



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월22일  
(11) 등록번호 10-1298442  
(24) 등록일자 2013년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61L 27/24 (2006.01) A61F 2/16 (2006.01)  
A61F 2/14 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-7003303  
(22) 출원일자(국제) 2005년08월12일  
심사청구일자 2010년08월12일  
(85) 번역문제출일자 2007년02월12일  
(65) 공개번호 10-2007-0060077  
(43) 공개일자 2007년06월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/CA2005/001240  
(87) 국제공개번호 WO 2006/015490  
국제공개일자 2006년02월16일  
(30) 우선권주장  
60/601,270 2004년08월13일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US04223984 A\*  
US04581030 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
내셔널 리서치 카운실 오브 캐나다  
캐나다 온타리오 케이1에이 0알6 오타와 몬트리올  
로드 1200  
오타와 하스피털 리서치 인스티튜트  
캐나다 케이1와이 4이9 온타리오주 오타와 파크데  
일 애버뉴 725  
(72) 발명자  
그리피스, 메이  
캐나다 온타리오주 케이0에이 1엘0 카프 스프루스  
릿지로드 1006 알.알.#3  
칼슨, 데이비드, 제이.  
캐나다 온타리오주 케이1제이 7이6 오타와 텔롱  
드라이브14  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 29 항

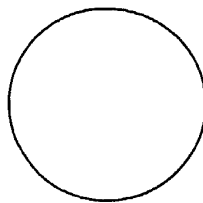
심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 안과용 장치 및 이와 관련된 방법 및 조성물

(57) 요약

시력을 향상시키거나 안구의 질환, 장애 또는 손상을 치료하기 위한 장치, 방법 및 조성물이 기술된다. 각막 온 레이, 각막 인레이 및 전층 각막 이식물과 같은 안과용 장치는 장치를 통한 또는 장치 상에서의 신경 성장을 용이하게 하는데에 효과적인 물질로써 제조된다. 물질은 1 %(w/w) 초과, 예를 들면 약 10 내지 약 30 %(w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 물질은 EDC/NHS를 사용하여 가교결합된 콜라겐-중합체 및/또는 제 2 생체중합체 또는 수용성 합성 중합체를 포함할 수 있다. 물질은 추가로 합성 중합체를 포함할 수 있다. 장치는 개인의 시력을 교정 또는 개선하거나, 개인의 안구의 질환, 장애 또는 손상을 치료하도록 안구 내에 위치된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

**리, 팽푸**

캐나다 온타리오주 케이1제이 1제이1 오타와 맥스  
톤프라이빗 19

**리우, 유웬**

캐나다 온타리오주 케이1브이 6엘7 오타와 스프링  
랜드드라이브 514-790

**라팻, 메대드**

캐나다 퀘벡주 제이9에이치 7케이7 가티노 로버트  
스튜어트 로드 112

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

가교결합된 콜라겐을 포함하는 광학적으로 등명한 생합성의 이식성 각막 장치로서, 상기 가교결합된 콜라겐은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 및 N-히드록시숙신이미드를 사용하여 콜라겐 중합체를 가교결합시키는 공정에 의해 생산된 것이고, 콜라겐을 5 내지 50 %(w/v)의 양으로 포함하는, 이식성 각막 장치.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 콜라겐의 양이 6 %(w/v) 이상인 각막 장치.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 콜라겐의 양이 10 %(w/v) 이상인 각막 장치.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 콜라겐의 양이 10 %(w/v) 내지 30 %(w/v)인 각막 장치.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 콜라겐의 양이 10 %(w/v) 내지 24 %(w/v)인 각막 장치.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 1종의 콜라겐을 함유하는 것인 각막 장치.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 2종 이상의 콜라겐을 함유하는 것인 각막 장치.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 추가로 세포성장촉진제를 포함하는 각막 장치.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 세포성장촉진제가 펩티드인 각막 장치.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 펩티드가 아미노산 서열 RGD, YIGSR 또는 IKVAV를 갖는 펩티드인 각막 장치.

### 청구항 11

제8항에 있어서, 세포성장촉진제가 신경영양인자, 신경성장인자 및 표피성장인자로 이루어진 군에서 선택되는 각막 장치.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 세포성장촉진제가 장치 전체에 걸쳐 분포되어 있는 각막 장치.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 콜라겐이 장치의 유일한 수-팽창성 중합체인 각막 장치.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 콜라겐이 pH 6.0 미만에서 가교결합된 것인 각막 장치.

### 청구항 15

제14항에 있어서, pH가 5.0 내지 5.5인 각막 장치.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 아텔로콜라겐, I형 콜라겐, III형 콜라겐 또는 이들의 배합물을 포함하는 것인 각막 장치.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 재조합 콜라겐을 포함하는 각막 장치.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 동물로부터 분리된, 프리온 없는 콜라겐을 포함하는 것인 각막 장치.

#### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 가교결합된 콜라겐이 비독성 가교제를 사용하여 콜라겐 중합체를 가교결합시키는 공정으로 생산되고, 가교는 길이가 0인 결합인 각막 장치.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 공정의 pH가 pH 서지(surge)를 방지하도록 유지되는 것인 각막 장치.

#### 청구항 21

제1항에 있어서, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-코-아크릴산), 콘드로이틴 술페이트, N,O-카르복시메틸키토산, 히아루론산, 히아루론산 알데히드 또는 알긴산염을 추가로 포함하는 각막 장치.

#### 청구항 22

제1항 내지 제18항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 이식 후 접촉감도의 회복에 효과적인 각막 장치.

#### 청구항 23

pH 6.0 미만에서 콜라겐 중합체를 가교제와 배합하는 단계; 및

가교결합된 콜라겐을 포함하는 조성물을 형성하도록 생성된 배합물을 경화하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제18항 및 제21항 중 어느 한 항의 각막 장치를 제조하는 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 배합 단계가, 생성되는 배합물 상에 높은 전단력을 제공하도록 구성된 시스템에서 콜라겐 중합체와 가교제를 혼합함을 포함하는 방법.

#### 청구항 25

제23항에 있어서, 배합을 0 내지 5 °C의 온도에서 수행하는 방법.

#### 청구항 26

제23항에 있어서, 배합물에 세포성장촉진제를 첨가함을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 27

제1항 내지 제18항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각막 장치를 안과적 질환, 장애 또는 손상을 갖는 개체의 안구와 접촉시킴으로써 상기 안과적 질환, 장애 또는 손상을 치료하기 위한 각막 장치.

#### 청구항 28

제1항 내지 제18항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 안과적 질환, 장애 또는 손상의 치료가 필요한 개체에서 상기 안과적 질환, 장애 또는 손상을 치료하기 위한 각막 장치.

## 청구항 29

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 85% 이상의 백색광 투과율을 나타내는 각막 장치.

## 명세서

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은, 본원에서 전문이 참고로 인용된, 2004년 8월 13일자로 출원된 미국 가출원 제 60/601,270 호를 기초로 우선권을 주장한다.

## 배경 기술

[0003] 1. 발명의 분야

[0004] 본 발명은, 개인의 시력을 향상시키거나 개인의 안구의 외상 또는 안과적 질환 또는 장애를 치료하기 위한 장치, 방법 및 구성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 개인에게 하나 이상의 이점을 제공하는 물질로써 제조된 각막 온레이(onlay), 각막 인레이(inlay) 및 각막 이식물에 관한 것이다.

[0005] 2. 해당 분야에 대한 설명

[0006] 미국특허 제 5,713,957 호에는, 10,000 달톤 초과 분자 유체 중량을 갖는 조직 유체 성분의 온레이 관통을 허용하기에 충분한 기공을 갖는, 비-생분해성 비-히드로겔 안구 생분해성 물질을 포함하는 각막 온레이가 개시되어 있다.

[0007] 미국특허 제 5,716,633 호에는 상피세포의 성장 및 실질층(stroma)의 재생을 촉진시키는 콜라겐/PHEMA-히드로겔이 개시되어 있다. 콜라겐-히드로겔은, 상피세포의 성장 또는 렌즈의 전면에 대한 각막 상피의 부착을 촉진하고 돕는 데에 효과적인, 보우만막에 부착되는 안과용 렌즈로서 제공될 수 있다. 콜라겐-히드로겔은, 콜라겐을 정착시키기 위한 3차원 중합체 그물을 형성하도록 콜라겐의 수성 원액의 존재 하에서 겔화되고 가교결합된 친수성 단량체 용액의 자유 라디칼 중합에 의해 형성된 히드로겔 중합체이다. 온레이 내의 콜라겐의 최종 농도는 약 0.3 내지 약 0.5 %(w/w)이다.

[0008] 미국특허 제 5,836,313 호에는 이식가능한 복합재 케라토프로스테스(keratoprosthesis)의 제조 방법이 개시되어 있다. 이 방법은 각막 상피세포의 성장에 적합한 기질을 제공하도록 고안된 케라토프로스테스를 제공한다. 각막 이식물 형상을 갖는 주형 내에 각막 조직을 넣고, 중합체 용액을 가교결합시킴으로써, 약 50 내지 100 마이크론의 두께를 갖는 생분해성 히드로겔을 각막 조직에 화학적으로 결합시켜, 케라토프로스테스를 제조한다. 아니면, 중합체 용액을 각막 조직과 예비-형성된 히드로겔 사이에 넣고, 중합체 용액이 히드로겔과 각막 조직 둘다에 커플링되도록 중합시킨다.

[0009] 미국특허 제 6,454,800 호에는 조직 세포의 부착 및 성장을 돕는 다수의 표면 만입부를 갖는 표면을 포함하는 각막 온레이 또는 각막 이식물이 개시되어 있다.

[0010] 미국특허 제 6,689,165 호에는 테더드(tethered) 각막 촉진제를 사용하여 각막 상피세포의 부착 및 이동을 증강시키는 각막 증강 및 대체를 위한 합성 장치가 개시되어 있다.

[0011] 기존 콜라겐-기재의 물질과 연관된 몇몇 문제점은, 아마도 섬유-기재의 물질의 형성 또는 이러한 물질로의 전환으로 인해서, 콜라겐-기재의 물질이 광학적으로 등명하지 않기 때문에, 바람직하지 못한 광산란을 일으킬 수 있다는 점이다.

[0012] 따라서, 개인의 시력 향상을 위해 안구에 위치하기에 적합한, 생분해성의, 안과적으로 허용가능한 물질이 필요하다.

[0013] 발명의 요약

[0014] 안과용 장치는, 개인의 안구에 위치할 때, 본체를 통해 또는 본체 상에서의 신경 성장을 용이하게 하는데 효과적인 구성물을 포함하는 본체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 장치는 시력 향상 안과용 장치이다. 또다른 실시양태에서, 장치는 치료용 안과용 장치이다. 본 발명의 시력 향상 장치는 하나 이상의 굴절이상을 교정하도록 구성된 장치라고 이해할 수 있다. 달리 말하자면, 본 발명의 장치는 굴절이상 교정 장치라고 이해할 수 있다.

본 발명의 장치의 본체는 광학적 기능(optical power)을 갖도록 형성될 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물은 광학적으로 증명하고, 약 1 내지 약 50 %(w/v 또는 w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 콜라겐의 양은 2.5 %(w/w 또는 w/v)초과이다. 본원에서 사용된 바와 같은, 콜라겐 및/또는 조성물 및 장치의 기타 성분의 양은, 본 발명의 개념에서 벗어나지 않게, w/w 또는 w/v %인 것으로 이해하도록 한다. 추가의 실시양태에서, 콜라겐의 양은 약 5.0% 초과이다. 예를 들면, 물질은 약 10 내지 약 30 %의 콜라겐을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 물질은 약 1 내지 약 50 %의 가교결합된 콜라겐을 포함하는데, 여기서 콜라겐은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드(EDC; CAS # 1892-57-5) 및 N-히드록시숙신이미드를 사용하여 가교결합된다. 추가의 실시양태에서, 가교결합된 콜라겐의 양은 2.5 내지 약 50 %이다. 물질은 제 2 콜라겐 중합체에 가교결합된 제 1 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서는, 본원에서 개시된 안과용 장치를 글루타르알데히드 없이 제조한다. 예를 들면, 안과용 장치의 제조 과정에서 가교제로서 글루타르알데히드를 사용하지 않는다. 글루타르알데히드는 글루타르알데히드 및/또는 본 발명의 조성물 및 장치에 관한 취급 및 안전성 요건 때문에 가교제로서 사용되기에 적합하지 않거나 바람직하지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서는, 안과용 장치를 세포독성 성분 없이 제조하는데, 달리 말하자면, 세포독성이 감소된 성분을 사용하여 제조한다.

[0016] 상기 장치는 각막 온레이, 각막 인레이 또는 전층(full-thickness)의 각막 이식물, 예를 들면 개인의 원래 각막을 대체하도록 구성된 장치일 수 있다. 본 발명의 장치는 투명하고, 장치로 형성되기 전에도 투명한 조성물로부터 제조될 수 있다.

[0017] 상기 장치의 물질은 하나 이상의 세포성장촉진제 또는 하나 이상의 추가의 생체중합체(biopolymer)를 포함할 수도 있다.

[0018] 본원 내용에 따르는 안과용 장치, 예를 들면 굴절이상 교정 장치의 제조 방법은, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드 및 N-히드록시숙신이미드(EDC 및 NHS)를 사용하여 콜라겐 중합체를 가교결합시킴을 포함한다. 가교결합은 산성 pH, 예를 들면 약 5.0 내지 약 5.5의 pH에서 일어난다. 이 방법은 세포성장촉진제를 가교결합된 조성물에 첨가하는 하나 이상의 단계를 포함할 수도 있다. 이 방법은 조성물을 주형 내에 넣고, 조성물이 경화되도록 하여, 안과용 장치를 형성함을 포함한다.

[0019] 본원에서 기술된 임의의 양태 또는 양태들의 조합은, 이러한 임의의 조합에 포함된 양태들이, 본원의 내용 및 명세서, 및 해당 분야의 보통 숙련자의 지식으로부터 명백해지는 바와 같이 서로 불일치하지 않는다면, 본 발명의 범주 내에 포함된다. 또한, 임의의 양태 또는 양태들의 조합은 본 발명의 임의의 실시양태로부터 특별히 배제될 수 있다.

[0020] 본 발명의 추가의 이점 및 양태는 하기 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구의 범위에서 명백해질 것이다.

### 발명의 상세한 설명

[0035] 전형적인 인간 안구는 수정체 및 홍채를 갖는다. 후안방(posterior chamber)은 홍채 뒤에 위치하고 전안방(anterior chamber)은 홍채 앞에 위치한다. 안구는 본원에서 논의되는 바와 같이 5개의 층으로 이루어진 각막을 갖는다. 층들 중 하나인 각막 상피는 각막의 외부 전면을 덮는다. 각막 상피는 주변부까지 측방향으로 연장하는 층화 편평 상피이다.

