



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0060477
(43) 공개일자 2017년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/70 (2006.01) A61K 38/01 (2006.01)
A61K 47/08 (2006.01) A61K 47/16 (2006.01)
A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/7023 (2013.01)
A61K 38/014 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0164964

(22) 출원일자 2015년11월24일

심사청구일자 2015년11월24일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박찬흠

강원도 춘천시 지석로 67 현진에버빌2차 204동
1302호

김수현

경기도 남양주시 진건읍 독정로 124-9

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 티앤아이

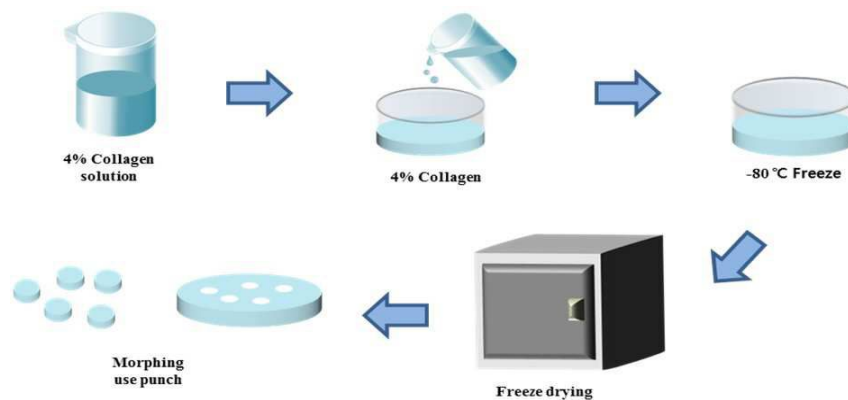
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치

(57) 요약

본 발명은 (1) 오리발을 세척 및 절단하는 단계, (2) 상기 (1)단계를 거친 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 단계, (3) 상기 (2)단계에서 추출된 산가용성 콜라겐을 동결 건조하는 단계, (4) 상기 (3)단계에서 건조된 콜라겐을 산성용액에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조하는 단계, (5) 상기 (4)단계에서 얻어진 콜라겐 용액을 동결하는 단계 및 (6) 상기 (5)단계에서 동결된 콜라겐 용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 제조방법에 따르면 외상 또는 만성질환에 의한 고막천공 환자의 고막재생 시간을 단축할 수 있고, 복원된 고막의 두께가 두껍지 않으면서 복원 경계부위가 깨끗하게 재생되도록 유도할 수 있는 고막재생용 콜라겐 패치를 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 47/08 (2013.01)

A61K 47/16 (2013.01)

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

(72) 발명자

이옥주

강원도 평창군 진부면 오대천로 703-2

주형우

경기도 남양주시 도농로 34 부영아파트1단지 508동 2302호

이정민

경기도 구리시 장자대로 38 금호베스트빌 1차 106동 1802호

문보미

서울특별시 도봉구 마들로 735-8 현대성우아파트 101동 808호

박현정

인천광역시 중구 하늘달빛로 113 우미린 2단지 753동 1501호

박예리

강원도 춘천시 안마산로 214 205동 807호

김동욱

서울특별시 노원구 동일로 1456 주공아파트 712동 1506호

이민채

경기도 구리시 원수택로 6-15 현암아파트 가동 201호

정주연

강원도 춘천시 효석로67번길 23 석사아파트 110동 507호

강길선

대전광역시 유성구 상대남로 26 도안신도시9블록 트리플시티아파트 916동 1401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 814005-03-2-HD030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 기술사업화지원

연구과제명 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.10.15 ~ 2016.10.14

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 오리발을 세척 및 절단하는 단계;
- (2) 상기 (1)단계를 거친 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 단계;
- (3) 상기 (2)단계에서 추출된 산가용성 콜라겐을 동결 건조하는 단계;
- (4) 상기 (3)단계에서 건조된 콜라겐을 산성용액에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조하는 단계;
- (5) 상기 (4)단계에서 얻어진 콜라겐 용액을 동결하는 단계; 및
- (6) 상기 (5)단계에서 동결된 콜라겐 용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (2)단계는,

상기 오리발 절단조직을 산성용액에 투입하여 교반한 후 상층액을 수거하는 1차 수거단계;

상기 1차 수거단계를 거친 상층액을 원심분리한 후 다시 그 상층액을 수거하는 2차 수거단계; 및

상기 2차 수거단계를 거친 상층액을 에탄올에 투입한 후 침전된 콜라겐을 수거하는 3차 수거단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 산성용액은 아세트산, 시트르산 및 포름산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 산성용액의 농도는 1 ~ 10%(w/w) 인 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (3)단계에서 상기 산가용성 콜라겐이 증류수에 분산된 후 동결 건조되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (3) 단계에서 상기 동결 건조는 -40 ~ 10℃의 온도 및 40 ~ 2000 mTorr의 압력 상태에서 12~72시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서 상기 산성용액은 아세트산, 시트르산 및 염산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서 상기 산성용액의 농도는 0.01 ~ 2.0M 인 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서 상기 콜라겐 용액은 2 ~ 6℃의 온도 조건 하에서 제조되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서 얻어지는 콜라겐 용액의 농도는 0.5 ~ 5 w/v%인 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서 상기 산성용액에 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 첨가제를 더 투입하여 용해시키는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 (5)단계에서 동결은 -100 ~ -50℃에서 12 ~ 24시간동안 수행되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 (6) 단계에서 상기 동결건조는 -40 ~ 10℃의 온도 및 40 ~ 2000 mTorr의 압력 상태에서 12 ~ 72시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치는 스폰지 형태의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치의 두께는 80 ~ 200 μ m인 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치를 가교시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 가교에는 제니핀(genipin), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 에틸디메틸아미노프로필카르보다이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 가교제가 사용되는 것을 특징으로 하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법.

청구항 18

상기 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따라 제조된 고막재생용 콜라겐 패치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 오리발로부터 추출된 콜라겐을 동결건조하는 방식을 이용함으로써 고막 환경에 적합한 최적의 물성을 가지며 고막천공에 효과가 높은 고막재생용 콜라겐 패치를 제조하는 방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라겐은 동물에서 다양한 결합조직의 세포 외 공간에 분포하는 주요 구조 단백질이다. 또한, 콜라겐은 우리 몸 속을 이루는 결합 조직의 주성분으로서, 전신 단백질 함량의 25%에서 35%까지 차지하는 포유 동물에서 가장 풍부한 단백질이다. 이러한 콜라겐은 기다란 섬유 형태를 가지며, 주로 힘줄, 인대, 피부 등의 섬유상 조직에서 발견되고, 또한 각막, 연골, 뼈, 혈관, 창자, 추간관 및 치아의 상아질에도 많이 분포한다.

[0003] 콜라겐 단백질은 일반적으로 두 개의 α 체인(α_1 , α_2)과 β 체인으로 이루어져 있으며, 트리플 헬릭스 구조로 구성되어 있다. 콜라겐의 아미노산 조성은 글리신(glycine), 프롤린(proline), 알라닌(alanine), 히드록시프롤린(hydroxyproline), 글루탐산(glutamic acid) 등으로 구성되어 있으며, 그 중에서도 콜라겐에 특이적으로 존재하는 히드록시프롤린이 높은 함량으로 포함되어 있다. 또한, 콜라겐은 형성하는 구조에 따라 여러가지로 분류할 수 있으며, 지금까지 28 종류의 콜라겐이 식별되었다. 이들 중 가장 일반적인 유형은 I, II, III, IV, V형 콜라겐이다. I형 콜라겐은 생체 내에서 가장 많이 부분을 차지하는 콜라겐으로 피부, 힘줄, 혈관, 장기, 뼈의 구성 요소이고, II형 콜라겐은 연골의 주요 콜라겐 성분이고, III형 콜라겐은 그물 구조로 망상형 섬유의 주요 구성 성분이며 일반적으로 I형 콜라겐과 함께 발견된다.

