

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51). Int. Cl.

*A61L 27/00* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0052891

*A61L 27/22* (2006.01)

(43) 공개일자 2006년05월19일

*A61L 27/36* (2006.01)*A61L 24/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7001784

(22) 출원일자 2006년01월25일

번역문 제출일자 2006년01월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/023557

(87) 국제공개번호 WO 2005/011764

국제출원일자 2004년07월22일

국제공개일자 2005년02월10일

(30) 우선권주장 10/626,571 2003년07월25일 미국(US)

(71) 출원인  
에스디지아이 홀딩스 인코포레이티드  
미국 브라운스빌 19801 월밍تون 스트리트 508 브라운스빌 애비뉴 300(72) 발명자  
맥케이, 윌리엄, 에프.  
미합중국 테네시 38133, 멤피스, 맥앨리 코브 3870  
토리아니, 마크, 더블유.  
미합중국 캘리포니아 92675, 샌 후안 카파스트라노, 비아 텔 아모32882  
에브라얼츠, 에프.제이.엘.  
네덜란드 앤델-6228 비티 매스트리취 알케보드 26  
드라포우, 수잔, 제이.  
미합중국 테네시 38018, 콘도바, 월리 레인 2009(74) 대리인  
김학제  
문혜정

심사청구 : 있음

(54) 콜라겐 및 광물제거 뼈 기질을 포함하여 이루어진 가교조성물

**요약**

콜라겐 단백질 및 광물제거 골 기질을 포함하는 조성은 상기 조성이 화학적으로 N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카보디아이미드 하이드로클로라이드(EDC)와 같은 카보디아이미드와 함께 가교된다는 점에서 설명된다. 상기 가교 반응은 N-하이드록시숙신아이미드(NHS)가 존재할 때 수행될 수 있다. 상기 콜라겐은 다공성 기질 또는 골격 내부에 있을 수 있다. 상기 DBM은 상기 콜라겐 내부에 분산된 작은 조각의 형태로 있을 수 있다. 상기 조성을 만드는 방법은 또한 콜라겐 슬러리가 다공성 스캐폴딩을 형성하기 위하여 상기 바람직한 형태, 냉동 건조로 만들어지고 및 상기 가교제를 포함하는 용액과 함께 침투된다는 점에서 설명된다. 상기 조성은 조직(예를 들어, 연조직 또는 골)공작용 임플란트로써 사용될 수 있다.

**명세서**

## 기술분야

본 발명은 생체 인공 판막에 관한 것으로, 특히 광물제거 뼈 기질(demineralized bone matrix, DBM)을 포함하는 화학적으로 가교된 콜라겐 기초 캐리어(carrier) 및 이들 물질을 예를 들어 뼈 유도 임플란트와 같은 임플란트용으로 사용하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

외상이나 질병으로 인하여 결손된 뼈나 연골 세포를 치료하거나 재생하기 위하여 여러 가지 물질들이 사용된다. 통상적으로 뼈 발생과 관련된 세포들의 이동, 증식 및 분화를 위한 임플란트용 뼈 치료 재료로써 다공성 기질(즉 스캐폴드)이 제공되었다. 이러한 방법에 의하여 제공되는 조성물은 침습적 뼈 성장에는 안정적인 구조를 제공하나, 뼈 세포의 증식이나 뼈 재생을 증진시키지는 못하였다.

다음의 방법으로, 뼈 결합 부위에 이식될 경우에 침습적 내증식을 위한 스캐폴딩을 제공할 뿐 아니라 뼈 세포의 복제 및 분화를 활발하게 유도하는 생활성 단백질이 포함된 뼈 치료 기질이 사용되었다. 일반적으로 이러한 뼈 유도 조성물은 뼈의 침습적 성장용 스캐폴드를 제공하는 기질과 부착증식 세포 및 뼈 유도 단백질원을 포함하여 이루어진다. 상기 기질은 콜라겐이나 폴리락트 산 또는 생분해성 다공질 세라믹과 같은 무기물질 중에서 선택될 수 있다. 뼈 생성 과정을 통하여 새로운 뼈의 형성을 유도하는 것으로 밝혀진 두 가지 특별한 물질로서 광물제거 뼈 입자 또는 가루 및 뼈 형태 형성 단백질(BMP)이 있다.

조직 공학용으로 여러 가지 다양한 종류의 조성물들이 사용되었으나, 아직까지도 뼈와 연골 조직의 치료 및 재생을 촉진시킴으로써 이식받는 환자들의 빠른 회복과 보다 더 좋은 결과를 낳게 하기 위한 개선 및 향상의 필요성이 있다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명의 첫 번째 양상은, 광물제거 뼈 기질(DBM) 및 콜라겐 단백질이 가교된 조성물을 제공하는 것이다. 상기 조성물은 카보디이미드로써 화학적으로 가교될 수 있다. 상기 카보디이미드는 N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)로 이루어질 수 있다. 상기 조성물은 N-하이드록시숙신이미드(NHS)의 존재하에 카보디이미드로써 화학적으로 가교될 수 있다. 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 성장 인자를 추가로 포함할 수 있다. 상기 콜라겐 단백질은 다공성 스캐폴딩에 존재할 수 있다. DBM은 입자 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 콜라겐 단백질을 포함하는 다공성 스캐폴드 내에 분산된 DBM 입자를 포함하여 이루어질 수 있다. DBM의 평균 입도는 최대 5mm 까지 될 수 있다. 예를 들어 DBM 입자의 평균 입도는 53에서 850  $\mu\text{m}$  사이일 수 있다.

본 발명의 두 번째 양상은, 광물제거 뼈 기질(DBM) 및 콜라겐 단백질이 가교된 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다. 상기 조성물은 카보디이미드로써 화학적으로 가교될 수 있다. 상기 카보디이미드는 N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)로 이루어질 수 있다. 상기 조성물은 N-하이드록시숙신이미드(NHS)의 존재하에 카보디이미드로써 화학적으로 가교될 수 있다. NHS가 사용되는 경우, NHS는 EDC/NHS의 비율이 1:2에서 2:5의 비율로 사용될 수 있다. 예를 들어, NHS는 EDC/NHS의 비율이 1:2, 2:3 또는 2:5의 비율로 될 수 있다. 완충 용액과 같은 조절된 pH에서 반응이 발생할 수도 있으며 발생하지 않을 수도 있다. 본 발명에 따른 방법은, 광물제거 뼈 입자를 콜라겐 슬러리 내에 분산시키고 상기 슬러리를 주형에 주입한 후 광물제거 뼈 기질을 포함하는 다공성 콜라겐 스캐폴딩을 형성하기 위하여 냉동 건조 과정을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 슬러리는 콜라겐 단백질과 DBM 입자를 포함하는 액상 슬러리일 수 있다. 슬러리는 산성 pH일 수 있다. 본 발명의 방법에 따르면, 가교는 상기 가교를 형성하기 위하여 카보디이미드 가교제가 다공성 콜라겐 스캐폴딩에 침윤되어 콜라겐 단백질 분자와 반응하는 과정을 포함하여 이루어질 수 있다.

