(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0073673
(43) 공개일자 2017년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/26* (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7013967
(22) 출원일자(국제) 2015년10월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년05월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/074610
(87) 국제공개번호 WO 2016/062862
국제공개일자 2016년04월28일
(30) 우선권주장
14382417.5 2014년10월24일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
히스토셀, 에세.엘레.
스페인 에-48160 데리오 (비즈카이아) 2° 파르케 테크놀로지코 800
(72) 발명자
베고나 까스트로 빼오
스페인, 48490 레이오아 - 비즈카이야, 알데꼬아네 128 2 오데
암빠이로 바이게뜨 오르츠
스페인, 46183 라 엘리아나 - 발렌씨아, 17, 사그라다 빠밀리아
(74) 대리인
특허법인주원

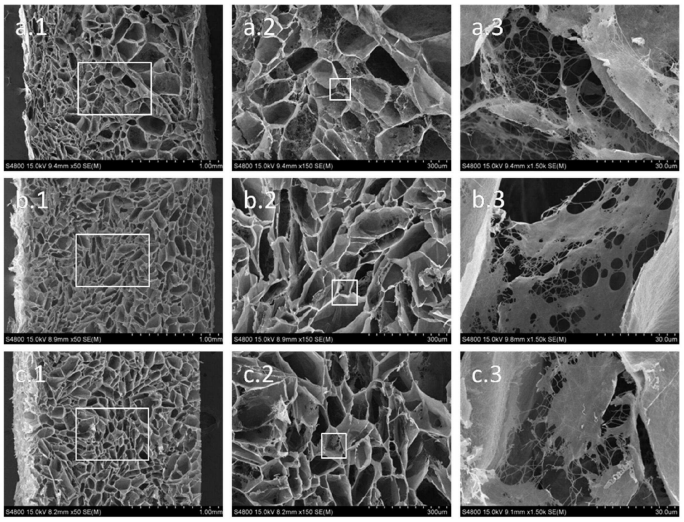
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **구강 점막 재생을 위한 생체재료 스캐폴드**

(57) 요 약

본 발명은 생체재료 스캐폴드를 제조하기 위한 공정을 나타내며, 상기 방법은 a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계; b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing)시켜서 물리적으로 가교결합(crosslink)시키는 단계;및 c) 상기 단계 b)의 수행 후 얻은 상기 물리적으로 가교결합(crosslink)된 하이드로겔을 동결건조시키는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 상기 정의된 공정에 의해 얻을 수 있는 생체물질 스캐폴드 뿐만 아니라 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원 또는 대체시키는데 이용하기 위한 생체재료 스캐폴드에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/225 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/3616 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 생체재료 스캐폴드의 제조 방법:

a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계;

b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing)시켜서 물리적으로 가교결합(crosslink)시키는 단계;및

c) 상기 단계 b)의 수행 후 얻은 상기 물리적으로 가교결합(crosslink)된 하이드로겔을 동결건조시키는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 피브린 네트워크는 피브리노겐-포함 물질을 중합함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 피브리노겐-포함 물질은 혈장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 피브리노겐-포함 물질의 중합은 응고제, 칼슘 공급원(calcium source)의 존재하에서 및 선택적으로는, 항피브린용해제(antifibrinolytic agent)의 존재하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 칼슘 공급원(calcium source)은 칼슘염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다당류 네트워크는 다당류 포함 물질의 중합에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 다당류 포함 물질은 아가로오스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에서 정의된 공정에 의해 얻어질 수 있는 생체재료 스캐폴드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 생체재료 스캐폴드는 상기 스캐폴드의 구조 내에 통합되거나 그 표면 상의 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체재료 스캐폴드.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 상호침투 네트워크(interpenetrating network)를 가지는 가교결합된 하이드로겔의 제조 공정:

a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계; 및

b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing) 시키는 단계.

청구항 11

제10항에서 정의된 공정에 의해 얻을 수 있는 상호침투 네트워크(interpenetrating network)를 가지는 가교결합된 하이드로겔.

청구항 12

의약으로서 이용을 위한 제8항 또는 제9항에서 정의된 생체재료 스캐폴드.

청구항 13

질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원(restore) 또는 대체시키는데 이용하기 위한 제8항 또는 제9항에서 정의된 생체재료 스캐폴드.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 연조직은 기능장애, 부상 또는 상처, 궤양, 화상, 양성 또는 악성 신생물(neoplasma), 감염, 타박상, 외상성 정신 장애(traumatism), 석회화(caustication), 선천적 기형, 물질 손실(substance loss) 및 치근막염(periodontal disease)를 포함하는 목록으로부터 선택되는 질병의 결과로서 손상된 또는 질병에 걸린 것을 특징으로 하는 생체재료 스캐폴드.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 연조직은 구강 점막인 생체재료.

청구항 16

제8항 또는 제9항에서 정의된 생체재료 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

제8항 또는 제9항에서 정의된 생체재료 스캐폴드를 포함하는 미용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조직 공학 분야, 및 더욱 구체적으로는 재생, 회복(repairing), 및/또는 연조직 대체를 위한 생체재료들(biomaterials)에 속한다.

배 경 기 술

[0002] "조직 공학" 으로 알려진 새로운 매우 유망한 지식 분야가 최근 몇년간 의학적 및 치과적 연구 에서 발전되어 왔다. 이러한 획기적인 분야의 주요 목적들은 상처들, 화상과 같은 다양한 요인들, 암 또는 특정 선천적인 이상들(congenital abnormalities)과 같은 획득된 질병들에 의해 손상된 인체의 실제 조직 및 기관들의 생체인공적 재생, 치료 또는 대체를 목적으로 한다. 조직 공학은 3가지 핵심적인 요소들에 주로 기초한다: 1)세포들, 2) 생체재료들(Biomaterials), 3) 생체분자들, 유도인자들(inducers) 또는 성장 인자들.

[0003] 생체재료들의 경우에, 그들은 생물학적 시스템들의 생산에 사용되고 의약의 다양한 분야들에 적용된다. 다른 특성들 사이에서, 이들 재료들은 그들의 살아있는 조직들과 영구적 접촉들로 인해 생체에 적합하다. 따라서, 그의 기능을 수행하는 기간 동안 조직- 재료 간섭에서 발생하는 원하지 않은 반응들을 방지하고 생체재료의 특성들을 유지하는 것이 필수적이다. 현재 연구들은 상기 재료의 물리화학적 특성들, 기계적 특성들 사이의 특이적 상호작용들의 이해와, 사이토카인과 성장인자의 접착, 활성화 및 방출 같은 세포 행동의 관찰에 주력하고 있다. 오늘날, 많은 양의 다른 생체재료들이 있으며, 이는 그들의 조성에 따라서 자연의 또는 합성의 중합의, 금속의 또는 세라믹 생체재료들로 분류될 수 있다.

[0004] 조직 공학에서, 생체재료들은 그들이 인공의 세포외 기질로서 작용하기 때문에 반드시 세포들의 생물학적 및 기계적 작용을 도와야 한다. 결과로서, 생체재료들은 세포들에게 적합한 구조와 작용을 가지는 새로운 조직들을 형성할 수 있도록 3차원 공간을 제공할 수 있다.

[0005] 연조직 결손들 가운데, 구강 점막 회복은 이 조직의 복잡한 구조로 인하여 도전과 필수적이 임무를 나타낸다. 다양한 외과적 절차들, 부상, 또는 다른 임상 질환들(clinical conditions)의 결과로서 구강 점막의 손실은 상기 생성된 결손을 효과적으로 회복하는 적합한 커버를 얻기 위한 필요의 관점에서 실제의 문제이다. 이러한 필요에 대하여 채택된 현재의 해결책등은 다른 공여자 부위들 및 기원들(origins)로부터 이식(graft)의 적용을 포함한다. 그러나, 이들의 이식편(graft)은 거부(동종이식편, 이종이식편), 공여자 부위 질병율(자가이식편), 원조직 특성들의 유지와 같은 합병증들을 나타내며, 주변 조직들에 의한 붕괴를 막는 동안 새로운 조직의 발달을 가능케 하는 충분한 구조적 특성들을 제공하며, 제한된 기능들은 심미적으로 매력이 없다. 이러한 합병증들은 해부학적으로 및 심미학적으로 수여부위(recipient site)와 유사한 기능적 생물학적 치환들을 생성하는 것이 필요하게 만든다. 오늘날, 많은 연구 그룹들은 그들의 연구를 이식되어질 자연상태의 조직과 유사한 조직학적 조직(histological organization) 을 제공하고, 상기 자연상태의 조직에 효과적으로 통합되어, 영향받은 부위의 손상된 조직을 기능적 조직으로 대체하는 새로운 생체재료의 개발에 촛점을 맞추고 있다. 그러한 생체재료의 생성은 거부 및 제한된 양의 조직을 포함하는 이러한 문제점들을 해결할 현재 실제로 최선의 대안이다.

[0006] 구강 점막의 재생을 위한 생체재료는 반드시 투과성, 안정성, 탄성, 유연성 및 가소성과 같은 기계적 및 구조적 특성들을 반드시 가지며, 다른 원하는 형태들, 예를들면, 시트 내, 겔 또는 고체-3차원 구조들을 반드시 채택한다. 이상적으로, 그들은 또한 새로운 조직 리모델링 공정으로서 주변 세포들을 촉진시킴과 성장 인자들 상기 물질이 분해하는 동안 부상 부위로 돌아가는 것에 의해 새로운 조직 형성을 유도하여야 한다.

[0007] WO 03/007873 은 트롬빈, 인자 XIII 및 염화칼슘의 존재 하에서 피브리노겐으로부터 가교결합된 피브린을 포함하는 동결건조된 생체적합성의 다공성 매트릭스를 게시한다. 상기 매트릭스는 추가적으로 다당류와 같은 보조성분을 포함할 수 있고, 주입물(implant)로서 사용될 수 있다.

발명의 내용

[0008] 발명의 간단한 설명

[0009] 본 발명의 저자들은 거대다공성(macroporous) 스캐폴드 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 새로운 생체재료를 개발하였고, 다공성 스태폴드 구조는 상기 재료에 고강도를 제공하며, 그의 팽창된 상태에서 용이하게 조작되며, 안정성, 탄성, 유연성 및 가소성을 가짐으로써 변형 힘을 가한 후에 그 형상을 되찾을 수 있다. 또한 본 발명의 생체재료는 그의 팽창된 상태에서 깨지거나 파괴되지 않고, 봉합공정(suture process)을 견뎌내는 것을 나타내었고, 이는 상기 손상된 조직의 정확한 수리를 보증한다.