[0004] 일반적으로, 생체의 연령이 증가함에 따라 콜라겐의 체내 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다. 이는 연령이 증가할수록 체내에서 콜라겐을 합성하는 능력이 떨어져 콜라겐이 생성되는 속도가 급격히 감소하기 때문이다. 이러한 영향으로 피부 강도, 탄력성 저하와 같은 노화현상이 생기게 되는데, 이는 생체 내의 콜라겐 감소가 세포의 수분대사 조절에 영향을 주고, 이로 인해 조직의 수분함량이 감소되어 노화가 촉진되기 때문인 것으로 알려져 있다.

[0005] 이러한 이유로 콜라겐은 생체 내에서 굉장히 중요한 역할을 하는 성분으로 알려져 있다. 이 사실에 주목하여 화장품, 인공 관절, 성형 수술, 뼈 이식, 피부 재건 수술, 상처 치료 등 다양한 분야에서 콜라겐에 대한 연구 개발이 진행되고 있다.

[0006] 예컨대, 특허문헌 1(국내 공개특허공보 제10-2008-0114798호)은 소 가죽 등을 이용하여 제조된 콜라겐 분말에 대해 기재하고 있고, 특허문헌 2(국내 공개특허공보 제10-2015-0096566호)에는 돼지피부 유래의 콜라겐 성분을 주요 활성성분으로 포함하는 화장품 조성물의 제조방법에 대해 기재하고 있다.

[0007] 선행문헌들에도 개시된 바와 같이, 대부분의 콜라겐은 소나 돼지로부터 추출되어 산업적으로 이용되어 왔지만,

광우병이나 구제역 발병으로 인한 감염성, 종교적인 신념이나 관습으로 인한 제한성의 문제점을 갖고 있다.

[0008] 한편, 고막은 외이도와 중이강 사이에 위치하며, 가로세로 약 $9 \times 8\text{mm}$, 두께는 약 0.1mm 인 매우 작고 얇은 막으로서 소리에 의해 떨림 작용이 일어나 소리를 증폭시킨 후 이소골에 전달하는 기능을 갖는다. 이러한 고막에는 중이염 등과 같은 만성질환이나 외상 등의 원인에 의해 천공이 발생할 수 있다. 이 경우, 고막의 재생을 촉진시키기 위해 수술방법으로 고막 성형술과 고막 패치술이 사용될 수 있다.

[0009] 상기 고막 성형술은 천공 부위에 기타 연부 조직이나 자가 근막을 이용하여 고막이 재생될 수 있도록 도와주는 방법의 수술이다. 그러나, 연부 조직과 자가 근막을 이용한 수술법은 공여부 수술이 필요하며 염증 및 흉터가 발생할 수 있는 가능성이 있다.

[0010] 상기 고막 패치술은 빠른 기간 내에 합병증 없이 치료 성공률을 높일 수 있는 방법으로, 고막 천공과 주변에 패치가 모두 접촉되도록 대주어 패치를 따라 편평 상피층이 균일하게 잘 재생될 수 있도록 유도한다. 새로 고막을 만들어주는 고막 성형술과 달리, 고막 패치술은 고막 천공 부위에 패치를 부착시킴으로써 고막이 자연적으로 재생되는 것을 유도하는 것으로, 재생된 고막은 패치를 따라 자라게 된다. 그러나, 기존의 고막 패치는 종이 패치를 이용하고 있으나 재생된 고막의 두께, 재생 시간 및 염증 발생 등의 문제가 있어 효율성 및 적합성이 떨어지는 문제점을 갖고 있다.

[0011] 따라서, 이러한 문제점들을 보완하기 위해 고막의 환경에 적합한 최적의 물성을 가지고, 고막천공에 효과가 높은 고막재생용 패치에 대한 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 1020080114798 A
(특허문헌 0002) KR 1020150096566 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 오리발로부터 추출된 콜라겐을 동결 건조함으로써 고막의 환경에 적합한 최적의 물성을 갖는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 외상 또는 만성질환에 의한 고막천공 환자의 고막재생 시간을 단축할 수 있고, 복원된 고막의 두께가 두껍지 않으면서 복원 경계부위가 깨끗하게 재생되도록 유도할 수 있는 고막재생용 콜라겐 패치를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 (1) 오리발을 세척 및 절단하는 단계, (2) 상기 (1)단계를 거친 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 단계, (3) 상기 (2)단계에서 추출된 산가용성 콜라겐을 동결 건조하는 단계, (4) 상기 (3)단계에서 건조된 콜라겐을 산성용액에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조하는 단계, (5) 상기 (4)단계에서 얻어진 콜라겐 용액을 동결하는 단계 및 (6) 상기 (5)단계에서 동결된 콜라겐 용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법을 제공한다.

[0016] 상기 (2)단계는 상기 오리발 절단조직을 산성용액에 투입하여 교반한 후 상층액을 수거하는 1차 수거단계, 상기 1차 수거단계를 거친 상층액을 원심분리한 후 다시 그 상층액을 수거하는 2차 수거단계 및 상기 2차 수거단계를 거친 상층액을 에탄올에 투입한 후 침전된 콜라겐을 수거하는 3차 수거단계를 포함할 수 있으며, 이때 사용되는 상기 산성용액은 아세트산, 시트르산 및 포름산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있고, 상기 산성용액의 농도는 1 ~ 10%(w/w) 인 것이 바람직하다.

[0017] 상기 (3)단계에서 상기 산가용성 콜라겐은 증류수에 분산된 후 동결 건조되는 것이 바람직하며, 이때 상기 동결 건조는 $-40 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 의 온도 및 40 ~ 2000 mTorr의 압력 상태에서 12 ~ 72시간 동안 수행될 수 있다.

[0018] 상기 (4)단계에서 사용되는 상기 산성용액은 아세트산, 시트르산 및 염산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있으며, 상기 산성용액의 농도는 0.01 ~ 2.0M인 것이 바람직하다. 상기 (4)단계에서 상기 콜라겐 용액은 2 ~ 6℃의 온도 조건 하에서 제조될 수 있으며, 이렇게 해서 얻어지는 콜라겐 용액의 농도는 0.5 ~ 5w/v%인 것이 바람직하다. 또한, 상기 (4)단계에서 상기 산성용액에 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 첨가제를 더 투입하여 용해시킬 수 있다.

[0019] 상기 (5)단계에서 동결은 -100 ~ -50℃에서 12 ~ 24시간동안 수행되는 것이 바람직하다.

