



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월29일
(11) 등록번호 10-1783448
(24) 등록일자 2017년09월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 24/08 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61L 24/08 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0051619
- (22) 출원일자 2015년04월13일
심사청구일자 2015년04월13일
- (65) 공개번호 10-2015-0131951
- (43) 공개일자 2015년11월25일
- (30) 우선권주장
1020140058438 2014년05월15일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020130055847 A*
KR1020110025530 A*
KR1020130033996 A*
KR1020100133117 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
- (72) 발명자
황동수
경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 601호 (지곡동, 교수아파트)
- 오동엽
부산광역시 동구 중동길 15-3 (초량동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 21 항

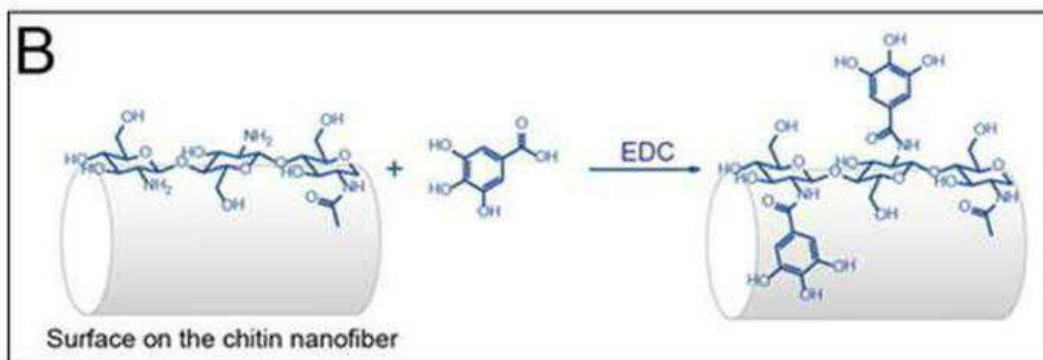
심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 하이드로젤 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 생체접착성 하이드로젤, 이의 제조방법, 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명을 통하여 제공되는 표면 처리된 나노섬유를 이용한 하이드로젤은, 우수한 생체접착력을 가지므로, 생체접착제, 조직공학용 지지체, 또는 약물 전달용 담체 등으로 폭넓게 응용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61L 15/28 (2013.01)

A61L 27/20 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

(72) 발명자

이도훈

경상북도 포항시 남구 중앙로131번길 29, 406 (대
도동)

정재혁

광주광역시 서구 화개중앙로4번길 3-11, 3층 (금호
동)

명세서

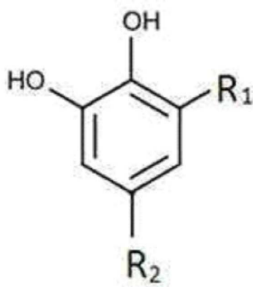
청구범위

청구항 1

탈아세틸화 처리한 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유를 포함하며,

상기 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유는 하기 화학식 1을 갖는 표면 처리물질을 처리하여 그 표면에 공유 결합된 트리히드록시페닐 (trihydroxypheny)잔기, 또는 탄닌산(tannic acid)을 포함하는 표면 처리된 나노섬유인 것인, 상대습도 50%에서의 접착강도가 5 내지 100 Mpa이고, 상대 습도 100%에서의 접착강도가 0.05 Mpa 내지 10 MPa 인 생체접착성 하이드로젤:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R1은 히드록시기이고,

R2는 수소원자, -COOH, -CHO, -NH2, -SH, 또는 탄소수 1 내지 10의 직쇄상, 분지상, 또는 환상 알킬기의 1이상의 수소원자가 수소, -COOH, -CHO, -NH2, 또는 -SH로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 그룹으로 치환된 것임.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1을 갖는 표면 처리물질은 갈산(gallic acid), 토포(3,4,5-trihydroxyphenylalanine, TOPA) 및 피로갈롤(pyrogallol)로 이루어지는 군에서 선택된 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 표면 처리물질은 나노섬유의 100 중량% 기준으로 0.1 내지 30 중량%로 포함되는 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1 항에 있어서, 상기 하이드로젤은 생리활성물질과 생접합(bioconjugation)된 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생리활성물질은 세포, 단백질, 핵산, 당, 효소, 또는 이들의 혼합물인 것인, 생체접착성

하이드로젤.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤은 금속이온을 첨가하여, 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유에 결합된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산과 금속 이온의 결합으로 형성된 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 금속 이온은 Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , V^{4+} , V^{3+} , 또는 V^{2+} 인 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 금속이온은 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 1몰 기준으로 0.05 내지 5 몰을 첨가한 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤은 산화제를 첨가하여 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 간의 공유결합으로 형성된 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 산화제는 쇼듐 페리오데이트(Sodium periodate), 테트라부틸암모늄 페리오데이트(tetrabutylammonium periodate), 또는 과산화수소(hydrogen peroxide)인 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 산화제는 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 1몰 기준으로 0.05 내지 5 몰을 첨가한 것인, 생체접착성 하이드로젤.

청구항 14

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 내지 제13항 중 어느 한 항의 생체접착성 하이드로젤을 포함하는, 생체접착용 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 생체 접착용 조성물은 피부, 뼈, 신경, 액손, 연골, 혈관, 각막, 근육, 근막, 뇌, 전립선, 유방, 자궁내막, 폐, 비장, 소장, 간, 정소, 난소, 경부, 직장, 위, 림프절, 골수, 및 신장으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 생체 조직에 적용되는 것인 생체접착용 조성물.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 생체 접착용 조성물은 하이드록시아파타이트 및 옥타칼슘포스페이트로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 뼈 전구체 물질에 적용되는 것인 생체접착용 조성물.

청구항 17

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 내지 제13항 중 어느 한 항의 생체접착성 하이드로젤을 포함하는, 조직공학용 지지체.

청구항 18

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 내지 제13항 중 어느 한 항의 생체접착성 하이드로젤을 포함하는, 약물전달용 담체.

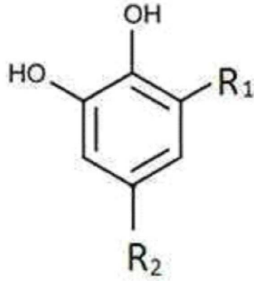
청구항 19

탈아세틸화 처리한 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유로 하이드로젤을 제조하는 단계; 및

상기 하이드로젤에 포함된 나노섬유의 표면에 탄닌산(tannic acid) 또는 하기 화학식 1의 표면 처리물질을 처리하여 나노섬유의 표면 처리를 수행하는 단계;

를 포함하는 상대습도 50%에서의 접착강도가 5 내지 100 Mpa이고, 상대 습도 100%에서의 접착강도가 0.05 Mpa 내지 10 MPa 인 생체접착성 하이드로젤 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R1은 히드록시기이고,

R2는 수소원자, -COOH, -CHO, -NH₂, -SH, 또는 탄소수 1 내지 10의 직쇄상, 분지상, 또는 환상 알킬기의 1이상의 수소원자가 수소, -COOH, -CHO, -NH₂, 또는 -SH로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 그룹으로 치환된 것이다.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 하이드로젤을 제조하는 단계는, 나노섬유에 금속 이온 또는 산화제를 첨가하여 수행하는 것인 생체접착성 하이드로젤 제조방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 산화제는, 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 1몰 기준으로 0.15 내지 5 몰을 첨가하는 것인, 생체접착성 하이드로젤 제조방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 금속 이온은 Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, V⁴⁺, V³⁺, 또는 V²⁺인 것인, 생체접착성 하이드로젤 제조방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 산화제는 소듐 페리오데이트, 테트라부틸암모늄 페리오데이트, 또는 과산화수소인 것인, 생체접착성 하이드로젤 제조방법.

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 생체접착성 하이드로젤 및 이의 제조방법과 상기 생체접착성 하이드로젤을 포함하는 생체접착제 조성물, 조직공학용 지지체, 및 약물전달용 담체로의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생체접착제는 생물의 세포막, 세포벽, 지질, 단백질, DNA, 성장인자, 세포, 조직 등과 같은 다양한 생물시료에 부착 특성을 갖는 물질을 말하며, 조직접착제, 지혈제, 조직공학용 지지체(scaffold), 약물전달용 담체(drug delivery carrier), 조직충진제(tissue augmentation), 상처 치료제, 또는 유착방지제 등의 다양한 생의학적 응용이 가능하다.
- [0003] 이러한 생체접착제는 강력한 접착능력 및 가교능력이 필요하고, 오랜 기간 생체 내에서 그 기능을 유지해야 한다. 현재 상용화 또는 실용화되고 있는 생체접착제로는 시아노아크릴레이트(cyanoacrylate) 순간 접착제, 피브린 글루(fibrin glue), 젤라틴 글루(gelatin glue), 및 폴리우레탄계 접착제 등이 있다.
- [0004] 그러나, 합성 고분자를 이용한 생체접착제의 경우, 생체 내의 수용액이 있는 상태에서 매우 약한 접착력을 보이며, 시아노아크릴레이트 계열 생체접착제의 경우, 인체에 면역 반응 등의 부작용을 일으키는 것이 큰 한계로 지적되고 있다.
- [0005] 또한, 현재 실제 환자에게 사용되고 있는 피브린 계열의 생체접착제의 경우, 인체에 면역 반응 등의 부작용은 적지만, 그 접착 능력이 매우 낮은 수준이기 때문에 사용에 한계가 있으며, 가격 또한 비싸다.
- [0006] 또한, 젤라틴 생체접착제의 경우 가교제로 사용되는 포르말린(formalin)이나 글루타알데하이드(glutaraldehyde)가 생체 내의 단백질과도 가교 반응을 일으켜 조직 독성을 일으키는 문제가 있으며, 폴리우레탄계 생체접착제의 경우에는, 합성원료인 방향족 디아이소시아네이트(diisocyanate)가 생체 독성이 있다는 문제가 있다.
- [0007] 따라서, 이러한 문제점을 극복하기 위해서 수분을 함유하는 생체조직 표면에서 강력한 접착능력 및 가교능력을 가지고, 생체 내에서 최소한의 부작용을 보일 수 있는 이상적인 형태의 생체재료의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유의 표면에 공유 결합된 디히드록시페닐(dihydroxyphenyl) 잔기, 트리히드록시페닐 (trihydroxyphenyl) 잔기, 또는 탄닌산을 함유하는 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 생체접착성 하이드로젤을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 생체접착성 하이드로젤을 포함하는 생체접착용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 생체접착성 하이드로젤을 포함하는 조직공학용 지지체를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 생체접착성 하이드로젤을 포함하는 약물전달용 담체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 생체접착성 하이드로젤의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유로 하이드로젤을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로젤에 포함된 나노섬유의 표면에 하기 화학식 1의 표면 처리물질을 처리하여 나노섬유의 표면 처리를 수행하는 단계를 포함하는 생체접착성 하이드로젤 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

