



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0025918
(43) 공개일자 2021년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/06 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01) A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/39 (2019.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 31/122 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0105942
(22) 출원일자 2019년08월28일
심사청구일자 2019년08월28일

(71) 출원인
금오공과대학교 산학협력단
경상북도 구미시 대학로 61 (양호동)
주식회사 테라시온 바이오메디칼
경기도 성남시 중원구 사기막골로105번길 25, 807호(상대원동, 중앙인도스피아2차)
(72) 발명자
권오형
대구광역시 동구 송라로 11길 39, 603동 1605호 (신천동, 신천휴먼시아6단지)
김귀재
경상북도 구미시 대학로3길 35, 207호 (거의동) (뒷면에 계속)
(74) 대리인
김창덕

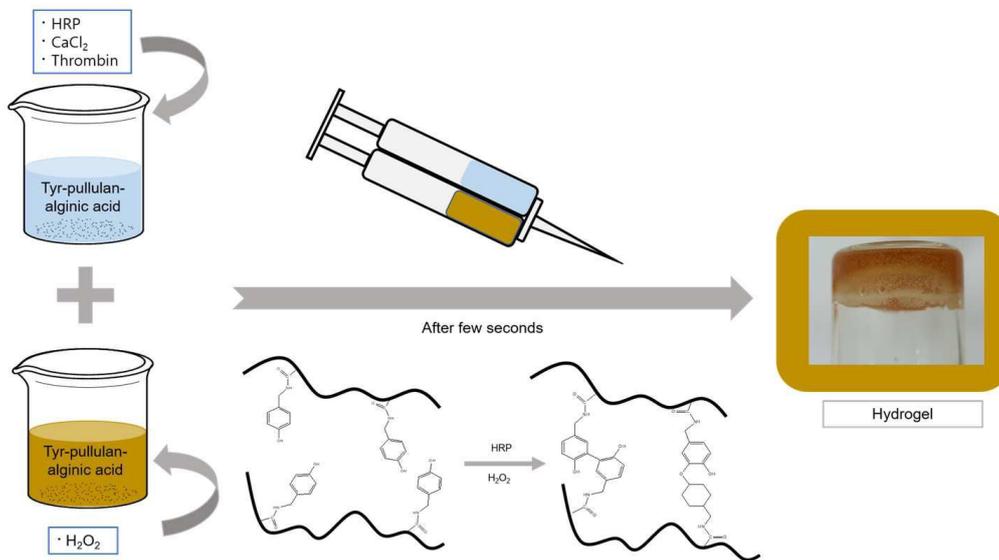
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 개선된 하이드로젤 지혈제 제조방법 및 그에 따른 지혈제

(57) 요약

본 발명은 폴루란과 알긴산을 이용한 하이드로젤 지혈제 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴루란과 알긴산이 포함된 하이드로젤에 염화칼슘과 트롬빈을 포함하여, 우수한 혈액응고능을 가짐과 동시에 창상치료에 효과적인 개선된 하이드로젤 지혈제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/375 (2013.01)

A61K 38/363 (2013.01)

A61K 38/39 (2013.01)

A61K 47/36 (2013.01)

A61P 7/04 (2018.01)

(72) 발명자

곽동민

대구광역시 북구 침산남로13길 8-2(침산동)

김은진

경기도 성남시 분당구 분당로263번길 13, 611동
803호(서현동, 효자촌대우아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0653694
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	맞춤형 기술파트너 지원사업
연구과제명	주사형 수화젤 지혈제의 제조기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	금오공과대학교 산학협력단
연구기간	2018.11.01 ~ 2019.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 폴루란에 카르복실기를 도입하는 단계;
- (b) 증류수에 알긴산을 첨가하여 알긴산 수용액을 제조하는 단계;
- (c) 상기 폴루란 및 알긴산 수용액을 혼합하여 교반한 후, 폴루란 및 알긴산의 측쇄에 티라민을 도입하는 단계;
- (d) 상기 티라민이 도입된 폴루란 및 알긴산을 투석 및 동결건조하여, 개선된 폴루란을 제조하는 단계; 및
- (e) 상기 개선된 폴루란을 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 과산화수소수(H₂O₂), 트롬빈 및 염화칼슘(CaCl₂)과 반응하여, 하이드로젤을 제조하는 단계;를 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a)단계에서 폴루란에 카르복실기를 도입하는 것은,

폴루란을 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘옥시(TEMPO), 소듐 브로마이드(NaBr) 및 소듐 하이포클로라이드(NaOCl)와 반응하여 치환하는 것인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a)단계에서 폴루란은 하이드로젤 지혈제의 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1 내지 50 중량부를 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

(b)단계에서 알긴산은 하이드로젤 지혈제의 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1 내지 80 중량부를 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b)단계에서 알긴산은 D-만루론산기 및 L-글루론산기를 포함하며, D-만루론산기와 L-글루론산기 중량비는 40 내지 70: 60 내지 30인 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (c)단계에서 티라민 도입은,

티라민, N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카르보다이이미드(EDC)와 반응하여 치환하는 것인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (c)단계에서 티라민을 도입 후, 치환율은 1 내지 15%인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (c)단계에서 개선된 폴루란은 중량평균분자량이 10,000 내지 750,000인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (e)단계에서 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 과산화효소(HRP)의 농도는 0.1 내지 5 중량부, 과산화수소수(H₂O₂)는 1 내지 30 중량부를 포함하는 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (e)단계의 반응은,

개선된 폴루란을 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 트롬빈 및 염화칼슘(CaCl₂)에 혼합하여, pH 6 내지 8의 실온에서, 20분 내지 1시간동안 인산염완충용액(PBS)에 용해시켜 1차 용액을 제조하고,

상기 1차 용액에 30% 과산화수소수(H₂O₂)인 2차 용액을 첨가하여, 5초 내지 2분동안 반응시켜서 하이드로젤을 제조하는 것인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 인산염완충용액 (PBS) 1 mL당 트롬빈은 100 내지 500 μg으로 포함하고, 인산염완충용액(PBS) 1 mL당 염화칼슘(CaCl₂)은 3 내지 15mM를 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 (e)단계에서 젤라틴, 키토산, 히알루론산, 알지네이트 및 셀룰로오스 유도체에서 적어도 어느 하나 이상을 더 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 (e)단계에서 지혈물질로 피브리노겐, 비타민 C, 비타민 K, 콜라겐, 젤라틴 및 미세젤폼(gelfoam)에서 선택된 적어도 어느 하나 이상을 더 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따라 제조된 개선된 하이드로젤 지혈제.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 하이드로젤 지혈제는 실온에서 점도가 10,000 내지 25,000cP인 개선된 하이드로젤 지혈제.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법 및 그에 따른 지혈제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴루란

[0001]

