

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 1월 31일 (31.01.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/015579 A2

- (51) 국제특허분류:
A61L 27/24 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/50 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/005834
- (22) 국제출원일: 2012년 7월 20일 (20.07.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0074104 2011년 7월 26일 (26.07.2011) KR
10-2012-0079079 2012년 7월 20일 (20.07.2012) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 차바이오텍 (CHABIO&DIOSTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 449-884 경기도 용인시 처인구 남사면 북리 151-21, Kyunggi-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 최용수 (CHOI, Yong Soo) [KR/KR]; 435-060 경기도 군포시 대야미동 667-3 대야미e편한세상아파트 106동 1304호, Gyeonggi-do (KR). 홍보희 (HONG, Bo-Hee) [KR/KR]; 447-721 경기도 오산시 원동 운암주공 5단지아파트 503동 601호, Gyeonggi-do (KR). 한규범 (HAN, Kyuboem) [KR/KR]; 305-721 대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 102-1002, Daejeon (KR). 김호진 (KIM, Hojin) [KR/KR]; 430-786 인천광역시 부평구 갈산2동 하나아파트 102동 402호, Incheon (KR). 김선미 (KIM, Sun Mi) [KR/KR]; 435-010 경기도 군포시 당동 899-33, 부티 목련빌라 202호, Gyeonggi-do (KR). 여성일 (YEO, Seong-

Il) [KR/KR]; 407-062 인천광역시 계양구 작전2동 신라아파트 C동 404호, Incheon (KR).

(74) 대리인: 서근복 (SEO, Keun Bok); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 642-6 성지하이츠 3차 빌딩 18층 9호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

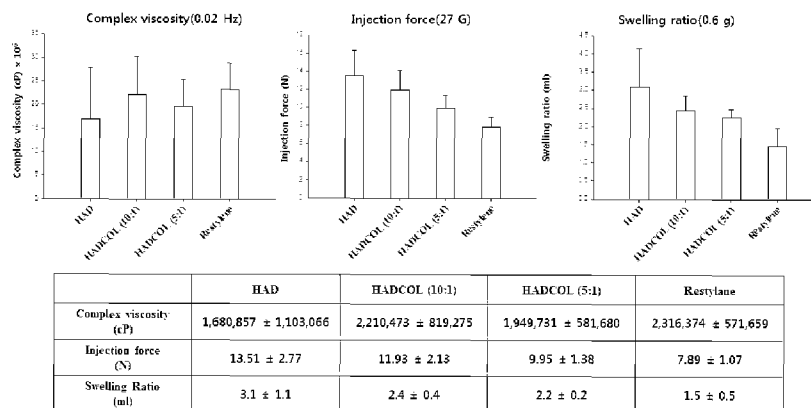
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: MEDICAL COMPOSITE ORGANIC MATERIAL INCLUDING COLLAGEN AND HYALURONIC ACID DERIVATIVES

(54) 발명의 명칭: 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a medical composite organic material, and more particularly, to a medical composite organic material including collagen and hyaluronic acid derivatives.

(57) 요약서: 본 발명은 의료용 복합 생체 소재에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재에 대한 것이다.

WO 2013/015579 A2

명세서

발명의 명칭: 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재

기술분야

- [1] 본 발명은 의료용 복합 생체 소재에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 연조직 결손 부위를 충전하기 위한 연조직 확대의 목적으로 최초로 사용된 필러는 자가지방(autologous fat)으로 보고 있으며, 1893년 Neuber가 환자의 팔에서 채취한 자가지방을 얼굴의 결손부위에 이식한 것이 최초의 사례이다.
- [3] 콜라겐은 인체에서 가장 흔하게 발견하는 단백질로 포유류에서 가장 많은 단백질이어서 전체 단백질의 약 25-35%를 차지한다. 특히 뼈, 힘줄, 인대를 구성하는 주요한 성분이며 주로 장기의 구조를 유지하는 역할을 한다. 소나 돼지의 피부에서 쉽게 추출할 수 있으며 소에서 추출한 콜라겐 필러가 1981년 최초로 미국 FDA의 허가를 받아 시장에 진입하였다.
- [4] 종래의 콜라겐 필러는 돼지 피부 또는 소 유래 콜라겐 제품으로서, 환자의 3~5%에서 면역반응이 나타나기 때문에, 반드시 알러지 테스트를 수행한 후에 이식하여야 하는 문제점이 있다.
- [5] 소 또는 돼지의 콜라겐 사용시 피부 반응 시험을 해야 하는 번거로움을 해결하고자 개발된 제품이 Cosmoderm®과 Cosmoplast®인데, 섬유아세포의 배양을 통하여 얻어진 인간 콜라겐을 이용한다. 인간 유래이므로 알러지 반응의 염려가 없고, 피부 반응시험을 미리 할 필요가 없다는 편리함이 있어서 2003년 FDA의 허가를 취득한 이후 콜라겐 필러의 대표적인 제품이 되었다.
- [6] 그러나 이들 자가세포 배양 콜라겐은 동물 유래 콜라겐에 두려움이 있는 환자에게 적용할 수 있으나, 넓은 면적의 피부를 채취하여야 하므로 여분의 피부를 많이 가지고 있거나, 다른 이유로 수술을 받아야 하는 환자만이 주로 이용할 수 있는 시술법이다.
- [7] 또한, 인간 섬유아세포 배양을 통해 배양액으로 분비한 콜라겐을 정제하여 제조된 콜라겐 필러는 면역반응은 해결할 수 있으나 안정성 부분에서 여전히 문제가 남아 있다.
- [8] 이러한 콜라겐의 문제점을 회피하고자, 히알루론산을 필러로 사용하는 방법 또한 널리 연구되고 있다. 즉, 히알루론산은 콜라겐과 달리 박테리아부터 포유류까지 중간 화학구조의 차이가 없어 항원으로 작용하지 않으므로 콜라겐을 대체하는 필러 물질로 개발되어 사용되고 있다.
- [9] 히알루론산은 모든 종에서 동일한 구조를 가지므로 콜라겐 필러의 문제점이었던 면역반응이 작다는 장점이 있다. 그러나 히알루론산 역시

