(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0134573
(43) 공개일자 2019년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/70 (2006.01) *A61K 31/728* (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 38/36* (2006.01)
A61K 38/39 (2019.01) *A61K 38/48* (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/7023 (2013.01)
A61K 31/728 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0154350(분할)
(22) 출원일자 2019년11월27일
심사청구일자 2019년11월27일
(62) 원출원 특허 10-2018-0029857
원출원일자 2018년03월14일
심사청구일자 2018년03월14일
(30) 우선권주장
1020170032019 2017년03월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김정범
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
남동규
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

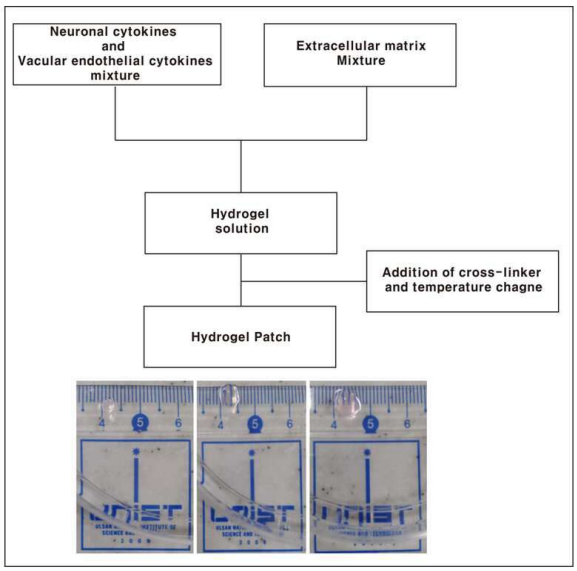
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **라미닌 및 히알루론산을 포함하는 약학적 조성물**

(57) 요 약

하이드로젤 패치, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 척수 손상 치료용 조성물에 관한 것으로서, 일 양상에 따른 하이드로젤 패치에 의하면 척수손상 환자를 척수 비침습적 방법으로 치료할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/1866 (2013.01)
A61K 38/363 (2013.01)
A61K 38/39 (2013.01)
A61K 38/4833 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 2300/232 (2013.01)
A61L 2430/32 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

라미닌; 및 히알루론산 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 척수손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포 성장인자를 더 포함하는 것인, 약학적 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포 성장인자는 신경세포 성장인자, 혈관내피세포 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 골형성 단백질(bone morphogenetic protein), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor), 간세포 성장인자, 형질전환 성장인자 또는 그들의 조합인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 신경세포 성장인자는 BDNF (Brain-derived neurotropic factor), GDNF (Glial cell derived neurotropic factor), CNTF (Ciliary neurotropic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), cAMP (cyclic adenocyne monophosphate), NT(Neurotropin), NT3 (Neurotropin-3), NT4(Neurotropin-4), T3 (Triiodo-L-Thyronine), SHH (Sonic hedgehog), 및 PDGF (Platelet-derived growth factor)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 파우더 제형인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 라미닌을 1 내지 100 ㎍/ml의 농도, 또는 히알루론산 10 ㎍/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 척수 손상은 만성 척수 손상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 세포를 포함하지 않는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 하이드로젤 패치, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 척수 손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 중추신경계 (척수)에 손상을 입었을 경우 운동기능장애 및 비뇨기장애의 의료적 장애뿐만 아니라 심리적 장애를 수반한다. 현재 척수손상치료법으로 신경손상을 완화시키기 위하여 외과적 치료, 메틸프레드니솔론(methylprednisolone)과 같은 스테로이드(steroid) 계열의 약물치료, 또는 재활치료가 행해지고 있다. 하지만, 이는 신경손상에 의한 장애를 완화시키는 치료법일 뿐이고, 손상된 척수신경 재생을 위한 근본적인 척수 신경재생 치료법은 현재까지 전무한 상태이다.

[0003] 손상된 척수신경 재생 유도를 위하여 신경손상부위에 생물학적 신경재생 유도 환경을 조성하는 방법, 또는 신경

줄기세포, 희소돌기아교 전구세포, 중간엽 줄기세포, 슈반씨 세포 또는 후각신경 외피세포 등을 투여하는 세포치료법이 개발되고 있다. 상기 세포치료법에 사용하는 세포치료제 개발을 위해서 성체줄기세포(adult stem cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell), 또는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)가 주로 사용되고 있다.

[0004] 하지만 성체줄기세포의 경우 희소성, 제한된 분화능 그리고 타가세포사용으로 인한 면역거부반응의 문제가 존재한다. 또한, 배아줄기세포의 경우 윤리적 문제 및 타가세포사용으로 인한 면역거부반응의 문제가 존재하며, 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포는 공통적으로 발암가능성의 문제가 존재한다.

[0005] 척수손상의 경우 척수 손상의 급성 기간인 손상 후 48시간이 척수손상치료의 적정기로 알려져 있다. 세포치료제의 경우 면역거부반응을 회피하기 위하여 자가 신경줄기세포, 희소돌기아교전구세포 등의 신경재생 세포가 필요하지만 급성 척수척수손상환자로부터 상기 세포들을 채취하여 급성 기간 내에 세포치료제로 사용할 세포수의 확보는 불가능한 현실이다. 또한 환자 체세포로부터 제작되는 유도만능줄기세포 또는 직접교차분화세포는 자가재생능으로 세포치료제 제작에 필요한 세포수를 충족할 수 있지만, 이를 제작하는 시간 및 목적세포로 분화하는 기간이 급성기 치료에 맞지 않으므로 척수손상치료의 적정기인 급성 기간에 치료가 불가능하다.

[0006] 따라서, 손상된 척수신경을 적정시기에 척수 비침습적 방법으로 척수의 손상을 최소화하며 손상된 척수신경을 재생을 유도하는 근본적인 척수신경 재생 기술 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은, 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드 또는 단백질; 및/또는 히알루론산 또는 그의 염을 포함하는 하이드로젤 패치를 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 피브리노겐, 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드; 및/또는 히알루론산 또는 그의 염을 포함하는 졸(Sol) 상태의 조성물에 대하여 트롬빈을 첨가하여 하이드로젤 패치를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드 또는 단백질; 및/또는 히알루론산 또는 그의 염을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드 또는 단백질; 및 히알루론산 또는 그의 염을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 상기 하이드로젤 패치를 용액상에서 4 내지 -210℃에서 저온보존 또는 동결보존하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 하이드로젤 패치를 제공한다.

[0013] 또 다른 양상은 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또 다른 양상은 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질병,예를 들면, 척수손상을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 양상은 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물을 질병의 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[0016] 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드 또는 단백질; 및/또는 히알루론산 또는 그의 염을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 라미닌 또는 라미닌 유래 펩티드 또는 단백질; 및 히알루론산 또는 그의 염을 포함할 수 있다.

[0017] 용어 "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함하며, "약제학적 유효량"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 충분한 본원에서 제공되는 발명을 실시하는 과정에서 이용되는 조성물의 임의의 양을 의미할 수 있다.

[0018] 용어, "투여하는," "도포하는", "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구체예에 따른 패치 또는 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체내로의 일 구체예

에 따른 패치 또는 조성물의 배치를 의미할 수 있다.

[0019] 본 명세서에서, 용어 "패치(patch)"는 일정 형상을 갖고, 목적 부위에 도포, 부착, 또는 접촉될 수 있는 수단을 의미할 수 있다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 하이드로젤 패치 또는 조성물은 고체와 액체의 중간 성질을 갖는 것일 수 있다. 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은, 무정형, 구형, 반구형, 원반형, 또는 원기둥형일 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 하이드로젤 패치의 직경은 0.05 ㎜ 내지 10 ㎝, 0.1 ㎜ 내지 5 ㎝, 0.1 ㎜ 내지 3 ㎝, 또는 0.2 ㎜ 내지 1.5 ㎝ 일 수 있고, 그러한 크기 또는 형태로 제공될 수 있다. 또한, 상기 하이드로젤 패치는 목적 부위(예를 들면, 조직 손상 부위)에 도포, 이식, 부착, 또는 접촉되어 손상 부위의 형태에 맞추어 형태가 변형되는 것일 수 있다.

[0021] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 고체(파우더 포함), 반고체, 또는 액체일 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 고체(파우더 포함), 반고체, 또는 액체 상태로 가역적인 상전이(예를 들면, 온도 변화에 따라)가 일어날 수 있다. 상기 하이드로젤 패치는 온도 조건 등 주변 상황에 따라 가역적인 상전이가 일어날 수 있으므로, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 고체(파우더 포함), 또는 액체 상태로 생산, 제공된 후, 목적 부위에 투여 전, 투여 시, 또는 투여 후에 하이드로젤 패치로 전환되어 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 하이드로젤 패치는 피브리노겐, 라미닌, 및 히알루론산을 포함하는 졸(sol) 상태로 제공되어, 사용자가 피브리노겐을 피브린으로 전환시킨 수 있는 물질(예를 들면, 트롬빈)을 사용함으로써, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치를 제작하여 사용할 수 있다. 따라서, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌; 및/또는 히알루론산을 포함하는 조성물, 예를 들면, 고체(파우더), 액체(졸), 또는 반고체 조성물의 전구 약물의 형태로 제공될 수 있다. 전구 약물의 형태로 제공된 조성물은 생체 내에서 하이드로젤 패치로 제조, 또는 변형되어 작용할 수 있다. 또한, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 트롬빈을 더 포함하거나, 트롬빈이 키트로서 함께 제공될 수 있다.

[0022] 또 다른 구체예에 있어서, 하이드로젤 패치 또는 조성물은 다공성일 수 있다. 상세하게는 하이드로젤 패치의 표면에 다공성(미세공)을 갖는 것일 수 있다. 특정 이론에 제한됨이 없이, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 다공성을 가짐으로 인해, 활성 물질간의 상호작용을 증진시킬 수 있다.

[0023] 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 환자의 척수 손상 부위에 척수 비침습적 방법으로 사용 가능할 수 있다. 본 명세서에서 비침습적인 방법은, 주사바늘을 이용한 척수에 침습적 방법의 세포 치료제 또는 약물 투여법과 구분된 것으로, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 목적 부위에 다른 전달 수단(예를 들면, 시린지) 없이 이식, 도포, 부착 또는 접촉 될 수 있다. 상기 척수 비침습적인 방법으로 사용 가능하다는 것은 주사바늘과 같이 척수에 침습적으로 치료용 조성물을 주입하여 주사 바늘로 인한 주입 부위의 척수 손상을 일으키는 방법과 달리, 척수 비침습적인 방법은 척수의 손상 없이 손상부위에 도포 또는 이식을 통하여 주사바늘를 통한 조성물의 주입방법으로 인하여 발생하는 척수손상 없이 조성물을 손상 부위에 전달하는 방법을 의미 할 수 있다. 또한, 상기 하이드로젤 배치 또는 조성물은 상기의 침습적 방법에 인해 발생하는 척수의 이차 손상을 방지하는 역할을 할 수 있다. 또한, 상기 하이드로젤 패치는 일정시간이 경과한 후에 생체내에서 생분해될 수 있다.

[0024] 일 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 피브린 및/또는 피브리노겐을 포함할 수 있다. 생체 내에서 작용하는 최종 약리학적 물질에는 피브린을 포함하나, 전구 약물의 형태로서 피브리노겐을 피브린 대신 사용할 수 있다. 또한, 피브린을 피브리노겐으로 전환시키는 물질의 양에 따라, 일 구체예에 따른 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물에는 피브리노겐 또는 트롬빈이 일부 포함될 수 있다. 따라서, 본 명세서는 피브리노겐; 라미닌; 및/또는 히알루론산 을 포함하는 전구 약물을 추가적으로 제공할 수 있다. 상기 피브린 또는 피브리노겐은 0.5 내지 20 ㎎/㎖, 0.8 내지 16 ㎎/㎖, 0.8 내지 12 ㎎/㎖, 1.0 내지 10 ㎎/㎖, 2 내지 8 ㎎/㎖, 또는 4 내지 8 ㎎/㎖의 농도로 포함될 수 있다.

