



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0101218
(43) 공개일자 2025년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0192623

(22) 출원일자 2023년12월27일

심사청구일자 2023년12월27일

(71) 출원인

주식회사 도프

경기도 화성시 동탄순환대로 830, 1810-1817호(영천동, 에스케이브이원센터)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

신용우

경기도 화성시 동탄순환대로21길 53, 1305동 2402호(청계동, 동탄역 롯데캐슬알바트로스)

한정훈

서울시 은평구 서오릉로21길 33, 한주팰리스 501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)선정

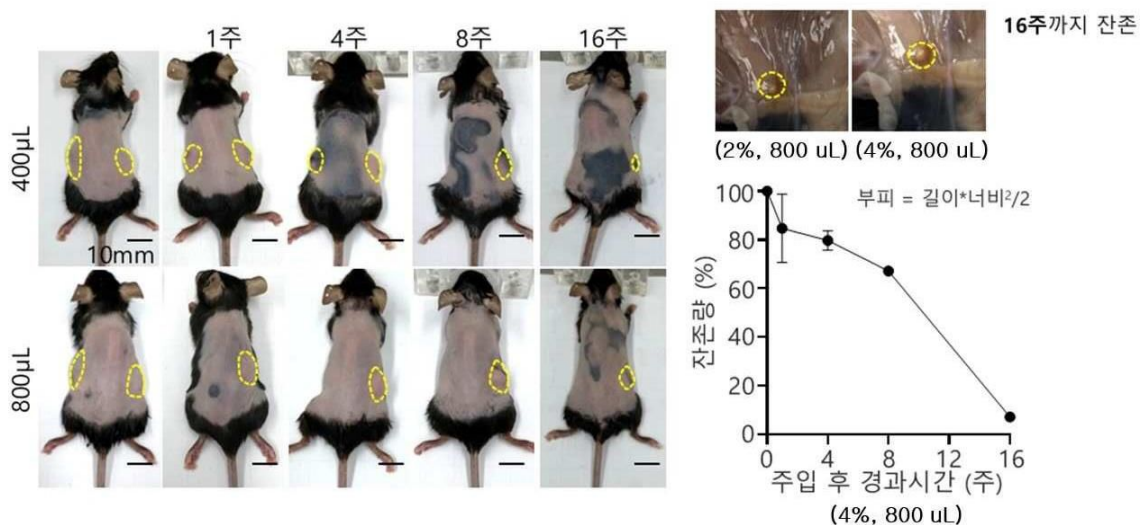
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 하이드로젤을 포함하는 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 기반의 하이드로젤 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 초임계 유체 추출 공정을 이용하여 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로젤, 이를 포함하는 의료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상기 세포외기질 기반의 하이드로젤은 생체안정성 및 생체적합성이 우수하며, 세포외기질의 구성 성분 및 성장 인자의 보존 정도가 현저하게 우수한 이점을 지니고 있다. 뿐만 아니라, 생체적합성 고분자와의 가교를 통해 인체 적용 후 오랜 기간 볼륨감을 형성할 수 있고, 겔 형상에 대한 우수한 유지력 및 지속력을 나타낸다. 이에 따라, 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로젤은 사고에 의한 외상, 궤양 등과 같은 조직 결손 부위의 조직 수복, 주름 개선, 피부 볼륨 증가 등을 위한 필러 용도 등 재생의학 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61L 27/22 (2013.01)
A61L 27/3687 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 2300/412 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

이두리
 경기도 화성시 동탄대로 24가길 30 한양수자인 13
 8동 1405호
노성래
 경기도 화성시 동탄대로 469-12 201동 602호
이주아
 경기도 화성시 동탄치동천로2길 4-7 301호
황석연
 서울시 서초구 효령로 84 (대우효령아파트) 103동
 703호
소경하
 서울시 관악구 인천 13길 49 (더 바움) 103동 401
 호

송원문

서울시 광진구 뚝섬로 35길 32 (자양우성3차) 303
 동 1003호

정해인

강원도 화천군 하남면 논미로 347-11

김현정

경기도 용인시 수지구 성북2로 126 (엘지빌리지3
 차) 313동 601호

홍준표

서울시 강남구 선릉로 120 개포1,2차 우성아파트
 9동 502호

서현석

서울시 송파구 잠실로 62 트리지움아파트 337동
 2602호

박창식

서울시 강남구 압구정로 151 현대아파트 208동 80
 1호

정형화

서울시 성동구 성수이로 137 성수동아이파크 104동
 1502호

조정목

서울시 강동구 풍성로 114-1 성안마을청구 102동
 1608호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180197
과제번호	20016553
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	소재부품기술개발사업
연구과제명	300ml 이상의 대용량 주입형 생체조직유래 하이브리드 조직수복제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 도프, 서울대학교, 서울아산병원, 한국건설환경시험연구원
연구기간	2021.06.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 히알루론산, 황산화 히알루론산, 키토산, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 히알루론산을 포함하는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 4

제1항에 있어서,

가교제를 더 포함하는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 가교제는 DMTMM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride), 스페르민(Spermine), 푸트레신(Putrescine), 스페르미딘(Spermidine), 부탄디올디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE) 및 에틸렌글리콜디글리시딜에테르(Ethylene glycol diglycidyl ether, EGDGE)로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 1 내지 4: 2 내지 8의 중량비로 포함되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 탈세포화는 초임계 유체 추출 공정에 의해 수행되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 초임계 유체로 사용되는 용매는 이산화탄소인 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 초임계 유체는 공용매로서 에탄올이 더 포함되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 추출은 30℃ 내지 40℃의 온도 조건하에서 수행되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 추출은 50 bar 내지 500 bar의 압력 조건하에서 수행되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 추출은 1 내지 3시간 동안 수행되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 초임계 유체로 추출하는 단계 전에 표피층과 진피층을 분리하는 단계를 포함하는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 초임계 유체로 추출하는 단계 후에 하기 단계 중 어느 하나의 단계를 더 포함하는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔:

인산염 완충액으로 피부조직을 세척하는 단계;

세척된 피부조직을 동결건조하는 단계;

동결건조된 피부조직을 분쇄하는 단계;

분쇄된 피부조직을 용매와 혼합하여 액상의 세포외기질을 수득하는 단계;

액상의 세포외기질을 동결건조하는 단계; 및

동결건조된 세포외기질을 멸균하는 단계.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 세포외기질(ECM)은 건조중량을 기준으로 하기 그룹에서 선택되는 어느 하나의 특징을 가지는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔:

DNA 잔존량이 50 내지 90 ng/mg; 및

콜라겐 함량이 500 내지 700 μ g/mg.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 세포외기질(ECM)은 원조직 대비 하기 그룹에서 선택되는 어느 하나의 특징을 가지는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔:

DNA 잔존량이 20% 이하; 및

콜라겐 함량이 80 내지 99%.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 세포외기질(ECM)은 성장인자를 함유하는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 성장인자는 ANG-1, CCL3L1, Decorin, Eotaxin-1, IL-10, IL12p40, IL-15, IL-18, IL-1Ra, IL-8, RANTES, SCF, TIMP-1, TIMP-2 및 VEGF로 이루어진 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 성장인자는 원조직 대비 하기의 함량으로 함유되는 것인, 세포외기질 기반의 하이드로겔:

ANG-1 함량이 60 내지 80%;

CCL3L1 함량이 45 내지 65%;

Decorin 함량이 70 내지 90%;

Eotaxin-1 함량이 50 내지 70%;

IL-10 함량이 55 내지 75%;

IL12p40 함량이 45 내지 65%;

IL-15 함량이 80 내지 100%;

IL-18 함량이 30 내지 50%;

IL-1Ra 함량이 25 내지 45%;

IL-8 함량이 30 내지 50%;

RANTES 함량이 25 내지 45%;

SCF 함량이 10 내지 30%;

TIMP-1 함량이 20 내지 40%;

TIMP-2 함량이 10 내지 30%; 및

VEGF 함량이 35 내지 55%.

청구항 20

탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔을 포함하는 의료용 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 히알루론산, 황산화 히알루론산, 키토산, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서,

상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 히알루론산을 포함하는 것인, 의료용 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서,

상기 하이드로겔은 가교제를 더 포함하는 것인, 의료용 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 가교제는 DMTMM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride), 스페르민(Spermine), 푸트레신(Putrescine), 스페르미딘(Spermidine), 부탄디올디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE) 및 에틸렌글리콜디글리시딜에테르(Ethylene glycol diglycidyl ether, EGDGE)로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 25

제20항에 있어서,

상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 1 내지 4: 2 내지 8의 중량비로 포함되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 26

제20항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 지방조직을 더 포함하는 것인, 의료용 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 지방조직 및 하이드로겔이 1: 1 내지 9의 중량비로 포함되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 28

제20항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 300 mL 이상의 대용량 투여용인 것인, 의료용 조성물.

청구항 29

제20항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 0.1 mL 내지 10 mL 미만의 소용량 투여용인 것인, 의료용 조성물.

청구항 30

제20항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 국소마취제를 더 포함하는 것인, 의료용 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 국소마취제는 리도카인(lidocaine), 에티도카인(etidocaine), 부피바카인(bupivacaine), 테트라카인(tetracaine), 메피바카인(mepivacaine), 프로카인(procaine), 프릴로카인(prilocaine), 로피바카인(ropivacaine) 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 32

제20항에 있어서,

상기 의료용 조성물은 조직수복재, 필러 또는 성형 보조물로 사용되는 것인, 의료용 조성물.

청구항 33

탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔 제조방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 히알루론산, 황산화 히알루론산, 키토산, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것인, 제조방법.

청구항 35

제33항에 있어서,

상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 히알루론산을 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 36

제33항에 있어서,

가교제를 더 포함하는 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 하이드로겔을 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 초임계 유체 추출 공정을 이용하여 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔, 이를 포함하는 의료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드로겔은 다량의 수분을 함유할 수 있는 3차원 고분자 구조체로서, 생체조직과 유사한 물성 및 뛰어난 생체적합성을 주요 특징으로 한다. 또한, 구성 고분자의 종류, 가교제, 가공 방식 등을 달리하여 하이드로겔의 물리화학적 특성을 조절하기가 용이하다. 이처럼 생체재료로 활용하기에 우수한 성질 덕분에 다양한 기능성 하이드로겔(접착제, 지혈제, 약물전달체, 세포치료제, 인공조직 등)이 활발하게 연구 및 개발되고 있다(한국공개특허 제2022-0100797호). 이러한 하이드로겔을 제조할 수 있는 소재로는 주로 히알루론산 등의 고분자가 많이 사용되고 있다.

[0003] 한편, 인체의 피부조직은 콜라겐, 엘라스틴 등의 단백질과 글리코사아미노글리칸을 포함하는 세포외기질(Extracellular matrix)에 의해 그 구조를 유지하고 있다. 피부조직은 외부의 충격, 질병 또는 노화 등에 의한 연조직의 결손이 발생하는 경우, 연조직 증강과 같은 조직 증강술을 의학 및 미용 목적으로 사용하고 있다. 이러한 조직 증강술은 성형수술을 통해 외과적으로 이루어지거나, 해당 부위에 생체 조직이나 합성 고분자 화학물질을 주입하여 연조직의 부피를 증대, 확장함으로써 비외과적인 방법으로 그 형태를 복원 및 교정하고 있다(한국공개특허 제2020-0005505호).

[0004] 손상된 연조직의 보다 효율적인 수복을 위해 대표적으로 가교된 히알루로산 기반 하이드로겔이 보편적으로 사용되고 있으나, 연조직 부위에 시술 시 여러가지 결함이 존재한다. 예컨대, 인체 내에서 히알루로니다제(hyaluronidase)의 발현으로 인해 수 시간에 불과한 짧은 반감기를 나타내어 적용에 한계가 있다.

