



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월11일
 (11) 등록번호 10-1240518
 (24) 등록일자 2013년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 5/18 (2006.01) *C08L 101/02* (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0030540
 (22) 출원일자 2012년03월26일
 심사청구일자 2012년03월26일
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2002536465 A*
 KR1020070004159 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
주식회사 제네웰
 경기도 성남시 중원구 사기막골로62번길 37, 스타
 타워 6층 (상대원동)
- (72) 발명자
이영우
 경기도 용인시 수지구 신봉동 LG신봉자이1차아파
 트 113-1901
임세환
 서울특별시 동작구 사당동 1009-23 301호
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
조인제

전체 청구항 수 : 총 12 항

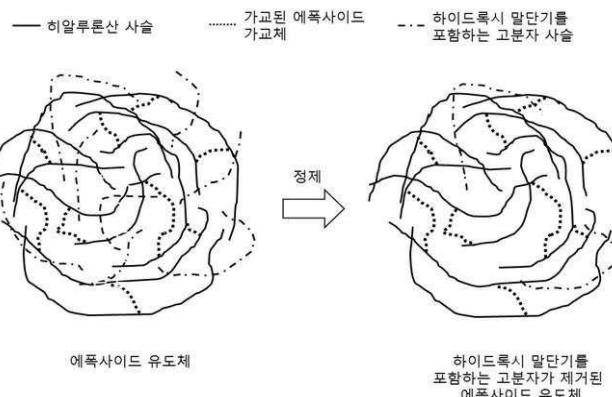
심사관 : 하승규

(54) 발명의 명칭 생체 적합성 고분자를 이용한 이식용 재료

(57) 요약

하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자와 히알루론산을 혼합한 용액에 에폭사이드 가교제를 반응하여 제조된 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자가 포함된 히알루론산 유도체 필름은 물리적 강도, 체내 안정성, 유연성, 생체조직에 대한 부착성 및 생체적합성을 향상시킨다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

조완진

경기도 부천시 원미구 중1동 무지개마을아파트
1212동 1204호

장지연

경기도 성남시 수정구 신홍3동 2534-1 블루힐하우스
A동 602호

특허청구의 범위

청구항 1

히알루론산이 가교결합된 구조에 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자가 물리적으로 결합되어 되어 있는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 유도체 필름의 히알루론산은 50 내지 90중량%이고, 상기 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자는 10 내지 50중량%인 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 가교밀도가 1mol% 내지 100mol%인 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자는 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알콜, 폴리프로필렌 옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱글리콜산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 공중합체, 폴리부틸렌 옥사이드, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류, 폴리옥시-에틸렌 케스터오일 유도체류, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스터류 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체는 히알루론산 또는 히알루론산 염 단독, 또는 히알루론산 또는 히알루론산 염 그리고 히알루론산과 에테르 공유결합을 형성할 수 있는 고분자와 함께 에폭사이드 가교제에 의하여 반응하여 제조되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 히알루론산 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 및 히알루론산 테트라부틸 암모늄으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 히알루론산과 에테르 공유결합을 형성할 수 있는 고분자는 히알루론산, 콜라겐, 알긴산, 혼파린, 젤라틴, 엘라스틴, 피브린, 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸, 혼파란설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄설페이트 및 케라탄 설페이트로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 에폭사이드 가교제는 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(polyethylene glycol diglycidyl ether), 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether), 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(ethylene glycol diglycidyl ether), 1,6-헥산디올 디글리시딜 에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌 글리콜 디글리시딜 에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜 디글리시딜 에테르(poly(propylene glycol)diglycidyl ether), 폴리테트라메틸렌글리콜 디글리시딜 에테르(poly(tetramethylene glycol)diglycidyl ether), 네오펜틸 글리콜 디글리시딜 에테르(neopentyl glycol diglycidyl ether), 폴리글리세롤 폴리글리시딜 에테르(polyglycerol polyglycidyl ether), 디글리세롤 폴리글리시딜 에테르(diglycerol polyglycidyl ether), 글리세롤 폴리글리시딜 에테르(glycerol polyglycidyl ether), 트리메틸프로판 폴리글리시딜 에테르(trimethylpropane polyglycidyl ether), 1,2-(비스(2,3-에폭시프로포록시) 에틸렌(1,2-(bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 펜타에리스리톨 폴리글리시딜 에테르(pentaerythritol polyglycidyl ether) 및 소르비톨 폴리글리시딜 에테르(sorbitol polyglycidyl ether)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 9

제 5항에 있어서,

상기 히알루론산의 반복단위 100중량부에 대하여 상기 가교제 1 내지 100중량부를 가교 반응시키는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름이 정제 후 유기용매에 침전하여 제조된 것임을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 유착방지제 또는 골재생 유도막으로 사용되는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

청구항 12

제 11항에 있어서,

항균 및 항염증 천연물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자와 히알루론산을 혼합한 용액에 에폭사이드 가교제를 반응하여 제조되어 물리적 강도, 체내 안정성, 유연성, 생체조직에 대한 부착성 및 생체적합성을 향상시킨 필름 형태의 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 포함된 히알루론산 유도체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

1934년 메이어(Meyer)와 팔머(Palmer)에 의해 눈의 유리액(vitreous humor)에서 처음 분리된 히알루론산은 음이온 뮤코 다당체(polyanionic mucopolysaccharide)로서 자연계에 널리 존재하는 생체고분자 물질이다[Meyer K. et al., *Journal of Biology and Chemistry* 107 629-34 (1934)]. 히알루론산은 동물의 태반, 눈, 관절 등의 연결조직 내 다양 존재하고 있고, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 미생물 *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* 등에서도 생산된다. 구조적으로 글루쿠론산(glucuronic acid)과 아미노당(N-acetylglucosamine)의 β (1,3) 글리코시드 결합(β (1,3) glycosidic bond)으로 연결된 반복 단위(repeating

unit)가 다시 $\beta(1,4)$ 글리코시드 결합에 의해 연속 연결된 긴 사슬구조로 형성하고 있다[Balazs E. A. et al., *Biochemical Journal*, 235, 903, 1986; Toole B.P. et al., *Journal of Internal Medicine*, 242, 35-40 (1997)].