[0025] 상기 피브리노겐 (Fibrinogen) 당단백질은 간의 간세포에서 만들어지는 용해성의 α, β, 및 γ 서브유닛으로 이루어진 헥사머 (hexamer)이다. 피브리노겐은 트롬빈 (Thrombin) 효소와 반응하여 용해성에서 불용해성의 피브린 (fibrin) 폴리머 (polymer) 섬유질 (fiber)로 상전이하게 된다.

[0026] 상기 트롬빈 (Thrombin) 효소는 세린 단백질 가수분해효소 (Serine protease)이며 용해성 피브리노겐을 불용해성 피브린으로 형질변화 시켜주는 효소이다. 상기 트롬빈은 피브리노겐을 피브린으로 변화시켜서, 졸 상태의 하이드로젤을 젤화시키는 역할을 할 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "라미닌(laminin)"은 기저판 (Basal lamina)을 구성하는 세포외기질 단백질로 α, β, 및

γ서브유닛으로 이루어진 헤테로트라이메릭 (Heterotrimeric) 단백질을 의미할 수 있다. 따라서, 상기 라미닌은 라미닌 전장 단백질 뿐만 아니라 라미닌 유래 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 라미닌은 라미닌-1, 라미닌-2, 라미닌-3, 라미닌-4, 라미닌-5A, 라미닌-5B, 라미닌-6, 라미닌-7, 라미닌-8, 라미닌-9, 라미닌-10, 라미닌-11, 라미닌-12, 라미닌-14, 또는 라미닌-15일 수 있다. 또한, 상기 라미닌 유래 펩타이드는 α 사슬, γ 사슬, 또는 β 사슬일 수 있다. 상기 라미닌은 1 내지 100 ㎍/ml, 2 내지 80 ㎍/ml, 5 내지 50 ㎍/ml, 5 내지 25 ㎍/ml, 8 내지 20 ㎍/ml, 또는 8 내지 15 ㎍/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0028] 상기 히알루론산 (Hyaluronic acid) 글라이코스아미노글리(glycosaminoglycan)은 D-glucuronic acid와 N-acetyl-D-glucosamine가 β-(1→4)와 β-(1→3)의 변화를 가지는 배당결합 (glycosidic bonds)으로 이루어지는 이당결합의 다당류이며 이당결합의 길이에 따라 다양한 분자량을 가지고 있다. 일 구체예에 있어서, 히알루론산의 분자량은 5,000 내지 20,000,000 Da 일 수 있다. 더욱 상세하게는, 히알루론산의 분자량은, 0.5 내지 4.0 x 10^6 Da, 1.0 내지 2.0 x 10^6 Da, 또는 1.5 내지 1.8 x 10^6 Da 일 수 있다. 상기 히알루론산은 10 ㎍/ml 내지 5 mg/ml, 50 ㎍/ml 내지 5 mg/ml, 100 ㎍/ml 내지 3 mg/ml, 100 ㎍/ml 내지 1 mg/ml, 200 ㎍/ml 내지 1 mg/ml, 또는 300 ㎍/ml 내지 800 ㎍/ml의 농도로 포함될 수 있다. 또한, 상기 히알루론산은 염, 약학적으로 허용가능한 염, 예를 들면, 소듐염, 칼륨염, 칼슘염, 또는 마그네슘염 등의 형태로 제공될 수 있다.

[0029] 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 세포 성장인자를 더 포함할 수 있다. 상기 세포 성장인자는 신경세포 성장인자, 혈관내피세포 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor), 간세포 성장인자, 형질전환 성장인자 또는 그들의 조합일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 성장인자는 태반 성장 인자, 대식세포 콜로니 자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 뉴로필린, 섬유아세포 성장인자(FGF)-1, FGF-2 (bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, 에리쓰로포이에틴, BMP-2, BMP-4, BMP-7, TGF-베타, IGF-1, 오스테오폰틴, 플레이오트로핀, 액티빈, 엔도쎌린-1 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 상기 신경세포 성장인자는 BDNF (Brain-derived neurotropic factor), GDNF (Glial cell derived neurotropic factor), CNTF (Ciliary neurotropic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), cAMP (cyclic adenocyne monophosphate), NT(Neurotropin), NT3 (Neurotropin-3), NT4(Neurotropin-4), T3 (Triiodo-L-Thyronine), SHH (Sonic hedgehog), 및 PDGF (Platelet-derived growth factor)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 혈관내피세포 성장인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, 또는 VEGF-E를 포함할 수 있다. 상기 세포 성장인자는 성장인자의 종류에 따라 하이드로젤 패치 또는 조성물에 포함되는 농도가 상이할 수 있으나, 일반적으로 1 ng/ml 내지 1,000 ng/ml 또는 0.1 μM 내지 100 μM 의 농도로 포함될 수 있다. 상기 세포 성장인자는 피브린, 라미닌, 및 히알루론산을 포함하는 하이드로젤 패치, 또는 조성물의 조직 손상 회복 효과를 상승시키는 역할을 할 수 있다.

[0030] 상기 Brain derived neurotrophic factor (BDNF) 단백질은 BDNF 유전자에 의하여 코딩된다. BDNF 단백질은 중추신경계 신경세포의 생존 및 새로운 신경세포의 분화 및 성장에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0031] 상기 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 단백질은 GDNF 유전자에 의하여 코딩된다. GDNF 단백질은 중추신경계의 신경세포 중 도파민 작동성 신경세포 (Dopaminergic neuron)와 운동신경세포 (Motor neuron)의 생존과 분화에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0032] 상기 Ciliary neurotrophic factor (CNTF) 단백질은 CNTF 유전자에 의하여 코딩된다. CNTF 단백질은 신경전달물질의 생성을 촉진하며, 신경세포와 희소돌기아교세포의 생존에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0033] 상기 Neurotrophin-3 (NT-3) 단백질은 NT-3유전자에 의하여 코딩된다. NT-3단백질은 중추신경계 신경세포의 생존 및 새로운 신경세포의 분화 및 성장에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0034] 상기 Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 단백질은 아데닐산고리화 효소(adenylate cyclase)의 작용으로 adenosine triphosphate (ATP)에서 유래되는 단백질로, 세포의 2차전달자 (second messenger)역할을 한다. 신경세포에서는 신경전달물질의 생산, 저장, 배포 등 신경전달물질의 전반전인 통제에 연관되어 있음이 알려져 있고, 신경세포의 생존과 분화에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며, 혈관내피세포의 장벽역활, 증식, 산화질소(nitric oxide)생성에 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0035] 상기 Sonic Hedgehog (SHH) 단백질은 SHH유전자에 의하여 코딩된다. SHH는 hedgehog 신호전달경로에 역할을 하며, 신경계에서는 특히 운동신경세포의 분화에 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0036] 상기 triiodothyronine (T3) 호르몬 (Hormone)은 갑상선 호르몬의 일종이며 생체내 대부분의 생리학적 역할에

영향을 준다. 신경계에서는 특히 희소돌기아교전구세포의 증식을 저지하여 희소돌기아교세포로의 분화를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0037] 상기 Platelet-derived growth factor (PDGF)의 subtype으로는 -AA,-BB,-AB,-CC,-DD가 있으며 Platelet derived growth factor subunit A (PDGFA) 유전자로부터 코딩되는 PDGFA subunit의 homodimer의 경우 PDGF-AA이며 각 subtype마다 binding하는 PDGF의 receptor (PDGFR)가 다르다. Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA)는 2합체의 당단백질로 특히 신경계에서는 희소돌기아교전구세포의 PDGF 수용기 (receptor)를 활성화시키는 Fibroblast growth factor (FGF)와 함께 희소돌기아교전구세포의 증식을 유지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0038] 상기 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 단백질은 혈관투과성장인자 (Vascular permeability factor, VPF)의 일종으로 신생혈관생성 (Angiogenesis) 및 혈관화(Vascularization)에 역할을 한다. 특히 VEGF는 배발달 (Embryonic development), 상처 등의 요소로 새로운 혈관생성에 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 독성 및 스트레스로 인한 신경세포의 사멸을 방지하여 신경세포 생존의 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0039] 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 콜라겐을 포함하거나 실질적으로 포함하지 않을 수 있다. 특정 이론에 제한됨이 없이, 상기 콜라겐은 조성물의 구성 성분으로 포함되거나 실질적으로 포함되지 않을 수 있으나, 포함되지 않는 것이 포함되는 것보다 일 측면에 따라서는 더 유리한 경우가 있을 수 있다.

[0040] 또한, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 세포를 실질적으로 포함하지 않을 수 있다. 본 명세서에서 "실질적으로 포함하지 않다(substantially does not comprise)"는 콜라겐 또는 세포가 하이드로젤 패치 또는 조성물의 활성, 또는 약리적 활성에 영향을 미치지 않을 정도로 포함되거나 전혀 포함되지 않는 것을 의미한다. 일 구체예에 따른 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 세포를 실질적으로 포함하지 않음으로써, 일반적으로 손상된 조직의 재생에 사용되는 세포치료제와는 구분된 것일 수 있다.

[0041] 상기 콜라겐 (Collagen) 단백질은 대표적으로 Type I, II, III, IV, V으로 구분되며 Type I 콜라겐이 신체에 가장 많이 존재한다. 콜라겐은 α1과 α2의 삼중나선 (Triple helix)구조를 이루고 있다.

[0042] 일 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌; 및 히알루론산 또는 그의 염으로 구성된 것일 수 있다. 또한 이외에도, 본 명세서에서 언급된 성분 중 1 종 이상이 추가적으로 포함되어 구성될 수 있다. 예를 들면, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 피브린 및/또는 피브리노겐; 라미닌; 히알루론산 또는 그의 염; 선택적으로 트롬빈; 선택적으로 콜라겐; 및 선택적으로 세포 성장인자로 구성된 것일 수 있다.

[0043] 일 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 세포 접착을 향상시키는 것일 수 있다. 따라서, 본 명세서는 추가적으로 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 세포(예를 들면, 신경세포)의 접착을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0044] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 신경줄기세포의 신경세포로의 분화를 증가시키는 것일 수 있다. 따라서, 본 명세서는 추가적으로 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 신경줄기세포의 신경세포로의 분화를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0045] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 염증반응을 줄여 신경손상을 억제하거나, 운동신경세포와 희소돌기아교세포의 재생을 도와 수초가 형성된 운동신경세포의 재생을 향상시키는 것일 수 있다.

[0046] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 척수손상 등과 같은 외상으로 인하여 손상된 신경 및 뇌졸증 등과 같은 신경퇴화로 인하여 손상된 신경 재생을 유도하는 기능을 할 수 있다. 따라서, 본 명세서는 추가적으로 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 신경세포의 손상을 억제하거나, 신경 재생을 유도하거나, 운동신경세포를 재생시키는 방법을 제공한다.

[0047] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 척수손상 치료로 인하여 야기되는 척수 2차 손상을 억제하는 것일 수 있다.