[0010] 생물학적 테스트 또한 상기 생체재료와 세포들의 정확한 상호작용, 특히 인간 피브로블라스트들, 케라티노사이트들, 줄기세포 및 연조직들과 관련된 다른 세포 유형 및 구강 점막 치료, 뿐만 아니라 상기 세포들에 대한 세포독성의 결핍을 지적하였다.

[0011] 추가적으로, 상기 본 발명의 생체재료는 생체내 모델에서 테스트 되었다. 그 결과들은 독성 이벤트들 및 적절한 분해성 비율 오버타임을 확인한다. 또한 상기 생체재료는 이식 후 초기 단계들에서 신혈관 형성의 분명한 신호들을 제공하며, 주변 조직과 적합한 상호작용을 나타내며, 즉 이는 본 발명의 생체재료를 이식(colonize)할 수 있게 한다.

[0012] 이러한 생체물질은 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔의 동결건조시킴으로써 합성된다.

[0013] 따라서, 본 발명의 첫번째 측면은 생체재료 스캐폴드의 생산 공정(지금부터 공정1)을 나타내며, 상기 제조방법은 다음을 포함한다.

[0014] a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계;

[0015] b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing)시켜서 물리적으로 가교결합(crosslink)시키는 단계;및

[0016] c) 상기 단계 b)의 수행 후 얻은 상기 물리적으로 가교결합(crosslink)된 하이드로겔을 동결건조시키는 단계.

[0017] 본 발명의 두번째 측면은 상기 정의된 공정 1에 의해 얻을 수 있는 생체재료 스캐폴드를 나타낸다.

[0018] 본 발명 공정의 단계 b)로부터의 결과인 하이드로겔은 본 발명의 생체재료에 동결융해(freeze-thawing) 공정의 적용으로부터 유도될 수 있는 물리적 가교결합의 결과로서 향상된 기계적 특성들을 부여한다. 이러한 동결융해

(freeze-thawing) 단계는 상호 침투 네트워크를 가지는 하이드로겔을 제공한다.

[0019] 따라서, 본 발명의 또하나의 측면은 상호침투 네트워크(interpenetrating network)를 가지는 가교결합된 하이드로겔의 제조 공정(지금부터 공정 2)을 나타내며, 상기공정은 다음을 포함한다.

[0020] a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계; 및

[0021] b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing) 시키는 단계.

[0022] 본 발명의 추가의 측면은 상기 정의된 공정 2에 의해 얻을 수 있는 상호침투 네트워크(interpenetrating network)를 가지는 물리적으로 가교결합된 하이드로겔을 나타낸다.

[0023] 본 발명의 또하나의 측면은 의약으로서 이용을 위한 상기 정의된 생체재료 스캐폴드에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 네번째 측면은 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 회복 또는 대체시키는데 이용하기 위한 상기 정의된 생체재료 스캐폴드에 관한 것이다.

[0025] 특별한 실시예에서, 상기 연조직은 구강 점막이다.

[0026] 본 발명의 추가의 측면은 상기 정의된 생체재료 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물을 나타낸다.

[0027] 본 발명의 또하나의 측면은 상기 정의된 생체재료 스캐폴드를 포함하는 미용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명은 또한 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 회복 또는 대체시키는데 이용하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 인간 또는 동물에 치료적으로 유효량의 상기 정의된 생체재료 스캐폴드를 투여하는 것을 포함한다.

[0029] 본 발명의 또하나의 측면은 상기 정의된 생체재료 스캐폴드의 의약에서의 이용에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 또한 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원 또는 대체시키는데 이용하기 위한 상기 정의된 생체재료 스캐폴드의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1. 다른 아가로오스 농도의 피브린 및 아가로오스 젤들의 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy) 사진 : a) 0.2%; b) 0.4%; c) 0.6%. 서브인덱스 1, 2 및 3 은 50X, 150x 및 1500X 각각. 서로 다른 스케일에 해당한다.

도 2. 주사 전자 현미경 사진들은 서로 다른 아가로스 조성들을 가지는 재료물질의 구조를 더욱 상세하게 나타낸다. 맨 윗줄: 1.500X. 아래 줄: 20.000X. a) 0.2% 아가로오스; b) 0.4%e; 아가로오스 c) 0.6% 아가로오스.

도 3. 얻어진 본 발명의 하이드로겔의 상세:

(a) 본 발명의 공정 1의 단계 a)에 따름; 본 발명의 공정 1 또는 2의 단계 a) 및 단계 b)에 따름.

도 4. 팽창된(swollen) 생체재료 및 그의 조작의 상세.

도 5. 생체재료의 말단들의 봉합술 후의 생체재료의 상세.

도 6. 본 발명의 생체재료에서 배양된 인간 섬유아세포(fibroblasts)의 녹색/적색 형광 현미경사진(0.2% 아가로오스). A, B 및 C: 각각 24, 48 및 72 시간 동안 배양 후. A, B 및 C 는 a, b 및 c보다 고배율로 확대한 현미경사진에 해당함. 스케일 바는 200 마이크론임.

도 7. 본 발명의 생체재료에서 배양된 인간 섬유아세포(fibroblasts)의 녹색/적색 형광 현미경사진(0.4% 아가로오스). A, B 및 C: 각각 24, 48 및 72 시간 동안 배양 후. A, B 및 C 는 a, b 및 c보다 고배율로 확대한 현미경사진에 해당함. 스케일 바는 200 마이크론임.

도 8. 본 발명의 생체재료 상에서 배양된 인간 섬유아세포들의 세포 생존도(Cell viability) (0.2% 및 0.4% 아가로오스). 상기 값들은 대조군(100%)에 대한 세포 생존도의 퍼센티지를 나타낸다. 점선은 ISO 10993:5에 따른 세포독성 한도를 나타낸다.

도 9. 양성 대조군 (irritant), 음성 대조군 (reference viability) 및 본 발명에 따른 샘플들 (Biom 1 및 Biom 2)에서 생존율의 퍼센티지. 점선은 본 자극 모델(irritation model)에 사용된 한도를 나타낸다. 선 위의

값들은 비자극물(NON-IRRITANTS) 로 고려되며 반면에 이 선 아래의 값들은 자극물(IRRITANTS)로 고려됨.

도 10. 쥐에서의 상기 물질들의 이식 부위의 다이어그램 및 서로 다른 시간들에서의 생체재료 외식편들(biomaterial explants) 이미지들: a) 7 일; b) 14 일; c) 30 일 및 d) 60 일.

도 11. 테스트 시간 동안 생체재료 외식편들의 육안 이미지: a) 7 일; b) 14 일; c) 30 일 및 d) 60 일.

도 12. 테스트 시간동안 외식편들의 조직학적 이미지:(7, 14, 30 및 60 일).

도 13. 미니피그 모델에서 구강 점막 결손에서의 컨셉의 생체내 증거: a) 발치 후 구강 점막 결손 b) 점막 결손 안에 본 발명의 생체재료 이식 c) 흡수봉합사로 생체재료 이식 후 결손 봉쇄 d) 동물 턱으로부터 알지네이트 캐스트 모델들의 스캐닝 및 *OrthoViewer* 이미지 분석 소프트웨어를 통한 이미지 분석의 예

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 여기에서 사용된 용어 "생체재료"는 살아있는 조직 안으로 이식되기 적합한 자연의 또는 합성의 생체적합성 물질을 말하며 이는 환자 또는 대상에서 본래의 기능을 수행, 증가, 또는 대체한다. 본 발명에 따른 상기 생체재료는 특별히 상기 상처(lesion)의 부위 내부로 일단 이식되면 재생에 의해 연조직 결손 또는 부상들을 재생, 대체 및/또는 회복하는데 적합하다.

[0033] "스캐폴드(scaffold)" 는 거대분자들의 연합에 의해 형성된 네트워크에 의해 구성된 매우 다공성의 3차원 구조로 설명된다. 이러한 거대분자들 사이의 연합은 강한 또는 약한 상호작용들(공유결합과 같은)에 의해 화학적으로 제공된다. 이 연합은 화학적 가교결합 네트워크를 만든다. 공정 1의 단계 b)의 수행 결과로서, 상기 거대분자들 사이의 연합이 또한 물리적으로 제공되며, 물리적 및 화학적 가교결합 네트워크를 가져온다.

[0034] 따라서, 본 발명에서 상기 생체재료 스캐폴드는 스캐폴드 구조를 가지는 상기 정의된 생체재료를 말한다.

[0035] 이전에 언급한 바와 같이, 생체재료 스캐폴드의 제조를 위한 본 발명의 공정 1은 하기를 포함한다:

[0036] a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계;

[0037] b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing)시켜서 물리적으로 가교결합(crosslink)시키는 단계;및

[0038] c) 상기 단계 b)의 수행 후 얻은 상기 물리적으로 가교결합(crosslink)된 하이드로겔을 동결건조시키는 단계.

[0039] 본 발명의 공정 1의 첫번째 단계는 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔의 제공을 포함한다.

[0040] 용어 "하이드로겔" 은 기술분야에서 잘 알려져 있고, 흔히 고체 상으로 알려진 것 안에 갇혀진 액체 상으로서 물을 가지는 겔로서 이해된다. 이러한 고체 상은 상기 액체 상을 가두고 그것이 흐르는 것을 방지하는 네트워크를 구성한다.

[0041] 본 발명의 공정의 첫번째 단계에서 제공된 하이드로겔은 피브린 네트워크를 제공한다. 용어 "피브린 네트워크", "피브린 매트릭스", "피브린 마이오매트릭스", "피브린-기초의 스캐폴드", "피브린 스캐폴드", 피브린 겔", "피브린 풀", 및 "피브린 실란트"들은 기술분야에서 자주 교체하여 사용되며, 응고 인자 및 Ca^{++} 공급원의 존재하에서 피브리노겐의 중합 생성물로부터 초래되는 3차원 네트워크를 말한다. 이러한 피브린 매트릭스는 부상 후 몸에서 자연적으로 제공될 뿐만 아니라, 조직 대체물로서 조작될 수 있다.

[0042] 따라서, 특정 실시예에서, 상기 피브린 네트워크는 적어도 하나의 응고 인자 및 칼슘 공급원의 존재하에서 피브리노겐-포함 물질의 중합에 의해 얻어진다

[0043] 바람직한 실시예에서, 상기 피브리노겐-포함 물질은 동종의 또는 이종의 기원의 것이다. 그럼에도 불구하고 또한 자가조직의 기원의 것일 수도 있다.

[0044] 피브리노겐은 혈장에 존재하는 고분자량 단백질이다. 따라서 피브린 네트워크의 생성을 위한 출발 물질로서 사용된 피브리노겐-포함 물질은 혈장 또는 혈장 유도체, 예로서, 이에 한정되지 않는 예로서, 저온침강물(cryoprecipitate) 또는 피브리노겐 농축물과 같은 것일 것이다. 이 경우 상기 응고 인자는 또한 혈장에 존재하며 특히 응고 인자는 트롬빈이다.