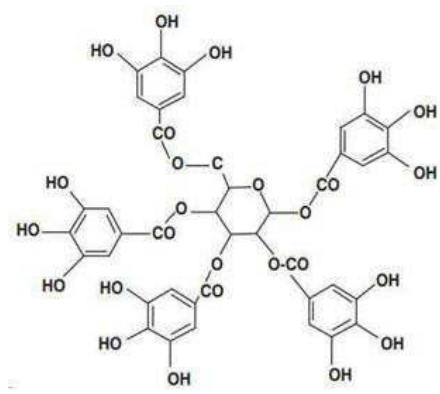
- [0014] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유의 표면에 공유 결합된 디히드록시페닐(dihydroxyphenyl) 잔기, 트리히드록시페닐 (trihydroxyphenyl) 잔기, 또는 탄닌산(tannic acid)을 함유하는, 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 하이드로젤에 관한 것이다.
- [0015] 또 하나의 양태로서, 상기 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 하이드로젤의 제조방법에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에 따른 표면 처리된 나노섬유를 함유하는 하이드로젤은 멧게(Sea squirt)의 상처 치료 메커니즘과 유사하다. 도 6은 멧게 표면의 모습을 개략적으로 설명하는 그림이다. 멧게는 튜닉(tunic)이라고 불리는 갑옷으로 둘러싸여 있으며, 상기 튜닉은 주로 투니신(tunicin), 셀룰로즈 나노섬유(cellulose nanofibrils(140 GPa, 26 nm X 2.2 mm)) 및 단백질 마이크로 섬유로 코팅된 TOPA (3,4,5-trihydroxyphenylalanine, 피로갈롤 아미노산)로 구성되어 있다. 멧게가 표면에 상처를 입으면, 다음과 같은 두 가지 반응이 일어나 상처를 치유한다. 먼저, 바다의 (pH ~8.2)염기 조건에 노출되어 피로갈롤 (TOPA의 잔기)이 산화적으로 투니신 또는 피로갈롤과 결합하며,

피로갈롤 그룹은 멧계 피 (血)에 많이 존재하는 바나듐(vanadium)과 배위 결합한다. 튜닉이 다시 생성되는 과정 동안, 공유 및 비공유 결합상호작용이 견고하게 형성하고 탄력 있는 보호벽이 형성되어, 상처 난 조직의 가장자리를 붙이고 과도한 출혈을 조절한다.

[0017] 탄닌산은 양금, 탄닌이라고도 하며, 나무의 껍질, 땅속 줄기, 과일 등 식물계에 넓게 존재하고, 다가 페놀을 포함하며 유펜성의 복잡한 조성을 가진 식물 성분이다. 식물계에는 농도의 차이는 있으나 널리 분포하며 물관부, 수피, 잎, 과일, 뿌리 등에 들어 있다. 유펜작용의 주체는 다가 페놀로서 단백질, 특히 콜라겐과 결합하여 동물의 생피를 안정된 가죽으로 변성하게 한다. 알칼로이드와 침전반응을 하고 3가의 철이온과 결합하여 녹색 또는 흑자색의 착화합물을 형성한다. 가수분해형 탄닌(I)과 축합형 탄닌(II)으로 대별한다. 탄닌(I)은 당, 퀴닌산 등의 수산기와 몰식자산, 엘라그산이 개환한 헥사히드록시디페닌산 등의 텡시드형의 에스테르이다. 산, 알칼리, 탄나아제에 의해 가수분해되어 갈산(gallic acid), 엘라그산(ellagic acid) 등을 생성한다. 오배자탄닌(불나무의 벌레혹), Terminalia chebula의 과일 등은 함량이 많아 가죽을 다루는 데 이용한다. 탄닌(II)는 플라반의 유도체인 카테킨류, 류코안토시안, 프로안토시안 외에스틸벤류 등이 있다. 그러나 축합형이라도 배당체 또는 몰식자산의 에스테르 등 가수분해형의 성질을 가진 것도 있지만, 이들을 산과 가열하면 중합하여 플로바펜(phlobaphene)이라는 적색 부정형 침전을 만든다. 수렴성 맛(떫은 맛)이 있으며 녹차에는 카테킨류와 이것의 3번째 위치에서 갈산과 형성된 에스테르, 날감의 떫은 즈에는 류코안토시안이 들어 있다. 갈산, 엘라그산류는 시킵산 경로(shikimic acid pathway)에서, 플라반류의 골격은 시킵산과 아세트산-말론산 경로의 복합형으로 생합성된다. 식물체에서 탄닌의 생리기능에 대해서는 명확하지는 않지만 단백질과 강하게 결합하는 점으로 보면 병충해에 대한 방어작용을 생각할 수 있다.

[0018] 탄닌산은 천연 폴리 페놀의 일종으로 하기 화학식의 구조를 가질 수 있다. 그러나, 탄닌산의 분자 구조가 이에 한정되는 것은 아니며, 다양한 작용기를 갖는 다양한 중합체의 형태로 존재할 수 있다.

[0019] 탄닌산은 하기 화학식에서 알 수 있듯, 분자 내에 많은 하이드록실 그룹을 가지고 있기 때문에 다당류, 단백질, 알칼로이드 등의 거대 분자와 쉽게 결합될 수 있는 특성을 가지고 있다. 특히, 분자 내에 존재할 수 있는 3개 이상의 갈로일 그룹(galloyl group)은 철(III) 이온 배위결합하여 팔면체 구조의 안정한 착화합물을 형성할 수 있다. 또한, 각각의 갈로일 그룹이 서로 다른 철(III) 이온을 중심 금속으로 하여, 가교 결합(cross link)을 형성할 수 있다. 탄닌산의 구조는 하기와 같다.



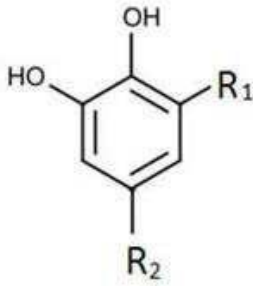
[0020] =

[0021] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0022] 본 발명의 일례에 따른 생체접착성 하이드로젤은 표면 처리된 나노섬유를 포함하며, 구체적으로 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유의 표면에 공유 결합된 디히드록시페닐(dihydroxyphenyl) 잔기, 트리히드록시페닐(trihydroxyphenyl)잔기, 또는 탄닌산(tannic acid)을 함유하는, 표면 처리된 나노섬유를 포함한다.

[0023] 상기 하이드로젤은, 투니신의 유사 섬유구조인 키토산 나노섬유, 키틴 나노섬유 또는 키토산에, 탄닌산 또는 하기 화학식 1의 표면 처리물질을 반응시켜 나노섬유의 표면에 공유결합으로 결합하여 제조된다.

화학식 1



[0024]

[0025]

상기 화학식 1에서,

[0026]

R1은 수소원자 또는 -OH 이고,

[0027]

R2는 -H, -COOH, -CHO, -NH₂, -SH, 탄소수 1 내지 10의 직쇄상 또는 분지상 알킬기, 또는 탄소수 3 내지 10의 환상 알킬기의 1이상의 수소원자가 수소원자, -COOH, -CHO, -NH₂, 또는 -SH로 치환된 알킬기이다.

[0028]

또한, 상기 화학식 1을 갖는 화합물은 카테콜(catechol), 도파(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA), 토파(3,4,5-trihydroxyphenylalanine, TOPA), 피로갈롤(pyrogallol), 및 갈산(gallic acid)으로 이루어지는 군에서 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 갈산과 피로갈롤일 수 있다.

[0029]

상기 표면 처리 결합방법으로 공유결합을 형성할 수 있는 방법을 이용할 수 있으며, 실시예에서는 상기 나노섬유의 아민기 (-NH₂)와 갈산 (gallic acid)의 카르복시기 (-COOH)가 펩타이드화 (-CONH-) 되는 반응을 이용하였으나 (도 2a), 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030]

상기 반응의 기초 물질로 사용된, 키틴, 키토산, 타닌 및 갈산은 음식물로부터 추출할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031]

상기 화학식 1을 갖는 화합물은 키틴 나노섬유, 키토산 나노섬유, 또는 이들의 혼합물의 100중량% 기준으로 0.1 내지 30 중량%, 0.1 내지 10 중량%, 1 내지 30 중량%, 10 내지 30 중량%, 또는 10 내지 20 중량% 일 수 있다.