[0020] 상기 (6) 단계에서 상기 동결건조는 -40 ~ 10℃의 온도 및 40 ~ 2000 mTorr의 압력 상태에서 12 ~ 72시간 동안 수행되는 것이 바람직하다. 상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치는 스폰지 형태의 구조를 가질 수 있고, 상기 콜라겐 패치의 두께는 80 ~ 200μm인 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명에 따른 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법은 상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치를 가교시키는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이때 사용되는 가교제는 제니핀(genipin), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드(1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기한 제조방법에 따라 제조된 고막재생용 콜라겐 패치를 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 고막재생용 콜라겐 패치 제조방법에 따르면, 오리발로부터 산가용성 콜라겐을 추출하고, 동결 건조 방식을 통해 상기 콜라겐을 다공성의 스폰지 형태로 제조함으로써 고막의 환경에 적합한 최적의 물성을 갖는 고막재생용 콜라겐 패치를 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따라 제조된 고막재생용 콜라겐 패치는 외상 또는 만성질환으로 인해 발생하는 고막 천공의 재생 시간을 단축시킬 수 있고, 복원된 고막의 두께가 두껍지 않으면서 복원 경계부위가 깨끗하게 재생되도록 유도할 수 있는바, 고막천공에 대한 효과가 탁월하다.

[0025] 또한, 상기 고막재생용 콜라겐 패치는 생체적합성이 뛰어나므로 염증의 발생이 낮아 사용시 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 실시예에 따라 오리발에서 산가용성 콜라겐을 추출하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 상기 도 1의 과정에 따라 추출된 콜라겐을 이용하여 고막재생용 콜라겐 패치를 제조하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 3은 실시예에 따라 제조된 건조 콜라겐의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다.

도 4는 실시예 및 비교예에 따라 제조된 건조 콜라겐에 대한 분해효소 반응실험 전후의 SDS-PAGE 분석 결과를 비교하여 나타내는 것이다.

도 5는 실시예 및 비교예에 따라 제조된 콜라겐 패치의 그로스(gross) 사진(A, B) 및 SEM 사진(C, D)을 비교하여 나타낸 것이다.

도 6는 오리발 콜라겐 패치 및 돼지 콜라겐 패치의 FT-IR 분석 결과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 오리발 콜라겐 패치(DFC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 물 흡수도를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 오리발 콜라겐 패치(DFC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 팽윤도를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 9는 오리발 콜라겐 패치(DFC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 공극률을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 10은 오리발 콜라겐 패치(DC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 일자별 셀 카운팅 키트-8(cell counting kit-8, CCK-8) 분석 결과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 오리발 콜라겐 패치와 담배 종이 패치의 그로스(gross) 사진을 비교하여 나타낸 것이다.

도 12는 오리발 콜라겐 패치 및 종이패치를 이용하여 각각 고막패치술을 실시한 실험군(collagen) 및 비교군(paper), 그리고 패치 미처리 상태인 대조군(control)의 시술 후 일자별 내시경 사진을 비교하여 나타낸 것이다.

도 13은 오리발 콜라겐 패치 및 종이패치를 이용하여 각각 고막패치술을 실시한 실험군(C) 및 비교군(P), 그리고 패치 미처리 상태인 대조군(X)의 시술 후 일자별 치유된 면적을 비교하여 그래프이다.

도 14는 오리발 콜라겐 패치 및 종이패치를 이용하여 각각 고막패치술을 실시한 실험군(collagen) 및 비교군(paper), 그리고 패치 미처리 상태인 대조군(control)의 시술 후 일자별 고막의 단면 변화를 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치에 관한 것이다.
- [0028] 먼저, 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법에 대해 살펴보면, 상기 제조방법은 (1) 오리발을 세척 및 절단하는 단계; (2) 상기 (1)단계를 거친 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 단계; (3) 상기 (2)단계에서 추출된 산가용성 콜라겐을 동결 건조하는 단계; (4) 상기 (3)단계에서 건조된 콜라겐을 산성용액에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조하는 단계; (5) 상기 (4)단계에서 얻어진 콜라겐 용액을 동결하는 단계; 및 (6) 상기 (5)단계에서 동결된 콜라겐 용액을 동결 건조하는 단계를 포함한다.
- [0029] 구체적으로, 도 1에는 오리발로부터 산가용성 콜라겐이 추출되는 과정이 모식적으로 도시되어 있고, 도 2에는 상기 도 1의 과정에 따라 추출된 콜라겐을 이용하여 고막재생용 콜라겐 패치를 제조하는 과정이 모식적으로 도시되어 있다.
- [0030] 이하, 첨부도면을 이용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법에 대해 상세히 설명한다.
- [0031] (1) 세척 및 절단단계
- [0032] 이 단계는 오리발을 세척 및 절단하는 단계로서, 상기 오리발을 물에 12 ~ 48시간 동안 담가 핏물을 제거하고 흐르는 물에 세척하는 단계, 세척된 상기 오리발을 1mm ~ 5mm 크기로 절단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 이 단계는 상기한 단계들을 거쳐 절단된 오리발 절단조직으로부터 비콜라겐 단백질, 지방 및 불순물 등을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 지방은 0.1 ~ 2.0M 농도의 염기성 용액에 상기 절단조직을 투입하여 2 ~ 6℃에서 12 ~ 48시간동안 교반하는 과정을 통해 제거될 수 있다. 이어서, 상기 지방이 제거된 절단조직을 메탄올과 클로로포름이 3:1 ~ 1:3의 중량비로 혼합된 혼합용액, 아세톤, 에탄올 및 증류수로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용액에서 세척해줌으로써 비콜라겐 단백질이나 기타 불순물들을 제거할 수 있다. 이러한 과정을 통한 비콜라겐 물질의 제거는 콜라겐 제품 순도를 증가시킬 수 있으며, 악취나 부패의 원인을 제거하여 안정성이 향상된 제품을 만들 수 있게 해준다.
- [0034] (2) 산가용성(acid-soluble) 콜라겐의 추출단계
- [0035] 이 단계는 상기(1) 단계를 거친 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 단계로서, 상기 오리발 절단조직을 산성용액에 투입하여 교반한 후 상층액을 수거하는 1차 수거단계, 상기 1차 수거단계를 거친 상층액을 원심분리한 후 다시 그 상층액을 수거하는 2차 수거단계 및 상기 2차 수거단계를 거친 상층액을 에탄올에 투입한 후 침전된 콜라겐을 수거하는 3차 수거단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 이때 사용되는 상기 산성용액은 콜라겐을 용해할 수 있는 유기산이라면 제한없이 포함할 수 있으며, 바람직하게는 아세트산, 시트르산 및 포름산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있고, 이 중에서 시트르산이 더욱 바람직하게 사용될 수 있다. 상기 산성용액의 농도는 1 ~ 10%(w/w)인 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 1차 수거단계에서 상기 교반은 2 ~ 6℃에서 24 ~ 72시간 동안 수행될 수 있고, 상기 2차 수거단계에서 상기 원심분리는 8,000 ~ 16,000rpm의 속도로 2 ~ 6℃에서 10 ~ 30분동안 수행될 수 있으며, 상기 3차 수거단계에서 상기 침전은 2 ~ 6℃에서 24 ~ 72시간 동안 수행될 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 3차 수거단계를 거친 콜라겐 침전물은 그 안에 남아있는 상층액을 완전 제거하기 위해 3,000 ~ 7,000rpm의 속도로 2 ~ 6℃에서 10 ~ 20분동안 2차적으로 원심분리되는 과정을 더 거칠 수 있다.
- [0039] 상기와 같이 상층액이 완전히 제거된 콜라겐 침전물은 산에 용해될 수 있는 콜라겐, 즉 산가용성 콜라겐이며, 이러한 과정을 거쳐 오리발 결합조직으로부터 추출된 산가용성 콜라겐은 후술될 (3) 콜라겐 동결건조단계로 진행된다.