[0003] 히알루론산은 생체적합성이 우수하고 용액상태에서 높은 점탄성의 특성으로 화장품 첨가제 등의 화장품 용도뿐만 아니라 안과용 수술보조제, 관절기능 개선제, 약물전달 물질 및 점안제 등의 다양한 의약 용도에 대해서도 널리 사용되고 있다. 하지만, 히알루론산 자체만으로는 생체내 (*in vivo*) 또는 산, 알칼리 등의 조건에서 쉽게 분해되어 사용이 제한적이다. 따라서, 구조적으로 안정된 히알루론산 유도체를 개발하기 위한 많은 노력이 진행되고 있다[Laurent T.C. et al., Portland Press Ltd, London, 1998].

[0004] 히알루론산 유도체는 우수한 생체적합성, 물리적 안정성 및 생분해성을 가지고 있어 성형 보조물, 관절기능개선제, 약물전달체, 세포배양지지체(scaffold) 및 수술 후의 유착방지제 등 다양한 용도로 개발되고 있다.

[0005] 히알루론산을 유도체화하는 방법 중 에폭사이드 가교제를 사용하여 유도체화하는 기술은 용액, 젤, 섬유, 스펀지, 필름 등 다양한 형태로 개발되고 있으며, 미국등록특허 제4,500,676호, 제4,713,448호, 제4,716,224호, 제4,716,154호, 제4,886,787호, 제4,963,666호, 제5,827,937호 등에는 그것의 제조방법들이 개시되어 있다.

[0006] 하지만, 상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 건조하는 과정에서 수축현상이 발생하여 균일한 필름으로 제조하는데 제한이 있고 정제하는 과정에서 물리적 강도가 약화되는 문제점등이 발생한다.

[0007] 상기와 같은 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름 제조의 문제점을 극복하기 위해서 국내공개특허 제2009-0012439호에서는 HA와 CMC의 표면가교로 유연성 및 물리적 강도가 개선된 필름을 개발하였으나, HA의 조성이 높아지면 물리적 강도가 약해 젖은 상태에서 말리는 현상이 발생하고 CMC의 조성이 높아지면 생분해 속도가 늦어져 필요이상으로 오래 남게 되어 이물반응을 유발하는 등의 문제점이 발생한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 종래 기술에서 문제되었던 CMC 유도체 부분을 사용하지 않으면서 히알루론산 유도체의 건조 및 정제과정에서 발생하는 문제점을 개선하여 균일한 형태와 우수한 물리적 강도를 가지는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름을 제공하는데 목적이 있다.

[0009] 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 우수한 물리적 강도, 체내 안정성, 유연성, 생체조직에 대한 부착성 및 생체적합성을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 상기 목적 및 기타 목적들은 하기 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성 될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 종래기술에서 발생하는 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 사용하여 히알루론산 에폭사이드 유도체를 건조 및 정제과정에서 발생하는 수축 및 물리적 강도 약화 현상을 방지하여 균일한 형태와 우수한 물리적 강도, 체내 안정성, 유연성, 생체조직에 대한 부착성 및 생체적합성 등이 향상된, 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명을 통해서 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 균일성과 물리적 강도, 체내 안정성, 유연성, 생체조직에 대한 부착성 및 생체적합성 등을 개선할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 우수한 생체적합성, 생분해성, 물리적 안정성 등을 가지고 있어 창상 피복재, 세포 지지체, 약물 전달체, 골재생유도막 및 조직 유착방지제 등 다양한 용도로 사용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 히알루론산이 가교결합된 구조에 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 물리적으로 결합되어 있는 구조를 나타내며, 정제 후에 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 대부분 제거된 상태에서의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 시험예 1에 따라 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자 함유 유무에 의한 필름 형상을 비교한 사진이다.

도 3는 본 발명의 시험예 2에 따라 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 함유한 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 IR 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 시험예 3에 따라 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름(실험군 1, 2, 3)과 상품화된 유착방지제 Interceed(비교군 1)와 골재생 유도막 Bio-Gide(비교군 2)의 인장강도를 비교한 도면이다.

도 5는 본 발명의 시험예 4에 따라 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 유기용매 처리 유무에 의한 인장강도를 비교한 도면이다.

도 6은 본 발명의 시험예 5에 따라 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 생체 내 잔존기간을 조직염색을 통해서 비교한 사진이다.

도 7은 유착방지 성능을 평가한 시험예 6의 동물실험에 있어서, 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름을 사용한 실험군(3종)과 상품화된 유착방지제인 Interceed (비교군 1) 및 유착방지제를 사용하지 아니한 대조군에서의 유착등급 및 유착세기를 나타낸 그래프이다.

도 8은 골 재생 정도를 평가한 시험예 7의 동물실험에 있어서, 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름을 사용한 실험군 3과 상품화된 골유도 재생막인 Bio-Gide (비교군 2) 및 골결손부에 아무런 처리로 하지 않은 대조군에서의 골 재생 정도를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 발명은 하이드록시(-OH) 말단기를 포함하는 고분자를 함유하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름을 제공한다.