과 알긴산이 포함된 하이드로젤에 염화칼슘과 트롬빈을 포함하여, 우수한 혈액응고능을 가짐과 동시에 창상치료에 효과적인 하이드로젤 지혈제의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 출혈이란, 혈액이 혈관 밖으로 나오는 것을 의미하여, 온 몸을 구성하는 혈관들이 심장의 압력에 의해 혈관 안의 혈액을 몸 전체로 순환을 시키는 데, 일부 혈관에서 상처가 생기게 되면, 압력이 빠져나갈 공간이 생기게 되어, 혈액이 상처 밖으로 새는 것을 의미한다. 혈액이 혈관 밖으로 배출되는 출혈은 일상생활에서의 부상, 수술과 같은 의료 행위에서 일어날 수 있다. 큰 상처로 인한 과다출혈, 또는 상처로 인해 노출된 혈관에 세균이나 바이러스 등이 침투하게 되면 환자를 사망에 이르게 할 수 있기 때문에 피가 빨리 응고되어 효과적으로 혈액의 손실을 막고 노출된 혈관을 보호하기 위해서는 지혈이 필요하다.
- [0003] 지혈이란, 혈관에 상처가 나서 혈액이 외부의 이물질과 접촉하면 혈소판이나 혈장에 존재하는 여러 혈액 응고 인자가 복잡한 경로를 거쳐 혈전을 야기하여 상처부위의 출혈을 멎게 하는 것을 의미하며, 특히, 외과수술 시나 응급상황에서 발생하는 과다출혈의 경우, 효과적인 지혈방법의 사용이 추가적으로 요구되는 경우가 다반사이다.
- [0004] 지혈방법으로는 크게 기계적 방법, 냉온에 의한 방법 및 화학적 방법 등이 존재하는데, 이중 화학적 방법으로는 혈액응고제 등을 출혈부위에 처치하여 출혈을 멎게 하는 것이 대표적이다.
- [0005] 현재 화학적 방법을 적용한 의료용 제제인 지혈제에 대한 연구는 오래전부터 활발하게 진행되고 있다. 그 중에서 1960년대 Wichterle에 의해 폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트) (PHEMA)로 이루어진 하이드로젤이 개발된 이후로 이것이 가지는 친수성과 생체적합성은 생체재료분야에서의 응용되고 있다. 하이드로젤은 특성상 다량의 수분 혹은 생물학적 체액을 함유할 수 있는 삼차원의 친수성 고분자 망상구조를 가지고 있는 구조를 말한다. 이러한 하이드로젤의 네트워크 망상구조는 화학 결합 또는 물리적 응집 등 여러 요인에 의해 형성되어 수용액상에서 팽윤된 후에 열역학적으로 안정하게 존재하게 된다. 하이드로젤은 유연한 강도 및 높은 함유율을 가지므로 살아있는 조직과 유사하여 의학 혹은 약학분야에 널리 이용되고 있다.
- [0006] 특히, 하이드로젤을 이용한 주입형 시스템은 간단한 혼합만으로도 원하는 부위에 고효율의 전달 시스템을 설계하는 것이 가능하다. 또한 그 유동성은 결손된 부위를 채우는데 사용하기에도 적합한 물성을 가지고 있어 다양한 분야에서의 응용이 기대되는 방법이다.
- [0007] 하이드로젤을 주입형 재료로써 활용하기 위해서는 체외에서는 유체와 같이 유동성을 가지고 있으며 주입 후에는 물리적 혹은 화학적 자극에 의해 젤화되는 것을 필요로 한다. 분자의 얽힘에 의하거나 이온결합, 수소결합, 소수성 상호작용을 포함한 이차결합에 의해 하이드로젤을 형성하는 경우 가역적 혹은 물리적 하이드로젤이라고 부른다. 물리적 하이드로젤은 일반적으로 균일하지 못하며, 사슬의 중간부 혹은 말단이 일시적으로 결합하는 형태이다. 이러한 물리적 하이드로젤을 유지하는 상호작용은 가역적이며 물리적 조건 (온도, pH, 농도, 첨가물, 이온강도 등)이 변하면 붕괴될 수 있다.
- [0008] 그러나 주입 시 젤화되는 모델에서의 가장 큰 제약이라고 할 수 있는 것은 다양한 종류의 젤 전구체와 가교제의 농도에 큰 영향을 받는다는 것이다. 이는 가교제에 의해서 생체의학적인 제약이 생길 수도 있으며 가교제나 전구체에 의한 개질과 같은 효과를 나타내면서 강도등의 변화와 원하지 않는 기계적인 물성의 변화를 초래하기도 한다. 그리하여 이러한 약점을 극복하고자 최근에는 화학적 가교제의 선택에 있어서 천연물질에서 추출한 물질을 사용하는 등의 여러 가지 방면으로의 연구가 진행되어 오고 있는 실정이다.
- [0009] 예를 들어, 생체적합성, 생체분해성, 건조 안정성 과립상 물질을 포함하는 건조 저장-안정성 형태의 지혈 조성물은 WO 제98-008550호 또는 WO 제2003-007845호에 공지되어 있다. 이들 생성물은 지혈에 대하여 당업계에 성공적으로 적용되고 있으며, 상업적으로 상표 플로실(Floseal)®은 유동성 페이스트를 형성하기 위하여 트롬빈-함유 용액 중에서 팽윤된 과립상 젤라틴 매트릭스로 이루어진 강력하면서 다목적인 지혈제의 예이다.
- [0010] 다른 예로, 한국등록특허 제10-1814841호는 a) 응고 유도제의 건조 제제를 포함하는 제1의 성분을 제공하는 단계; b) 지혈에 사용하기 적절한 생체적합성 중합체의 건조 제제를 포함하는 제2의 성분을 제공하는 단계; c) c1) 최종 용기내의 건조 혼합물을 얻도록 상기 제1의 성분 및 상기 제2의 성분을 상기 최종 용기에 충전시키거나 또는 c2) 상기 최종 용기내의 상기 제1의 성분과 상기 제2의 성분의 배합물을 얻도록, 상기 제1의 성분 또는 상기 제2의 성분을 상기 최종 용기에 제공하고 그리고 상기 제2의 성분 또는 상기 제1의 성분을 첨가하여 상기 제1의 성분 및 상기 제2의 성분을 배합된 형태로 최종 용기에 제공하는 단계, d) 건조 및 안정한 지혈 조성물로서 상기 제1의 성분 및 상기 제2의 성분을 배합된 형태로 함유하는 저장 가능한 제약 장치로 최종 용기를 피니

쉬 처리하는 단계를 포함하는, 건조 및 안정한 지혈 조성물의 제조 방법에 관한 것을 개시하고 있다.

[0011] 한국등록특허 제10-1103423호는 생체 주입형 조직 접착성 하이드로젤 및 이의 생의학적 용도에 관한 내용을 개시하고 있다. 보다 상세하게는 도파 또는 이의 유도체를 포함하는 생체 주입형 조직 접착성 하이드로젤에 관한 것으로, 상기 생체 주입형 조직 접착성 하이드로젤은 종래 조직 접착성 하이드로젤과 달리 체내에서 일어나는 효소 반응에 의한 in situ 가교 형성을 유도하여 하이드로젤을 형성함으로써 보다 생체적합성이 우수한 in situ 형성 조직 접착성 하이드로젤을 제공하며 동시에 합성 고분자와 천연 고분자의 하이브리드화로 인하여 생체적합성 및 기계적 강도가 우수하고 도파 유도체의 결합을 통해 우수한 조직 접착력을 제공함을 언급하고 있다.

[0012] 상기와 같이 지혈효과, 생체적합성 및 경제성 등에서 두루 우수한 지혈제에 대한 개발의 필요성은 계속적으로 요구되고 있으며, 이에 본 발명은 고추냉이에서 추출한 효소인 서양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)를 하이드로젤을 지혈제에 적용하여 다루기 쉽고 우수한 혈액응고능을 나타내며, 나아가 천연 고분자인 알긴산을 더 포함하여, 창상치료효과를 더한 개선된 지혈제를 제공하기 위하여 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점과 기술적 과제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 출혈부위에 적용되어 생체 내 생분해성을 제공하고, 우수한 지혈능 유효성을 제공하는 것에 목적이 있다.

[0015] 나아가, 창상면에서 효과적인 상처치유능력 및 접착성을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 따라서, 내시경, 복강경 시술 등의 외과적 시술에서도 사용에 있어서, 상처치유능까지 제공하여, 기술의 활용성을 향상시키는 것에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기한 바와 같은 본 발명의 목적을 달성하고, 후술하는 본 발명의 특징적인 효과를 실현하기 위한, 본 발명의 특징적인 구성은 하기와 같다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법은 다음과 같다.

[0019] (a)폴루란에 카르복실기를 도입하는 단계; (b)증류수에 알긴산을 첨가하여 알긴산 수용액을 제조하는 단계; (c)상기 폴루란 및 알긴산 수용액을 혼합하여 교반한 후, 폴루란 및 알긴산의 측쇄에 티라민을 도입하는 단계; (d)상기 티라민이 도입된 폴루란 및 알긴산을 투석하고 동결건조하여 개선된 폴루란을 제조하는 단계; 및 (e)상기 개선된 폴루란을 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 과산화수소수(H₂O₂), 트롬빈 및 염화칼슘(CaCl₂)과 반응하여, 하이드로젤을 제조하는 단계;를 포함하는 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법이 제공된다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 제조방법에 따라 제조된 개선된 하이드로젤 지혈제가 제공된다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 폴루란과 알긴산을 포함하여 개선된 하이드로젤 지혈제를 제공하는 효과가 있다.

[0022] 본 발명에 따른 개선된 하이드로젤 지혈제는 지혈을 촉진하는 혈액응고인자를 도입하고, 이들이 효과를 나타내는 최적의 농도를 설정하여 지혈제의 혈액응고능을 최적화하는 효과가 있다. 또한, 천연 고분자를 포함하여 생체 안정성 및 접합성이 우수한 효과가 있다.

[0023] 본 발명에 따른 개선된 하이드로젤 지혈제는 알긴산을 포함하여, 과량의 삼출물이 있는 창상면에서 효과적인 상처치유능력 및 접착성을 제공하는 효과가 있다.

[0024] 본 발명에 따른 개선된 하이드로젤 지혈제는 주입형 하이드로젤 형태로 제조되어 다루기 쉽고, 유동성이 향상된 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따라 폴루란에 카르복실기를 도입하기 위한 TEMPO 반응의 공정을 나타내는 도면이다.

도 2는 카르복실기가 도입된 폴루란과 알긴산에 티라민을 도입하기 위한 EDC 반응 공정을 나타내는 도면이다.

도 3은 하이드로젤의 제조 과정을 나타내는 도면이다.

도 4는 HRP 농도에 따른 젤화시간을 나타내는 도면이다.

도 5는 HRP 농도에 따른 하이드로젤의 유변학적 특성을 레오미터를 통해 나타낸 도면이다.

도 6은 HRP 농도에 따른 swelling ratio를 통해 crosslinking density 정도를 나타내는 도면이다.

도 7은 개선된 폴루란의 농도에 따른 하이드로젤의 in vitro 생분해 평가를 나타내는 도면이다.

도 8은 개선된 폴루란 하이드로젤을 이용한 적혈구 용혈 실험을 나타내는 도면이다.

도 9는 SD rat을 이용한 지혈동물실험을 나타내는 도면이다.

도 10은 SD rat을 이용한 지혈동물실험의 개선된 폴루란 농도별 결과를 나타내는 사진이다.