[0045] 트롬빈은 피브리노겐 분자를 저분자량 폴리펩타이드 및 피브린 모노머들로 파열을 유발하는 단백질 분해효소이

다. 상기 모노머들은 다이머로 중합하고 그 후에 이전에 트롬빈에 의해 활성화된 인자 XIII의 작용을 통해, 칼슘 이온들의 존재하에서 공유결합에 의해 서로 결합한다.

[0046] 피브린 네트워크의 준비에 사용된 피브리노겐의 농도는 다양할 것이며 1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL 까지(상기 하이드로겔에서 최종농도) 범위의 농도를 포함한다. 바람직한 실시예에서는 상기 피브리노겐은 약 1 내지 5 mg/mL의 농도들로 추가된다.

[0047] 나아가, 상기 피브리노겐은 어떠한 적합한 농도의 응고 인자와 혼합될 수 있다. 바람직하게는 상기 응고 인자는 트롬빈이다.

[0048] 트롬빈은 약 0.1 IU/mL 내지 약 300 IU/mL 범위의 변화하는 농도들로 추가된다.

[0049] 바람직하게는, 상기 트롬빈 대 피브리노겐 비율은 약 0.001 내지 약 100, 더욱 바람직하게는 약 0.01 내지 약 10, 더욱 더 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1의 범위이다.

[0050] 특별한 실시예에서, 상기 하이드로겔은 최종농도 약 1 내지 약 100 mg/mL 에서 피브리노겐 및 최종농도 약 0.5 IU/mL 내지 약 250 IU/mL 에서 트롬빈을 포함한다.

[0051] 특별한 실시예에서, 상기 피브리노겐-포함 물질의 중합은 또한 다른 응고 인자들의 존재하에서 수행된다.

[0052] 용어 "응고 인자"는 구성성분, 보통 혈장에 존재하며 응고를 가능하게 하는 체인 반응에 포함된 단백질을 말한다. 본 발명에서 사용되기 위해 적합한 응고 인자들은 제한이 없이, 인자 III (조직 인자 또는 트롬보플라스틴); 인자 IV; 인자 V (프로악셀레린(proaccelerin) 또는 불안정 인자); 인자 VI, 인자 VII (안정한 인자 또는 프로컨버틴(Proconvertin); 인자 VIII: (항혈우병 인자(antihemophilic factor) A 또는 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor); 인자 IX (항혈우병 인자(Antihemophilic) B 또는 크리스마스 인자), 인자 X (스튜아트-프라워 인자), 인자 XI (혈장 트롬보플라스틴 선행사건): 인자 XII (Hageman factor), 인자 XIII (피브린 안정화 인자), 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor), 고분자량 ㅋ키니노겐(HMWK 또는 피츠제럴드 인자) 등을 포함한다.

[0053] 따라서, 혈장 또는 피브리노겐-포함 물질과 같은 혈장 유도체를 이용하는 경우에, 피브리노겐의 중합에 필요한 모든 분자들은 거기에 포함되며 상기 피브린 네트워크는 칼슘 공급원의 추가에 의한 혈장으로부터 형성될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 칼슘 공급원은, 제한되지 않고, 염화칼슘, 글루콘산 칼슘, 또는 그의 조합과 같은 칼슘 염이다. 더욱 바람직한 실시예에서, 상기 칼슘 염은 염화칼슘이다. 더욱 더 바람직한 실시예에서, 상기 염화칼슘의 농도는 0.1 내지 3 g/L 사이이다. 그러나, 더 낮거나 더 높은 농도들이 또한 사용될 수 있다. 특별한 실시예에서, 상기 피브리노겐-포함 물질은 물 또는 PBS와 같은 생리 식염수 용액에 첫째로 희석된다.

[0054] 피브린 폴리머는 섬유소용해(fibrinolysis)로 불리는 공정을 통해 분해될 수 있다. 섬유소용해 동안, 플라스미노겐은 플라스미노겐 활성인자(tPA)에 의해 활성 효소 플라스민으로 전환된다. 플라스민은 그 결합 부위들을 통하여 피브린 표면에 결합하며 피브린 분해를 초래한다. 상기 하이드로겔의 섬유소용해를 막기 위해서, 상기 피브리노겐의 중합은, 제한됨이 없이, 엡실론 아미노카프론산(epsilon aminocaproic acid), 트라넥사민산(tranexamic acid) 또는 아프로티닌과 같은 항섬유소용해제(antifibrinolytic agent)의 존재하에서 수행될 수 있다.

[0055] 트라넥사민산은 플라스미노겐에서 라이신 결합 부위에 대해 높은 친화도를 가지고, 이러한 부위들을 차단할 수 있고 플라스미노겐 활성인자가 피브린 표면에 결합하는 것을 막으며, 항섬유소용해 효과를 가하는 아미노산 라이신의 합성 유도체이다. 트라넥사민산은 다른 동물 기원의 항섬유소용해제 가운데 질병들을 전염시키지 않는다는 점에서 유익하다. 바람직한 실시예에서, 하이드로겔 내에서 트라넥사민산의 농도는 0.5 내지 2 g/L, 바람직하게는 1 내지 2 g/L이다. 그러나 더 낮거나 더 높은 농도들 또한 사용될 수 있다.

[0056] 피브린 네트워크들은 매우 다재다능하며 따라서 그들은 다른 인공 조직들의 발달을 위해 사용되어 왔다. 그러나 이들의 임상적 이용은 주로 낮은 항상성(consistency), 그의 어려운 조작 및 그의 매우 연약함(great fragility)이라는 점에서 제한되어 왔다. 이러한 이유 때문에, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 제공된 하이드로겔은 다당류 네트워크를 추가로 포함한다. 일반적으로, 상기 다당류는 조직의 강도와 항상성을 제공하는 데 사용되며, 그 안에서 용해성이어야 한다.

[0057] 여기서 사용된 용어 "다당류 네트워크"는 다당류의 물리적 겔화로부터 결과인 3차원 네트워크를 나타낸다. 다당류 네트워크는 보통 물리적 겔들, 즉 구성성분들 사이의 화학적 결합들에 의해 안정화되지 않고 오히려 저에너

지 결합들(반 데르 발스, 수소 결합들, 극성 결합들, 이온 결합들 등.)에 의해 안정화되는 겔들을 형성한다.

[0058] 상기 다당류는 겔을 형성할 수 있는, 바람직하게는 온도의 변화에 의해, 어떠한 다당류일 수 있고, 아가로오스, 아가, 셀룰로오스, 덱스트란, 전분, 키토산, 곤약, 커드란, 카라기닌, 펙틴, 젤란, 및 알지네이트로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 당업자들은 이해할 것이다, 그러한 겔 상태가 된 다당류는 유익하게 하나의 다당류로 구성되고, 그러나 본 발명은 또한 2 이상의 다당류들의 혼합물을 포괄한디. 본 방법의 유익한 실시예에서, 상기 다당류는 아가로오스이다.

[0059] 당업자들은 다당류의 겔화 및 상기 다당류 네트워크의 형성을 위한 적합한 조건들은 그의 본연에(nature)에 달려있다는 것을 인식할 수 있을 것이다. 따라서 다당류로서 아가로오스의 이용의 바람직한 경우에서, 온도를 아가로오스 농도의 겔화 온도 아래로 낮추면 충분하다. 이러한 온도는 샘플에서 아가로오스 농도의 겔화 온도의 연관성을 보여주는 표들로부터 당업자들에 의해 손쉽게 결정될 수 있다.

[0060] (예를들면, 상기 표는 하기에서 이용가능하다 http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Appendix_B_-_Agarose_Physical_Chemistry.pdf

[0061] 다른 실시예들에서, 본 발명은 변형된 아가로오스들, 제한이 없이, 메틸아가로오스, 하이드록시에틸아가로오스,하이드로프로필아가로오스, 알릴아가로오스, 아세틸아가로오스 등의 이용을 고려한다.

[0062] 바람직한 실시예에서 아가로오스는 낮은 녹는점 아가로오스이다. 낮은 녹는점 아가로오스는 Ultra Pure (R) 아가로오스 (Invitrogen), NuSieve (R) GTG (R) 아가로오스 (Lopza), LM 아가로오스 및 LM Sieve 아가로오스 (Pronadisa)아가로오스 SERVA Premium (Serva) 등과 같이 상업적으로 이용가능하다. 다당류 네트워크가 아가로오스에 의해 형성되는 이벤트에서, 상기 다당류 네트워크의 형성은 상기 혼합물의 온도 10-37℃, 바람직하게는 15-25℃, 가장 바람직하게는 20-25℃ 에서 수행된다.

[0063] 바람직한 실시예에서, 상기 다당류 네트워크는 아가로오스에 의해 형성된다. 또하나의 바람직한 실시예에서, 하이드로겔 내의 아가로오스의 농도는 약 0.05 내지 1% 및, 바람직하게는, 0.2 내지 0.6% 이다.

[0064] 본 발명의 공정의 단계 (a) 에서 제공된 하이드로겔은 따라서 피브리노겐의 피부린 내로의 가교결합 반응을 수행하고 상기 다당류의 겔화를 유도함으로써 얻어진다. 당업자는 두 반응 모두 동시에 또는 어떠한 순서로, 수행될 수 있다는 것을 이해할 것이며 즉, 상기 피브리노겐의 피브린 내로의 중합이 첫번째 수행될 수 있고 상기 다당류의 겔화가 뒤따르거나 또는 상기 다당류의 겔화가 첫번째로 수행될 수 있고 피브리노겐의 피브린 네트워크 내로의 중합이 뒤따를 수 있다.

[0065] 특별한 실시예에서, 피브린 네트워크의 형성을 위해 적합한 조건들 하에서 피브리노겐-포함 물질을 둠으로써 피브린 네트워크가 첫번째로 형성되고 그리고나서 상기 첫번째 네트워크를 다당류를 포함하는 용액과 접촉시키고 상기 다당류 네트워크의 형성에 적합한 조건들 하에 상기 혼합물을 둠으로써 상기 다당류 매트릭스가 형성된다. 다당류 네트워크가 아가로오스에 의해 형성된 특별한 경우에, 상기 아가로오스 네트워크의 형성은 상기 혼합물을 아가로오스의 녹는점 아래의 온도에 둠으로써 달성될 수 있다. 그러한 온도는 당업자에 의해 추가의 실험 없이도 사용되어지는 특별한 아가로오스 종류의 융해 프로파일을 참조함으로써 결정될 수 있다.