[0032]

본 발명에서 용어, "하이드로젤(hydrogel)" 이란, 하이드로졸이 냉각으로 인하여 유동성을 상실하거나, 3차원 망목 구조와 미결정 구조를 갖는 친수성 고분자가 물을 함유하여 팽창하여 형성된다. 많은 양의 물이 고분자 물질의 격자 내에 채워져 팽윤되어 삼차원적인 구조를 유지하며, 액체지만 고체와 같은 형태를 띠는 재료를 의미한다.

[0033]

하이드로젤은 전체 중량의 적어도 20% 이상의 수분을 흡수할 수 있으며, 하이드로젤이 용액 상에서 팽윤된 후에는 열역학적으로 안정하게 존재하여, 액체와 고체의 중간 형태에 해당하는 기계적 및 물리화학적 특성을 지니게 된다. 하이드로젤은 실제 조직과 비슷한 기계적 유연함을 가지고 있고, 물을 많이 함유하되, 물에 의해 젤의 결합이 끊어지지 않기 때문에, 수분을 포함하는 젖은 생체 표면과의 접착을 필요로 하고 외부 수분에도 저항성을 가지고 있어야 하는 의료용 접착제 등으로의 응용이 활발하게 이루어지고 있다.

[0034]

따라서, 본 발명에 따른 우수한 조직접착성을 갖는 하이드로젤은 조직접착제, 지혈제, 조직공학용 지지체, 약물 전달 담체, 조직충진제, 상처 치료제, 또는 유착방지제 등의 다양한 생의학적 응용이 가능하다. 본 발명의 일구 현에는 의료목적의 접착제로 사용할 수 있는 표면이 개질된 나노섬유 하이드로젤을 제공한다.

[0035]

본 발명에 따른 하이드로젤은 상대습도 50%에서의 접착강도가 5 내지 100 Mpa, 5 내지 80 Mpa, 20 내지 100 Mpa, 20 내지 80 Mpa, 50 내지 80 Mpa, 50 내지 60 Mpa, 또는 55 내지 60 Mpa 일 수 있다. 또한, 상기 하이드로젤은 상대 습도 100%에서의 접착강도가 0.05 Mpa 내지 10 MPa, 0.1 내지 10 Mpa, 1 내지 10 Mpa, 5 내지 10 Mpa, 또는 0.05 내지 5 Mpa 일 수 있다.

[0036]

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 표면 처리된 나노섬유를 함유하는 하이드로젤을 포함하는 생체접착제 조성물에 관한 것이다.

[0037]

본 발명의 생체접착제 조성물은 현재 시중에서 주로 이용되고 있는 시아노아크릴계 접착제 또는 피브린계 접착

제 등을 대체하여, 피부, 혈관, 소화기, 뇌신경, 성형외과, 정형외과 등의 여러 영역에서 사용할 수 있다.

- [0038] 예를 들어, 본 발명의 생체적합성 생체조직접착제는 외과 수술용 봉합사를 대체 할 수 있고, 불필요한 혈관을 폐색(blocking)하는데 사용될 수 있으며, 안면조직, 연골 등의 연조직 또는 뼈, 치아 등의 경조직의 지혈 및 봉합에 이용될 수 있고, 가정 상비약으로 적용하는 것이 가능하다.
- [0039] 본 발명의 생체적합성 생체접착제 조성물의 다양한 응용 분야를 정리하면 다음과 같다:
- [0040] 일 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 생체의 내부 및 외부 표면에 적용될 수 있으며, 즉 본 발명의 생체접착제는 피부와 같은 생체의 외부 표면 또는 외과수술 과정에서 노출되는 내부기관의 표면 등에 국소적으로 적용될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 생체접착제는 조직의 손상된 부분을 접착시키거나 조직에서 공기 또는 유체가 누출되는 것을 봉합하거나, 의료가구를 조직에 접착시키거나, 또는 조직의 결합부분을 채우는데 이용될 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 "생체 조직"은 특별하게 제한되지 않으며, 예를 들어 피부, 뼈, 신경, 액손, 연골, 혈관, 각막, 근육, 근막, 뇌, 전립선, 유방, 자궁내막, 폐, 비장, 소장, 간, 정소, 난소, 경부, 직장, 위, 림프절, 골수, 및 신장 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 일 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 연골 등의 연조직 또는 뼈, 치아 등의 경조직의 지혈 및 봉합에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 뼈성분의 전구체에도 적용할 수 있으며, 상기 전구체 성분으로는 하이드록시아파타이트 및 옥타칼슘소스페이트로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 다른 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 상처치유(wound healing)에 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 생체적합성 생체접착제는 상처에 적용되는 드레싱(dressing)으로 이용될 수 있다.
- [0045] 다른 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 피부 봉합에 이용될 수 있다. 즉, 본 발명의 생체접착제는 국소적으로 적용되어 상처를 봉합하는 데 이용되어, 봉합사를 대체 할 수 있다. 또한, 본 발명의 생체접착제는 탈장 복원에 도 적용될 수 있으며, 예를 들어 탈장복원에 이용되는 메쉬(mesh)의 표면 코팅에 이용될 수 있다.
- [0046] 다른 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 혈관과 같은 관 구조의 봉합 및 누출을 방지하는 데에도 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 생체접착제는 지혈에도 이용될 수 있다.
- [0047] 다른 구현예로, 본 발명의 생체접착제는 수술 후의 유착방지제로 이용될 수 있다. 유착이란 모든 수술 부위에서 발생하는 것으로 수술 부위의 주변에서 다른 조직들이 상처 주위에 달라붙는 현상이다. 유착은 수술 후 97% 정도 발생을 하며, 특히 그 중에서 5내지 7%가 심각한 문제를 야기한다. 이러한 유착을 방지하기 위해서 수술 시 상처를 최소화 한다거나 소염제를 사용하기도 한다. 또한 섬유소의 형성을 방지하기 위하여 TPA(tissue plasminogen activator)를 활성화 하거나, 결정성 용액, 고분자 용액, 고체 막 등의 물리적 장벽을 사용하고 있지만 이러한 방법들은 생체 내에서 독성을 나타낼 수 있으며 다른 부작용을 나타낼 수 있다.
- [0048] 본 발명의 생체접착제는 수술 후에 노출된 조직에 적용되어 그 조직과 주위의 조직 사이에 발생하는 유착을 방지하는 데 이용될 수 있다.
- [0049] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직공학용 지지체에 관한 것이다.
- [0050] 조직공학(Tissue engineering) 기술이란, 환자의 조직으로부터 분리된 세포를 지지체에 배양하여 세포-지지체 복합체를 제조한 후, 제조된 세포-지지체 복합체를 다시 생체 내에 이식하는 것을 말하며, 조직공학 기술은 인공피부, 인공뼈, 인공연골, 인공각막, 인공혈관, 인공근육 등 생체의 거의 모든 장기의 재생에 적용되고 있다.
- [0051] 본 발명의 생체접착성 하이드로젤은 조직공학 기술에서 생체조직 및 장기의 재생을 최적화하기 위하여 생체조직과 유사한 지지체(scaffold)를 제공할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 지지체를 이용하여 간편하게 인공 세포외 기질(extracellular matrix)을 구현할 수 있으며, 화장품, 상처 피복재, 치과용 매트릭스 등의 의료용 소재로도 활용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 하이드로젤에는 생체의 세포나 조직과 상호작용을 통하여 세포의 성장 및/또는 분화를 촉진시키고, 아울러 조직의 재생과 회복을 도와주는 작용에 관여하는 각종 생리활성물질들이 쉽게 부착될 수 있다.
- [0054] 특히, 상기 하이드로젤에 있는 아민 작용기가, 다른 생리활성물질의 생접합을 위한 작용기로 사용되어 생리활성 물질이 손쉽게 생접합 될 수 있다.

- [0055] 본 발명에서 용어, "생접합(bioconjugation)"이란, 두 개 이상의 생분자(biomolecule)를 결합시키는 것을 의미한다.
- [0056] 또한, 상기 생리활성물질은 천연 세포의 기질과 유사하게 유사한 구조의 인공 세포의 기질을 구현하기 위하여 포함될 수 있는 각종 생체분자(biomolecule)들을 총칭하기도 한다. 상기 생리활성물질은 세포, 단백질, 핵산, 당, 효소 등을 포함할 수 있으며, 일 예로 세포, 단백질, 폴리펩타이드, 다당류, 단당류, 올리고당류, 지방산, 핵산 등을 들 수 있으며, 대표적으로 세포를 들 수 있다.
- [0057] 상기 세포는, 원핵세포 및 진핵세포를 포함한 모든 세포일 수 있고, 일 예로 조골세포(osteoblast), 섬유세포(fibroblast), 간세포(hepatocyte), 신경세포(neurons), 암세포(cancer cell), B세포(B cell), 백혈구세포(white blood cell) 등을 포함한, 면역세포(immunocyte) 및 배아세포(embryonic cell) 등일 수 있다.
- [0058] 이 외에도, 생리활성물질은 핵산 물질로서 플라스미드 핵산, 당 물질로서 히아루론산, 히파린 황산염, 콘드로이틴 황산염, 알진염, 단백질 물질로서 호르몬 단백질을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 담체에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명에 따른 생체 주입형 조직접착성 하이드로젤은 약물 전달용 유효 골격(scaffold)으로서의 인공 세포의 기질로 사용될 수 있다. 상기 약물은 특별하게 제한되지 않으며, 화학물질, 소분자, 펩타이드, 단백질 의약품, 핵산, 바이러스, 항균제, 항암제, 항염증제, 또는 이들의 혼합물 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 상기 소분자는, 조영제(예컨대, T1 조영제, 초상자성 물질과 같은 T2 조영제, 방사성 동위 원소 등), 형광 마커, 또는 염색 물질 등이 될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 상기 펩타이드 또는 단백질 의약품은, 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달단백질 또는 그 일부분, 항체 또는 그 일부분, 단쇄 항체, 결합단백질 또는 그 결합 도메인, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인(cytokine), 전사조절 인자, 혈액 응고 인자, 또는 백신 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로는, 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), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구 성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론류, 인터루킨류, 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자(growth hormone releasing factor), 엔지오텐신(angiotensin), 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스타틴(angiotatin), 엔도스타틴(endostatin), 소마토스타틴(somatostatin), 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신(bacitracin), 머게인, 콜리스틴(colistin), 단일 항체, 백신류 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 상기 핵산은, RNA, DNA 또는 cDNA가 될 수 있으며, 핵산의 서열은 암호화 부위 서열 또는 비암호화 부위 서열 (예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드(anti-sense oligonucleotide) 또는 siRNA)이 될 수 있다.
- [0064] 상기 바이러스는, 바이러스 전체 또는 바이러스의 핵산을 포함하는 바이러스 중심부(core), 즉, 바이러스의 외피(envelope)없이 패키징 된 바이러스의 핵산이 될 수 있다. 운반될 수 있는 바이러스 및 바이러스 중심부의 예로는 파필로마 바이러스(Papillomavirus), 아데노 바이러스(Adenovirus), 배큘로바이러스(baculovirus), 레트로 바이러스 중심부(retrovirus core), 및 세틸키 바이러스 중심부 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 상기 항균제는, 미노사이클린, 테트라사이클린, 오플록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시사이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로모마이신, 미크로노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세포탁신, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산, 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 상기 항암제는, 파클리탁셀, 텍소터어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D, 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 상기 항염증제는, 아세트아미노펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플