[0016]

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0017]

구체적으로, 본 발명은 히알루론산과 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 혼합하고 2개 이상의 에폭사이드 기를 갖는 에폭사이드 가교제를 이용하여 히알루론산을 가교화 시킨 것이다. 상기에서 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자는 도 1에 나타난 바와 같이 필름으로 고형화되는 과정에서 수축현상을 막고 정제과정에서 서서히 제거되면서 히알루론산 유도체 필름의 형태가 변형되는 것을 막아준다.

[0018]

또한, 히알루론산 에폭사이드 유도체를 정제 후에 유기용매에 침전하여 정제과정에서 약해진 물리적 강도를 개선할 수 있다(도6).

[0019]

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 히알루론산이 50 내지 90중량%이고, 상기 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자는 10 내지 50중량%로 구성되어 있다.

[0020]

상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 가교밀도는 1mol% 내지 100mol%일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 5mol% 내지 50mol%일 수 있다. 가교밀도가 1mol% 미만일 경우 물 흡수력이 높아 형태변형이 발생하고 정제의 어려움이 있고 100mol%를 초과할 경우 깨지기 쉬우며 다량의 가교제가 잔존해 있을 가능성이 높아진다.

[0021]

본 발명에서 히알루론산 에폭사이드 유도체는 히알루론산 또는 히알루론산 염 단독, 또는 히알루론산 또는 히알루론산 염 그리고 히알루론산과 에테르 공유결합을 형성할 수 있는 고분자와 함께 에폭사이드 가교제에 의하여 반응하여 제조될 수 있다.

[0022]

상기에서 히알루론산 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 및 히알루론산 테트라부틸 암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 히알루론산 나트륨을 사용하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023]

본 발명에서 히알루론산과 에테르 공유결합을 형성할 수 있는 고분자는 히알루론산, 콜라겐, 알긴산, 혜파린, 젤라틴, 엘라스틴, 피브린, 라미닌, 피브로네틴, 프로테오글리칸, 혜파란설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄설페이트 및 케라탄 설페이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

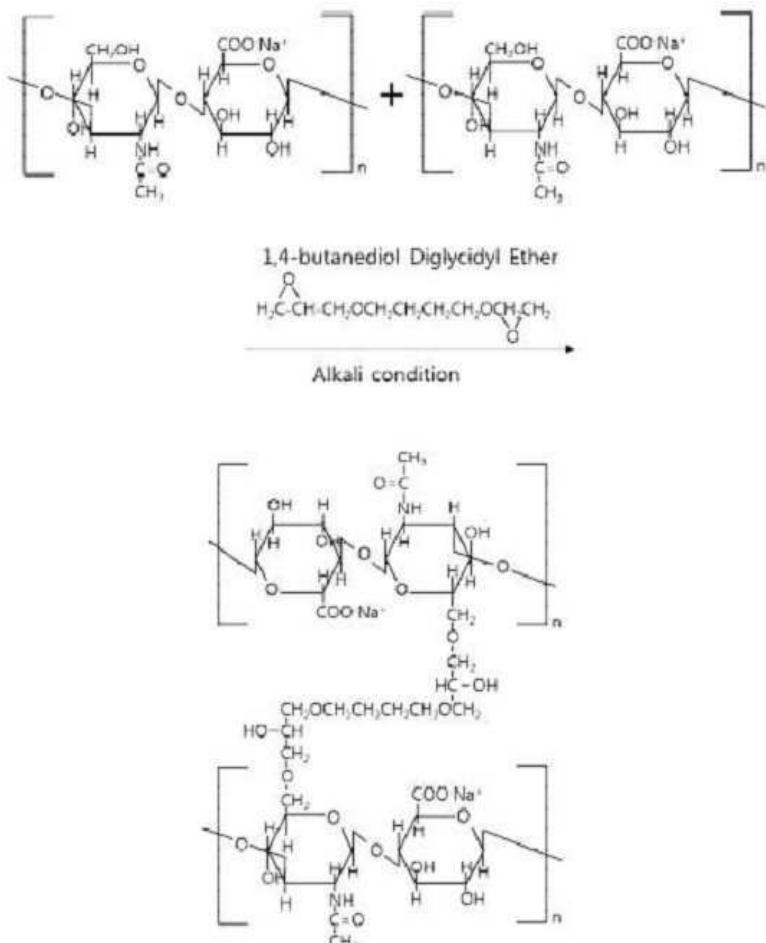
[0024]

본 발명에서 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자로는 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알콜, 폴리프로필렌 옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱글리콜산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 공중합체, 폴리부틸렌 옥사이드,

폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류, 폴리옥시-에틸렌 케스터오일 유도체류, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스터류 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명의 히알루론산이 에폭사이드 가교제에 의해서 유도체화되는 과정은 하기의 반응식 1에 도시하였다.

[0026] [반응식 1]



[0027]

[0028]

본 발명의 에폭사이드 가교제는 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(polyethylene glycol diglycidyl ether), 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether), 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(ethylene glycol diglycidyl ether), 1,6-헥산디올 디글리시딜 에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌 글리콜 디글리시딜 에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜 디글리시딜 에테르(poly(propylene glycol)diglycidyl ether), 폴리테트라메틸렌글리콜 디글리시딜 에테르(poly(tetramethylene glycol)diglycidyl ether), 네오펜틸 글리콜 디글리시딜 에테르(neopentyl glycol diglycidyl ether), 폴리글리세롤 폴리글리시딜 에테르(polyglycerol polyglycidyl ether), 디글리세롤 폴리글리시딜 에테르(diglycerol polyglycidyl ether), 글리세롤 폴리글리시딜 에테르(glycerol polyglycidyl ether), 트리메틸프로판 폴리글리시딜 에테르(trimethylpropane polyglycidyl ether), 1,2-(비스(2,3-에폭시프로포시)에틸렌(1,2-(bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 펜타에리스리톨 폴리글리시딜 에테르(pentaerythritol polyglycidyl ether) 및 소르비톨 폴리글리시딜 에테르(sorbitol polyglycidyl ether) 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

[0029]

상기 둘 이상의 에폭시 작용기를 포함하는 가교제는 히알루론산의 하이드록시(-OH) 말단기와 반응하여 에테르 결합을 형성하여 가교가 이루어진다.