[0066] 그러나 바람직한 실시예에서, 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 상기 하이드로겔이 피브리노겐 포함 물질, 응고 인자, 버퍼된 생리 식염수 용액, 바람직하게는 PBS, 및, 선택적으로 항섬유소용해제 (antifibrinolytic agent)를 첫번째 혼합함으로써 형성된다. 이 혼합물에, 다당류 및 칼슘 공급원이 동시에 추가되었고, 따라서 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크는 상기 결과의 혼합물을 상기 다당류의 겔화에 적합한 조건들, 예를 들면 상기 다당류의 녹는점 아래의 온도에 둠으로써 동시에 형성된다.

[0067] 더욱 바람직한 실시예에서, 상기 피브리노겐 포함 물질은 혈장이며, 응고 인자는 혈장에 포함된 트롬빈이고, 상기 다당류는 아가로오스이며 칼슘의 공급원은 염화칼슘이다.

[0068] 본 발명의 공정 1의 두번째 단계(단계 b)는 단계 (a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing) 공정을 수행하게 하는 것을 포함한다.

[0069] 이러한 동결융해 공정은 하이드로겔의 물리적 가교결합을 유도하며, 그 중요성으로서, 상기 하이드로겔은 그의 기계적 특성들을 향상시키며, 특히, 하이드로겔에 더 높은 강도, 또한 쉽게 조작되는 것을 제공한다.

[0070] 상기 동결융해 기술은 상기 하이드로겔의 동결 및 융해의 적어도 하나의 사이클을 포함하며, 그러나 바람직하게

는 상기 하이드로겔의 물리적 가교결합은 일련의 동결-융해 사이클들을 사용함으로써 달성된다.

[0071] 동결, 동결 상태에서 선택적 저장, 및 상기 하이드로겔의 그후의 융해의 결과로서, 크리오겔(cryogel)이 형성된다. 이 크리오겔은 다공성 구조를 가지는 것으로 특징된다. 동결 동안, 상기 용매(물)의 주요 대부분의 결정화가 형성된다. 융해된 후, 크리오겔, 또는 크리오구조들(cryostructures)이 형성된다. 상기 폴리머 농도(polymer concentration)로서의 고분자 사슬들(polymeric chains)의 강제정렬이 물의 얼음으로의 전환에 의해 증가되며 나란히 회합들의 형성을 위한 메커니즘을 제공할 것이며, 이는 그리고 나서, 상기 겔의 연결 지역들로서 융해로 온전히 남아있다.

[0072] 물리적으로 가교결합된 겔의 3차원 구조는 상기 중합적 네트워크의 연결 지역들에서 다중의 체인간 수소 결합들에 의해 주로 안정화된다.

[0073] 온도 및 동결기간, 융해 비율, 재동결 사이클들과 같은 극저온 치료(cryogenic treatment)에서 레짐을 달리함으로써, 최종 겔 및 그의 매크로- 및 마이크로- 구조들의 특성들을 조절 및 바꾸는 것이 가능하다. 특히, 상기 크리오젤의 안정성 및 기계적 특성들은 동결 시간 및 동결-융해 사이클들을 증가시키는 것과 함께 증가한다.

[0074] 특별한 실시예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 얻어진 하이드로겔은 적어도 6 시간, 더욱 바람직하게는 적어도 12시간 동안, -30℃ 내지 -15℃, 더욱 바람직하게는 -20℃ 사이에 포함된 온도에서 그것을 동결시킴으로써 동결 단계가 행해진다. 그 이후, 상기 동결된 하이드로겔은 실온, 보통 20~25℃, 2 내지 6시간, 더욱 바람직하게는 약 3시간 동안 융해된다.

[0075] 오직 동결-융해의 하나의 사이클이 상기 물리적 가교결합을 상기 하이드로겔에 제공하기 충분하다 할 지라도, 여러개의 동결-융해 사이클, 바람직하게는 2 내지 5사이클을 실행함이 권장된다.

[0076] 특별한 실시예에서, 본 발명의 공정 1은 본 발명의 공정 1의 단계 (b)의 결과 발생한 상기 물리적으로 가교결합된 하이드로겔을 세정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0077] 상기 동결-융해 공정을 수행한 후 단계 (b)의 결과의 상기 하이드로겔은 상기 결과 물질의 3차원 구조의 일부를 형성하지 못하는 어떠한 화합물 또는 물질을 제거하기 위하여 물로 간단하게 세정될 수 있다. 예를들면, 피브리노겐 포함 물질로서 혈장을 사용하는 경우에, 이러한 세정 단계는 상기 생체재료의 구조에 물리적으로 또는 화학적으로 회합되지 않고 상기 혈장에 존재하는 그러한 물질의 제거로 이어진다.

[0078] 상기 세정 단계 후에, 결과의 하이드로겔은 백색의 무취이다.

[0079] 본 발명의 공정 1의 단계 (c)는 본 발명의 생체재료 스캐폴드를 얻기 위해 단계 (b)의 결과인 상기 물리적으로 가교결합된 하이드로겔을 동결건조하는 것를 나타낸다.

[0080] 약학적 관점으로부터, 본 발명의 생체재료 스캐폴드를 얻기 위해 상기 생체재료는 동결건조된 형태에서 이용가능한 것이 중요하며 이는 저장 동안 그것의 안정성을 향상시키기 때문이다.

[0081] 또한, 동결건조는 생체재료에 조절된 공극율(porosity), 고강도, 그의 팽창된 상태에서 용이하게 조작되며, 안정성, 탄성, 유연성 및 가소성을 제공하는 것을 가능하게 하며, 따라서 변형 힘(deformation force)을 가한 후에 그 형상을 되찾을 수 있다. 또한 본 발명의 생체재료는 그의 팽창된 상태에서 깨지거나 파괴되지 않고, 봉합공정(suture process)을 견뎌내는 것을 나타내었고, 이는 상기 손상된 조직의 정확한 수리(fixing)을 보증한다.

[0082] 하이드로겔은 예를들면, 글루코오스, 슈크로오스 또는 트레할로스와 같은 5% 농도의 동결방지제(cryoprotectant)의 존재하에서 당업자들에게 알려진 어떠한 방법에 의해 동결건조될 수 있다. 사실, 본 발명의 생체재료는 그의 특징들의 변화 없이 동결건조 및 재현탁될(resusupended) 수 있다는 추가의 장점을 가진다.

[0083] 그러나, 동결건조를 위한 동결 방법이 생체재료의 기공(pore) 크기에 영향을 미친다. 기공 크기는 -1℃/분 과 같이 점진적 동결된 동결건조물에서는 훨씬 더 크고, 급속 동결된 동결건조물에서는 더 작다.(예를들면, 직접적으로 실온 내지 -80℃)

[0084] 동일한 동결건조를 위한 동결방법에서, 0.4 및 0.6%와 같이 고농도 아가로오스를 가지는 겔들은, 더욱 유사한 구조를 가지는 것으로 나타난 반면, 0.2% 와 같은 더 낮은 아가로오스 농도를 가지는 동결건조물들은 상당히 더 큰 기공 크기를 가지는 것으로 나타났다.

[0085] 동일한 아가로오스 농도 및 상이한 동결방법에 대하여, 동결건조에서의 느리고 점진적 동결이 생체재료에 기공들의 균일분포 및 더 나은 시각적 모습을 제공하는 것으로 나타났다. 사실, 단위 영역 당 상기 기공들의 비율은

다르며, 1:2의 비율(느린 동결:급속 동결)에 해당한다.이는 급속 동결된 것은 점진적으로 동결된 동결건조물과 비교하여 단위 영역당 두배의 기공들을 가진다는 사실로 해석된다. 기공은 따라서 급속 동결된 동결건조물들에서 더 작다.

[0086] 따라서, 바람직한 실시예에서, 상기 동결건조 공정은 하이드로겔을 0.5℃/분 내지 5℃/분 사이의 점진적 동결 속도로 하여 수행된다.

[0087] 결과의 동결건조된 생체재료는 또한 이후에 그의 안정성에 영향을 미치지 않고 살균공정이 행해지게 된다. 상기 공정은 예를들면, 동결건조된 생산물에 감마-조사의 적용을 포함한다.

[0088] 살균 공정들은 기술분야의 전문가들에게 잘 알여져있고 본 발명의 경우에서와 같이 살균된 생산물들을 필요로 하는 적용들(applications)에서 상기 생체재료를 사용하게 할 목적으로 행해진다.

[0089] 여기에서 설명된 상기 공정들은 연조직들에 사용된 다른 생체재료에 비하여, 특히, WO2011/023843 및 WO2013/072409 에서 기재된 것과 같은 공정들에 따라서 얻어진 생체재료들과 비교하여, 유익한 특성들을 나타내는 생체재료를 제공한다.

[0090] 특히, 상기 생체재료들은 적절한 상호접속(interconnection) 또는 가교결합을 가지는 매우 다공성 구조를 나타내며 영양분 공급 및 세포 폐기물 제거를 보장한다.

[0091] 나아가, 결과의 생체재료는 용이하게 팽창될 수 있고, 처음의 조성에 의존하여 그것의 건조 중량의 10 내지 30 배의 비율로 액체를 흡수할 수 있다. 팽창된 상태에서, 그것은 매우 저항력이 있고, 기억(그것에 변형력을 가한 후에도 그의 형상을 되찾음)을 가지며, 쉽게 다루어질 수 있고, 또한 수술적 조작(surgical manipulation)을 촉진시키고, 따라서 수령자 베드(recipient bed) 및 생체내 이식에 대한 봉합을 촉진시킨다.

[0092] 추가로, 상기 생체재료의 기계적 특성들은 동결-융해 단계로부터 유도된 물리적 가교결합으로 인해 향상된다.

[0093] 본 발명의 또하나의 측면은 상호 침투(interpenetrating) 네트워크를 가지는 물리적으로 교차결합된 하이드로겔을 준비하기 위한 공정(본 발명의 공정 2)을 나타내며 상기 공정은 하기 단계들을 포함한다:

[0094] a) 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 하이드로겔을 제공하는 단계; 및

[0095] b) 상기 단계 a)의 하이드로겔을 동결융해(freeze-thawing) 시키는 단계.

[0096] 상기 공정 2의 단계 a) 및 b)는 본 발명의 공정 1의 경우에 대하여 상세한 설명에서 이전에 언급한 것과 동일한 절차들을 따라 수행될 수 있다.

[0097] 이전에 언급된 것에 따라, 본 발명의 공정 2의 수행 후 결과의 하이드로겔은 상호 침투(interpenetrating) 네트워크를 가지는 물리적으로 가교결합된 하이드로겔이다. 상기 물리적으로 가교결합은 향상된 기계적 특성들을 가지는 하이드로겔은 제공한다.

[0098] 본 발명의 생체재료

[0099] 상기 정의된 본 발명의 공정 1은 향상된 특성들을 가지는 생체재료의 생산을 가능하게 하고 이는 구강 점막의 재생을 위해 사용될 수 있다. 따라서 또하나의 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 공정 1에 의해 얻을 수 있는 생체물질을 나타낸다.