[0005] 이외에 손상된 조직의 치유를 목적으로 자가 피부조직을 이식하는 방법이 시행되고 있다. 그러나, 이러한 경우 이식받는 사람은 본인의 피부조직을 적출하는 부담이 있어 이식받는 사람의 건강상태가 양호하지 않은 경우에는 위험할 수 있다. 한편, 이종조직이나 합성 생체재료를 사용하여 이식하는 경우, 면역거부반응이 발생하여 장기간 이식시 염증반응을 초래하여 재수술하는 결과를 초래할 수도 있다.

[0006] 이에 따라, 생체 내 특성과 외과적 유용성 등을 고려하여 손상된 조직 수복 및 치유를 위해 히알루론산 기반 하이드로겔 제품 및 자가 또는 동종 조직 이식 간에 절충안이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2022-0100797 A
(특허문헌 0002) KR 10-2020-0005505 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 체내 이식 후에도 면역거부반응 없이 일정기간 동안 손상된 조직의 볼륨을 지속적으로 유지할 수 있는 조직 수복용 생체재료를 개발하고자 연구하였다. 그 결과, 최적화된 초임계 유체 처리 공정을 피부 조직에 적용하여 탈세포화시켜 생체안정성 및 생체적합성을 증가시키고, 성장인자의 보존 정도가 개선된 세포외기질을 수득함과 동시에 이를 생체적합성 고분자와의 가교를 통해 인체 적용 후 오랜 기간 볼륨감을 형성할 수 있고, 겔 형상에 대한 우수한 유지력 및 지속력을 나타내는 하이드로겔을 생성함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적 달성을 위해, 본 발명의 일 측면은, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 측면은, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔을 포함하는 의료용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 기반의 하이드로겔은 주성분으로 사용되는 피부조직 유래 세포외기질의 탈세포화가 계면활성제 사용 없이 초임계 유체 추출 공정을 통해 이루어져 생체안정성 및 생체적합성이 우수하다. 또한, 세포외기질의 구성 성분 및 성장 인자의 보존 정도가 현저하게 우수한 이점을 지니고 있다. 뿐만 아니라, 생체적합성 고분자와의 가교를 통해 인체 적용 후 오랜 기간 볼륨감을 형성할 수 있고, 겔 형상에 대한 우수한 유지력 및 지속력을 나타낸다. 이에 따라, 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 사고에 의한 외상, 폐양 등과 같은 조직 결손 부위의 조직 수복, 주름 개선, 피부 볼륨 증가 등을 위한 필러 용도 등 재생의학 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a는 초임계 유체 추출 공정 전의 돼지 피부조직을 촬영한 사진이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 초임계 유체 추출 공정 후 용매와 혼합하여 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액의 동결건조 상태를 촬영한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 초임계 유체 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액 시료의 간존 DNA 정량 분석 결과를 나타낸 것이다. 여기서, pD는 대조군으로서 원조직 돼지 진피(porcine dermis) 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이며, SC1은 시험군으로서 초임계 유체 추출 공정 후의 탈세포화된 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 초임계 유체 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액 시료에서 면역원성 단백질 MHC1의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과(도 3a) 및 이를 정량화한 결과(도 3b)를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 초임계 유체 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액 시료의 콜라겐 함량 분석 결과를 나타낸 것이다. 여기서, N은 대조군으로서 원조직 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이며, SC는 시험군으로서 초임계 유체 추출 공정 후의 탈세포화된 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 초임계 유체 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액 시료의 성장인자 보존 정도를 확인한 사이토카인 어레이 결과를 나타낸 것이다. 여기서, Native는 대조군으로서 원조직 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이고, SC는 시험군으로서 E0 가스 멸균 전 탈세포화된 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이며, SC-E0는 E0 가스 멸균 후 탈세포화된 돼지 진피 유래 세포외기질 용액 시료를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 초임계 유체 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액 시료 내 높은 수준으로 보존된 사이토카인 중 VEGF에 의한 세포성장 활성 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔 제조 공정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔의 체내 유지력을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 여기서, 좌측 옆구리에는 2% 농도의 하이드로겔을 투여하였고, 우측 옆구리에는 4% 농도의 하이드로겔을 투여한 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 중대형 동물(돼지)의 조직 확장 수술 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물(a) 및 조직 확장 돼지 동물 모델 구축 후 상기 조성물(a)을 투여하고 봉합 부위(b)를 촬영한 사진이다.

도 11은 대용량 주입가능한 조직 확장 동물 모델에 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물 투여 후 주변 근육 조직에 미치는 염증 반응 유발 여부 및 재생 효과 확인을 위한 H&E 염색 결과를 나타낸 것이다. 여기서, (a)는 대조군으로서 조성물 미처리 군인 정상 근육을 염색한 결과이고, (b) 및 (c) 조성물 투여군의 근육을 염색한 결과이다.

도 12a 및 도 12b는 대용량 주입가능한 조직 확장 동물 모델에 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물 투여 후 각각 0일차(도 12a) 및 4주차(도 12b)에 CT 촬영하여 투여 조성물 보존 여부를 확인한 CT 사진이다.

도 13은 대용량 주입가능한 조직 확장 동물 모델에 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물 투여 후 4주차에 부피 보존 정도를 분석하고자, Horos 프로그램을 통해 3D 이미지화를 실시한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

세포외기질 기반의 하이드로겔

[0015]

본 발명의 일 측면은, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔을 제공한다.

[0016]

본 명세서에서 사용된 용어, "피부조직(skin tissue)"은 가장 바깥쪽을 이루는 표피층과 그 아래층의 진피층, 그리고 피하조직으로 이루어진다. 이 중 표피층은 표피층과 진피층이 단단하게 결합할 수 있도록 하는 기저막으로부터 여러 층으로 분화된 상피세포와 그 밖에 멜라닌세포, 면역세포로 이루어진다. 표피층 아래의 진피층은 주로 섬유아세포와 콜라겐 및 엘라스틴 등으로 구성되는 세포외기질(Extracellular matrix)로 이루어진다.

[0017]

본 발명에 있어서, 상기 피부조직은 이에 제한되지는 않으나, 피부조직의 표피층이 제거된 진피층을 통칭하는 것으로 피부조직과 진피층은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0018]

본 명세서에서 사용된 용어, "세포외기질(extracellular matrix, ECM)"은 세포 밖에 존재하지만 세포와 밀접하게 연관된 고분자들(콜라겐, 엘라스틴, 당단백질, 성장인자 등)로 이루어진 삼차원적 망 구조체(network structure)를 지칭한다. 세포외기질은 세포 부착(cell adhesion), 세포 간 상호작용(cell-to-cell

communication) 및 세포 분화(cell differentiation) 등을 포함하여 살아있는 세포의 기본적 생활사를 조절하는 중요한 요소이다.

- [0019] 본 명세서에서 사용된 용어, "탈세포화(decellularization)"는 조직으로부터 세포외기질을 제외한 다른 세포 성분, 예를 들면 핵, 세포막, 핵산 등을 제거하는 것을 의미한다. 탈세포화는 목적으로 하는 이식 조직 또는 기관의 원래의 구조를 유지하면서 전체 장기로부터 세포를 제거하여 인공 지지체를 생산하는 새로운 방법이다. 탈세포화 과정에서, 조직으로부터 세포 성분들이 제거되지만, 세포외기질 및 일부 성장인자 단백질들은 보존된다. 따라서, 탈세포화 조직 내 보존된 콜라겐, GAG(glycosaminoglycan), 피브로넥틴 및 엘라스틴 등을 포함하는 다양한 세포외기질 성분들은 온전한 조직 내와 유사한 삼차원적인 미세환경을 제공함으로써 배양된 세포의 생존, 증식 및 분화를 향상시킬 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 탈세포화는 이에 제한되지는 않으나, 계면활성제 처리 없이, 초임계 유체 추출에 의해 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 개체로부터 분리된 피부조직으로부터 유래할 수 있다. 상기 피부조직은 동종 또는 이종 유래 지방조직일 수 있다. 상기 동종은 인간을 의미하며, 이종은 인간 이외의 동물, 즉, 돼지, 소, 말 등의 포유류 등을 의미할 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어, "생체적합성 고분자(biocompatible polymer)"는 의료용 고분자(biomedical polymer)로도 지칭되며, 인체 내에서 주변조직과 친화성을 가지며, 거부반응을 나타내지 않는 이른 바 생-접착성(bio-adhesive) 표면을 지닌 재료를 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 천연고분자 또는 합성고분자를 사용할 수 있다. 상기 생체적합성 고분자는 이에 제한되지는 않으나, 히알루론산, 황산화 히알루론산, 키토산, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 용어, "하이드로겔(Hydrogel)"은 친수성 고분자가 공유 또는 비공유 결합으로 가교되어 만들어진 3차원 망상구조물을 지칭할 수 있다. 구성 성분의 친수성으로 인해 수용액 내 및 수성 환경 하에서 많은 양의 물을 흡수하며 팽윤하지만, 가교 구조에 의해 용해되지 않는 성질을 가지고 있다. 따라서, 구성 성분과 제조방법에 따라 다양한 형태와 성질을 가진 하이드로겔이 만들어질 수 있다. 일반적으로, 하이드로겔은 다량의 수분을 함유하고 있으므로 액체와 고체의 중간 성질을 갖는 것일 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 용어, "세포외기질 기반의 하이드로겔"은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM)을 구성 성분으로 하는 천연 하이드로겔로서, 생체적합성 고분자와 가교시켜 형성된 하이드로겔일 수 있다.
- [0026] 상기 생체적합성 고분자는 상술한 바와 같으며, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질과 가교되어 소정의 물성 및 구조적 안정성을 갖는 하이드로겔을 형성할 수 있는 한, 특별히 제한되지 않는다.
- [0027] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 히알루론산을 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어, "히알루론산(hyaluronic acid, HA)"은 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루쿠론산으로 이루어진 반복 단위가 선형으로 연결되어 있는 생체 고분자 물질로서, 분자량이 100 kDa 내지 20,000 kDa에 이르는 무색 투명한 고점도의 선형 다당류이며, 안구의 유리액, 관절의 활액, 담벼슬 등 다양한 생물종과 조직으로부터 산 가용화법, 알칼리 가용화법, 중성 가용화법, 효소 가용화법 등으로 추출 및 정제하여 사용할 수 있다. 수용액 내 히알루론산의 분자량 및 농도에 따라 점성, 탄성, 보습성이 결정되며, 히알루론산의 농도가 높을수록 그 성질이 증가한다. 히알루론산은 분자량 크기에 따라서 기능이 상이한 것으로 알려져 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산은 히알루론산과 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 히알루론산의 의료용 조성물로 허용가능한 염 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 히알루론산의 염은 예를 들어, 소듐 히알루로네이트, 포타슘 히알루로네이트, 암모늄 히알루로네이트, 칼슘 히알루로네이트, 마그네슘 히알루로네이트, 아연 히알루로네이트, 코발트 히알루로네이트일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산은 이에 제한되지는 않으나, 중량 평균 분자량(Mw)이 200 kDa 내지 5,000 kDa, 500 kDa 내지 4,500 kDa, 600 kDa 내지 4,000 kDa, 700 kDa 내지 3,500 kDa, 800 kDa 내지 3,000 kDa, 900 kDa 내지 2,500 kDa, 또는 1,000 kDa 내지 2,000 kDa일 수 있다. 상기 중량 평균 분자량 범위 내의 히알루론산 또는 이의 염을 사용함으로써 하기 기술되는 가교제와의 반응성 및 하이드로겔 제조의 용이성을 향상시킬

수 있으며, 제조된 하이드로겔의 물성을 개선할 수 있다.