도 11은 SD rat을 이용한 개선된 폴루란 농도별 결과에서 출혈양을 그래프로 나타낸 도면이다.

도 12는 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 간의 지혈부위를 H&E staining을 통해 조직학적으로 관찰한 결과이다.

도 13은 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 간의 지혈부위를 carstairs staining을 통해 조직학적으로 관찰한 결과이다.

도 14는 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 피부 창상부위의 상처 크기 감소율을 그래프로 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 후술하는 본 발명에 대한 상세한 설명은, 본 발명이 실시될 수 있는 특정 실시예를 예시로서 도시하는 첨부 도면을 참조한다. 이들 실시예는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있기에 충분하도록 상세히 설명된다. 본 발명의 다양한 실시예는 서로 다르지만 상호 배타적일 필요는 없음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 여기에 기재되어 있는 특정 형상, 구조 및 특성은 일 실시예에 관련하여 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 다른 실시예로 구현될 수 있다. 또한, 각각의 개시된 실시예 내의 개별 구성요소의 위치 또는 배치는 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 후술하는 상세한 설명은 한정적인 의미로서 취하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는, 적절하게 설명된다면, 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다. 도면에서 유사한 참조부호는 여러 측면에 걸쳐서 동일하거나 유사한 기능을 지칭한다.

[0027] 이하, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시예들에 관하여 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.

[0029] 본 발명에 따른 폴루란을 이용한 하이드로젤 지혈제는 생분해성, 비독성 및 생체친화성을 갖는 폴루란을 주요 성분으로 하며, 티라민 및 과산화수소수(H_2O_2)와 함께 반응하여 가교제로서 역할을 수행하며 생분해성과 생체적 합성이 우수한 가교제로 알려져 있는 서양고추냉이 과산화효소(HRP)를 이용하여 제조된다. 나아가, 알긴산을 포함하여, 우수한 생체친화성 및 육아조직의 성장에 도움을 줄 수 있어, 창상치료효과를 동시에 제공할 수 있다.

[0030] 폴루란(pullulan)은 아우레오바시둠 폴루란스(Aureobasidium pullulans)가 세포외(extracellular)로 생산하는 물질로서, 주로 3개의 글루코오스가 α -1, 3 결합된 말토트리오스가 α -1, 6 결합으로 반복 결합된 직쇄상의 글루칸으로 형성 되어 있다. 상세한 구조 연구에 의해 폴루란은 말토트리오스 단위만의 반복 구조만으로 형성된 것이 아니라 말토테트라오스가 수 % 함유되어 있으며, 분자의 말단은 글루코오스이고 텍스트란과는 다른 구조로 이루어져 있다고 밝혀져 있다. 이런 구조를 가진 폴루란은 무미무취하고 부정형의 백색분말로 각종 독성, 변이 원성 시험 결과에 대해 아무 문제가 없어 국내외에서 식품 첨가물로 인가되어 있다. 또한 다른 다당류에 비해 물에 녹기 쉽고 저점성이지만 부착성과 실같이 늘어나는 성질이 강하며 안정한 중성용액으로 여러 가지 응용이 용이한 다당류 물질이다. 그리고 수용액의 점성은 온도 의존성이 비교적 낮고 각종 염류 및 pH의 영향을 적게 받는 특성을 가지고 있다. 한 예로서 각종 금속 이온이 공존하는 폴루란 수용액의 (1% 수용액, 25°C, 30 rpm)

점도가 250 ~ 300cp로 풀루란 분자 중의 -OH기와 킬레이트를 형성한다고 생각되는 티탄, 붕소 이온의 경우를 제외하면, 어느 경우도 점도의 증가나 젤이 형성되지 않는다. 그리고 접착성이 우수한 특성과 함께 구조상 많은 미생물에 의해서 완전히 자화되어 최종적으로는 탄화가스와 물로 변환되는 생분해성적인 특성을 가진 고분자 물질이다.

[0031] 알긴산(alginic acid)의 경우, 다시마 등 해조류에 포함되어 있는 알긴산은 양질의 식이섬유 기능을 나타내는 다당류 이다. 이를 해초산(海草酸)이라고도 한다. 알긴산은 2종의 우론산의 중합체로 중합도 80이고, 분자량 1,500 정도이다. 묽은 황산으로 씻은 갈조를 묽은 알칼리성의 더운물에서 추출하여 추출액을 산성으로 만들면 생기는 침전이 알긴산이다. 알긴산은 분자 속에 우론산의 카르복시기(COOH-)가 있으므로 산의 성질을 나타내는데, 보통은 나트륨염으로 다룬다. 알긴산은 1957년까지는 만루론산만으로 되어 있다고 생각하였으나, 최근에 L-글루론산도 알긴산의 구성성분인 것이 밝혀졌다. 구조는 만루론산과 L-글루론산이 β-1,4 결합으로 수백 개가 연결된 것이다. 또한, 분자중에는 만루론산만 또는 L-글루론산만이 길게 결합된 곳이 있다. M/G비율(만루론산과 L-글루론산의 존재량 비)은 해조의 종류에 따라 다르다. 낮은 M/G비율은 단단하고 부서지기 쉬운 젤을 형성하고, M/G비율이 높은 경우에는 보다 탄성적인 젤을 형성한다. 알긴산은 대부분이 칼륨, 나트륨, 칼슘과 결합하여 존재하고 있다. 최근에는 알긴산이 다양한 금속 (Co,Cu,Cd,Zn 등)과 결합하여 자연적으로 생고분자(ge l)를 생성하고 합성된 물질이 이온교환 능력을 가지고 있다는 점이 밝혀졌으며, 이 생고분자는 환경에서 중금속 등을 흡착하는 능력 이외에도 가공(crosslinking)방법이나 첨가물 등을 조절하여 다양한 특성을 지닌 생분해 고분자로 합성이 가능하다.

[0032] 또한, 알긴산의 중요한 특성은 생체친화성 및 육아조직의 성장에 도움이 되는 것이며, 특히, 생분해 고분자 등으로 의료용 하이드로젤 등에 포함되어, 우수한 생체친화성을 제공한다. 이는, 천연물에서 유래한 3차원 구조의 친수성 고분자로 그 구조에 많은 양의 물을 함유하고 있고, 알긴산이 생체조직의 구성 성분인 세포외기질(Extracellular matrix)과 유사하게 수화된 구조로 되어 있기 때문이다. 따라서, 본 발명에서는 풀루란을 포함한 하이드로젤에 나아가 알긴산을 포함하여, 하이드로젤의 상처치유효과를 극대화시킨다. 일반적으로 알긴산은 전체 조성물 포함되는 중량% 및 분자량에 따라 하이드로젤의 물성이 변하기 때문에, 하이드로젤을 제조 시 알긴산의 적절한 중량 %와 분자량을 고려하는 것이 중요하다.

[0033] 서양고추냉이 과산화효소(HRP)는 티라민(tyramine)과 과산화수소수(H₂O₂)와 함께 반응하여 가교제로서 역할을 수행하며, 생분해성과 생체적합성이 우수한 가교제로 알려져 있다. 반응은 크게 2가지 단계로 반응이 진행되는데 첫 번째 단계로 HRP가 과산화수소수에 의해서 산화되고, 두 번째 단계로 산화된 HRP는 티라민에 있는 페놀 그룹을 산화시켜서 중간체를 형성한다. 이렇게 생성된 물질로 인해서 가교점이 생성되어서 네트워크 구조를 형성하게 되는 것이다. 이때의 중요한 요소로는 H₂O₂와 HRP의 농도에 의해서 기계적 강도와 하이드로젤 형성 시간을 쉽게 조절할 수 있다는 점이다.

[0034] 이에 본 발명에 따른 개선된 하이드로젤은 풀루란과 알긴산을 원료로 하고 서양고추냉이 과산화효소(HRP)를 가교제로 이용한 제조방법이 제공된다.

[0035] i) TEMPO 반응을 이용하여 풀루란에 카르복실기를 도입하는 단계, ii) 증류수에 알긴산을 첨가하여 알긴산 수용액을 제조하는 단계, iii) 상기 카르복실기가 도입된 풀루란과 알긴산에 티라민을 도입하기 위한 EDC 반응 단계, iv) 티라민이 도입된 풀루란 및 알긴산을 서양고추냉이 과산화효소 및 과산화수소수를 반응시켜 하이드로젤을 제조하는 단계를 포함한다.

[0036] 보다 자세하게는, 본 발명에 따른 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법은 (a) 풀루란에 카르복실기를 도입하는 단계; (b)증류수에 알긴산을 첨가하여 알긴산 수용액을 제조하는 단계; (c)상기 풀루란 및 알긴산 수용액을 혼합하여 교반한 후, 풀루란 및 알긴산의 측쇄에 티라민을 도입하는 단계; (d)상기 티라민이 도입된 풀루란 및 알긴산을 투석 및 동결건조하여 개선된 풀루란을 제조하는 단계; 및 (e)상기 개선된 풀루란을 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 과산화수소수(H₂O₂), 트롬빈 및 염화칼슘(CaCl₂)과 반응하여, 하이드로젤을 제조하는 단계;를 포함한다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 (a)단계에서 풀루란에 카르복실기를 도입하는 것은, 풀루란을 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO), 소듐 브로마이드(NaBr) 및 소듐 하이포클로라이드(NaOCl)를 용매인 증류수에서 혼합하여 치환반응하여 도입할 수 있다. 이는 풀루란에 티라민을 도입하기 위하여, 먼저 카르복실산을 도입 한 후, 카르복실기에 티라민기를 순차적으로 도입하기 위함이다.