[0100] 또하나의 측면에서, 본 발명은 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크를 포함하는 다공성 생체재료 스캐폴드에 관한 것이다.

[0101] 본 발명의 생체재료 스캐폴드는 폴리머성 체인들의 적합한 상호접속을 가지고 매우 다공성이며 영양분의 공급 및 세포 폐기물의 제거를 보장한다.

[0102] 특별한 실시예에서, 상기 본 발명의 생체재료 스캐폴드는 1 내지 500 마이크론, 바람직하게는 50 내지 200 마이크론, 더욱 바람직하게는 50 내지 100 범위의 기공 크기를 가진다.

[0103] 본 발명의 생체재료 스캐폴드의 내부 구조는 주사 전자 현미경(SEM)에 의해 분석되었다.

[0104] 도 1-2는 다른 스케일로 다른 다당류 농도들을 사용하여 상기 생체재료 스캐폴드의 내부구조를 자세하게 나타내는 현미경 사진이다.

[0105] 일반적으로 기공들 사이에서 낮은 상호접속을 가지는 타원형의 다공성 구조(oval porous structure)가 관찰되었

다. 상기 기공들은 그들이 정말 마이크로영역들(microareas)에 의해 맞추어졌다 할지라도 상기 생체재료 전체에서 명확한 방향성을 가지는 것으로 보이지 않는다.

[0106] 이전에 언급된 바와 같이, 본 발명의 생체재료 스캐폴드는 쉽게 팽창될 수 있고, 그것의 최초 조성에 의존하여 건조 중량의 10 내지 30배의 비율로 액체를 흡수할 수 있다. 팽창된 상태에서, 그것은 매우 저항력이 있고, 기억(그것에 변형력을 가한 후에도 그의 형상을 되찾음)을 가지며, 쉽게 다루어질 수 있고, 또한 수술적 조작(surgical manipulation)을 촉진시키고, 따라서 수령자 베드(recipient bed) 및 생체내 이식에 대한 봉합을 촉진시킨다. 따라서 상기 팽창된 재료는 그의 특성들을 잃지 않고 압착 및 접혀질 수 있고, 변형 후 그의 초기의 형상을 회복할 수 있다.

[0107] 바람직한 실시예에서, 상기 다공성 생체재료 스캐폴드는 다당류의 겔화에 적합한 조건 하에서 다당류의 존재에서 피브리노겐 포함 물질을 첫번째 가교결합함으로써 얻어진다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 상기 피브리노겐 포함 물질의 가교결합은 적어도 하나의 응고인자, 칼슘공급원, 및 선택적으로는, 항섬유소용해제(antifibrinolytic agent)의 존재하에서 수행된다. 바람직한 실시예에서 겔화 이후, 결과의 하이드로겔은 동결건조 단계로 이행되기 전에 상기 설명된 것과 같은 동결-융해 방법이 이행된다.

[0108] 또하나의 바람직한 실시예에서, 상기 다공성 생체재료 스캐폴드는 상기 피브린 네트워크 및 다당류 네트워크의 동시 형성에 의해 얻어지며, 피브리노겐-포함 물질, 응고인자, 버퍼된 생리식염수 용액, 바람직하게는 PBS, 및 선택적으로는 항섬유소용해제를 다당류 및 칼슘 공급원과 혼합한 결과의 혼합물을 다당류의 겔화에 적합한 조건에서, 예를들면 다당류의 녹는점 아래 온도에서, 수행한다. 겔화 후, 결과의 하이드로겔은 동결건조 단계로 이행되기 이전에 상기 설명한 것과 같은 동결-융해 방법이 이행된다.

[0109] 이들의 바람직한 실시예들로부터 결과의 상기 생체재료 스캐폴드는, 여기에서 상기 하이드로겔은 동결-융해 공정으로 이행되고, 동결-융해 공정으로 이행된 결과로서 출발 하이드로겔이 물리적으로 가교결합된 점에 의해 또한 향상된 강도를 나타내는 것으로 특징된다.

[0110] 바람직한 실시예들 모두에서, 피브리노겐- 포함 물질은 바람직하게는 혈장이다.

[0111] 또한 바람직한 실시예들 모두에서, 응고 인자는 바람직하게는 트롬빈이다. 또한 또하나의 바람직한 실시예에서, 칼슘 공급원은 칼슘염이고, 가장 바람직하게는, 염화칼슘이다. 또한 또하나의 바람직한 실시예에서,함섬유용해제는 트라넥사민산이다.

[0112] 또하나의 바람직한 실시예에서, 다당류는 아가로오스이다. 더욱 더 바람직한 실시예에서, 아가로오스는 낮은 녹는점 아가로오스이다. 더욱 바람직한 또하나의 실시예에서, 생체재료에서 아가로오스의 농도는 약 0.05 내지 1%이고, 더욱 바람직하게는 0.2 내지 0.6% 이다.

[0113] 본 문헌에서 제공된 실시예들에서 보여지는 바와 같이, 본 발명의 다공성 생체재료 스캐폴드는 매우 저항력이 있고, 쉽게 다루어질 수 있고, 변형력을 가한 후에도 그의 형상을 회복하는 기억을 가지는 것으로 특징된다. 나아가, 본 발명의 생체재료는 팽창된 상태에서, 파괴되지 않고 봉합을 견디는 것을 나타내었고, 이는 손상된 조직의 정확한 수리를 보증한다.

[0114] 상기 생물학적 테스트들은 또한 상기 생체재료와 세포들의, 특히 인간 섬유아세포들, 정확한 상호작용, 뿐만 아니라 상시 세포들에 대한 세포독성의 결핍을 지적하였다.

[0115] 본 발명의 다공성 생체재료 스캐폴드는 선택적으로 하나 이상의 성장 인자들(예를들면, 상기 매트릭스 조성의 0.0000001 내지 1 또는 5 중량% 범위의 양으로) 과 같은 하나 이상의 활성 성분들을 포함할 수 있고 구강 점막의 재생을 촉진한다. 적합한 활성 성분들의 예는 피브로넥틴, 피브린, 라미닌, 산성 및 염기성의 섬유아세포 성장 인자들, 테스토스테론, 강글리오사이드 GM-I, 카탈라아제, 인슐인-유사 성장 인자-I (IGF-I), 혈소판-유래의 성장인자(PDGF), 뉴런의 성장인자 갈렉틴-1, 및 그의 조합들을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예로서, U.S. 특허 No. 6,506,727 to Hansson 등. 및 U.S. 특허 No. 6,890.531 to Horie 등. 참조. 여기서 사용된 바와 같이 "성장 인자들"은 상기 재생, 성장 및 점막 조직의 생존을 촉진하는 분자들을 포함한다. 본 발명의 몇몇 실시예들에서 사용된 성장인자들은 케라틴 추출물들에서 자연적으로 발견되는 것일 수 있고, 또는 상기 케라틴 추출물들에 첨가된 또는 케라틴 매트릭스들을 형성한 첨가제의 형태로 존재할 수 있다. 성장 인자들의 예는 혈소판-유래의 성장인자(PDGF), 에리스로포이에틴(EPO), 트롬보포이에틴(TPO), 미오스태틴 (GDF-8), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 염기성 피브로블라스트 성장 인자 (bFGF or FGF2), 표피 성장 인자 (EGF), 헤파토사이트 성장인자 (HGF), 그래뉼로사이트-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 및 그래뉼로사이트- 매크로파아지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 성장 인자들의 대가족(large families)을 이루는 많은 구조적

으로 및 진화론적으로 관련된 단백질들이 존재한다.

[0116] 나아가, 본 발명에 따른 상기 다공성 생체재료 스캐폴드는 선택적으로 하나 이상의 면역조절의(immunomodulatory) 또는 생리활성의 화합물들을 포함한다. 여기서 사용된 "면역억제 또는 면역조절제"는 일반적으로 또는 특별하게 포유돌물 면역 반응을 억제하거나 조절하는 물질(agent)이다.

[0117] 여기서 사용된 용어 "면역조절물질(immunomodulator)은 사이토카인, 림포카인들, 모노카인들, 줄기 세포 성장 인자들, 림포톡신들, 헤마토포이에틱 인자들, 콜로니 자극 인자들 (CSF), 인터페론들(IFN), 파라티로이드 호르몬, 티록신, 인슐린, 프로인슐린, 릴랙신, 프로릴랙신, 여포 자극 호르몬 (FSH), 티로이드 자극 호르몬 (TSH), 황체형성 호르몬 (LH), 혜파틱 성장 인자, 프로스타글란딘, 피브로블라스트 성장 인자, 프로락틴, 플라센탈 락토젠(placental lactogen), OB 단백질, 형질전환 성장 인자(TGF), TGF-α, TGF-β, 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), TNF-α, TNF- beta, 뮬러리안(mullerian)-억제 물질, 생쥐 고나도트로핀(gonadotropin)- 관련된 펩타이드, 인히빈, 액티빈, 혈관내피 성장 인자, 인테그린, 인터루킨 (IL), 그래뉼로사이트-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 그래뉼로사이트 마크로파지-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론-α, 인터페론-베타, 인터페론-γ, SI 인자, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 IL-21, IL-25, LIF, 키트-리간드, FLT-3, 엔지오스타틴, 트롬보스폰딘, 엔도스태틴, LT, 등을 포함한다.

[0118] 또하나의 특별한 실시예에서, 상기 생체재료 스캐폴드는 탄산칼슘, 비스포스포네이트,하이드록시아파타이트 또는 콜라겐과 같은 골전도성 물질을 추가로 포함한다. 이러한 물질의 융합은 생체재료 스캐폴드가 경조직 재건을 위해 사용된 때 유도된 뼈재생으로서 특별한 관련성의 것이다.

[0119] 본 발명의 특별한 실시예에서, 상기 생체재료 스캐폴드는 상기 스캐폴드의 3차원 구조 내부로 융합된 또는 그의 표면에 있는 세포들을 추가로 포함한다. 세포들의 융합은 상기 생체재료 및 매우 손상된 조직들에서 또는 환자들로부터 원래(in situ) 세포성 공헌의 가능성이 없는 상기 조직 회복 공정의 재생 활성을 향상시키는데, 이러한 생체재료는 상기 손상된 조직에 존재하는 것들과 동일한 종류의 건강한 세포들을 포함하기 때문이다.