[0030]

상기 히알루론산 에폭사이드 가교제의 중량비는 상기 히알루론산의 반복단위 100중량부에 대하여 1 내지 100중량부, 보다 바람직하게는 5중량부 내지 50중량부인 것을 특징으로 한다. 중량비가 5중량부 미만일 경우 물 흡수력이 높아 형태변형이 발생하고 정제의 어려움이 있고 50중량부를 초과할 경우 깨지기 쉬우며 다량의 가교제가 잔존해 있을 가능성이 높아진다.

- [0031] 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 물리적 강도를 개선하기 위해 사용되는 유기용매는 디메틸설폐사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 아세트로 나이트릴, 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF), 아세톤, 아세톤 수용액, 메탄올 또는 에탄올 등의 C₁ 내지 C₆ 알코올 또는 알코올 수용액을 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 의한 히알루론 에폭사이드 유도체는 수화된 상태에서의 건조 방법에 의해서 필름, 맴브레인, 스펀지, 분말 형태로 제조될 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명에 의한 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 수분 흡수능력이 높기 때문에 상처에서의 삼출물 및 혈액 등을 빠르게 흡수하여 치료효과와 상처 치유를 도와 줄 수 있다.
- [0034] 게다가, 상기 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 물리적 강도가 높아서(도 4) 조작이 용이하며 주위 조직들로부터 환부를 보호해 줄 수 있다. 또한, 분해효소에 대한 안정성을 갖추고 있기 때문에, 일정시간 동안 물리적인 장벽을 형성하게 되고, 그 후 완전히 분해되어 생체에 흡수된다 (도 6)
- [0035] 상기의 특성으로 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 조직수복용 재료, 골재생 유도막 또는 유착방지제의 용도로 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 본 발명에 의한 골재생 유도막 또는 유착방지제는 항균 및 항염증 천연 물질을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 항균 및 항염증 천연 물질은 녹차, 강황, 검정콩 종피, 장미꽃잎, 작약근, 도라지, 콩나물, 유색보리종피, 동백꽃잎, 메밀, 자몽, 감초, 황련, 황기, 황백, 황금, 계피, 목초, 복분자, 오배자, 향나무, 개나리, 고추잎, 박하, 뱀딸기, 뽕나무, 삼백초, 소나무, 약쑥, 어성초, 왕벚꽃나무, 조릿대 또는 양대줄기 추출물일 수 있다.
- [0037] 이하 본 발명의 이해를 돋기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변경 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- [0038] [실시예]
- [0039] 실시예 1~4: 히알루론산과 혼합하여 사용 가능한 고분자들의 가교 형성유무
- [0040] 본 실험에서 히알루론산과 혼합하여 사용 가능한 고분자들이 가교되어 에테르 공유결합 형성유무를 판단하기 위해 1중량 %의 히알루론산, 알긴산, 젤라틴, 콜라겐을 각각 1중량 % 히알루론산 용액과 50/50으로 혼합한 후 폴리에틸렌 옥사이드를 5중량% 첨가한 후 여기에 각각의 에폭사이드 가교제(1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 폴리프로필렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 네오펜틸 디글리시딜에테르)를 혼합된 고분자들의 반복단위 100중량부에 대해 5중량부 비율로 첨가하여 12시간 동안 실온에서 가교반응을 진행한 뒤 고형물을 꺼내어 탈이온수(D-I water)에서 1시간 동안 보관하였다. 고형물이 탈이온수에서의 용해여부를 확인하여 가교형성 유무를 판단하였다.

표 1

구 분	물 질	가교제	용해여부
실시예 1	히알루론산	1,4 부탄디올 디글리시딜 에테르	비용해
		폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		폴리프로필렌글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		네오펜틸 디글리시딜에테르	비용해
실시예 2	알긴산	1,4 부탄디올 디글리시딜 에테르	비용해
		폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		폴리프로필렌글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		네오펜틸 디글리시딜에테르	비용해
실시예 3	젤라틴	1,4 부탄디올 디글리시딜 에테르	비용해
		폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		폴리프로필렌글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		네오펜틸 디글리시딜에테르	비용해

실시예 4	콜라겐	1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르	비용해
		폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		폴리프로필렌글리콜 디글리시딜에테르	비용해
		네오펜틸 디글리시딜에테르	비용해

[0042] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이 히알루론산, 알긴산, 젤라틴, 콜라겐을 각각의 에폭사이드 가교제와 혼합하여 제조된 고형물들은 탈이온수에서 용해되지 않고 팽윤되어 존재하는 것으로 확인되었다. 상기한 결과로부터 히알루론산, 알긴산, 젤라틴, 콜라겐을 에폭사이드 가교제와 혼합할 경우 에테르 공유결합이 형성되어 탈이온수 내에서 안정하게 존재함을 확인하였다.