본 발명의 세 번째 양상은, 광물제거 뼈 기질(DBM) 및 콜라겐 단백질이 가교된 조성물을 포유류에 임플란팅하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공하는 것이다. 상기 조성물은 카보디이미드로써 화학적으로 가교될 수 있다. 상기 조성물은 정형 외과 응용에 사용될 수 있다. 예를 들어 상기 조성물은 포유류의 척추나 또는 추간 공간에 임플란트 될 수 있다. 상기 포유류는 인간일 수 있다.

본 발명의 네 번째 양상은, 광물제거 뼈 기질(DBM) 및 콜라겐 단백질을 포함하고 아미드 결합을 통하여 가교된 조성물을 제공하는 것이다. 상기 조성물은 콜라겐 단백질 내에 분산된 DBM 입자를 포함하여 이루어질 수 있다. 상기 콜라겐 단백질은 다공성 스캐폴딩 내에 존재할 수 있다. DBM의 평균 입도는 최대 5mm 까지 될 수 있다. 예를 들어 DBM 입자의 평균 입도는 53에서 850  $\mu\text{m}$  사이일 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 카보디이미드 가교체를 사용한 아미드 가교된 단백질 기질의 형성을 나타내는 예시도이고,

도 2-7은 쥐에 임플란트된 콜라겐/DBM 스폰지의 조직 사진이다.

## 실시예

본 발명의 한 실시예에 따르면, 세포 이동용 골 전도(osteocompetent) 기질을 제공하고 환자에게 이식한 후에 연장된 기간을 갖는, 콜라겐 캐리어 내부에 DBM을 포함하는 조성물이 제공된다. 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 화학적 가교 방법이 콜라겐 및 DBM을 포함하는 조성물을 가교하기 위하여 제공된다. 가교하는 동안, 콜라겐 분자들은 상기 콜라겐 분자들에서 반응기가 존재하는 내내 서로 가교될 수 있다. 또한 가교하는 동안, 콜라겐 분자들은 상기 DBM에서 반응표면기의 존재 때문에 상기 DBM에 가교될 수 있다. 그 결과, 이식 후에 길게 지속되고 뼈가 형성됨으로써 생체 내에서 여전히 방향이 바뀔 수 있는 골 전도(osteocompetent) 기질이 제공된다. 이 방법은 또한 상기 기질에 첨가되는 DBM의 양의 제어 및 상기 결과 조성의 물질 운반 성질의 최적화를 허락한다.

본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)와 같은 카보디이미드는 상기 조성을 화학적으로 가교하는데 사용될 수 있다. 도 1은 카보디이미드를 사용하는 아미드 가교 단백질 기질의 형성을 예시한다. 도 1에서와 같이, 제 1 단백질 분자에서 자유 카르복실산기는 O-아실리소리아(O-acylisourea) 기를 형성하기 위하여 카보디이미드와 함께 반응한다. 예를 들어, 상기 카르복실산기는 콜라겐 분자의 글루타민산 또는 아스파라트산 잔기가 될 수 있다. 그런 뒤 상기 파생 O-아실리소리아기는 상기 가교를 형성하기 위하여 제 2 단백질 분자에서 아민 그룹과 함께 반응할 수 있다. 예를 들어, 상기 아민 그룹은 콜라겐 분자의 하이드록시리신 잔기(hydroxy lysine residue)가 될 수 있다.

비록 콜라겐 분자들 사이의 가교는 위에서 논의되었지만, 또한 가교는 DBM 및 콜라겐 사이에서도 형성될 수 있다. 예를 들어, 상기 광물제거 골 기질의 표면에서 카르복실산기는 상기 카보디이미드와 함께 반응할 수 있고 그런 뒤 상기 파생 O-아실리소리아기는(O-acylisourea) 기는 콜라겐 분자에서 아민기와 함께 반응할 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 콜라겐 기질은 카보디이미드(예를 들어, EDC)와 함께 N-하이드록시숙신이미드(NHS)가 존재할 때 가교될 수 있다. 상기 가교 반응 동안의 상기 NHS의 첨가는 가교 반응 속도를 증가시킴으로써, NHS를 사용 없이 형성된 조성물의 가교밀도 보다 높은 가교밀도를 형성할 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 콜라겐 기질은 완충되거나 또는 제어된 pH 조건하에서 EDC와 가교될 수 있다. 다양한 가교 조건은 국제 공개 제WO 85/04413호에서 밝혀졌다.

전형적인 가교 조건은 10 내지 300mM 농도의 카보디이미드, 2 내지 40°C의 반응 온도, 2 내지 11 사이의 pH, 및 약 1 내지 96 시간의 반응 시간을 포함한다. 다만, 여기에 한정되지는 않는다. 추가 전형적인 반응 조건은 20 내지 200mM 농도의 카보디이미드, 10 내지 35°C의 반응 온도, 3 내지 9 사이의 pH, 및 약 2 내지 48 시간의 반응 시간을 포함한다. 부가적으로 전형적인 반응 조건은 50 내지 150mM 농도의 카보디이미드, 20 내지 30°C의 반응 온도, 4 내지 6.5 사이의 pH, 및 4 내지 24 시간의 반응 시간을 포함한다.

비록 EDC가 상기에서 개시되었지만, 여기에 한정되지 않고 다른 카보디이미드 가교체를 포함하여 시안아미드는 또한 본 발명의 실시예에 따라 사용될 수 있다. 그러나 성장인자, 세포, 가소제, 및 칼슘 또는 인산염을 포함하는 화합물은 또한 상기 발명의 실시예에 따라 상기 뼈 유도 조성물에 첨가될 수 있다.