루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄, 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

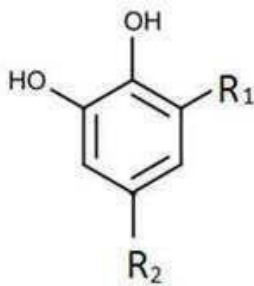
[0068] 본 발명은 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유의 표면에 공유 결합된 디히드록시페닐(dihydroxyphenyl) 잔기, 트리히드록시페닐 (trihydroxyphenyl) 잔기, 또는 탄닌산을 포함하는 표면 처리된 나노섬유를 포함하는, 생체접착성 하이드로젤을 제공한다.

[0069] 본 발명의 하나의 양태로서, 상기 하이드로젤은, 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산과, 산화제 또는 금속 이온간의 결합으로 형성된 하이드로젤일 수 있다.

[0070] 보다 구체적으로, 본 발명의 생체접착성 하이드로젤을 제조하는 방법은, 키틴 나노섬유 또는 키토산 나노섬유로 하이드로젤을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로젤에 포함된 나노섬유의 표면에 탄닌산 또는 하기 화학식 1의 표면 처리물질을 처리하여 나노섬유의 표면 처리를 수행하는 단계;

[0071] 를 포함하는 생체접착성 하이드로젤 제조방법이다.

[0072] [화학식 1]



[0073]

[0074] 상기 화학식 1에서,

[0075] R1은 수소원자 또는 히드록시기이고,

[0076] R2는 수소원자, -COOH, -CHO, -NH₂, -SH, 또는 탄소수 1 내지 10의 직쇄상, 분지상, 또는 환상 알킬기의 1이상의 수소원자가 수소, -COOH, -CHO, -NH₂, 또는 -SH로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 그룹으로 치환된 알킬기이다.

[0077] 상기 하이드로젤을 제조하는 단계는 나노섬유에 금속 이온 또는 산화제를 첨가하여 수행하는 것인 생체접착성 하이드로젤 제조방법일 수 있다.

[0078] 상기 금속 이온은 Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, V⁴⁺, V³⁺, V²⁺ 등 일수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 상기 산화제는 소듐 페리오데이트(Sodium periodate), 테트라부틸암모늄 페리오데이트 (tetrabutylammonium periodate), 또는 과산화수소(hydrogen peroxide) 등 일수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0080] 또한, 상기 금속이온 또는 산화제의 첨가량은 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 1몰 기준으로 0.05 내지 5몰, 0.15 내지 5몰, 0.15 내지 15몰, 0.5 내지 5몰, 5 내지 15몰, 0.5 내지 1.5몰, 또는 0.15 내지 1.5몰 일 수 있다.

[0081] 상기 금속을 첨가하는 단계는 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산과 금속 이온을 배위 결합시키는 단계이다.

[0082] 하나의 구체적 양태로서, 본 발명은 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산과 Fe³⁺ 이온을 반응시키는 단계를 포함하는, 생체접착성 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.

[0083] 키토산은 키틴에서 아세트아미드 그룹이 제거된, 즉 탈아세틸화가 50%이상 된 형태로 해당 키토산은 85-95%의 탈아세틸화된 키토산을 사용할 수 있다. 제조방법의 경우에도 키틴 나노섬유의 경우, 나노섬유가 포함된 하이드로젤 상태에서 수행하고, 키토산의 경우, 물에 녹기 때문에 물에 녹여진 용액상태에서 수행할 수 있다.

[0084] 또한, 상기 산화제를 첨가하는 단계는 상기 나노섬유에 포함된 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산이 산화제에 의해 산화되어 디히드록시페닐 잔기, 트리히드록시페닐 잔기, 또는 탄닌산 사이에 공유

결합을 형성시키는 단계이다.

[0085] 본 발명의 또 하나의 양태로서, 상기 하이드로젤을 제조하는 단계를 수행하기 전에, 상기 나노섬유에 탈아세틸화 처리하는 단계를 추가로 수행하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0086] 본 발명의 표면 처리된 나노섬유를 포함하는 하이드로젤은 우수한 생체접착력을 가지며, 생체에 대한 부작용이 최소화된 생체접착용 조성물 및 이의 제조 방법을 제공하고자 한다. 따라서, 상기 생체접착성 하이드로젤은 생체접착제, 조직공학용 지지체, 또는 약물 전달용 담체 등으로 폭넓게 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0087] 도 1a는 본 발명에서 제조한 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤의 TEM 이미지이다.
- 도 1b는 본 발명에서 제조한 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤의 XRD 이미지이다.
- 도 2a는 본 발명에 따른 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유의 합성 방법에 따른 구조식이다.
- 도 2b는 본 발명에 따른 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤과 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤의 FT-IR 작용기 측정 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 2c는 멧게 살(flesh)에 Arnow assay 시약 처리로 인한 발색현상을 보여주는 이미지이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 Fe^{3+} 및 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤을 함유하는 접착 조성물과, $NaIO_4$ 및 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤을 함유하는 접착 조성물의 알루미늄 막대에 대한 접착강도 시험결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4a는 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤에 산화제 또는 Fe^{3+} 첨가 시 TOPA와 일어나는 결합 기작을 나타내는 그림이다.
- 도 4b는 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤에 Fe^{3+} 첨가 시 TOPA와 실질적으로 일어나는 결합반응을 라만분광기(Raman Spectrometer)를 활용해서 증명한 그래프이다.
- 도 5는 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 포함하는 하이드로젤의 쥐 조골세포 (MC-3T3 e1) 에 대한 세포독성을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 6는 멧게 표면의 모습을 개략적으로 설명하는 그림이다.
- 도 7은 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 포함하는 하이드로젤을 개략적으로 설명하는 그림이다.
- 도 8은 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤에 갈산이 첨가 되었는지 여부를 ^1H-NMR 분석결과를 나타낸다.
- 도 9는 본 발명에 따른 두 가지 하이드로젤의 접착력을 보여준 사진이다.
- 도 10은 본 발명의 일예에 따라 제조된 키토산 하이드로젤에 산화제를 처리하여 접착력을 증가시키는 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 11은 본 발명의 일예에 따라 제조된 하이드록시아파타이트/접착제 복합체를 물속에 넣고 흔들어 접착력을 시험하는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 예시하고 하기에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변형, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0089] 하기 실시예에 사용된 물질은 키틴, $CaCl_{2B} \cdot H_2O$ (calcium chloride dehydrate), 및 갈산은 Sigma-Aldrich

(US)에서 구매하였고, EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide) 및 NHS (N-hydroxysuccinimide)는 Thermo scientific에서 구매하였다.

[0090] **실시예 1. 키틴 나노섬유의 하이드로젤 제조**

[0091] **1-1: 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤의 제조**

[0092] 키틴 나노섬유기반 하이드로젤 제조를 위해서 H. Tamura et al 방법 (Tamura, H., Nagahama, H. & Tokura, S. Preparation of chitin hydrogel under mild conditions. Cellulose 13, 357-364 (2006))을 사용하였다.

[0093] 먼저 CaCl₂·H₂O 850g을 1L 의 메탄올에 녹여주었고, 키틴 20g을 첨가한 후, 150 °C에서 6 시간 동안 섞었다. 그 이후, 키틴 나노섬유 하이드로젤을 침전시키기 위해서, 키틴 나노섬유를 함유하는 메탄올 용액 1L에 증류수 20L를 넣어주었다. 그리고 칼슘이온을 물을 기반으로 한 투석 (MWC0 = 1,000)을 통해 제거하였다.

[0094] 하이드로젤에 포함되어있는 키틴 나노섬유의 표면을 탈아세틸화(deacetylation)하기 위해서 머서화(mercerization)를 수행되었다. 구체적으로 키틴 나노섬유 하이드로젤을, 6시간 동안 NaOH (20 wt%) 에서 환류(reflux)시켜 표면을 탈아세틸화하고, 상기 표면이 탈아세틸화된 키틴 나노섬유는 10,000 rpm으로, 4°C에서 30 분 동안 원심분리를 통해 침전시켜 수득한 후, 여러 번 물로 세척해주었다.

