



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월19일

(11) 등록번호 10-1364591

(24) 등록일자 2014년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/52 (2006.01) **A61L 27/54** (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2012-0063337**
 (22) 출원일자 **2012년06월13일**
 심사청구일자 **2012년06월13일**
 (65) 공개번호 **10-2013-0139673**
 (43) 공개일자 **2013년12월23일**
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020080075387 A
 KR1020070106696 A
 KR100750287 B1
 임지에 외 3명, Polymer(Korea) 2008, Vol.32,
 No.5, pp.415-420

(73) 특허권자
아주대학교산학협력단
 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
 (72) 발명자
김문석
 경기도 용인시 수지구 상현로11번길 26 (상현동,
 상현마을현대성우2차아파트) 162동 104호
윤소미
 부산광역시 해운대구 선수촌로 9 (반여동, 왕자맨
 션) 12동 103호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
한라특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 정재철

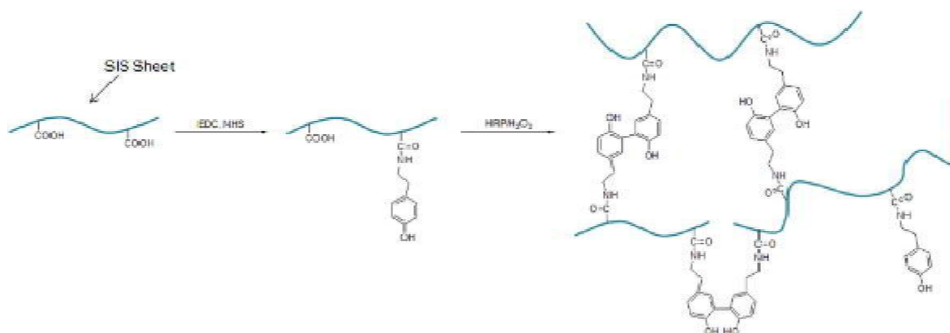
(54) 발명의 명칭 **산화중합반응에 의한 소장점막하조직 가교 젤의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 소장점막하조직 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합반응에 의한 가교 반응 시키는 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 생체적합성인 소장점막하조직 젤은 산화중합반응에 의한 가교 결합의 형성에 의해 쉽게 분해되지 않는 젤 형성이 가능하며, 젤화 시간, 팽윤 정도, 분해 및 기계적 물성과 같은 물리화학적 특성은 과산화수소 농도에 따라 조절가능하다는 장점이 있어 지혈제, 약물전달체 및 조직공학용 지지체로서의 용도로서 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이빛나

서울특별시 구로구 경인로65길 16-15 (신도림동, 신도림4차 e-편한세상) 1101동 1802호

권진선

부산광역시 부산진구 엄광로238번길 5(가야동, 가야삼정그린코아) 101동 1006호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10038665

부처명 지식경제부

연구사업명 산업원천기술개발사업

연구과제명 표준형 스캐폴드 제작을 위한 통합기반기술

기 여 율 1/1

주관기관 아주대학교

연구기간 2010.12.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

소장점막하조직 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합반응에 의한 가교 반응 시키는 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법.

청구항 2

- (i) 소장점막하조직에 가교제를 도입하고 분쇄시키는 단계;
- (ii) 가교제가 도입된 분쇄된 소장점막하조직을 산성 용액 및 캡신과 혼합하여 소장점막하조직 용액을 제조하는 단계;
- (iii) 상기 혼합 용액에 염기성 용액을 처리하여 pH를 조절하는 단계;
- (iv) 상기 단계 (iii)에서 얻은 용액을 동결 건조하여 파우더로 제조하는 단계; 및
- (v) 상기 단계 (iv)의 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합 반응시켜 가교 반응시키는 단계를 포함하는 산화중합반응에 의한 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 (i) 단계의 가교제는 티라민, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산, 도파민, 에피네프린 또는 하이드록시에틸아닐린인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 (v) 단계의 가교제는 당근 과산화효소 또는 과산화수소인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 가교 반응을 통하여 하이드로젤화가 일어나는 시간, 분해 시간, 기계적 강도 조절은 당근 과산화효소 또는 과산화수소의 농도로 조절하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 과산화수소의 농도는 50 ~ 300 mM 농도로 하이드로젤화 시간을 조절하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 방법을 통해 제조한 소장점막하조직 하이드로젤.