[0038] 본 발명에 따른 상기 (a)단계에서 풀루란은 하이드로젤 지혈제의 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1 내지 10

중량부를 포함하여 제공된다. 바람직하게는 5 내지 50 중량부로 포함할 수 있다. 상기 범위보다 높은 범위를 갖게 되는 경우 생체 내에서 하이드로젤의 점도가 너무 높아져 젤화에 시간이 오래 걸리게 되어 지혈시간을 지연시키게 되고 상기 범위보다 낮은 범위를 갖게 되는 경우 하이드로젤의 조직접착성이 떨어질 수 있다. 따라서, 1 내지 50 중량부를 제공하여 이러한 문제점을 해결할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 상기 (b)단계에서 알긴산은 하이드로젤 지혈제의 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1 내지 80 중량부를 포함하여 제공된다. 상기 범위에서 하이드로젤로 제조 시, 기계적 물성을 최적화 시키면서, 창상치료용 알긴산 하이드로젤의 상처치유효과를 제공할 수 있다. 나아가 상처에 너무 세게 달라붙는 단점을 보완하면서 건조 한 경우, 상처로부터 쉽게 제거가 가능하다.

[0040] 또한, 상기 알긴산은 D-만루론산기 및 L-글루론산기를 포함하며, D-만루론산기와 L-글루론산기 중량비는 40 내지 70: 60 내지 30인 것을 특징으로 한다. 전술한 바와 같이, 알긴산에서 M/G비율(만루론산과 L-글루론산의 존재량 비)은 해조의 종류에 따라 다르다. 낮은 M/G비율은 단단하고 부서지기 쉬운 겔을 형성하고, M/G비율이 높은 경우에는 보다 탄성적인 겔을 형성한다. 따라서, 상기 40 내지 70: 60 내지 30인 것을 제공하여, 균형적인 단단함과 탄성의 제공이 가능하다.

[0041] 본 발명에 따른 상기 (c)단계에서 티라민 도입은, 티라민, 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카르보다이미드(EDC)와, N-하이드록시석신이미드(NHS)를 사용하여 EDS-NHS 반응을 진행하여, 측쇄에 치환할 수 있다. 티라민의 도입은 고분자 사이를 연결하는 가교점을 의미한다. 따라서, 도입된 티라민기의 치환도에 따라 하이드로젤의 젤 형성시간 및 기계적 강도를 조절할 수 있음을 의미한다. 나아가, 기계적 물성을 통하여, 하이드로젤의 기능성 발휘에도 영향을 미칠 수 있음은 물론이다.

[0042] 본 발명에 따른 상기 (c)단계에서 티라민을 도입 후, 폴루란과 알긴산의 측쇄에 티라민 치환율은 1 내지 15%로 제공된다. 서양고추냉이 과산화효소(HRP)가 가교제로서 작용하기 위해서는 티라민기를 필요로 하지만 폴루란 및 알긴산에는 티라민기가 존재하지 않으므로 폴루란 및 알긴산을 이용하기 위해서는 폴루란에 티라민기의 도입이 필요하다. 하이드로젤의 기계적 강도와 젤 형성 시간을 고려할 때, 티라민의 치환율은 약 1 내지 15%가 제공될 수 있으며, 바람직하게는 약 4 내지 10%가 제공될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 상기 측쇄에 티라민이 치환된 폴루란은 중량평균분자량이 10,000 내지 750,000인 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조방법이 제공된다. 보다 구체적으로 살펴보면, 폴루란은 중량평균분자량이 50,000 내지 250,000g/mol이고, 바람직하게는 100,000 내지 200,000g/mol일 수 있다. 개선된 폴루란에 포함되는 알긴산의 경우는 중량평균분자량이 10,000 내지 500,000g/mol일 수 있으며, 바람직하게는 100,000 내지 300,000g/mol일 수 있다. 상기 범위보다 높은 범위를 갖게 되는 경우 하이드로젤의 점도가 높아지기 때문에 그 조작 용이성이 떨어질 수 있고, 제조 공정상 균일하지 못한 결과물을 만들 수 있다. 반대로 낮은 범위를 갖게 되는 경우 하이드로젤의 충분한 기계적강도를 확보하지 못하는 문제점이 있을 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 하이드로젤을 제조하기 위하여, 상기 (c)단계에서 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 과산화효소(HRP)의 농도는 0.1 내지 5 중량부, 과산화수소수(H_2O_2)는 1 내지 30 중량부를 포함하여 제공된다. 하이드로젤은 과산화효소(HRP) 및 과산화수소의 농도를 조절하여 젤화 시간, 분해 시간, 기계적 강도, 또는 함수율에서 선택되는 물리화학적 성질을 조절할 수 있다. 과산화수소수에 의해 산화된 HRP는 개선된 폴루란에 도입된 티라민기에 있는 폐놀기를 산화시켜 중간체를 형성하며, 이로 인해 가교점이 생성되어 네트워크 구조를 형성함으로써 주입형 하이드로젤이 형성되게 된다. 즉, 천연물에서 유리한 생체친화적인 서양고추냉이 과산화효소를 가교제로 이용하여 가교 반응을 진행할 수 있다. 상기 범위에서 하이드로젤의 젤화 시간, 기계적 강도를 용이하게 조절이 가능하고 기계적 강도와 우수한 체내 안정성을 갖는 in situ 형성 하이드로젤의 제공이 가능하다. 따라서, 체외에서 사용자가 조작에 용이한 액상 제형의 형태로 제공이 가능하다.

[0045] 본 발명에 따른 상기 (d)단계에서 상기 티라민이 도입된 폴루란 및 알긴산을 투석 및 동결건조하여, 알긴산을 포함하는 개선된 폴루란을 제조할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 (e)단계의 혼합은, 개선된 폴루란을 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 트롬빈 및 염화칼슘($CaCl_2$)과 반응하여, pH 6 내지 8의 실온에서, 20분 내지 1시간동안 인산염완충용액(PBS)에 용해시켜 1차 용액을 제조하고, 상기 1차 용액에 30% 과산화수소수(H_2O_2)인 2차 용액을 첨가하여, 5초 내지 2분동안 반응시켜서 하이드로젤을 제조하는 것을 제공할 수 있다.

[0047] 즉, 두 단계로 나누어 진행될 수 있는데, 개선된 폴루란, 서양고추냉이 과산화효소(HRP), 트롬빈(92.6

units/mg) 및 염화칼슘(CaCl₂)을 실온에서 20분 내지 1시간, 바람직하게는 30분 동안 pH 6 내지 8, 바람직하게는 pH 7의 인산염완충용액(PBS)에 용해시켜 1차 용액을 제조하는 단계와 상기 1차 용액에 티라민 치환된 폴루란 및 30% 과산화수소수(H₂O₂)를 실온에서 pH 6 내지 8, 바람직하게는 pH 7의 인산염완충용액(PBS)에 용해시켜 만든 2차 용액을 첨가하여 5초 내지 2분 동안 반응시켜서 하이드로젤을 제조하는 단계로 구성된다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 인산염완충용액 (PBS) 1 mL당 트롬빈은 100 내지 500 μg으로 포함하고, 인산염완충용액 (PBS) 1 mL당 염화칼슘은 3 내지 15mM을 포함할 수 있다. 이 수치범위보다 낮은 경우 지혈 효과가 떨어지고, 높은 경우 경제적 손실을 초래할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 상기 (e)단계에서 젤라틴, 키토산, 히알루론산, 알지네이트 및 셀룰로오스 유도체에서 적어도 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있고, 지혈물질로 피브리노겐, 비타민 C, 비타민 K, 콜라겐, 젤라틴 및 미세젤 폼(gelfoam)에서 선택된 적어도 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 따른 상기 제조방법에 따라 제조된 개선된 폴루란을 이용한 하이드로젤 지혈제가 제공된다.

[0051] 이 경우, 상기 하이드로젤 지혈제는 실온에서 점도가 10,000 내지 25,000 cP일 수 있고, 접착 강도가 10 내지 30kPa로 제공될 수 있다. 상기 범위를 만족하는 경우 하이드로젤 지혈제가 지혈 부위로부터 이탈되거나 유실되는 현상을 방지하면서 창상치료에 효율적인 효과를 제공한다. 상기 점도 범위보다 높은 범위를 갖는 경우 수술 시 조작용이성에 대한 문제가 생기게 되면서, 반대로 상기 범위 보다 낮은 범위를 갖게 되는 경우 조직 부착성 및 저장성에 문제가 발생하고, 창상치료의 효율 역시 저하된다.

[0052] 또한, 본 발명의 하이드로젤 지혈제는 주사형, 스프레이형, 겔형, 액형 및 에어로졸 형태 등으로 이용될 수 있으며, 바람직하게는 주사형으로 제공된다. 이에 따라 창상면이나 복강경 수술등에 용이하게 제공하여 기술의 활용성을 향상시키는 효과를 제공할 수 있다.