- [0031] 상기 세포외기질 기반의 하이드로겔 형성 시, 이에 제한되지는 않으나 가교제를 더 포함할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어, "가교(crosslinking)"는 하나의 중합체 사슬을, 동일한 또는 다른 사슬에 연결하는 결합 반응을 의미하며, "가교제(crosslinker)"는 상기 결합 반응을 유도할 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. 상기 결합 반응에 있어서, 연결은 공유 결합 또는 이온 결합의 형태를 가질 수 있고, 가교 결합의 수가 많아질 수록 가용성과 열가소성은 줄어들지만, 기계적 강도가 커지고 고분자 화합물의 탄성이 커지는 효과가 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 가교제는 DMTMM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride), 스페르민(Spermine), 푸트레신(Putrescine), 스페르미딘(Spermidine), 부탄디올디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE) 및 에틸렌글리콜디글리시딜에테르(Ethylene glycol diglycidyl ether, EGDGE)로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다. 상기 가교제는 형성되는 하이드로겔이 소정의 물성 및 구조적 안정성을 갖는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게, 상기 가교제는 DMTMM일 수 있다.
- [0034] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 1 내지 4: 2 내지 8의 중량비, 1: 1 내지 4: 3 내지 7의 중량비, 1: 1 내지 3: 3 내지 6의 중량비, 또는 1: 1 내지 2: 3 내지 5의 중량비로 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 2: 4.0 내지 4.5의 중량비로 포함될 수 있다.
- [0035] 일 구체예에서, 피부조직의 세포 제거, 즉, 탈세포화는 초임계 유체 추출 공정에 의해 수행될 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 사용된 용어, "초임계 유체 추출(supercritical fluid extraction)" 또는 "초임계 추출(supercritical extraction)"은 임계점 즉, 임계 온도 및 임계 압력 이상에 존재하는 기체와 액체의 중간 성격을 갖는 초임계 유체를 사용하여 물질을 분리하는 방법이다. 상기 초임계 유체 추출은 추출 원료와 초임계 유체의 용해도 차이에 의해 원료 중에 함유된 가용 성분이 초임계 유체로 용해되는 용매 추출 원리와 원료 중에 함유된 용질 분자가 고밀도 응축상으로부터 저밀도 팽창상인 초임계 유체로 이행하는 증발 현상인 증류 원리를 복합적으로 이용한 것이다.
- [0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "초임계 유체"는 일반적인 조건에서는 기체 상태이나 임계 온도와 임계 압력 이상에서는 유체인 것을 말한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 초임계 유체로는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 이산화탄소, 질소, 아산화질소, 메탄, 에틸렌, 프로판 및 프로필렌이 있다. 바람직하게는, 임계온도가 30℃ 내지 40℃이고, 임계 압력이 50 bar 내지 500 bar인 이산화탄소를 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 탈세포화는 초임계 유체 추출 시 초임계 유체 이외에 '공용매(co-solvent)'를 첨가할 수 있다. 상기 공용매는 초임계 유체의 추출능 증가 및 용해도 향상 등의 목적으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 에탄올, 메탄올, 석유 에테르, 아세토니트릴, 헥산 등을 공용매로서 사용할 수 있다. 이때, 바람직하게는 공용매는 에탄올일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM)은 개체로부터 분리된 원조직, 즉 초임계 유체 추출 공정의 탈세포화를 수행하지 않은 피부조직 유래 세포외기질과 비교하여 세포가 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100% 제거된 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM)은 이에 제한되지는 않으나, 건조중량을 기준으로 하기 그룹에서 선택되는 어느 하나의 특징을 가질 수 있다:
- [0041] DNA 잔존량이 약 50 ng/mg 내지 약 90 ng/mg; 및
- [0042] 콜라겐 함량이 약 500 μg/mg 내지 약 700 μg/mg.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 건조중량을 기준으로 DNA 잔존량이 약 100 ng/mg 이하 포함된 것일 수 있다. 바람직하게는, 약 75 ng/mg 내지 약 100 ng/mg, 약 76 ng/mg 내지 약 99 ng/mg, 약 77 ng/mg 내지 약 98 ng/mg, 약 78 ng/mg 내지 약 97 ng/mg, 약 79 ng/mg 내지 약 96 ng/mg, 약 80 ng/mg 내지 약 95 ng/mg, 약 81 ng/mg 내지 약 94 ng/mg, 또는 약 83 ng/mg 내지 약 93 ng/mg 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 건조중량을 기준으로 콜라겐 함량이 약 500 μ

g/mg 이상 포함된 것일 수 있다. 바람직하게는 약 500 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 700 $\mu\text{g/mg}$, 약 505 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 695 $\mu\text{g/mg}$, 약 510 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 690 $\mu\text{g/mg}$, 약 515 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 685 $\mu\text{g/mg}$, 약 520 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 680 $\mu\text{g/mg}$, 약 525 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 675 $\mu\text{g/mg}$, 약 530 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 670 $\mu\text{g/mg}$, 또는 약 535 $\mu\text{g/mg}$ 내지 약 665 $\mu\text{g/mg}$ 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0045] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM)은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 하기 그룹에서 선택되는 어느 하나의 특징을 가질 수 있다:
- [0046] DNA 잔존량이 약 20% 이하; 및
- [0047] 콜라겐 함량이 약 80 내지 약 99%.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 원조직 대비, 즉 탈세포화 전 또는 탈세포화를 수행하지 않은 피부조직 유래 세포외기질 대비 DNA 잔존량이 약 20% 이하 포함된 것일 수 있다. 바람직하게는, 약 5 내지 약 20%, 약 5 내지 약 19%, 또는 약 5 내지 약 18% 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0049] 즉, 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 원조직 대비 약 80% 이상 제거된 것일 수 있다. 바람직하게는, 약 80 내지 약 99%, 약 81 내지 99%, 또는 약 82 내지 약 99% 제거된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0050] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질의 성분, 예를 들어 콜라겐이 원조직 대비 소정의 함량으로 유지되어 있는 것일 수 있다.
- [0051] 구체적으로, 본 발명에 있어서, 상기 피부조직 유래 세포외기질은 원조직 대비, 콜라겐 함량이 약 80% 이상 포함된 것일 수 있다. 바람직하게는, 약 80 내지 약 99%, 약 81 내지 약 98%, 약 82 내지 약 97%, 약 83 내지 약 96%, 약 84 내지 약 95%, 또는 약 85 내지 약 94% 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 초임계 유체를 이용한 용매 추출 과정을 통하여 얻은 샘플에서 시험한 41가지 성장인자 중 32가지의 성장인자가 검출되었고, 이 중 15가지의 성장인자는 원조직 대비 보존되었다.
- [0053] 본 명세서에서 사용된 용어, "성장인자(growth factor)"는 각종 세포 분열이나 생장 분화를 촉진하는 폴리펩티드의 총칭이다. 여러 종류가 발견되었으며, 기능도 다양하고, 세포의 신호전달계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 생물체의 기본적 구성성분이 되는 영양물질 이외에 세포의 증식, 생물체의 증식 및 발육에 필요한 물질로서 세포가 성장하고 분화하는데 필수적 요소이다. 일례로, 혈관내피성장인자(VEGF), 데코린(decorin), 에오타신-1(eotaxin-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1), TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase 2) 등이 있다.
- [0054] 상기 성장인자는 이에 제한되지는 않으나, ANG-1, CCL3L1, Decorin, Eotaxin-1, IL-10, IL12p40, IL-15, IL-18, IL-1Ra, IL-8, RANTES, SCF, TIMP-1, TIMP-2 및 VEGF로 이루어진 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 하기의 함량으로 성장인자를 함유할 수 있다:
- [0056] ANG-1 함량이 60 내지 80%;
- [0057] CCL3L1 함량이 45 내지 65%;
- [0058] Decorin 함량이 70 내지 90%;
- [0059] Eotaxin-1 함량이 50 내지 70%;
- [0060] IL-10 함량이 55 내지 75%;
- [0061] IL12p40 함량이 45 내지 65%;
- [0062] IL-15 함량이 80 내지 100%;
- [0063] IL-18 함량이 30 내지 50%;
- [0064] IL-1Ra 함량이 25 내지 45%;
- [0065] IL-8 함량이 30 내지 50%;

- [0066] RANTES 함량이 25 내지 45%;
- [0067] SCF 함량이 10 내지 30%;
- [0068] TIMP-1 함량이 20 내지 40%;
- [0069] TIMP-2 함량이 10 내지 30%; 및
- [0070] VEGF 함량이 35 내지 55%.
- [0071] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 ANG-1 함량이 60 내지 80%, 62 내지 75%, 64 내지 70%, 또는 65 내지 68% 함유된 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 CCL3L1 함량이 45 내지 65%, 47 내지 60%, 49 내지 58%, 51 내지 56%, 또는 52 내지 55% 함유된 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 Decorin 함량이 70 내지 90%, 72 내지 88%, 74 내지 86%, 76 내지 84%, 78 내지 82%, 또는 79 내지 81% 함유된 것일 수 있다.
- [0074] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 Eotaxin-1 함량이 50 내지 70%, 52 내지 65%, 54 내지 63%, 또는 56 내지 60% 함유된 것일 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL-10 함량이 55 내지 75%, 57 내지 73%, 59 내지 71%, 61 내지 69%, 또는 63 내지 67% 함유된 것일 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL12p40 함량이 45 내지 65%, 47 내지 63%, 49 내지 61%, 51 내지 59%, 또는 53 내지 57% 함유된 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL-15 함량이 80 내지 100%, 83 내지 98%, 86 내지 96%, 또는 89 내지 94% 함유된 것일 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL-18 함량이 30 내지 50%, 32 내지 48%, 34 내지 46%, 36 내지 44%, 38 내지 46%, 또는 40 내지 44% 함유된 것일 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL-1Ra 함량이 25 내지 45%, 27 내지 43%, 29 내지 41%, 31 내지 39%, 33 내지 37%, 또는 34 내지 36% 함유된 것일 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 IL-8 함량이 30 내지 50%, 32 내지 48%, 34 내지 46%, 36 내지 44%, 37 내지 42%, 또는 38 내지 40% 함유된 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 RANTES 함량이 25 내지 45%, 27 내지 40%, 29 내지 38%, 31 내지 36%, 또는 32 내지 34% 함유된 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 SCF 함량이 10 내지 30%, 12 내지 25%, 14 내지 23%, 16 내지 21%, 또는 17 내지 19% 함유된 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 TIMP-1 함량이 20 내지 40%, 22 내지 38%, 24 내지 36%, 26 내지 34%, 27 내지 32%, 또는 28 내지 31% 함유된 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 TIMP-2 함량이 10 내지 30%, 12 내지 25%, 14 내지 23%, 15 내지 21%, 또는 16 내지 19% 함유된 것일 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 피부조직 유래 세포외기질은 이에 제한되지는 않으나, 원조직 대비 VEGF 함량이 35 내지 55%, 37 내지 53%, 39 내지 51%, 41 내지 49%, 43 내지 47%, 또는 44 내지 46% 함유된 것일 수 있다.
- [0086] 전술한 일련의 특징을 지닌 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 인체에 직접적으로 적용되는 물질로서, 주성분으로 사용되는 피부조직 유래 세포외기질의 탈세포화가 계면활성제 사용 없이 초임계 유체 추출 공정을 통해 이루어져 생체안정성 및 생체적합성이 우수하다. 또한, 세포외기질의 구성 성분 및 성장 인자의 보존 정도가 현저하게 우수한 이점을 지니고 있다. 뿐만 아니라, 생체적합성 고분자와의 가교를 통해 인체 적용 후 오랜 기간 볼륨감을 형성할 수 있고, 겔 형상에 대한 우수한 유지력 및 지속력을 나타낸다. 이에 따라, 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 사고에 의한 외상, 궤양 등과 같은 조직 결손 부위의 조직 수복, 주름 개선, 피부 볼륨 증가 등을 위한 필러 용도 등 재생의학 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[0087] 세포외기질 기반의 하이드로겔의 제조

[0088] 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질을 주성분으로 하여 제조될 수 있다. 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 개체로부터 분리된 피부조직을 초임계 유체로 추출하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[0089] 상기 "탈세포화", "피부조직" 및 "초임계 유체"는 상술한 바와 같다.