상기 화학적 가교 방법은 상기 기질에 첨가된 DBM의 양 및 상기 DBM의 뼈 유도 능력에 두드러지게 영향 주는 것 없이 상기 물질 운반 성질을 최적화하는 것을 허락한다. 이 가교 방법은 수화된 때 그 형상을 유지할 수 있고 수화된 때 압축에 따른 그 고도를 회복할 수 있는 콜라겐/DBM 조성의 생산을 허락한다.

본 발명의 실시예에 따른 상기 콜라겐/DBM 조성물은 다양한 형태로 잘라질 수 있고 임플란트 형태의 다양함에 맞춰 말렸을 때 그 구조가 유지될 수 있다. 상기 조성은 6 내지 10 주의 시간틀용 상기 임플란트 내부에서 손상되지 않고 남아있을 수 있다. 그러나, 이 시간틀은 이식 부위 및 환자에서 환자간의 다양성에 의존한다. 자연 성분인 상기 콜라겐은 세포부착 및 이동을 허락하고 결합 부위에서 상기 세포가 존재함에 의해 개조될 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 조성물은 작은 콜라겐 스폰지(collagen sponge) 형태일 수 있다. 상기 스폰지 형태는 뼈나 연질조직의 회복을 위하여 결합부위에 단독으로 축적되거나, 동종이식(allograft) 또는 동종이식 조직과 결합될 수 있다. 작은 콜라겐 스폰지는, 예컨대, 큐브나 직사각형의 고체일 수 있다. 상기 스폰지는 2-10 mm의 크기일 수 있다. 나아가, 스폰지는 좀더 정교한 크기로 연마될 수 있고 식염수나 다른 화석제와 결합되어 페이스트상의 물질로 될 수 있다. 상기 페이스트상의 물질은 뼈나 연질조직의 회복을 위하여 상처부위에 주입되거나 축적될 수 있다.

또한, 본 발명의 실시예에 의한 DBM과 콜라겐을 포함하는 조성물의 이식은 뼈형성을 촉진하기 위한 뼈유도 및 뼈전도 특성을 갖는 조성물을 제공한다

본 발명의 전형적인 실시예에 의하면, 콜라겐 단백질은 다공성 스캐폴딩 내부에 존재한다. 예컨대, 콜라겐 매트릭스는 다공성 또는 반다공성 스폰지 형태로 존재할 수 있다. 대신에 콜라겐 매트릭스는 막, 섬유와 같은 구조, 분말, 양털모양 또는 섬유 형태로 존재할 수 있다. 다공성 스캐폴딩은 뼈 내부증식을 위한 뼈전도 매트릭스를 제공할 수 있다.

DBM은 일정 크기와 모양의 입자 형태로 존재 할 수 있다. 예컨대, 5 mm 이상의 평균직경을 갖는 DBM 입자는 본 발명의 일 실시예에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에 따라, 2 내지 4 mm의 직경을 갖는 DBM 입자가 사용될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시예에 따라, 53 내지 850  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 입자 형태로 사용될 수 있다. 그러나, 조성물의 소정의 특성에 따라 좀더 크거나 작은 입자가 또한 사용될 수 있다. 조성물중의 DBM은 블락이나 스트립(strips) 형태일 수도 있다.

콜라겐 소스(collagen source)는 이식받는 포유동물에 따라 동종이형(allogeneic)이거나 이종 발생성(xenogeneic)일 수 있다. 콜라겐 소스는 인간이나 동물로부터 유래하거나 세포주나 세균으로부터 발현되는 재조합 형태일 수 있다. 재조합 콜라겐은 효모나 원핵세포로부터 유래할 수 있다. 콜라겐은 공지의 방법에 의해 조직으로부터 추출할 수 있다. 콜라겐 단백질은 일종의 콜라겐형일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 일정량의 DBM을 포함할 수 있다. DBM의 양은 소정의 특성을 갖는 조성물을 얻기 위하여 조절할 수 있다. 본 발명의 일

실시예에 의하면, DBM과 콜라겐 고체의 중량에 따라 조성물은 2 내지 95 중량%의 DBM을 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에 의하면, DBM과 콜라겐 고체의 중량에 따라 조성물은 55 내지 85 중량%의 DBM을 함유할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 따른 유도 뼈 회복 조성물은 또한 하나 또는 그 이상의 성장인자를 포함할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 성장인자는 콜라겐 매트릭스 내부나 그 위에 존재할 수 있다. 예컨대, 사이토킨(cytokines)이나 프로스타글란딘(prostaglandins)은 다공성이나 반다공성 콜라겐 매트릭스 또는 DBM 입자의 내부나 그 위에 존재할 수 있다. 성장인자는 천연 유래, 재조합 그렇지 않으면 통상의 방법에 의해 생산되는 것일 수 있다. 상기 성장인자는 또한 상업적으로 얻어지는 것일 수도 있다. 둘 또는 그 이상의 성장인자의 조합은 임플란트의 뼈유도나 생물학적 활성을 증진시키기 위한 뼈유도 조성물에 응용될 수도 있다.

본 발명에 사용되거나 포함될 수 있는 성장인자의 예로는 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2A 및 TGF- $\beta$ 3와 같은 형질전환 성장인자- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 표피 생장인자(EGF), 인슐린 유사 생장인자-I이나 II(insulin like growth factor-I이나 II), 인터페론, 종양괴사 인자(tumor necrosis factor), 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor ; FGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 신경성장인자(NGF), 그리고 성장인자나 성장인자 유사 효과를 나타내는 다른 분자들이 될 수 있으나, 본 발명이 이들 예에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에 따라, 성장인자가 수용성 성장인자일 수 있다.

성장인자는 콜라겐 매트릭스를 형성하기 전에 콜라겐 안으로 혼입된다. 대신에 성장인자는 수용액 또는 비수용액상에서 콜라겐 매트릭스 속으로 흡수될 수 있다. 예컨대, 성장인자를 포함하는 용액은 콜라겐 매트릭스 속으로 침윤될 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 성장인자를 포함하는 용액은 진공 침윤(vacuum infiltration)을 사용하여 콜라겐 매트릭스 속으로 침윤될 수 있다.