[0036] 각막의 5개의 층들은 각막 상피, 보우만막, 실질층, 데스메막 및 내피를 포함한다. 각막 상피는 통상적으로 약 5 내지 6 개의 세포 층 두께(약 50 마이크로미터 두께)를 갖고, 일반적으로 각막이 손상되면 재생된다. 각막 상피는 비교적 매끄러운 굴절 표면을 제공하고 안구 감염의 예방을 돕는다. 각막 실질층은 섬유아세포 및 각화 세포와 같은 세포가 분산되어 있는 콜라겐의 라미네이트 구조이다. 실질층은 각막 두께의 약 90%를 차지한다. 상피 하에 위치한, 실질층의 앞부분은무세포성이며 보우만막으로서 공지되어 있다. 보우만막은 상피와 실질층 사이에 위치하며, 각막을 손상으로부터 보호하는 것으로 생각된다. 각막 내피는 전형적으로, 각막으로부터 수분을 제거함으로써 각막을 탈수시키는 저-입방 또는 편평 세포의 단층이다. 인간 성인 각막은 전형적으로 두께가 약 500  $\mu\text{m}$ (0.5 mm)이고 전형적으로 혈관을 갖지 않는다.

[0037] 시력의 향상 또는 개선을 원하거나 안구의 질환, 장애 또는 외상의 치료를 필요로 하는 개인, 예를 들면 인간에게 하나 이상의 이점을 제공하는 안과용 장치가 발명되어 왔다. 본원에서 기술된 장치는 각막 온레이, 각막 인레이 또는 전층 각막 이식물로서 구성될 수 있다. 본 발명의 장치는 시력이 감퇴된 개인의 시력을 향상시키거나 시력을 잃은 개인에게 시력을 제공할 수 있다. 본원에서 기술된 장치는 특히 인공수정체를 포함하지

않는다.

- [0038] 본원에서 사용된 "광학적으로 등명한"이란 85% 이상의 백색광 투과율을 말한다. 특정 실시양태에서, "광학적으로 등명한"이란 건강한 각막, 예를 들면 90% 초과와 백색광 투과율 및 3% 미만의 산란도를 갖는 각막의 광학적 등명성을 말한다.
- [0039] 본원에서 사용된 "각막 온레이"란, 인간 또는 동물과 같은 개인의 안구의 상피 또는 상피세포층과 보우만막 사이에 위치하도록 구성된, 예를 들면 그러한 크기 또는 형상을 갖는 안과용 이식물 또는 장치이다. 이에 비해, 콘택트렌즈는 안구의 상피 상에 위치하도록 구성된다. 따라서 각막 온레이는 보우만막 전체에 걸쳐 위치하거나 보우만막 내로 연장되는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다. 이러한 부분은 장치의 면적 또는 부피의 적은 부분, 예를 들면 50% 미만을 차지한다.
- [0040] 본원에서 사용된 "각막 인레이"란, 안구의 실질층 내에 위치하도록 구성된 장치 또는 이식물이다. 실질층 내에 플랩(flap) 또는 포켓(pocket)을 형성함으로써 각막 인레이를 실질층 내에 위치시킬 수 있다. 각막 인레이는 안구의 보우만막 하에 위치된다.
- [0041] 본원에서 사용된 "전층 각막 이식물"이란 안구의 수양액(aqueous humor)의 앞에 위치한 안구의 건강하지 못한 각막의 전부 또는 일부를 대체하도록 구성된 장치이다.
- [0042] 본 발명의 안과용 장치는 감소된 세포독성을 갖거나 무-세포독성이고, 장치를 장착한 개인에게 하나 이상의 이점을 제공한다. 예를 들면, 장치는 (i) 바람직한 굴절률, (ii) 바람직한 광학적 등명성(가시광선의 경우, 동일한 두께를 갖는 건강한 인간 각막 물질의 투광률 및 광산란도와 동일하거나 더 우수한 투광률 및 광산란도), (iii) 바람직한 광학적 기능, 예를 들면 시력 향상 기능, (iv) 향상된 안락함, (v) 향상된 각막 및 상피 건강, 및 (vi) 치료적 이점, 예를 들면 안구의 질환, 장애 또는 외상의 치료 중 하나 이상을 제공한다. 본 발명의 안과용 장치는 투명하거나 투명한 물질로써 제조된다. 이러한 장치의 몇몇 예는 광학적으로 등명한 장치를 포함한다.
- [0043] (i) 허용가능한 광학적 기능을 갖는 매트릭스를 형성하도록 성형가능, 예를 들면 몰딩가능하고 (ii) 광학적으로 등명하거나 시각적으로 투명하고 (iii) 장치를 통한 및/또는 장치 상에서의 신경 성장을 용이하게 하는데 효과적인 물질로써 장치를 제조함으로써, 상기 이점 뿐만 아니라 기타 이점을 얻을 수 있다. 장치가 각막 온레이인 경우, 장치는 장치의 전면 상에서의 재-상피화(re-epithelialization)를 용이하게 하는데 효과적이다.
- [0044] 장치는, 취급, 봉합을 포함할 수 있는 이식, 및 장착후 마모 및 눈물을 견디도록 충분한 기계적 또는 구조적 성질을 갖는 물질로써 제조된다. 장치는 건강한 안구를 유지하기에 충분한 영양분 및 기체 교환을 제공하거나 허용한다. 각막 온레이와 같은, 주형 내에서 제조되는 장치는, 본원에서 논의되는 바와 같이, 가장자리 구배 및 시력 교정 곡률을 포함하는 적당한 크기 및 형상으로 몰딩될 수 있는 물질로써 제조된다.
- [0045] 본 발명의 한 실시양태에서, 시력 향상 안과용 장치는, 장치가 개인의 안구에 위치할 때, 본체를 통한 신경 성장을 용이하게 하기에 효과적인 물질을 포함하는 본체를 포함한다. 본체를 통한 신경 성장을 용이하게 함으로써, 장치를 수용하는 개인의 각막은 그것의 접촉감도를 유지한다. 본체는 광학적 기능을 갖도록 형성된다. 따라서, 본체는 렌즈 본체라고 이해될 수 있다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 장치는 각막 온레이, 각막 인레이 또는 전층 각막 이식물이도록 구성되는데, 예를 들면 그러한 크기 및 형상을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 굴절이상 교정 장치는 광학적 기능을 갖지 않을 수 있다. 예를 들면, 본원 내용에 따르는 굴절이상 교정 장치는 환자의 각막 상피와 보우만막 사이에 위치되거나 환자의 각막 실질층 내에 위치할 수 있는 블랭크(blank)라고 이해될 수 있다.
- [0046] 각막 온레이의 경우, 온레이를 형성하는 물질은 보우만막과 상피 사이의 기체 및 영양분(예를 들면 글루코스)의 교환을 제공 또는 허용함으로써, 회생가능하고 완전한 기능을 갖춘 상피를 유지한다. 기타 영양분은 상피세포와 같은 세포의 생존, 성장 및 분화를 촉진 또는 향상시키는 인자 또는 물질을 포함한다. 교환은 건강한 인간 각막의 것과 동일하거나 더 우수해야 한다. 영양분 및/또는 약물에 대한 물질의 투과도를 통상적인 기술을 사용하여 모니터링할 수 있다. 또한, 물질을 통한 영양분 및/또는 약물의 이동으로 인해 물질의 광학적 성질이 변해서는 안된다. 온레이 또는 렌티클은 완전 생분해성이고, 온레이에 대한 상피의 신속한 부착을 허용하고, 신경 지배 및 감도, 예를 들면 접촉감도의 회복을 허용한다.
- [0047] 본 발명의 안과용 장치는 세포외 매트릭스(ECM) 성분을 포함할 수 있다. 특정 장치에서, 본체 물질은 콜라겐을 포함하거나, 본질적으로 콜라겐으로 이루어지거나, 콜라겐으로 이루어진다. 콜라겐은 예를 들면 장치의 제조



동안에 EDC/NHS를 사용하여 가교결합될 수 있다. 본 발명의 히드로겔 장치 내에 제공된 콜라겐의 양은 현재 기타 안과용 장치에 사용되는 콜라겐의 양보다 많다. 예를 들면, 본 발명의 장치 내에 제공된 콜라겐의 양은, 본원에서 논의되는 바와 같이, 전형적으로 1 %(w/w) 또는 (w/v) 초과이다. 특정 실시양태에서, 콜라겐의 양은 2.5% 초과이다. 예를 들면, 콜라겐의 양은 약 5.0% 이상일 수 있다. 본 발명의 장치의 특정 실시양태에서, 콜라겐의 양은 약 1 내지 약 50 %(w/w), 예를 들면 2.5 내지 약 50 %이다. 예를 들면, 콜라겐의 양은 약 6 %(w/w) 초과이다. 또는, 물질은 약 10 내지 약 30 %(w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 해당 분야의 보통 숙련자들이 알고 있듯이, 수화된 인간 각막의 약 15 중량%는 콜라겐이다(문헌[Maurice D M: The Cornea and Sclera, pp 489-600. The Eye, Vol I, Second ed., Ed. H Davson. Academic Press, New York, 1969]을 참고). 따라서, 본 발명의 장치는 기존 안과용 장치에 존재하는 콜라겐의 양보다는 더 많고 인간 각막에 존재하는 콜라겐의 양과 훨씬 더 유사한 양의 콜라겐을 포함한다. 또한 본 발명의 장치 내에 제공된 콜라겐의 양 및 유형은 바람직한 굴절률, 바람직한 광학적 투명성, 성형성을 제공하고, 취급, 이식, 장치의 눈에의 봉합, 및 장착후 마모 및 눈물을 견디기에 효과적이다.

[0048] 비-콜라겐-기재의 부분과 같은, 안과용 장치의 나머지 부분은 물 또는 식염수와 같은 액체일 수 있거나, 생체중합체 등과 같은 하나 이상의 추가의 중합체를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 본원에서 개시된 바와 같이, 약 24 %(w/w)의 콜라겐을 포함하는 안과용 장치는 물 또는 식염수와 같은 액체를 약 76 %(w/w)로 포함할 수 있다. 달리 말하자면, 안과용 장치는, 수화된 상태에서는, 수화된 안과용 장치의 중량의 24%인 콜라겐 성분을 포함할 수 있다. 또다른 예로서, 안과용 장치는 수화된 장치의 중량의 24%인 콜라겐 성분, 및 수화된 장치의 중량의 6%인 제 2 중합체성 성분을 포함할 수 있고, 중량의 70%는 액체이다.

[0049] 해당 분야의 보통 숙련자들이 알고 있는 바와 같이, 장치가 수화되지 않은 상태에서는, 장치의 콜라겐의 양은 수화된 상태의 장치의 콜라겐의 양보다 큰 %일 수 있다.

[0050] 콜라겐은 3개의 폴리펩티드쇄를 포함하고 나선형 구조이다. 본원에서 사용된 "콜라겐 중합체"라는 용어는 3중 나선 콜라겐 분자를 말한다. 콜라겐은 약 300 nm의 길이 및 약 1.5 nm의 직경을 갖는, 막대와 유사하게 생긴 분자이다. 콜라겐 분자는, 콜라겐의 항원성의 대부분을 포함하는, N-말단 및 C-말단 둘 다 상에 "텔로펩티드(telopeptide)"라고 불리는 아미노산 서열을 갖는다. 아텔로콜라겐(atelocollagen)은 펩신 소화에 의해 수득되고(문헌[DeLustro 등, J Biomed Mater Res. 1986 Jan; 20(1): 109-20]을 참고), 텔로펩티드를 갖지 않으므로, 면역원성이 낮다는 것을 알 수 있다(문헌[Stenzel 등, Annu Rev Biophys Bioeng. 1974; 3(0): 231-53]을 참고).

[0051] 위에서 정의된 장치에서 사용되는 콜라겐은 동물, 이스트 및 박테리아 공급원을 포함하는 임의의 적합한 콜라겐 공급원으로부터 수득 또는 유래될 수 있다. 예를 들면, 콜라겐은 특히 인간 콜라겐, 소 콜라겐, 돼지 콜라겐, 새 콜라겐, 쥐 콜라겐, 말 콜라겐일 수 있거나, 재조합 콜라겐일 수도 있다. 본 발명의 장치에서 사용되는 재조합 콜라겐은, 보통의 동물성 공급원으로부터 수득되는 콜라겐 내에는 존재하지 않는 하나 이상의 구조적 또는 물리적 특성을 가질 수 있는데, 왜냐하면 재조합 콜라겐은 박테리아, 이스트, 식물 또는 유전자도입 동물로부터 수득되기 때문이다. 예를 들면, 재조합 인간 콜라겐은 동물로부터 유래되고 가공된 콜라겐 내에는 존재하지 않을 수 있는 상이한 글리코실화 성분을 포함할 수 있다. 또한, 재조합 콜라겐은 조성이 다양할 수 있는 동물-유래된 콜라겐과는 상이한 가교도를 가질 수 있다. 동물-유래된 콜라겐 내의 가교도의 변동은, 바람직하지 못할 수 있는콜라겐의 불일치성 및 화학적 및 물리적 성질의 변동을 초래할 수 있다. 재조합 인간 콜라겐은 엄격하게 제어된 순도를 가질 뿐만 아니라, 동물-유래된 콜라겐과 연관될 수 있는 바이러스 및/또는 프리온 오염과 관련이 없다. 본 발명의 장치에서 유용한 콜라겐을 공식적으로 입수하거나 통상적인 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 예를 들면, 재조합 콜라겐을 피브로겐(Fibrogen)(뮤티젠(mutigene) 이스트 생체반응기 배지로부터 제조) 또는 파밍(Pharming)(네덜란드)(유전자도입 소 또는 토끼의 젖으로부터 제조)으로부터 입수할 수 있거나, 재조합 콜라겐을 PCT 공개 제 WO 93/07889 호 또는 제 WO 94/16570 호에 개시된 방법을 사용하여 제조하고 수득할 수 있다. 특정 장치에서, 콜라겐은 I형 콜라겐일 수 있다. 장치를 아텔로콜라겐(예를 들면 텔로펩티드를 갖지 않는 콜라겐)으로써 제조할 수도 있다. 특정 실시양태에서, 콜라겐은 변성되지 않은 유형의 콜라겐이다. 아텔로콜라겐을 코켄 제팬(Koken Japan)과 같은 회사(본원에서 기술된 바와 같은 공급처 A)로부터 입수할 수 있는데, 여기서 소 콜라겐은 중성 조성물 내 3.5 %(w/v), 산성 조성물 내 3.0 %(w/v) 및 산성 조성물 내 10 %(w/v)로서 입수가능하고, 돼지 콜라겐은 산성 조성물 내 3.0 %(w/v) 또는 산성 동결건조 돼지 콜라겐 분말로서 입수가능하다. 산성 동결건조 돼지 콜라겐 분말을 니폰 햄(Nippon Ham)(일본)(본원에서 기술된 바와 같은 공급처 B)으로부터 수득할 수도 있다. 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)(본원에서 기술된 바와 같은 공급처 C)은 0.3% 산성 및 10% 산성 콜라겐 조성물을 제공한다.