제조과정에서 동물의 단백질을 미량 함유하게 되므로 이물질 반응의 문제가 완전히 해소된 것은 아니다.

- [10] 히알루론산은 체내에서 두 가지 경로로 분해되는데 첫째는 히알루로니다제(hyaluronidase)에 의한 분해이고 둘째는 세포 수용체(cell receptor)에 부착되어 세포내로 탐식되어 리소좀(lysosome)내의 효소에 의하여 분해되는 것이다. 히알루론산의 생분해는 매우 빨라서 0.5일 내지 수 일 내에 모두 분해되는 것으로 알려져 있다.
- [11] 이러한 짧은 생분해를 극복하기 위하여 히알루론산의 가교 결합이 도입되었는데, 가교 결합에 의하여 분자량이 커지면, 우선 백혈구 특히 단핵구에 의한 탐식을 억제할 수 있고, 또한 히알루로니다제의 작용 속도도 감소된다.
- [12] 그러나 히알루론산에 가교제를 처리하여 제조된 의료용 필러는 시간이 지남에 따라 체내에서 분해되어 그 효과를 지속시키는데 제한이 있다.
- [13] 또한, 콜라겐에 가교제를 처리하여 제조된 필러의 경우에도 히알루론산과 마찬가지로 체내 안정성의 문제가 남아 있다.
- [14] 히알루론산 유도체 필러와 지방조직에서 분리한 세포를 혼합하여 주입한 경우에는, 세포 내 안정성이 보다 더 지속되며 넣어준 세포에서 분비되는 세포외기질로 대체되어 보다 오랜 기간 안정하게 유지된다. 그러나 히알루론산 유도체만으로는 세포 친화력(부착능)이 떨어지기 때문에, 세포의 생존을 및 증식력에 큰 영향을 주지 못하게 된다.
- [15] 수탉의 벼슬에서 추출한 히알루론산을 이용한 동물성 히알루론산 필러제로는 Hylaform®과 Hylaform Plus®가 있으며 각각 400 μm 와 750 μm 의 입자 크기를 가지고 있어서 전자는 진피 중간부위인 망상진피에, 후자는 진피와 피하의 경계면에 주입하여 주름을 제거하는데 사용된다. 수탉의 벼슬에서 추출하므로 단백질이 미량 남아 있을 수 있어서 조류 단백질에 과민반응이 있는 환자에게는 사용해서는 안 된다.
- [16] 전술한 선행기술의 문제점들을 극복하고자, 본 발명자들은 인체 피부 조직 성분과 가장 유사한 형태로서, 히알루론산 유도체와 인간 탯줄에서 분리한 콜라겐을 적절하게 혼합한 복합 생체 소재를 개발하였다. 상기 복합 생체 소재는 유용한 약물 또는 세포를 추가로 포함할 수 있다.
- [17] 즉, 본 발명에 따른 복합 생체 소재는 인간유래의 콜라겐을 사용함으로써 면역 문제를 해결하였고, 히알루론산 유도체를 함께 사용함으로써 콜라겐만으로 이루어진 필러보다 더 오랜 기간 체내에서 유지될 수 있다.
- [18] 히알루론산은 카르복실기(COO-)가 존재하여 (-)전하를 띠므로 세포의 부착이 어려운 반면, 인간 콜라겐은 세포의 이동과 증식을 유도한다. 따라서 인간 콜라겐을 히알루론산 유도체와 혼합된 형태로 피하 조직에 이식함으로써, 조직 내에 존재하는 섬유아세포의 이동 및 증식을 유도하여 조직 수복효과를 지속시킬 수 있다.
- [19] 특히, 콜라겐만을 이식한 경우 그 점도 높아 콜라겐 자체가 세포의 이동을 막는