[0048] 따라서, 일 구체예에 따른 상기 하이드로젤 패치 또는 조성물은 손상된 조직의 재생 또는 수복용인 것일 수 있다. 상세하게는 상기 손상된 조직은 척수일 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 척수손상 (Spinal cord injury; SCI)은 척수의 압박, 탈구에 의한 손상을 의미할 수 있다. 척수손상은 외상성 척수 손상, 척추 퇴행성 질환(척추증 등), 척추 염증성 질환(척추염, 만성 류마티스 관절염 등

), 종양(척수 종양, 척추 종양 등), 혈관성 질환(척수 출혈, 뇌졸중, 골수 외 혈관 장애에 의한 척수 마비 등), 척수염(거미 막염, 바이러스성 척수염, 세균성 척수염 등), 다발성 경화증, 근위축성 측색경화증 등을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치 또는 조성물은 급성 척수손상 뿐만 아니라, 만성 척수손상에도 치료 효과를 갖는 것일 수 있다. 따라서, 상기 척수손상은 만성 척수손상일 수 있다.

[0050] 일 구체예 따른 상기 조성물의 투여 용량은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는 경구, 설하, 비경구 (예를 들어, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 경막내, 또는 정맥내), 직장, 국소 (경피 포함), 흡입, 및 주사, 또는 이식성 장치 또는 물질의 삽입을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.

[0051] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자(biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다.

[0052] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[0053] 또 다른 양상은 피브리노겐; 라미닌 또는 라미닌 유래 펩타이드; 및 히알루론산 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 졸 (Sol) 상태의 조성물에 대하여 트롬빈을 첨가하여 하이드로젤 패치를 제조하는 방법을 제공한다.

[0054] 상기 방법은 또한, 상기 졸 상태의 조성물에 세포 성장인자를 배합하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 상기 방법은 또한, 트롬빈을 첨가하여 젤화시킨 후, 다시 트롬빈을 첨가하여 2차 젤화시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 젤화는 10 내지 40 ℃에서 5분 내지 3시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 상기 트롬빈은 약 1 내지 10 U/ml의 농도로 첨가되는 것일 수 있다. 상기 하이드로젤 패치는 틀의 모양에 따라서 다양한 형태 또는 크기로 제작할 수 있다.

[0056] 상기 방법은 또한, 하이드로젤 패치를 용액 내에서 4 내지 -210℃로 저온보존 또는 동결 보존하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 용액은 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 포함할 수 있으나, 하이드로젤 패치의 화학적 또는 물리적 성질을 실질적으로 변화시키지 않는 것이라면 어떠한 것이든 사용될 수 있다. 상기 하이드로젤 패치는 저온보존 또는 동결 보존되어도 그 형태 또는 활성이 실질적으로 변하지 않는다.

[0057] 상기 하이드로젤 패치, 피브린 및/또는 피브리노겐, 라미닌, 히알루론산 또는 세포 성장인자에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0058] 또 다른 양상은 상기 하이드로젤 패치를 용액(예를 들면, DMSO)에서 4 내지 -210℃에서 저온보전 또는 동결보존하는 방법을 제공한다.

[0059] 상기 방법으로 저온보존 또는 동결보존 한 하이드로젤 패치는 척수손상치료의 적정기인 급성단계의 척수손상환

자 치료를 위하여 환자 발생시 바로 사용 가능할 수 있으며, 저온보존 또는 동결보존 상태에서 상온으로 옮겨져 녹더라도 형태학적 변화가 없고 척수손상 치료 효과의 큰 차이가 없을 수 있다.

발명의 효과

[0060] 하이드로젤 패치 및 상기 하이드로젤 패치를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 일 양상에 따른 하이드로젤 패치에 의하면, 손상된 조직을 회복시켜 척수손상을 포함한 다양한 질환에 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치 제작 방법과 0.3 ㎜ 내지 0.8 ㎜의 다양한 크기의 하이드로젤 패치를 나타낸 도면이다.

도 2는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치 제형(액체, 젤, 파우더)(위쪽 패널, 왼쪽부터 오른쪽)과, 파우더 제형의 젤화(아래쪽 패널)를 나타낸 도면이다.

도 3은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 단면, 겉면을 주사 전자scanning 현미경(SEM)으로 관찰한 동결 보존 전, 및 후를 나타낸 이미지이다.

도 4는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 조성물(피브린, 히알루론산, 및 라미닌)과 이를 처리하지 않은 그룹 (bare)의 시험관 내 (in vitro) 마우스 신경줄기세포 분화에 대한 영향을 광학현미경 및 면역 형광 염색법을 사용하여 확인한 도면이다; 스케일 바는 각각 100 ㎛ 및 50 ㎛를 나타낸다.

도 5는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 각 구성 성분 단독과, 두 개 성분의 조합에 따른 시험관 내 (in vitro) 마우스 신경줄기세포 분화에 대한 영향을 면역형광 염색법을 사용하여 신경세포 (Tuj1), 성상교세포 (GFAP) 분화 분포도로 나타낸 이미지이다; 스케일 바는 50 ㎛를 나타낸다.

도 6은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치, 그의 각 구성 성분 단독과, 두 개 성분의 조합에 따른 시험관 내 (in vitro) 마우스 신경줄기세포 분화에 대한 영향을 신경세포 (Tuj1) 분화 분포도로 정량화하여 나타낸 그래프이다; * p< 0.05, ** p< 0.005, *** p< 0.0005.

도 7은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치, 그의 각 구성 성분 단독과, 두 개 성분의 조합에 성장 인자를 추가하여, 이들의 시험관 내 (in vitro) 마우스 신경줄기세포 분화에 대한 영향을 신경세포 (Tuj1) 분화 분포도로 정량화하여 나타낸 그래프이다; * p< 0.05, ** p< 0.005, *** p< 0.0005.

도 8은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치에 각 성장인자 (FGF, BDNF, GDNF, cAMP, NT3, PDGF-AA, SHH, T3, 또는 VEGF)를 추가하여, 이들의 시험관 내 (in vitro) 마우스 신경줄기세포 분화에 대한 영향을 신경세포 (Tuj1) 분화 분포도로 정량화하여 나타낸 그래프이다; * p< 0.05, ** p< 0.005, *** p< 0.0005.

도 9는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치를 생체 내에 이식한 경우 생분해됨을 나타낸 이미지이다.

도 10은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치를 손상된 척수에 이식하는 과정을 나타낸 이미지이다.

도 11은 척수손상동물 모델의 척수손상 1주일 후, 척수손상으로 손실된 척수손상동물 모델의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다.

도 12는 하이드로젤 패치의 이식 없이 PBS만을 이식부위에 도포한 척수손상 동물모델의 척수손상 8주차의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다.

도 13은 하이드로젤 패치 2 (Hydrogel patch 2 without GF)를 이식한 척수손상동물 모델의 척수손상 8주 차의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다.

도 14는 하이드로젤 패치 5 (Hydrogel patch 2 with GF)를 이식한 척수손상 동물 모델의 척수손상 8주차의 뒷다리 움직임을 관측한 도면이다.

도 15는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치(패치 3 with PBS, 패치 3 및 패치6) 이식에 따른 BBB score 값을 나타낸 그래프이다.

도 16은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치(패치 1, 패치 2, 및 패치 3) 이식에 따른 BBB score 값을 나타낸 그래프이다.

도 17은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치(패치 4, 패치 5, 및 패치 6) 이식에 따른 BBB score 값을 나타낸 그

래프이다.

도 18은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치(패치 2, 및 패치 5) 이식에 따른 BBB score 값을 나타낸 그래프이다.

도 19는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 이식에 따른 조직학적 분석 결과를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 참고예 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0064] **<실시예> 하이드로젤 배합 및 패치 제작**

[0065] **1-1. 하이드로젤 배합**

[0066] DMEM/F12(1:1) (Gibco, 11330-057) 배양액에 피브리노겐 (Sigma, F8630)이 20 mg/ml가 되도록 37℃에서 30분간 용해하고, DMEM/F12(1:1) (Gibco, 11330-057) 배양액에 히알루론산 (Sigma, 53747)이 5 mg/ml가 되도록 4℃에서 하루 동안 용해하고, DMEM/F12(1:1) (Gibco, 11330-057) 배양액에 트롬빈 (Sigma, T4648)이 200 U/ml가 되도록 용해하였다. 콜라겐 (Corning, 354236)은 10X Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Sigma, D5652-10L), 3차수, 및 1N NaOH (Millipore, 1.00983.1011)에서 중성화 및 이온화시켜서, 최종농도가 3.00 mg/mL가 되도록 희석하였다.

[0067] 이후에, 상기 성분을 배합하여 졸 상태의 하이드로젤을 제작하였다. 각 성분의 최종 농도는 다음과 같다:

[0068] 피브리노겐 (Sigma, F8630) 1 mg/ml, 5 mg/mL 또는 10 mg/ml;

[0069] 라미닌 (Thermofisher, 23017-015) 5 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 또는 50 ㎍/ml;

[0070] 히알루론산 (Sigma, 53747) 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 또는 1 mg/ml; 및

[0071] 콜라겐 (Corning, 354236) 1.2 mg/ml.

[0073] **1-2. 하이드로젤 배합에 신경세포 성장인자의 첨가**

[0074] 실시예 1-1에서 배합한 졸 상태의 하이드로젤에 대하여Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, 15140-122), 2 mM L-Glutamine (invitrogen, 25030-081), N2 supplement (Gibco, 1750-048), 및 B27 supplement minus vitamin A (Gibco, 12587010)를 포함하는 DMEM/F12 (Gibco 11330-057)과 Neurobasal medium (Gibco, 21103049)를 1:1로 배합한 배양액에 하기 신경세포 성장인자 및/또는 혈관내피세포 성장인자를 첨가한 것을 배합하였다:

[0075] recombinant Human BDNF (Peprotech, 450-02) 10 ng/ml, recombinant Human GDNF (Peprotech, 450-10) 10 ng/ml, recombinant Human NT-3 (Peprotech, 450-03), 5 ng/ml, db-cAMP (Sigma, D0260) 1 uM, T3 (Sigma, T6397) 60 ng/ml, recombinant Human sonic hedgehog (SHH; Peprotech, 100-45) 50 ng/ml, recombinant Human PDGF-AA (Peprotech, 100-13A-100), recombinant Human FGF-basic (Peprotech, 100-18B) 10 ng/ml 및 recombinant Human VEGF165 (Peprotech, 100-20) 20 ng/ml.

[0077] **1-3. 하이드로젤 패치의 제작**

[0078] 도 1에 도식화하여 나타낸 바와 같이, 하이드로젤 패치를 제작하였다.

[0079] 구체적으로, 실시예 1-1 또는 1-2에서 배합한 졸 상태의 하이드로젤에 5 U/ml의 트롬빈 (Sigma, T4648)을 첨가하여 37℃에서 1시간 배양하여 젤화시킨 후, 자외선 (Ultraviolet light)으로 멸균된 파라필름에 원형으로 0.3에서 0.8 mm의 원틀을 찍어내어 10 cm petridish에 부착하였다. 이후에, 5 U/ml의 트롬빈을 원틀에 분주 후 15내지 60 uL의 하이드로젤을 분주 하여 하이드로젤에 기포가 발생하지 않게 하이드로젤과 트롬빈을 배합하여, 약 2분간 상온에서 젤화 과정을 거친 후 37℃에서 1시간 동안 2차 젤화 과정을 거쳤다. 젤 상태의 하이드로젤을 원틀의 파라필름에서 분리하여 0.3 mm에서 0.8 mm의 다양한 사이즈의 패치형태로 제작하였다. 제작된 하이드로젤

패치는 실시예 1-2의 신경세포 성장인자 및 혈관내피세포 성장인자가 첨가된 배양액에 보존하였다.