청구항 8

청구항 7의 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 담체.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 약물 전달용 담체는 펩타이드, 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 약물을 전달하는 것을 특징으로 하는 담체.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 펩타이드 및 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스틴, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담체.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 항균제는 미노싸이클린, 테트라싸이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시사이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로모마이신, 마이크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세포탁신, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담체.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소터어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담체.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 항염증제는 아세트아민펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담체.

청구항 14

청구항 7의 하이드로젤을 포함하는 조직 공학용 지지체.

청구항 15

청구항 7의 하이드로젤을 포함하는 지혈제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 티라민과 같은 페놀 유도체를 도입한 소장점막하조직 파우더를 산화중합반응으로 가교 결합을 형성시켜 체내 안정성 및 우수한 기계적 물성을 특징으로 하는 생체적합성의 소장점막하조직 가교 젤의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 천연소재는 천연물질, 동물, 인체에서 유래한 물질로서 매우 우수한 생체적합성을 가지고 있다. 대표적인 일례로 세포외기질 (extracellular matrix; ECM)을 들 수 있는데 이는 복잡한 인체 및 동물에서 추출된 생체재료로서 세포의 기능을 제어할 수 있다는 특징이 있다. 따라서 천연소재로 제조된 지지체는 생체에 이식 후 염증반응이 적을 뿐 아니라, 뛰어난 생체 기능성과 생분해성 등을 제공할 수 있어 이상적인 조직공학용 지지체의 재료로 평가받고 있다.

[0003] 이러한 천연소재 물질 중에 돼지의 소장점막하조직(Small Intestinal Submucosa, SIS)이 있는데, 이를 이용하여 손상된 조직을 재생하기 위한 지지체로 응용할 수 있다. 상세하게는 각종 질병으로 인한 장기의 손상을 치유하기 위해 때때로 골수 이식이나 심장, 신장, 안구 등의 장기 기증 등으로 치료를 하는 경우가 있지만 수요에 비해 공급이 상당히 부족하기 때문에 조직공학을 이용한 인공장기의 개발이 필요하다. 이러한 조직공학은 생명과학과 공학의 원리를 이용하여 손실된 기관의 기능을 복원 혹은 보존을 목적으로 생물학적 대체물의 재생에 적용되는 학문간 상호 협조를 필요로 하는 분야로서, 본 발명에서는 여러 성장인자 등을 다량 함유하여 인공장기 형성 시 높은 영향을 미칠 수 있도록 천연소재인 소장점막하조직과 가교제를 이용하여 주사제형 소장점막하 지지체를 제조하였다.

[0004] 돼지의 소장점막하조직은 세포가 존재하지 않은 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며 90% 이상이 피부에 있는 콜라겐 I, II 형으로 구성되어 있고, 그 외에는 소량의 콜라겐 V, VI형 등이 다양하게 존재한다. 또한 소장점막하조직은 ECM으로서 글리코사미노글리칸 및 피브로넥틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 하이아루론산과 염기성 섬유아세포 성장인자-2 (base fibroblast growth factor - 2; FGF-2), 신경성장인자 (nerve growth factor; NGF), 변환성장인자- β (transforming growth factor- β ; TGF- β), 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF), 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 및 인슐린 성장인자 (insulin-like growth factor-1; IGF-1) 등의 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있다.

[0005] 소장점막하조직 내에 ECM 및 사이토카인이 존재하기 때문에 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 줌으로써 조직재생 이외에도 많은 분야에 응용될 수 있다.