장벽(barrier) 역할을 하여 세포의 이동을 억제하였으나, 본 발명의 복합 생체 소재의 경우는 이식된 주변 조직에 존재하는 세포들이 필러 안쪽으로 이동하여 자가조직세포에 의한 조직수복 효과를 보인다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 본 발명의 목적은 면역 문제가 없고 조직 수복 효과를 지속적으로 보이는 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는, 예를 들면 필러와 같은, 의료용 복합 생체 소재를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [21] 전술한 본 발명의 목적은 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [22] 상기 콜라겐은 포유류유래 콜라겐, 보다 바람직하게는, 인간 태줄유래 콜라겐일 수 있다. 더욱이, 상기 인간 태줄유래 콜라겐은 I형 콜라겐일 수 있다. 상기 포유류유래 콜라겐은 종래 기술에 따라 포유류의 여러 조직으로부터 얻을 수 있다.
- [23] 특히, 상기 인간 태줄유래 콜라겐은 (i) 과산화수소로 처리된 인간 태줄 조직을 분쇄하는 단계; (ii) 상기 분쇄된 태줄 조직을 아세트산 및 펩신으로 처리한 후 원심분리하는 단계; (iii) 상기 원심분리에 의해 얻은 상등액의 pH를 7로 맞추고 NaCl을 첨가하여 콜라겐을 침전시키는 단계; 및 (iv) 상기 침전된 콜라겐을 분리하는 단계를 포함하는 인간 태줄유래 콜라겐 제조 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [24] 상기 히알루론산 유도체는 줄기세포를 포함한 세포치료제의 세포전달체로서 사용될 수 있는 생체적합성 및 생분해성이 우수한 히알루론산 또는 그 염의 유도체를 제조하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 경우, 상기 히알루론산 유도체는 마이크로입자(microparticle) 형태일 수 있다.
- [25] 더욱이, 상기 히알루론산 유도체는 히알루론산 또는 부탄다이올글라이시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)를 사용하여 가교화하고 의료용 목적의 히알루론산 유도체를 분쇄하여 마이크로 미터 크기로 제조하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [26] 히알루론산은 오래 전부터 그 존재가 알려져 있으며, 자연에 널리 존재하는 생친화성(biocompatible) 물질이다. 히알루론산은 세포외기질(extra-cellular matrix, ECM)에 필수적인 요소인 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로서 단량체인 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)과 D-글루쿠로닉산(D-glucuronic acid)가 연속적으로 연결된 선형 다당류(linear polysaccharide)이다. 히알루론산은 생체조직의 기본구성 성분으로 세포의 형태형성, 세포분화, 세포분열에 필수적인 물질이며, 상처를 회복시키는 데 도움을 준다. 히알루론산은 에테르 결합을 통해서 수용액상에서 불용성의

- 겔이면서도 우수한 점탄성과 높은 수분 흡수 능력을 보이고 있어 생체내에서 일정기간 동안 형태를 유지하다 분해되어 체내 흡수된다.
- [27] 천연 히알루론산은 체내에 주입 시 히알루론산 분해효소(hyaluronidase)에 의해 빨리 분해되기 때문에, 이러한 분해속도를 조절하기 위하여 여러 가지 방법으로 가교시키거나, 벤질알콜 등의 화학물질을 이용하여 구조를 변형시킨 히알루론산 유도체를 만들어 사용하여야 한다.
- [28] 본 발명의 의료용 복합 생체 소재에 있어서, 히알루론산 또는 그의 염은 특별히 제한되지 않으며, 1% 내지 50%의 농도로 0.1 N 내지 10 N의 염기성 수용액에 넣고, 이에 히알루론산 또는 그의 염의 반복단위(repeating unit)를 기준으로 0.01% 내지 200%의 당량비 만큼 가교제를 첨가하며, 바람직하게는 0.1% 당량 내지 50% 당량을 첨가하여 히알루론산 또는 그의 염과 균질한 상태로 혼합하여 제조하는 것이 바람직하다. 혼합액을 제조하는 시간은 특별히 제한되지 않으며, 1 시간 내지 48 시간이 바람직하다.
- [29] 상기 둘 이상의 에폭시 작용기를 포함하는 가교제는 특별히 제한되는 것은 아니지만, 바람직한 예로서 부탄다이 올다이글라이시딜 에테르(1,4-butandiol diglycidyl ether, BDDE), 에틸렌글라콜 다이글라이시딜 에테르(ethylene glycol diglycidyl ether, EGDGE), 헥산다이올 다이글라이시딜 에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌글라이콜 다이글라이시딜 에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글라이콜 다이글라이시딜 에테르 (polypropylene glycol diglycidyl ether), 폴리터트라메틸렌글라이콜 다이글라이시딜 에테르(polytetramethylene glycol diglycidyl ether), 네오펜틸글리콜 다이글라이시딜 에테르(neopentyl glycol diglycidyl ether), 폴리글리콜 폴리글라이시딜 에테르(polyglycerol polyglycidyl ether), 다이글리세롤 폴리글라이세롤 에테르(diglycerol polyglycidyl ether), 글리세롤 폴리글라이디일 에테르(glycerol polyglycidylether), 트리메틸프로판 폴리글라이시딜 에테르(tri-methylpropane polyglycidyl ether), 비스에폭시프로폭시에틸렌(1,2-(bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 펜타에리스리톨 폴리글라이시딜 에테르(pentaerythritol polyglycidyl ether) 및 소르비톨 폴리글라이시딜 에테르(sorbitol polyglycidyl ether)와 같은 화합물을 들 수 있다.
- [30] 상기 혼합액을 반응시킨 후, 생리식염수로 세척하여 미 반응물을 제거하고 분쇄기를 이용하여 마이크로 크기로 분쇄 후 생리식염수로 세척을 수행한다. 세척된 생성물을 분쇄하여 입자 크기를 조절하고, 1~3%가 되도록 농도를 조절한 후 121°C에서 가압멸균하여 최종적으로 생체에 적용할 수 있는 히알루론산 유도체 제조함으로써 본 발명의 의료용 복합 생체 소재 조성물로 사용할 수 있다.
- [31] 콜라겐의 경우 체내에 존재하는 콜라게나아제에 의하여 빠르게 분해가 된다. 종래의 콜라겐 또는 가교된 콜라겐으로만 제조된 복합 생체 소재(예를 들면, 필러)의 경우에 가교결합된 히알루론산보다 체내에서 빠르게 분해된다.