[0053] 더불어, 상기 점도 및 접착 강도 범위를 제공함으로써, 더욱 효과적으로 활용이 가능하다.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] < 실시예 >

[0057] 1. 폴루란에 카르복실기를 도입하는 단계

[0058] 폴루란의 개질을 위하여, 먼저 폴루란에 카르복실기를 도입하고자 알드리치(Aldrich)사에서 구입한 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시, 자유 라디칼(TEMPO)과 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)사에서 구입한 소듐 브로마이드(NaBr)와 소듐 하이포클로라이드 용액을 이용하였다. 폴루란을 TEMPO 그리고 NaBr과 함께 3차 증류수에 넣고 1°C에서 충분히 교반시켜 준다. 이후 15% NaOCl 용액을 첨가 하면서 용액의 pH를 4M HCl를 서서히 첨가하여 9.5로 유지하면서 0.5 M NaOH 용액을 넣어 주면서 약 120분 정도 교반하여 준다. 그 후에 반응을 종결시키기 위하여 메탄올을 첨가하여 준 후에 4M HCl을 이용하여 중성화하여 준다. 그 다음 용액을 아세톤으로 침전 시킨 후 미 반응 물질을 제거하기 위하여 침전 과정을 2 ~ 3회 정도 반복 한 후 용액을 감압 건조하여 카르복실기가 도입된 폴루란을 제조하였다. 이에 대한 공정을 도 1에 도시하였다.

[0060] 2. 알긴산 수용액을 제조하는 단계

[0061] 먼저 알긴산 1 내지 10 중량%를 3차 증류수에 넣고 약 3 내지 5시간 동안 충분히 교반하여 준 후 만들어진 용액을 알긴산 수용액을 제조하였다.

[0063] 3. 알긴산과 폴루란에 티라민을 도입하여 개선된 폴루란을 제조하는 단계

[0064] 앞서 제조된 카르복실기가 도입된 폴루란과 알긴산 수용액을 혼합하여 교반한 후, 이들에 티라민기를 도입하고자 플루카(Fluka)사에서 구입한 티라민, 와코(Wako)사에서 구입한 N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 TCI사에서 구입한 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카르보다이이미드(EDC)를 이용하여 반응을 진행하였다.

[0065] 우선 카르복실기가 도입된 폴루란과 알긴산 수용액을 약 3 ~ 5시간 충분히 교반하여 준 후 만들어진 용액에 티

라민과 EDC 그리고 NHS를 함께 용액에 넣고 pH를 4.7로 유지하여 주면서 약 12시간 교반한다. 그 후에 만들어진 용액을 4M HCl을 이용하여 중화한 뒤 반투석막에 넣어 100mM NaCl 용액, 25% 에탄올 그리고 증류수에서 각각 약 2일, 1일, 1일씩 4일간 투석하여 준다. 투석을 마친 용액을 동결 건조하여 티라민이 도입된 알긴산이 포함된 개선된 폴루란 샘플을 제조하였다. 이에 대한 공정을 도 2에 도시하였다.

[0067] 4. 개선된 하이드로젤 지혈제의 제조

[0068] 앞서 제조된 티라민 치환된 폴루란과 알긴산에 암레스코(Amresco)사에서 구입한 서양고추냉이 과산화효소 (232unit/mg, HRP), 대정(Daejung)사에서 구입한 과산화수소(H₂O₂), 트롬빈(92.6 units/mg) 및 염화칼슘을 첨가하여 실온에서 30분 동안 pH 7에서 용해시킨 다음에, 30% 과산화수소와 티라민 치환된 개선된 폴루란을 용해한 용액을 첨가하여 60초 이내로 반응시켜 최종적으로 개선된 하이드로젤 지혈제를 제조하였다. 이에 대한 제조과정을 도 3에 도시하였다.

[0070] < 실험예 >

[0071] 실험예 1 하이드로젤화 시간 분석

[0072] 도 4는 HRP 농도에 따른 젤화시간을 나타내는 도면이다. 결과에 따르면, HRP의 농도가 높을수록 젤화시간은 감소하였다. 이 경우, 개선된 폴루란의 농도는 0.3 g/ml로 제공하였다. 이 경우, HRP의 농도는 200 내지 900 units/ml를 제공하였으며, 이 경우, HRP의 농도는 692 units/ml 이상일 경우 젤화가 5초 이내에 이루어짐을 확인하였다.

[0074] 실험예 2 유변학적 특성 분석

[0075] 실시예에 따라 제조한 하이드로젤의 유변학적 특성을 파악하고자 Thermo Scientific HAAKE MARS II Rheometer (Thermo Scientific HAAKE MARS II Rheometer, Thermo, Germany)를 사용하였다. 사용된 레오미터(Rheometer)는 고분자 물질뿐만 아니라 용액, 에멀전, 서스펜션, 열경화성 재료의 유변학적 물성(물질의 점도, 탄성률, 응력, 전단속도 등)을 측정하는 기기로서 미지의 재료에 대한 물질정보를 유동과 변형을 부과하여 물리적인 방법으로 물질의 구조 및 특성을 파악 할 수 있다. 다만, HRP 농도를 346, 519, 692 및 865units/ml로 제공하여 하이드로젤의 유변학적 특성(저장탄성률)을 레오미터로 나타낸 결과를 도 5에 도시하였다.

[0077] 실험예 3 개선된 폴루란 농도에 따른 swelling ratio 분석

[0078] 지름 1 cm, 높이 0.5 cm의 알루미늄 팬에 실시예에 따라 제조한 하이드로젤을 주사하여 일정 크기의 하이드로젤을 만든 뒤, 50 ml PBS 용액 (pH 7.2, 37℃)에 넣어 1, 3, 5, 10, 15 분이 지난 뒤 무게를 측정하였다. Swelling ratio는 다음과 같은 식으로 계산을 하였다.

[0079]
$$\text{Swelling ratio (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

[0080] Ws: swelling된 하이드로젤의 무게이다.

[0081] Wd: 동결건조된 하이드로젤의 무게이다.

[0083] HRP 농도에 따른 swelling ratio를 통해 crosslinking density 정도를 도 6에 나타내었다. 다만, HRP 농도를 173, 346, 519units/ml로 제공하였다.

[0085] 실험예 4 개선된 폴루란 하이드로젤의 in vitro 생분해성 평가

[0086] 실시예에 따라 제조한 하이드로젤 지혈제의 생분해거동을 알아보기 위한 in vitro 생분해 거동을 확인하였다.

샘플을 50 mL cornical tube에 넣은 후 25 mL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액을 넣고 shaking bath (90 rpm, 37°C)에 넣어 시간경과 (0, 5, 12, 24 h)에 따른 하이드로젤의 생분해 거동을 관찰하였다. 시간에 따라 회수한 시편은 새로운 10 mL cornical tube에 넣고 동결건조 한 뒤 무게를 측정하였다. 다만, 폴루란의 농도는 0.3, 0.4, 0.5 g/mL으로 제공하였다.

[0087] 개선된 폴루란의 농도(0.3, 0.4, 0.5 g/mL)가 높아짐에 따라 6시간 후 *in vitro* 환경에서의 생분해 거동을 관찰하였을 때, 각각 20.1%, 18.2%, 16.0%의 무게 감소율을 보였고, 24간 후에는 각각 50.0%, 48.1%, 46.5% 임을 확인하였다. 10일 후에는 각각 75.0%, 73.6%, 71.8%의 무게 감소율을 보였고, 20일 후에는 모든 샘플이 분해되었음을 관찰할 수 있었다. 이에 대한 결과는 도 7에 도시하였다.

[0089] 실험예 5 트롬빈 및 염화칼슘 농도에 따른 PRT 실험

[0090] 실시예에 따라 제조한 하이드로젤 제조 시 트롬빈 및 염화칼슘을 포함하여 농도별 혈액응고능 실험을 시행하였다. 각 농도의 지혈제를 37%로 맞춘 항온수조 위 시계접시에 300 μL 첨가 후, 혈액을 3000rpm 이상으로 원심분리하여 얻은 PPP(Platelet-poor-plasma) 300 μL 를 시계 접시 위 용액에 첨가하였다. 이 후 혈전이 생성되는 시간을 측정하였다. 이에 대한 결과를 표 1 및 표 2에 나타냈다.

표 1

[0091]

Trombin(μg/300 μL)	Time(s)
20	16
40	10
60	6
80	5
100	5

표 2

[0092]

CaCl ₂ /(mol/L)	Time(s)
0.003	227
0.006	206
0.009	108
0.012	134
0.015	166

[0093] 표 1과 같이 트롬빈의 경우 60 μg/300 μL에서 6초라는 결과가 나온 것을 보아 가장 효율적인 농도로 보이며, 표 2와 같이 CaCl₂의 경우 농도가 너무 높거나 낮을 경우 지혈 효과가 떨어지는데 0.009 mol/L 일 때 108초로 가장 효율적임을 확인하였다.