[0006] 이러한 특징을 가지는 소장점막하조직은 미국의 "Purdue University"에 있는 Badylak에 의해 실험이 시작되었으며 "COOK"사와 더불어 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구 결과로 정맥이나 동맥의 혈관 및 진피, 상피, 뼈 등의 이식물, 담즙관의 재생, 요실금 환자의 방광을 조여주는 이식물 등으로 현재 상용화되어있다. 그러므로 소장점막하조직은 여러 가지 생체 대체물으로써 다양하게 응용가능하며 생체적합성 재료로 앞으로 많은 연구가 기대된다. 그러나 천연소재로서의 응용에는 한계가 있고 기계적 물성의 증가 및 화학적 처리에 의하여 물성을 증진시켜야만 한다.

[0007] 최근 주입형 하이드로젤은 의료분야에서 많은 관심을 받고 있는데, 의료용 충전제로부터 생리활성 물질의 방출 시스템, 삼차원 구조를 이용한 기관/조직재생 등 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 주입형 하이드로젤은 외과적인 수술과정 없이 주사기 등을 사용하여 간단하게 생체 내에 주입될 수 있다는 장점을 가지고 있다. 일반적으로 주입형 하이드로젤의 경우 체외에서는 유체와 같은 특성을 가지고 있어 주사기를 사용하여 이식이 가능하고, 체 내에 주입 후에는 젤화가 일어나게 된다. 즉, 이식 후에는 약물이나 생리활성물질의 지속적인 방출을 위한 약물전달시스템 또는 세포의 성장을 유지할 수 있는 지지체로서의 역할을 할 수 있다. 또한 다양한 가교 방법을 도입하여 하이드로젤의 젤화 시간, 팽윤 정도, 분해 및 기계적 물성과 같은 물리화학적 특성을 조절할 수 있다. 이러한 물리화학적 특성의 조절은 소장점막하조직을 약물전달 시스템이나 조직공학에 이용하는 데 큰 장점이 된다. 따라서 적당한 가교의 정도를 조절하여 원하는 물리화학적 특성을 가지는 하이드로젤을 제조하는 것이 중요하다.

- [0008] 주입형 하이드로젤은 UV-중합반응, 비-공유결합 도입 후 또는 가역적 상호작용 또는 비가역적 화학 반응에 의한 자가-조립을 통해 수득될 수 있다. 이들 주입형 시스템은 광-개시제, 교차-결합제와 같은 독성 첨가제의 사용, 약한 기계적 물성(물리적 교차-결합)과 같은 일부 제한을 지닌다. 최근 말단기-특이적 화학 반응(예를 들어 Micheal 추가 및 효소반응)이 널리 조사되고 있다. 특히 효소적 교차-결합 시스템은 생체 적합성 및 반응 시간 제어의 용이성과 같은 장점을 지닌다. 당근 과산화효소(HRP) 및 과산화수소의 존재 하에서 효소 반응을 통해 화학적 교차-결합을 지닌 높은 탄성력 및 분해 가능한 하이드로젤을 생성할 수 있게 한다. 컨쥬게이트 내 페놀 유도체의 HRP-매개된 커플링 반응은 오르토(ortho) 위치에서 탄소-탄소 결합을 통하여 또는 오르토 위치에서의 탄소와 페녹시 산소 사이의 탄소-산소 결합을 통해 발생된다. 젤화 시간은 HRP 및 과산화수소의 농도에 따라 상이하나 몇 초 내지 몇 분으로 제어될 수 있다. 이들은 효소 반응을 이용한 생체주입형 하이드로젤을 이용하여 시험관 내 및 생체 내 연구가 진행되고 있다.
- [0009] 따라서 본 발명은 소장점막하조직-티라민 컨쥬게이트로 구성된 효소 기작을 이용한 주입형 하이드로젤을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다. 즉 조직공학용 주입형 골격, 서방형 약물 전달(단백질, DNA, 성장 인자, 세포), 조직 충전제, 지혈제, 상처 치료 및 장 유착 방지 등의 다양한 생의학적 응용을 위해 생체주입형 하이드로젤을 개발한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 천연소재의 경우 생체적합성이 우수한 반면 기계적 물성 및 분해속도의 조절이 어렵기 때문에, 천연소재로서의 응용에는 한계가 있고 기계적 물성의 증가 및 화학적 처리에 의하여 물성을 증진시켜야만 한다.
- [0011] 이에, 본 발명자들은 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 주는 ECM 및 사이토카인이 존재하여 조직재생이나 상처 치유 이외에도 많은 분야에 응용될 수 있는 소장점막하조직에 산화중합반응을 이용한 가교 결합 형성을 통하여 기계적 물성이 우수하며 분해기간이 조절 가능한 주사제형을 제조하였다.
- [0012] 본 발명의 목적은 산화중합반응에 의한 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법을 제공하는데에 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조 방법에 의해 제조된 소장점막하조직 하이드로젤을 제공하는데에 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 약물 담체를 제공하는데에 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 조직공학용 지지체를 제공하는데에 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 지혈제를 제공하는데에 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은
- [0019] 소장점막하조직 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합반응에 의한 가교 반응 시키는 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법을 이용하여 제조한 소장점막하조직 하이드로젤을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 담체를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 조직 공학용 지지체로 이