- [32] 본 발명의 복합 생체 소재에 포함되는 콜라겐과 히알루론산 유도체의 혼합비율(부피비)은 1:10 내지 10:1인 것이 바람직하고, 이 경우 체내 안정성이 우수하다. 또한, 상기 콜라겐의 농도는 1%(w/v) 내지 3%(w/v)이고, 상기 히알루론산 유도체의 농도는 1%(w/v) 내지 3%(w/v)인 것이 바람직하다.
- [33] 본 발명의 의료용 복합 생체 소재를 인체 내부로 이식하면, 주변 인체 조직의 세포가 상기 의료용 복합 생체 소재 내부로 이동한다. 이렇게 이동한 세포가 세포외기질을 분비하고, 따라서 상기 의료용 복합 생체 소재 성분이 분해되더라도, 상기 세포외기질로 인하여 원하는 효과가 지속된다는 점에서 종래 기술로부터 전혀 예측할 수 없는 결과를 보여 준다.
- [34] 본 발명의 의료용 복합 생체 소재는 약물 또는 세포를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약물의 추가로 인하여 원하는 약리 효과를 나타낼 수 있고, 상기 세포의 추가로 인하여, 예를 들면, 조직 수복과 같이, 원하는 조직 수복의 효과를 보다 확실하게 얻을 수 있다. 즉, 본 발명의 의료용 복합 생체 소재에 약물 또는 세포를 포함시킨 후, 생체 내 이식물로서 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [35] 본 발명의 의료용 복합 생체 소재는 인간의 피부 조직과 유사한 조성, 즉 인간 콜라겐과 히알루론산 유도체를 포함함으로써, 인간 세포에 대한 친화도가 매우 우수하다.
- [36] 또한, 본 발명의 의료용 복합 생체 소재를 체내에 주입한 경우에, 상기 의료용 복합 생체 소재 내부로 주변 세포가 유입되고, 이들 세포에 의해 세포외기질이 생성된다. 이로써, 이식된 본 발명의 의료용 복합 생체 소재 성분이 다 분해되어도 이동한 세포가 분비한 세포외기질로 채워지기 때문에, 원하는 효과가 지속된다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 본 발명의 실시예 3에서 제조한 복합 생체 소재를 주사기에 담은 모습을 보여 준다.
- [38] 도 2는 본 발명의 실시예 4의 상용 생체 소재들(필러)과 본 발명의 복합 생체 소재들의 복합점도, 주사능 및 흡수능을 비교한 결과이다.
- [39] 도 3은 본 발명의 실시예 5에서 상용 생체 소재들(필러)과 본 발명의 복합 생체 소재들을 마우스 피하에 이식한 후 시간에 따른 크기 및 형태의 변화를 보여 준다.
- [40] 도 4 및 도 5는 본 발명의 실시예 6에서 상용 생체 소재들(필러)과 본 발명의 복합 생체 소재들을 마우스 피하에 이식한 후 시간에 따른 무게 변화를 보여 준다.
- [41] 도 6은 본 발명의 실시예 7에서 상용 생체 소재들(필러)과 본 발명의 복합 생체 소재들을 마우스 피하에서 분리하고 주변 조직으로부터, 주입된 생체 소재 내로 세포의 유입 여부를 확인하기 위한 헤마톡실린-에오신 염색 사진이다.

- [42] 도 7 및 도 8은, 각각 본 발명의 실시예 7에서 상용 생체 소재들(필러)과 본 발명의 복합 생체 소재들을 마우스 피하에서 분리하고 주변 조직으로부터, 주입된 생체 소재 내로 세포의 유입과 혈관의 생성 여부를 확인하기 위한, 1주째 및 16주째에서의 면역 형광 사진이다. 이소렉틴 B4(antibody isolectin B4) 및 폰 빌레브란트 인자(vWF)는 신생 혈관 마커이며, DAPI는 세포의 핵을 관찰하기 위해 청색으로 염색하는 마커이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 이하, 다음의 실시예 또는 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 또는 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 내용을 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 본 발명의 권리 범위를 실시예의 범위로 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

- [44] 실시예 1. 히알루론산 유도체의 제조

- [45] 0.25 N NaOH 용액에 히알루론산 나트륨을 100 mg/ml 농도로 용해시켰다. 상기 용액에 BDDE(1,4-Butanediol diglycidyl ether)를 첨가하였다. 30°C에서 36시간 반응시킨 후, 생리식염수로 세척하여 미반응물을 제거하였다. 세척된 생성물을 분쇄하여 입자 크기를 조절하고, 20 mg/ml이 되도록 농도를 조절하여, 히알루론산 유도체를 제조하였다.