[0052] 몇몇 콜라겐 유형들 중에서도, 아테로콜라겐 I는 용해의 용이함, 취급 및 최종 장치의 등명성을 제공한다. 이러한 콜라겐(중성 또는 산성 용액 중의, 또는 산성 동결건조 분말로서의, 소, 돼지 또는 재조합 콜라겐)은 전술된 바와 같은 몇몇 회사로부터 입수가 가능하다. 동결건조 산성 돼지 콜라겐은 용이하게 용해되므로, 냉수에서 4℃에서 교반함으로써, 33 %(w/v) 이하의 농도의 균질(비-유백광) 수용액을 얻는다. 용액과 같은, 등명한 콜라겐 조성물의 pH는 약 3(공급처 B) 또는 약 5(공급처 A)이다. 0.3 %(w/v) 정도로 낮은 농도의 상업적인 산성 콜라겐 조성물을, 0 내지 4℃에서 교반하면서 진공 증발시킴으로써 농축시켜, 약 10 %(w/v) 이하의 최종 콜라겐 농도를 갖는 등명한 용액을 얻을 수 있는데, 이것을 본 발명의 장치의 제조에서 사용할 수 있다.

[0053] 단리 및 정제 과정에서 변성(즉 3중 나선 구조를 전부 또는 상당 부분 잃음으로써 젤라틴이 됨) 되지 않은 I형 콜라겐을 사용함으로써, 비교적 견고하거나 강한 안과용 장치를 수득할 수 있다.

[0054] 시차주사열계량법(DSC)은 공급처의 콜라겐 용액의 품질을 그것의 3중 나선 함량을 근거로 결정하기에 유용한 기술이다(표 1). 거의 완벽한 3중 나선 함량의 경우, 변성의 DSC 엔탈피( $\Delta H_{\text{변성}}$ )는 (건조 콜라겐 중량을 기준으로) 65 내지 70 J/g이다. DSC 데이터로부터,  $\Delta H_{\text{변성}}$  결과는, 상업적인 산성 동결건조 돼지 콜라겐 용액 및 몇몇 상업적 소 콜라겐 용액은 완전한 3중 나선 구조임을 알려준다.

[0055] 낮은 3중 나선 함량을 갖는 콜라겐 용액( $\Delta H_{\text{변성}} < 5$  J/g, 공급처 C, 표 1)은, 비교적 낮은 점도를 가지며, 동일한 농도의, 100%에 가까운 3중 나선 함량을 갖는 콜라겐 조성물 또는 용액에 비해 약한 겔을 제공한다. 약 60 J/g 초과와  $\Delta H_{\text{변성}}$ 을 갖는 콜라겐 조성물(용액)이 허용가능한 안과용 장치를 제공하는 것으로 밝혀졌다.

## 표 1

[0056] 콜라겐 용액의 변성 엔탈피

상업적 콜라겐 샘플	조성	$\Delta H_{\text{변성}}$ (건조 콜라겐 J/g)
코켄(일본), 공급처 A	10% 소 콜라겐 용액	65.3
코켄(일본), 공급처 A	3% 산성 용액으로부터 농축된, 10% 소 콜라겐 용액	67.5
코켄(일본), 공급처 A	3.0% 산성 용액으로부터 농축된, 5% 소 콜라겐 용액	66.4
코켄(일본), 공급처 A	3.5% 중성 소 콜라겐 용액	68.1
코켄(일본), 공급처 A	열변성된 3.5% 중성 소 콜라겐 용액	24.4
코켄(일본), 공급처 A	3.0% 돼지 콜라겐 용액	72.0
코켄(일본), 공급처 A	동결건조 돼지 콜라겐(산성)으로부터의 5% 용액	68.1
니폰 햄, 공급처 B	동결건조 돼지 콜라겐(강산성)으로부터의 10% 용액	63.4
벡톤 디킨슨, 공급처 C	0.3% 용액으로부터 농축된 5% 소 콜라겐 용액	59.4
벡톤 디킨슨, 공급처 C	"10%" 소 콜라겐 용액	4.8
피브로젠 재조합 인간 콜라겐	0.3 wt/wt%로부터 농축된 10% 용액	67.7

[0057] 전술된 실시양태를 포함하여 특정 실시양태에서, 본체 물질은 가교결합된 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 아니면, 달리 말하자면, 본체 물질은 둘 이상의 가교결합된 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본체 물질은 제 1 콜라겐 중합체, 제 2 콜라겐 중합체 및 제 3 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 기타 물질은 셋 초과와 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 가교결합된 중합체는 안과용 장치의 콜라겐 성분으로서 이해될 수 있다.

[0058] 따라서, 본 발명에 따르는 시력 향상 안과용 장치는 약 1 내지 50 %(w/w)의 콜라겐을 갖고 광학적 기능을 갖도록 형성된 콜라겐 성분을 포함할 수 있다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 특정 실시양태에서, 콜라겐의 양은 2.5% 초과, 예를 들면 약 5.0% 이상이다. 예를 들면, 특정 실시양태에서, 콜라겐은 약 6 %(w/w) 초과이다. 예를 들면, 콜라겐의 양은 약 10 내지 약 30 %(w/w)이다. 예를 들면, 콜라겐의 양은 약 10 내지 약 24 %(w/w)일 수 있다. 특정 장치에서, 콜라겐은 장치의 유일한 수-팽창성(예를 들면 히드로겔) 중합체이다. 기타 장치에서, 콜라겐은 유일한 장치 또는 렌즈-형성 중합체일 수 있다. 예를 들면, 장치는 건조 상태에서 100%의

콜라겐을 포함할 수 있다. 앞에서 논의된 바와 같이, 특정 장치에서, 예를 들면 EDC/NHS를 사용하여, 콜라겐을 가교결합시키거나 적어도 부분적으로 가교결합시킬 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물 및 장치의 제조에서 사용되는 콜라겐 중합체는 동일한 콜라겐 공급원 또는 상이한 콜라겐 공급원으로부터 유래될 수 있다. 아니면, 달리 말하자면, 단일 유형의 콜라겐, 예를 들면 I형 아테로콜라겐(다수의 콜라겐 중합체체를 함유)을, 콜라겐 중합체들이 서로 가교결합하는 것을 허용하기에 효과적인 방식으로 가공한다. 한 실시양태에서, 콜라겐 중합체는 재조합 콜라겐이다. 또다른 실시양태에서, 콜라겐 중합체는 둘 다 동일한 동물 공급원으로부터 유래된다. 단일 조성물 내의 개별 콜라겐 중합체들은 상이한 분자량을 가질 수 있다.

[0060] 본 발명의 굴절이상 교정 장치는 가교결합된 재조합 콜라겐을 포함한다는 것을 알 수 있을 것이다. 이러한 장치 내에 존재하는 콜라겐의 양은 이전에 개시된 굴절이상 교정 장치 내의 기타 콜라겐의 양보다 더 많다. 이러한 장치는 광학적 기능을 갖도록 형성될 수 있다.

[0061] 본원에서 개시된 장치는 투명하다. 예를 들면, 장치는 광학적으로 등명해야 한다. 예를 들면, 장치는 개인의 안구 내에 위치할 때 (건강한 인간 각막 조직의 광산란도와 동일하거나 더 우수한) 최소의 광산란도를 제공해야 한다. 또한, 본원에서 개시된 장치는 굴절률을 갖는다. 특정 실시양태에서, 굴절률은 약 1.34 내지 약 1.37이다. 예를 들면, 굴절률은 1.341 내지 1.349일 수 있다. 장치가 각막 온레이 또는 각막 인레이로서 구성되는 경우, 이 장치는, 전층 각막 이식물이 요구될 수 있는, 각막이 손상되거나 질환을 갖는 안구에 위치하도록 구성되는것에 비해, 개인의 건강한 안구 내에 위치하도록 구성된다. 본 발명의 장치의 특정 실시양태에서, 장치는 황색기 또는 황색을 갖지 않는다. 예를 들면, 장치는 몇몇 콜라겐-함유 조성물과 연관될 수 있는 황색기 또는 황색을 감소시키거나 없애도록 디자인될 수 있다.

[0062] 본 발명의 장치는 전면 및 후면을 갖는다. 따라서, 장치의 본체 또는 콜라겐 성분은 전면 및 후면을 가질 수 있다. 전면 및 후면은 일반적으로 서로 반대되는 표면이다. 장치의 전면은, 장치가 안구 내에 위치할 때, 망막을 등지는 표면을 말하고, 후면은, 장치가 안구 내에 위치할 때, 망막 쪽을 향한다. 장치가 각막 온레이인 경우, 후면은 보우만막과 인접하거나 접촉할 수 있고, 전면은 각막 상피와 인접하거나 접촉할 수 있다. 장치가 각막 인레이인 경우, 전면은 보우만막과 인접하거나 보우만막 쪽을 향하고, 후면은 안구의 망막 쪽을 향하도록 실질층 내에 존재할 것이다. 장치가 전층 각막 이식물인 경우, 전면은 각막 상피 쪽으로 향하고, 후면은 각막 내피와 인접하거나 접촉할 수 있다.

[0063] 본 발명의 장치는 추가로 표면 개질되지 않을 수 있거나, 본 발명의 장치는 전면과 후면 중 하나 또는 둘 다 상에서 세포 성장 및/또는 분화에 영향을 주도록 표면 개질될 수 있다. 예를 들면, 각막 온레이는 전면 또는 후면 상에서 세포 성장에 영향을 주는 표면 개질에 적용되지 않을 수 있다. 본원에서 사용된 "세포 성장"이란 세포 또는 세포수의 증대를 말한다. 따라서, 세포 성장이란 개별 세포의 물리적 성장, 예를 들면 표면적, 부피 등의 증가, 세포의 증식, 예를 들면 세포의 분열, 및 어떤 경우에는 건강한 인간 각막에서 발견되는 바와 같은 층화된 다층을 형성하는 세포의 이동을 말한다. 세포 성장이란 신경세포의 성장, 예를 들면 장치 상에서의 또는 장치 하에서의 또는 장치를 통한 하나 이상의 신경원 과정의 연장, 및 장치의 표면 상에서의 상피세포 또는 내피세포의 성장 또는 이동 또는 증식을 말한다. 본원에서 사용된 "세포 분화"란 단일 또는 다수의 전능성(totipotent), 중복성(multipotent) 또는 미성숙 전구세포(줄기세포를 포함)가 최종 표현형을 달성하기 위해 거치는 형태학적, 생화학적 및 생리학적 변화를 말한다. 본 발명의 장치의 특정 실시양태에서, 상피세포는 각막 온레이 상에서 성장하고, 거기에 견고하게 커플링되어 있는데, 예를 들면 온레이, 특히 온레이의 전면에 직접 부착된다.

[0064] 특정 각막 온레이에서, 본체 또는 콜라겐 성분은, 온레이가 개인의 안구 내에 위치할 때, 온레이 하에서의 상피 세포 성장을 감소시키기에 효과적일도록 후면 개질된다. 추가로 또는 대안적으로, 각막 온레이는, 온레이가 개인의 안구 내에 위치할 때, 온레이의 전면 상에서의 상피세포 성장(이동을 포함)을 촉진시키기에 효과적일도록 전면 개질된 본체 또는 콜라겐 성분을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 전층 각막 이식물은, 이식물이 안구 내에 위치할 때, 전층 각막 이식물의 후면 상에서의 내피세포 성장을 감소시키기에 효과적일도록 후면 개질된 본체 또는 콜라겐 성분을 포함할 수 있다. 전층 각막 이식물은 전면 개질되지 않을 수 있다.

[0065] 세포 성장을 감소시킬 수 있는 표면 개질의 예는, 전면과 후면 중 하나 또는 둘 다 상에  $CF_4$  또는  $C_3F_8$ 과 같은 플라스마-중합 플루오르화 단량체 필름을 제공하기, 표면들 중 하나 또는 둘 다 상에 낮은 자유 표면 에너지를 제공하기, 및/또는 표면들 중 하나 또는 둘 다를 친수성으로 만들기를 포함한다. 표면들 중 하나 또는 둘 다

상에 알긴산염 코팅을 제공함으로써, 표면을 친수성으로 만들 수 있다.

[0066] 장치는 장치 상에서의 또는 장치를 통한 세포 성장을 용이하게 하는 하나 이상의 세포성장촉진제를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포성장촉진제는 펩티드를 포함한다. 예를 들면, 세포성장촉진제는 RGD, YIGSR 또는 IKVAV를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 펩티드일 수 있다. I형 콜라겐 그 자체는 RGD 서열의 풍부한 공급원이다. 특정 실시양태에서, 세포성장촉진제는 신경영양인자(neurotrophic factor) 또는 분자의 생체활성 또는 신경영양 부분이다. 예를 들면 신경영양인자는 신경성장인자(NGF), 표피성장인자(EGF 또는 HB-EGF) 또는 염기성섬유아세포성장인자(bFGF 또는 FGF-2)일 수 있다. 세포성장촉진제를, 장치의 콜라겐 성분 또는 본체와 일체형으로 형성할 수 있는데, 달리 말하자면, 세포성장촉진제를 실질적으로 장치 전체에 걸쳐 제공할 수 있다. 이에 비해, 몇몇 안과용 장치는 장치의 한 표면에만 제공된 펩티드를 포함한다.

[0067] 특정 실시양태에서, 콜라겐-기재의 안과용 장치는 장치 제조 과정에서 산성 pH에서 가공된 콜라겐 성분을 포함한다. 콜라겐 성분이 제 2 콜라겐 중합체에 가교결합된 제 1 콜라겐 중합체를 포함하는 경우, 산성 pH가 특히 유용하다. 이러한 장치의 제조에서 사용되는 산성 pH는 전형적으로 약 6.0 미만인데, 예를 들면 pH는 약 5.0 내지 약 5.5일 수 있다. 산성 pH를 유지하고 pH 조정 동안에 pH 서지(surge)를 방지 또는 감소시킴으로써, 콜라겐의 원섬유형성(fibrillogenesis)을 감소시킨다. 또한, pH를 약 5.0 보다 높게 유지하면, pH가 5.0 미만인 경우만큼 빠르게 콜라겐이 열화되지는 않는다.