용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 지혈제로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본원 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.

[0025] (i) 본 발명에 따른 생체적합성인 소장점막하조직 젤은 산화중합반응에 의한 가교 결합의 형성에 의해 쉽게 분해되지 않는 젤 형성이 가능하며, 젤화 시간, 팽윤 정도, 분해 및 기계적 물성과 같은 물리화학적 특성은 과산화수소 농도에 따라 조절가능하다는 장점이 있다.

[0026] (ii) 본 발명의 상기 소장점막하조직 젤은 주사제형의 하이드로 젤 및 이의 지혈제, 약물전달체 및 조직공학용 지지체로서의 용도로서 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 소장점막하조직과 티라민의 합성 및 산화중합반응의 모식도이다.

도 2는 티라민이 도입된 소장점막하조직에 당근 과산화효소와 과산화수소를 이용하여 젤을 가교하는 방법의 모식도이다.

도 3은 산화중합반응에 의해 가교된 소장점막하조직 가교 젤의 온도에 따른 점도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 산화중합반응에 의해 가교된 소장점막하조직 가교 젤의 가교된 모습을 측정한 사진이다.

도 5는 이중 주입식 주사기를 이용하여 동물모델 피하에 주입 후 소장점막하조직 가교 젤의 형성을 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 하기, 본 발명에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

[0029] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은

[0030] 소장점막하조직 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합반응에 의한 가교 반응 시키는 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은

[0032] (i) 소장점막하조직에 가교제를 도입하고 분쇄시키는 단계;

[0033] (ii) 가교제가 도입된 분쇄된 소장점막하조직을 산성 용액 및 펩신과 혼합하여 소장점막하조직 용액을 제조하는 단계;

[0034] (iii) 상기 혼합 용액에 염기성 용액을 처리하여 pH를 조절하는 단계;

[0035] (iv) 상기 단계 (iii)에서 얻은 용액을 동결 건조하여 파우더로 제조하는 단계; 및

[0036] (v) 상기 단계 (iv)의 파우더를 수용액화 후 가교제를 혼합하여 산화중합 반응시켜 가교 반응시키는 단계

[0037] 를 포함하는 산화중합반응에 의한 소장점막하조직 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.

[0038] 본 발명은 생체적합성의 주사제형 소장점막하조직 파우더 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 티라민이 도입된 소장점막하조직에 산성 용액과 펩신을 혼합하여 제조한 소장점막하조직 용액을 염기성 용액으로 생체와 맞는 pH로 적정하고 이를 동결건조시켜 티라민이 도입된 소장점막하조직 파우더를 제조하고, 상기 소장점막하조직 파우더를 산화중합반응을 통해 수용액 상으로 생체 내 주사 시 그 자리에서 젤이 형성되어 우수한 기계적 물성을 가지고 가교 정도에 따라 분해기간의 조절이 가능한 주사용 하이드로 젤을 제조하는 방법에 관한

것이다.