[0095] 상기 수득한 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤을, TEM(transmission electron microscope) 및 XRD(X-Ray Diffraction)로 분석하였으며, 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타냈다.

[0096] 건조된 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤의 형태는 고해상도 주사형 전자 현미경(high-resolution scanning electron microscope) JEOL JSM-7401F (SEM, Japan)을 통해 연구하였다.

[0097] 도 1a에 나타낸 바와 같이, 상기 제조된 키틴 나노섬유 하이드로젤에 나노섬유가 있는 것은 TEM을 활용해서 확인할 수가 있었으며, 도 1b에 나타낸 바와 같이, 나노섬유가 키틴 나노섬유와 동일한지 여부는 XRD 분석법을 통해서 확인할 수 있었다.

[0098] The XRD 실험은 40 kV/100 mA Ni-filtered Cu K α-radiation의 조건에서, D/MAX-2500/PC (Rigaku, Japan)를 이용해 수행하였으며, XRD 패턴들은 5 ° 내지 40° 산란각의 영역에서 4° /min의 스캐닝 속도로 기록되었다.

[0099] **1-2: 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤 제조**

[0100] 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 기반의 하이드로젤 제조를 위해서 다음의 논문들을 참조하였다. (Pasanphan, W., Buettner, G. R. & Chirachanchai, S. Chitosan conjugated with deoxycholic acid and gallic acid: A novel biopolymer-based additive antioxidant for polyethylene. Journal of Applied Polymer Science 109, 38-46 (2008); Yu, S. H. et al. Preparation and characterization of radical and pH-responsive chitosan-gallic acid conjugate drug carriers. Carbohydrate Polymers 84, 794-802 (2011); Pasanphan, W. & Chirachanchai, S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. Carbohydrate Polymers 72, 169-177, (2008).)

[0101] 상기 실시예 1-1에서 제조한 키틴 나노섬유 하이드로젤 10g을 PBS 버퍼 50 ml에 첨가하였다. 키틴 단량체 (acetyl-glucosamine)에 대하여 2 당량의 갈산과, 갈산에 대하여 1.1 당량의 EDC를, 메탄올 20 ml에 용해시켰다. EDC가 완전히 용해된 15분 후, NHS (EDC의 1 당량)를 메탄올 용액에 첨가하였다. NHS 첨가 30분 후, 키틴 하이드로젤을 포함하고 있는 버퍼와 갈산/EDC/NHS를 포함하고 있는 용액을 혼합하고, 혼합물을 12시간 동안 유지하였다. 상기 과정은 아이스 베스(ice bath)내에서 수행하였으며, 하이드로젤 함성물 안의 EDC와 NHS는 대규모 회석, 원심분리법(centrifugation), 디캔테이션(decantation), 및 물 기반의 투석을 이용하여 제거되었다.

[0102] 상기 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤 속에 존재하는 갈산-키틴 콘주게이션을 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy)으로 분석하였으며, 그 결과를 도 2b에 나타냈다.

[0103] 도 7은 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 포함하는 하이드로젤을 개략적으로 설명하는 그림이다.

[0104] 도 2b에 나타낸 바와 같이, 상기 제조된 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유를 함유한 하이드로젤에 갈산이 첨가 되었는지 여부를 FT-IR을 활용해서 확인할 수 있었다. FT-IR 분석은 4 cm⁻¹ 분해능을 가지며, 1000 내지

4000 cm^{-1} 범위를 가진, 싱글빔(single-beam) MIDAC M 1200 (Midiac corporation, MA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0105] **실시예 2: 비색분석법을 통한 갈산 결합의 확인**

[0106] 접착제에 있는 갈산의 함량을 정량 하기 위해, 수정된 Arnou 어세이를, 아미노산 및 폴리페놀 추출물 분석에 널리 쓰이는 키틴 가수분해 방법과 함께 수행하였다. 5 mg, 10 mg, 및 15 mg 의 갈산과 25 mg 의 건조된 접착제를, 각각 6 M HCl 500 μl 와 페놀 20 μl (산화물 최소화하기 위함)를 포함하고 있는 유리 앰플 안에 진공 밀봉하고 110 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열하였다. 24 시간 후, 각각의 유리 앰플 안에 용액을 10배 희석시켰다. 1.45 M sodium nitrite/0.4 M sodium molybdate 용액 500 μl 를 각각의 희석된 용액 500 μl 에 첨가하여 색깔의 변화를 관찰하였고, 1M NaOH 1ml를 각각의 희석된 용액에 첨가하여 색깔의 변화를 관찰하였다.

[0107] 상기 각각의 희석된 용액의 색깔 변화를 결과를 도 2c에 나타냈다.

[0108] 도 2c에 나타난 바와 같이, 1.45 M sodium nitrite/0.4 M sodium molybdate 용액 500 μl 를 첨가한 경우 어두운 노란색으로 변화였고, 1M NaOH 1ml를 첨가한 경우 검붉은색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다.

[0109] **실시예 3: 접착 조성물의 제조**

[0110] 갈산 (피로갈롤산)으로 표면 처리된 키틴 나노섬유가 생체 조직과 유사한 표면에서의 접착력을 알아보기 위하여 여러 접착실험을 수행하였다. 상기 실시예 1에서 제조한 갈산이 결합된 키틴 나노섬유를 함유하는 하이드로젤에서, 수중에서 접착력을 유지하기 위해서 경화 과정이 필요한 데, 피로갈롤에 의한 서로 다른 경화 방법, 즉 금속이온과의 배위결합에 의한 경화 방법과 잔기간 공유결합에 의한 경화방법을 통해 두 종류의 접착 조성물을 만들었다.

[0111] 첫 번째로 배위결합 방법으로, 실시예 1에서 제조된 피로갈롤이 결합된 키틴 나노섬유에 피로갈롤:Fe³⁺의 몰비가 3:1이 되도록 FeCl₃를 섞어 주어 피로갈롤-Fe 배위결합에 의해 경화시켜 Fe³⁺ 및 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤을 함유하는 접착 조성물을 제조하였다.

[0112] 두 번째로 공유결합 방법으로, 실시예 1에서 제조된 피로갈롤이 결합된 키틴 나노섬유에 피로갈롤:IO₄⁻의 몰비가 2:1이 되도록 산화제인 NaIO₄를 처리하여 공유결합을 통해 가교시켜, IO₄⁻ 및 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤을 함유하는 두 종류의 접착 조성물을 제조하였다.

[0113] Fe³⁺-DOPA 하이드로젤은 Fe³⁺가 카테콜 (DOPA의 잔기)과 배위결합을 이루어 물속에서 강한 가역적인 결합을 가진다고 알려져 있는데, DOPA의 잔기인 카테콜과 Fe³⁺의 배위결합은 라만 분광법에 의해서 분석 가능하다고 잘 알려져 있다 (Holten-Andersen, N. et al. pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 2651-2655 (2011)) (Kim, B. J. (2014). Mussel-Mimetic Protein-Based Adhesive Hydrogel. Biomacromolecules.). 위 논문들을 바탕으로 피로갈롤 그룹과 Fe³⁺ 간의 배위결합을 라만 분광학 실험을 통해 증명하였다. 라만 분광 실험을 수행한 결과 갈산의 피로갈롤 그룹은 Fe³⁺와 강하면서도 가역적인 결합을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0114] 그 결과를 도 4b에 나타냈다. 라만 스펙트럼은 LabRam ARAMIS (Horiba Jobin-Yvon, France)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 얻었다. 모든 스펙트럼은 785 nm의 광을 시료에 조사하여 400 cm^{-1} 내지 1600 cm^{-1} 범위의 값들 데이터 값을 수집했다.

[0115] 도 4b에 나타난 바와 같이, Fe³⁺과 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유가 Fe³⁺-DOPA 복합체처럼 배위결합을 이루어, 물속에서 강한 가역적인 결합이 되어 성공적으로 착화합물이 형성됨을 확인할 수 있었다.

[0116] **실시예 4: 접착 조성물의 수중접착강도 (shear strength) 측정**

[0117] 상기 실시예 3의 두 종류의 접착 조성물의 수중 접착력을 측정하였다.

[0118] 10mm X 50mm 크기를 가진 두 알루미늄 막대기 10mm X 10mm 면적의 끝부분에 조성물을 바른다. 접착 조성물이 발라져 있는 10mm X 10mm의 두 알루미늄 막대기 끝을 서로 마주보도록 포개어 클립으로 고정시켰다. 2개의 알루미늄 막대기가 클립으로 고정시키면 1 쌍의 접착 실험 시료 샘플이 된다. 이런 방식으로 두 개의 접착 조성물에 대해 각각 5쌍의 샘플을 준비한 후 PBS (pH 7.4) 버퍼에 2시간 동안 침지시켰다.

[0119] 수중접착강도는 다음과 같은 방법으로 측정되었다. universal testing machine (INSTRON)을 이용하여 알루미늄 막대기 양쪽을 5 mm/min 속도로 잡아당기면서 거리에 따른 힘을 측정하였다. stress는 F(force)/A(area, 면적)으로 잡아당기는 힘을 단면적(10mm X 10mm)으로 나눈 값이며 단위는 N/m^2 이다. strain 은 늘어난 비율을 의미하며 [(최종길이-처음길이)/처음길이]x100을 의미한다. Strain-stress 그래프는 x축은 strain y축은 stress로 나타낸다. 두 알루미늄 바 사이의 접착제가 떨어지기 전 가장 높은 stress 값을 시료의 접착강도 (shear strength)로 정의한다. 두 접착 조성물의 접착 강도 및 stress-strain 커브 그래프는 도 3에 나타내었다. 참고 문헌 (Kim, B. J. (2014). Mussel-Mimetic Protein-Based Adhesive Hydrogel. Biomacromolecules)

[0120] **실시예 5: 조골세포에 대한 세포독성 시험**

[0121] 상기 실시예 3의 접착 조성물들이 세포 독성이 있는지 확인하기 위해서, 조골세포 (Mouse osteoblast MC3T3-e1; Riken cell bank)에 대한 세포 생존능력 실험을 수행하였다. 실험 방법과 세포 생존 능력 (개체 수) 측정 원리는 다음과 같다.