성장인자나 인자들은 액체형태의 콜라겐 DBM 조성물로 전달될 수 있다. 그러나, 성장인자는 콜라겐 DBM 조성물 위로 또는 그 안으로 재조성하거나 투여되기 전에 견조한 상태로 제공될 수 있다. 콜라겐 매트릭스 위나 그 내부에 존재하는 성장인자 다공성이거나 반다공성 매트릭스의 틈새부피 내부에 존재할 수 있다. 조절된 방출 캐리어 내부에 함유되어 있는 성장인자는 콜라겐 DBM 조성물로 혼입될 수도 있다.

다공성 콜라겐 스캐폴딩을 형성하는 공지의 방법이 사용될 수 있다. 예컨대, DBM과 슬러리 형태의 콜라겐(예 : 수용성 슬러리)은 소정의 모양을 갖는 사상균의 공동(cavity)으로 보내져서, 스캐폴딩을 형성하기 위하여 동결건조될 수 있다. 건조된 스캐폴딩이 사상균으로부터 제거된 후, 카보디이미드(carbodiimide) 가교제가 조성물의 구멍속으로 침윤되어 가교를 형성하는 콜라겐 매트릭스와 DBM과 반응하는 것이 가능하게 된다.

이하, 가교된 콜라겐/DBM 조성물의 형성에 사용될 수 있는 반응방법의 예를 설명하나, 이들 방법에 국한되는 것은 아니다.

#### 반응방법 1

10-300 mM 농도의 EDC 수용액을 다공성 콜라겐/DBM 조성물에 첨가하여 콜라겐 가교를 형성하기 위하여 1-48 시간 동안 반응시킬 수 있다.

#### 반응방법 2

10-300 mM 농도의 EDC가 함유된 pH4.0-6.5의 MES 완충액을 다공성 콜라겐/DBM 조성물에 첨가하여 콜라겐 가교를 형성하기 위하여 1-48 시간 동안 반응시킬 수 있다.

#### 반응방법 3

EDC/NHS가 물에 1 : 2 내지 2 : 5(예: 1:2, 2:3 또는 2:5)의 비율로 함유되어 있는 10-300 mM 농도의 EDC가 함유된 NHS를 다공성 콜라겐/DBM 조성물에 첨가하여 콜라겐 가교를 형성하기 위하여 1-48 시간 동안 반응시킬 수 있다.

#### 반응방법 4

EDC/NHS가 pH 4.0-6.5인 MES 완충액에 1 : 2 내지 2 : 5(예: 1:2, 2:3 또는 2:5)의 비율로 함유되어 있는 10-300 mM 농도의 EDC가 함유된 NHS를 다공성 콜라겐/DBM 조성물에 첨가하여 콜라겐 가교를 형성하기 위하여 1-48 시간 동안 반응시킬 수 있다.

본 발명의 전형적인 실시예에 따르면, 화학적으로 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 뼈 이식 대체물(bone graft substitute)로 이용될 수 있다. (예를 들면, 충진제(void filler)로서). 화학적으로 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 포유류(예를 들면, 인간)에 인플란트될 수 있다. 본 발명의 한 실시예에 따르면, 화학적으로 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 포유류의 척추에 인플란트될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 화학적으로 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 포유류의 추간공간에 인플란트될 수 있다.

콜라겐 스폰지(Collagen sponges)는 60% DBM과 40% 콜라겐 슬러리(slurry)로 구성된다. 콜라겐 슬러리와 DBM 입자는 결합 및 혼합되어 균일농도(uniform consistency)로 되어 있다. 혼합물은 주형(mold)에 보내져서 냉각되고, 동결 건조된다. 건조된 스폰지는 밤새도록 상온에서 가교 용액에 노출된다. 가교 용액은 수용액에서 100 mM EDC으로 구성된다. 가교 후에 스폰지들은 5번 물로 세척된다. 스폰지들은 냉각되고 이어서 동결 건조된다. 다음에 스폰지들은 파우치(pouches)에 채워지고 E-빔 조사(E-beam irradiation)에 의해 살균된다.

이어서 스폰지들은 4주동안 실험용 쥐의 근육 파우치 모델(athymic rat intramuscular pouch model (hind limb))에 인플란트된다. 이어서 샘플은 추출(explant)되고, 조직상의 박편(histological sections)들이 준비되어서, 이 박편들이 Hemotoxylin & Eosin으로 착색된다. 샘플 조직 박편들의 촬영된 이미지(image)를 도 2부터 7까지 나타내고 있다.

도 2는 제 1 스폰지 단편의 이미지이다. 이 이미지는 20배 확대하여 촬영한 것이다. 스폰지 1은 80 % DBM 과 20 % 콜라겐으로 구성된다. 이 스폰지는 DBM 입자와 콜라겐 슬러리로 구성된다. 상기 혼합물은 주형에 주입되어 냉각되고, 동결 건조되어 스폰지 형태(sponge configuration)가 된다. 이 스폰지는 밤새도록 상온에서 100 mM EDC 수용액에 노출된다. 이에 의하여 가교된 스폰지는 여러 번 물로 세척되고, 냉각, 그리고 동결 건조된다. 이 최종 제품은 25 kGy의 양으로 E-빔 조사(E-beam irradiation)되어 살균된다. 다음으로 인플란트 샘플들은 3 mm 입방으로 절단된다. 이 입방체들은 몇 방울의 염류로 수화되어 실험용 쥐(athymic rats)의 뒷다리 근육 파우치에 인플란트된다. 근육 파우치는 봉합되어 닫히고, 쥐는 4주 동안 자유로운 상태에서 유지된다. 이후 이 동물이 회생되고, 샘플은 주위의 근육조직으로부터 제거된다. 이 채외 배양은 10 % 중성의 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정된다. 샘플은 표준 파라핀 임베딩 기술(standard

paraffin embedding techniques)로 가공(process), 박편(sectione)되어 Hematoxylin and Eosin으로 착색된다. 박편들은 뼈 발생 또는 연골활동(osteogenic or chondrogenic activity)을 분석하기 위해 표준 조도하에서 20배 대물렌즈를 사용하여 관찰될 수 있을 것이다.

도 2에서, DBM입자(DBM) 내에서 연골활동(C)의 존재가 관찰될 수 있다. 새로운 뼈(N)의 작은 범위뿐만 아니라 잔류 콜라겐 스폰지(S) 역시도 관찰된다.