- [0039] 따라서, 본 발명은 산화중합반응에 의한 가교 결합을 형성시켜 기계적 물성 향상 및 분해기간의 조절이 가능한 생체적합성인 소장점막하조직 가교 젤을 제공하는 데 그 목적이 있다.
- [0040] 먼저, 포유류의 소장점막하조직을 분리하는데, 포유류의 소장을 분리하여 공장을 제거한 후 식염수에 침지 및 인산완충용 액에 침지하였다가 장간막을 제거한 다음 일정한 길이로 자른다. 이렇게 자른 소장을 뒤집어 점막층을 마찰로서 제거한 후 다시 뒤집어 장막과 근육층을 제거하여 소장점막하조직을 분리한다.
- [0041] 상기 분리된 소장점막하조직을 시트 형태로 동결 건조 후에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필카보이미드)(EDC)와 N-히드록시석신이미드(NHS)를 이용하여 소장점막하조직에 티라민을 도입한다. 티라민이 도입된 소장점막하조직을 분쇄하고 분쇄된 소장점막하조직을 산성 용액 및 펩신으로 혼합시킨다. 상기 혼합 용액에 염기성 용액을 이용하여 pH 5.5 ~ 7.8, 바람직하게는 pH 6.5 ~ pH 7.5로 적정시켜 젤 형성이 가능한 생체적합성의 소장점막하조직 파우더를 제조한다.
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (i)의 가교제는 티라민, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산, 도파민, 에피네프린 또는 하이드록시에틸아닐린이며, 가장 바람직하게는 티라민을 소장점막하조직과 가교시킨다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (i)의 소장점막하조직은 시트(sheet)형이다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (i)의 소장점막하조직은 동결 건조 상태에서 가교제를 도입시킨다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (ii)의 산성 용액은 아세트산, 파라톨루엔설폰산 또는 말레인산 1 ~ 5 중량% 농도로 pH를 조절한다.
- [0046] 상기 산성 용액은 pH 2.5 ~ 4.5로 조절할 수 있는 용액이면 가능하고, 바람직하게는 아세트산, 파라톨루엔설폰산 및 말레인산 중에서 선택된 산(acid)을 1 ~ 5 중량% 농도로 포함된 수용액을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (iii)의 염기성 용액은 수산화나트륨(NaOH), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 인산수소이나트륨(Na_2HPO_4), 탄산수소칼슘($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$), 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화질산칼슘($\text{Ca}(\text{OH})\text{NO}_3$), 수산화염화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})\text{Cl}$), 수산화시아나칼슘($\text{Ca}(\text{OH})\text{CN}$), 수산화칼륨(KOH), 수산화암모늄(NH_4OH) 및 아세트산나트륨(CH_3COONa)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 용액을 이용할 수 있다.
- [0048] 상기 염기성 용액은 산성을 적정시켜주고, 피하주사 또는 조직공학용 지지체로써 사용되어 질 때 주변의 세포들의 염증반응을 줄이기 위하여 사용된다. 상기 염기성 용액을 적정시켜 pH 5.5 ~ 7.8의 생체내 pH와 유사하게 조절한다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (iii)의 염기성 용액을 처리한 pH 조절은 pH 5.5 - 7.8로 조절한다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (v)의 가교제는 당근 과산화효소 또는 과산화수소이다.
- [0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (v)의 가교 반응을 통하여 하이드로젤화가 일어나는 시간, 분해 시간, 기계적 강도 조절은 당근 과산화효소 또는 과산화수소의 농도로 조절할 수 있다.
- [0052] 상기 제조된 소장점막하조직 용액은 생체 내에 주입 시 체액에 의해 쉽게 분해되고 기계적 물성이 낮으므로 가교 반응을 통하여 분해기간 및 기계적 물성의 제어를 할 수 있다. 산화중합반응은 고분자 사슬간의 가교 결합을 형성시켜 체액에 의해 분해되는 것을 억제시켜 이것으로 인해 인체 내에서 분해되는 기간이 조절이 가능하다. 천연소재를 사용한 지지체는 산화중합반응과 같은 화학적 처리를 통해 하이드로젤의 젤화 시간, 팽윤 정도, 분해 및 기계적 물성과 같은 물리화학적 특성을 조절할 수 있는데, 이를 위해 사용된 가교 방법은 티라민이 도입된 소장점막하조직에 당근 과산화효소(HRP)와 과산화수소를 첨가시켜 페놀 유도체 간의 산화중합반응을 유도하는 것이다. 당근 과산화효소와 과산화수소의 농도의 조절을 통하여 젤화 시간, 분해 시간, 하이드로젤의 기계적 물성을 조절할 수 있다.
- [0053] 즉, 본 발명에 따른 소장점막하조직은 산화중합반응에 의해 가교 결합을 형성시켜 수용액 상으로 생체 내 주사 시 그 자리에서 젤이 형성된 후 젤의 분해기간을 조절할 수 있는 주사제형 하이드로젤을 제조함으로써 지혈제