[0122] 접착 조성물인 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 물질을 세포 배양 디쉬(dish)에 코팅하여 실험군으로 삼았고, 아무것도 코팅되지 않는 세포 배양 디쉬를 대조군으로 삼았다. 두 종류의 세포 배양 디쉬에 미리 준비된 조골세포가 골고루 분산된 용액을 분양시켰다. 3일동안 서로 다른 세포 배양 디쉬에서 자라는 조골세포의 개체 수를 CCK-8 (cell counting kit-8)를 이용하여 모니터링 하였다. CCK-8 시약은 세포 대사 물질과 반응하여 발색하기 때문에 세포를 포함하고 있는 배지의 흡광계수를 통해 세포 개체 수를 구할 수 있다. 또한, 세포 개체 수 증가는 세포 생존능력과 비례하는 것으로 이것을 통해 세포 생존 능력을 정량적으로 말할 수 있다.

[0123] 세포생존 능력 시험 결과를 도 5에 나타냈다. 빨간색 원은 본 발명의 접착 조성물을 처리한 유리기판에서의 세포 생존능력을 나타낸 결과이며, 검은색 원은 본 발명의 접착 조성물을 처리하지 않는 유리기판을 대조군으로 사용한 경우의 세포 생존능력을 나타낸 결과이다.

[0124] 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 접착 조성물을 처리한 유리기판에서의 세포 생존능력이 대조군에 비해서 오히려 향상된 것으로 보아, 본 발명에서 만들어낸 갈산으로 표면 처리된 키틴 나노섬유 하이드로젤이 생체에 무해함을 보여 주었다.

[0125] **실시예 6: 키토산 나노섬유의 하이드로젤 제조**

[0126] 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤 제조를 위해서 다음의 논문들을 참조하였다. (Pasanphan, W., Buettner, G. R. & Chirachanchai, S. Chitosan conjugated with deoxycholic acid and gallic acid: A novel biopolymer-based additive antioxidant for polyethylene. Journal of Applied Polymer Science 109, 38-46 (2008); Yu, S. H. et al. Preparation and characterization of radical and pH-responsive chitosan-gallic acid conjugate drug carriers. Carbohydrate Polymers 84, 794-802 (2011); Pasanphan, W. & Chirachanchai, S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. Carbohydrate Polymers 72, 169-177, (2008).)

[0127] 키토산(85-95%의 탈아세틸화된 키토산)1g을 pH 2인 염산 수용액 100 ml에 녹였다. 1M 수산화나트륨 수용액을 조금씩 떨어뜨리면서 키토산 용액의 pH를 5.5 까지 증가시켰다. 단량체(glucosamine)에 대하여 2당량의 갈산과, 갈산에 대하여 1.1당량의 EDC를, 메탄올 20 ml에 용해시켰다. EDC가 완전히 용해된 15분 후, NHS (EDC의 1당량)를 메탄올 용액에 첨가하였다. NHS 첨가 30분 후, 키토산 용액과 갈산/EDC/NHS를 포함하고 있는 용액을 혼합하고, 혼합물을 12시간동안 유지하였다. 상기 과정은 아이스 베스(ice bath)내에서 수행하였으며, 하이드로젤 합성물 안의 EDC와 NHS는 대규모 회석, 원심분리법(centrifugation), 디캔테이션(decantation), 및 물 기반의

투석을 이용하여 제거되었다.

[0128] 상기 갈산을 함유하는 키토산 하이드로젤 속에 존재하는 갈산-키토산 콘쥬게이션을 proton Nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)로 분석하였으며, 그 결과로서 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤 $^1\text{H-NMR}$ 데이터를 도 7에 나타냈다.

[0129] 도 7에 나타낸 바와 같이, 상기 제조된 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤에 갈산이 첨가되었는지 여부를 $^1\text{H-NMR}$ 을 활용해서 확인할 수 있었다.

[0130] **실시예 7: 키토산 하이드로젤을 이용한 접착조성물 제조**

[0131] 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤이 수중에서 접착력을 유지하기 위해서 경화 과정이 필요한 데, 피로갈롤에 의한 서로 다른 경화 방법, 즉 금속이온과의 배위결합에 의한 경화 방법과 잔기간 공유결합에 의한 경화방법을 통해 두 종류의 접착 조성물을 제조하였다. 상기 접착 조성물의 제조방법을 실시예 3과 실질적으로 동일하되, 실시예 3의 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤을 사용하였으나, 대신에 본 실시예에서는 실시예 6의 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤을 사용하였다.

[0132] 첫 번째 금속이온과의 배위결합에 의한 경화 방법으로서, 실시예 6에서 제조한 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤에 피로갈롤: Fe^{3+} 의 몰비가 3:1이 되도록 FeCl_3 를 섞어 주어 피로갈롤-Fe 배위결합에 의해 경화시켜, Fe^{3+} 및 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤을 함유하는 접착 조성물을 제조하였다.

[0133] 두 번째 잔기간 공유결합에 의한 경화방법으로서, 실시예 6에서 제조한 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤에 피로갈롤: IO_4^- 의 몰비가 2:1이 되도록 산화제인 NaIO_4 를 처리하여 공유결합을 통해 가교시켜, IO_4^- 및 갈산을 함유하고 있는 키토산 하이드로젤을 함유하는 두 종류의 접착 조성물을 제조하였다.

[0134] 상기 제조된 두 종류의 접착 조성물에 대한 사진을 도 9에 나타냈다. 도 9에 사진은 제조된 하이드로젤의 접착력을 보여준 사진이며, pyrogallol 잔기 사이의 공유결합에 가교의한 하이드로젤과 금속과의 배위결합에 의해 가교된 하이드로젤의 형태를 보여주고 있다. 이때, pH는 pH가 증가할수록 배위결합의 수를 최대치로 끌어 올릴 수 있어서 pH를 증가시킨 사진이다. 즉, 단순한 하이드로젤의 형태 사진이다. 또한, 본원 키토산 나노섬유 이용한 경우 물성확인 실험결과를 도 3에 나타냈다.

[0135] **실시예 8: 키토산 하이드로젤을 포함하는 생체접착제의 특성평가**

[0136] 하이드록시아파타이트를 키토산 하이드로젤에 수중으로 접착한 사진과 간단한 실험방법, 키토산 하이드로젤로 기계적 강도는 측정하지 않았지만, 점막에 물속에서 접착

[0137] 임상수술시 골재생을 위해 실제 사용되는 하이드록시아파타이트(칼슘-포스페이트 복합체) 또는 소뼈가루 등의 골전도성 물질 고정을 위한 접착 물질로 키토산/갈릭산 하이드로젤을 사용하였다. 위와 같이 임상에서 사용되기 위해 체내 수중환경에서의 수중 접착제로서 특성평가를 위한 시험방법은 다음과 같다.

[0138] 실시예 7 에서 제조된 키토산/갈릭산 물의 20%(w/w)가 되도록 녹여 키토산이 포함된 하이드로젤을 형성시킨다. 이 때, 키토산/갈릭산의 농도는 20%(w/w)에만 국한되지 않으며, 10%(w/w) 이상의 경우에 충분한 접착력을 유지함을 확인하였다.

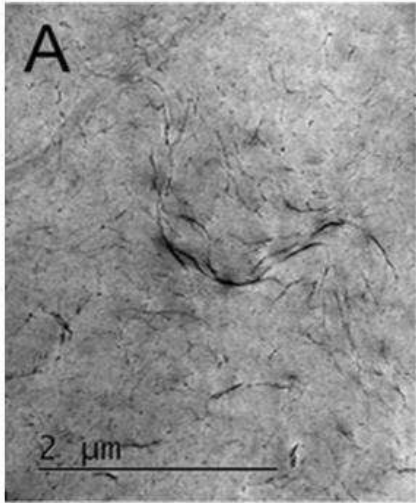
[0139] 제조된 하이드로젤을 하이드록시아파타이트 또는 소뼈가루와 함께 섞어 주었고, 산화제인 NaIO_4 를 이용하여 강한 공유결합을 형성시켜 접착력을 증가시켰으며 도 10에 나타내었다. 산화제를 사용하지 않는 경우에도 충분한 접착능을 보였으며, 본 실시예 에서는 강한 결합을 유도하기 위해 산화제와 함께 사용하였다.

[0140] 또한, 제조된 하이드록시아파타이트/접착제 복합체를 물속에 넣고, 강하게 흔들었으나 분리되어 떨어지는 구성물을 보이지 않았으며, 강한 접착력은 일주일 이상 유지되었으며, 도 11에 나타내었다.