[0120] 바람직하게는, 하이드로겔에 융합된 상기 세포들은 피브로블라스트, 케라티노사이트, 미오사이트, 아디포사이트, 내피세포, 미분화된 중간엽 줄기세포 또는 다른 세포 균주(strain)로 분화된 중간엽 줄기세포 및/또는 미분화된 조혈모세포들 또는 다른 세포 균주로 분화된 조혈모세포들, 안구세포, 각막세포, 망막세포, 상피세포, 백혈구계로부터의 세포들, 조혈계로부터의 세포들, 연골 세포, 연골아세포, 골아 세포, 골 세포, 뉴우런 또는 말초 및 중추 신경계로부터의 다른 세포들, 백혈구계로부터의 세포들 및 마크로파지들 (macrophages)로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0121] 치료적 용도

[0122] 본 발명의 또하나의 측면은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 의약에서의 용도를 나타낸다.

[0123] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 인간 및 동물들에서 연조직의 기능성 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원 또는 대체시키기 위한 용도를 나타낸다.

[0124] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 기능장애, 부상, 또는 상처, 궤양, 화상, 양성 또는 악성 신생물(neoplasma), 감염, 타박상, 외상성 정신 장애(traumatism), 석회화(caustication), 선천적 기형, 물질 손실(substance loss) 및 치근막염(periodontal disease)를 포함하는 목록으로부터 선택되는 질병의 결과로서 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원 또는 대체시키기 위한 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 용도를 나타낸다.

[0125] 더욱 바람직한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 구강 점막의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원(restore) 또는 대체시키기 위한 용도를 나타낸다. 더욱 바람직하게는 상기 다공성 생체재료 스캐폴드는 치은염, 치주염의 치료, 및 치주인대(periodontal ligament) 회복을 위해 이용된다.

[0126] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 상처, 화상, 궤양, 데인 상처, 누공 또는 다른 만성적 또는 괴사성 상처들의 치료 또는 치유에 있어서의 용도를 나타낸다.

[0127] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 근골격계 부상들의 치료에서의 용도를 나타낸다.

[0128] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 심혈관 질환들의 치료에서의

용도를 나타낸다.

[0129] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 각막 손상 또는 망막 손상과 같은 안과적 질환들의 치료에서의 용도를 나타낸다.

[0130] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드는 골관절계(osteoarticular system)의 회복, 더욱 특별하게는 추골간 디스크 질환들(intervertebral disc diseases) 또는 연골의 회복, 및 퇴행성 관절염, 관절주위염(periarthritis) 또는 관절증(arthrosis)의 치료를 위하여 이용된다.

[0131] 또하나의 특별한 실시예에서, 본 발명은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드는 경조직 재생, 특별히 치주 조직들의 재생을 위하여 이용된다.

[0132] 본 발명의 또하나의 관점은 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 의약에서의 용도에 관한 것이다.

[0133] 본 발명은 또한 질병에 걸리거나 손상된 연조직의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 증가, 복원 또는 대체시키기 위한 상기 정의된 다공성 생체재료 스캐폴드의 용도에 관한 것이다.

[0134] 본 발명의 추가의 관점은 본 발명의 상기 다공성 생체재료 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0135] 바람직한 실시예에서, 상기 약학 조성물은 본 발명의 상기 다공성 생체재료 스캐폴드 및 또한 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 또하나의 바람직한 실시예에서, 상기 약학 조성물은 본 발명의 상기 다공성 생체재료 스캐폴드 및 또한 활성 성분을 포함한다. 또하나의 바람직한 실시예에서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 본 발명의 상기 다공성 생체재료 스캐폴드 및 또한 활성 성분 모두를 포함한다.

[0136] 여기서 사용된, 용어 "활성 성분"은 약물학적 활성 또는 질병의 진단, 치유, 완화, 치료, 또는 예방에서 또하나의 다른 효과를 제공하거나, 또는 인체 또는 동물의 몸의 구조 또는 기능에 영향을 미치는 임의의 구성성분을 의미한다.

[0137] 본 발명의 약학 조성물은 치료방법에서 분리된 방식으로 또는 다른 약학적 화합물들 또는 구성들(compositions)을 포함하여 사용될 수 있다.

[0138] 본 발명의 또하나의 관점은 본 발명의 다공성 생체재료 스캐폴드를 포함하는 미용 조성물을 나타낸다.

[0139] 상기 미용 조성물은 본 발명의 다공성 생체재료 스캐폴드를 포함하는 임의의 조성물을 포함하며, 그의 국소적 투여를 위한 겔, 크림, 연고 또는 밤 형태이다. 상기 조성물은 관련된 어떠한 미용적으로 활성인 분자를 가지않을 때 조차도 완화성의(emollient), 방어적 및 재생 특성들을 가진다.

[0140] 본 발명의 변형에서, 상기 미용 조성물은 또한 활성 분자들을 융합할 수 있으며, 그들이 어떠한 치료적 효과를 가지지 않는다 하더라도 그들은 미용제로서 특성들을 가진다. 상기 항산화 조성물에 혼합될 수 있는 상기 활성 분자들 가운데 완화제, 보존제, 향기 물질, 항여드름제, 항진균제, 항산화제, 데오드란트, 땀배출억제제, 비듬방지제, 색소제거제(depigmenters), 지루성 방지제(antiseborrheic agents), 염색제, 선탠 로션, 자외선 흡수제, 효소가 인용될 수 있다.

[0141] 미용 조성물은 예를들면 조성물의 pH가 5 아래의 값으로 감소하는 것을 방지하는 완충제(buffer agents)와 같은 pH 조절제와, 뿐만 아니라 상기 조성물에서 중요한 구조의 변화들을 방지하는 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 기술분야의 당업자는 미용 조성물들에서 공통적으로 사용되는 많은 것들 중에서 어느 추가 구성성분들이 사용될 것인지와 그들이 필수적인지를 판단할 수 있다.

[0142] 본 발명은 이제 설명의 목적으로 제공된 실시예를 참고하여 추가로 설명되며 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안될 것이다.

[0143] **실시예**

[0144] 실시예 1. 생체재료 스캐폴드의 제조

[0145] 인간 혈장 (76 ml), PBS 1x (16.5 ml) 및 Amchafibrin (1.5 ml)의 혼합물을 포함하는 용액을 준비하였다. 동시에 아가로오스 4% (5 ml) 및 염화칼슘 10% (1 ml) 를 상기 용액에 첨가하였다. 비율은 결과 혼합물의 총 부피에 대하여 v/v로 측정되었다.

[0146] 상기 결과 혼합물은 완전히 혼합되고 금형에 첨가되었다. 상기 혼합물은 겔로 남겨졌다. 도 3(a)는 동결건조로 이행되기 이전의 결과의 하이드로겔을 보여준다.

[0147] 상기 형성된 하이드로겔은 물로 부드럽게 세정되고 동결건조되었다. 그러한 목적으로 하이드로겔은 -80℃에서 동결되었고 물은 그 뒤에 0.024 mbar 및 -48℃에서 승화되었다.

[0148] 실시예 2. 생체재료 스캐폴드의 제조 및 그의 물리적 특징

[0149] 인간 혈장 (76 ml), PBS 1x (16.5 ml) 및 Amchafibrin (1.5 ml) 의 혼합물을 포함하는 용액을 제조하였다. 동시에 아가로오스 4% (5 ml) 및 염화칼슘 10% (1 ml)를 상기 용액에 첨가하였다. 비율은 결과 혼합물의 총 부피에 대하여 v/v로 측정되었다.

[0150] 상기 결과 혼합물은 완전히 혼합되고 금형에 첨가되었다. 상기 혼합물은 겔로 남겨졌다.

[0151] 상기 형성된 하이드로겔은 -20℃에서 12시간 동안 동결함으로써 동결-융해 공정으로 이행되었고 그뒤에 상기 동결된 하이드로겔은 실온에서 3시간 동안 융해되었다.

[0152] 도 3(b)는 동결건조가 이행되기 이전에 결과의 하이드로겔을 보여준다.

[0153] 그 후, 결과의 하이드로겔은 물로 부드럽게 세정되었고 동결건조되었다. 그러한 목적으로 하이드로겔들은 -80℃에서 동결되었고 물은 그 뒤에 0.024 mbar 및 -48℃에서 승화되었다.

[0154] 동일한 절차를 취하였고, 그러나 아가로오스 농도를 0.2%, 0.4% 및 0.6% 으로 변화시켰다.

[0155] 도 1은 상이한 다당류 농도들에 대한 생체재료 스캐폴드의 내부 구조를 자세하게 보여준다.

[0156] 1,500X 및 20,000X 확대는(도 2) 상기 구조의 기공들을 채우는 피브린 네트워크 뿐만 아니라 아마 상기 기공들의 벽을 형성하는 아가로오스로 덮힌 피브린 섬유들을 더욱 자세하게 볼 수 있게 한다.

[0157] 일반적으로, 기공들 사이에 낮은 상호접속(interconnection)을 가지는 타원형의 다공성 구조가 관찰되었다. 상기 기공들은 그들이 실제로 마이크로 영역(microarea)에 의해 지향된다(oriented) 할지라도 상기 물질 전체에서 명확한 방향성을 가지지 않는 것으로 보인다.

[0158] 0.4 및 0.6% 와 같이 더 높은 아가로오스 농도를 가지는 겔들은 더욱 유사한 구조를 가지며, 반면 더 낮은 아가로오스 농도는 상당히 더 큰 기공 크기를 가지는 겔들을 야기하였다.

[0159] 상기 물질은 또한 관리용이성(manageability)에 대하여 평가되었다. 기본적 조작 테스트들이 실험실에서 수행되었고 퍼포먼스(performance)를 시각적으로 평가하였다. 그것이 팽창된 때 상기 생체재료는 저항성이며, 기억(변형력이 가해진 후 그의 형상을 회복한다)을 가지며 쉽게 관리될 수 있다(도 4 참조)

[0160] 추가적으로, 외과 수술(surgical intervention) 동안 상기 생체재료의 행동을 예측하기 위하여 봉합 테스트들이 진행되었다. 상기 생체재료가 파괴되지 않고 봉합을 견디는 것이 관찰되었고, 상기 조직의 정확한 회복(fixing)을 확신한다.(도 5 참조)

[0161] 상기 생체재료에 의해 흡수될 수 있고 저장될 수 있는 액체의 양과 부피를 평가하기 위하여 다른 아가로스 조성들을 가지는 샘플들이 물에 침수되었다.

[0162] 결과는 생체재료는 그것의 최초의 조성에 따른 건조중량의 10 내지 30 배를 흡수할 수 있다는 것을 나타낸다. 상기 생체재료는 첫번째 24시간에서 완전히 팽창하고, 이러한 팽창은 그후에 약간 증가한다.

[0163] 실시예 3. 생체재료의 생물학적 특징

[0164] *살아있는/죽은*

[0165] 인간 피브로블라스트 세포들이 실시예 2에서 설명된 대로 제조된 0.2% 아가로오스 농도를 가지는 생체재료에서 24, 48 및 72 시간 동안 배양되었다.