도 3은 제 2 스폰지 박편의 이미지이다. 도 3에서 나타내고 있는 이 이미지는 20배 확대하여 촬영한 것이다. 스폰지 2는 80 % DBM 과 20 % 콜라겐으로 구성된다. 이 스폰지는 DBM 입자와 콜라겐 슬러리로 구성된다. 혼합물(resulting mixture)은 주형에 주입되어 냉각되고, 동결 건조되어 스폰지 형태(sponge configuration)가 된다. 이 스폰지는 밤새도록 상온에서 100 mM EDC 수용액에 노출된다. 결과적으로 가교된 스폰지는 여러 번 물로 세척되고, 냉각, 그리고 동결 건조된다. 이 최종 제품은 25 kGy의 양으로 E-빔 조사되어 살균(steriliz)된다. 임플란트 샘플(Implantation samples)들은 3mm 입방으로 절단된다. 이 입방체들은 몇 방울의 염류로 수화되어 실험용 쥐(athymic rats)의 뒷다리 근육 파우치에 임플란트 된다. 근육 파우치는 봉합되어 닫히고, 쥐는 4주 동안 비제한 상태에서 유지된다. 이후 이 동물이 희생되고, 샘플은 주위의 근육조직으로부터 제거된다. 이 추출물은 10 % 중성의 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정된다. 샘플은 표준 파라핀 임베딩 기술(standard paraffin embedding techniques)로 가공(process), 박편(sectione)되어 Hematoxylin and Eosin으로 착색된다. 박편들은 뼈 발생 또는 연골활동(osteogenic or chondrogenic activity)을 분석하기 위해 표준 조도하에서 20배 대물렌즈를 사용하여 관찰될 수 있을 것이다.

도 3에서, 섬유조직(F)과 DBM 입자(DBM)의 존재가 관찰될 수 있다. 도 3에 나타낸 바와 같이 DBM(G)을 재형성하는 거대 셀의 존재가 역시 관찰될 수 있다.

도 4는 제 2 스폰지(스폰지 2)의 다른 박편의 이미지이다. 이 이미지는 역시 20배로 확대 촬영된 것이다. 도 4에서, DBM 입자(DBM)내에서 혈관의 존재가 관찰될 수 있다. 잔류 콜라겐 스폰지가 역시 도 4에서 관찰될 수 있다.

도 5는 제 2 스폰지(스폰지2) 또 다른 박편의 이미지이다. 이 이미지는 역시 20배로 확대 촬영한 것이다. 도 5에서 잔류골 수 형성(rudimentary marrow formation)이 DBM입자(DBM)들 사이에서 관찰될 수 있다.

도 6은 제 3 스폰지 박편의 이미지이다. 이 이미지는 20배 확대하여 촬영한 것이다. 이 스폰지는 60 % DBM 과 40 % 콜라겐으로 구성된다. 스폰지 3은 DBM 입자와 콜라겐 슬러리로 구성된다. 결과 혼합물(resulting mixture)은 주형에 보내져서 냉각되고, 동결 건조되어 스폰지 형태(sponge configuration)가 된다. 이 스폰지는 밤새도록 상온에서 100mM EDC 수용액에 노출된다. 결과적으로 가교된 스폰지는 여러 번 물로 세척되고, 냉각, 그리고 동결 건조된다. 이 최종 제품은 25 kGy의 양으로 E-빔 방열(E- beam irradiation)되어 살균된다. 임플란트 샘플(Implantation samples)들은 3mm 입방으로 절단된다. 이 입방체들은 몇 방울의 염류로 수화되어 실험용 쥐(athymic rats)의 뒷다리 근육 파우치에 임플란트 된다. 근육 파우치는 봉합되어 닫히고, 이 동물은 4주 동안 비제한 상태에서 유지된다. 이후 이 동물이 희생되고, 샘플은 주위의 근육조직으로부터 제거된다. 이 체외배양은 10 % 중성의 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정된다. 샘플은 표준 파라핀 임베딩 기술(standard paraffin embedding techniques)로 가공(process), 박편(sectione)되어 Hematoxylin and Eosin으로 착색된다. 박편들은 뼈 발생 또는 연골활동(osteogenic or chondrogenic activity)을 분석하기 위해 표준 조도하에서 20배 대물렌즈를 사용하여 관찰될 수 있을 것이다.

도 6에서, 뼈모세포(osteoblastlike cells) 셀에 의해 늘어선(lined) 미네랄이 제거된 뼈 기질 입자(demineralized bone matrix) (DBM)가 관찰 될 수 있다.

도 7는 제 4 스폰지 박편의 이미지이다. 이 이미지는 20배 확대하여 촬영한 것이다. 도 7에서 나타낸 바와 같이, 이 스폰지는 40 % DBM 과 60 % 콜라겐으로 구성된다. 이 스폰지는 DBM 입자와 콜라겐 슬러리로 구성된다. 결과 혼합물(resulting mixture)은 주형에 보내져서 냉각되고, 동결 건조되어 스폰지 형태(sponge configuration)가 된다. 이 스폰지는 밤새도록 상온에서 100 mM EDC 수용액에 노출된다. 결과적으로 가교된 스폰지는 여러 번 물로 세척되고, 냉각, 그리고 동결 건조된다. 이 최종 제품은 25 kGy의 양으로 E-빔 방열(E- beam irradiation)되어 살균(steriliz)된다. 임플란트 샘플(Implantation samples)들은 3mm 입방으로 절단된다. 이 입방체들은 몇 방울의 염류로 수화되어 실험용 쥐(athymic rats)의 뒷다리 근육 파우치에 임플란트 된다. 근육 파우치는 봉합되어 닫히고, 이 동물은 4주 동안 비제한 상태에서 유지된다. 이후 이 동물이 희생되고, 샘플은 주위의 근육조직으로부터 제거된다. 이 추출물은 10 % 중성의 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정된다. 샘플은 표준 파라핀 임베딩 기술(standard paraffin embedding techniques)로 가공(process), 박편(sectione)되어 Hematoxylin and Eosin으로 착색된다. 박편들은 뼈 발생 또는 연골활동(osteogenic or chondrogenic activity)을 분석하기 위해 표준 조도하에서 20배 대물렌즈를 사용하여 관찰될 수 있을 것이다.