[0068] 임의의 소형 또는 중합체성 콜라겐-반응성 물질 또는 분자를 사용하여, 콜라겐 중합체를 가교결합시킬 수 있다. 가교결합화학에서는, 해당 분야의 보통 숙련자들이 통상적으로 알고 있는 통상적인 방법 또는 신규한 약품을 사용할 수 있다. 콜라겐 중합체를 가교결합시킴으로써, 장치는 광학적 등명성을 유지할 수 있고 생분해를 견뎌낼 수 있다.

[0069] 특정 실시양태에서, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드(EDC; CAS #1892-57-5) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 사용하여 콜라겐 중합체를 가교결합시킨다. 달리 말하자면, 장치의 제조에서 사용되는 가교제는 EDC/NHS이다. 콜라겐 중합체와 EDC/NHS 가교제를, pH 서지를 방지하면서 산성 pH에서 함께 혼합한다. 충분히 혼합한 후, 혼합된 조성물의 일부를 주형에 넣고, 이것이 주형 내에서 경화되도록 하여, 안과용 장치를 형성한다. 콜라겐과 CSC를 가교결합시키는데 수용성 EDC/NHS를 사용하는 것의 장점 중 하나가 길이가 0인 (아미드) 결합을 형성한다는 것이다. 이로써 그래프팅된 독성 물질이 조직 내로 침출할 가능성이 감소한다. 또한, 반응하지 않은 약품 및 EDC/NHS 반응의 부산물이 수용성이므로, 겔 형성 후 이것들을 쉽게 제거할 수 있다.

[0070] 특정 실시양태에서, 세포독성이 감소된 가교물질 또는 가교제를 사용하여 콜라겐 중합체를 가교결합시킨다. 이러한 가교제는 바람직하게는, 안과용 장치가 개인의 안구 내에 위치할 때, 자극 또는 부작용을 일으키지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 가교제는 글루타르알데히드 이외의 가교제이다. 글루타르알데히드가 특정 실시양태에서는 유용한 가교제일 수 있지만, 글루타르알데히드는 취급 및 안전성 요건 때문에 바람직하지 않을 수 있다.

[0071] 추가의 실시양태에서, 공정은 추가로, 콜라겐 조성물과 혼합될 수 있는, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-코-아크릴산), 콘드로이틴 술페이트, 케라탄 술페이트, 더마탄 술페이트, 엘라스틴, 키토산, N,O-카르복시메틸키토산, 히아루론산, 히아루론산 알데히드 및 알긴산염 중에서 하나 이상의 성분을 사용함을 포함할 수 있다. 따라서, 안과용 장치는 콜라겐 성분, 예를 들면 가교결합된 콜라겐 중합체의 매트릭스, 및 생체중합체를 포함하는 하나 이상의 비-콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 비-콜라겐 중합체를 함께 가교결합시키고/시키거나 콜라겐 중합체에 가교결합시켜 가교결합된 중합체의 네트워크 또는 매트릭스를 형성할 수 있다.

[0072] 특정 실시양태에서, 조성물을 비교적 좁은 채널 또는 통로를 통해 함께 혼합함으로써 상이한 조성물들 사이에 강한 전단을 유도한다. 한 실시양태에서는, 조성물을 주사기 시스템을 사용하여 혼합한다. 혼합은 점성 콜라겐 용액과 약품 사이에 강한 전단을 유도하는 좁은 채널을 통한 주사기 펌핑에 의존한다. 채널 직경은 주사기 또는 기타 유사한 장치의 점도 및 파열강도에 알맞는 것으로 선택된다. 높은 점도(예를 들면 20 내지 30 % (w/v) 콜라겐 용액)의 경우, 손을 사용하면 보다 높은 압력을 달성할 수 있기 때문에, 소직경 주사기 플런저를 갖는 저용량 주사기를 사용한다. 혼합을 산성 pH(예를 들면 약 5.0 내지 약 5.5) 및 저온(예를 들면 약 0 내지 약 5 °C)에서 수행한다.

[0073] 기타 안과용 장치에 비해, 살아있는 세포를 사용하지 않고서 본 발명의 장치를 제조한다. 따라서, 본 발명의 발명자들은 살아있는 각막 세포를 사용하지 않고서 비교적 높은, 거의 생리학적 농도의 콜라겐을 함유한 조성물

및 안과용 장치의 신규한 제조 방법을 발명하였다. 또한, 본 발명의 장치는 기타 장치에서 콜라겐의 교차-반응성을 증가시키는데 사용되는 합성 덴드리머 성분을 실질적으로 또는 전혀 포함하지 않는다.

[0074] 추가의 신경-친화성(nerve-friendly) 물질을 본 발명의 장치의 제조 과정에서 사용할 수 있다. 이러한 물질을 본원에서 개시된 방법으로 제조하고, 해당 분야의 보통 숙련자에게 통상적으로 알려진 통상적인 방법, 예를 들면 세포 배양 시스템 등을 사용하여, 신경 성장과 같은 신경-친화도에 대해 시험한다. 예를 들면, 물질을, 2003년 8월 11일자로 출원된 WO 2004/015090에 개시된 방법을 사용하여 시험하고 동정할 수 있다.

[0075] 본원에서 개시된 장치는 안구의 각막 영역 주위로 안구 내에 위치하도록 구성, 예를 들면 그러한 크기 및 형상을 갖는다. 장치가 각막 온레이인 경우, 온레이는 약 4 내지 약 12 mm, 예를 들면 약 6 mm의 직경을 가질 수 있다. 온레이는 약 30  $\mu$ m 미만, 예를 들면 약 10 내지 약 30  $\mu$ m의 가장자리 두께를 가질 수도 있다. 온레이는 약 70  $\mu$ m의 중심 두께를 가질 수도 있다.

[0076] 온레이 형상의 주형을 폴리프로필렌으로부터 제조할 수 있고, 이것은 4 mm, 6 mm, 8 mm 또는 12 mm의 직경을 가질 수 있다. 주형은 비교적 뾰뚱하고(예를 들면 닫힌 동안에 휘어지지 않음), 충전물을 보여줄 수 있도록 투명해야 한다. 주형은 미세하게 점점 가늘어지는(예를 들면 약 10  $\mu$ m) 온레이 가장자리, 또는 약간 가파른(예를 들면 약 30  $\mu$ m) 온레이 가장자리를 제공하도록 구성된다.

[0077] 각막 이식물 주형(전층 또는 부분층)은 약 12 mm의 직경을 가질 수 있다. 이식물 주형은 각막의 원하는 곡률 및 두께를 갖도록 성형된다. 필요하다면, 안과용 장치(예를 들면 히드로겔)를 이식 과정에서 필요로 하는 바와 같이 원형절제(trephine)할 수 있다.

[0078] 본 발명의 굴절이상 교정 장치의 한 예가 도 8 및 도 8A에 도시되어 있다.

[0079] 본원에서 개시된 각막 온레이는, 개인의 안구의 하나 이상의 파면수차(wavefront aberration)를 교정하도록 구성될 수도 있다. 파면 기술 및 파면수차의 측정에 관한 내용은 미국특허 제 6,086,204 호(Magnate) 및 제 WO 2004/028356 호(Altmann)에 제공되어 있다. 온레이로 하여금 교정에 적합한 형상을 갖도록 하는데 필요한 형상으로 주형을 성형함으로써, 각막 온레이를 파면수차의 교정에 적합하도록 성형할 수 있다. 각막 온레이에서 파면수차 측정을 사용하는 방법은 2004년 5월 20일자로 출원된 미국특허출원 제 60/573,657 호에 개시되어 있다. 온레이를 파면수차의 교정에 적합하도록 삭마(ablate)할 수도 있다. 예를 들면, 레이저 또는 레이저-유사 장치, 선반(lathe) 및 기타 적합한 렌즈 성형 장치를 사용하여, 온레이를 삭마할 수 있다.

[0080] 본원에서 개시된 각막 온레이는 다수의 상이한 대역을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 각막 온레이는 광학적 대역 및 주변 대역을 포함할 수 있다. 전형적으로 광학적 대역은 주변 대역으로 둘러싸여 있는데, 달리 말하자면, 광학적 대역은 대체로 온레이의 광축(예를 들면 중심 광축)을 중심으로 그 주위에 위치하고, 주변 대역은 각막 온레이의 광학적 대역의 가장자리와 주변 가장자리 사이에 위치한다. 환자가 겪는 특정 시력 감퇴에 따라서는, 추가의 대역 및 온레이 구조가 온레이에 제공될 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명의 각막 온레이는 비-경계 대역, 예를 들면 시각적으로 또는 광학적으로 감지가능한 경계를 갖지 않는 둘 이상의 대역을 가질 수 있다. 온레이의 대역들은 매끄럽고 연속적일 수 있고, 온레이는 굴절이상 뿐만 아니라, 굴절이상의 교정과 별개로 또는 그것과 더불어 안구 및/또는 광학적 장치의 기타 광학적 수차를 교정하도록 광학적으로 최적화될 수 있다. 해당 분야의 숙련자가 알고 있는 바와 같이, 각막 온레이는 근시, 원시, 난시 및 노안을 포함하지만 여기에만 국한되지는 않는 시력 감퇴를 교정하도록 구성될 수 있다. 온레이는 안구의 실질층 상에 제공된 광학적 수단 또는 물리적 수단 중 하나 또는 둘 다를 사용하여 시력 감퇴를 향상시키거나 개선할 수 있다. 따라서, 각막 온레이는 단초점 렌즈이거나, 이중초점 렌즈를 포함하지만 여기에만 국한되지는 않는 다초점 렌즈일 수 있다.

[0082] 추가로 또는 대안적으로, 각막 온레이는 원환체(toric) 렌즈일 수 있다. 예를 들면, 온레이는 난시를 갖는 안구 상에 위치할 때, 난시를 교정하거나 감소시키는데 효과적일 수 있는 원환체 영역을 포함할 수 있다. 온레이는 온레이의 후면 상에 위치한 원환체 영역을 포함할 수 있거나, 온레이는 전면 상에 위치한 원환체 영역을 포함할 수 있다. 유리하게도, 원환체 온레이는, 온레이가 안구 상에 적당하게 위치한 상태를 유지시키는 밸러스트(ballast) 없이 사용될 수 있는데, 왜냐하면 온레이는 장치 상피에 의해 비교적 정해진 위치에 고정될 수 있기 때문이다. 그러나, 밸러스트는 원한다면 제공될 수 있다. 특정 실시양태에서, 온레이는 프리즘과 같은 밸러스트를 포함하거나, 하나 이상의 하층(inferior) 및/또는 상층(superior)의 얇은 대역과 같은 하나 이상의 얇아진 영역을 포함할 수 있다. 노안을 교정하도록 구성된 온레이에서, 온레이는 동심원형, (양성 및/또는 음성



구면 수차를 갖는) 비구면형, 회절형 및/또는 다중-대역(multi-zone) 굴절형과 같은 하나 이상의 디자인을 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명은 합성 또는 비-천연 조성물과 같은 조성물도 포함한다. 조성물은 완전 또는 부분 합성일 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 광학적으로 증명된 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 본원에서 개시된 하나 이상의 안과용 장치의 제조에서 사용될 수 있다. 대안적으로는, 조성물은 비-안과용 조성물로서 비-안과용 장치에서 사용될 수 있거나 안과용 장치에서 사용될 수 있고 굴절이상 교정 효과를 제공하지 않을 수 있다. 또다른 실시양태에서, 본원 내용에 따르는 조성물은 수화된 상태의 약 1 %(w/w) 초과 콜라겐을 포함하고 광학적으로 증명하다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 콜라겐의 양은 2.5% 초과, 예를 들면 약 5.0 % 초과일 수 있다. 예를 들면, 조성물은 수화된 상태의 약 1 또는 2.5 또는 약 5.0 내지 약 30 %(w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 약 6 %(w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 조성물은 약 10 내지 약 24 %(w/w)의 콜라겐을 포함할 수 있다. 조성물은, EDC/NHS에 의해 가교결합된, 수화된 상태의, 약 1 %(w/w) 초과 가교결합된 콜라겐을 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 조성물은 둘 이상의 콜라겐 중합체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 전술된 바와 같이 제 2 콜라겐 중합체에 가교결합된 제 1 콜라겐 중합체를 포함한다. 조성물은 글루타르알데히드와 같은 세포독성 물질을 실질적으로 또는 전혀 포함하지 않을 수 있다.

[0085] 본원에서 개시된 안과용 장치를 임의의 적합한 방법 또는 기술을 사용하여 안구 내에 위치시킬 수 있다.

[0086] 예를 들면, 보우만막으로부터 상피의 일부를 제거 또는 분리함으로써, 각막 온레이를 안구의 보우만막 상에 위치시킬 수 있다. 특정 상황에서는, 에탄올과 같은 알코올을 특정량으로 각막 상피에 도포하여 상피를 안구로부터 벗겨낼 수 있다. 알코올은 약 10 내지 약 60 %, 예를 들면 약 20 또는 약 50 %의 농도일 수 있다. 에탄올을 약 37℃(예를 들면 체온)으로 가온하는 것은 상피 제거를 촉진시키는데 효과적일 수 있다. 이러한 상피 제거 기술은 현재 실행되고 있는 라섹(LASEK) 기술과 유사하다.

[0087] 또다른 상황에서는, 각막 온레이를 상피 플랩 하에 또는 상피 포켓 내에 위치시킴으로써, 온레이를 보우만막 상에 위치시킬 수 있다. 이러한 플랩 및 포켓을, 절단 장치, 둔개 도구 등을 사용하여 만들 수 있다. 각막 온레이를 안구 내에 위치시키는 방법의 예는 2003년 9월 12일자로 출원된 미국출원 제 10/661,400 호 및 2004년 5월 20일자로 출원된 미국출원 제 60/573,657 호에 개시되어 있다.

[0088] 실질층내 포켓 또는 각막 플랩을 형성하고 각막 인레이를 이러한 포켓 내에 또는 플랩 하에 위치시킴으로써, 각막 인레이를 안구 내에 위치시킬 수 있다.

[0089] 각막의 손상되거나 질환이 있는 부분을 제거하고 각막 이식물을 각막의 제거된 부분의 영역 내에 또는 그 근처에 위치시킴으로써, 전층 각막 이식물을 안구 내에 위치시킬 수 있다.

[0090] 겸자, 또는 2003년 9월 12일자로 출원된 미국특허출원 제 10/661,400 호 및 2004년 5월 20일자로 출원된 미국특허출원 제 60/573,657 호에 기술된 바와 같은 임의의 기타 적합한 삽입기를 사용하여, 본원에서 개시된 안과용 장치를 안구 내에 위치시킬 수 있다.

[0091] 안과용 장치를 안구 내에 위치시키는 것을 용이하게 하기 위해서, 장치는 시각화(visualization) 성분을 포함할 수 있다. 시각화 성분은 장치가 안구 내에 삽입 또는 위치되는 동안 장치를 쉽게 알아볼 수 있게 하는 임의의 적합한 요소일 수 있다. 예를 들면, 시각화 성분은 장치의 회전 배치를 도울 수 있는 하나 이상의 마크(marking)를 포함할 수 있고, 시각화 성분은 생분해성 또는 비-세포독성 염료와 같은 염료 또는 착색제를 포함할 수 있다.