[0090] 본 발명에 있어서, 초임계 유체는 용해도를 바탕으로 개체로부터 분리된 피부조직 내 지질 성분, 구체적으로 세포막의 주성분인 인지질 성분을 추출하여 탈세포화시킴으로써 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질을 제조할 수 있다.

[0091] 상기 초임계 유체는 이산화탄소 가스, 암모니아 가스, 질소 가스, 일산화질소(NO) 가스, 이산화질소(NO₂) 가스, 아산화질소(N₂O) 가스, 이산화황 가스, 수소 가스, 수증기, 포화탄화수소, 불포화탄화수소, 방향족 화합물 및 이들의 혼합 가스로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 바람직하게는, 이산화탄소 가스를 사용할 수 있다. 상기 초임계 유체로 이산화탄소 가스를 이용 시, 이산화탄소는 낮은 임계 온도(31℃)와 임계 압력(73 bar)을 가지고 있어 쉽게 초임계 조건으로 조정이 가능하며, 자연계에 널리 존재하고 무색, 무취하며 인체에 무해하고 화학적으로 안정한 장점이 있다.

[0092] 본 발명에 있어서, 상기 초임계 추출 단계는 0 내지 1000 bar, 30 내지 900 bar, 60 내지 800 bar, 90 내지 700 bar, 120 내지 600 bar, 150 내지 500 bar, 또는 200 내지 400 bar의 압력 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0093] 본 발명에 있어서, 상기 초임계 추출 단계는 0 내지 1000 bar, 30 내지 900 bar, 60 내지 800 bar, 90 내지 700 bar, 120 내지 600 bar, 150 내지 500 bar, 또는 200 내지 400 bar의 압력 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0094] 구체적으로, 초임계 추출 단계의 압력은 이에 제한되지는 않으나, 0 bar 이상, 50 bar 이상, 100 bar 이상, 150 bar 이상, 200 bar 이상, 250 bar 이상, 300 bar 이상, 350 bar 이상, 400 bar 이상, 450 bar 이상, 500 bar 이상, 550 bar 이상, 600 bar 이상, 650 bar 이상, 700 bar 이상, 750 bar 이상, 800 bar 이상, 850 bar 이상, 900 bar 이상 또는 950 bar 이상일 수 있다.

[0095] 또한, 초임계 추출 단계의 압력은 이에 제한되지는 않으나, 1000 bar 이하, 950 bar 이하, 900 bar 이하, 850 bar 이하, 800 bar 이하, 750 bar 이하, 700 bar 이하, 650 bar 이하, 600 bar 이하, 550 bar 이하, 500 bar 이하, 450 bar 이하, 400 bar 이하, 350 bar 이하, 300 bar 이하, 250 bar 이하, 200 bar 이하, 150 bar 이하, 100 bar 이하 또는 50 bar 이하일 수 있다.

[0096] 상기 초임계 추출 단계의 압력 조건은, 피부조직 유래 세포외기질의 기계적 특성을 유지하면서, 피부조직의 세포를 대부분 제거하여 효율적으로 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질을 제조할 수 있는 조건이라면 그 범위는 이에 제한되지 않는다.

[0097] 상기 초임계 추출 단계에 있어서, 초임계 유체 이외에 공용매를 더 포함할 수 있다. 상기 공용매는 에탄올, 물, 메탄올, 헥산, 석유 에테르, 아세토니트릴, 아세톤, 에틸아세테이트 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매일 수 있다. 바람직하게는, 공용매로서 에탄올을 더 포함할 수 있다.

[0098] 상기 공용매는 초임계 유체의 추출능 증가 및 용해도 향상 등의 목적으로 첨가되어 분리된 피부조직 내의 지질 및 세포를 대부분 제거하되, 피부조직 유래 세포외기질의 기계적 특성을 보존하는 한, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다.

[0099] 본 발명에 있어서, 상기 초임계 추출 단계는 이에 제한되지는 않으나, 28℃ 내지 38℃, 28℃ 내지 37℃, 29℃ 내지 36℃, 29℃ 내지 35℃, 30℃ 내지 34℃, 30℃ 내지 33℃, 또는 31℃의 온도 조건하에서 수행될 수 있다.

[0100] 본 발명에 있어서, 상기 초임계 추출 단계는 이에 제한되지는 않으나, 3시간 이내 동안 수행될 수 있다. 바람직하게는, 60분 내지 180분, 70분 내지 170분, 80분 내지 160분, 90분 내지 150분, 100분 내지 140분, 110분 내지 130분, 또는 120분 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0101] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 제조 시, 이에 제한되지는 않으나, 상기 초임계 유체로 추출하는 단계 전에 피부조직의 표피층과 진피층을 분리하는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

[0102] 상기 표피층과 진피층의 분리는 당업계에 공지된 방법을 통해 수행될 수 있다. 일반적으로, 표피층과 진피층의 분리는 여러가지 단백질 분해 효소, 예컨대, 디스파아제, 트립신, 트립신 등을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0103] 또한, 용액의 이온 강도를 변화시켜 표피층과 진피층을 분리할 수 있다. 구체적으로, 1M 이상의 염화나트륨(NaCl) 용액 또는 20 mM의 EDTA 용액으로 37℃에서 14시간 내지 32시간 동안 처리하면 표피층과 진피층을 분리할 수 있다.
- [0104] 일 구체예에 있어서, 상기 표피층 및 진피층의 분리는 이에 제한되지는 않으나, 37℃의 온도 조건하에서, 1M NaCl을 24시간 동안 처리하여 수행될 수 있다.
- [0105] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은, 이에 제한되지는 않으나, 상기 초임계 유체로 추출하는 단계 후에 하기 단계 중 어느 하나의 단계를 더 포함하여 제조될 수 있다:
- [0106] 인산염 완충액으로 피부조직을 세척하는 단계;
- [0107] 세척된 피부조직을 동결건조하는 단계;
- [0108] 동결건조된 피부조직을 분쇄하는 단계;
- [0109] 분쇄된 피부조직을 용매와 혼합하여 액상의 세포외기질을 수득하는 단계;
- [0110] 액상의 세포외기질을 동결건조하는 단계; 및
- [0111] 동결건조된 세포외기질을 멸균하는 단계.
- [0112] 상기 인산염 완충액을 이용한 세척을 통해 초임계 유체 추출 이후 피부조직에 존재하는 잔존 용액 및 불순물을 세척할 수 있다.
- [0113] 상기 세척된 피부조직에 대해 동결건조를 수행할 수 있다.
- [0114] 상기 동결건조는 조직이 동결된 상태에서 이를 급속 냉각후 진공으로 수분을 흡수하는 방법으로, 상기 동결건조를 수행하여 세포외기질 물질 내 수분을 조절할 수 있으며, 분말화를 용이하게 수행할 수 있도록 할 수 있다.
- [0115] 상기 동결건조는 이에 제한되지는 않으나, 약 -80℃ 이하, 바람직하게는 -40℃ 내지 -80℃의 초저온 냉동 조건하에서 4시간 이상, 바람직하게는 4 내지 48시간 동안 수행할 수 있다.
- [0116] 상기 동결건조는 이에 제한되지는 않으나, 동결건조기를 이용하여 24시간 내지 48시간 동안 수행될 수 있다.
- [0117] 상기 동결건조된 피부조직은 분쇄를 통해 분말화될 수 있다. 상기 분쇄는 당업계에 공지된 분쇄 수단, 예를 들어, 냉동 분쇄기, 초음파 분쇄기 등과 같은 분쇄기, 믹서기, 호모게나이저, 핸드블렌더, 플런저 밀 등을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0118] 상기 분쇄를 통한 피부조직의 분말화에 의해 이후 수행되는 용매와의 혼합 단계에서 용매 내 용해 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0119] 상기 분쇄를 통해 분말화된 피부조직은 임의의 용매에 첨가되어 용이하게 현탁 또는 용해될 수 있다. 상기 용매는 상기 분말화된 피부조직이 용해될 수 있는 용매라면 제한없이 사용가능하며, 예를 들어, 다양한 수용액 즉, 증류수, 완충용액 및 생리 식염수로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다.
- [0120] 상기 용매와 분말화된 피부조직 혼합물에 대해 예를 들어, 파이펫팅(pipetting), 볼텍싱(vortexing), 셰이킹(shaking), 교반(agitation) 등과 같은 물리적 혼합을 수행함에 따라 피부조직 유래 세포외기질이 용매 내 균일하게 현탁 또는 용해되도록 할 수 있다. 이를 통해, 용매 내 피부조직 유래 세포외기질이 균질하게 현탁 또는 용해되어 있는 액상의 세포외기질을 수득할 수 있다.
- [0121] 상기 수득된 탈세포화된 피부조직 유래의 액상의 세포외기질, 즉 세포외기질 용액은 동결건조를 통해 사용시까지 보존될 수 있다. 상기 동결건조를 수행하여 세포외기질 물질 내 수분을 조절할 수 있으며, 분말화를 용이하게 수행할 수 있도록 할 수 있다.
- [0122] 상기 동결건조의 수행 조건은 상술한 바와 같다.
- [0123] 상기 동결건조된 피부조직 유래 세포외기질은 멸균을 수행할 수 있다.
- [0124] 본 명세서에서 사용된 용어, "멸균(sterilization)"은 대상으로 하는 물체의 표면과 내부에 존재하는 모든 곰팡이, 세균, 바이러스, 및 원생동물 등의 영양세포 및 포자를 사멸 또는 제거시켜 무균 상태로 만드는 것이다. 멸균방법은 물리적, 화학적 및 기계적 방법이 있으며, 멸균 대상 물체나 그 조성의 특성에 따라 적절한 멸균방법을 선택하여 실시할 수 있다. 일례로, X-선, 중성자(Neutrons), 음극선(Cathod) 등을 이용한 방사선 조사,

EO(Ethylene oxide), 포름알데히드(Formaldehyde), β -프로피오락톤(β -propiolactone) 등을 이용한 가스 처리, 및 필터를 이용한 여과 방법으로 멸균할 수 있다.