[0080] 상기 방법으로 제작된 하이드로젤 형태를 하이드로젤 패치라 하고, 제작된 하이드로젤 패치의 종류를 아래에 정리하였다.

[0081] 이하 명세서에서는 하이드로젤 패치 1 내지 6으로 기재한다.

[0082] 하이드로젤 패치 1: 피브린,

[0083] 하이드로젤 패치 2: 피브린 + 라미닌 + 히알루론산

[0084] 하이드로젤 패치 3: 피브린 + 라미닌 + 히알루론산 + 콜라겐

[0085] 하이드로젤 패치 4: 피브린 + 신경세포 성장인자 및 혈관내피세포 성장인자(실시예 1-2에 기재된 모든 성장인자)

[0086] 하이드로젤 패치 5: 피브린 + 라미닌 + 히알루론산 +신경세포 성장인자 및 혈관내피세포 성장인자(실시예 1-2에 기재된 모든 성장인자)

[0087] 하이드로젤 패치 6: 피브린 + 라미닌 + 히알루론산 + 콜라겐 + 신경세포 성장인자 및 혈관내피세포 성장인자(실시예 1-2에 기재된 모든 성장인자)

[0089] **1-4. 하이드로젤 패치의 제형 및 동결보존 가능 여부 확인**

[0090] 상기 제작한 하이드로젤 패치의 다양한 제형을 제조하였고, 이의 동결보존 가능 여부를 확인하였다.

[0091] 구체적으로, 실시예 1-3과 같은 방법으로 제작한 하이드로젤 패치 2의 가역적인 상전이를 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0092] 도 2에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤 패치 2를 실시예 1-1과 같은 방법으로 액체 제형으로 제조한 후 바이알에 담구어 놓았으며, 트롬빈을 실시예 1-3과 같은 방법으로 시린지에 담구어 놓았다. 또한, 하이드로젤 패치 2를 -80℃, 0.33Torr기압에서 24시간 동결건조 (대한 Scientific, F78)하여 고체 제형으로 만든 후, 이를 잘게 부숴 파우더 형태로 제조하였다. 또한, 파우더 형태의 제형을 제조하였다. 상기 파우더 형태의 제형을 실시예 1-3과 같은 방법으로 트롬빈을 첨가하여 젤화시켜 파우더 형태의 제형이 다시 젤의 형태로 제조될 수 있음을 확인하였다.

[0093] 이상의 결과로, 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 가역적인 상전이가 일어나, 고체, 반고체, 액체 또는 파우더 제형 등 다양한 제형으로 제공될 수 있음을 알 수 있었다.

[0094] 추가적으로, 동결보존 가능 여부를 확인하였다.

[0095] 구체적으로, 실시예 1-2와 같은 방법으로 제조된 배양액에 디메틸 설폭시드 (DMSO, Sigma, D2650)를 첨가하여 10% (v/v) DMSO가 되도록 한 것에 하이드로젤 패치 2를 첨가하였다. 이후에, 4℃ (30분), -20℃ (1시간), -80℃ 로 순차적 온도를 낮춰서 동결보전하고 동결건조(Freeze-dry)처리하였다. 이후에, 저온주사전자현미경 Cold FE-Scanning Electron Microscopy(Cold FE-SEM; Hitach High-Technologies, S-4800) 촬영을 통하여 동결 보존 전후의 하이드로젤 패치의 형태학적 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0096] 도 3에 나타낸 바와 같이, 동결 보존 전, 및 동결보존 1달 후 해동한 하이드로젤 패치의 형태학적인 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 하이드로젤 패치의 표면이 다공성인 것을 알 수 있었다.

[0098] **<실험예 1> 시험관내 신경줄기세포 분화평가**

[0099] 5 일령의 C57BL/6 마우스 (C57BL/6N Japan SLC, Inc.)를 희생하여 뇌를 채취하고 공지된 방법으로 마우스 신경줄기세포를 primary cell culture하여 100 mm dish (SARSTEDT, 831802)에서 배양하였다.

[0100] 상기 마우스 신경줄기세포에 일 구체예에 따른 물질과 비교예 물질을 도포하여, 마우스 신경줄기세포의 분화에 미치는 영향을 확인하였다.

[0101] 구체적으로, 공지된 방법(Kim JB et al. Nat Protoc. 2009)으로 마우스 신경줄기세포를 추출 및 배양하고, 상기

신경줄기세포 1x10^{4}개에 대하여 실시예 1-2와 같은 방법으로 제작한 하이드로젤(피브린 5 mg/mL; 라미닌 10 ㎍/ml; 및 히알루론산 0.5 mg/ml)을 도포하고 트롬빈을 첨가하여 하이드로젤 패치가 되도록 하였다. 이후에, 실시예 1-2의 신경세포 성장인자 및 혈관내피세포 성장인자를 포함하거나 포함하지 않는 배양액에 배양하였다. 또한, 최적 농도를 선정하기 위해, 비교예 물질로서, 피브린 단독 1 mg/ml, 5 mg/mL 또는 10 mg/ml; 라미닌 단독 5 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 또는 50 ㎍/ml; 및 히알루론산 단독 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 또는 1 mg/ml; 또는 라미닌 10 ㎍/ml 및 히알루론산 0.5 mg/ml 을 사용하였다.

[0102] 다음으로, 14일간 배양한 후에, 면역형광염색을 수행하였다. 구체적으로, 면역세포화학을 위해서, 세포들은 4% (w/v) Paraformaldehyde in Phosphate Buffer Solution (Wako, 163-20145)로 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정한 세포들은 10X Phosphate Buffer Saline (PBS, P2007)로 1X로 희석하여 상온에서 5분간 3번 세척하고, 1X PBS에 녹인 0.1% (v/v) Triton X-100(Sigma, T9284)를 사용하여 상온에서 10분간 투과시켰다(Permeabilized). 1X PBS로 상온에서 5분간 3번 세척한 후에, 비특이적 결합을 저해하기 위하여 1X PBS에 녹인 4% (v/v) 소태아 혈청 으로 상온에서 1시간 블로킹(Blocking)했다. 그 후 세포들을 일차 항체 항-beta III tubulin(Tuj1) (1:400; Abcam) 또는 항-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:400; Sigma)로 상온에서 1시간 배양하고 3차례 1X PBS에 녹인 0.05% (v/v) Tween-20 (Sigma, P7949) (PBST)을 사용하여 상온에서 10분간 3번 세척하였다. 이후에, 2차 형광 항체 (Alexa Fluorophore-conjugated secondary antibodies 488 (1:1000) 또는 Alexa Fluor®594 (1:1000)로 빛을 차단한 후 상온에서 30분간 배양했다. 이중 염색이 필요한 경우, 상기의 다른 일차 항체와 배양하기 전에 30분간 상온에서 추가적 블로킹을 수행하였다. PBST를 사용하여 상온에서 10분간 3번 세척한 후 세포 핵 염색을 위하여 DAPI(1:1000; Invitrogen)에 15초간 빛을 차단하여 배양한 후, PBST를 사용하여 상온에서 10분간 3번 세척하였다. 세포들은 형광 현미경을 사용한 시각화를 위하여 PBS에 보관하였다.

[0103] 이후에 , 디지털 흑백 카메라 (Leica, DFC345 FX)가 부착된 도립 형광 현미경 (Leica, DMI 3000B)을 사용하여 신경세포(Tuj1) 및 성상교세포 (GFAP)를 관찰하였다. 도립 형광 현미경으로 관찰한 이미지는 ImageJ (National Institutes of Health (http://rsb.info.nih. gov/ij) 소프트웨어를 사용하여 신경세포 또는 성상교세포의 수를 카운팅하여 분화율을 계산하였다.

[0104] 모든 통계적 분석은 unpaired two-tailed Student’s t-test를 사용하여 수행했고, 유의도는 *P < 0.05, **P < 0.005 또는 ***P < 0.0005이다.

[0105] 도 4에 나타낸 바와 같이, 신경줄기세포에 일 구체예에 따른 하이드로젤을 도포한 경우 도포하지 않은 조건(bare)에 비교하여 신경줄기세포의 세포접합이 향상되었음을 알 수 있었다.

[0106] 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 피브린 단독, 라미닌 단독, 히알루론산 단독, 및 라미닌과 히알루론산 조합을 도포한 경우에 비해 일 구체예에 따른 조성물(피브린, 라미닌, 히알루론산)을 도포한 경우, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화가 상승적으로 일어났음을 알 수 있었다. 상세하게는, 아무것도 처리하지 않은 대조군에서 5%의 신경세포가 나타나고, 각 물질 단독은 12% 미만의 신경세포가 나타남을 알 수 있었다. 이에 반해, 히알루론산과 라미닌의 조합에서는 약 15%의 신경세포가 나타남을 알 수 있었고, 단독으로는 실질적으로 효과가 나타나지 않는 피브린을 히알루론산과 라미닌을 조합하였을 때 20% 이상의 신경세포가 나타남을 알 수 있었다. 이는 히알루론산과 라미닌의 조합으로 신경세포의 분화의 효과가 현저하며, 특히, 3가지 조성물의 조합은 상승적인 효과를 일으켜 신경세포로의 분화를 현저하게 증가시켰음을 의미한다.

[0107] 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 성장인자를 추가하였을 때, 도 6의 결과와 일치하게 피브린 단독, 라미닌 단독, 히알루론산 단독, 및 라미닌과 히알루론산 조합을 도포한 경우에 비해 일 구체예에 따른 조성물(피브린, 라미닌, 히알루론산)을 도포한 경우, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화가 상승적으로 일어났음을 알 수 있었다. 상세하게는 성장인자 자체로도, 신경세포로의 분화를 상승시키나, 3가지 조성물과 성장인자의 조합에 의해 상승적인 효과를 일으켜 약 30% 정도의 신경세포를 나타내고, 이러한 결과는 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치 또는 조성물이 통상적으로 예측하기 힘든 상승적 효과를 나타냄을 의미한다.

[0108] 또한, 도 8에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 조성물에 각각의 성장인자 하나씩을 추가하여 확인한 결과, 마우스 신경줄기세포의 신경세포로의 분화율을 약 2.5 내지 5배 향상시킴을 확인할 수 있었다.

[0109] 상기의 결과로, 일 구체예에 따른 조성물은 그 자체로서 분화도 증가의 상승적 효과가 있을 뿐만 아니라, 성장인자와 조합되어 더욱 상승적인 효과를 나타내고, 성장인자의 세포에 대한 효과를 상승시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0111] **<실험예 2> 생분해성 평가**

[0112] 실시예 1에서 제작한 하이드로젤 패치의 생분해성 평가를 위하여 6주령 C57BL/6 마우스 (C57BL/6N Japan SLC, Inc.)에 2,2,2-tribromoethanol (Sigma, T48402)를 Tert-amyl alcohol (Sigma, 152463)에 용해하여 제작한 25mg/ml의 Avertin 마취제를 마우스당 125 - 250 mg/kg body weight으로 투여하여 마취시켰다. 이후에, 하이드로젤 패치 5를 피하에 이식하였다. 젤 패치를 이식하고 2주 후에, 피하 절개하여 이식한 젤 패치의 생분해 여부를 확인하였다.

[0113] 그 결과 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치가 생체내에서 생분해됨을 확인할 수 있었다.

[0115] **<실험예 3> 하이드로젤 패치 척수손상 치료효과 확인**

[0116] **4-1. 척수손상동물 모델을 이용한 하이드로젤 패치 척수손상 치료효과 확인**

[0117] 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 척수손상 재생 효과를 확인하기 위해서, 척수손상동물모델에 젤 패치를 이식한 후 8주간 행동 평가를 수행하였다.