또는 주사형 약물전달 제형 및 조직공학적 지지체로 응용할 수 있음을 확인하였다.

- [0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 당근 과산화효소의 농도는 0.5 ~ 2 mg, 과산화수소의 농도는 50 ~ 300 mM 농도로 하이드로젤화 시간을 조절한다.
- [0055] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법을 이용하여 제조한 소장점막하조직 하이드로젤을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 담체를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 약물 전달용 담체는 펩타이드, 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 약물을 전달한다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 펩타이드 및 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스틴, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 전달할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항균제는 미노싸이클린, 테트라싸이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시싸이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로모마이신, 마이크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세프트락신, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 선택하여 전달할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소티어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 전달할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항염증제는 아세토아민펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 전달할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 소장점막하조직 하이드로젤은 이중 주입식 주사기 키트(dual syringe kit)를 구성하여 in situ 가교를 형성할 수 있고, 상기 이중 주입식 주사기 키트(dual syringe kit)에 분사 노즐을 결합하여 분사(spray) 가능하게 할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 조직 공학용 지지체로 이용될 수 있다.
- [0064] 상기 소장점막하조직은 ECM 및 사이토카인이 존재하기 때문에 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 줌으로써 조직재생 이외에도 많은 분야에 응용될 수 있다. 예를 들어 연골 재생(cartilage regeneration), 골 재생(bone regeneration), 치주골 재생, 피부재생(skin regeneration), 심근 재생(cardiac tissue regeneration), 인공 수정체(artificial intraocular lens), 척수 신경 재생(spinal cord regeneration), 뇌신경 재생(cranial regeneration), 성대 재생 및 충진제(vocal regeneration and augmentation), 유착 방지막(adhesion barrier), 요실금 치료제(urinary incontinence treatment), 주름 제거(wrinkles removal)용 충진제, 화상 치료제(wound dressing), 조직 충진제(tissue augmentation) 및 척추 추간판 치료제(intervertebral disc treatment)등에 이용될 수 있다.