[0092] 본 발명의 안과용 장치 및 이러한 장치의 제조 방법 및 사용 방법과 관련한 추가의 상세한 내용이, 본 발명을 예시할 뿐 제한하지는 않는 하기 실시예에서 제공된다.

## 실시예

### [0093] 실시예 1

### [0094] 콜라겐-기재의 각막 온레이의 제조

[0095] 전형적으로, 수성 완충액 중 콜라겐 용액 0.5 내지 2.0 ml를, 공기 기포 포집(air bubble entrapment) 없이 약 0℃에서, 수성 완충액 중 가교제 0.01 내지 0.50 ml와 혼합하였다. 몇몇 조성물에서는, 콜라겐 이외의 제 2 생

체중합체를 조성물에 첨가하였다.

- [0096] 조성물을 혼합하기 위해, 조성물을 함유하는 주사기를 테프젤 티-단편(Tefzel Tee-piece)(업타이트 피팅스(Uptight Fittings))에 연결하여, 점성 콜라겐 용액의 철저한 혼합 및/또는 pH 서지 없이 제어된 중화를 허용하는 마이크로-매니폴드를 형성한다. pH 서지는 종종 콜라겐의 비가역적인 섬유아세포형성을 초래하여 불투명한 매트릭스를 제공한다.
- [0097] 더욱 구체적으로는, 제 1 루어 어댑터를 사용하여, 티-단편의 스레드(thread) 구멍의 저부에 꼭 들어맞는 크기로 절단된 격벽을 유지한다. 격벽은 레스텍 코포레이션(Restek Corporation)의 "아이스 블루(Ice Blue)" 17 mm 범용 22397 격벽을 절단한 것이었다. MES(2-[N-모르폴리노]에탄술포산) 완충액과 같은 완충액을 함유하는 제 1 주사기를 제 2 루어 어댑터에 넣고 임의의 공기 기포를 완충액과 함께 밀어냈다. 콜라겐 용액을 제 2 주사기에 넣고 이것을 3개의 루어 어댑터가 장착된 (도 1에 도시된 바와 같은) 테프젤 티-단편의 제 3 루어 어댑터에 연결하였다(도 2). 완전한 조립체가 도 3에 도시되어 있다.
- [0098] 티-단편 내의 좁은 구멍 채널(예를 들면 약 0.5 내지 약 0.25 mm)을 통해 흐르는 유체가 액체를 강하게 전단하도록, 티-단편을 통해 제 1 주사기와 제 2 주사기 사이에서 반복적으로 펌핑함으로써, 콜라겐 용액을 MES 완충액과 완전히 혼합하였다. pH를 5.0 내지 5.5로 조정하였다. 이어서 0 내지 4 °C에서 콜라겐/완충액 혼합물과 EDC 및 NHS 용액(EDC:NHS의 몰당량비가 1:1)을 또다른 주사기를 사용하여 매니폴드에 통과시킴으로써, 이것들을 혼합하였다.
- [0099] 각각의 실질적으로 균질한 용액의 액적을 온레이 주형 내로 즉시 분배시키고, 100% 습도 환경에서, 우선 실온에서 5 내지 24 시간(예를 들면 15 시간) 동안 경화시킨 후, 37°C에서 15 내지 24 시간 동안 경화시켰다.
- [0100] 각각의 최종 온레이 샘플을, 2시간 동안 인산염 완충 식염수(PBS)에 함침시킨 후, 조심스럽게 그것의 주형으로부터 분리하였다.
- [0101] 어떤 경우, 이러한 겔을 제 2 반응성 생체중합체의 수용액에 함침시켜, 추가로 가교결합시키고 신규한 생물학적 인자를 부가할 수 있다.
- [0102] 마지막으로, 가교결합된 온레이 히드로겔을 20°C에서 PBS 용액(PBS 중 0.5%, 1% 클로로포름을 함유)에 함침시켜, 임의의 반응성 잔사를 중결시시키고, 반응 부산물을 추출시켰다. 이러한 멸균 평형 수화 온레이를 모든 시험 전에 PBS로써 철저하게 행구었다.
- [0103] 보다 높은 콜라겐 농도(10% 이상)에서 몇몇 콜라겐/EDC-NHS 용액으로부터 제조된 겔의 경우, 겔을 우선 pH 9.1 완충액에 함침시켜 임의의 잔여 반응을 중결시시키고 클로로포름-포화된 PBS에 저장하기 전에 반응 생성물을 적당하게 추출시켰다. 이러한 염기성 추출로 인해 이러한 샘플의 경우에는 상피 세포독성 문제가 없어졌다. 많은 화학양론의 경우, 클로로포름-포화된 PBS에 함침시킨 후, 클로로포름 잔사를 제거함으로써, 멸균 무-세포독성 겔을 얻었다.
- [0104] 실시예 2
- [0105] 세포성장촉진제를 함유하는 안과용 장치
- [0106] 펜타펩티드(YIGSR, 라미닌 거대분자 내의 활성 단위)와 같은 세포성장촉진제를 단독으로, 또는 시너지적(synergistic) 펩티드, 예를 들면 IKVAV, 시너지적 IGF를 함유하는 것, 및 상피 건강을 촉진하는 물질 P 펩티드, EGF, NGF, FGF 또는 이러한 분자들의 일부와 함께, 제 2 EDC-NHS 반응성 생체중합체를 갖는 것을 포함하여 임의의 콜라겐/EDC-NHS 가교결합된 장치에 도입시킬 수 있다. YIGSR의 경우, 이러한 세포성장촉진제의 커플링을, 촉진제 상의 티로신 잔사의 자유 아민 말단기의 반응성을 통해, 달성할 수 있다. 겔화 후 철저한 추출을 수행하여, 임의의 미결합 세포성장촉진제를 제거할 수 있다.
- [0107] 안과용 장치의 구체적인 배합에 관한 상세한 내용은 하기 실시예 3 내지 13 및 표 2에 제공된다.
- [0108] 실시예 3
- [0109] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 °C에서 시작하여 21°C에서 15 시간 동안 유지된 후 37°C에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)/N-히드록시숙신이미드(NHS) + 콜라겐을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.



- [0110] 실시예 4
- [0111] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, COP + EDC-NHS + 콜라겐을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다. [70℃에서 질소 하에서 1,4-디옥산 중 NiPAAm과 AAc를 2,2'-아조비스-이소부티로니트릴 개시제와 자유 라디칼 중합시킴으로써, COP라는 공중합체인 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-코-아크릴산)을 제조하였다].
- [0112] 실시예 5
- [0113] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, EDC-NHS + 콘드로이틴 술페이트 C(ChS) + 콜라겐을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0114] 실시예 6
- [0115] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + N,O-카르복시메틸키토산(CMC)을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0116] 실시예 7
- [0117] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 2 시간 동안 유지되는 온도, 겔을 PBS 중 키토산 (1% 수용액, 5000 Da)에 4시간 동안 함침시켜 2차 가교결합시킴, 마지막으로 37℃에서 15시간 동안 유지되는 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + N,O-카르복시메틸키토산(CMC)을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0118] 실시예 8
- [0119] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + 히아루론산(HA)을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0120] 실시예 9
- [0121] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + 콘드로이틴 술페이트(ChS) + 히아루론산(HA)을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0122] 실시예 10
- [0123] PBS에서 pH 7 내지 8, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도의 조건에서, 콜라겐 + 히아루론산 알데히드(HA-CHO) + 소듐 시아노보로히드라이드를 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다. HA(0.1g)를 21℃에서 2시간 동안 과요오드산나트륨(0.05g)으로써 산화적 분해시킴으로써, HA-CHO를 제조하였다. 수용액을 2일 동안 물에 대해 투석시켰다.
- [0124] 실시예 11
- [0125] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + 알긴산염을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.
- [0126] 실시예 12
- [0127] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 2 시간 동안 유지되는 온도, 겔을 PBS 중 키토산 (1% 수용액, 5000 Da)에 4시간 동안 함침시켜 2차 가교결합시키는 조건에서, 글루타르알데히드("Glut", 수중 1%로 희석됨) + 콜라겐을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다. 주형 내의 겔을, PBS에서 제거하기 전에, 15시간 동안 37℃로 가온하였다.
- [0128] 실시예 13
- [0129] MES 완충액에서 pH 5.5, 0 내지 4 ℃에서 시작하여 21℃에서 15 시간 동안 유지된 후 37℃에서 15시간 동안 유

지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, 콜라겐 + EDC-NHS + 키토산을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.

**[0130]** 실시예 14

PBS 완충액에서 pH 7 내지 8, 0 내지 4 °C에서 시작하여 21°C에서 15 시간 동안 유지된 후 37°C에서 15시간 동안 유지된 온도, 및 1:1의 EDC:NHS 몰당량비의 조건에서, EDC-NHS + 콘드로이틴 술페이트 C(ChS) + 콜라겐을 사용하여, 실시예 1에 기술된 바와 같이 안과용 장치를 제조하였다.

실시예 3 내지 14의 모든 장치는, 하기 표 2에 명시된 상업적인 콜라겐 및 반응물 비 모두를 갖는 견고하고 깨끗하고 가요성인 겔을 제공한다.

온레이 용도를 위한 몇몇 히드로겔은 DSC, 광학적 투명성 및 굴절률, 측정값, 인장성(강직도(stiffness), 최대 인장강도, 파단신장도, 표 2) 및 생체내 성능에 의해 특징지어졌다. 모든 예에 대해 반응 후 겔 상에서 DSC를 측정한 결과, 변성온도의 증가 및  $\Delta H_{\text{변성}}$ 의 감소가 관찰되었으며, 이는 콜라겐의 가교결합과 일치하는 결과였다. 표 2의 모든 배합물의 굴절률은 1.341 내지 1.349였다.

**[0134]** 실시예 15

**[0135]** 시험관내 온레이 성능(표 2)

리(Li) 등의 문헌[PNAS 100:15346-15351(2003)]에 개시된 방법을 사용하여, 어떻게 상피세포(인간 불멸화 각막 상피세포, HCEC)가 성장하여 히드로겔 상에서 합류상태(confluence)에 도달하는지를 평가하고(합류상태 도달 시간), 어떻게 HCEC 세포가 히드로겔 상에서 증화하는지를 평가하고, 히드로겔 상에서 및 히드로겔 내로의 병아리 후근신경절 신경 성장을 평가하였다(테이타가 유효한 경우, 후자는 마이크론/일 성장으로서 기록됨).

인간 각막은 완전한 제거된 지 3 내지 5 일 후 상피를 회복한다.

시험관내 시험 기간은 통상적으로 약 6 내지 8 일이었지만, 보다 우수한 배합물은 3 내지 5 일 이하 이내에 합류상태에 도달하도록 재-상피화를 허용하였다. 보다 조밀한 겔(> 5% 콜라겐)의 경우, 많은 배합물의 대한 시험관내 시험에서 우수한 겔상(over) 신경 성장(300 마이크론)이 관찰되었다. 겔내(in) 신경 성장은 겔 강직도가 증가함에 따라 급격히 둔화되었지만 심층(in-depth) 현미경에 의해서는 관찰되었다.

**표 2**

**[0139]** 히드로겔의 조성 및 성능

실시예 번호	콜라겐 공급처(표 1)(최초 농도, wt/vol %)	콜라겐/XL 당량비 또는 (wt/wt)	겔 내의 최종 콜라겐 농도 (w/v%)	최대 응력, g 힘*	m 파단신장도 (mm)*	강직도 s, g/mm*	시험관내 상피세포, 합류상태 도달시간	6일 이내의 시험관내 신경 성장**
2	B, AFDP: (10%에서 용해됨)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=5:1 Col:YIGSR=5:0.0001	7.2				3-5	겔상: 빠름 겔내: 27μm/d
3	A, (10% 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=5:1	7.3	8.0	2.6	4.0		
3	B, AFDP: (10%에서 용해됨)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=5:1	7.3	9.7	4.0	4.4	2-3	겔상: 빠름 겔내: 40μm/d
3	B, AFDP: (15%에서 용해됨)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=5:1	10.8	13.08	4.6	3.0	2-3	
3	B, AFDP: (20%에서 용해됨) 350μm 두께 겔	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=10:1	14.3	11.95	4.3	3.0	2-3	

3	B, AFDP: (32%에서 용해됨)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=1:1	18.0	14			2-3	겔상: 빠름 겔내: 30 $\mu$ m/d
3	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=1:1	2.7	3.1	2.0	1.7	3-5	겔상: 빠름
5	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:ChS=(9:1)	2.7	2.5	1.8	1.4	3	겔상: 빠름 겔내: 41 $\mu$ m/d
5	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:ChS=(4:1)	2.7	2.7	1.8	1.5	3	겔상: 빠름 겔내: 73 $\mu$ m/d
5	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:ChS=(3:1)	2.7	3.1	1.5	1.5	3	겔상: 빠름 겔내: 70 $\mu$ m/d
6	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=1:1 Col:CMC=(1:0.5)		3.6	1.6	2.0		
6	B, AFDP: (32%에서 용해됨)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=1:1.3 Col:CMC=(15:1)	1.45	6.0			3	
7	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=1:1 Col:CMC=(2:1) + 가용성 키토산		2.9	1.6	1.9		
8	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:HA=(9:1)	2.2	2.5	2.2	1.08	3-5	
8	A, (5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:HA=(4:1)	2.2	2.4	2.2	2.07	3-5	
8	A, (10% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:HA=(3:1)	2.2	2.0	1.8	1.13	3-5	
9	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=0.5:1.0 Col:HA:Chs=9:1:1	2.3	3.0	1.7	1.7	3-5	겔상 및 겔내 성장
10	A, (3.5% 중성 소) 350 $\mu$ m 두께 겔	Col-NH <sub>2</sub> :HA-CHO=1:1	3.2	1.0		0.7		
11	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:Alg=4:1	2.7	3.0	2.0	1.6	3-5	겔상: 빠름 겔내: 41 $\mu$ m/d
11	A, (3.5% 중성 소)	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=2:1 Col:Alg=2:1	2.7	3.4	2.5	1.5	3-5	겔상: 빠름 겔내: 13 $\mu$ m/d
12	A, (3.5% 중성 소)	Col:Glut=(130:1) + 가용성 키토산		3.1	2.1	1.5		
13	B, (11% AFDP), 900 $\mu$ m 두께 겔	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=0.33:1.0 Col:키토산=(15:1)	5.8	8.32	3.29	2.57	4	
13	B, (11% AFDP), 500 $\mu$ m 두께 겔	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=0.66:1.0 Col:키토산=(15:1)	5.8	4.25	4.02	1.32		
13	B, (11% AFDP), 900 $\mu$ m 두께 겔	Col-NH <sub>2</sub> :EDC=0.66:1.0 Col:키토산=(15:1)	5.8	8.46	5.23	2.17		