[0118] 공식 소형 척수손상 동물 모델 평가 방법은 만성 척수손상 연구의 행동분석을 평가하는 방법으로 동물의 관절, 뒷다리, 걸음걸이, 앞다리와 뒷다리의 조화운동, 허리의 포지션, 발바닥으로의 지탱 및 꼬리의 포지션을 관찰 및 평가하여 행동능력의 회복을 평가하는 방법이다. 이를 반영하여 각 동물에 0부터 21까지 점수(Score)를 매겨 회복력을 정량화하며, 0 부터 7까지는 초기단계(Early stage)로 뒷다리의 움직임이 거의 회복되지 않은 최소의 행동능력 복구를 나타내며, 8 부터 13까지는 중간 회복 단계(Intermediate recovery stage)로 뒷다리의 움직임이 회복되었으나 앞다리와 뒷다리의 조절이 잘 되지 않은 조화운동의 간격이 있음을 나타낸다. 마지막으로 14부터 21까지는 후기 회복 단계(Late recovery stage)로 앞다리와 뒷다리의 조화운동을 나타낸다.

[0119] 우선, Adult 수컷 스프래그-달리(Sprague-Dawley) 랫드 (OrientBio)에 10 mg/rat Zoletil 50 (Virbac)을 주입시켜 마취시킨 후, T9 부분의 척수 후궁을 제거하였다. 이후에 혈관 클립(vascular clip)을 사용하여 10분간 척수를 압박하여 척수손상동물모델을 제작하였다. 척수손상수술 후 자발적 배뇨가 가능할 때까지 약 2주간 하루에 2 회씩 방광을 압박하여 배뇨관리를 시행하였다. 척수손상동물모델을 제작하고 1주일 후 도 10에 도시된 바와 같이 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치를 척수손상 부위에 직접 이식하였다. 행동 평가는 8주간 척수 손상 동물 모델 평가 방법 (BBB test; open field test)을 사용하여 수행하였고, 검사결과는 두 검사자의 관측치 평균값을 사용하였고, 그 결과를 도 15 내지 18에 나타내었다.

[0120] 도 11은 척수손상동물 모델의 척수손상 1주일 후, 척수손상으로 손실된 척수손상동물 모델의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다. 도 12는 하이드로젤 패치의 이식 없이 PBS만을 이식부위에 뿌린 척수손상 동물모델의 척수손상 8주차의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다. 도 13은 하이드로젤 패치 2 (Hydrogel patch 2 without GF)를 이식한 척수손상동물 모델의 척수손상 8주 차의 뒷다리 움직임을 관찰한 도면이다. 도 14는 하이드로젤 패치 5 (Hydrogel patch 2 with GF)를 이식한 척수손상 동물 모델의 척수손상 8주차의 뒷다리 움직임을 관측한 도면이다.

[0121] 도 15 내지 18은 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 이식에 따른 BBB score 값을 나타낸 그래프이다.

[0122] 도 11 내지 14에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤 패치의 이식 없이 PBS만을 이식부위에 도포한 척수손상동물 모델은 척수 손상 8주 후 손상된 뒷다리의 운동능력에 변화가 없었음을 알 수 있었다. 이에 반해, 하이드로젤 패치 2를 이식한 척수손상동물 모델은 척수 손상 8주 후 좌측 뒷다리의 운동능력이 회복되었고, 신경세포성장인자 및 혈관내피세포 성장인자를 추가한 하이드로젤 패치 5를 이식한 척수손상동물 모델은 척수 손상 8주 후 양측 뒷다리의 운동능력이 현저히 복구 되었음을 확인하였다.

[0123] 또한, 척수 손상 동물 모델 평가 방법 (BBB test; open field test)을 이용하여 척수 손상 회복능을 평가한 결과, 도 15 내지 18에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤 패치의 이식 없이 PBS만을 이식부위에 도포한 척수손상동물 모델은 4 내지 6의 BBB 점수를 나타내었다. 이는 척수손상 재생과정의 초기단계(early stage)를 나타낸다. 이에 반해, 하이드로젤 패치 2를 이식한 척수손상동물 모델에서는 약 8 내지 10의 BBB 점수를 보여 척수손상 재생과정의 중간 회복 단계를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, 하이드로젤 패치 5를 이식한 척수손상동물 모델은 약 10

내지 12의 BBB 점수를 보여 척수 손상 재생과정의 후기 회복 단계에 있음을 알 수 있었다.

[0124] 계속해서 도 15 내지 18에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤 패치 1과 4를 이식한 척수손상 동물 모델은 약 6 내지 8사이의 BBB 점수를 보여 척수 손상 재생 과정의 초기단계 (early stage)를 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 결과는 피브린, 라미닌, 히알루론산을 포함하는 하이드로젤 패치가 다른 조합에 비해 현저한 효과를 나타냄을 의미한다.

[0125] 또한, 하이드로젤 패치 2, 및 하이드로젤 패치 5와 콜라겐을 추가한 하이드로젤 패치 3, 및 6을 비교한 결과, BBB 점수는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0126] 또한, 하이드로젤 패치 3과 상기 하이드로젤 패치 3에 PBS만 첨가한 것을 비교한 결과, BBB 점수는 큰 차이가 없음을 알 수 있었고, 이를 통해 세포 배양액이 하이드로젤 패치 효능에 역할을 하지 않음을 알 수 있었다.

[0127] 따라서, 상기 결과에 의해서 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치는 척수손상으로 손실된 운동 능력을 현저히 복구하는 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0129] **4-2. 조직학적 분석를 이용한 하이드로젤 패치 척수손상 치료효과 확인**

[0130] 일 구체예에 따른 하이드로젤 패치의 척수손상 재생 효과를 확인하기 위해서, 조직학적 분석을 수행하였다.

[0131] 구체적으로, 하이드로젤 패치의 척수손상 부위 신경재생 효과의 조직학적 분석을 위하여 하이드로젤 패치 이식 수술 8주 후 랫드를 희생시킨 후, 4% (w/v) paraformaldehyde (Merck)를 사용하여 관류하여 척수를 채취하였다. 이후에, 10 um 두께로 척수를 절단하고, 절단한 척수 샘플을 실험예 1과 동일한 방법으로 항-neurofilament (NF) (1:3000, Abcam), 항-GFAP (1:1000, Abcam), 항- 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) (1:800, Abcam), 항-Homeobox HB9 (Hb9) (1:100, DSHB), 항-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:500,abcam)를 사용하여 염색하였다. 이후에, 공초점 현미경 (LSM 700, Zeiss)으로 촬영하여 하이드로젤 이식부위의 신경재생 여부를 평가하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

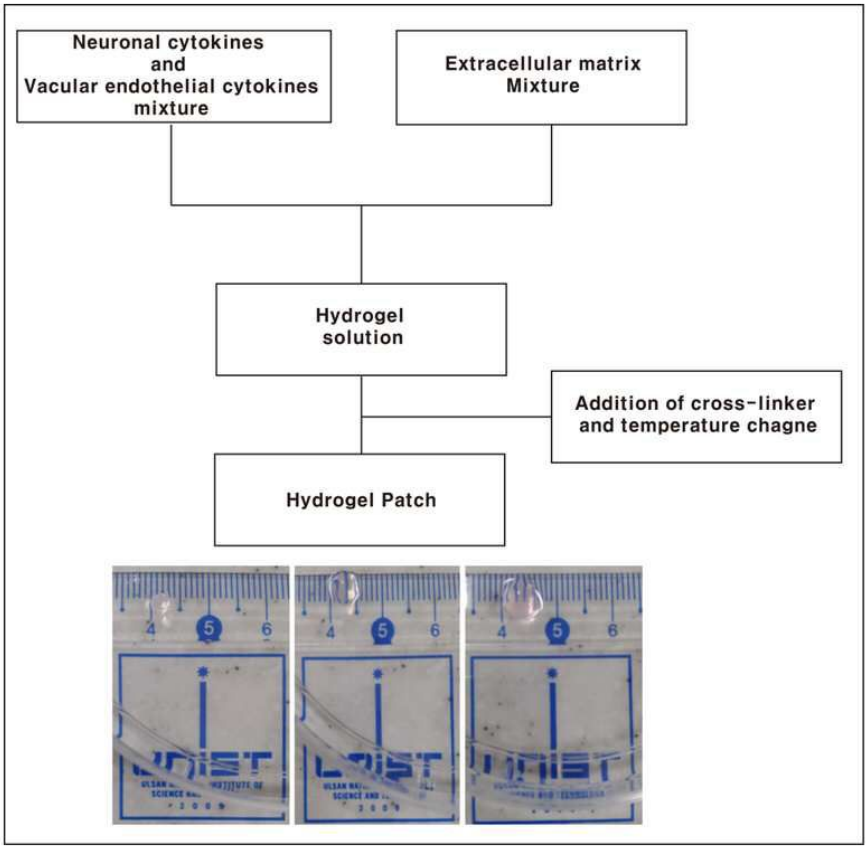
[0132] 그 결과 도 19에 나타난 것과 같이, PBS를 이식부위에 도포한 경우에 비하여 하이드로젤 패치 2 또는 5를 이식한 경우, 척수손상 병변 부위에, GFAP 성상교세포의 분포도가 낮은데 반해, NF 신경세포의 분포도가 높음을 알 수 있었다. 또한, 하이드로젤 패치 2 또는 5를 이식한 경우 CNPase 희소돌기아교세포가 NF 신경세포와 같은 위치에서 발현 (co-localization)하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 하이드로젤 패치의 도포에 의해 손상된 신경세포의 재생 및 재생된 신경세포의 수초 형성이 현저히 증가하였음을 의미한다.

[0133] 또한, PBS를 이식부위에 도포한 경우 NF 신경세포의 분포가 적으며 염증반응을 나타내는 Iba-1 미세아교세포의 분포도가 높은 반면, 하이드로젤 패치 2 또는 5를 이식한 경우에서 척수의 Hb9와 NF를 같이 발현하는 운동신경세포의 분포도가 높으며, Iba-1 미세아교세포의 분포가 현저히 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 하이드로젤 패치 이식 시 척수손상으로 인하여 야기되는 염증반응을 줄여 신경손상을 저해하며, 운동신경세포와 희소돌기아교세포의 재생을 도와 수초가 형성된 운동신경세포의 재생을 도와줌을 의미한다.

[0135] 상기의 결과로, 하이드로젤 패치는 손상된 척수신경 재생 유도 및 성상교세포의 활성화를 저해하여 손실된 운동 능력을 복구하는 치료 효과의 현저한 상승이 있고, 주사기를 사용하는 척수손상 치료로 인하여 야기되는 척수 2차 손상을 하이드로젤 패치를 사용함으로써 현저히 저해할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었다.