[0040] (3) 콜라겐 동결건조 단계

[0041] 이 단계는 상기 (2)단계를 거쳐 오리 결합조직으로부터 추출된 산가용성 콜라겐을 동결건조하여 건조된 콜라겐을 수득하는 단계이다. 이때, 상기 산가용성 콜라겐은 증류수에 분산된 후 동결 건조될 수 있다. 이때, 상기 동결 건조는 $-40 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 의 온도 및 $40 \sim 2000 \text{ mTorr}$ 의 압력 상태에서 12~72시간 동안 수행될 수 있다. 여기서, 동결 건조란 물질을 동결시키고, 수증기의 부분압을 낮춰 얼음을 직접 증기로 만드는 승화에 의해 얻어지는 건조방식의 일종이다. 이때, 부분압을 낮춘다는 것은 물의 3중점 이하로 압력을 낮춘다는 것을 의미하는 것으로, 낮은 압력에서 얼음 형태인 수분은 열 에너지를 공급해 액체로 변하는 것이 아니라 수증기로 직접 승화한다. 따라서, 승화된 얼음 결정체들이 공간을 남기기 때문에, 건조된 물질은 무수히 많은 틈을 가져, 수분 흡수가 용이해 재수화(re-hydration) 시 완전하게 재용해(re-resolution)될 수 있다.

[0042] (4) 콜라겐 용액 제조단계

[0043] 이 단계는 상기 (3)단계에서 건조된 콜라겐을 산성용액에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조하는 단계이다.

[0044] 상기 산성용액은 콜라겐을 용해할 수 있는 유기산이라면 제한없이 포함할 수 있으며, 바람직하게는 아세트산, 시트르산 및 염산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있고, 이 중에서 아세트산이 더욱 바람직하게 사용될 수 있다. 여기서, 산성용액은 산 성분(아세트산, 시트르산 또는 염산)이 증류수에 용해된 용액을 말하는 것으로, 상기 산성용액의 농도는 $0.01 \sim 2.0\text{M}$ 인 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 제조방법에 따라 제조되는 콜라겐 패치는 다수의 기공이 존재하는 스펀지 형상의 구조를 갖는 것으로, 상기 산성용액을 사용하여 pH를 조정된 콜라겐 희석용액을 사용하여 제조된다. 구체적으로, 상기 농도 범위를 갖는 산성용액을 사용하여 콜라겐 용액의 pH를 2 ~ 4 정도로 조정함으로써, 최종적으로 얻어지는 스펀지 형상을 갖는 콜라겐 패치의 크랙이나 균열의 발생을 억제하여, 생산성을 향상시킬 수 있다. 특히, 상기 산성용액으로서 아세트산을 사용할 경우에는, 발포 조작과 같은 별도의 공정없이 그대로 동결하여 동결 건조시켜도 균일한 기공 직경을 갖는 콜라겐 패치가 얻어지기 때문에, 기계적 물성이 우수하고 크랙이나 균열의 발생이 더욱 억제될 수 있어 바람직하다.

[0046] 이 단계에서 상기 콜라겐 용액은 $2 \sim 6^{\circ}\text{C}$ 의 온도 조건 하에서 제조되는 것이 바람직하며, 이렇게 해서 얻어지는 콜라겐 용액의 농도는 $0.5 \sim 5\text{w/v\%}$ 인 것이 바람직하다. 상기 콜라겐 용액의 제조 온도 및 농도 등을 상기한 범위 내에서 조절함으로써 고막재생용 패치의 두께를 적정범위로 조절할 수 있다. 구체적으로, 천공 고막과의 접촉성이나 기계적 강도 등을 고려했을 때, 상기 패치의 두께는 $80 \sim 200\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.

[0047] 또한, 상기 콜라겐 용액은 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 최종적으로 제조되는 고막재생용 콜라겐 패치를 건조상태에서 다루기 쉽게 하기 위하여 첨가되는 것으로, 이 단계에서 건조된 콜라겐과 함께 상기 산성용액에 투입되어 용해됨으로써 콜라겐 용액에 포함될 수 있다.

[0048] (5) 콜라겐 용액 동결 단계

[0049] 이 단계에는 상기 (4)단계에서 얻어진 콜라겐 용액을 동결시키는 단계이다. 이러한 동결 과정을 통해 콜라겐 용액 내에 있는 물을 동결시켜 얼음결정을 형성시키고, 후술할 (6)동결건조단계를 통해 상기 동결된 얼음결정을 진공상태 하에서 액체 상태를 거치지 않고 승화(건조)시킴으로써 다공성 형태의 콜라겐 패치를 얻을 수 있다.

[0050] 상기 동결 방법으로서 급속 동결방법, 즉 액체 질소를 이용하여 초저온(-180°C 이하) 하에서 동결시킴으로써 콜라겐 용액이 동결되는 속도를 최소화하여 균일하게 동결되도록 유도하는 방법을 사용할 수 있지만, 일정 크기 이상의 기공확보가 어렵고, 또한 형성될 수 있는 기공의 크기에 제약이 따르는 단점이 있다. 따라서, 본 발명에서는 콜라겐 용액을 동결시킬 때 냉각 온도를 일정하게 조절하여 천천히 동결시켜, 기공의 크기를 최대화하면서 균일한 기공구조를 얻는 방법을 사용하였다. 이러한 점들을 고려하여 본 발명에서 동결은 $-100 \sim -50^{\circ}\text{C}$ 에서 12 ~ 24시간동안 수행될 수 있다.

[0051] (6) 동결건조단계

[0052] 이 단계는 상기 (5)단계에서 동결된 콜라겐 용액을 동결 건조하는 단계이다.

[0053] 상기 동결 건조(freeze-drying)를 통해 동결된 콜라겐 용액 내 존재하는 수분이 기체 상태의 증기로 승화되고, 용매가 빠져나간 자리에 기공이 형성되어 가벼운 스펀지 형태의 콜라겐 패치가 얻어진다. 또한, 동결 건조를 통해 용매가 제거되기 때문에 콜라겐 성상의 물리적, 화학적 변화가 극도로 작고, 건조에 의한 수축현상이나, 형

태의 변화가 거의 발생하지 않는다. 또한 콜라겐 천연의 조직구조가 파괴되지 않고, 다공질 상태로 존재한다.