도 7에서, 신생 뼈(new bone (N))의 작은 면적을 갖는 광물제거 골 기질이 도시된다. 부가하여, 잔류 콜라겐 스폰지(residual collagen sponge (R))가 도 7에 또한 도시된다.

도 2 내지 도 7의 이미지는 본 발명에서 설명하는 가교 콜라겐/DBM 조성물이 뼈 형성의 증진을 도모하는 골유도성 및 골전도성 조성물(osteoinductive and osteoconductive composition)을 제공하기 위하여 임플란트로서 사용될 수 있음을 도시하고 있다.

또한 본 발명의 실시예에 따르면, 조성물은 광물제거 골 기질(DBM)과 콜라겐 단백질을 포함된 상태로 제공되며, 상기 조성물은 화학적으로 글루타알데히드(glutaraldehyde), 포름알데히드(formaldehyde), 1-4부탄디올 글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether), 히드록시피리디늄roxypyridinium, 히드록시리실피리디늄(hydroxylsylpyridinium) 및 포르말린(formalin)을 포함하는 군으로부터 선택된 화합물과 가교된다.

광물제거 골기질(DBM)과 콜라겐 단백질을 포함하는 조성물은 또한 상기 조성물이 조사(예, 이-빔(e-beam) 또는 감마선 조사(gamma irradiation)), 광선(예, 자외선 또는 적합한 억제제(initiator)를 사용하는 다른 과정의 광선)을 이용하거나 광산화(photooxidation)를 통하여 가교된 상태로 제공된다. 가교를 위해 광선이 사용될 때, PL(pulsed light)이 사용될 수 있다. 콜라겐 기질은 탈수소열 조건(dehydrothermal condition)이나 산성 조건 하에 또한 가교될 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 탈수소열 조건 하에서 상기 조성물을 고온의 진공상태에 놓이게 함으로써 가교될 수 있다.

상기 조성물은 효소 공정(enzymatic process)을 이용하여 또한 가교될 수 있다. 예를 들면, 상기 콜라겐은 리실 산화제(lysyl oxidase) 또는 조직 트랜스글루타민 분해효소(tissue transglutaminase)를 이용하여 가교될 수 있다. 리실 산화제는 리신에서 입실론 아미노 그룹(epsilon amino group)의 산화탈아민화(oxidative deamination)를 통하여 콜라겐을 가교하는 작용을 하는 금속단백질(metalloprotein)이다. 상기 콜라겐 기질은 무효소 당화(glycation)(즉, 글루코오스 및 리보오스와 같은 당을 환원함으로써 콜라겐 중의 아민 그룹에 대한 무효소 가교를 말한다) 또는 당화(glycosylation)(즉, 인접 단백질 분자간의 비가역 가교를 형성하게 하는 일련의 화학반응을 초래하는 글루코오스의 콜라겐에의 무효소 결합을 말한다). 예를 들면, 가교는 웬토시딘 가교(즉, 리신 및 아르기닌 잔기(arginine residue)의 무효소 당화로부터 기인한 가교를 말한다)일 수 있다. 택일적으로, 콜라겐에서의 가교는 입실론(감마-글루타밀)리신 가교(epsilon (gamma-glutamyl) lysine crosslink)일 수 있다.

가교는 세포성 유도에 의하여 일어날 수 있다. 예를 들면, 가교는 세포성 메카니즘에 의하여 콜라겐이 가교하도록 생체 내에서 비가교 기질을 배양하는 것에서 기인할 수 있다.

상기 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 조직 형성을 증진시키고자 포유류에 주입될 수 있다. 예를 들면, 상기 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 뼈형성을 증진시키고자 포유류에 주입될 수 있다. 택일적으로, 상기 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 연조직 형성(soft tissue formation)을 증진 증진시키고자 포유류에 주입될 수 있다. 상기 가교된 콜라겐/DBM 조성물은 정형외과적 응용(orthopaedic application), 두개악안면 응용(craniomaxillofacial application), 및 외상을 위해 적용될 수 있다.

가교하는 동안 스페이서(spacer)가 콜라겐/DBM 조성물에 병합될 수 있다. 전형적인 스페이서는 폴리옥시알킬렌아민(예, Jeffamine<sup>®</sup>, 이는 Huntsman Corporation의 등록상표), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 또는 폴리머릭 스페이서(polymeric spacer)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

비닐피롤리디논(Vinylpyrrolidinone) 및 메틸 메타크릴레이트(methyl methacrylate) 또한 가교된 콜라겐/DBM 조성물에 병합될 수 있다.

콜라겐 분해효소 억제제, 성장인자, 항체, 금속단백질 분해효소, 세포 결합 단편(cell attachment fragment)(들) 또는 이들의 조합과 같은 결합성 또는 비결합성 첨가제(Bound or non-bound additive)는 가교된 콜라겐/DBM 조성물에 병합될 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 첨가제는 가교하는 동안이나 그에 앞서 조성물에 첨가될 수 있어, 상기 첨가제는 콜라겐이나 DBM에 결합된다.

상술한 상세한 설명은 기술할 목적으로 제공된 예시와 함께 본 발명의 원리를 설명하게 위한 것이긴 하나, 당업자에 의하여 다양한 변형이 이루어질 수 있으며 이는 모두 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석된다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

광물제거 골 기질(demineralized bone matrix, DBM); 및 콜라겐 단백질;을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 가교되어 있는 조성물.

### 청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 카보디이미드 가교제로 화학적으로 가교된 조성물.

### 청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 카보디이미드 가교제가 N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)인 조성물.

### 청구항 4.

제 2항에 있어서, 상기 조성물이 N-하이드록시숙신이미드(NHS)의 존재하에 화학적으로 가교된 조성물.

### 청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 하나 이상의 성장 인자를 더 포함하는 조성물.

### 청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 2 내지 95 중량%의 DBM를 포함하는 조성물.

### 청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 55 내지 85 중량%의 DBM를 포함하는 조성물.

### 청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 DBM이 상기 콜라겐 내에 분산된 DBM 입자를 포함하는 조성물.

### 청구항 9.

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 단백질이 다공성 스캐폴딩 내에 있는 조성물.

### 청구항 10.

제 9항에 있어서, 상기 DBM이 상기 다공성 스캐폴딩 내에 분산된 DBM 입자를 포함하는 조성물.

**청구항 11.**

제 8항에 있어서, 상기 DBM 입자는 평균 입도가 5 mm 이하인 조성물.