도면

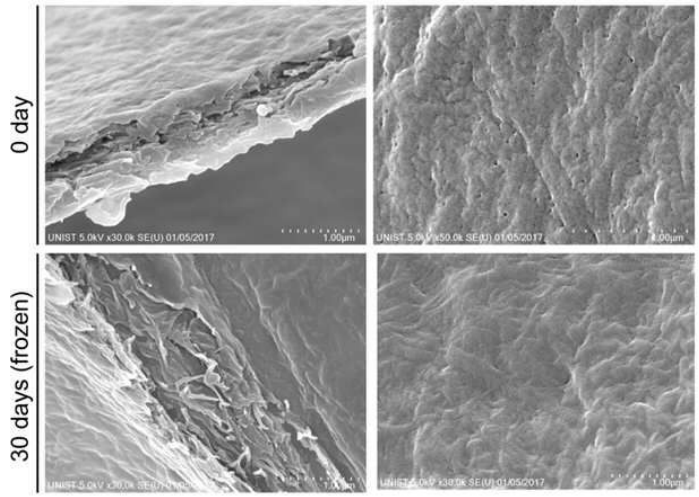
도면1


Neuronal cytokines
and
Vacular endothelial cytokines
mixture
Extracellular matrix
Mixture
Hydrogel
solution
Addition of cross-linker
and temperature chagne
Hydrogel Patch

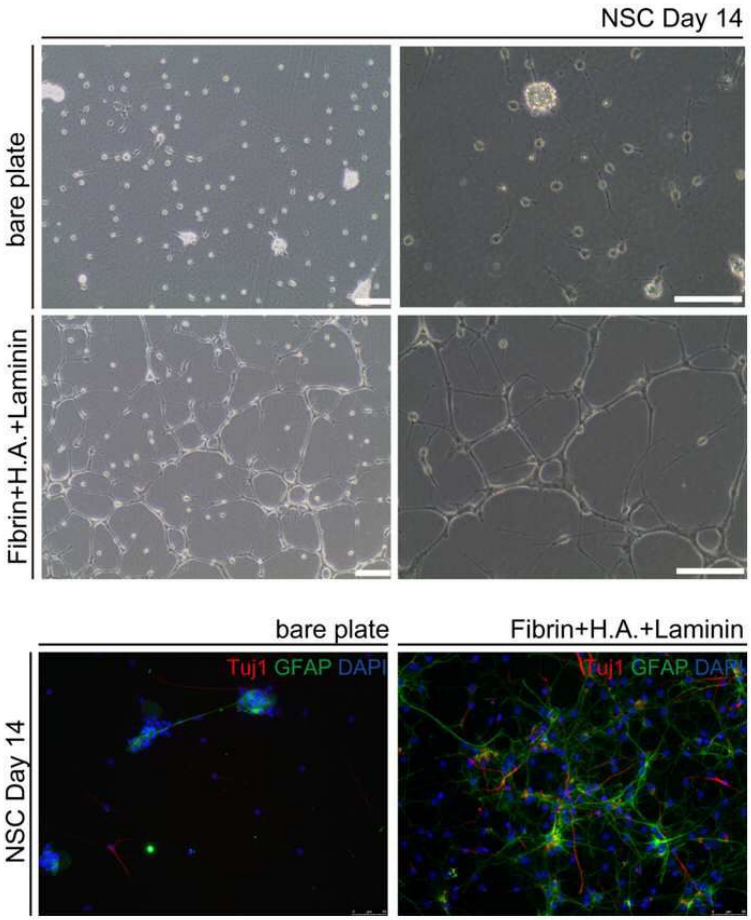
도면2



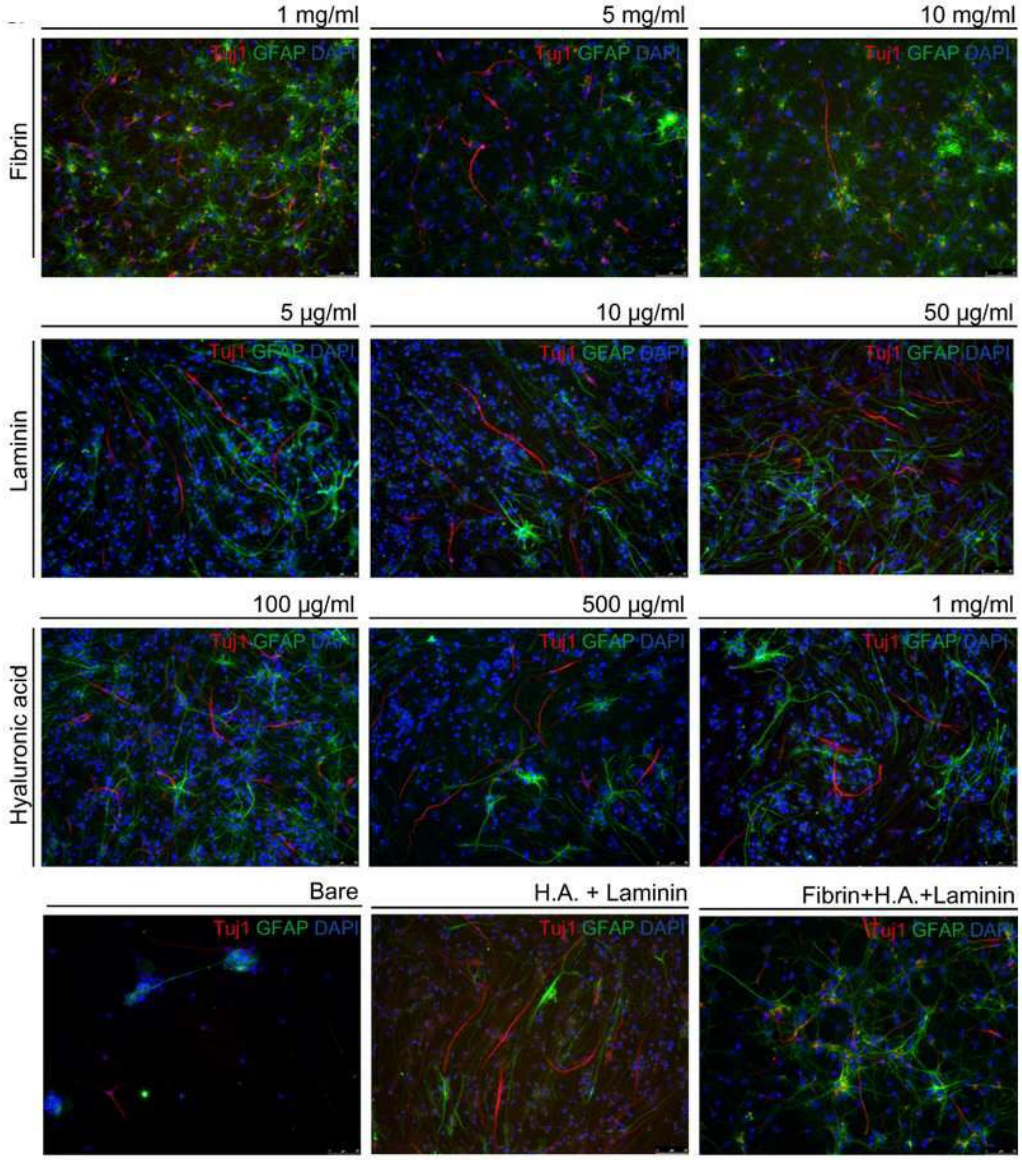
도면3


0 day
30 days (frozen)

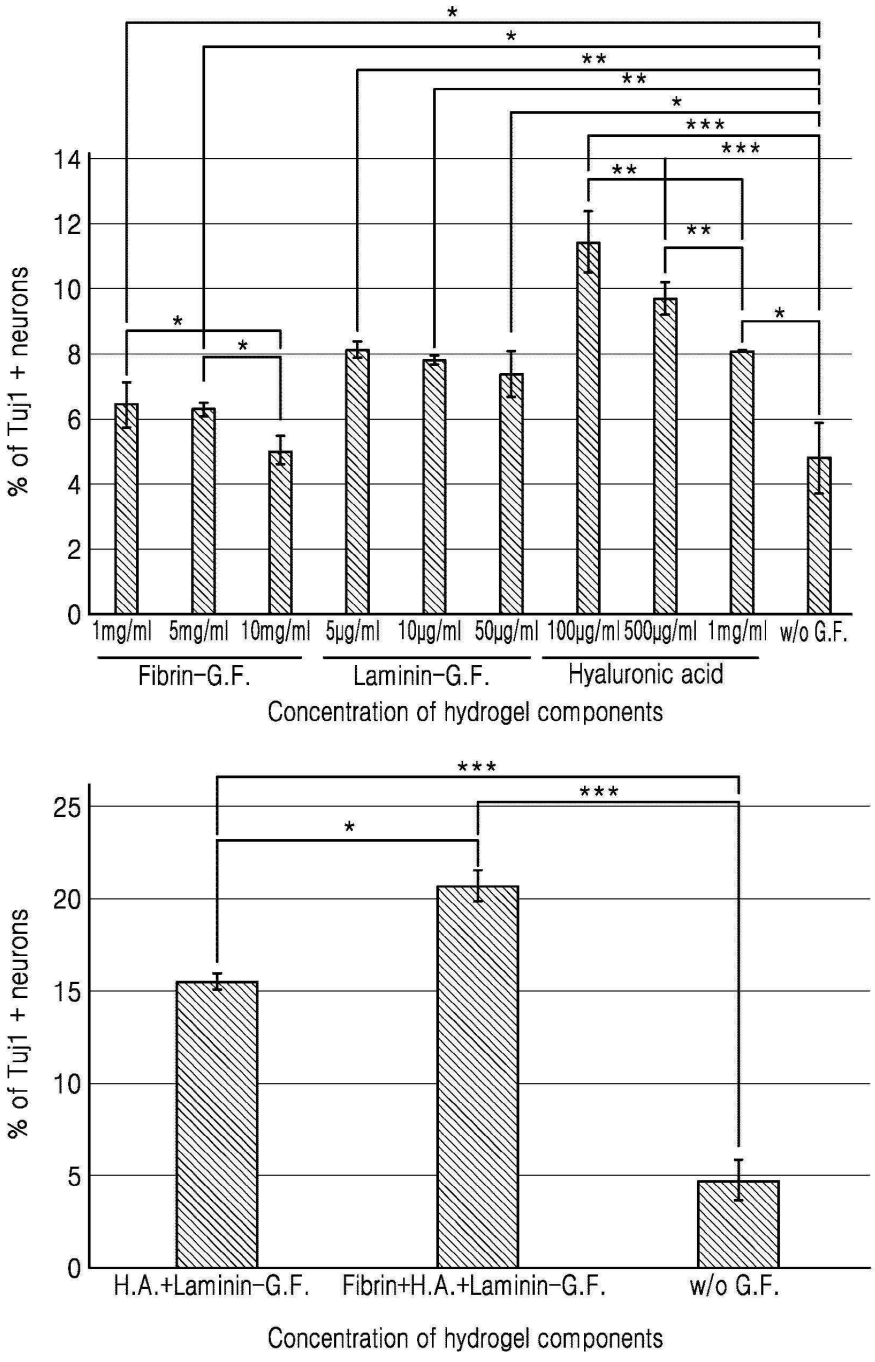
도면4


NSC Day 14
bare plate
Fibrin+H.A.+Laminin
bare plate
Fibrin+H.A.+Laminin
NSC Day 14
Tuj1 GFAP DAPI
Tuj1 GFAP DAPI