- [0125] 일 구체예에서, 상기 동결건조된 피부조직 유래 세포외기질은 감마선 또는 EO(Ethylene oxide) 가스를 이용하여 멸균을 수행할 수 있다.
- [0126] 상기 멸균에 있어서, 감마선의 조사 범위는 이에 제한되지는 않으나, 10 내지 30 kGy일 수 있다. 또한, EO 가스의 처리 농도는 이에 제한되지는 않으나, 350 mg/L 내지 550 mg/L, 400 mg/L 내지 500 mg/L, 420 mg/L 내지 480 mg/L, 430 mg/L 내지 460 mg/L, 또는 440 mg/L일 수 있다. 또한, EO 가스의 처리 시간은 이에 제한되지는 않으나, 1 내지 5시간, 1.5 내지 4.5시간, 2 내지 4시간, 2.5 내지 3.5시간, 또는 3시간일 수 있다.
- [0127] 상기와 같은 일련의 과정에 따라 최종 수득한 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질을 생체적합성 고분자와 혼합함으로써, 세포외기질 기반의 하이드로겔을 제조할 수 있다.
- [0128] 상기 "탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질", "생체적합성 고분자", "세포외기질 기반의 하이드로겔"은 상술한 바와 같다.
- [0129] 상기 세포외기질 기반의 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질과 생체적합성 고분자를 혼합하여 가교시킴에 의해 형성된 천연 하이드로겔로서, 상기 가교는 당업계에 공지된 방법을 통해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 가교는 이에 제한되지는 않으나, 동결-융해(freezing-thawing)에 의한 물리적 가교법, 방사선 조사에 의한 화학적 가교법, 또는 자외선 또는 가시광을 사용한 광 가교법에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 동결-융해에 의한 물리적 가교법에 의해 수행될 수 있으나, 목적한 물성 및 구조적 안정성을 갖는 하이드로겔을 형성할 수 있는 한, 특별히 제한되지는 않는다.
- [0130] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 생체적합성 고분자로서 히알루론산을 포함하는 것일 수 있다.
- [0131] 구체적으로, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 히알루론산을 혼합하여 아마이드 결합을 유도하고, 동결-융해(freezing-thawing)에 의한 물리적 가교법을 통해 추가적인 가교를 유도함에 따라 형성될 수 있다.
- [0132] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 가교제를 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 가교제는 이에 제한되지는 않으나, DMTMM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride), 스페르민(Spermine), 퓨트레신(Putrescine), 스페르미딘(Spermidine), 부탄디올디글리시디에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE) 및 에틸렌글리콜디글리시디에테르(Ethylene glycol diglycidyl ether, EGDGE)로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다. 상기 가교제는 형성되는 하이드로겔이 소정의 물성 및 구조적 안정성을 갖는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게, 상기 가교제는 DMTMM일 수 있다.
- [0133] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 1 내지 4: 2 내지 8의 중량비, 1: 1 내지 4: 3 내지 7의 중량비, 1: 1 내지 3: 3 내지 6의 중량비, 또는 1: 1 내지 2: 3 내지 5의 중량비로 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제가 1: 2: 4.0 내지 4.5의 중량비로 포함될 수 있다.
- [0134] **세포외기질 기반의 하이드로겔을 포함하는 의료용 조성물**
- [0135] 본 발명의 다른 측면은, 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔을 포함하는 의료용 조성물을 제공한다.
- [0136] 상기 "탈세포화", "피부조직", "세포외기질", "생체적합성 고분자" 및 "하이드로겔"은 상술한 바와 같다.
- [0137] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 의료용 조성물 내 포함되는 하이드로겔의 구성 성분으로 함유되는 세포외기질(ECM)은 이에 제한되지는 않으나, 개체로부터 분리된 피부조직에 대해 계면활성제 처리 없이 초임계 유체 추출 공정에 의해 탈세포화가 수행된 피부조직으로부터 수득할 수 있다.
- [0138] 상기 "초임계 유체"는 상술한 바와 같다.
- [0139] 상기 초임계 유체를 이용한 용매 추출 과정으로 탈세포화된 세포외기질을 효과적으로 수득할 수 있으며, 세포외기질 중 세포외액에 존재하는 성장인자 또한 다량으로 잔류시킬 수 있다.
- [0140] 상기 성장인자는 "세포외기질 기반의 하이드로겔"에서 상술한 바와 같다.

- [0141] 상기 초임계 유체 추출 이후 수득된 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 감마선 또는 EO(Ethylene oxide) 가스를 이용하여 멸균을 수행할 수 있다.
- [0142] 본 발명에 따른 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM)은 "세포외기질 기반의 하이드로겔"에서 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [0143] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 의료용 조성물 내 포함되는 하이드로겔의 구성 성분으로 함유되는 생체적합성 고분자는 "세포외기질 기반의 하이드로겔"에서 상술한 바와 같다.
- [0144] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 가교제를 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 가교제는 상술한 바와 같다.
- [0145] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔에 포함되는 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제의 혼합 중량비는 "세포외기질 기반의 하이드로겔"에서 상술한 바와 같다.
- [0146] 본 발명에 있어서, 상기 의료용 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 조직수복제, 필러 또는 성형 보조물 등으로 사용될 수 있다.
- [0147] 본 명세서에서 사용된 용어, "조직수복"은 사고 또는 질환으로 인한 손상 조직 또는 노화된 조직의 구조와 기능을 복원시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, 미용용 필러 용도, 성형용 보형물 용도 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0148] 본 명세서에서 사용된 용어, "조직수복제"는 조직수복에 사용되는 물질로서, 외상 또는 질환에 의한 조직 손상 부위, 주름 부위 또는 볼륨이 필요한 부위 등에 주입되는 연조직과 유사한 충전 물질을 포괄적으로 지칭하는 것일 수 있다.
- [0149] 본 발명에 따른 의료용 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 얼굴, 목, 가슴, 엉덩이, 팔, 겨드랑이, 손, 다리 및 발로 이루어진 군으로부터 선택되는 연조직을 대상으로 적용될 수 있다.
- [0150] 본 발명에 있어서, 상기 의료용 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 지방조직을 더 포함할 수 있다.
- [0151] 상기 지방조직은 자가 또는 동종 유래 지방조직일 수 있으며, 인체 적용 후 면역거부반응을 유발하지 않는 한, 특별히 제한되지는 않는다.
- [0152] 본 발명의 의료용 조성물에 있어서, 상기 지방조직은 세포외기질 기반의 하이드로겔과 1: 1 내지 9의 중량비, 1: 1 내지 8의 중량비, 1: 1 내지 7의 중량비, 1: 1 내지 6의 중량비, 1: 1 내지 5의 중량비, 1: 1 내지 4의 중량비, 1: 1 내지 3의 중량비, 또는 1:3의 중량비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0153] 본 발명에 따른 의료용 조성물은 외상 또는 질환에 의한 광범위한 조직 손상 또는 가슴과 엉덩이 등 미용 목적으로 조직 부피를 증가시키기 위해 300 mL 이상의 대용량으로 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 수 있다. 또한, 미간주름, 이마주름, 눈가주름, 팔자주름, 입가주름 등의 주름 개선, 눈밑애교살, 볼 등 조직 부피 감소 개선 등을 위해 약 0.1 mL 내지 약 10 mL 미만의 소용량으로 이를 필요로 하는 개체의 안면부에 투여될 수 있다.
- [0154] 상기 의료용 조성물은 국소마취제를 더 포함할 수 있다. 상기 의료용 조성물 내 국소마취제의 농도는 체내 주입 시 느낄 수 있는 통증을 완화시키는 데 효과적인 양일 수 있다. 상기 의료용 조성물 내 국소마취제의 농도는 0.1 내지 5.0 (w/v)%, 0.2 내지 1.0 (w/v)%, 또는 0.3 (w/v)% 일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로, 상기 국소마취제는 이에 제한되지는 않으나, 리도카인(lidocaine), 에티도카인(etidocaine), 부피바카인(bupivacaine), 테트라카인(tetracaine), 메피바카인(mepivacaine), 프로카인(procaine), 프틸로카인(prilocaine), 로피바카인(ropivacaine) 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다. 바람직하게는, 리도카인 및 그의 염일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0155] 본 발명에 있어서, 상기 의료용 조성물은 개체에 투여될 때 유익한 효과를 제공하는 다른 물질 또는 물질의 조합을 더 포함할 수 있다. 이러한 유익한 물질은 이에 제한되지는 않으나, 히터-방지제, 항-염증제, 마취제, 자극-완화제, 항-출혈제 가령 지혈제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0156] 본 발명에 따른 의료용 조성물 내 포함되는 하이드로겔의 구성 성분으로 함유되는 세포외기질(ECM)은 이의 유래 조직인 피부조직에 대해 계면활성제 처리 없이 초임계 유체 추출 공정을 통해 수득되어 계면활성제가 야기할 수 있는 단백질의 변성, 성장인자의 파괴, 이식거부반응 등의 문제점을 최소화시켜 우수한 생체안정성 및 생체적합성을 보인다. 뿐만 아니라, 세포외기질의 구성 성분(예컨대, 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등) 및 성장인자의

보존 정도가 현저하게 우수한 이점을 지니고 있다. 아울러, 본 발명에 따른 의료용 조성물은 하이드로겔의 구성 성분으로서 생체적합성 고분자를 포함하여 상기 이점을 지닌 탈세포화된 세포외기질과 가교 반응을 유도함으로써 인체 적용 후 오랜 기간 볼륨감을 형성할 수 있고, 겔 형상에 대한 우수한 유지력 및 지속력을 나타낸다.

[0157] 이에 따라, 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 의료용 조성물에 유효성분으로서 포함될 수 있다.

[0158] 본 발명의 의료용 조성물은 주사기로의 주입 등을 통해 생체 내로 주입 또는 삽입될 수 있다. 이러한 의료용 조성물은 일반적인 의료용 재료로서 사용될 수 있으며, 사고에 의한 외상, 궤양 등과 같은 조직 결손 부위의 조직 수복, 주름 개선, 피부 볼륨 증가 등을 위한 필러 용도 등 재생의학 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[0159] 세포외기질 기반의 하이드로겔 제조방법

[0160] 본 발명의 또 다른 측면은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM); 및 생체적합성 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는 세포외기질 기반의 하이드로겔 제조방법을 제공한다.

[0161] 상기 "탈세포화", "피부조직", "세포외기질", "생체적합성 고분자" 및 "하이드로겔"은 상술한 바와 같다.

[0162] 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질은 하기 단계 중 어느 하나의 단계를 포함하여 제조될 수 있다:

[0163] 개체로부터 분리된 피부조직을 표피층 및 진피층으로 분리하는 단계;

[0164] 분리된 진피층을 초임계 유체로 추출하는 단계;

[0165] 초임계 유체로 추출된 진피층을 인산염 완충액으로 세척하는 단계;

[0166] 세척된 진피층을 동결건조하는 단계;

[0167] 동결건조된 진피층을 분쇄하는 단계;

[0168] 분쇄된 진피층을 용매와 혼합하여 액상의 세포외기질을 수득하는 단계;

[0169] 액상의 세포외기질을 동결건조하는 단계; 및

[0170] 동결건조된 세포외기질을 멸균하는 단계.

[0171] 상기 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질의 각 제조 단계에 대한 구체적인 세부사항은 '세포외기질 기반의 하이드로겔의 제조'에서 상술한 바와 같다.

[0172] 본 발명에 따른 세포외기질 기반의 하이드로겔은 상기와 같이 제조된 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 생체적합성 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는 공정을 통해 제조될 수 있다.

[0173] 상기 혼합 단계는 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 및 생체적합성 고분자의 아마이드 결합을 유도하고, 당 업계에 공지된 가교 방법의 추가적 수행을 통해 목적한 물성 및 구조적 안정성을 갖는 하이드로겔을 형성하는 단계이다.

[0174] 상기 당업계에 공지된 가교 방법은 동결-융해(freezing-thawing)에 의한 물리적 가교법, 방사선 조사에 의한 화학적 가교법, 또는 자외선 또는 가시광을 사용한 광 가교법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 동결-융해에 의한 물리적 가교법에 의해 수행될 수 있다.

[0175] 상기 생체적합성 고분자는 이에 제한되지는 않으나, 히알루론산, 황산화 히알루론산, 키토산, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트 및 젤라틴으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.

[0176] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM) 및 생체적합성 고분자로서 히알루론산을 포함하는 것일 수 있다.

[0177] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 가교제를 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 가교제는 상술한 바와 같다.

[0178] 일 구체예에서, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제 1: 1 내지 4: 2 내지 8의 중량비, 1: 1 내지 4: 3 내지 7의 중량비, 1: 1 내지 3: 3 내지 6의 중량비, 또는 1: 1 내지 2: 3 내지 5의 중량비로 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기 하이드로겔은 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질(ECM): 생체적합성 고분자: 가교제 1: 2: 4.0 내지 4.5의 중량비로 포함될 수 있다.

[0180] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위

한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

I. 초임계 유체 추출 공정을 이용하여 탈세포화된 피부조직 및 이로부터 유래된 세포외기질의 제조

실시예 1. 초임계 유체 추출 공정을 이용한 탈세포화된 돼지 피부조직 제조

돼지 유래 피부조직의 탈세포화를 위해 초임계 유체 추출 공정을 수행하였다. 돼지 피부조직(도 1a)을 증류수(DW)로 세척한 후 37℃ 항온기에서 1M NaCl로 24시간 동안 처리하여 표피를 제거하였다. 돼지 피부조직을 200 bar~400 bar의 압력 조건 및 31℃의 온도 조건하에서 1~3시간 동안 초임계 처리하였다.