**청구항 12.**

제 8항에 있어서, 상기 DBM 입자가 평균 입도 범위가 53 내지 850 $\mu\text{m}$ 인 조성물.

**청구항 13.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 글루타르알데히드, 포름알데히드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 하이드록시피리디늄, 하이드록시라이실피리디늄, 및 포르말린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 화학적으로 가교된 조성물.

**청구항 14.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 방사선 조사에 의하여 가교된 조성물.

**청구항 15.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 광산화에 의하여 가교된 조성물.

**청구항 16.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 효소 공정에 통하여 가교된 조성물.

**청구항 17.**

제 16항에 있어서, 상기 콜라겐 단백질이 트랜스글루타미나제의 작용을 통하여 가교된 조성물.

**청구항 18.**

제 16항에 있어서, 상기 조성물이 라이실 산화효소로 가교된 조성물.

**청구항 19.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 탈수소열처리에 의하여 가교된 조성물.

**청구항 20.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 산 조건 하에서 가교된 조성물.

**청구항 21.**

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 단백질이 전자빔 조사(e-beam irradiation), 감마 조사, 또는 빛을 이용하여 가교된 조성물.

**청구항 22.**

제 21항에 있어서, 상기 콜라겐 단백질이 PL(pulsed light)를 이용하여 가교된 조성물.

**청구항 23.**

제 1항에 있어서, 간격자(spacer)를 더 포함하는 조성물.

**청구항 24.**

제 23항에 있어서, 상기 간격자가 폴리옥시알킬렌아민 간격자 또는 폴리에틸렌 글리콜 간격자인 조성물.

**청구항 25.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 비닐 피롤리디논 또는 메틸 메타크릴레이트를 더 포함하는 조성물.

**청구항 26.**

제 1항에 있어서, 콜라겐분해효소 억제제, 성장인자, 항체, 금속단백분해효소, 세포 부착 단편(들), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 더 포함하는 조성물.

**청구항 27.**

제 26항에 있어서, 상기 첨가제가 콜라겐 또는 DBM에 결합된 조성물.

**청구항 28.**

제 26항에 있어서, 상기 첨가제가 콜라겐 또는 DBM에 결합되지 않은 조성물.

**청구항 29.**

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 글리케이션 또는 당화에 의하여 가교된 조성물.

**청구항 30.**

제 1항에 있어서, 상기 가교가 펜토시딘(pentosidine) 가교인 조성물.

### 청구항 31.

제 1항에 있어서, 상기 가교가 입실론(감마-글루타밀)라이신 가교인 조성물.

### 청구항 32.

콜라겐 단백질 및 광물제거 골 기질를 포함하는 조성물의 제조방법에 있어서, 상기 제조방법은 상기 조성물을 가교하는 단계를 포함하는 제조방법.

### 청구항 33.

제 32항에 있어서, 상기 조성물이 카보디이미드 가교제로 화학적으로 가교되는 제조방법.

### 청구항 34.

제 33항에 있어서, 상기 카보디이미드가 N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)인 제조방법.

### 청구항 35.

제 33항에 있어서, 상기 조성물이 N-하이드록시숙진이미드(NHS)의 존재하에 화학적으로 가교되는 제조방법.

### 청구항 36.

제 35항에 있어서, 상기 NHS는 EDC/NHS 비율이 1:2 내지 2:5로 존재하는 제조방법.

### 청구항 37.

제 35항에 있어서, 상기 NHS는 EDC/NHS 비율이 1:2, 2:3 또는 2:5로 존재하는 제조방법.

### 청구항 38.

제 32항에 있어서, 콜라겐 슬러리 내에 광물제거 골 기질 입자를 분산시키는 단계, 상기 슬러리를 몰드의 공간으로 캐스팅하는 단계 및 상기 캐스트 슬러리를 동결 건조하여 콜라겐 단백질 및 광물제거 골 기질을 포함하는 다공성 스캐폴딩을 형성하는 단계를 더 포함하는 제조방법.

### 청구항 39.

제 38항에 있어서, 상기 슬러리가 수용성 슬러리인 제조방법.

### 청구항 40.

제 38항에 있어서, 상기 가교가 카르보디이미드 가교제를 상기 다공성 스캐폴딩의 기공 내에 침투시키는 단계; 및 상기 카르보디이미드 가교제를 상기 콜라겐 단백질 및/또는 DBM와 반응하여 가교를 형성하도록 하는 단계;를 포함하는 제조방법.

#### 청구항 41.

제 32항에 있어서, 상기 가교는 세포 메카니즘에 의하여 콜라겐 가교를 하도록 생체내 비가교된 기질을 배양함으로써 생기는 제조방법.

#### 청구항 42.

광물제거 골 기질(DBM) 및 콜라겐 단백질을 포함하는 조성물로서 가교되어 있는 조성물을 포유동물 내에 임플란트하는 단계를 포함하는 치료방법

#### 청구항 43.

제 42항에 있어서, 상기 조성물이 카보디이미드 가교제로 화학적으로 가교된 치료방법.

#### 청구항 44.

제 42항에 있어서, 상기 조성물이 상기 표유동물의 척추 내에 임플란트 되는 치료방법.

#### 청구항 45.

제 42항에 있어서, 상기 조성물이 상기 표유동물의 추간 공간 내에 임플란트 되는 치료방법.

#### 청구항 46.

제 42항에 있어서, 상기 조성물이 외상 부위 내에 임플란트 되는 치료방법.

#### 청구항 47.

제 42항에 있어서, 상기 조성물이 개두악안면강(cradiomaxillofacial cavity) 내에 임플란트 되는 치료방법.

#### 청구항 48.

제 42항에 있어서, 상기 표유동물이 사람인 치료방법.

#### 청구항 49.

광물제거 골 기질(DBM); 및 콜라겐 단백질;을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 아미드 결합을 통하여 가교되는 조성물.

**청구항 50.**

제 49항에 있어서, 1 이상의 성장인자를 더 포함하는 조성물.

**청구항 51.**

제 49항에 있어서, 상기 조성물이 2 내지 95 중량%의 DBM을 포함하는 조성물.

**청구항 52.**

제 49항에 있어서, 상기 조성물이 55 내지 85 중량%의 DBM을 포함하는 조성물.