[0043] 실시예 5: 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 함유하는 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 제조

[0044] 본 실험에서 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자로 폴리프로필렌 옥사이드를 사용하였다. 0.25N NaOH에 10중량%의 히알루론산과 30중량%의 폴리프로필렌 옥사이드를 혼합한 용액을 각각 3개의 반응기에 준비하였다. 상기 용액의 히알루론산 100중량부에 대해 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 (polyethylene glycol diglycidyl ether)를 각각 5중량부, 10중량부, 25중량부의 비율로 첨가하였다. 실온에서 24시간 반응시킨 후 사각 디쉬(dish)에 담아 고르게 퍼준 후 12시간 동안 실온에서 건조하여 1차 필름을 제조하였다. 1차 필름을 정제수로 세척하여 비 반응물과 폴리프로필렌 옥사이드를 제거한 후 에탄올에 침전하고 수축하여 2차 필름을 제조하였다. 2차 필름을 정제수로 재팽윤하고 건조하여 최종 유도체 필름을 제조하였다. 본 발명의 실험을 실시하기 위해 제조된 유도체 필름을 가교제의 비율에 따라 실험군 1(5중량부), 실험군 2(10중량부), 실험군 3(25중량부)으로 명명하였다.

[0045] 비교예 1: 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 함유하지 않은 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 제조

[0046] 10중량%의 히알루론산을 0.25N NaOH에 녹여 히알루론산 용액을 준비하였다. 상기 용액의 히알루론산 100중량부에 대해 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 (polyethylene glycol diglycidyl ether)를 25중량부의 비율로 첨가한 후 실온에서 24시간 반응시켰다. 상기 용액을 사각 디쉬(dish)에 담아 고르게 퍼준 후 12시간 동안 실온에서 건조하여 1차 필름으로 제조하고 정제수로 세척하여 비 반응물을 제거하였다. 수화된 유도체를 에탄올에 침전하여 수축시켜 2차 필름으로 제조한 후 정제수로 재팽윤하고 건조하여 최종 유도체 필름을 제조하였다. 상기 비교예 1에서 제조된 유도체 필름은 실험군 4로 명명하였다.

[0047] [시험예]

[0048] 시험예 1: 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자의 함유 유무에 의한 필름형상 비교

[0049] 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자 필름의 균일성을 확인하기 위하여 실시예 5와 비교예 1에서 각각 제조된 1차 필름 형상을 사진으로 비교하였다.

[0050] 도 2에서 보는 바와 같이 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 함유되지 않은 필름은 건조 후에 크게 수축되어 말려있는 반면에 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 함유된 필름에서는 가장자리 부분에서 약간의 수축이 있었지만 말립현상은 보이지 않았다. 이상의 결과를 통해서 용액에서 필름으로 고형화되는 과정에서 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 수축을 막아주는 역할을 해주는 것으로 확인되었다.

[0051] 시험예 2: 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 구조분석

[0052] 1중량%의 히알루론산을 탈이온수(D-I water)에 용해하여 히알루론산 용액을 제조하고, 10중량%의 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자를 탈이온수에 용해하여 용액을 제조하였다. 제조된 용액을 각각 사각 디쉬(dish)에 담아 실온에서 12시간 건조하여 히알루론산 필름 및 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자 필름을 제조하였다. ATR-IR을 이용하여 상기 제조된 히알루론산 필름, 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자 필름, 실험군 3 및 실험군 4의 구조를 분석하였다.

[0053] 도 3은 IR 스펙트럼(IR spectrum)을 비교한 것으로, 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자 필름은 2885 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$, methylene)에서 강한 피크(peak)를 보였으며, 이와 유사하게 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 함유된 실험군 3도 2925 cm^{-1} 에서 강한 피크(peak)가 관찰되어 히알루론산과 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. 상기한 결과로 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 함유된 히알루론산 유도체는 정제 후에도 하이드록시 말단기를 포함하는 고분자가 일정량 남아있는 것으로 확인되었다.

시험예 3: 히알루론산 유도체 에폭사이드 유도체의 물리적 강도 측정

[0055] 실시예 5에서 제조한 실험군 1, 2, 3과 상품화된 유착방지제인 Interceed(J&J, USA)와 글재생 유도막인 Bio-Gide(Geistlich Pharma AG, Switzerland)를 각각 비교군 1, 2로 하여 물리적 강도 값을 비교, 분석하였다. 측정을 위하여 시료를 $3\times1\text{cm}$ 로 재단한 후 만능재료시험기(Instron, USA)의 Grip에 위치시킨 후 10mm/min 의 속도로 당기면서 재료에 걸리는 힘을 측정하였다.

[0056] 도 4는 실험군과 비교군의 인장력 (N) 값을 비교한 것으로서, 가교제의 함량이 많아질수록 물리적 강도가 증가하며 모든 실험군에서 비교군 1(Interceed)보다 높은 값을 보였다. 하지만, 실험군 1에서는 비교군 2(Bio-Gide)보다 다소 낮은 값을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이를 나타내진 않았다.

[0057] 이러한 결과를 토대로 히알루론산 유도체 필름이 유착방지제 또는 글재생 유도막으로 사용하기에 적합한 물리적 강도를 가지는 것을 확인하였다.

시험예 4: 유기용매 처리 유무에 의한 물리적 강도 비교

[0059] 실시예 5의 제조과정 중 수화된 HA 유도체를 에탄올에 처리한 것과 처리하지 않은 시료의 물리적 강도를 비교하기 위하여, 실험군 1, 2, 3과 실시예 5의 제조과정에서 수화된 HA 유도체를 에탄올에 침전하지 않고 전조하여 제조한 시료를 각각 준비하였다. 각각의 시료를 실시예 5와 같이 준비하여 물리적 강도를 측정하였다.

[0060] 도 5에서 보는 바와 같이 에탄올에 침전하여 제조한 시료는 침전하지 않고 제조한 시료보다 높은 물리적 강도를 보였다. 이상의 결과를 통하여 에탄올과 같은 유기용매를 처리하는 공정이 히알루론산 유도체의 물리적 강도를 높여준다는 것을 확인하였다.