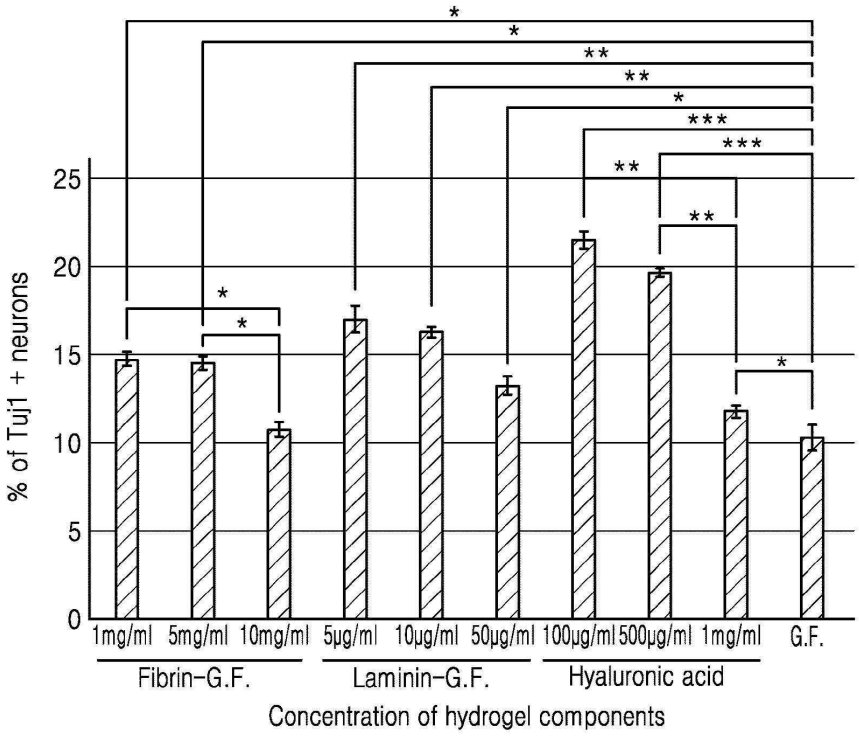
도면5

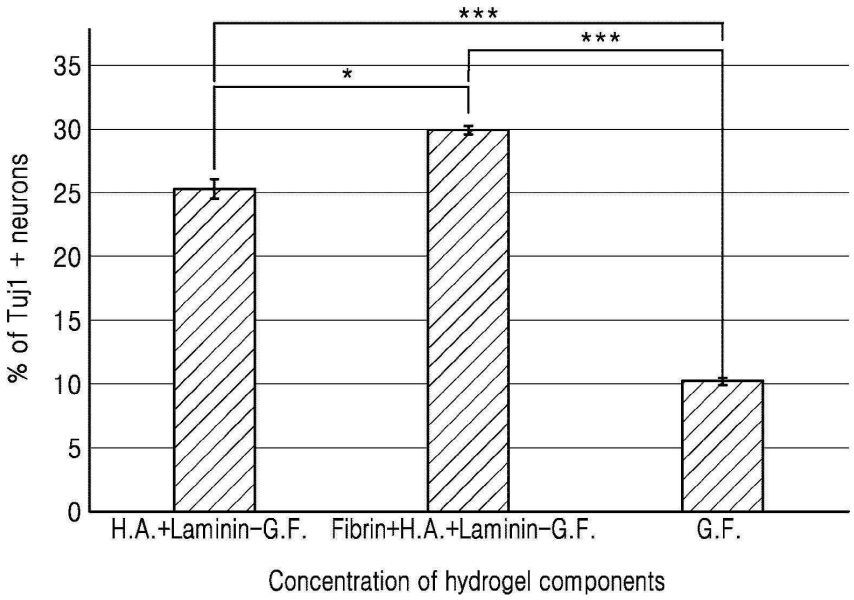

1 mg/ml
5 mg/ml
10 mg/ml
Fibrin
Tuj1 GFAP DAPI
5 μg/ml
10 μg/ml
50 μg/ml
Laminin
100 μg/ml
500 μg/ml
1 mg/ml
Hyaluronic acid
Bare
H.A. + Laminin
Fibrin+H.A.+Laminin

도면6

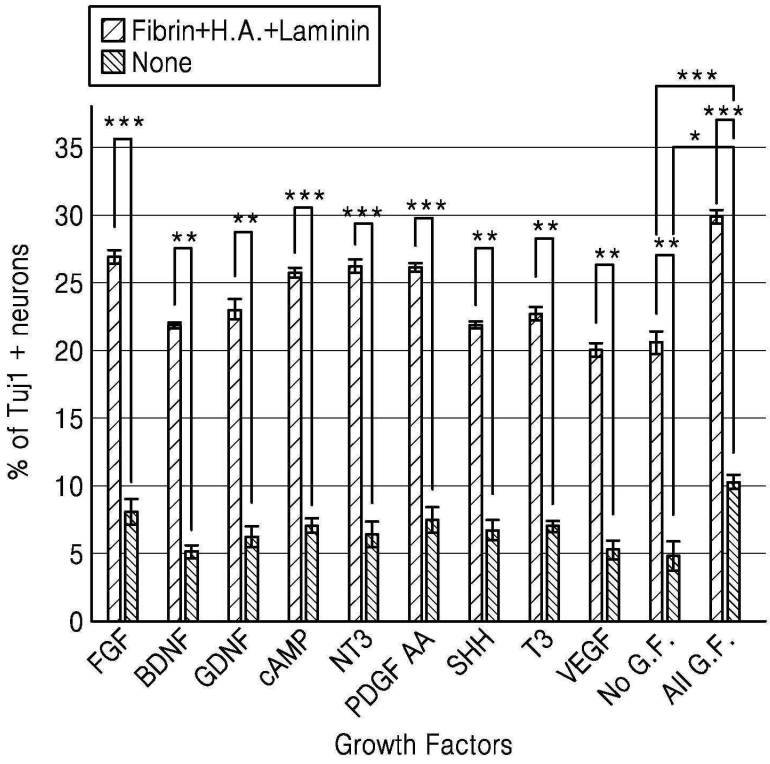

% of Tuj1 + neurons
0
2
4
6
8
10
12
14
1mg/ml
5mg/ml
10mg/ml
5μg/ml
10μg/ml
50μg/ml
100μg/ml
500μg/ml
1mg/ml
w/o G.F.
Fibrin-G.F.
Laminin-G.F.
Hyaluronic acid
Concentration of hydrogel components
% of Tuj1 + neurons
0
5
10
15
20
25
H.A.+Laminin-G.F.
Fibrin+H.A.+Laminin-G.F.
w/o G.F.
Concentration of hydrogel components

도면7

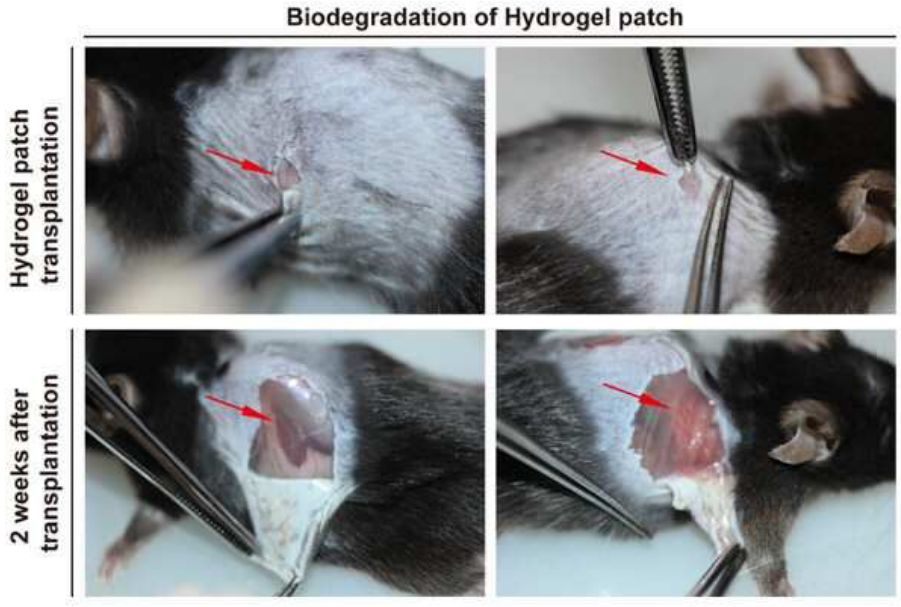

% of Tuj1 + neurons
0
5
10
15
20
25
1mg/ml
5mg/ml
10mg/ml
5μg/ml
10μg/ml
50μg/ml
100μg/ml
500μg/ml
1mg/ml
G.F.
Fibrin-G.F.
Laminin-G.F.
Hyaluronic acid
Concentration of hydrogel components


% of Tuj1 + neurons
0
5
10
15
20
25
30
35
H.A.+Laminin-G.F.
Fibrin+H.A.+Laminin-G.F.
G.F.
Concentration of hydrogel components

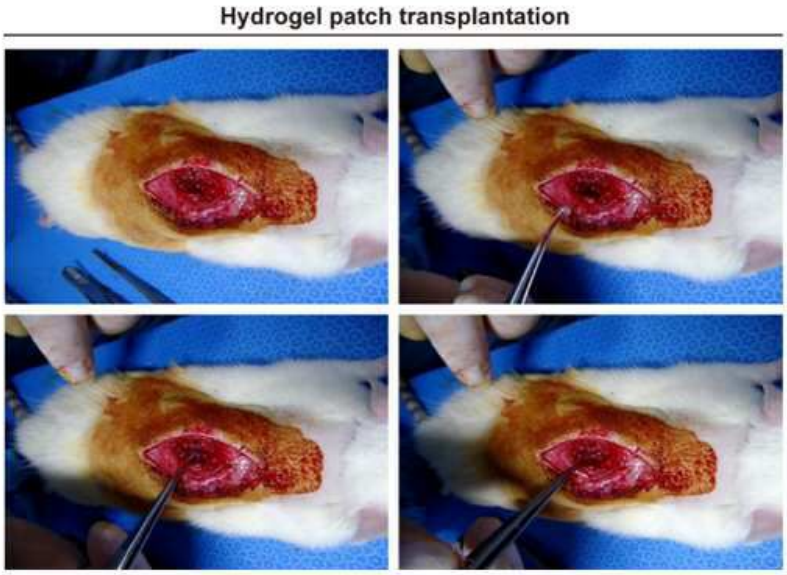
도면8


Fibrin+H.A.+Laminin
None
% of Tuj1 + neurons
0
5
10
15
20
25
30
35
FGF
BDNF
GDNF
cAMP
NT3
PDGF AA
SHH
T3
VEGF
No G.F.
All G.F.
Growth Factors

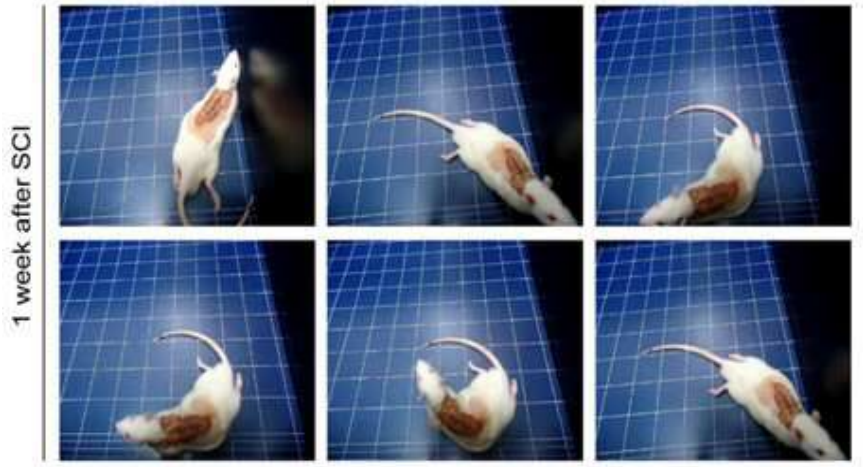
도면9


Biodegradation of Hydrogel patch
Hydrogel patch transplantation
2 weeks after transplantation