[0166] 세포 생존능력을 평가하기 위하여 살아있는/죽은 분석이 진행되었다. 이 분석은 비색법(colorimetric method)에 의해 살아있는 세포들을 죽은 세포들로부터 구별할 수 있게 한다. 살아있는 세포들은 그들의 에스테라아제 활성으로 인해 녹색 형광을 발한다. 죽은 세포들은 그러나 이러한 활성이 없고 녹색 형광을 내지 못한다. 죽은 세포들의 존재를 보기 위하여 상기 키트는 오직 손상된 멤브레인을 가지는 세포들에 침투하는 화합물인 에티듐 호모다이머(ethidium homodimer)를 포함한다.

[0167] 도 6 및 7은 다른 시간들에서 평가된 상기 물질들의 형광 결과들을 보여준다. 상기 세포들은 3차원 구조를 광범위하게 침범하고 그것은 배양에서 시간이 흐르면서 증가한다. 죽은 세포들(적색)은 어느 경우에도 관찰되지 않

았다.

[0168] 이 결과는 상기 생체재료와 인간 섬유아세포(fibroblast)들의 양의 상호작용으로 해석된다.

[0169] **세포독성**

[0170] 실시예 2에 따라 제조된 생체재료의 세포독성이 ISO 10993- 5 스탠다드 (Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Cytotoxicity Assay in vitro)에 따라 평가되었다.

[0171] 상기 분석은 96-웰 플레이트에서 4000 cells/well 의 시딩 밀도(seeding density)를 가지는 패스(pass) 3에서 섬유아세포 FA0506007 으로 진행되었다.

[0172] 0.2 및 0.4% 아가로오스를 가지는 두개의 다른 조성들의 트리플리케이트들(Triplicates)이 상기 분석에서 사용되었다.

[0173] 세포독성 결과 24시간 후- 배양은 상기 물질들 어느 것도 평가된 세포들에서 세포독성이 아님을 보여준다.(도 8 참조)

[0174] ***혈액적합성(Hemocompatibility)***

[0175] 혈액적합성이 또한 ISO10993-4:2002 표준(Biological Evaluation of Medical Devices. Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood)에 따라서 평가되었다. 용혈 효과(hemolytic effects)의 정량화는 혈액내 높은 혈장 헤모글로빈 수준으로 인한 특이적 결정으로 고려되었고, 생체재료들과 접촉하는 적혈구 막의 취약성(fragility)을 결정한다.

[0176] ***자극 테스트***

[0177] 상기 생체재료의 자극물일 가능성을 분석하기 위하여, 실시예 2에 따른 두개의 조성들이(0.2% 및0.4% 아가로오스) 분석되었다. 두가지 경우 모두에서 상기 물질이 3중으로(in triplicate) 분석되었다. 상기 생체재료는 어떠한 분석된 조성들에 대해 자극물이 아니었다.(도 9 참조)

[0178] 실시예 3. 생체내 원칙 증명(*In vivo* proof-of-principle)

[0179] 첫번째 접근에서, 상기 이식된 생체재료에 대한 주변 조직의 반응을 잠재적 독성 이벤트들(potential toxicity events) 및 분해성 관점에서 평가하기 위하여 실시예 2에 따라 합성된 생체재료가 쥐 모델에서 피하로 이식되었다. 8주 이상 나이의 위스타 AG 쥐들이 Ethi 잠재적 독성 eventscal 위원회 규칙에 따른 하우징 및 관리에 따라 본 연구에 사용되었다.

[0180] 각 동물에서, 등 아래의 양쪽 모두에 두개의 절개를 실행하였고 상기 절개들의 하나를 통하여 생체재료의 1 cm^2 이 피하로 도입되었고 다른 하나는 대조군(생리식염수)으로 남겨두었다(도 10 참조). 생체재료 이식 후 7, 14, 30 및 60 일에, 쥐들은 희생되었고 조직학적 평가를 위해 생체재료 및 주변 조직들을 얻었다.

[0181] 인접한 조직들에서 상기 경험의 어느 때에도 육안의 외부 염증, 홍반, 또는 부종의 신호가 발견되지 않았다. 신혈관 형성의 신호들이 7 일 및 14일 모두에서 관찰되었다. 본 발명의 상기 생체재료의 상당한 재흡수가 이식으로부터 30일 후에 관찰되었고 분석의 마지막인 60일까지 점진적으로 계속되었다.

표 2

[0182] 테스트 시간(60일) 동안 본 발명 생체재료의 크기 진행

	영역 (cm^2)			
일	7	14	30	60
평균	1.366	0.909	0.789	0.241
편차	0.107	0.207	0.034	0.035

[0183] 이식물 크기 진행의 분석은 본 발명의 생체재료의 크기에서 약간의 초기 증가는 아마도 본 발명 생체재료가 조직액을 흡수할 수 있고, 7일 내지 14일 사이에 그의 초기 크기를 회복하는 능력 때문인 것임을 보여준다. 그 때부터 그의 크기는 시간이 지나면서 점진적으로 감소하고, 어떠한 주변 조직 반응 없이 시간에 따라 그의 재흡수 능력을 증명한다. 어쨌든, 명백한 생체재료 붕괴는 관찰되지 않았고, 그에 의하여 매트릭스는 3차원 구조를 계

속하여 보인다.

[0184] 조직학적 평가는 대조군과 비교하여, 초기 단계들에서(7일) 생체재료가 전형적인 섬유성 캡슐에 의해 둘러싸이는 병변, 및, 외인성 물질이 인식된 때 모든 경우에 발생하는 면역 세포 모집(immune cells recruitment)을 나타낸다. 30일에서의 결과는 새로운 혈관의 네트워크들의 형성이 계속되는 동안 이 초기의 반응의 총 resolution을 보여주며 규칙적인 세포외 기질이 본 발명의 생체재료와의 접촉에서 관찰될 수 있다.

[0185] 도 11은 테스트 시간(7, 14, 30 및 60 일) 동안의 상기 생체재료 외식편들(explants)의 거시적 이미지를 보여주며, 반면 도 12는 상기 테스트 시간 동안의 외식편의 조직학적 이미지들을 보여준다.

[0186] 실시예 4. 생체내 원칙 증명(*In vivo* proof-of-principle)

[0187] 생체재료 기능성이 미니피그의 구강 점막 결손 모델에서 생체재료 이식 후 잇몸 부피 증가의 평가에 의해 수행되었다.

[0188] 연구는 실험실 동물의 관리와 관리를 관할하는 유럽의 규정에 따라서 수행되었고 Universitat Autonoma de Barcelona 의 동물 관리 및 사용위원회에 의해 승인되었다. 35 kg 체중의 수컷 미니피그 한마리가 선택되었고 연구 전체 동안 연질 식이를 유지하였다.

[0189] 앞니 3 및 작은 어금니 2 의 발치가 아래턱의 각 사이드에서 수행되었다. 2달의 치유기간 후, 아래턱 각 사이드로부터 알지네이트 인상(alginate impressions) 및 3D 스캐닝이 얻어지고 새로운 수술이 생체재료 이식을 위하여 수행되었다. 4개의 측면 절개들과 봉투 플랩들(1,5 x 2 cm)이 각 치아 발치의 측면의 잇몸 점막에 유래되었고 생체재료(1x1 cm)로 채워졌다. 추가로, 양 사이드 모두에서, 또하나의 절개가 P1 과 송곳니 사이의 자연의 공간에 수행되었다. 절개는 흡수가능한 단사 봉합사(monofilamental suture)로 완전히 닫혔다. 생체재료 이식 후 15, 45 및 90 일에, 3D 알지네이트 인상들이 수행되었고 마지막으로 동물이 진정 및 안락사되었다. 각 잇몸 점막 구역에 대한 생검 (2x1 cm)을 얻었고 2 mm 의 연속적인 섹션들이 10% 중성의 완충된 포르말린에서 일상적으로 수리되었고, 파라핀 내장되고 및 헤마톡실린 및 에오신 착색됨. 상기 실험에 따라서 조직 치유의 거시적 평가 및 식품 섭취의 조절이 수행되었다. 또한, 마스터 금형들이 알지네이트 인상(alginate impressions)를 사용하여 제조되었고, 금형 모듈들은 스캔되었고, 다른 시간 모델들 합성, 종단 및 횡단의 섹션들 선택 및 마스터 차이들의 탐지를 가능하게 하는 이미지 분석 소프트웨어(OrthoViewer 2014 from 3Shape S/L)로 처리되었다. 수단 및 표준 편차가 계산되었고 부피 차이가 분석되었다.

[0190] 미니피그에서 연구 동안 생체재료 독성의 신호 또는 어떠한 부작용들이 관찰되지 않았다. 생검은 우수한 피부 및 표피 조직을 보였으며 생체재료 적용으로 인한 숙주 반응 또는 염증은 관찰되지 않았다. 다층의, 성숙하고 queratinisated 상피의 존재와 함께 완전한 상피 재생이 생산되었다. 점막하층은 두껍고, 밀집한 및 잘 조직화된 섬유들로 구성된 성숙한 콜라겐과 함께, 잘 조직화된 결합 조직을 보였다. 생체재료는 거의 완전히 사라졌다.

[0191] 캐스트 모델 부피 분석은 표 3에 나타낸 바와 같이, 생체재료가 이식되었을때 병변들에서 부피 증가를 보였다.