시험예 5: 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 생체내 잔존기간 평가

[0062] 실시예 5에서 제조된 시료의 생체내 잔존기간을 평가하기 위해 동물실험을 진행하였다. 실험동물은 8주령의 SD rat을 사용하였다. 마취제를 쥐의 하복부에 주사하여 마취를 시행하고 등부에 $5\times10\text{mm}$ 크기의 시편을 각각 이식하고 2주, 4주, 12주에 조직학적분석(H&E staining)으로 시편의 잔존 여부를 평가하였다.

[0063] 상기 실험결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 나타낸 바와 같이 실험군 1은 2주까지는 생체내에서 관찰되었지만 4주, 12주에는 관찰되지 않았다. 실험군 2 및 3은 12주까지 생체내에 잔존하는 것으로 확인되었다. 상기 결과를 토대로 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 가교제의 함량에 따라서 생체 내 잔존기간의 차이를 보이지만, 히알루론산 에폭사이드 유도체는 생체 내에서 쉽게 분해되지 않고 일정시간 동안 안정하게 유지되는 것으로 확인되었다.

시험예 6: 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 조직유착 방지성능 평가

[0065] 실시예 5에서 제조된 시료의 조직유착 방지성을 평가하기 위해 동물모델(SD rat)을 이용하였다. 마취제를 쥐의 하복부에 주사하여 마취를 시행하였다. 마취된 쥐의 복부를 절개하고, 복벽(peritoneum)의 표피부분에 $1\times2\text{cm}$ 크기의 상처를 뼈 절삭기구(bone burr)를 이용하여 형성시키고, 이 상처와 맞닿아 있는 맹장에 표피가 살짝 벗겨질 정도로 상처를 냈다. 상처와 상처 사이에 어떠한 유착방지제도 사용하지 않은 대조군, 비교군 1(Interceed)과 실시예 5에서 제조된 실험군 1, 2 및 3의 조직 유착을 비교 관찰하였다. 각 시료들은 $2\times3\text{cm}$ 크기로 잘라 사용되었다. 조직유착 정도에 따라 4단계(0, 1, 2, 3, 숫자가 클수록 유착이 심함)의 유착평가 시스템(grading system)을 이용하여 그 성적을 합산하고 평균을 내었다(A. A. Luciano, et al., "Evaluation of

commonly used adjuvants in the prevention of postoperative adhesions", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 146, 88-92 (1983)).

[0066] 또한, 조직 유착이 발생한 종에 대해서 유착의 세기를 3단계(1, 2, 3, 숫자가 클수록 유착세기 강함)로 측정하여 그 성적을 합산하고 평균을 내었다.

[0067] 상기 동물실험에 의한 조직유착 정도 및 유착의 세기를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3의 유착 정도는 각각 0.67 ± 0.82 , 1.25 ± 0.96 , 0으로서, 2.6 ± 0.54 인 대조군 뿐만 아니라 2.5 ± 0.58 인 비교군 1에 비해서도 낮은 값을 보였다. 또한, 유착세기를 측정한 값에서도 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3은 각각 0.5 ± 0.54 , 1 ± 0.8 , 0인데, 1.6 ± 0.54 인 대조군, 1.75 ± 0.5 인 비교군 1에 비해 낮은 값을 보였다.

[0068] 유착방지 성능시험 결과, 본 발명의 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름은 가교 비율에 따라 약간의 차이를 보였지만, 대조군 뿐만 아니라 비교군 1과 비교하여 낮은 값을 보여 조직유착을 방지하는데 효과적인 것으로 확인되었다.

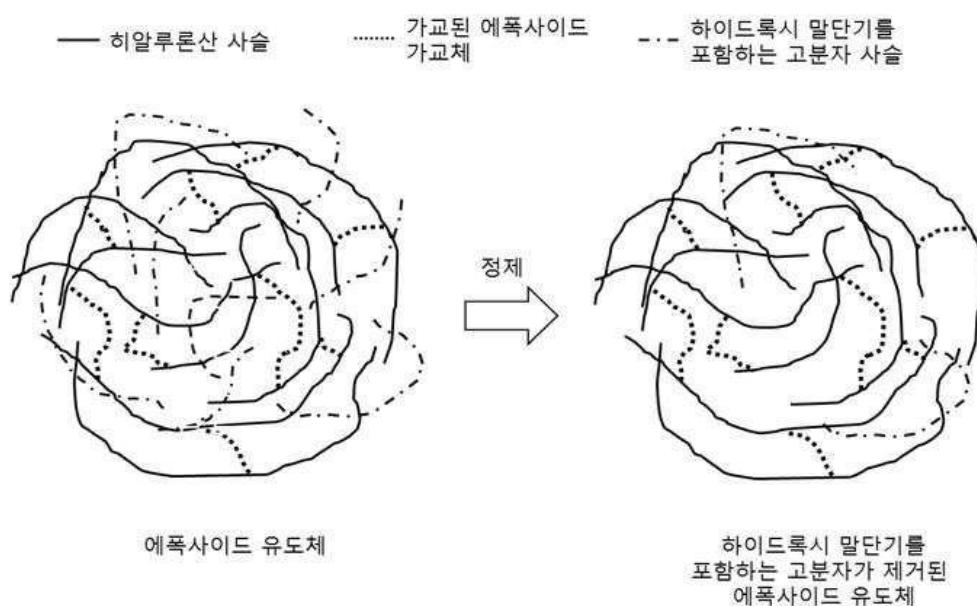
[0069] 시험예 7: 히알루론산 에폭사이드 유도체 필름의 골재생 정도 평가

[0070] 실시예 5에서 제조된 실험군 3의 골 재생 효과를 확인하기 위해, 8주령 SD rat을 모델 동물로 사용하였다. 실험동물을 마취한 후 이마 부분 중앙의 피부를 4cm 정도 절개한 후, 골막(periosteum)을 절개하여 옆으로 제쳐놓은 상태에서 뇌경막과 두 개 정중부를 지나는 혈관의 손상을 주의하면서 직경 8mm 치과용 드릴을 이용하여 임계 결손크기(critical size defect)인 지름 8mm 크기[J. P Schmitz et al., *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 205, 299(1986)]의 결손부를 형성시킨 후, 실험군 3과 비교군 2를 $\Phi 12\text{mm}$ 원형으로 재단하여 결손부위를 덮어주고, 골막과 피부를 각각 봉합하였다. 또한, 골 결손부에 어떠한 처리도 하지 않고 봉합한 대조군도 함께 실험하였다. 12주 동안 사육한 후, 동물을 희생하여 골 결손부를 채취하여 Micro-CT, Soft X-ray를 통해 골 재생 효과를 평가하였다.