- [0065] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 소장점막하조직 하이드로젤을 포함하는 지혈제로 이용될 수 있다.
- [0066] 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 1. 실시예
- [0068] (1) 실시예 1: 돼지에서의 소장점막하조직 분리 및 보관
- [0069] 본 발명은 사후 4시간 이내의 돼지의 공장을 추출하여 지방조직을 우선 제거하고, 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 세척한 다음, 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라 다시 식염수에 넣고 세척하였다. 물리적 힘을 가해서 공장의 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 소장점막하조직 층만을 분리하였다. 이를 다시 식염수로 세척하고, -80 °C 급저온 냉각기에 보관하였다.
- [0070] (2) 실시예 2: 소장점막하조직-티라민의 합성
- [0071] 상기 실시예 1의 과정을 거쳐 -80 °C에서 보관한 소장점막하조직을 시트형태로 동결건조 후, 95% 에탄올에 용해시킨 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필카보이미드)(EDC)와 N-히드록시석신이미드(NHS)를 20mM 농도로 가하여 상온에서 반응 시켰다. 반응 시간은 3시간이다. 그 다음 95% 에탄올에 용해된 티라민을 20mM 농도로 가하여 9시간 동안 반응 시켰다.
- [0072] (3) 실시예 3: 소장점막하조직-티라민 분말의 제조
- [0073] 상기 실시예 2의 과정을 거쳐 합성한 티라민-소장점막하조직을 동결건조 후, 동결분쇄기(6700, SPEX Inc., US A)를 이용하여 10~30 μ m 크기의 분말로 제조하였다.
- [0074] (4) 실시예 4: 생체적합성 소장점막하조직-티라민 파우더의 제조
- [0075] 분말 형태를 갖는 소장점막하조직-티라민 1 중량%를 3%의 아세트산과 0.1%의 펩신 및 3차 증류수를 이용하여 상온에서 48시간 동안 교반시켜 주었다. 이 후에 형성된 소장점막하조직-티라민 용액을 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 7.4를 맞추었다. pH를 맞춘 용액을 동결건조 후에 동결분쇄기를 이용해 분쇄시켜 최종 생체적합성 소장점막하조직 파우더를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 최종 파우더를 pH 7.4인 인산완충용액과 섞어 주사제형 가능한 젤이 형성됨을 확인하였다.
- [0076] (5) 실시예 5: 산화중합반응을 이용한 가교 반응
- [0077] 상기 제조된 소장점막하조직-티라민 용액은 생체 내에 주입 시 체액에 의해 쉽게 용해되므로 가교 반응을 통하여 기계적 물성을 향상시킬 수 있다. 산화중합반응은 고분자 사슬간의 가교 결합을 형성시켜 체액에 의해 지지체가 용해되는 것을 억제시켜 생분해기간을 조절할 수 있다.
- [0078] 상기 제조된 소장점막하조직-티라민 파우더를 20 중량%로 인산완충용액에 녹인 후, 용액 A [소장점막하조직-티라민 (20 중량%)과 동량의 HRP를 포함하는 수용액]와 용액 B [소장점막하조직-티라민 (20 중량%)와 동량의 과산화수소를 포함하는 수용액]를 양쪽 주사기를 이용하여 동량 혼합함으로써 가교 젤을 형성시킨다.
- [0079] (6) 실시예 6: 소장점막하 가교 젤의 in vivo 주입
- [0080] 상기 실시예 4에서 제조한 소장점막하조직-티라민 파우더를 에틸렌 옥사이드 가스로 멸균한 후 상기 실시예 5의 형태로 만들어 in vivo 상에서 가교 젤을 형성시켰다. 주입 즉시 생체 내에서 단단하게 젤이 형성됨을 확인하였으며, 형성된 젤을 1주 경과한 시점에 주사부위를 절개하여 젤의 모습을 관찰하였다.(도 5).