- [0140] <sup>†</sup>약어: Col 콜라겐; Glut 글루타르알데히드; HA 히아루론산; Chs 콘드로이틴 술페이트 C; Col-NH<sub>2</sub> 콜라겐의 자유 아민 부분; AFDP 산성 동결건조 돼지; epi. 상피; ND 결정하지 않음.
- [0141] \*달리 언급이 없는 한 500 $\mu$ m 두께, 12 mm 직경 이식물. 응력, 신장도 및 강직도 데이터는 리 등의 문헌[PNAS 100:15346-15351(2003)]에 개시된 바와 같은 봉합 풀 아웃(suture pull out) 방법에서 취득된 것임.
- [0142] \*\*젤상: DRG 과성장 히드로겔로부터 유래된 신경돌기; 겔내: 6일 이내에 지시된 길이만큼 히드로겔 내로 성장한 신경돌기
- [0143] 실시예 16
- [0144] 생체내 온레이 성능
- [0145] 온레이를 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. 10 %(w/v) 돼지 콜라겐과 EDC/NHS로부터 제 1 세트의 온레이를 제조하였다. 3.5 %(w/v) 소 콜라겐과 콘드로이틴 술페이트(CSC)와 EDC/NHS로부터 제 2 세트의 온레이를 제조하였다. 온레이는 약 6 mm의 직경, 약 70  $\mu$ m의 중심 두께, 및 30  $\mu$ m의 경사진 가장자리를 가졌다.
- [0146] 온레이를 이식하기 위해, 돼지의 상피를 45% 에탄올로써 30 내지 45 초 동안 처리하였다. 나비형으로 절개하고 상피 내에 포켓을 형성하였다. 시각화를 위해, 온레이를 청색 무-세포독성 염료(겔-코드(Gel-Code, 등록상표))로써 염색하였다. 예비-염색된 온레이를 포켓에 삽입하였다. 보호용 콘택트렌즈를 안구 상에 봉합하였다.
- [0147] 염증, 충혈 및/또는 각막의 혈관침윤을 평가하기 위해 시각적 검사를 수행하였다. 각막 등명성을 평가하기 위해 세극등현미경검사를 사용하였다. 안압을 측정하기 위해 안압계(tonopen)를 사용하였다. 각막의 접촉감도를 결정하기 위해 코체트-보네트 촉각계(Cochet-Bonnet aesthesiometer)를 사용하였다. 접촉감도는 기능성 신경의 존재를 평가하는데 유용할 수 있는데, 이것은 수확된 이식물-함유 각막의 생체내 공초점 영상화 및 면역조직화학에 의해 입증되었다. 각막지형도(topography)를 이식 직전 및 수술한 지 3주일 후에 PAR 각막지형도시스템(CTS)을 사용하여 검사하였다.
- [0148] 마취된 돼지의 안구를 CTS에 정렬함으로써, 각막지형도를 검사하였다. 형광물질과 인공눈물의 묽은 용액을 안구에 도포하여, 각막 표면을 코팅하고 목표 격자(target grid)를 시각화하였다. 목표 격자가 각막 전면 상의 초점과 맞춰지도록, 장치 초점면을 조정하였다. 격자의 디지털 영상을 포착하였다. 디지털 영상을 분석하여 각막 전면의 형상의 측정값을 취득하였다. 온레이를 이식하기 전과 후의 디지털 영상을 비교함으로써, 온레이의 장착으로 인한 각막 형상의 변화를 평가할 수 있다.
- [0149] 생체내 공초점현미경검사를 수행하면, 살아있는 돼지의 각막의 상이한 깊이의 영상을 포착할 수 있어서, 안과용 장치에 대한 안구의 반응을 모니터링할 수 있게 된다. 예를 들면, 공초점현미경검사를 사용하여 장치 내 신경의 존재를 모니터링할 수 있다. 안과용 장치를 이식하기 전 및 수술한 지 3주일 후에, 니덱 콘포스칸 3(Nidek Confoscan 3) 생체내 공초점현미경으로써 마취된 돼지를 검사함으로써, 생체내 공초점현미경검사를 수행하였다. 인공눈물을 검사되는 안구 상에 점적하였다. 안구의 움직임을 감소시키기 위해, 국소용 마취제 2 방울을 안구에 도포하였다. 공초점 렌즈(겔 함침)를, 굴절을 일치시키기 위한 렌즈 전면 상의 1층 겔과 함께 각막과 접촉시켰다. 각막 내피가 초점을 맞추도록 장치 초점면을 조정하고, 이어서 렌즈의 초점면이 각막 두께와 동일한 깊이로 스캐닝되는 동안, 각막의 영상을 취득하였다.
- [0150] 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색된 조직 절편의 조직병리학적 검사 외에도 면역조직화학을 사용하여, 온레이 상에서의 각막 상피의 회복 및 하부 온레이와의 부착 및 상호작용의 조기 징후를 결정하였다. 면역조직화학을 사용하여, 신경의 존재 여부 및 면역 및 염증 세포의 임의의 침윤을 입증할 수도 있었다. 통상적인 기술을 사용하여, 세제로써 투과화(permeabilization)한 후 이식된 온레이의 존재 또는 부재 하에서, 절편의 각막 상에서 항-신경미세섬유(anti-neurofilament) 염색을 수행하였다. 면역형광법을 사용하여 결합된 항체를 시각화하였다.
- [0151] 앞에서 논의된 바와 같이, 각막 온레이가 장착된 각막은 치유가 잘 되었으며, 충혈 또는 염증이 최소이거나 전혀 없으면서 광학적으로 등명함을 유지하였다. 혈관침윤 징후는 없었다. 정상적인 안압이 관찰되었다. 수술 후 각막은 접촉감도를 나타내었다. 지형도 검사는 이식된 온레이가 각막 지형도의 변화에 영향을 줄 수 있음을 보여주었다. 온레이는 중심 각막 용기부에서 약 50  $\mu$ m의 두께 변화를 초래하였다. 상피는 온레이에 잘 부착되었다. 생체내 각막 현미경검사 결과, 상피하 및 실질층 신경, 및 상피로부터 내피까지 분포된 세포를 갖는 우

수한 일반적 각막 구조를 볼 수 있었다. H&E 염색된 동결절편은 온레이가 호스트 각막과 통합되었음을 보여주었다. 면역조직화학은 E-카드헤린(E-cadherin)을 사용한 염색을 이용해 미처리된 각막과 비교할 때 온레이-이식된 각막 내의 세포의 부착성은 거의 변하지 않았음을 입증하였다. 케라틴 3 및 E-카드헤린 염색은 대조물의 것에 필적할만하였다. 섬유와 기저막 복합물을 정착시키기 위한 VII형 콜라겐 염색은 대조물의 염색보다 덜 뚜렷하였다. α6 인테그린에 대한 염색은 조작된 대조물과 미처리된 대조물 둘 다에서 기저 상피세포의 편재화를 보여주었다. 항-신경미세섬유 200 항체 염색은 온레이가 장착된 각막 내 이식 부위 내의 신경의 존재를 보여주었다. 항 CD 45 항체 염색은 염증 또는 면역 반응이 없음을 보여주었다.

[0152] 실시예 17

[0153] 각막 온레이의 삭마

[0154] VISX 스타 S4 엑시머 레이저를 사용하여, 콜라겐/EDC 및 콜라겐/키토산 온레이를 삭마하였다(표 3). PAR 각막 지형도 시스템(CTS)을 사용하여 처리 전후의 온레이의 표면 지형도 측정값을 취득하였다. 처리를 위해, 온레이를 보관 용액으로부터 꺼내고 PMMA로 만들어진 구형 표면 상에 놓았다.

[0155] 치료레이저 각막절제술(phototherapeutic keratectomy: PTK)은 균일한 수의 레이저 펄스(또는 에너지)를 전체 삭마 대역에 제공한다. 굴절교정 각막절제술(refractive keratectomy: PRK)은 삭마 대역 상의 펄스 밀도를 변화시킴으로써 곡률을 원하는 대로 변화시킨다. AZD란 삭마 대역 직경을 말한다. 깊이는 레이저 제조사에 의해 보고된 바와 같은 인간 각막 상의 예상된 치료 깊이이다.

### 표 3

삭마 척도

수술	유형	AZD (mm)	구 (D)	원주 (D)	깊이 (μm)
1	PTK	5	----	----	10
2	PTK	5	----	----	20
3	PRK	6	2 +2	0	26
4	PRK	6		0	19
5	PRK	6	4 +4	0	51
6	PRK	6		0	38
7	PRK	6	4	-+2	30

[0156] 콜라겐/EDC 온레이의 수술전 및 수술후 지형도로부터 차 지도(difference map)를 생성하여 삭마의 효과를 나타내었다.

[0157] PTK 삭마는 (차 지도에 대해) 직경 약 5 mm의 완전히 일정한 중심 청색 영역을 제공할 것으로 예상되었다. 제거된 조직의 양의 작은 구배가 예측되었는데, 왜냐하면 온레이는 구부러진 표면이기 때문이다. 근시 구 PRK 삭마는 중심에서 최대 조직 깊이를 제거할 것으로 예상되었다. 제거된 조직의 깊이는 삭마의 가장자리에서 점차 0으로 감소할 것으로 예상되었다. 원시 구 교정은 중심 1 mm 직경을 건드리지 않고 그대로 놓아두고 처리 대역의 가장자리에서 최대 조직을 제거할 것으로 예상되었고, 중심으로부터 9 mm로 밖으로 주변으로 형성될 것으로 예상되었다. 원시 교정 후 차 지도는 중심 녹색 대역 주위에 청색 환을 나타낼 것으로 기대되었다. 근시 난시 교정으로부터 얻어진 차 지도는, 그것의 청색 패턴이 타원형이라는 것만 제외하고는, 근시 구 교정으로부터 얻어진 지도와 유사하게 보일 것으로 예상되었다.

[0158] 삭마된 온레이로부터 얻어진 차 지도는, 모든 차 지도에서, 전술된 예상 조직 제거 패턴을 나타내었다. 제거된 조직의 최대 깊이는 인간 각막에 대해 예상된 것보다 더 클 것으로 기대되었다. 예를 들면 각막 온레이 물질이 제거되는 속도는 각막 제거 속도의 약 1.7 내지 약 2 배였다. 온레이 물질의 삭마 속도와 각막 제거 속도의 차는 샘플 전체에 걸쳐 균일하지는 않았다. 속도차는, 다른 어떤 요인들 중에서도, 처리 측정의 깊이, 물질 밀도 및 표면 조도, 및 물질의 수분함량으로 인한 것일 수 있다.

[0159] 콜라겐/키토산 온레이는 콜라겐/EDC 온레이보다 더 빠른 속도로 삭마되는 것으로 관찰되었다. 이러한 차는 수

화로 인한 것일 수 있다. 예를 들면, 수술후 콜라겐/키토산 온레이는 콜라겐/EDC 온레이보다 훨씬 더 낮은 수분함량을 가질 수 있다.

[0161] 안과용 장치는 우레탄과 같은 강도 증강 성분을 포함할 수도 있다.

[0162] 실시예 18

[0163] 인간 재조합 콜라겐 안과용 장치

[0164] 본원에서 기술된 바와 같은 주사기 시스템을 사용하여, 미국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재의 피브로겐에서 입수된 13.7 중량%의 인간 재조합 I형 콜라겐 0.3 ml와 0.625 M 모르폴리노에탄술포산(MES) 0.3ml를 혼합함으로써, 가교결합된 콜라겐 히드로겔을 제조하였다. 혼합을 빙수욕에서 수행함으로써, 혼합을 저온에서 수행하였다.

[0165] 균질한 용액을 얻은 후, EDC/NHS 57  $\mu$ l를, 콜라겐 자유 아민(col1-NH<sub>2</sub>) 기에 대한 몰당량비가 3:3:1이 되도록 혼합물에 주입하였다. 용액의 pH를 약 5로 조정하기 위해서, NaOH(2N)를 혼합물에 첨가하였다.

[0166] 혼합물을 유리 또는 플라스틱 주형에 주입하고 100% 습도 및 실온에서 16 시간 동안 두었다. 이어서 주형을 배양기로 옮겨 37°C에서 5시간 동안 후-경화시켰다.

[0167] 이러한 방법을 사용하여, EDC/NHS 대 콜라겐 col1-NH<sub>2</sub> 기의 비가 1:1:1 및 6:6:1인 인간 재조합 I형 콜라겐을 함유하는 기타 히드로겔을 제조하였다.

[0168] 굴절률(RI)을 비기(VEE GEE) 굴절계에서 결정하였다. 백색광, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm 및 650 nm의 파장에서 투광률을 측정하였다. 응력, 파단신장도 및 모듈러스와 같은 직접 인장성 측정값을 인스트론(Instron) 전자기 시험기(모델 3340) 상에서 결정하였다. 샘플의 크기는 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  0.5 mm였다. 히드로겔의 수분함량을 하기 식에 따라 계산하였다:

[0169]  $(W - W_0) / W\%$

[0170] 상기 식에서, W<sub>0</sub> 및 W는 각각 건조한 샘플 및 팽창한 샘플의 중량을 나타낸다.

[0171] EDC/NHS/col1-NH<sub>2</sub>의 비(몰당량)가 1/1/1인 인간 재조합 콜라겐 히드로겔(F1으로 표시)은 1.3457  $\pm$  0.0013의 굴절률을 가졌다. EDC/NHS/col1-NH<sub>2</sub>의 비(몰당량)가 3/3/1인 인간 재조합 콜라겐 히드로겔(F3으로 표시)은 1.3451  $\pm$  0.0002의 굴절률을 가졌다. EDC/NHS/col1-NH<sub>2</sub>의 비(몰당량)가 6/6/1인 인간 재조합 콜라겐 히드로겔(F6으로 표시)은 1.3465  $\pm$  0.0001의 굴절률을 가졌다.

[0172] 표 4는 상이한 히드로겔의 투광률을 요약한 것이다.

#### 표 4

[0173] 투광률

파장 (nm)	백색광	450	500	550	600	650
평균 투광률(%)						
F1	86.7 $\pm$ 0.9	69.7 $\pm$ 1.2	76.0 $\pm$ 1.3	79.2 $\pm$ 1.4	82.4 $\pm$ 1.3	84.9 $\pm$ 1.4
F3	90.7 $\pm$ 2.5	85.8 $\pm$ 3.5	86.4 $\pm$ 2.9	86.7 $\pm$ 2.6	88.0 $\pm$ 2.4	89.6 $\pm$ 2.6
F6	75.5 $\pm$ 1.5	48.7 $\pm$ 0.4	57.7 $\pm$ 1.1	62.7 $\pm$ 1.1	67.6 $\pm$ 1.4	71.6 $\pm$ 1.7

[0174] F3로 표시된 히드로겔 물질은 가장 허용가능한 광학적 성질을 나타내는 것으로 나타났다. 시각적으로 또는 거시적으로는, F3은 기타 인간 재조합 히드로겔에 비해 가장 우수한 투명도를 갖는 것으로 나타났다.