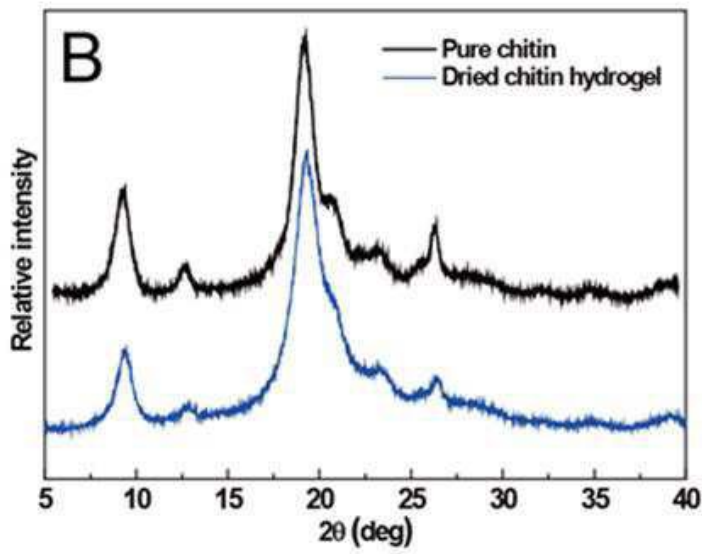
[0141] 본 실시예는 해당 접착제가 생체접착제로서 가능성을 지니고 있으며, 이는 생체 내부의 점막조직 및 장기 내 봉합제제 또는 오랫동안 지속가능성 약물전달제제로서의 사용가능성을 내포하고 있다.

도면

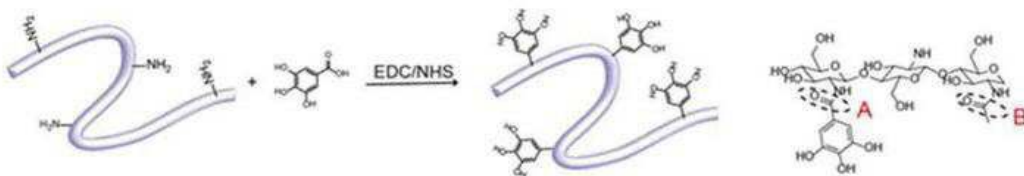
도면1a



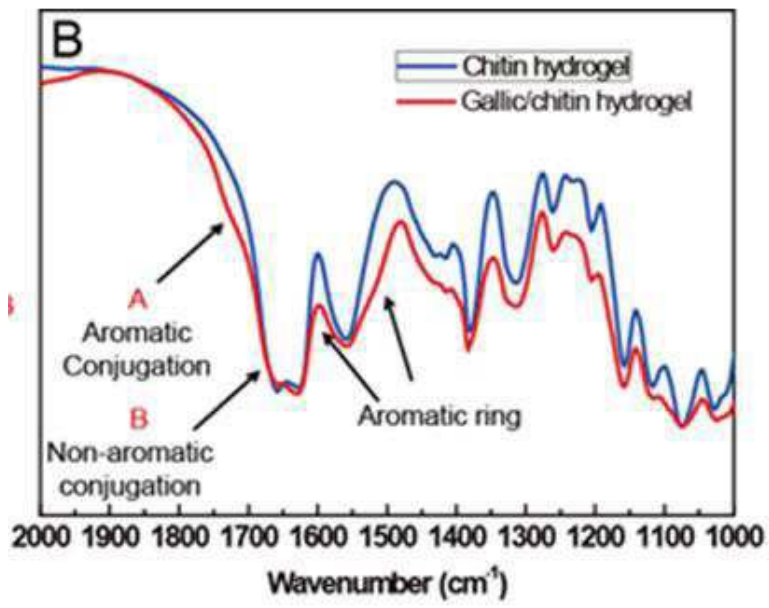
도면1b



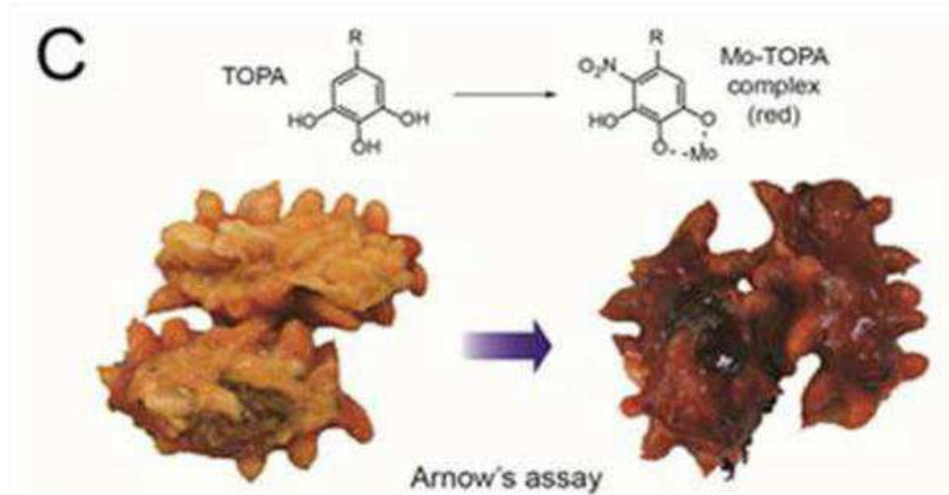
도면2a



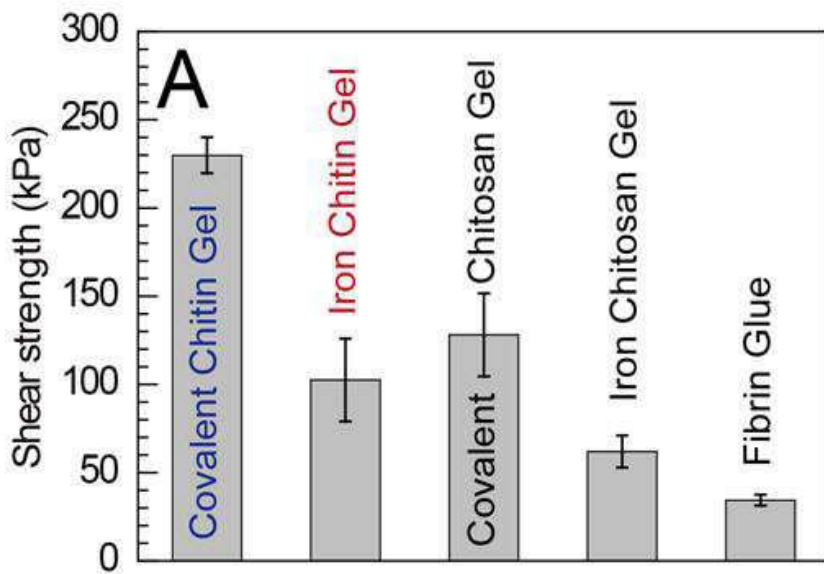
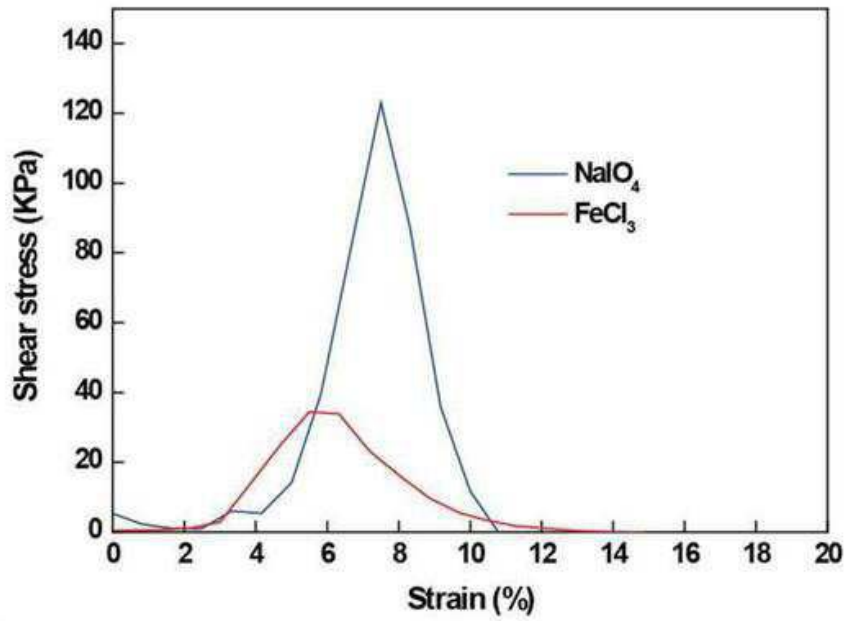
도면2b