[0095] 실험예 6 제조된 하이드로젤 지혈제의 적혈구 용혈 실험

[0096] 혈액 응고 후의 잔여 적혈구 양을 측정하기 위해 적혈구 용혈 실험을 실시하여, 용혈된 적혈구에서 나온 헤모글로빈의 흡광도를 통해 혈액 응고능을 확인하였다. 대조군은 하이드로젤 샘플을 도입하지 않은 채로 혈액응고 반응을 진행한 경우이다. 실험예 6의 경우, 실시예에 따라 제조한 하이드로젤 지혈제를 제공하였으며, 다만, 폴루란의 농도는 0.3, 0.4, 0.5 g/mL으로 제공하였다.

[0097] 일정 시간 후 샘플 위에 5 mL의 증류수를 첨가하여 혈액응고반응을 정지시킨 후 얻은 상등액을 96 well plate에 분주하여 헤모글로빈의 흡광도를 측정한다. 혈액응고가 많이 진행되면 잔여 적혈구의 양이 적기 때문에 용혈을 통해 방출된 헤모글로빈의 양도 적으므로, 헤모글로빈의 흡광도 세기를 통해 지혈능을 관찰할 수 있다. 이에 대한 결과는 도 8에 도시하였다.

[0099] 실험예 7 *in vivo* 동물모델 실험

[0100] 1) 실시예에 따라 제조된 하이드로젤 지혈제의 *in vivo* 지혈 실험

[0101] 도 9는 SD rat을 이용한 지혈동물실험방법을 나타내는 사진이다. SD rat에 Zoletil[®] 50과 Rompun[®]을 4:1 비율로 섞은 동물용 마취제를 투여하여 마취한 후 SD rat이 마취되면 복부 부위의 털을 제모하여 수술대에 45°로 기울여 고정하였다. 포비돈 요오드 용액으로 복부 제모 부위를 소독한 후 중앙에 10번 블레이드를 이용하여 약 20 내지 30 mm 절개하고 피부 및 복막을 박리하여 양측방으로 거상시켜 간을 노출시켰다. 미리 무게를 재둔 필터페이퍼를 간 밑에 배치한 후, 마개 위로 3 mm 노출된 10번 블레이드를 이용하여 깊이 3 mm의 상처를 간 좌엽에 내고, 출혈이 시작되면 제조된 개선된 하이드로젤 지혈제 0.5 ml를 도입하여 지혈이 되는 시간을 측정하였다. 지혈이 되면 혈액을 흡수한 필터페이퍼와 하이드로젤 무게를 재어, 출혈량을 계산하였다.

[0102] 도 10은 SD rat을 이용한 지혈동물실험에서 제조된 폴루란의 폴루란 농도를 조절(0.3, 0.4, 0.5 g/mL)하여 그에 따른 결과를 나타내는 사진이다.

[0103] 도 11은 SD rat을 이용한 개선된 폴루란 농도(0.3, 0.4, 0.5 g/mL)별 결과에서 출혈량을 그래프로 나타낸 도면이다. 출혈량의 경우 대조군이 1,080.6 mg, 개선된 폴루란 0.3, 0.4, 0.5 g/ml의 경우 각각 580.6, 300.3, 231.7 mg의 출혈이 나타났음을 확인하였고, 0.5 g/ml의 경우 지혈 효과가 가장 큼을 확인할 수 있었다.

[0104] 또한, 도 12에 기재된 조건으로 제조된 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 간의 지혈부위를 H&E staining을 통해 조직학적으로 관찰한 결과를 도 12에 나타냈다. 세포의 핵은 파랗게, 세포질은 붉게 염색되는데 상처부위가 붉은 것을 보아 상처부위에 적혈구가 잘 얹혀있음을 확인할 수 있었다.

[0105] 더불어, 도 13에 기재된 조건으로 제조된 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 간의 지혈부위를 carstairs staining을 통해 조직학적으로 관찰한 결과를 도 13에 나타냈다. 이 염색법은 피브린을 붉게, 혈소판은 푸르게 염색시키는데, 상처부위가 붉은 것을 보아 피브린이 잘 형성되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0107] 2) 제조된 하이드로젤 지혈제의 *in vivo* 상처 치유능 실험

[0108] SD rat에 Zoletil[®] 50과 Rompun[®]을 4:1 비율로 섞은 동물용 마취제를 투여하여 마취한 후 SD rat이 마취되면 앞다리와 뒷다리 사이의 몸통부위의 털을 제모하였다. 포비돈 요오드 용액으로 소독한 후 양쪽 옆구리에 직경 2 cm 크기의 전층창상을 냈다. 투명한 OHP 필름을 사용하여 창상부위에 대고 따라 그려서 창상크기를 재고, 창상부위에 개선된 폴루란 하이드로젤을 주입한 뒤 가교가 완료되면 창상부위와 그 주변을 Tegaderm[™]으로 덮어서 보호했다(대조군으로는 멸균된 거즈를 사용). 이후 2일 마다 들어내어 OHP필름을 사용하여 창상부위를 그려서 시간경과에 따른 창상치유거동을 확인하였다.

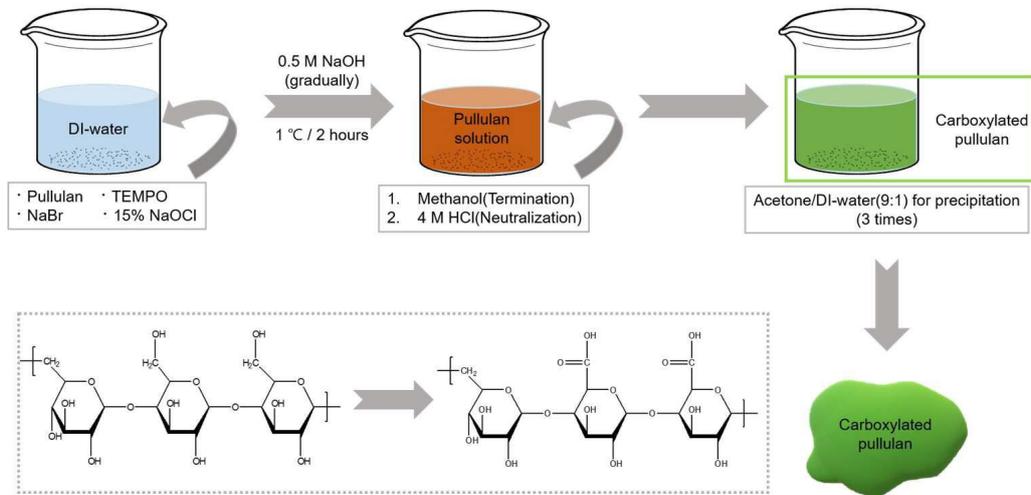
[0109] 도 14는 실시예에 따라 제조된 개선된 폴루란 하이드로젤로 처리된 피부의 창상을 시간경과에 따라 그 크기를 측정함으로써 상처가 치유되는 정도를 대조군과 비교한 그래프이다. 다만, 이 경우, 하이드로젤은 폴루란 0.4 g/ml, 알긴산 0.05 g/ml, HRP 519 units/ml로 제조하여 사용하였다.

[0111] 이상에서 본 발명이 구체적인 구성요소 등과 같은 특정 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명이 상기 실시예들에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적인 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형을 꾀할 수 있다.

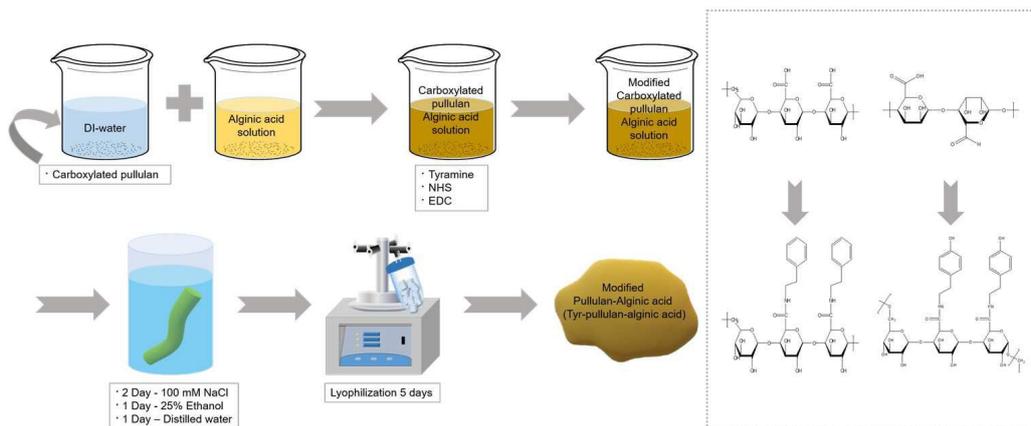
[0112] 따라서, 본 발명의 사상은 상기 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등하게 또는 등가적으로 변형된 모든 것들은 본 발명의 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