실시예 2. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질의 제조

상기 실시예 1.에서 초임계 추출 공정 후 수득한 탈세포화된 돼지 피부조직을 동결건조하였다. 이후, 조직 분쇄기(Universal mill Multi Drive basic/IKA)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄 후 3차 증류수에 1% 농도로 혼합하여 탈세포화된 돼지 피부조직 유래의 세포외기질 용액(extracellular matrix solution, ECM sol.)을 제조하였다. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 용액을 사각 플레이트에 100 mL씩 분주하여 동결건조하였다(도 1b).

II. 초임계 유체 추출 공정을 이용하여 탈세포화된 피부조직 유래 세포외기질 용액의 생화학적 특성 평가

실험예 1. 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 용액 내 DNA 함량 확인

상기 실시예 2.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액의 탈세포화 정도를 확인하기 위해, DNA 함량을 측정하였다. 이때, 대조군으로는 초임계 유체 추출 공정을 미실시한 원조직을 사용하였다. 한편, DNA 함량 측정을 위한 시료는 개별적으로 3개의 시료를 대상으로 실시하였다.

구체적으로, 각 시료는 동결건조하여 완전히 건조시킨 후, DNeasy Blood & Tissue kit(Qiagen)를 사용하여 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에서 초임계 유체 추출 공정 전후에 잔존하는 DNA를 추출하였다. 이후, 이를 정량 분석하여 돼지 피부조직 유래 ECM 용액 내 함유된 DNA 함량을 Thermo Fisher Scientific사의 Qubit dsDNA HS Assay Kit와 Qubit Flex Fluorometer를 이용하여 측정하였다.

실험 결과, 초임계 유체 추출 공정에 따라 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에서 잔존 DNA 함량이 건조중량을 기준으로 100 ng/mg 이하로 확인되었다(도 2 및 표 1). 이를 통해, 돼지 피부조직에 대해 초임계 유체 처리시 DNA 제거 효과가 우수함을 알 수 있었다.

이에 따라, 잔존 DNA 함량이 100 ng/mg 이하로 확인되어 탈세포화가 잘 이루어진 것이 검증된 바, 이식 거부반응 없이 이식제로서 활용 가능할 것으로 예상된다.

표 1

시료 NO.	그룹	dsDNA 농도(ng/mL)	고형분 질량(mg)	Total dsDNA (ng/mg)
1	초임계 유체(SC) 처리군	4.254	10.7	80
2		4.550	10.6	86
3		4.084	10.3	79
4	대조군(원조직, pD)	43.1	10.8	798
5		41.1	10.0	822
6		40.1	9.9	810

실험예 2. 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 용액 내 면역원성 단백질 제거 확인

상기 실시예 2.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에 대해 이식 거부반응 정도를 검증하고자, 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액 내 면역원성 단백질 MHC class I의 발현 정도를 확인하였다. 이때, 대조군으로는 초임계 유체 추출 공정을 미실시한 원조직을 사용하였다.

구체적으로, 시료는 돼지 피부조직 원조직 및 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액을 RIPA 용해 버퍼(lysis buffer)를 사용하여 단백질을 추출하였다. 이 후, BCA 단백질 농도 검출 시약으로 단백질 정량을 수행하였다. 단백질 정량 후, MHC class I(SANTA CRUZ Biotechnology, Inc., Cat#sc-55582) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시하고 정량화하였다.

실험 결과, 면역원성 단백질 MHC class I은 모든 시료에서 약 100% 감소됨을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

- [0197] 이를 통해, 초임계 유체 처리하여 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액이 이식 거부반응 없이 이식체로서 활용 가능할 정도로 우수한 탈세포화 성능을 가짐을 알 수 있었다.
- [0198] **실험예 3. 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 용액의 콜라겐 보존 여부 확인**
- [0199] 상기 실시예 2.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에서 이식체로서의 조직 재생에 중요한 세포외기질 단백질의 손실이 없음을 확인하기 위해, Biocolor사의 Sircol insoluble Collagen assay kit를 사용하여 콜라겐 함량을 측정하였다. 이때, 대조군으로는 초임계 유체 추출 공정을 미실시한 원조직을 사용하였다.
- [0200] 측정 결과, 초임계 유체 추출 공정에 따라 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액 내 콜라겐 함량은 시료의 건조 중량을 기준으로 원조직 대비 85.6% 수준으로 콜라겐 단백질이 보존됨을 알 수 있었다(도 4).
- [0201] 상기 결과를 통해, 초임계 유체 추출 공정 처리에 의해 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액은 세포외기질 단백질 보존율이 우수하며, 탈세포화가 효과적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 이에 따라, 이식체로서 활용 가능한 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0202] **실험예 4. 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 용액의 성장인자 보존 여부 확인**
- [0203] 상기 실시예 2.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액의 성장인자 보존 정도를 확인하기 위해, Porcine Cytokine Array 1(AAP-CYT-1; Raybiotech)를 사용하여 두드러지게 발현되는 사이토카인 수 및 발현 정도를 확인하였다. 이때, 시험군 시료로는 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액의 에틸렌 옥사이드(Ethylene oxide, EO) 가스 멸균 전 시료(SC) 및 EO 가스 멸균 후 시료(SC-EO)를 사용하였다. 또한, 대조군(Native)으로는 초임계 유체 추출 공정을 미실시한 원조직을 사용하였다.
- [0204] 한편, EO(Ethylene oxide) 가스는 440 mg/L의 농도로 3시간 주입을 선택하였다. 상세하게는, 5루베(1루베=1 m³) 당 에틸렌 옥사이드:CO₂=20:80(%)로, EO 가스 최종 농도 440 mg/L로 3시간 처리한 것이다.
- [0205] 구체적으로, 시료를 Porcine Cytokine Array 1의 용해 버퍼를 사용하여 단백질을 추출하였으며, BCA 단백질 농도 검출 시약으로 단백질 정량을 수행하였다. 각 시료 당 100 µg의 단백질을 각각의 어레이 멤브레인[Porcine Cytokine Array 1(AAP-CYT-1; Raybiotech)]에 동일하게 로딩하여 분석하였다.
- [0206] 분석 결과는 LI-COR 소프트웨어를 사용하여 48가지 사이토카인의 Dot intensity 값을 측정하였다. 전체 성장인자 보존율은 SC 시료가 73%, SC-EO 시료가 39%였다. 또한, 재생효과가 있는 것으로 알려져 있는 사이토카인인 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 보존율은 SC 시료가 56%, SC-EO 시료가 45%로 확인되었다(도 5 및 표 2).

표 2

[0207]

사이토카인 (Cytokine)	각 시료에 대한 평균 스팟 픽셀 강도 (Mean spot pixel intensity) 값	
	초임계 공정전 시료	초임계 공정후 멸균 시료
안지오포이에틴-1(Angiopoietin-1, ANG-1)	1253	836
CCL3L1(Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1)	893	486
디코린(Decorin)	3362	2703
이오탁신-1(Eotaxin-1)	1523	891
IL-10	590	381
IL12p40	538	296
IL-15	143	134
IL-18	963	401
IL-1Ra	605	215
IL-8	675	263
RANTES	190	64
SCF(Stem cell factor)	189	33
TIMP-1(Tissue inhibitor of metalloproteinases-1)	1323	386
TIMP-2(Tissue inhibitor of metalloproteinases-2)	1573	258

VEGF(Vascular endothelial growth factor)	1463	661
--	------	-----

[0208] 이를 통해, 초임계 추출 공정을 거쳐 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에서 EO 가스 멸균 전 및 후 다수의 사이토카인이 검출되며, 성장인자 보존율이 우수함을 알 수 있었다.

[0209] **실험예 5. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액의 세포성장 활성 확인**

[0210] 상기 실시예 2.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액 내 우수하게 보존되는 여러 사이토카인 중 재생 효과가 있는 것으로 알려져 있는 VEGF(vascular endothelial growth factor)가 세포의 성장을 활성시키는지 검증하였다.

[0211] 구체적으로, 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액 내 함유된 사이토카인에 의한 세포성장 활성 평가를 위해 96웰 플레이트에 5×10^4 cells/well의 HaCaT 각질형성세포를 분주한 후 16시간 동안 배양하였다. 이후, FBS 무첨가 배지에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 그 다음, 배지를 제거하고 FBS 무첨가 배지에 인간 재조합 VEGF(293-VE, R&D systems)를 0, 5, 10, 25, 50 및 100 ng/mL의 농도로 희석하여 100 μ L씩 첨가한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 이후 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(G5421, Promega)를 활용하여 세포의 성장 활성을 확인하였다.

[0212] 분석 결과, VEGF에 의해 세포의 성장이 활성됨을 확인하였으며, 100 ng/mL의 농도에서 세포성장이 145% 활성됨을 확인하였다(도 6).

[0213] 이를 통해, 초임계 추출 공정을 거쳐 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 용액에서 높은 수준으로 유지된 VEGF가 세포성장의 활성에 도움을 준다는 것을 알 수 있었다.

[0214] **III. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 세포외기질 및 생체적합성 고분자 함유 조성물 제조**

[0215] **실시예 3. 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로젤 제조**

[0216] 조직수복제, 필러 등의 목적으로 사용하기 위한 하이드로젤을 제작하고자, 상기 실시예 1. 및 실시예 2.로부터 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM과 히알루론산을 가교하여 하이드로젤을 제조하였다. 가교 전 히알루론산(식물성 히알루론산(버섯 유래), 수용성, 1,400 kDa~1,800 kDa) 4% 수용액(최종 농도 2%)과 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 2% 수용액(최종 농도 1%)을 각각 5 mL 용량으로 제작하였다. 즉, 히알루론산 수용액과 탈세포화된 피부조직 유래 ECM 수용액은 각각 히알루론산 및 ECM이 2:1 비율이 되도록 혼합하였다.

[0217] 히알루론산을 40 mg 추가하고, 가교제로 TCI사의 DMTMM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride) 414 mg (히알루론산 단위체당 3몰배에 해당)을 사용하여 아마이드 결합을 유도하였다. 이후, freezing-thawing 기법을 3일간 반복하여 추가적인 가교를 유도하였다(도 7). 증류수로 3일간 하이드로젤을 세척하였다. 이후, 하이드로젤은 동결건조하여 상온(25℃) 보관하였다.

[0218] **IV. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 생체적합성 고분자 함유 조성물의 생화학적 특성 평가**

[0219] **실험예 6. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로젤의 체내 유지력 측정**

[0220] 상기 실시예 3.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 하이드로젤의 체내 유지력을 확인하기 위해, 하이드로젤을 동물 모델의 피하 조직에 삽입하고, 일정 시간 경과 후 회수된 삽입물의 무게를 측정하여 삽입 전후 무게 변화를 확인하였다. 이때, 하이드로젤이 완전히 소실되는 지점을 하이드로젤의 최대 체내 유지 기간으로 결정하였다.

[0221] 구체적으로, 하이드로젤 농도(전체 중량 기준 2% 및 4%)와 용량(400 μ L 및 800 μ L)을 기준으로 그룹을 나누어 마우스의 피하에 주입하고, 1, 2, 4 및 8주차에 경과를 관찰하였다. 16주차에는 삽입물의 전후 무게 변화를 측정하고 회수한 조직을 샘플링하였다.

[0222] 실험 결과, 4% 농도의 하이드로젤 투여 그룹은 하이드로젤 용량 400 μ L 및 800 μ L에 관계없이 16주간 유지되었다(도 8). 따라서, 4% 하이드로젤은 조직수복제로서 체내에서 안정적으로 16주 이상 유지되어 손상 조직의 회복에 충분한 도움을 줄 것으로 예상된다.