- [0054] 이러한 동결건조는 $-40 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 의 온도 및 $40 \sim 2000 \text{ mTorr}$ 의 압력 상태에서 12 ~ 72시간 동안 방치하여 수행될 수 있다. 상기 동결 건조 조건은 콜라겐 패치 베이스의 품질에 큰 영향을 미치므로 이의 조절에 세심한 주의가 요구된다. 대표적으로 동결 건조시 그 속도가 빠르면 콜라겐 패치 베이스 내 형성되는 기공의 직경이 작아지므로 냉각 처리 조건을 세심히 조절해야 한다.
- [0055] 상기한 방법에 의해 기공이 있으며, 유연성이 있는 스폰지 형태의 구조를 갖는 고막재생용 콜라겐 패치가 제조될 수 있다. 이러한 콜라겐 패치는 사용의 편의를 위해 시트 모양으로 성형하거나 고막의 형상에 맞춰 성형하여 사용할 수 있다.
- [0056] 이렇게 제조된 고막재생용 콜라겐 패치의 두께는, 상기 패치와 천공 고막의 접촉성이나 상기 패치의 기계적 강도 등을 고려하였을 때 $80 \sim 200\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.
- [0057] 본 발명에 따른 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법은 상기 (6)단계를 거쳐 제조되는 콜라겐 패치를 가교시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 가교 반응은 동결건조된 콜라겐 패치가 고막재생용 패치로서의 역할을 수행할 수 있도록 하기 위하여, 체내에서의 분해 내성을 유지할 수 있는 견고함을 부여하기 위해 수행된다. 상기 가교 반응은 당업계에 알려진 다양한 방법, 예를 들면, 물리적 또는 화학적 가교방법을 통해 달성될 수 있다. 물리적 가교방법은 진공 가온 방법(Dehydrothermal treatment)을 포함하며, 예를 들어, 진공 하에서 $90^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$ 로 가열한 후, 10 ~ 48시간 동안 유지시킴으로써 수행할 수 있다. 한편, 화학적 가교방법은 가교제를 이용하는 방법을 포함하며, 예를 들어, 가교제로서, 반응에 참여한 후 콜라겐 패치에 결합되지 않고 세척과정 중에 모두 제거되는 제니핀(genipin), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0058] 한편, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조된 고막재생용 콜라겐 패치를 제공한다.
- [0059] 본 발명에 따른 고막재생용 콜라겐 패치는 고막 패치술에 사용되는 것으로, 상기 고막 패치술은 외상에 의해 고막이 뚫어진 경우나 염증 등의 원인에 의해 고막 천공이 있는 상태에서 고막 재생을 촉진하기 위해 시행되는 수술 방법 중 하나이다. 이러한 고막패치술은 고막 천공 변연부가 모두 접촉되도록 패치를 대어줌으로써 편평 상피층이 패치를 따라 잘 재생되도록 유도하여 빠른 기간 내에 합병증 없이 치료 성공률을 높이는 것이 관건이라 할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 고막재생용 콜라겐 패치는, 상기 패치를 통해 신생혈관 생성 전까지의 기간 동안 확산에 의한 물질 수송이 이루어질 수 있을 정도의 높은 흡수율을 가지고 있고, 이와 동시에 최적의 확산상태를 유지할 수 있을 정도의 두께를 가지고 있다. 또한, 상기 콜라겐 패치는 고막의 천공 변연부에 적용 후 신생진피의 형성을 위하여 주변의 세포가 들어와서 증식 및 분화할 수 있는 기공의 크기를 가지고 있고, 이동된 섬유아세포에 원활한 영양 공급을 위한 신생혈관 형성이 용이하게 하기 위하여 인접된 기공들 간의 혈관 및 물질 수송이 이루어질 수 있는 연결통로를 가지고 있어 고막재생용 패치로서 적합하게 사용될 수 있다.
- [0061] 이하, 실시예들을 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명이 이러한 실시예들에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 실시예
- [0063] < 산가용성 콜라겐 제조 >
- [0064] 도 1을 참조하여 산가용성 콜라겐 제조방법을 살펴보면 하기와 같다.
- [0065] 먼저, 오리발을 수돗물에 하루 동안 담가 핏물을 제거하고 세척하고, 세척된 상기 오리발을 1~5mm 크기로 절단하여 원료로 사용하였다.
- [0066] 상기 오리발의 절단조직으로부터 비콜라겐 단백질, 지방 및 불순물을 제거한다. 이를 위해 상기 절단조직을 0.5M NaOH 용액에 넣고 4°C 에서 24시간 동안 교반하여 지방을 제거하는 과정을 거친다. 상기 지방이 제거된 절단조직을 메탄올과 클로로포름이 3:1의 부피비로 혼합된 용액, 아세톤, 70%(w/w) 에탄올 및 증류수에서 순차적으로 세척하여 오리발 절단조직에 남아 있는 비콜라겐 단백질 및 불순물들을 제거한다.
- [0067] 그런 다음, 상기 절단 조직으로부터 산가용성 콜라겐을 얻기 위하여, 상기 절단조직을 5%(w/w) 시트르산(citric acid) 용액에 넣어 4°C 에서 48시간 동안 교반한 뒤 상층액만 수거하는 1차 수거단계를 거친다. 이때, 상기 시트

르산 용액은 상기 절단조직의 4 배의 부피비로 사용되었다. 이어서, 상기 1차 수거단계를 거친 상층액을 12,000rpm 속도로 4℃에서 15분동안 원심분리하여 상층액을 수거하는 2차 수거단계를 거친다. 이어서, 상기 2차 수거단계를 거친 상층액을 100%(w/w) 에탄올 용액에 부어 4℃에서 48시간 동안 침전시킨 후, 상층액을 제거하고 침전된 콜라겐을 수거하는 3차 수거단계를 거친다. 이어서, 상기 3차 수거단계를 거친 침전물에 남아있는 상층액을 완전히 제거하기 위해 3,500rpm의 속도로 4℃에서 5분 동안 원심분리한다. 이와 같이 상기 침전물로부터 상층액을 완전히 제거하는 과정을 거쳐 오리발 절단조직으로부터 산가용성 콜라겐을 추출하는 과정을 완료하였다.

[0068] 이렇게 추출된 산가용성 콜라겐을 증류수에 분산시킨 뒤, 동결건조기(FDUT-6002; 오펜론, 한국)를 이용하여 -37℃에서 48시간 동안 압력이 60 mtorr 이하로 내려갈 때까지 동결 건조하여 건조된 콜라겐(이하, "오리발 콜라겐"이라 함)을 얻었다.

[0069] < 고막재생용 콜라겐 패치 제조>

[0070] 도 2를 참조하여 고막재생용 콜라겐 패치 제조방법을 살펴보면 하기와 같다.

[0071] 상기 건조된 산가용성 콜라겐을 0.5M 아세트산 용액에 용해시켜 4%(w/v)의 콜라겐 용액으로 제작한다.

[0072] 상기 콜라겐 용액을 페트리 접시(petri dish)에 넣은 후, -80℃에서 12시간 동안 동결한다.

[0073] 완전히 동결된 콜라겐 용액을 동결건조기(FDUT-6002; 오펜론, 한국)를 이용하여 -37℃에서 48시간 동안 압력이 60 mtorr 이하로 내려갈 때까지 동결 건조하여 용액 내의 수분을 제거하여 스펀지 형태의 콜라겐 패치(이하, "오리발 콜라겐 패치"라 함)를 얻었다.

[0074] 비교예

[0075] 상기 오리발 대신에 (주)세원셀론텍에서 제공받은 돼지 피부 콜라겐을 사용하여, 상기 실시예와 동일한 방법으로 콜라겐 패치(이하, "돼지 콜라겐 패치"라 함)를 제조하였다.

[0076] 평가방법

[0077] 1. 콜라겐 조성분석

[0078] 상기 실시예에 따라 제조된 오리발 콜라겐(DC; Duck's foot collagen)의 조성을 알아보기 위하여 8%겔을 이용하여 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) 분석을 실시하고, 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0079] 도 3을 살펴보면, 오리발 콜라겐의 분석결과, 분자량 130kDa, 110kDa인 두 개의 α -chain($\alpha 1$, $\alpha 2$)과 분자량 235kDa인 하나의 β -chain이 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 이는 콜라겐의 종류 중 생체 내에서 가장 많이 부분을 차지하며 피부, 힘줄, 혈관, 장기, 뼈의 구성요소가 되는 Type I 콜라겐과 유사한 것으로, 오리발 콜라겐의 조성이 Type I 콜라겐의 조성과 유사하다는 것을 알 수 있다.