[0175] 표 5는 본 발명의 인간 재조합 히드로겔의 기계적 성질을 제공한다.

#### 표 5



[0176] 기계적 성질

샘플	F1	F3	F6
평균 최대 응력(KPa)	62.6 ± 9.9	117.2 ± 36.9	149.9 ± 57.7
평균 파단 응력(KPa)	67.1 ± 21.0	110.5 ± 49.7	99.5 ± 60.8
평균 파단신장도(%)	62.60 ± 6.82	50.20 ± 7.55	23.51 ± 9.03
평균 모듈러스(MPa)	0.281 ± 0.032	0.525 ± 0.124	1.949 ± 0.939

[0177] 히드로겔 F3은 비교적 낮은 모듈러스를 갖지만 허용가능한 기타 기계적 성질도 갖는 것으로 나타났다.

[0178] 표 6은 히드로겔 물질에 적합한 수분함량값을 제공한다.

**표 6**

[0179] 평형 수분함량

샘플	F1	F3	F6
수분함량(%)	92.82 ± 0.68	92.63 ± 0.61	91.40 ± 0.38

[0180] 히드로겔이 고도로 수화되었다는 것은 명백하다.

[0181] 본 실시예에서는, pH 지시약을 MES 완충액에 첨가하여 pH 변화를 모니터링하는 것을 도왔다. 본 실시예에서 사용된 특정 지시약은 알리자린 레드 S(Alizarin Red S)(시그마 알드리치(Sigma Aldrich))이다.

[0182] 도 4는 7일에 걸친 인간 재조합 콜라겐 샘플 F1 상에서의 인간 각막 상피세포 성장의 그래프이다. 도 5는 7일에 걸친 인간 재조합 콜라겐 샘플 F3 상에서의 인간 각막 상피세포 성장의 그래프이다. 도 6은 7일에 걸친 인간 재조합 콜라겐 샘플 F6 상에서의 인간 각막 상피세포 성장의 그래프이다.

[0183] 재조합 히드로겔 물질 상에서 관찰된 세포 성장은 대조 실험에서 관찰된 것보다 우수하였다.

[0184] 도 7은 히드로겔 물질 F3이 30일 이상 동안 생체 내에서 유지됨을 보여주는 사진이다.

[0185] 실시예 19

[0186] 콜라겐-폴리(NIPAAm-co-AAC) 조성물

[0187] 본원에서 기술된 EDC/NHS 가교결합 방법을 사용하여 조성물을 제조하였다(실시예 4). 출발 콜라겐 농도는 15%였다. 최종 콜라겐 농도는 11%였다. 최종 폴리(NIPAAm-co-Aac) 농도는 3%였다. 겔 내의 총 고체 농도는 14%였다.

[0188] 이러한 물질은, 리 등의 문헌[PNAS 100:15346-15351(2003)]에 개시된 바와 같은 봉합 폴 아웃 방법을 사용시, 1.3542의 굴절률, 11 g-힘의 인장강도, 3.3 mm의 신장도 및 3.8 g-힘/mm의 모듈러스를 가졌다.

[0189] 변성 온도는 가교결합 전 40℃로부터 가교결합 후 50℃로 증가하였다. 물질은 인간 각막 또는 토끼 각막보다 더 높은 투광률 및 더 낮은 후방산란도를 가졌다. 예를 들면, 백색광을 사용시, % 투광률은 히드로겔 물질에 대해서는 약 102%였고, 인간 각막에 대해서는 약 93%였고, 토끼 각막에 대해서는 78%였다. 히드로겔은 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm 및 650 nm의 광의 파장에 대해 각각 약 90%, 96%, 100%, 101% 및 103%의 % 투광률을 가졌다. 인간 각막 및 토끼 각막은 모든 시험 파장에서 100% 미만의 % 투광률을 나타내었고, 각 파장에서 히드로겔 물질보다 일관되게 낮은 % 투광률을 나타내었다.

[0190] 히드로겔 물질은 파종 7일 후에 각막 상피세포 합류상태에 도달한 것으로 나타났다.

[0191] 실시예 20

[0192] 콜라겐/콘드로이틴 술페이트 조성물

[0193] 프로테오글리칸 등가물로서 콘드로이틴 술페이트(CSC), 및 I형 콜라겐을 사용하여, 높은 광학적 투명성 및 인장강도를 갖는 생합성 매트릭스를 개발하였다. 광학적 투명성의 손실을 초래할 수 있는 응집 또는 콜라겐 원섬유 형성 없이, 제어된 조건 하에서, 콜라겐 건조 중량을 기준으로 30 %(w/w) 이하의 CSC를 함유하는 히드로겔을 제조하였다. 히드로겔은 물리적으로 및 생화학적으로 특징지워졌다. 시험관내 시험은, 인간 각막 상피세포

(HCES)가 겔의 표면 상에서 잘 성장하였고 성공적으로 증화되었음을 보여주었다. 매트릭스는 우수한 겔내 신경 성장을 도왔다. 유사한 결과가 생체 내에서도 얻어졌다.

[0194] 조성물을 본원에서 기술된 실시예 14와 유사하게 제조하였다. EDC 및 NHS를 사용하여, CSC를 콜라겐에 공유결합시켰다.

[0195] 상이한 CSC 대 콜라겐 건조중량비 및 상이한 EDC 대 콜라겐-NH<sub>2</sub> 몰당량비를 갖는 콜라겐(3.5 w/v%) 및 CSC 겔을, 본원에서 논의된 바와 같은 EDC/NHS(1:1 몰당량) 가교결합 기술을 사용하여, 제조하였다. 모든 겔은 시각적으로 투명하였다. 조성물은, 표 7에 명시된 바와 같이, 인간 각막에 비해 더 높은 투광률 및 더 낮은 광산란도(약 87%의 투광률 및 3%의 후방산란도)를 가졌다.

## 표 7

[0196] 투광률 및 후방산란도

CSC 대 콜라겐 중량비(%)	0	5	10	20	30
투광률(%)	89.9	95.5	93.0	90.5	97.3
후방산란도(%)	0.30	0.19	0.19	0.17	0.19
EDC 대 NH <sub>2</sub> 비	0.25	0.5	1.0	2.0	
투광률(%)	96.7	100	99.9	88.2	
후방산란도(%)	0.24	0.28	0.16	0.20	

[0197] 굴절률은 1.34 내지 1.35였고, 이것은 인간 각막의 굴절률(1.376)과 유사하다.

[0198] 상이한 EDC 대 콜라겐-NH<sub>2</sub> 몰비를 사용하여 제조된 겔의 팽창비를 측정하고 이것을 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0199] 
$$\text{팽창비} = (W_w - W_d)/W_d$$

[0200] 상기 식에서, W<sub>w</sub>는 수화된 겔의 중량이고 W<sub>d</sub>는 건조한 겔의 중량이다.

[0201] EDC/NHS를 사용하는 콜라겐-CSC 가교결합은 카르복실산과 아민기 사이에 가교결합을 형성하게 한다. 이러한 결과(도 9)는 EDC 대 콜라겐-NH<sub>2</sub> 비가 증가하면, 보다 압축된 네트워크가 도입됨으로 인해, 콜라겐-CSC 겔의 팽창비가 감소한다는 것을 시사한다.

[0202] 이식물의 기계적 성질의 측정을 리 등의 문헌[PNAS 100:15346-15351(2003)]에 개시된 바와 같은 봉합 풀 아웃 방법을 사용하여 수행하였다. 이식물을 PBS에서 완전히 수화시키고 10 mm/min의 속도로 인발시켰다. 이식물(두께 500 μm 및 직경 12mm)의 파열시의 인장강도를 모니터링하였다. EDC 대 NH<sub>2</sub> 몰비를 증가시킴으로써 겔의 인장강도를 향상시켰다(도 10). 그러나, EDC의 양이 실질적으로 증가하면 물질이 취약해지므로, EDC 대 콜라겐-NH<sub>2</sub> 몰비가 2 이상이 될 때 인장강도는 약간 감소하였다.

[0203] 도 11에 도시된 바와 같이 콜라겐의 농도를 증가시킴으로써, 겔의 인장강도를 향상시킬 수 있다(3.5% 콜라겐 대신 10% 콜라겐을 사용). 인장강도는 2.65 g-힘으로부터 10.02 g-힘으로 증가하였고 팽창비는 21.5로부터 12.1로 감소하였다.

[0204] 가교결합 효율을 시차주사열계량법(DSC)으로써 평가하였다. 콜라겐 또는 가교결합 콜라겐 히드로겔을 가열하면 가교결합의 본질 및 정도에 따라 특정 온도에서 원래의 3중나선구조의 구조적 변화가 유도될 것이다. 콜라겐 용액 및 가교결합된 완전 수화된 콜라겐 히드로겔을 밀봉된 팬에서 특징짓는데, 샘플의 온도는 2 °C/min의 일정 속도로 상승하였다. 최대 피크에서의 온도를 변성온도로서 기록하였다. EDC 대 NH<sub>2</sub> 비가 증가함에 따라, 변성온도는 42.4°C로부터 56.6°C로 증가하였고(도 12A), 이는 공유결합이 3중나선의 안정성을 증가시켜 변성온도를 증가시켰다는 것을 시사한다. 콜라겐-CSC 겔의 변성온도는 콜라겐만으로 이루어진 겔의 변성온도보다 높았다(도 12B). 그러나, 콜라겐-CSC 겔 내에서의 CSC 대 콜라겐 몰비를 변화시키는 것으로는 변성온도를 변화시키지 못했다.

[0205] 확립된 세포주로부터의 인간 각막 상피세포의 시험관내 성장을 관찰하였다. 겔 내로 이식된 후근신경절을 사용

하여, 신경 성장을 시험관 내에서 수행하였다. 신경돌기를 7일 동안 성장시키고, 겔을 신경미세섬유에 대해 염색하고 신경돌기 연장 길이를 측정하였다. 신경돌기는 모든 콜라겐-CSC 겔 내에서 잘 성장하였다(도 13).

[0206] CSC의 농도를 5%로부터 20%로 증가시켰더니 겔 내의 신경돌기 연장 길이가 상당히 향상되었다. 30% CSC를 함유하는 겔에서는 추가의 이점이 명백히 드러나지 않았다(도 13). 탁월한 상피 피복 및 이식물 일체화가 관찰되었다.

[0207] 실시예 21

[0208] III형 콜라겐 조성물

[0209] 물질: 인간 재조합 III형 콜라겐(5.1 %w/w 피브로겐 인코포레이티드), 0.625 M 모르폴리노에탄술폰산[MES, 알리자린 레드 S pH 지시약(6.5 mg/100ml 물)], 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카르보디이미드 HCl(EDC), N-히드록시-숙신이미드(NHS).

[0210] 18.3 % (w/w) III형 콜라겐 용액으로부터 히드로겔을 제조하였다. 18.2 중량% 인간 재조합 III형 콜라겐 0.3 ml (5.1 %w/w 인간 재조합 III형 콜라겐 피브로겐 인코포레이티드로부터 농축됨)과 MES(0.625 M) 0.3 ml를, 빙수욕 내의 플라스틱 티와 연결된 2개의 기포 발생 없는(bubble free) 주사기에서 혼합하였다. 균질한 용액이 형성된 후, EDC 33.5 mg 및 NHS 20.1 mg을 MES 0.125 ml에 용해시키고 이 중 57  $\mu$ l를 취하고 상기 주사기에 3:3:1의 EDC:NHS:콜라겐-NH<sub>2</sub>의 물비로 주입하였다. 혼합물이 분홍색으로 보이면 pH가 약 5가 되었다는 것이므로 NaOH 용액을 첨가하지 않았다. 혼합물을 잘 혼합하고 유리 주형(두께 434  $\mu$ m)에 넣고 100% 습도 및 실온에서 16 시간 동안 방치하였다. 이어서 주형을 배양기로 옮겨 37°C에서 5시간 동안 후-경화시켰다. 그 결과의 편평한 히드로겔을 꺼내서 10 mM PBS에 함침시키고 8시간 간격으로 신선한 완충액으로 교체하였다. 수득된 히드로겔을 1% 클로로포름을 함유하는 10 mM PBS에 함침시키고 4 °C 냉장고에서 보관하였다.

[0211] 전술된 방법을 사용하여, 2:2:1 및 1:1:1의 EDC:NHS:콜라겐-NH<sub>2</sub>의 비를 갖는 추가의 III형 콜라겐 히드로겔도 제조하였다. 수득된 모든 겔은 투명하였다.

[0212] 5.1 % (w/w) III형 콜라겐 용액으로부터 히드로겔을 제조하였다. 5.1 중량% 인간 재조합 III형 콜라겐 0.3 ml 및 MES(0.625 M) 50  $\mu$ l를, 빙수욕 내의 플라스틱 티와 연결된 2개의 기포 발생 없는 주사기에서 혼합하였다. 균질한 용액이 형성된 후, EDC 9.3 mg 및 NHS 5.6 mg을 MES 0.125 ml에 용해시키고 이 중 57  $\mu$ l를 취하고 상기 주사기에 3:3:1의 EDC:NHS:콜라겐-NH<sub>2</sub>의 물비로 주입하였다. 혼합물이 분홍색으로 보이면 pH가 약 5가 되었다는 것이므로 NaOH 용액을 첨가하지 않았다. 혼합물을 잘 혼합하고 유리 주형(두께 434  $\mu$ m)에 넣고 100% 습도 및 실온에서 16 시간 동안 방치하였다. 이어서 주형을 배양기로 옮겨 37°C에서 5시간 동안 후-경화시켰다. 그 결과의 편평한 히드로겔을 꺼내서 10 mM PBS에 함침시키고 8시간 간격으로 신선한 완충액으로 교체하였다. 마지막으로, 수득된 히드로겔을 1% 클로로포름을 함유하는 10 mM PBS에 함침시키고 4 °C 냉장고에서 보관하였다. 그 결과의 겔은 광학적으로 증명하였다.

[0213] 18.3 % w/w 콜라겐 출발 농도에 대한 최종 콜라겐 함량은 8.36 % (w/v) (각 성분의 첨가 후 희석비를 기준으로 계산된 값) 또는 약 10 % (w/v) (측정된 값)였다.