[0223] **V. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 생체적합성 고분자 함유 조성물의 대용량 주입 후 유효성 및 생착율 검증**

- [0224] **실험예 7. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔의 대용량 주입을 위한 중대동물 실험모델 확립**
- [0225] 상기 실시예 3.에서 제조한 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔을 대용량의 조직수복재 또는 성형용 필러 등으로 적용하고자, 상기 하이드로겔을 대용량으로 주입가능한 동물 모델을 구축하였다. 대용량 수복을 위한 단계적 조직 확장 모델을 수립하고, 효과적인 조직 확장 이후 상기 하이드로겔 함유 조성물을 대용량으로 적용하였다.
- [0226] 구체적으로, 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물의 대용량 주입을 위해 45 kg 이상의 돼지 모델에서 장력(Tension)이 적은 옆구리 부분을 실험 부위로 지정 후 절개하여 조직 확장기(Tissue Expander)를 삽입하였다(도 9).
- [0227] 삽입한 조직 확장기 내에 피부 확장 및 조직 이식 공간을 확보를 위한 생리 식염수(Saline) 350 CC(350 mL에 해당)를 투여하였다. 투여 후, 4주 동안 보존하여 공간 확장을 실시하였다. 4주 후, 조직 확장기를 제거한 뒤 확장된 공간에 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔(75%) 및 지방(25%) 함유 조성물을 350 CC 대용량으로 투여하였다(도 10).
- [0228] 이때, 지방은 돼지의 자가 지방으로 허리 및 복부 등의 부위로부터 추출한 것을 사용하였다. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔을 자가지방과 복합적으로 환부에 주입함으로써 대용량 수복 기능을 충족시키는 동시에 수복된 부위가 자가조직으로 재생되도록 유도할 수 있다.
- [0229] **실험예 8. 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔의 생체조직 내 생착율 및 유효성 검증**
- [0230] 조직 손상 개선 및 치료를 위한 조직수복재 또는 가슴성형과 같은 미용 목적의 필러 용도로서 적용가능한지를 확인하고자, 상기 실험예 7.과 같이 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물을 대용량으로 생체조직 주입 후, 생착을 위한 유효성을 평가하였다.
- [0231] 구체적으로, 상기 실험예 7.과 같이 실험 진행 후 4주차에 조직학적 검사(Histology Analysis H&E Staining), 전산화 단층 촬영을 통한 흡수율, 생착 정도 측정, 보존량 및 재생 효과 확인 등을 진행하였다. 또한, Horos 3D Volume 측정 프로그램(Horos project, GNU Lesser General Public License, Version 3 (LGPL-3.0))을 통해 보존되어 있는 상기 하이드로겔 및 지방 함유 조성물의 부피(volume)를 측정하여 보존률을 확인하였다.
- [0232] **실험예 8.1. 조직수복량 확인**
- [0233] 상기 실험예 7.에서 조직 확장기를 이용하여 하이드로겔 함유 조성물을 대용량으로 주입가능한 효과적인 돼지 동물 모델을 구축하고, 상기 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물을 주입하여 조직수복량 정도를 확인해 본 결과, 377 mL 부피 수준까지 달성되었다.
- [0234] **실험예 8.2. 조직학적 분석(Histology Analysis)**
- [0235] H&E 염색 결과, 대용량의 탈세포화된 돼지 피부조직 유래 ECM 및 히알루론산 기반 하이드로겔 및 지방 함유 조성물을 주입한 후, 주변 근육(Muscle)에서 염증반응이 일어나는지 여부 및 재생 효과를 확인하기 위해 H&E 염색을 진행하였다.
- [0236] 도 11에 나타난 바와 같이, 정상 근육(a)과 상기 하이드로겔 및 지방 함유 조성물을 주입한 근육(b 및 c)의 염색 사진을 비교해 본 결과, 근육세포가 염증없이 염색된 것으로 보아 투여된 하이드로겔 및 지방 함유 조성물이 주변 근육에 염증이나 오염(contamination)과 같은 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이에 따라, 투여된 하이드로겔 및 지방 함유 조성물이 클린(Clean) 환경에서 잘 보존되고 있음을 확인한 바, 상기 조성물을 손상된 조직 수복을 위한 조직수복재뿐만 아니라 가슴성형과 같은 미용 목적의 필러로서도 유용하게 활용 가능함을 알 수 있었다.
- [0237] **실험예 8.3. 형태학적 분석(Morphology Analysis)**
- [0238] CT 촬영(Medical Rapid Prototyping, MRP)을 진행하여 상기 하이드로겔 및 지방 함유 조성물을 대용량으로 주입한 후 보존량을 확인하였다. 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, 형태학적으로 촬영한 0일차, 4주차 CT 사진을 바탕으로 비교하여 주입 부위에서 투여 조성물이 얼마나 보존되어 있는지 확인하였다.
- [0239] 또한, CT 촬영한 사진에서 하이드로겔 및 지방 함유 조성물이 주입된 부분을 Horos 프로그램을 통해 3D 이미지

화(Image) 한 후 부피 보존 정도를 분석해 본 결과, 최종 377 mL 수준까지 보존되고 있음을 확인하였다(도 13).