- [46] 실시예 2. 인간 태줄 유래 휴먼 콜라겐의 제조

- [47] 동결된 태줄을 상온에서 해동시켰다. 태줄을 1~2 cm 길이로 절단한 후, 정제수로 세척하였다. 70% 에탄올 용액을 처리한 후, 4°C에서 24시간 반응시켰다. 정제수로 세척한 후, 3% H₂O₂ 용액을 처리하고 4°C에서 12~24시간 마그네틱 바를 이용하여 교반 하였다. 정제수로 2회 이상 세척하고 0.5 M 아세트산 용액을 넣어 블렌더(blender)와 균질기(homogenizer)를 사용하여 조직을 분쇄하였다. 펩신을 처리하고 4°C에서 24시간 반응시켰다. 10,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후, NaOH를 사용하여 수거한 상층액의 pH를 7로 맞추어 펩신 효소의 활성을 제거하였다. pH를 조정된 용액에 NaCl을 처리하고 NaCl이 다 녹을 때까지 교반 후, 4°C에서 콜라겐이 염석이 되어 침전이 되도록 12~24시간 정치하였다. 10,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리 후, 염석이 된 콜라겐 펠렛(pellet)을 분리하여 한외여과 장치(ultrafiltration system)로 탈염 및 농축하였다. 최종적으로 여과방법으로 제공하고 동결 건조하여 보관하였다. 제조된 콜라겐 용액을 하이드록시프로린(hydroxyprolin) 분석법으로 정량하였고 SDS-PAGE를 통하여 순도를 확인하였다. 아미노산 분석을 통해 회수된 단백질이 콜라겐 타입 I임을 확인하였고 타회사의 아미노산 분석 데이터와 비교 확인하였다(표 1).

- [48] 표 1

[Table 1]

인간 태줄 유래 I형 콜라겐

아미노산(mol %)	상용 제품	배치 A	배치 B	배치 C
CYA	0.00	0.31	0.17	0.12
ASX	4.50	4.83	4.44	4.43
GLX	7.50	7.38	7.67	7.26
hydroxy_PRO	9.20	11.40	10.94	10.51
SER	3.20	3.51	3.65	3.46
GLY	32.70	37.05	35.51	35.17
HIS	0.50	0.00	0.00	0.85
ARG	5.20	4.51	4.72	4.81
THR	1.60	0.81	1.89	1.65
ALA	11.00	9.25	9.65	10.54
PRO	13.00	10.63	11.73	11.62
TYR	0.30	0.11	0.18	0.29
VAL	2.30	1.85	2.07	2.07
MET	0.60	0.91	0.92	0.77
ILE	1.10	1.37	1.25	1.22
LEU	2.50	2.47	2.28	2.35
hydroxy_LYS	0.90	0.00	0.00	0.00
PHE	1.30	1.28	1.02	1.04
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00
LYS	2.60	2.30	1.91	1.83
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00

[49] 실시예 3. 복합 생체 소재의 제조

[50] 실시예 1에서 제조된 2% 히알루론산 유도체, 실시예 2에서 제조된 2%(w/v) 콜라겐, 그리고 이들을 각각 5:1 및 10:1의 비율로 혼합한 복합 생체 소재를 준비한 후, 각각 멸균용 용기에 담아 멸균 후 프리필드 시린지(도 1)에 충전하였다(표 2).

[51] 표 2

[Table 2]

구분	히알루론산 유도체(HAD)	휴먼 콜라겐(COL)	10:1(HADCOL (10:1))	5:1(HADCOL (5:1))
성분 명	BDDE crosslinked hyaluronic acid	Human Collagen	BDDE crosslinked HA + Human Collagen(10:1)	BDDE crosslinked HA + Human Collagen(5:1)

[52] 실시예 4. 복합 생체 소재의 물성 확인

[53] 실시예 3에서 제조한 복합 생체 소재들과 대조군으로서 레스틸렌(Restylane)과의 물성을 비교하기 위하여 복합점도(complex viscosity), 주사능(injection force) 및 흡수능(swelling ratio)을 비교 분석하였다.

[54] 복합점도 분석은 원심 분리한 표 2의 생체 소재 0.6 ml를 레오미터(Rheometer)를 사용하여 0.02 Hz의 진동수 범위에서 측정하였다. 주사능 분석은 1 ml 주사기에 27 G 주사 바늘을 연결한 후, 주사능시험기기(Syringe ability test machine)에 장착한 후, 12 mm/min의 속도로 시린지 밀대를 밀어 주사능을 측정하였다(3회 반복 측정). 흡수능을 측정하기 위하여 상기 생체 소재 0.6 ml(g)에 생리식염수를 10 ml 첨가한 후, 5분간 와동시켰다(vortex). 이후, 37°C에서 72시간 동안 정치시켜 상을 분리하였다. 정치시킨 상태에서 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액 100 µl를 서서히 첨가하였다. 색의 차이를 확인하고 층 분리를 경계로 삼아, 아래 층에 가라앉아 있는 검체의 부피를 확인하여 다음의 식 (1)에 의해 흡수능을 산출하였다.

[55] $\text{흡수용매량} = \text{팽윤된 부피} \div \text{검체의 무게 (ml/g)} \quad (1)$

[56] 상기 생체 소재들과 레스틸렌의 복합점도, 주사능 및 흡수능을 측정한 결과로도 2에 나타내었다. 도 2에 나타나 있듯이, 본 발명의 복합 생체 소재인 HADCOL (10:1) 및 HADCOL (5:1)은 대조군인 상용화된 레스틸렌과 유사한 복합점도 값을 보였을 뿐만 아니라, 주사능과 흡수율 또한 대조군과 유사한 값을 보였다.

[57] 실시예 5. 복합 생체 소재 주입 모식도와 시간에 따른 복합 생체 소재의 외형 변화

[58] 실시예 3에서 제조한 HADCOL (10:1), HADCOL (5:1)의 효력을 확인하기 위하여, 현재 시판되고 있는 필러인 레스틸렌과 테라필(TheraFill)을 대조군으로 이용하여 BALB/c-nu Slc의 피하에 각각 200 µl씩 투여한 후 시간에 따른 상태 변화를 확인하였다(도 3).