도면2c



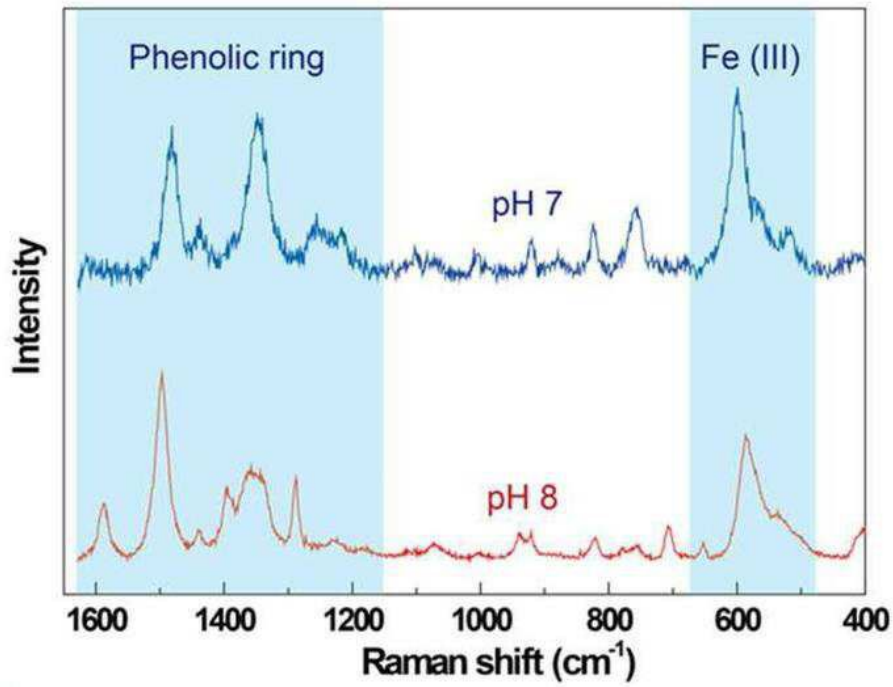
도면3



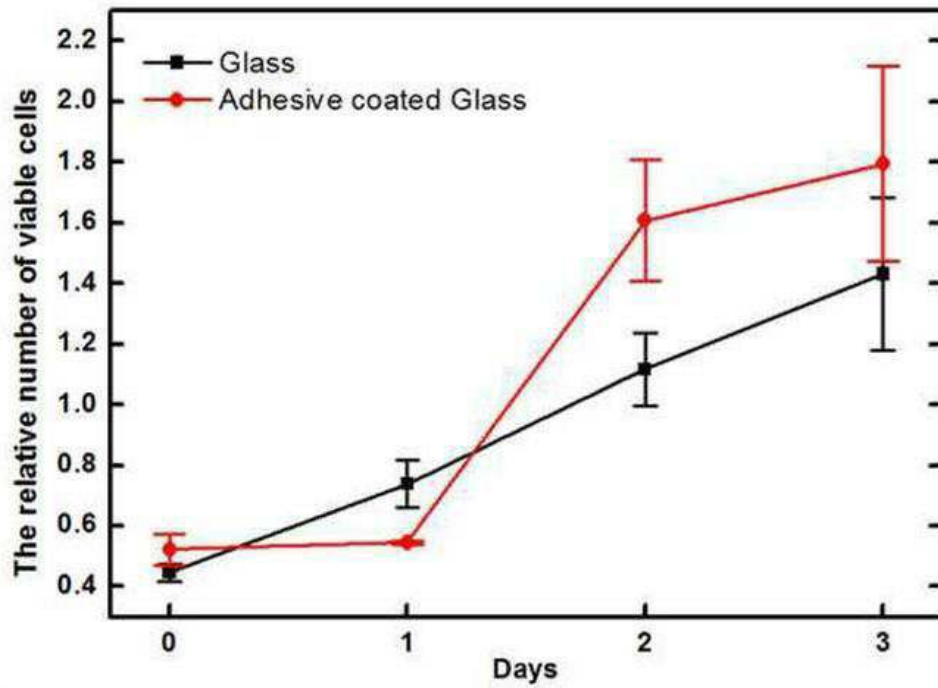
도면4a



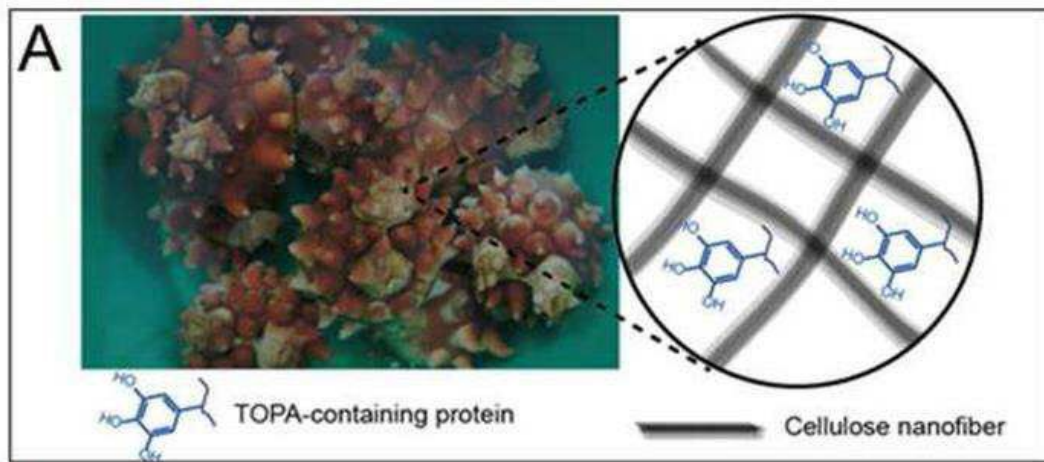
도면4b



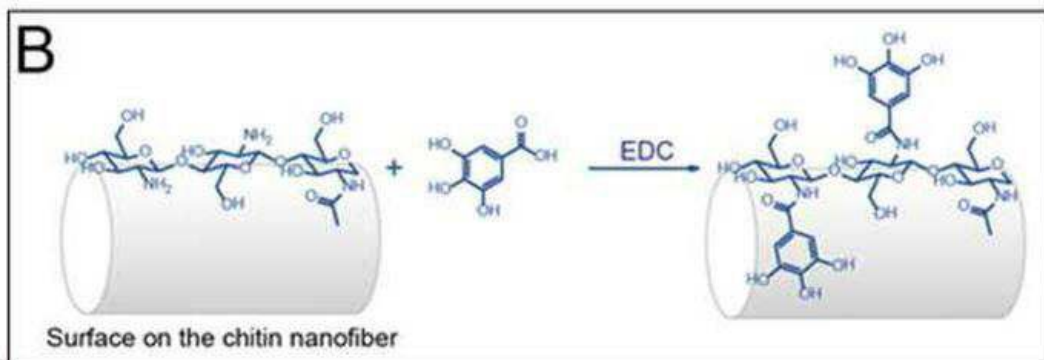
도면5



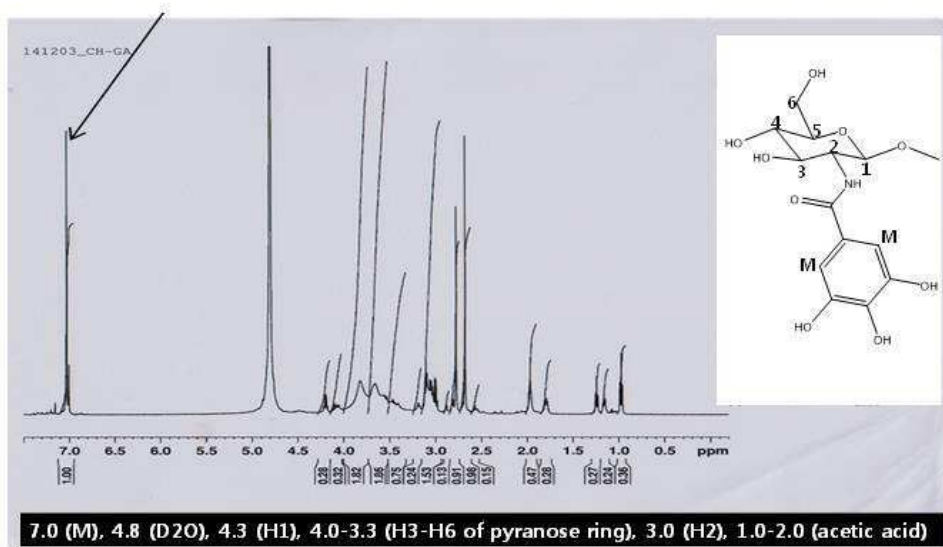
도면6



도면7

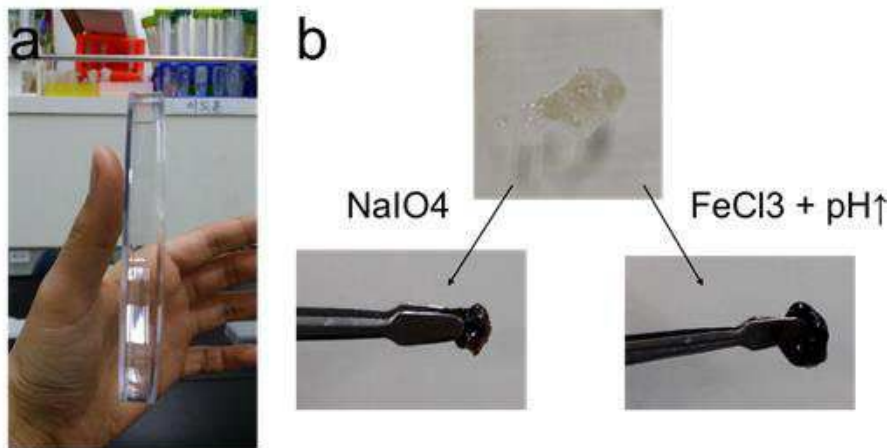


도면8

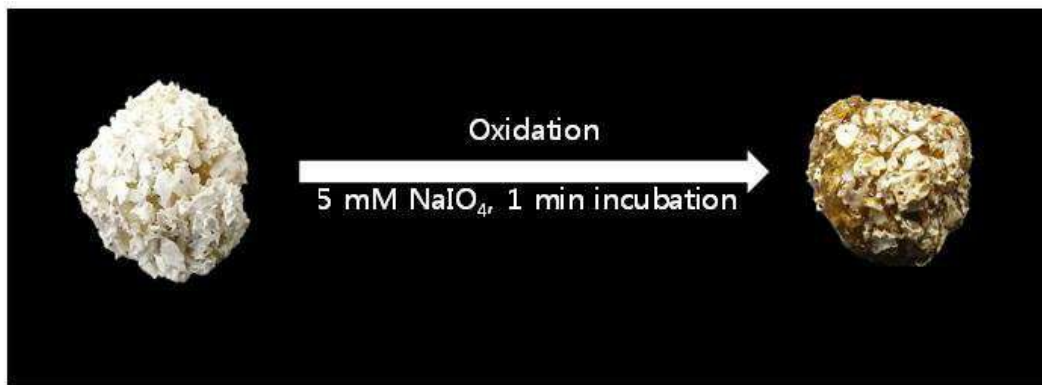


¹H NMR of Chitosan-Gallic acid conjugate

도면9



도면10



도면11