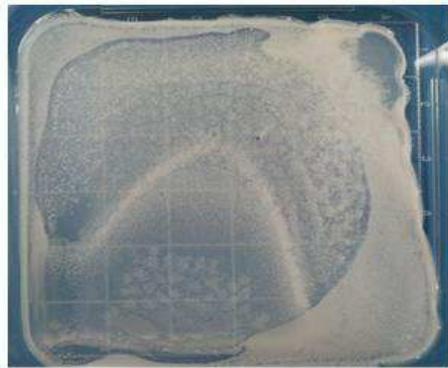
[0071] 도 8에서 나타난 바와 같이, 실험군 1이 대조군에 비해 골재생이 우수함을 관찰할 수 있었으며, 상품화된 골유도 재생막인 비교군2(Bio-Gide)와 동등한 골 재생효과를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 히알루론산 유도체 필름이 우수한 골재생 능력을 가지는 것을 확인하였다.

도면

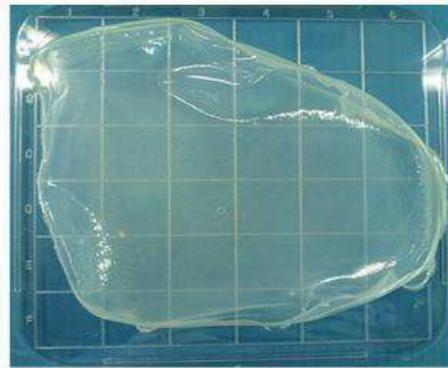
도면1



도면2

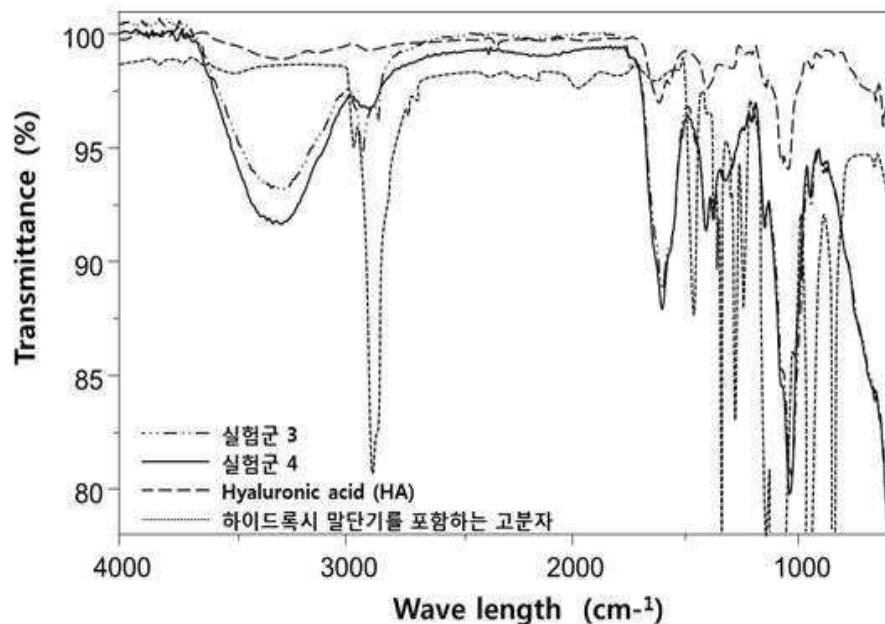