[59] 시간이 지남에 따라 대조군(Restylane, TheraFill)과 실험군(HADCOL (10:1), HADCOL (5:1)) 모두 외형적으로 크기가 감소하는 양상을 보였으나, 대조군에서 더 많은 감소를 나타냈다. 또한, 실험군은 대조군에 비해 외형 유지가 16주 동안 비교적 지속적으로 이루어지는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때, 본 발명의 복합 생체 소재가 체내에 더 오래 유지될 것으로 판단된다.

[60] 실시예 6. 시간에 따른 복합 생체 소재의 무게 변화

[61] 실시예 5의 실험군과 대조군이 시간에 따라 체내에서 유지되는 정도를 무게로서 측정하였다. 실시예 5에서 얻은, 시간에 따라 얻은 생체 소재들을 피하 조직에서 조심스럽게 제거한 후 무게를 측정하였다(도 4 및 도 5). 도 4에 나타나 있듯이, 시간에 따라 무게 변화가 가장 많은 것은 테라필로 나타났으며, 레스틸렌, HADCOL (10:1), HADCOL (5:1)은 감소하는 양상이 유사하게 나타났다. 또한, 도 5에 나타나 있듯이, 대조군으로서 사용된 테라필은 초기 무게에 비해 약 $87.7 \pm 5.2\%$ 감소하였고, 레스틸렌과 실험군인 HADCOL (10:1) 및 HADCOL (5:1)은 초기 1주일 정도까지 팽윤에 의해 무게가 증가하는 것으로 나타났으나, 이후 레스틸렌과 HADCOL (5:1)은 무게 감소의 정도가 유사하게 나타난 반면에, HADCOL (10:1)은 $31 \pm 16.5\%$ 의 무게 감소를 보여, 체내에서 가장 오래 유지되었다.

[62] 실시예 7. 시간에 따른 복합 생체 소재의 조직학적 분석

[63] 실시예 3에서 제조된 복합 생체 소재를 4% 포르말린에 24시간 동안 진탕 고정하였다. 상기 고정된 조직을 PBS(Phosphate buffered Saline)로 3회 세척하였고, 30% 수크로스(sucrose) 용액에서 조직이 가라앉을 때까지 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이 후 냉동 절편용 샘플을 제작하기 위하여 OCT 화합물(optimal cutting temperature compound)에 포매하고 동결박절 마이크로톰(cryocut microtome)을 사용하여 $5 \mu\text{m}$ 내지 $6 \mu\text{m}$ 의 두께로 잘라 슬라이드 글라스 위에 올려놓았다. 37°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 형태 관찰을 위해 헤마톡실린-에오신(Hematoxyline-Eosin) 염색과, 신생 혈관을 확인하기 위해 항체 이소렉틴 B4((antibody Isolectin B4) 및 폰 빌레브란트 인자(vWF)를 이용하여 면역 형광 염색을 실시하였다. 도 6에 나타나 있듯이, 1주 및 16주 후에 실험군인 HADCOL (10:1)과 HADCOL (5:1)에서 안쪽으로 세포가 유입된 것을 확인할 수 있었으나, 대조군인 레스틸렌과 테라필의 경우에는 세포의 유입을 확인할 수 없었다.

[64] 면역 형광 염색 결과 도 7 및 도 8에 나타나 있듯이, 1주 및 16주째 실험군에서 혈관 신생의 특이적인 마커인 이소렉틴 B4와 vWF가 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 주변 조직 유래 세포들이 복합 생체 소재(필러) 내부로 이동하여 신생 혈관이 형성되었음을 의미한다.