[0080] 2. 콜라겐 분해효소 반응 테스트

[0081] 콜라겐 분해효소에만 특이적으로 반응을 하는 콜라겐의 특성을 확인하기 위하여, 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 콜라겐 분해효소에 대한 반응 시험을 시행하였다. 구체적으로, 각각의 콜라겐에 콜라게나아제(collagenase)를 1시간 동안 반응시키고, 8%겔을 이용하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 그리고, 도 4에 오리발 콜라겐 및 돼지 콜라겐에 대한 분해효소 반응실험 전후의 SDS-PAGE 분석 결과를 비교하여 나타내었다.

[0082] 도 4를 살펴보면, 콜라게나아제로 처리하지 않은 군(1, 2)에선 콜라겐 Type I 밴드가 정상적으로 나타났고, 콜라게나아제로 처리한 군(3, 4)에선 콜라겐 Type I 밴드가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 이로부터 돼지 콜라겐과 마찬가지로, 오리발 콜라겐도 콜라게나아제에 의해 분해되는 콜라겐 특유의 성질을 가지고 있음을 알 수 있다.

[0083] 3. SEM 분석

[0084] 상기 실시예에 따라 제조된 오리발 콜라겐 패치와 비교예에 따라 제조된 돼지 콜라겐 패치의 구조를 확인하기 위하여 주사 전자 현미경(제조사: Hitachi, Tokyo, Japan, 모델명: S-3500N)을 이용하여 단면을 관찰을 하였다. 도 5에 도시된 A 및 B는 각각 오리발 콜라겐 패치 및 돼지 콜라겐 패치의 그로스(gross) 사진을 나타내고, C 및 D는 각각 오리발 콜라겐 패치 및 돼지 콜라겐 패치의 SEM 사진을 나타낸다.

- [0085] 도 5의 C 및 D를 살펴보면, 두 가지 콜라겐 패치 모두 입체적으로 상호 연결된 다공성 구조를 갖고 있는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 다공성 구조의 패치는 고막 재생 시 세포간 물질대사 및 가스교환이 용이하여 고막 천공 재생을 위한 패치로써 적합한 조건을 가진다.
- [0086] 4. FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 분석
- [0087] 상기 방법으로 제작된 오리발 콜라겐 패치 및 돼지 콜라겐 패치의 구조분석을 하기 위하여 FT-IR 측정 장치(제조사: Perkin Elmer, UK모델명: Frontier)를 이용하여 정성분석을 수행하였고, 그 결과를 도 6에 도시하였다.
- [0088] 도 6에 도시된 FT-IR스펙트럼을 살펴보면, 오리발 콜라겐 패치에서는 3292cm^{-1} 에서 Amide A, 1628cm^{-1} 에서 Amide, 1555cm^{-1} 에서 Amide, 1233cm^{-1} 에서 Amide 피크 값을 나타내었다. 그리고, 돼지 콜라겐 패치에서는 3316cm^{-1} 에서 Amide A, 1634cm^{-1} 에서 Amide, 1550cm^{-1} 에서 Amide, 1237cm^{-1} 에서 Amide 피크 값을 나타내었다. 상기 분석결과 오리발 콜라겐 패치와 돼지 콜라겐 패치는 Amide A, I, II, III의 유사한 피크 값을 갖는다는 것을 확인할 수 있다.
- [0089] 5. 물 흡수도(water uptake) 및 팽윤도(swelling ratio) 평가
- [0090] 상기 방법으로 제작된 오리발 콜라겐 패치(DFC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 물 흡수도와 팽윤도를 확인하기 위해, 각각의 패치를 지름 8mm 크기로 펀칭하여 증류수에 1시간 동안 침지시켜 물 흡수도와 팽윤도를 측정하였다. 상기 물 흡수도 및 팽윤도는 각각 하기의 식 (1) 및 (2)으로 계산하였고, 그 결과를 도 7 및 도 8에 도시하였다.
- [0091]
$$\text{Water uptake (\%)} = (W_s - W_d) / W_d \times 100 \cdots (1)$$
- [0092]
$$\text{Swelling ratio} = (W_s - W_d) / W_d \cdots (2)$$
- [0093] 단, 상기 식 (1) 및 (2)에서 W_s : 젖은 상태의 패치 무게, W_d 는 건조 상태의 패치 무게를 나타낸다.
- [0094] 상기 도 7을 살펴보면, 오리발 콜라겐 패치(DFC)와 돼지 콜라겐 패치(PC) 모두 95% 이상의 물 흡수도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 또한 도 8을 살펴보면, 두 패치 모두에서 높은 팽윤도를 나타내었다. 이러한 결과로부터 오리발 콜라겐 패치(DFC)가 돼지 콜라겐 패치(PC)와 유사하게 우수한 친수성을 가진다는 것을 알 수 있다.
- [0095] 6. 공극률(porosity)
- [0096] 상기 방법으로 제작된 오리발 콜라겐 패치(DFC) 및 돼지 콜라겐 패치(PC)의 공극률은 액체 치환법(liquid displacement process)을 이용하여 측정하였다. 이때, 에탄올을 변위 액체로 사용하였다. 각각 동일한 부피의 에탄올(V_1)에 오리발 콜라겐 패치와 돼지 콜라겐 패치를 10분동안 침지시켰다. 각각의 패치가 침지된 에탄올의 총 부피(V_2)를 측정하였다. 이후, 에탄올에 침지된 각 패치를 제거한 후 잔류 에탄올의 부피(V_3)를 측정하였다. 각 패치의 공극률(P)은 아래와 같은 식으로 계산하였고, 그 결과를 도 9에 도시하였다.
- [0097]
$$P(\%) = [(V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)] \times 100$$
- [0098] 도 9를 살펴보면, 돼지 콜라겐 패치(PC)는 88%, 오리발 콜라겐 패치(DFC)는 68%의 공극률을 나타내는 것을 확인할 수 있는바, 오리발 콜라겐 패치(DFC)의 경우 돼지 콜라겐 패치(PC) 보다 공극률이 낮은 것을 알 수 있다.
- [0099] 7. 세포 독성 실험 (CCK-8 assay)
- [0100] 상기 방법으로 제작된 오리발 콜라겐 패치 및 돼지 콜라겐 패치의 세포 생존율 및 독성 테스트하기 위하여 셀 카운팅 키트-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8) 분석을 시행하였다. 상기 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐 패치는 지름 6mm로 제작하여 멸균 후 96well에 넣었고, NIH 3T3 세포를 사용하였다. 각 패치에 상기 세포를 파종하여 7일 동안 관찰하였고, 1, 5, 7일째의 분석 결과를 도 10에 도시하였다.
- [0101] 도 10을 살펴보면, 각 기간에 따라 증식되는 세포의 수가 증가됨을 확인할 수 있고, 이로써 각 패치에 세포독성이 없음을 알 수 있다. 아울러, 오리발 콜라겐 패치(DC)의 경우 세포 증식률이 우수한 것을 확인할 수 있다. 도 10에 표시된 Con에 해당되는 데이터는 96well에 패치를 넣지 않은 상태에서 NIH 3T3 세포를 파종하여 CCK-8 assay를 실시한 것으로, 오리발 콜라겐 패치와 돼지 콜라겐 패치의 세포증식효과에 대한 기준을 삼기 위한 데이터이다.