하이드록시 말단기를 포함하는
고분자가 함유된 필름

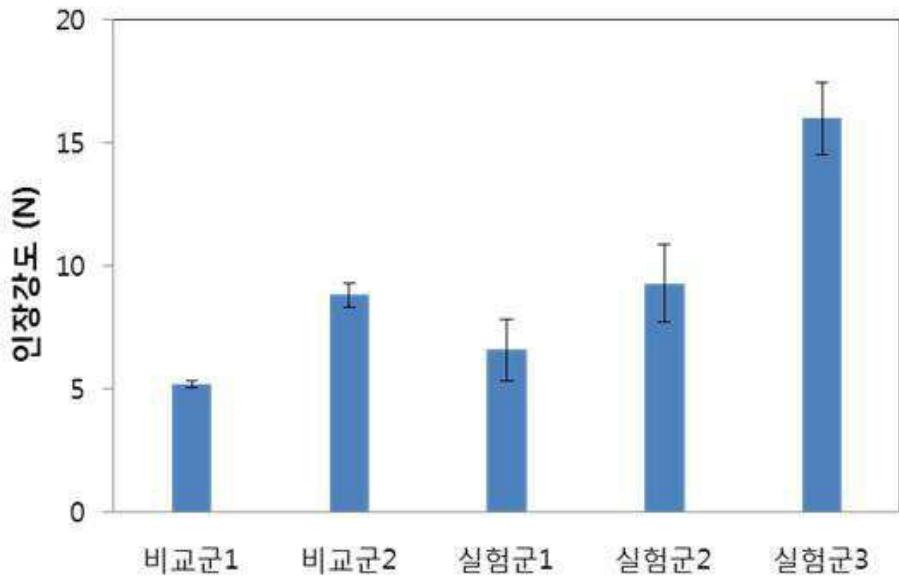


하이드록시 말단기를 포함하는
고분자가 함유되지 않은 필름

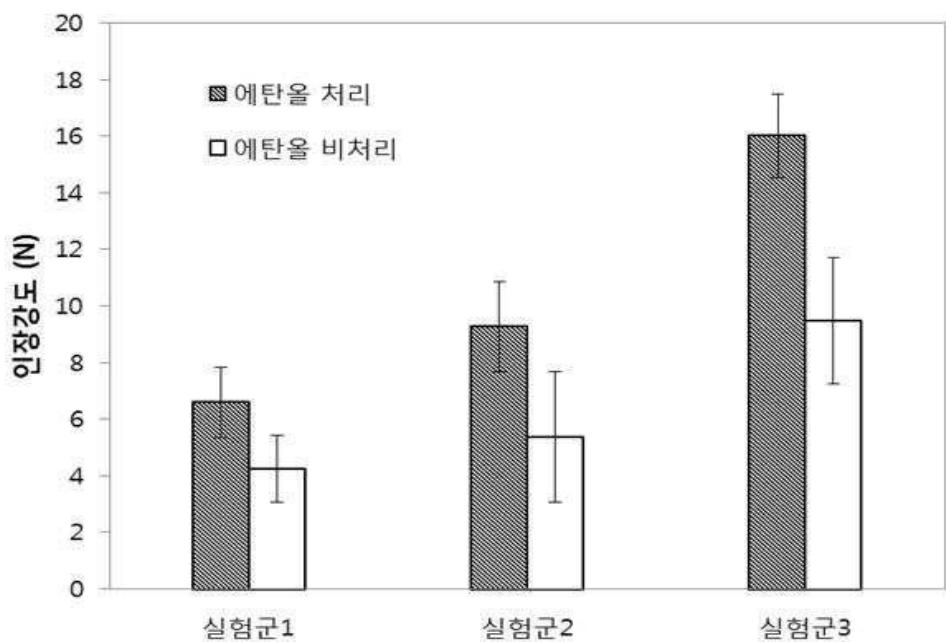
도면3



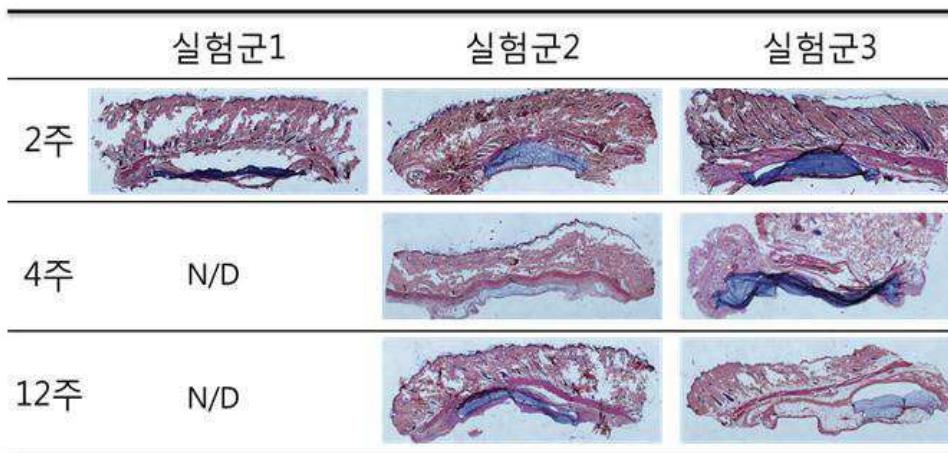
도면4



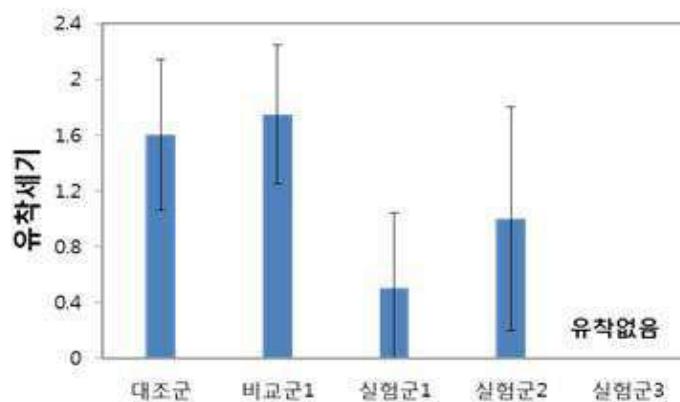
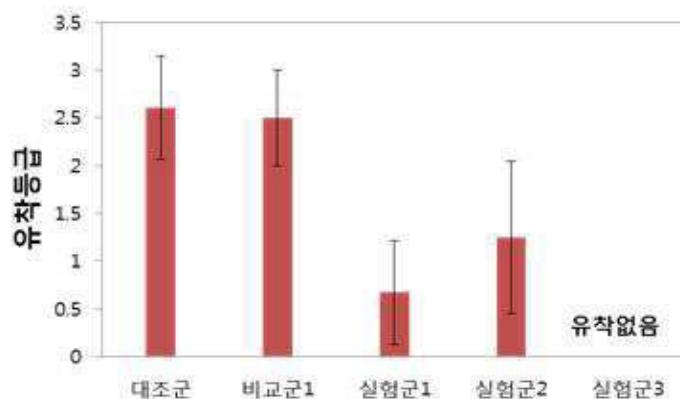
도면5



도면6



도면7



도면8