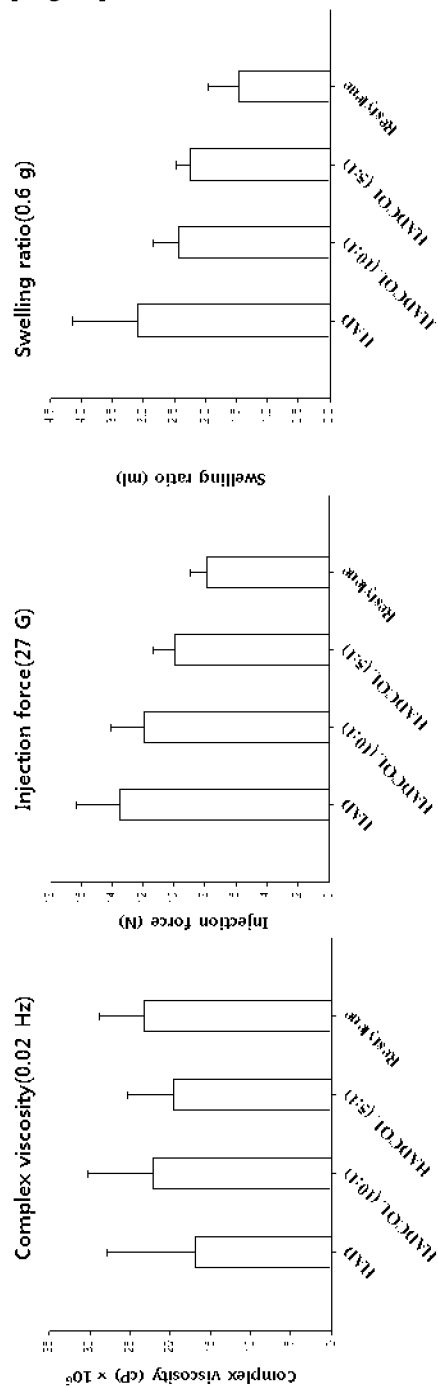
청구범위

- [청구항 1] 콜라겐 및 히알루론산 유도체를 포함하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 콜라겐은 포유류유래 콜라겐인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 포유류유래 콜라겐은 인간 탯줄유래 콜라겐인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 인간 탯줄유래 콜라겐은 I형 콜라겐인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 콜라겐과 상기 히알루론산 유도체의 혼합 비율(부피비)은 1:10 내지 10:1인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 콜라겐의 농도는 1%(w/v) 내지 3%(w/v)인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 히알루론산 유도체의 농도는 1%(w/v) 내지 3%(w/v)인 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 인간 탯줄유래 콜라겐은 (i) 과산화수소로 처리된 인간 탯줄 조직을 분쇄하는 단계; (ii) 상기 분쇄된 탯줄 조직을 아세트산 및 펩신으로 처리한 후 원심분리하는 단계; (iii) 상기 원심분리에 의해 얻은 상등액의 pH를 7로 맞추고 NaCl을 첨가하여 콜라겐을 침전시키는 단계; 및 (iv) 상기 침전된 콜라겐을 분리하는 단계를 포함하는 인간 탯줄유래 콜라겐 제조 방법에 의해 제조된 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 약물 또는 세포를 추가로 포함하는 것임을 특징으로 하는 의료용 복합 생체 소재.

[Fig. 1]

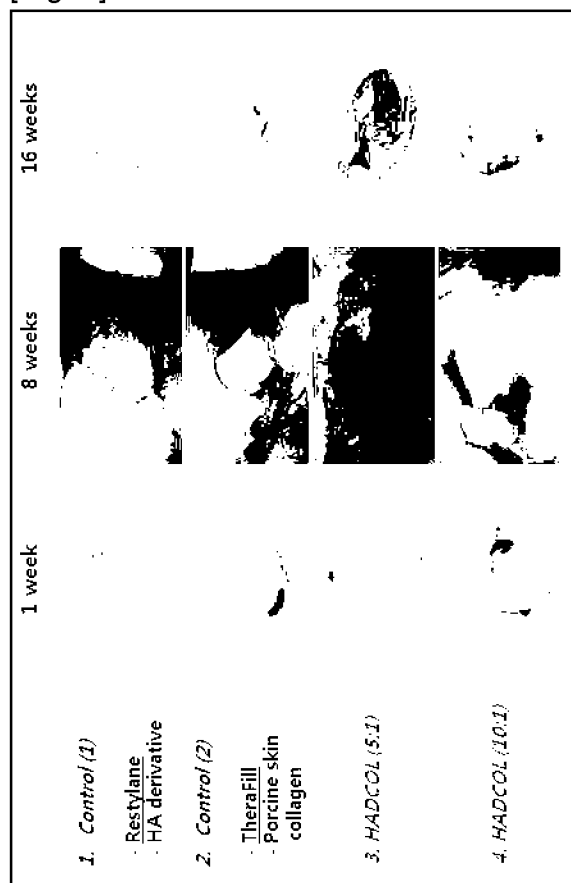


[Fig. 2]

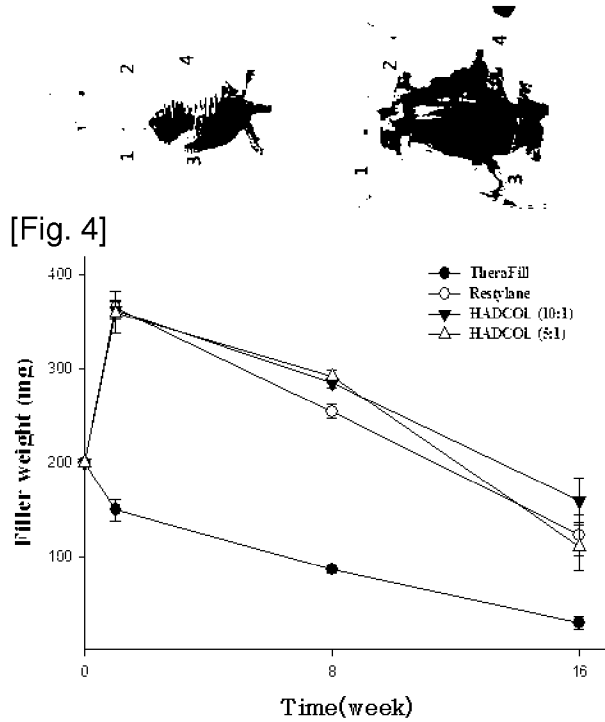


	HAD	HADCOL (10:1)	HADCOL (5:1)	Resylene
Complex viscosity (cP)	1,680,857 ± 1,103,066	2,210,473 ± 819,275	1,949,731 ± 581,680	2,316,374 ± 571,659
Injection force (N)	13.51 ± 2.77	11.93 ± 2.13	9.95 ± 1.38	7.89 ± 1.07
Swelling Ratio (ml)	3.1 ± 1.1	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.5