[0102] 8. 동물실험

[0103] 상기 평가방법 3 내지 7에 따른 분석결과, 본 발명에 따라 제조된 오리발 콜라겐 패치의 우수한 생체적합성과 물성이 확인되었으며, 기존에 주로 사용되어 왔던 돼지 콜라겐 패치와의 비교를 통해 오리발 콜라겐도 콜라겐으로서의 특성을 갖추고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 본 발명에 따른 오리발 콜라겐 패치가 고막재생용 콜라겐 패치로서 적합하다는 것을 확인할 수 있다. 이에, 실시예에 따라 제작된 오리발 콜라겐 패치의 고막 재생 효과를 확인하기 위하여, 임상에서 사용되고 있는 담배 종이와 함께 비교실험을 시행하였다. 도 11에는 본 발명에 따라 제조된 오리발 콜라겐 패치(좌)와 종이패치(우)의 사진이 도시되어 있고, 상기 비교 실험은 쥐(rats) 고막 천공 모델을 이용하여 다음과 같이 시행되었다.

[0104] 구체적으로, 본 발명에 따라 제작된 오리발 콜라겐 패치의 고막 재생 효과를 확인하기 위하여, 상기 도 11에 도시된 각각의 패치를 고막 천공 모델에 부착하는 동물실험을 시행하였다. 실험동물로서는 실험용 쥐(SD-Rat, 수컷 8주령)를 사용하였으며, 벤틸레이터를 이용해 호흡 마취하였다. 이때, 마취제는 이소플루란스(isoflurance)를 사용하였으며, 그 용량은 초기 마취시 4%, 유지시 2.5%로 하였다. 소독을 마친 끝이 등근 니들로 상기 실험용 쥐의 고막에 천공을 유발하였다. 이후, 천공 유발부위에 멸균된 오리발 콜라겐 패치와 종이 패치를 부착하는 수술을 진행하였다. 수술이 완료된 쥐는 14일 동안 사육하며, 매일 한번씩 내시경 카메라로 관찰하며 사진 촬영을 하였다.

[0105] 도 12에는 수술 후 1, 3, 7, 14일 차에 촬영된 쥐의 고막 천공부위 사진이 도시되어 있으며, 구체적으로 대조군(control)은 패치를 고막 천공 유발부위에 부착하지 않은 경우, 실험군(collagen)은 본 발명에 따라 제조된 오리발 콜라겐 패치를 고막 천공 유발부위에 부착한 경우, 비교군(paper)은 담배 종이를 고막천공 유발 부위에 고막 천공 유발부위에 부착한 경우를 나타낸다. 도 12를 살펴보면, 육안적 관찰 결과 오리발 콜라겐 패치가 담배 종이 패치에 비해 고막 천공 유발부위에 잘 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 9. 고막 천공 모델의 치유 면적 측정

[0107] 상기 도 12에 도시된 1, 3, 7, 14일 차의 고막 천공부위 사진을 이용하여 대조군, 실험군 및 비교군의 치유 효과를 분석하였다. 각각의 경우에 따른 천공 치유효과를 분석하기 위하여, 토탈 이미징 솔루션(Total Imaging Solution) 소프트웨어 InnerView™ Series(ALL RIGHTS RESERVED BY INNERVIEW Co., Ltd.)를 이용하여 천공 부위의 면적을 측정하였다. 상기 방법으로 측정한 고막 천공의 치유 면적을 백분율로 계산하여 도 13에 도시하였다.

[0108] 도 13을 살펴보면, 3일차에서 패치를 부착시키지 않은 대조군(X)은 16.58%, 오리발 콜라겐 패치로 처리한 실험군(C)은 44.48%, 종이 패치로 처리한 비교군(P)은 28.32%의 천공 치유효과를 나타내었다. 이로써, 오리발 콜라겐 패치의 천공 치유 능력이 다른 군들에 비해 빠르고 높은 것을 확인할 수 있다.

[0109] 10. 고막 천공 모델의 조직학적 관찰

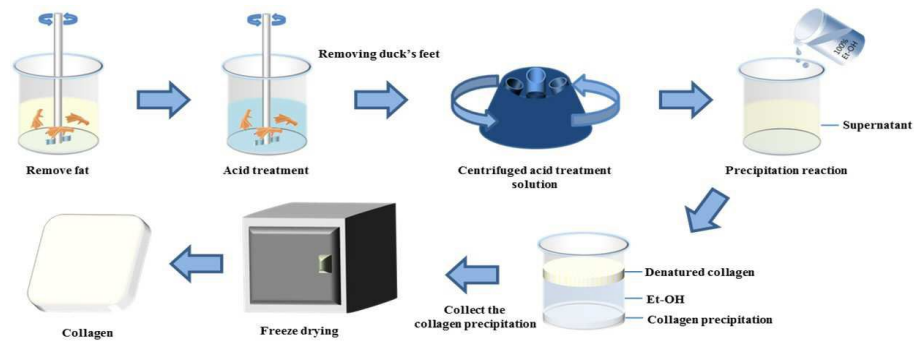
[0110] 상기 평가방법 8에 따른 방법으로 수술 후 1, 3, 7, 14일 차에 고막 천공 모델 조직을 실험용 쥐로부터 적출하여, 헤마톡실린 & 에오신(Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색을 통해 조직학적 관찰을 실시하였다. 이때, 상기 조직은 위상차현미경(Nikon Eclips 80i, Nikon, Japan)을 이용하여 촬영하였고, 그 결과를 도 14에 도시하였다.

[0111] 도 14를 살펴보면, 오리발 콜라겐 패치로 처리한 실험군(collagen)의 경우 종이 패치를 사용한 비교군(Paper)보다 재생된 고막의 두께가 대체적으로 얇은 것을 확인할 수 있다. 고막은 피부층(외측), 고유층, 점막층(내측)의 3층으로 구성되어 있는데, 실험군(collagen)의 경우 이 3층이 균일하게 구성되어 있는 것을 확인할 수 있는 반면, 비교군(Paper)의 경우 3층의 구성이 불균일하며 두꺼운 것을 관찰할 수 있다. 이러한 결과는, 오리발 콜라겐 패치의 경우 종이 패치에 비해 고막에 잘 부착되어 있거나 인접하여 고막 치유에 효과가 높다는 것을 입증한다.

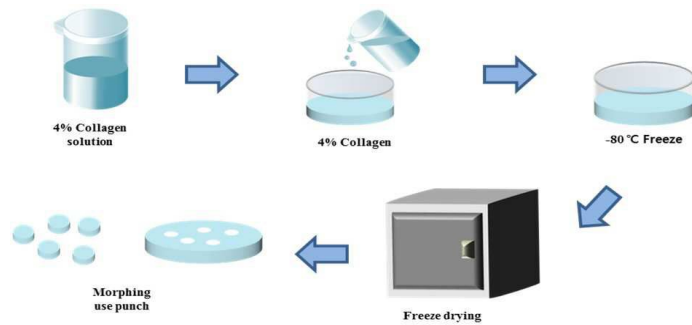
[0112] 이상, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 권리범위는 아래의 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하며 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