**청구항 53.**

제 49항에 있어서, 상기 조성물이 상기 콜라겐 단백질 내에 분산된 DBM 입자를 포함하는 조성물.

**청구항 54.**

제 49항에 있어서, 상기 콜라겐 단백질이 다공성 스캐폴딩 내에 있는 조성물.

**청구항 55.**

제 54항에 있어서, 상기 조성물이 상기 다공성 스캐폴딩 내에 분산된 DBM 입자를 포함하는 조성물.

**청구항 56.**

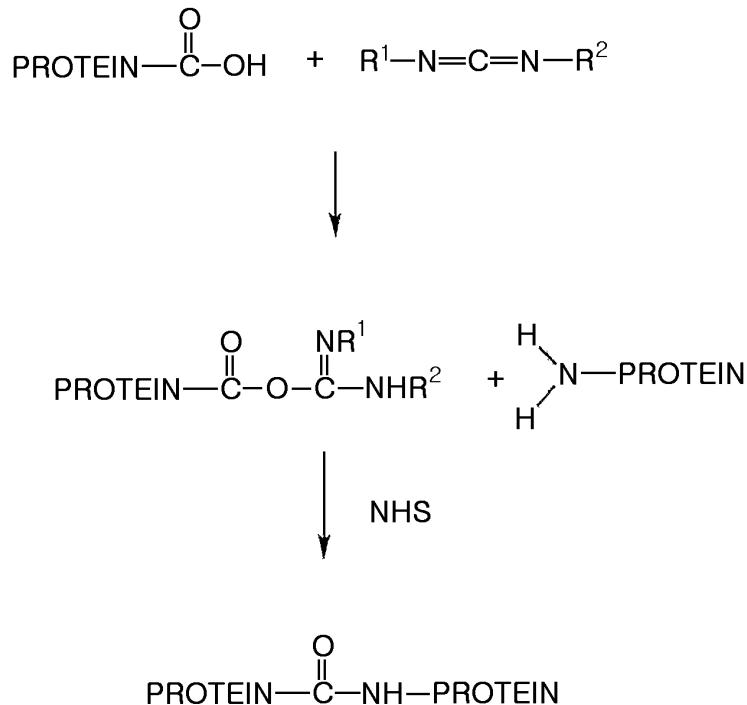
제 55항에 있어서, 상기 DBM 입자는 입도가 5 mm 이하인 조성물.

**청구항 57.**

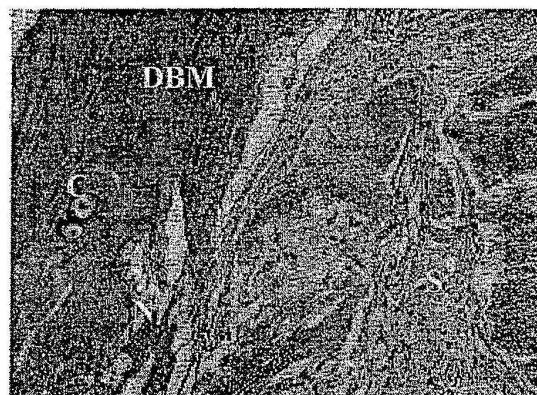
제 55항에 있어서, 상기 DBM 입자는 입도가 53 내지 850  $\mu\text{m}$ 인 조성물.

**도면**

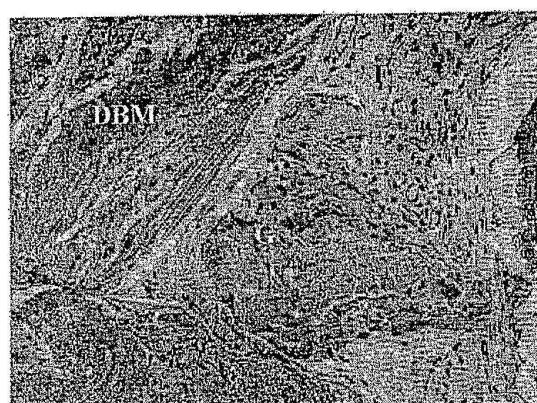
도면1



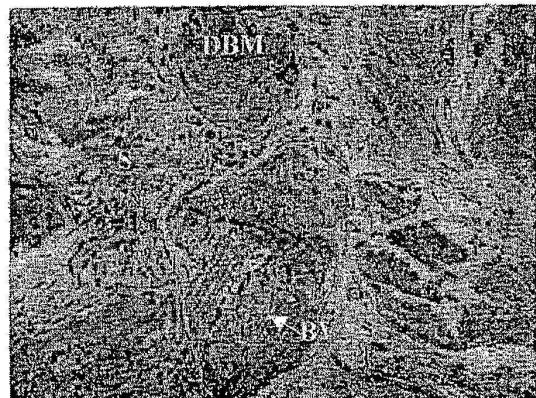
도면2



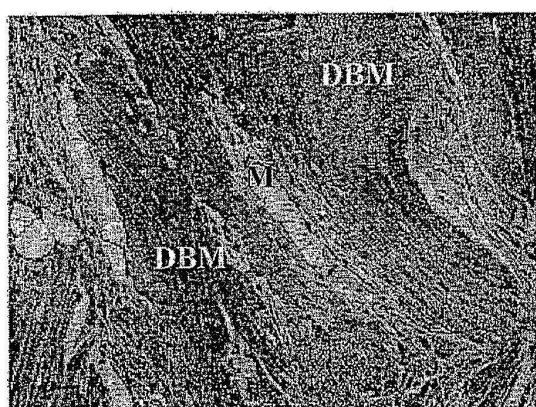
도면3



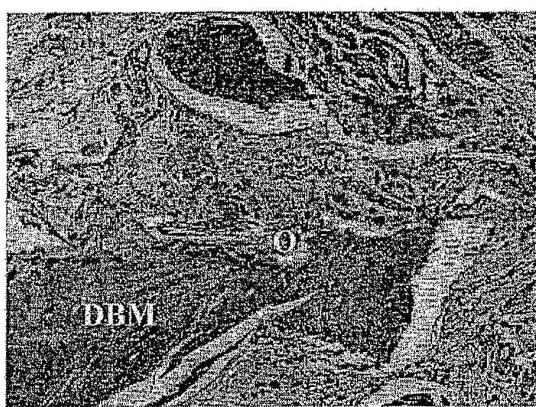
도면4



도면5



도면6



도면7