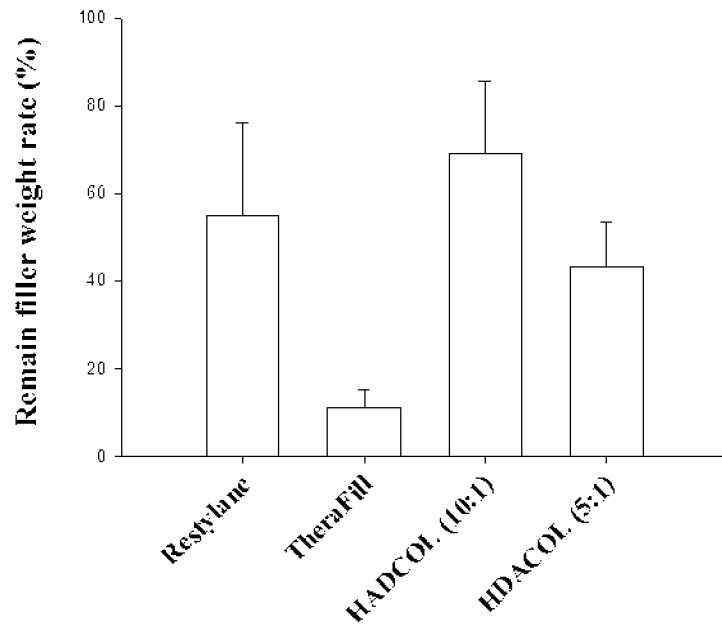
[Fig. 3]



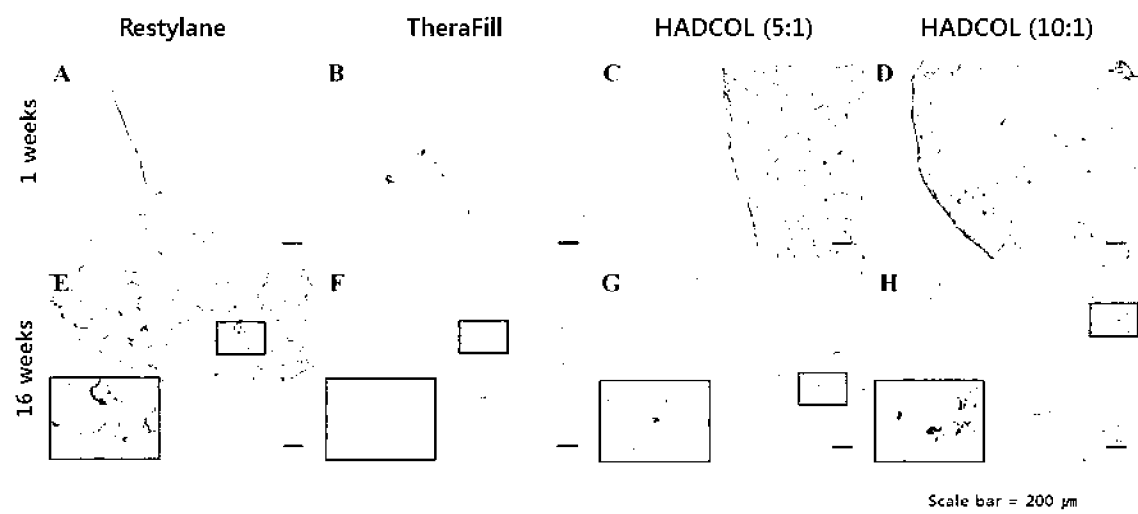
[Fig. 4]



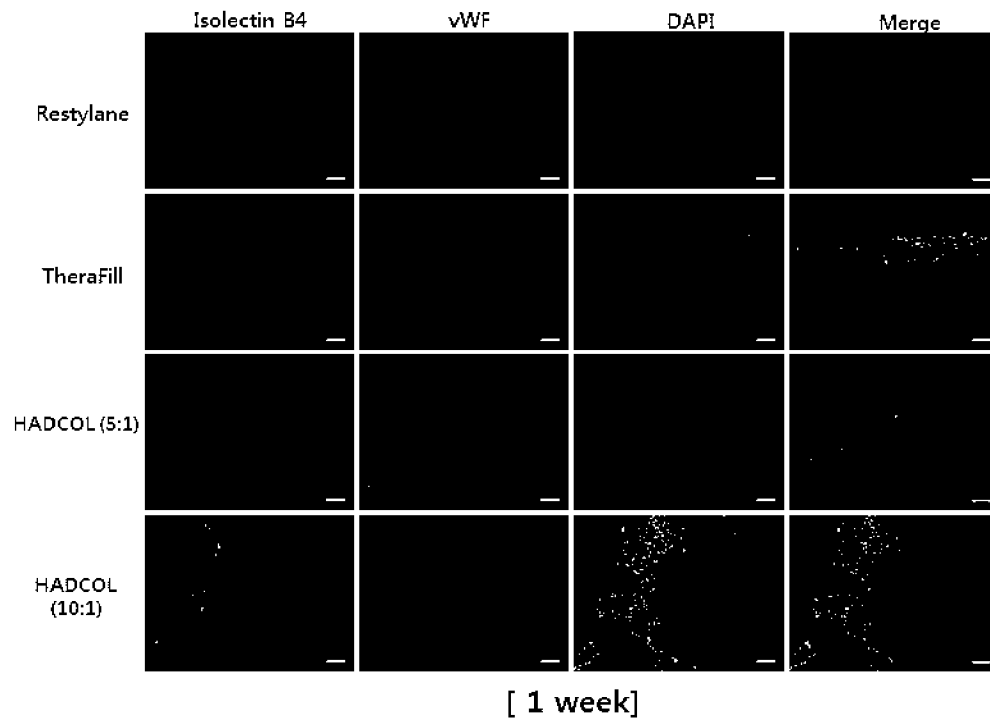
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