도면

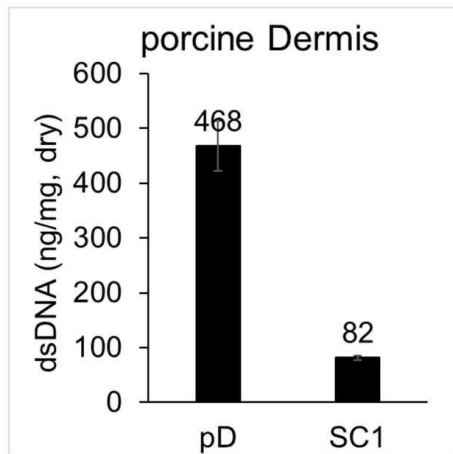
도면1a



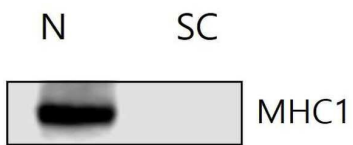
도면1b



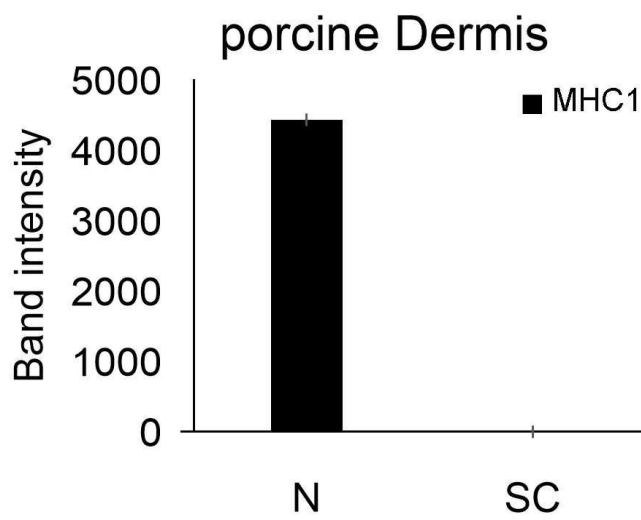
도면2



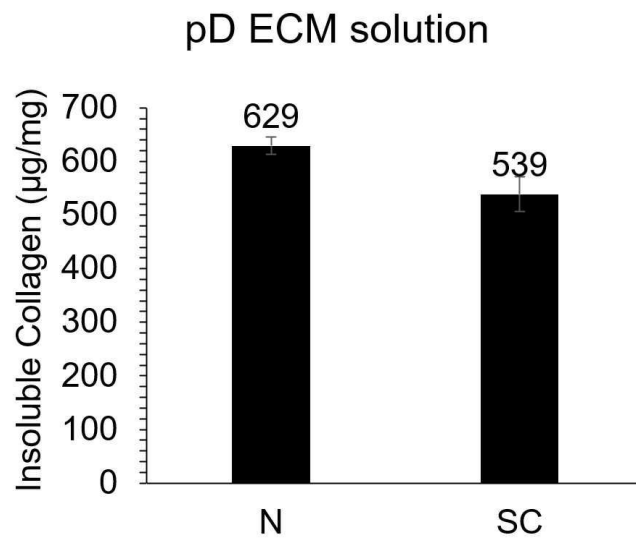
도면3a



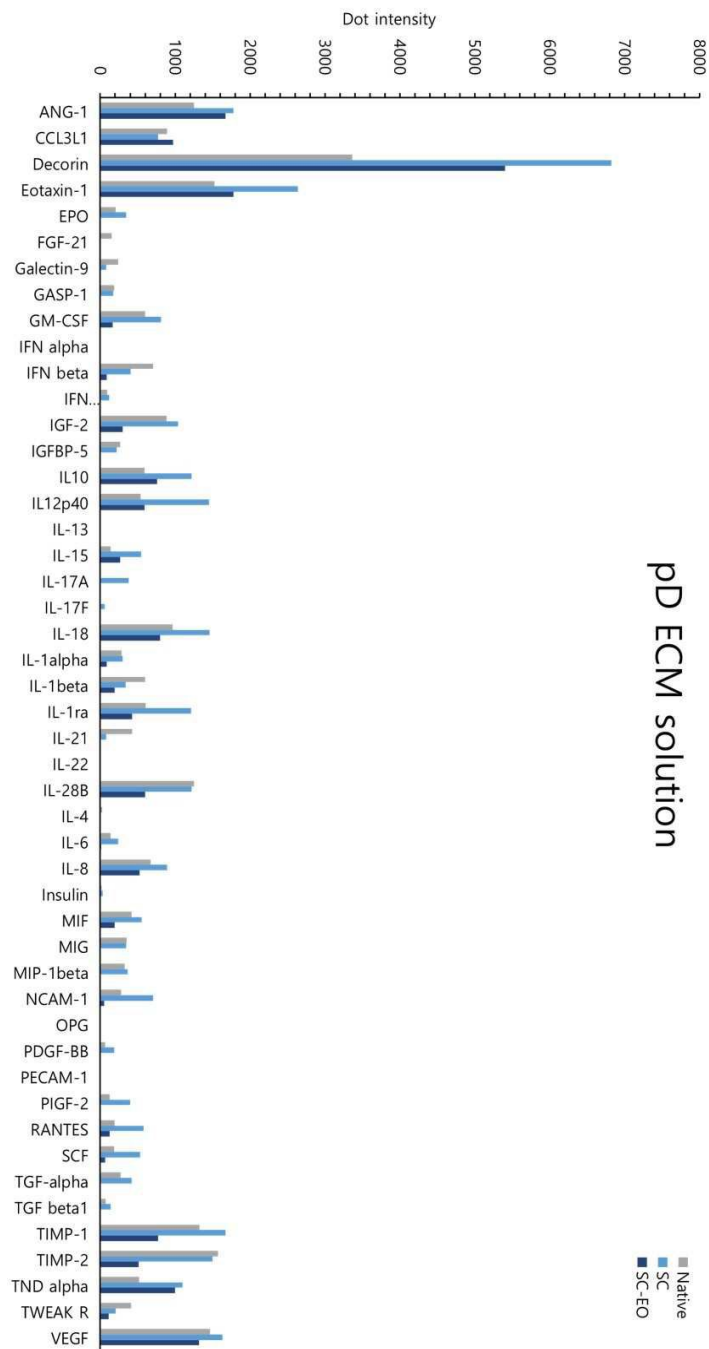
도면3b



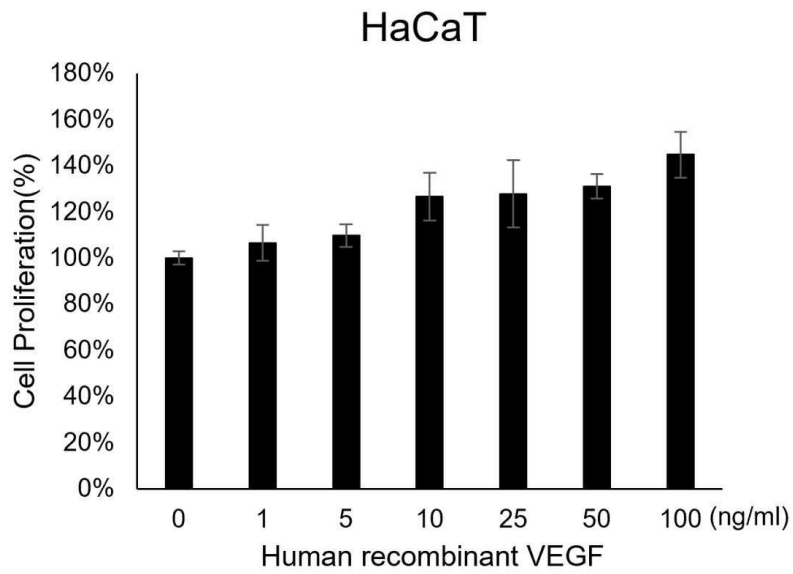
도면4



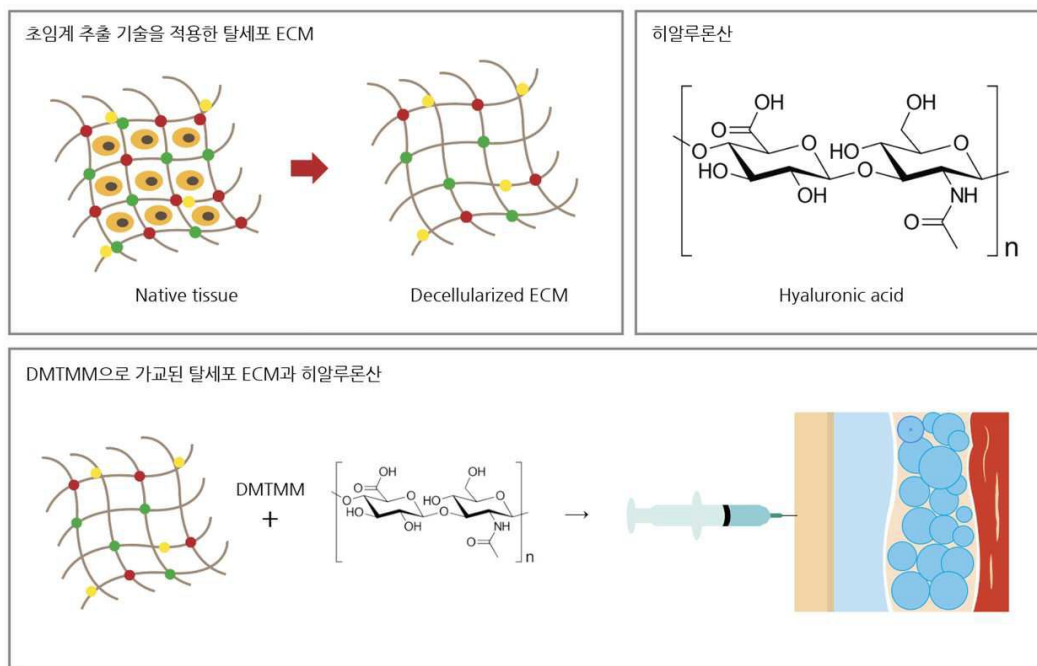
도면5



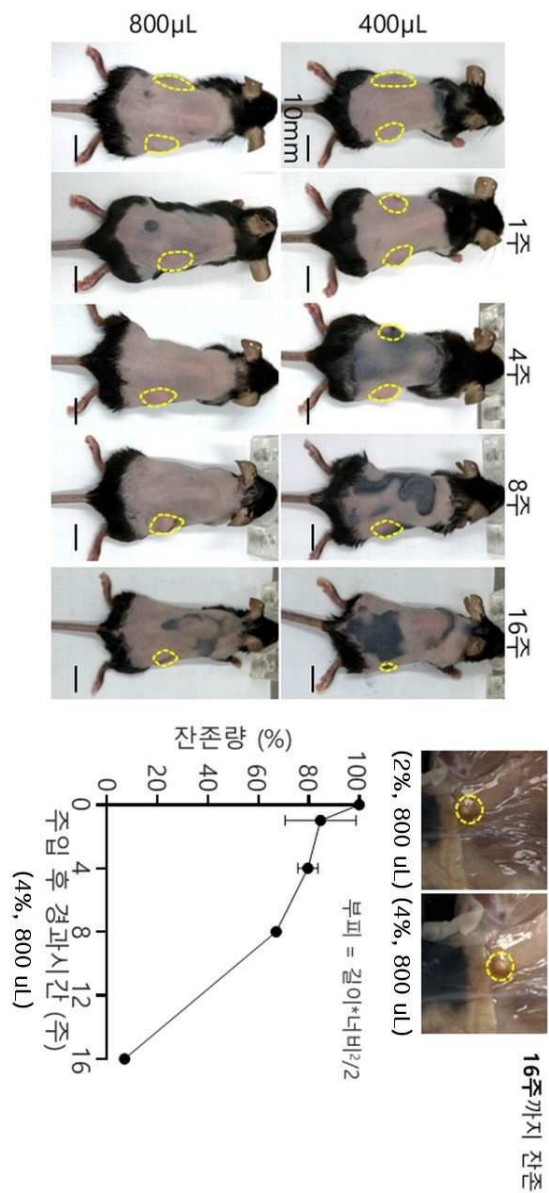
도면6



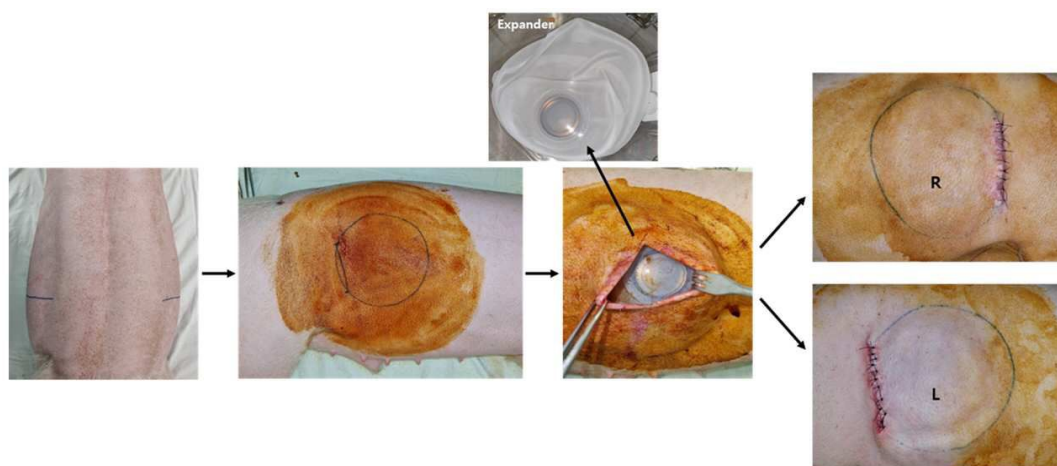
도면7



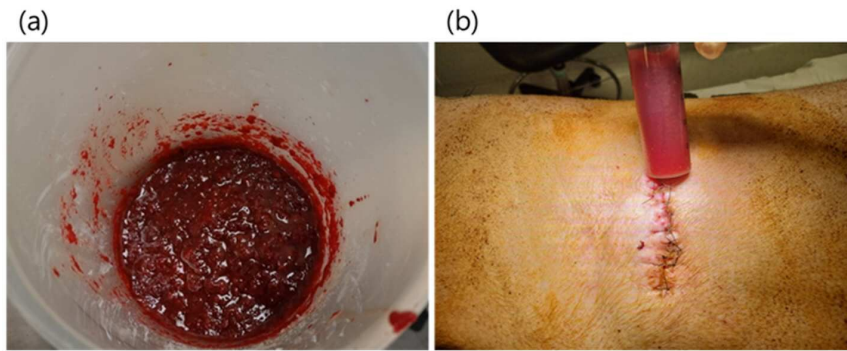
도면8



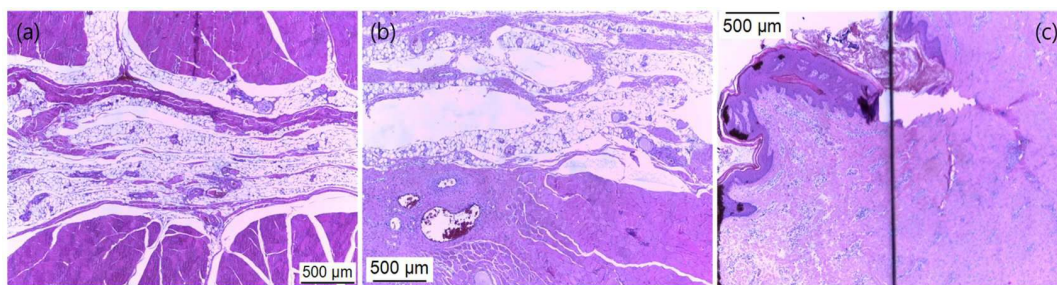
도면9



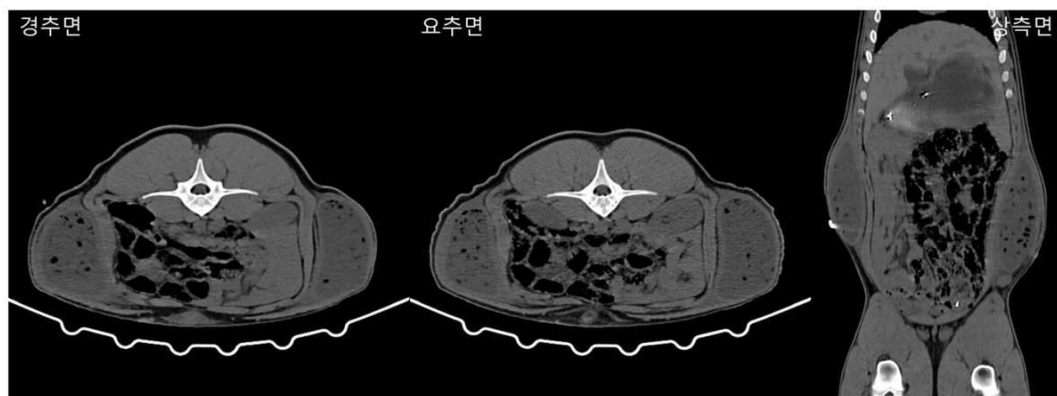
도면10



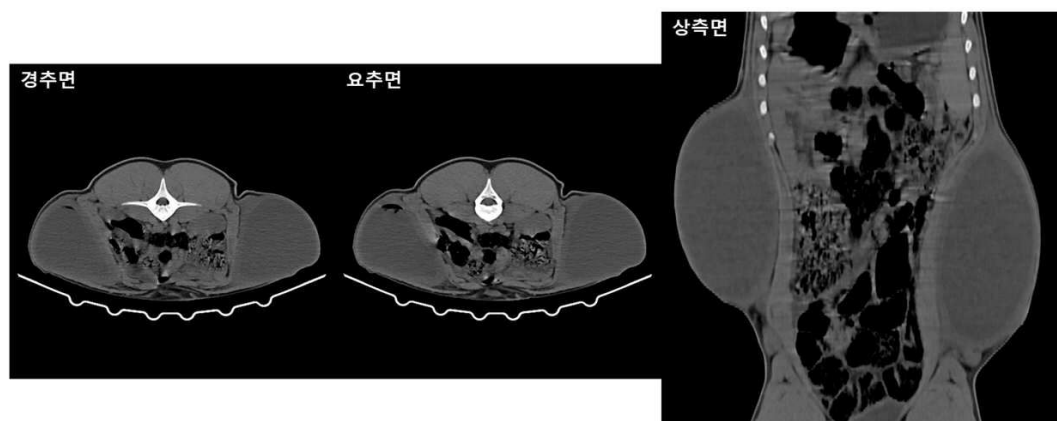
도면11



도면12a



도면12b



도면13