[0214] 5.1 % w/w 콜라겐 출발 농도에 대한 최종 콜라겐 함량은 3.76 % (w/v) (각 성분의 첨가 후 희석비를 기준으로 계산된 값) 또는 약 4 % (w/v) (측정된 값)였다.

[0215] 본 발명을 다양한 구체적인 실시예 및 실시양태에 대해 기술하였지만, 본 발명이 여기에만 국한되는 것은 아니고 기타 실시양태도 본 발명의 범주 내에 속한다는 것을 알 것이다.

[0216] 수많은 공개공보, 특허 및 특허출원이 앞에서 언급되었다. 언급된 각 공개공보, 특허 및 특허출원은 본원에서 전문이 참고로 인용되었다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 조성물 및 장치의 제조를 위한 시스템의 T-어댑터의 단면도이다.

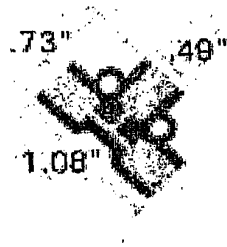
[0022] 도 2는 본 발명의 조성물 및 장치의 제조를 위한 시스템의 암형(female) 루어(Luer) 어댑터의 단면도이다.

[0023] 도 3은 본 발명의 조성물 및 장치의 제조를 위한, 1개의 격벽과 이것과 커플링된 2개의 주사기를 갖는, 도 1의 T-어댑터의 평면도이다.

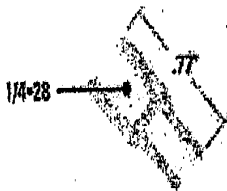
- [0024] 도 4는 F1으로 표시된 인간 재조합 히드로겔 물질에 대한 시간의 함수로서의 세포수의 그래프이다.
- [0025] 도 5는 F3으로 표시된 인간 재조합 히드로겔 물질에 대한 시간의 함수로서의 세포수의 그래프이다.
- [0026] 도 6은 F6로 표시된 인간 재조합 히드로겔 물질에 대한 시간의 함수로서의 세포수의 그래프이다.
- [0027] 도 7은 래트 내에 위치한, F3으로 표시된 인간 재조합 히드로겔 물질의 사진이다.
- [0028] 도 8은 본 발명의 굴절이상 교정 안과용 장치의 한 실시양태를 도시한다.
- [0029] 도 8A는 본 발명의 온레이의 한 실시양태의 렌즈 가장자리 형상을 도시한다.
- [0030] 도 9는 EDC 대  $\text{NH}_2$  몰비의 함수로서의 팽창비의 그래프이다.
- [0031] 도 10은 EDC 대  $\text{NH}_2$  몰비의 함수로서의 인장강도의 그래프이다.
- [0032] 도 11은 콜라겐 농도의 함수로서의 인장강도의 그래프(왼쪽) 및 콜라겐 농도의 함수로서의 팽창비의 그래프(오른쪽)이다.
- [0033] 도 12는 상이한 EDC 대  $\text{NH}_2$  몰비를 갖는 조성물에 대한 온도의 함수로서의 열유량의 그래프(왼쪽), 및 상이한 CSC 농도를 갖는 조성물에 대한 온도의 함수로서의 열유량의 그래프(오른쪽)이다.
- [0034] 도 13은 콘드로이틴 술페이트 대 콜라겐 건조중량비의 함수로서의 신경돌기 길이의 그래프이다.

## 도면

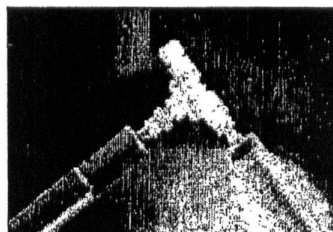
### 도면1



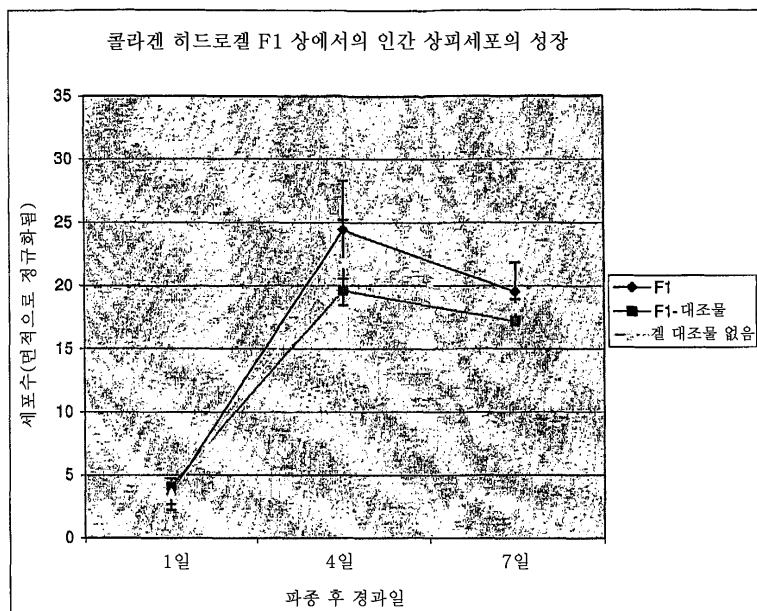
### 도면2



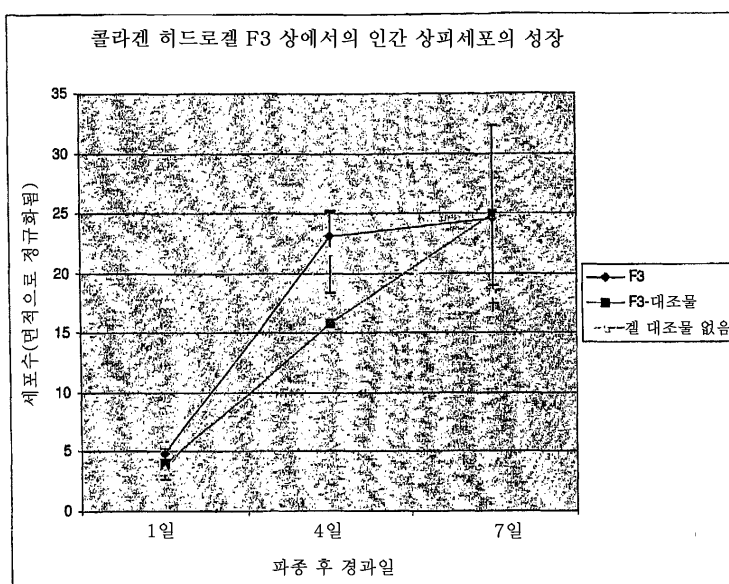
### 도면3



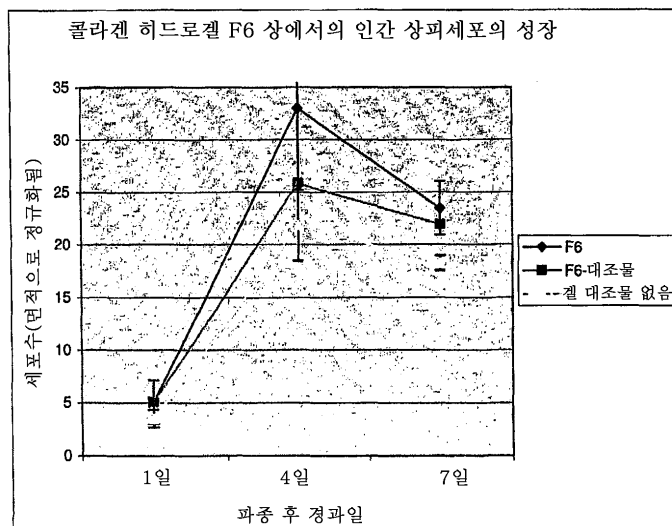
도면4



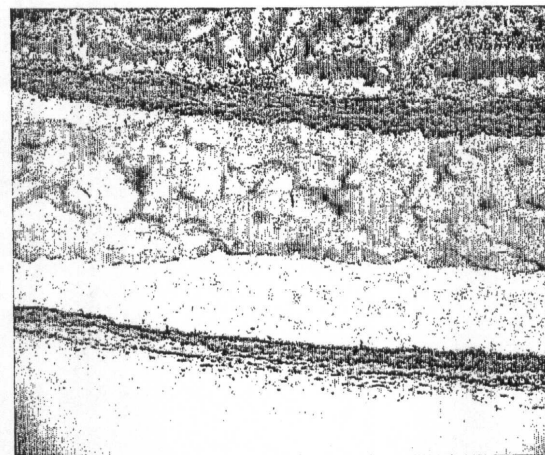
도면5



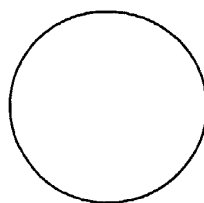
도면6



도면7

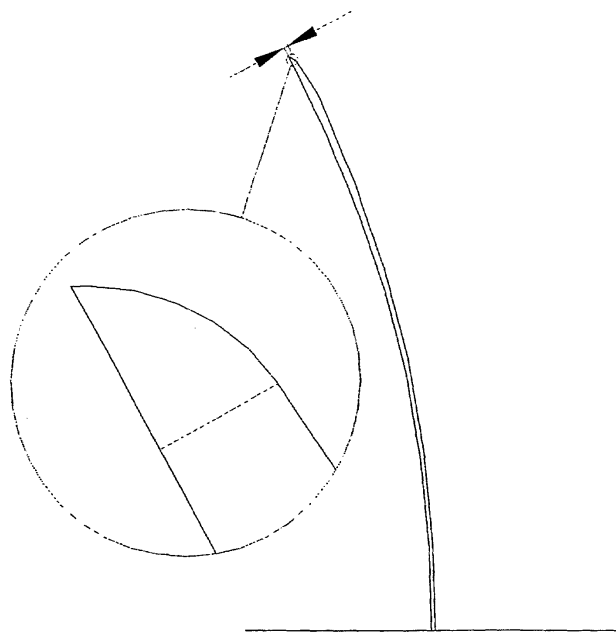


도면8

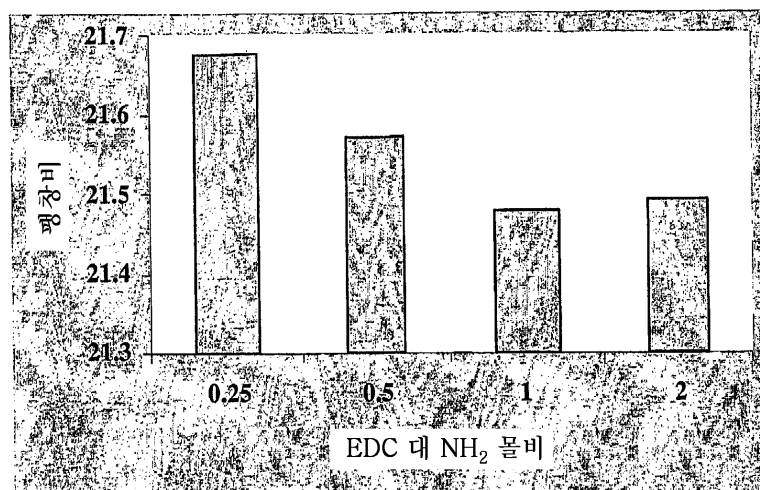




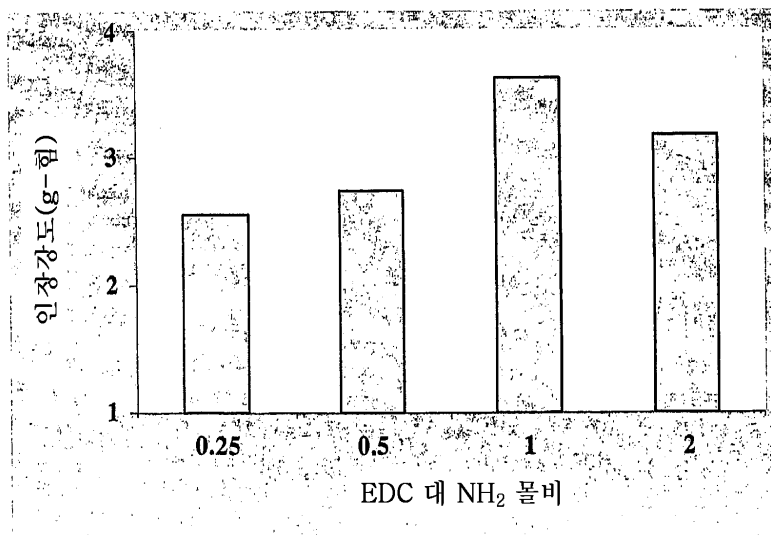
도면8A



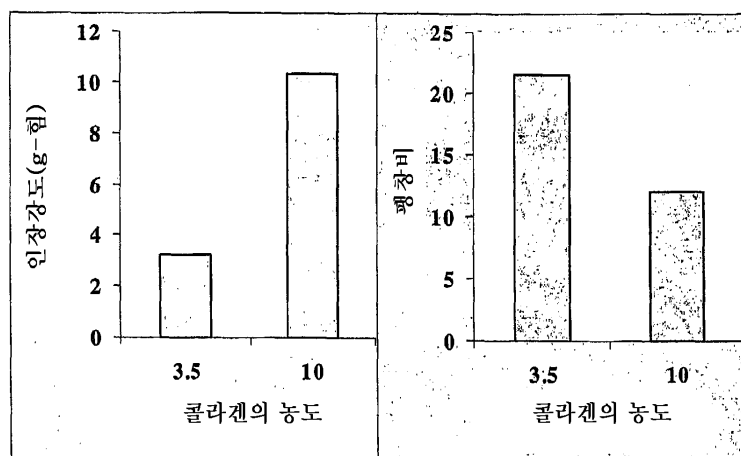
도면9



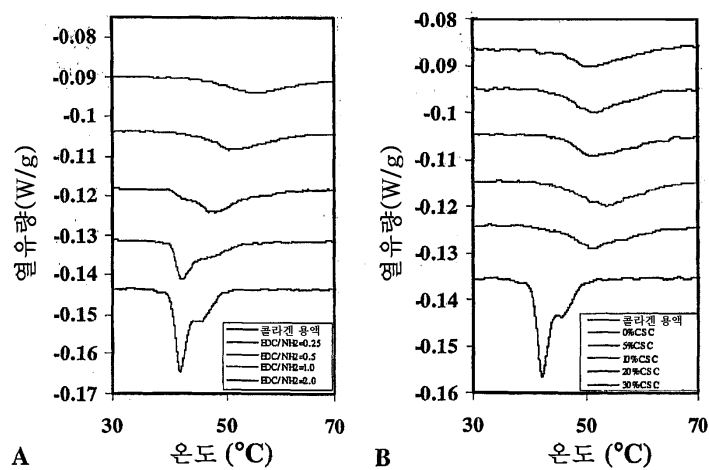
도면10



도면11



도면12



도면13