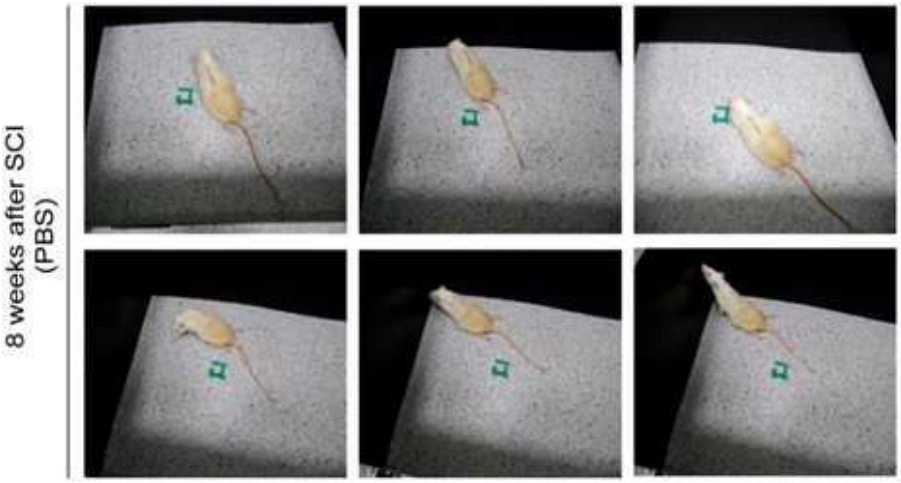
도면10



도면11



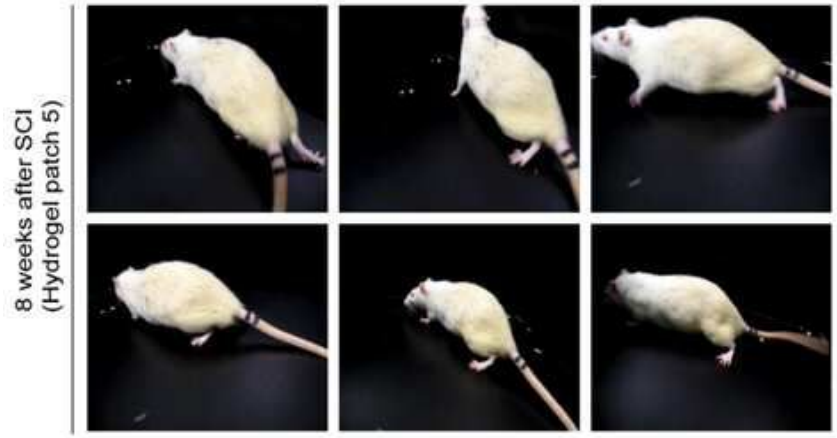
도면12



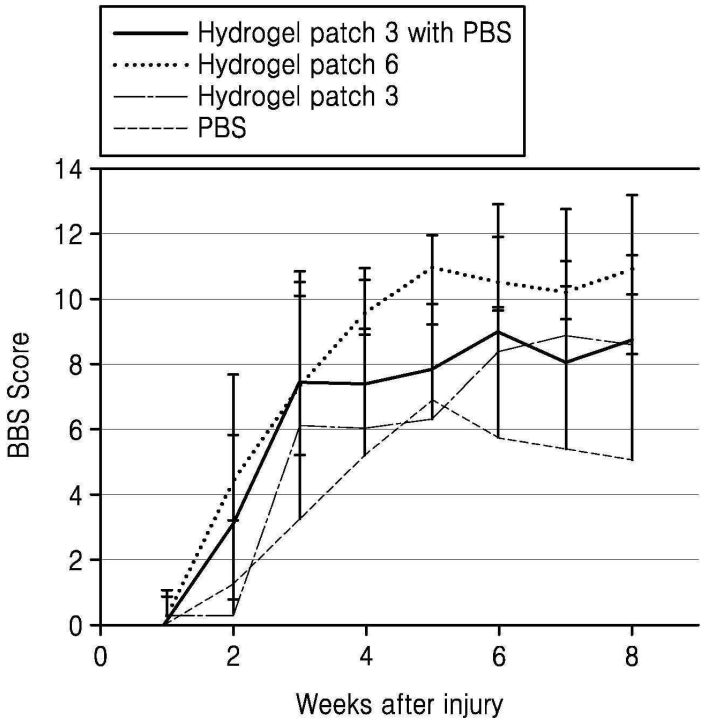
도면13



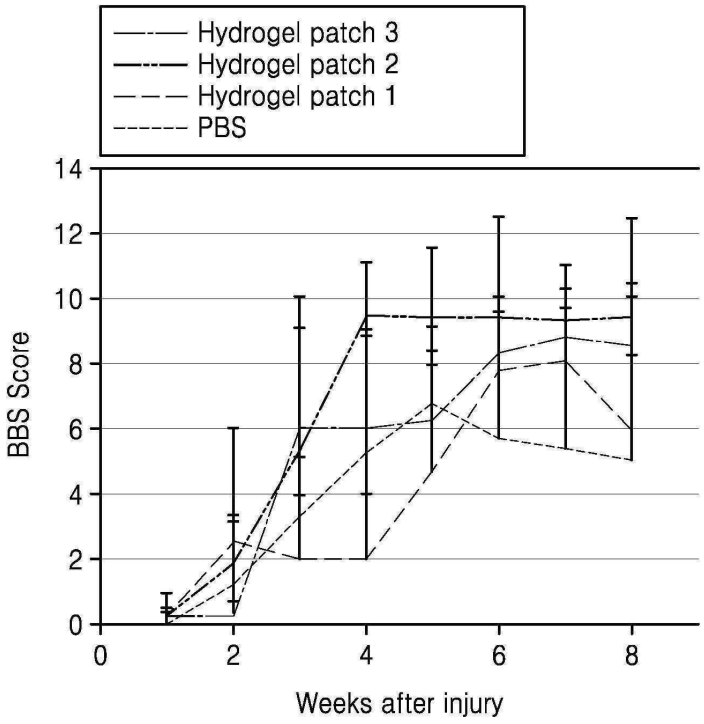
도면14



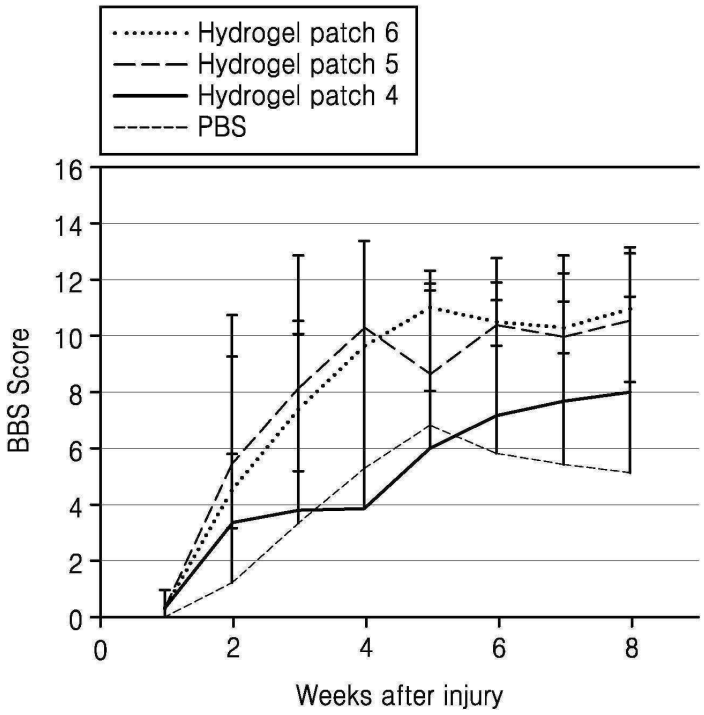
도면15



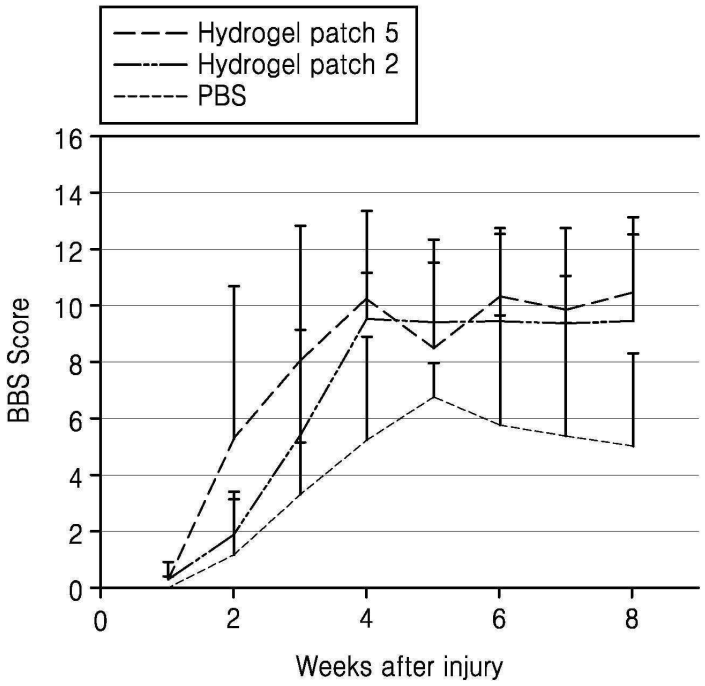
도면16


Hydrogel patch 3
Hydrogel patch 2
Hydrogel patch 1
PBS
BBS Score
0
2
4
6
8
10
12
14
Weeks after injury

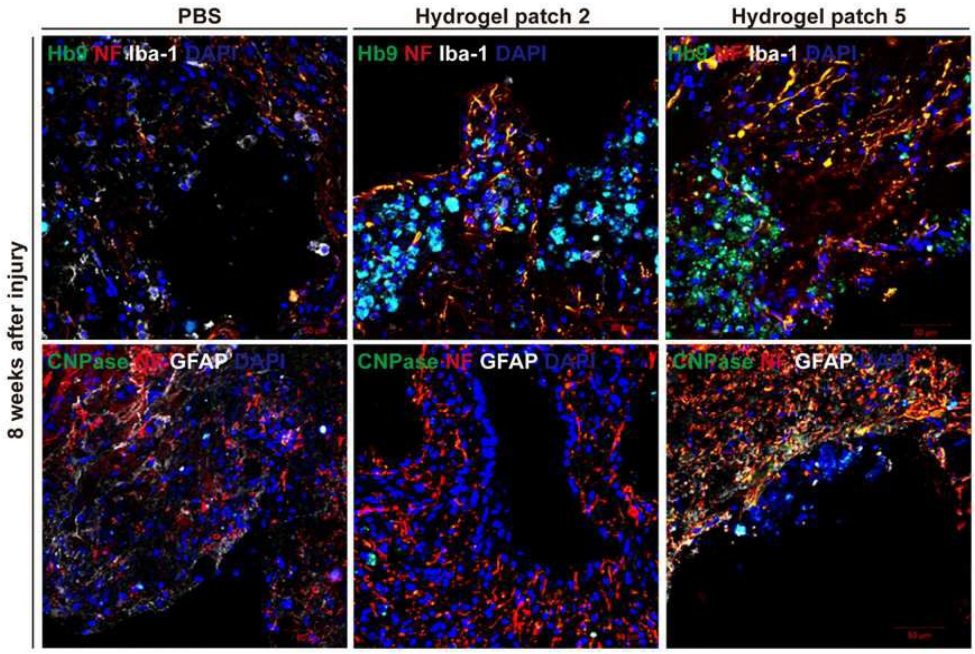
도면17


Hydrogel patch 6
Hydrogel patch 5
Hydrogel patch 4
PBS
BBS Score
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Weeks after injury

도면18


Hydrogel patch 5
Hydrogel patch 2
PBS
BBS Score
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8
Weeks after injury

도면19


PBS
Hydrogel patch 2
Hydrogel patch 5
8 weeks after injury
Hb9 NF Iba-1 DAPI
CNPase NF GFAP DAPI