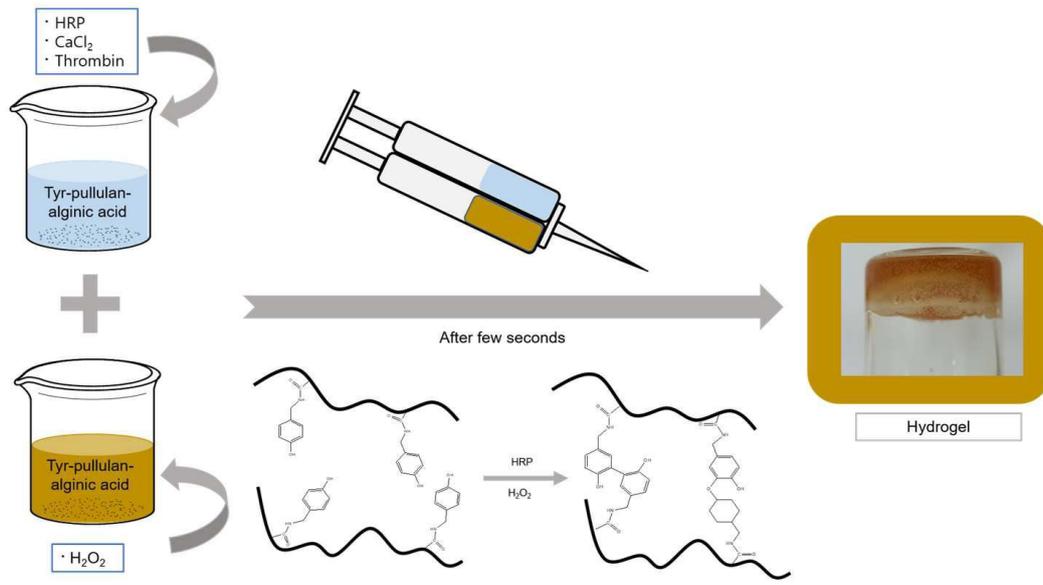
도면1



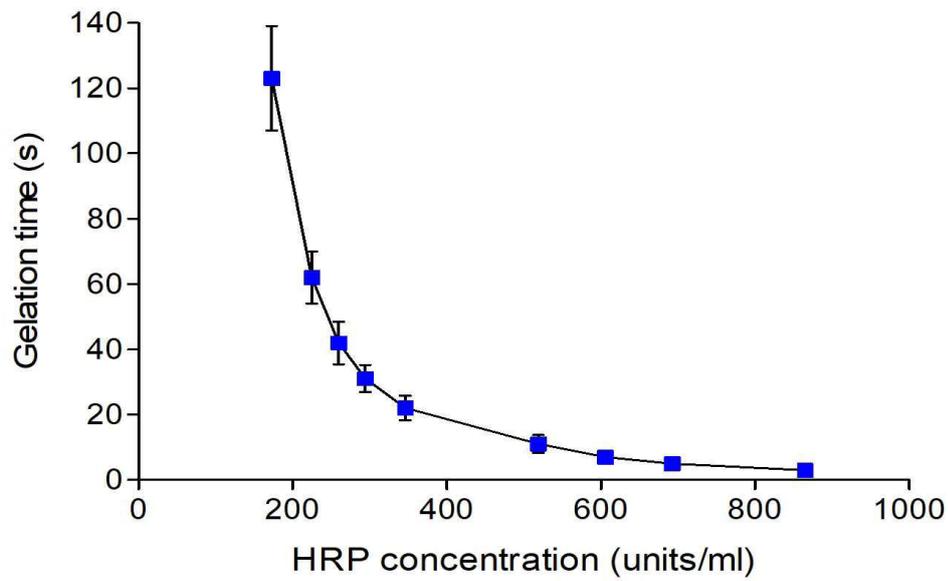
도면2



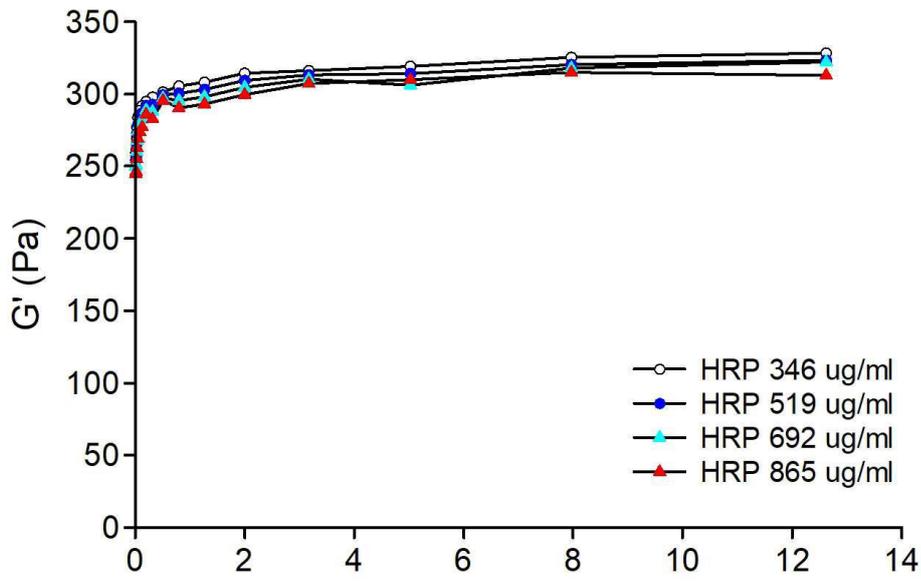
도면3



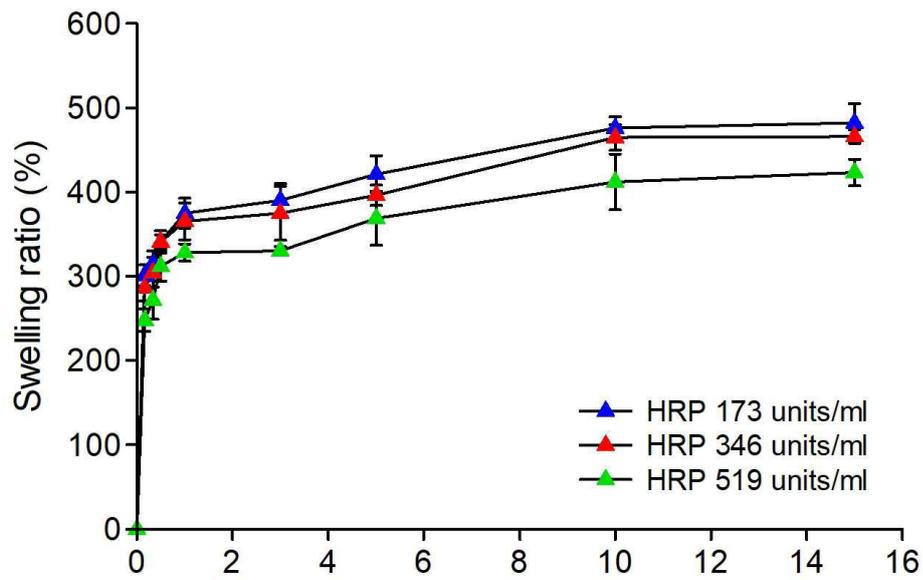
도면4



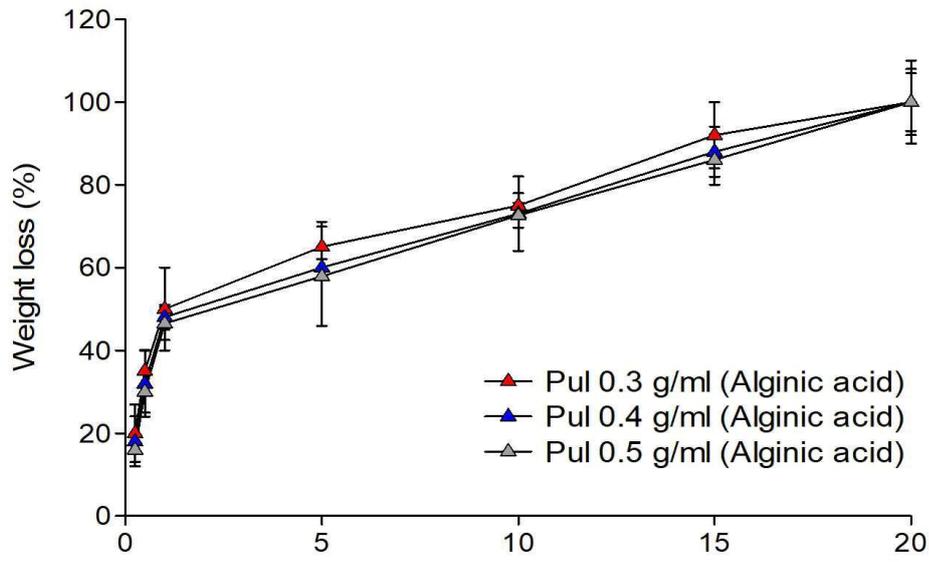
도면5



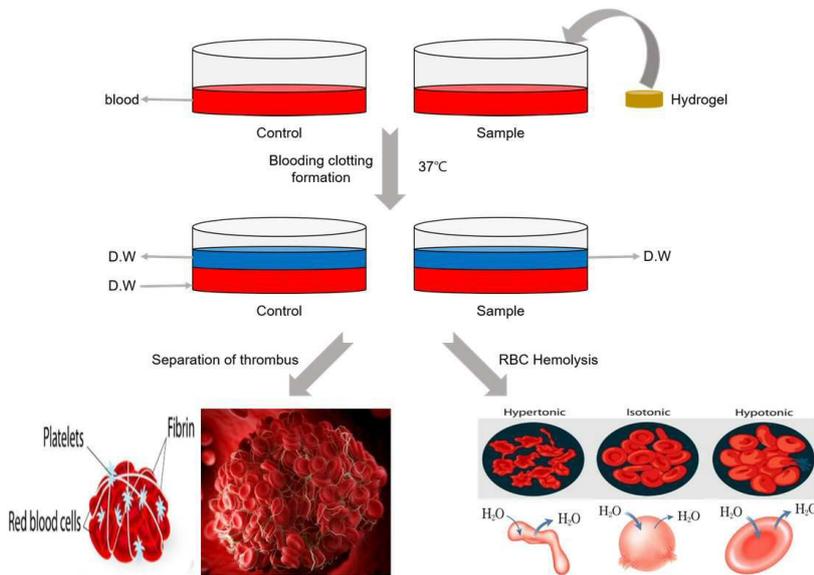