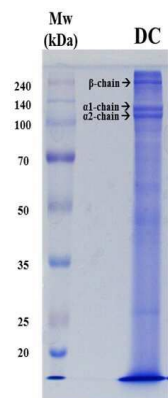
도면1



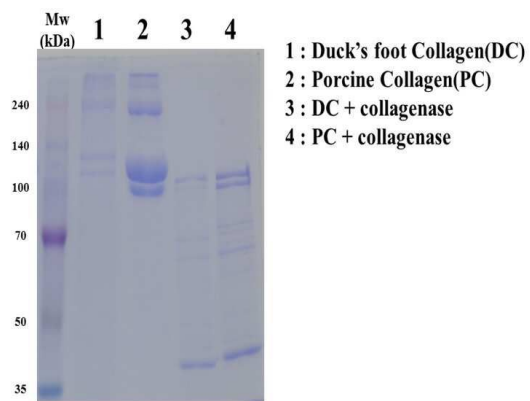
도면2



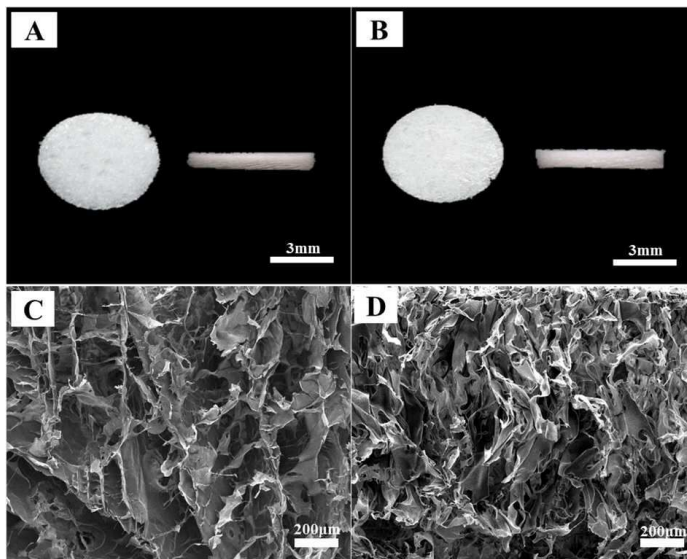
도면3



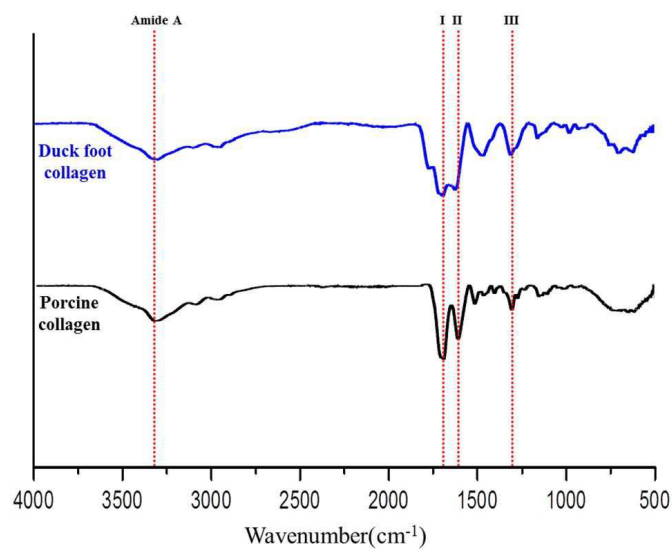
도면4



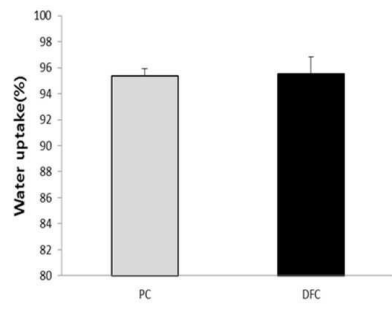
도면5



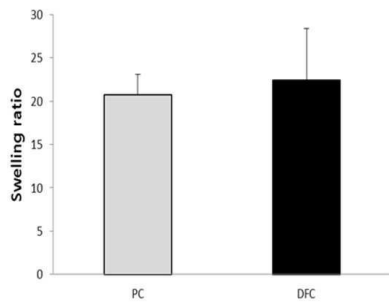
도면6



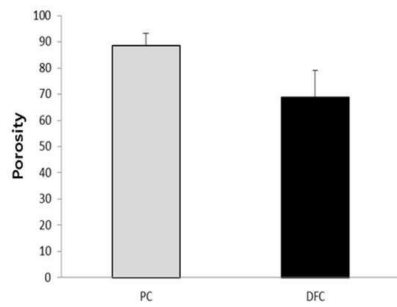
도면7



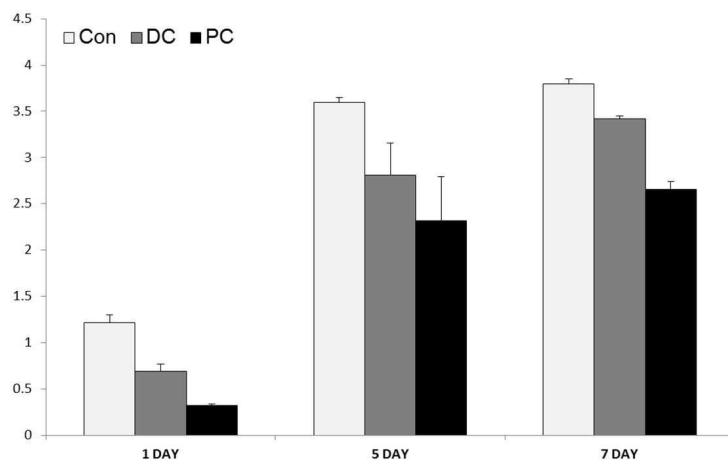
도면8



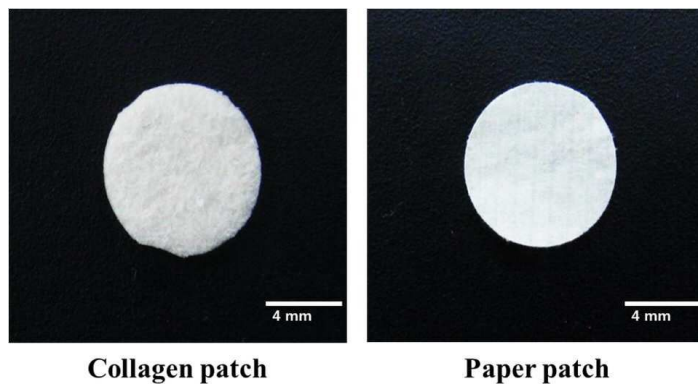
도면9



도면10



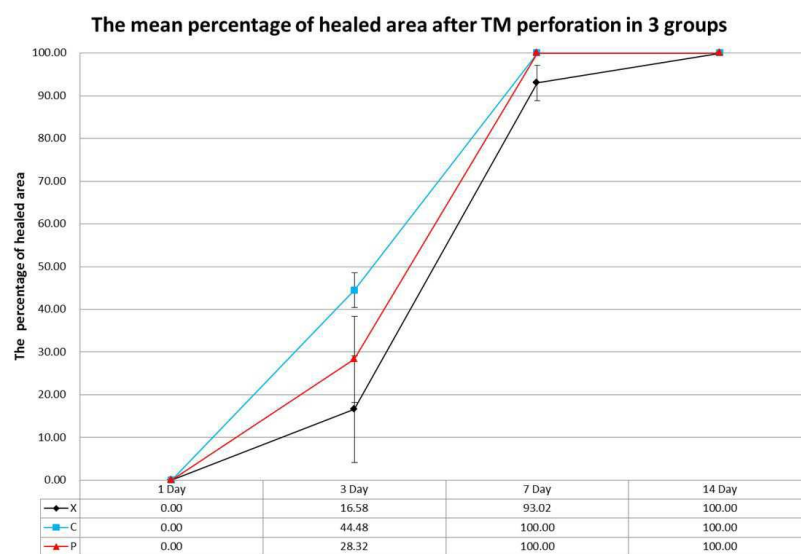
도면11



도면12



도면13



도면14