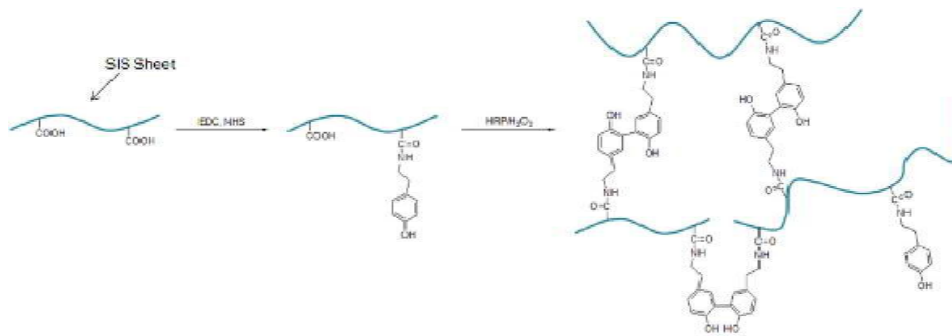
[0081] **2. 비교예**

[0082] (1) 비교예 1: 가교되지 않은 소장점막하조직 파우더의 in vivo 주입

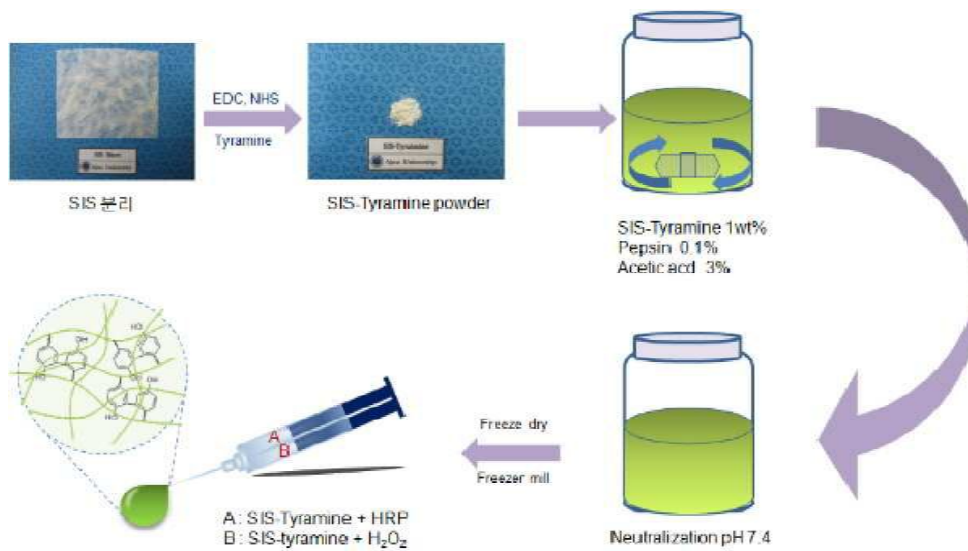
[0083] 상기 실시예 3에서 제조된 소장점막하조직 파우더를 20 중량%를 인산완충용액에 녹여 주사기를 이용해 동물모델 피하에 1 ml 주입하였다.

도면

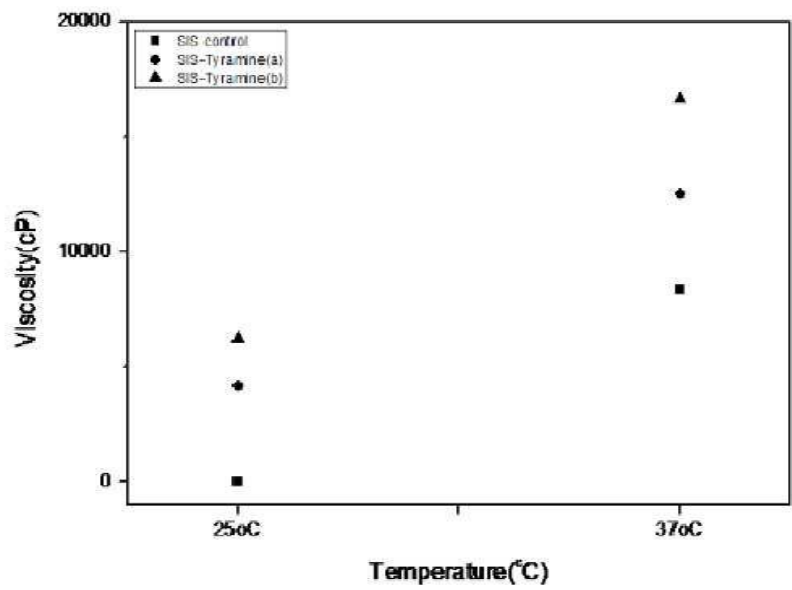
도면1



도면2



도면3



도면4



도면5