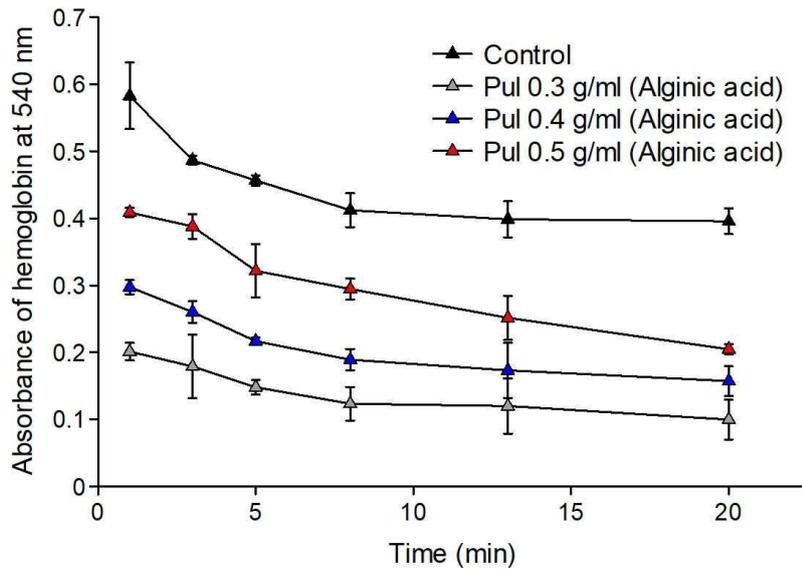
도면6



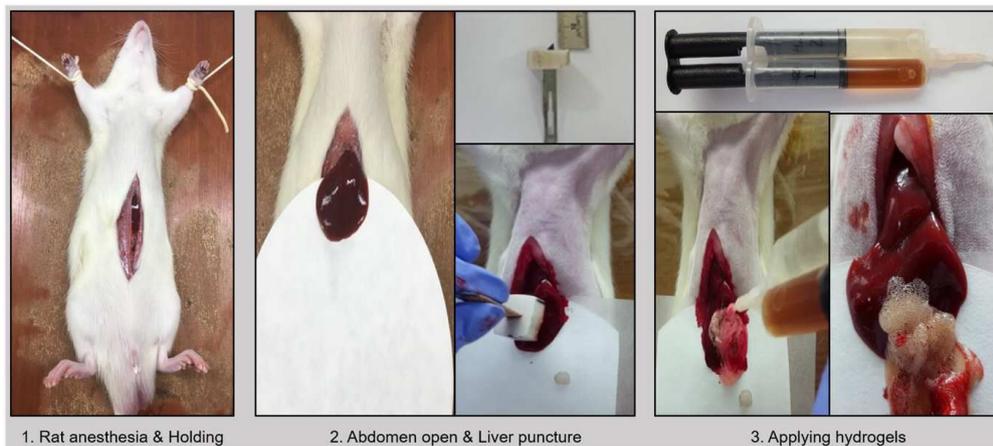
도면7



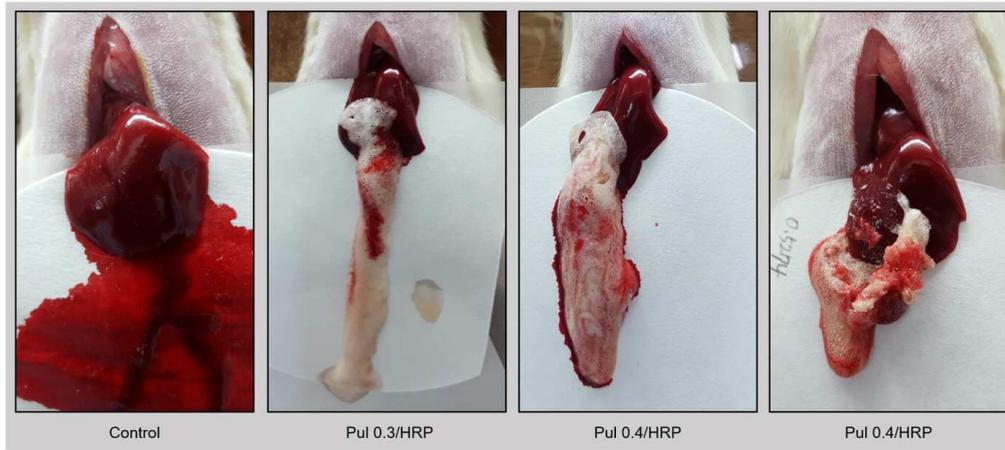
도면8



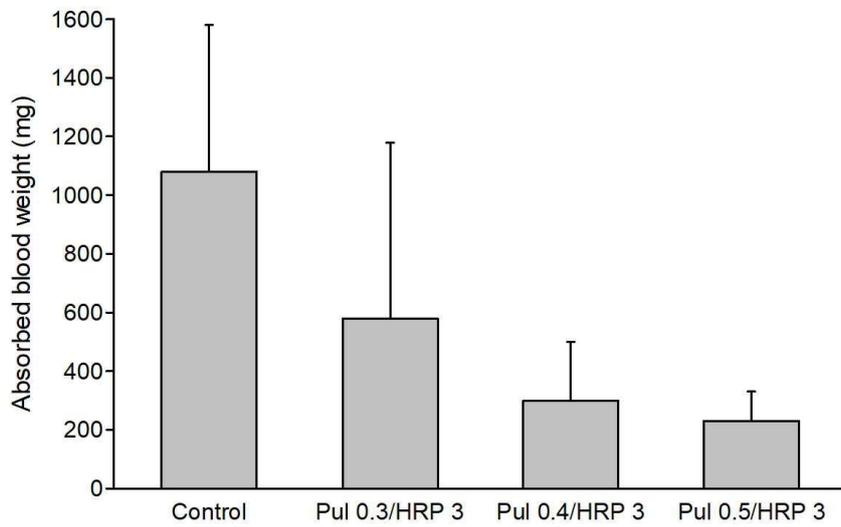
도면9



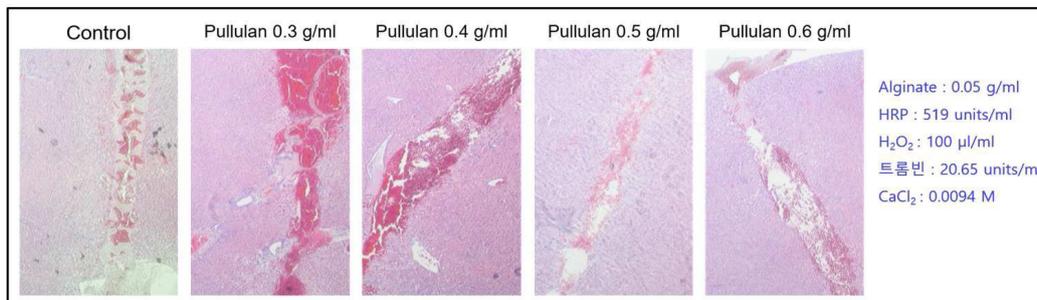
도면10



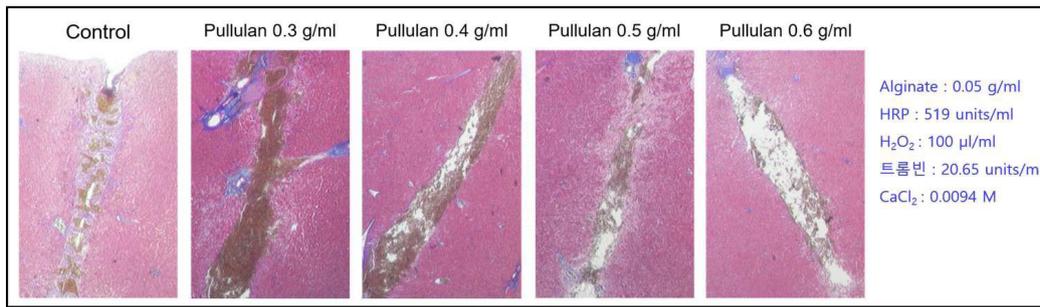
도면11



도면12



도면13



도면14