표 3

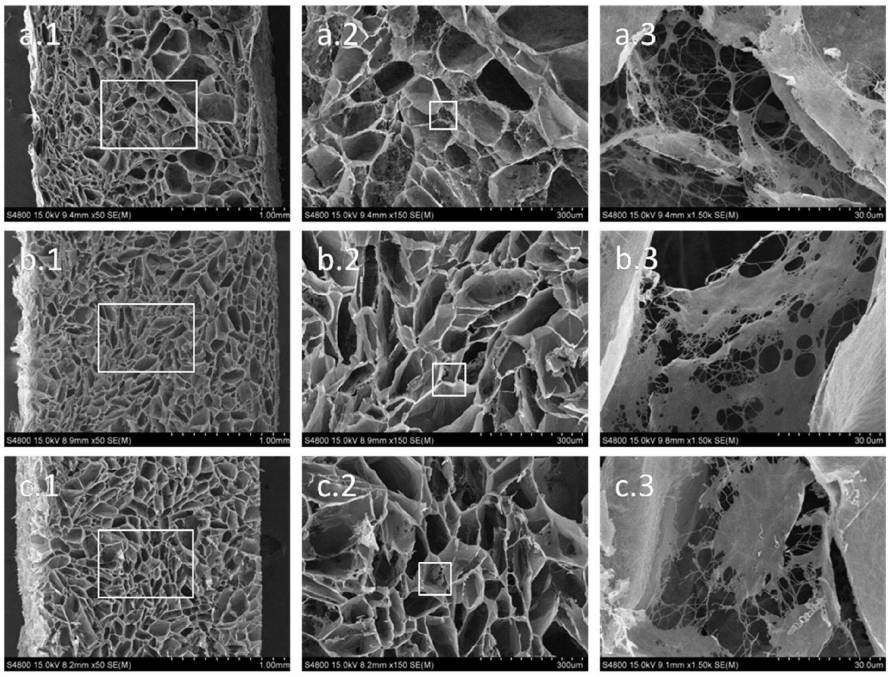
[0192] 생체재료 이식 구강 점막 결손들에 의한 잇몸 점막 부피에서의 증가

구역	**최종 부피 증가 (㎜)**
절개1	1,07
절개2	0,88
절개3	1,98
절개4	1,37
평균 ± SD	1,33±0,5

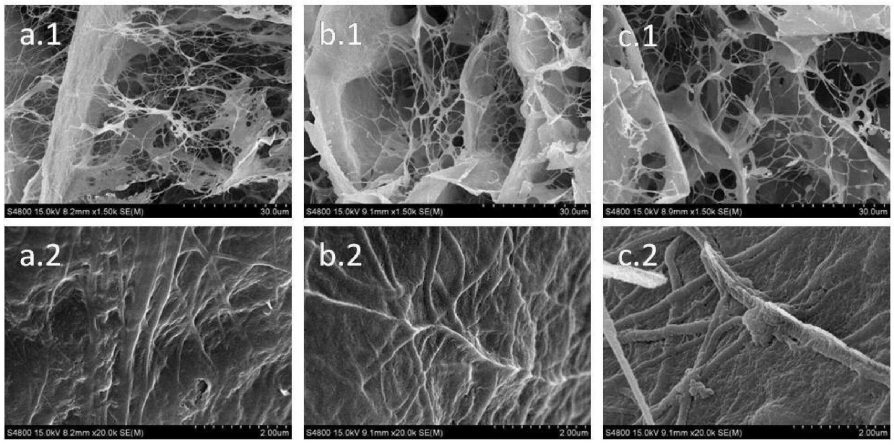
[0193] 생체재료 이식은 중요한 잇몸 부피 증가를 생성하였고 이는 자가조직의 상피하 결합 조직 이식편(환자 자신의 조직의 공여부위로부터 이식편)이 적용된 때 얻어진 부피 증가와 매우 유사하다.

도면

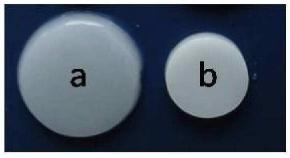
도면1



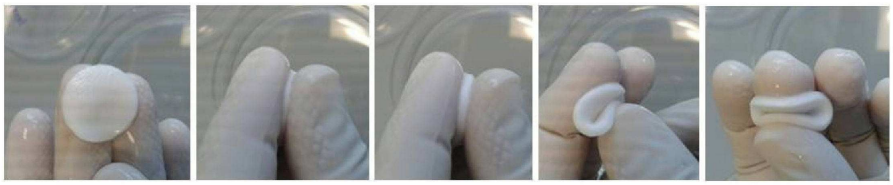
도면2



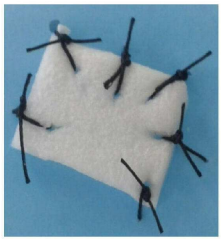
도면3



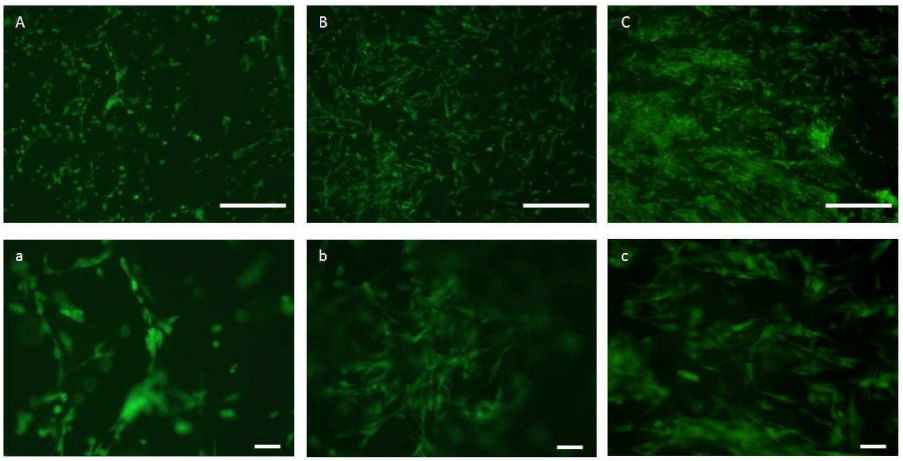
도면4



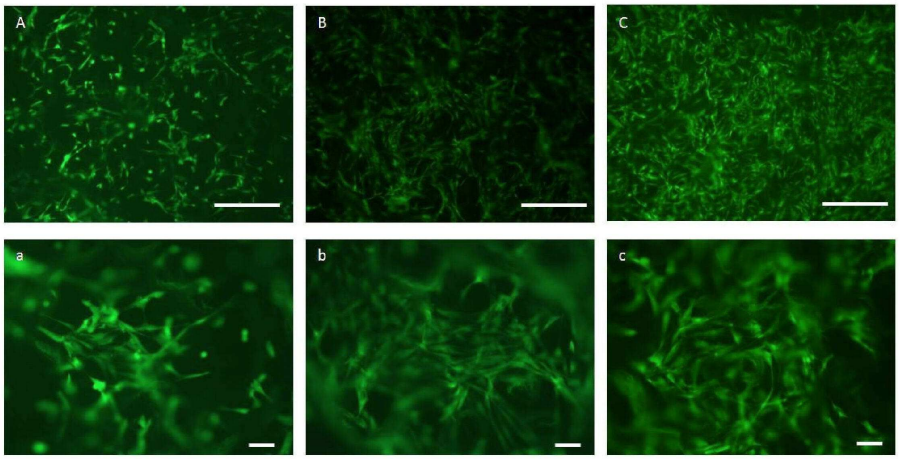
도면5



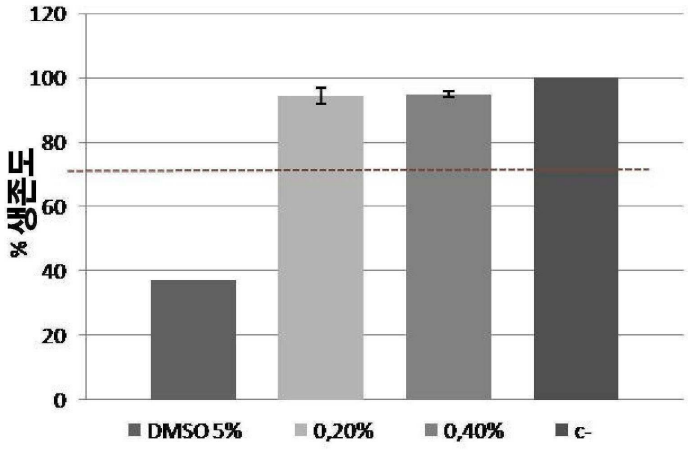
도면6



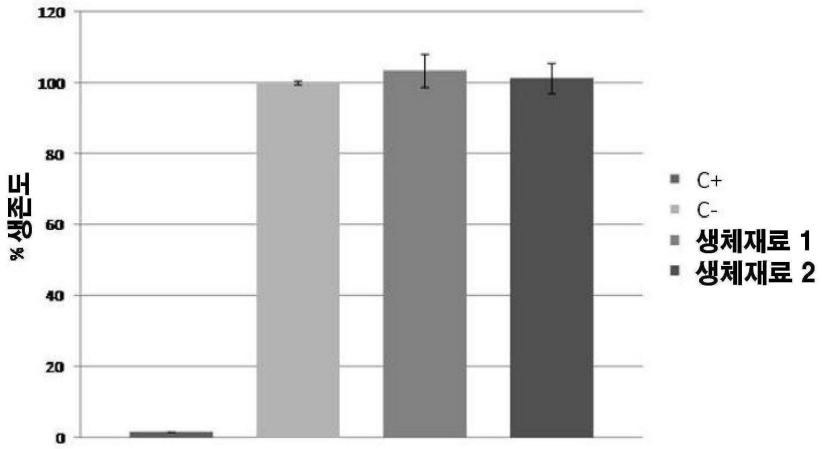
도면7



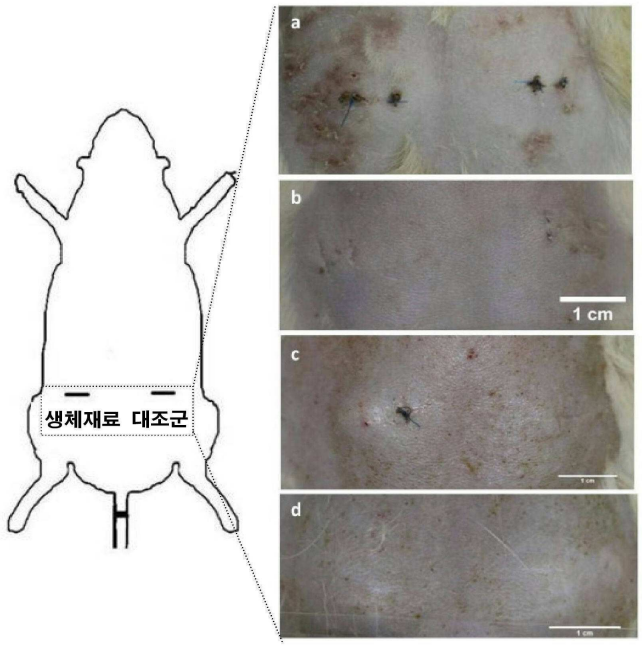
도면8


120
100
80
60
40
20
0
% 생존도
DMSO 5%
0,20%
0,40%
c-

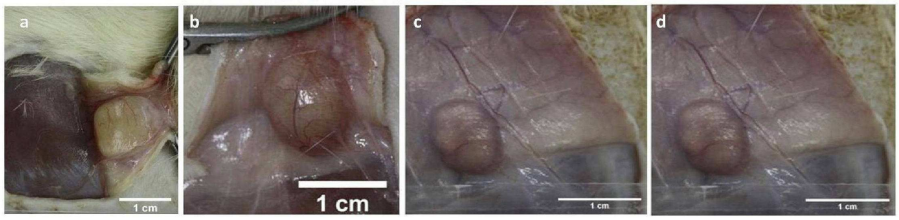
도면9


120
100
80
60
40
20
0
% 생존도
C+
C-
생체재료 1
생체재료 2

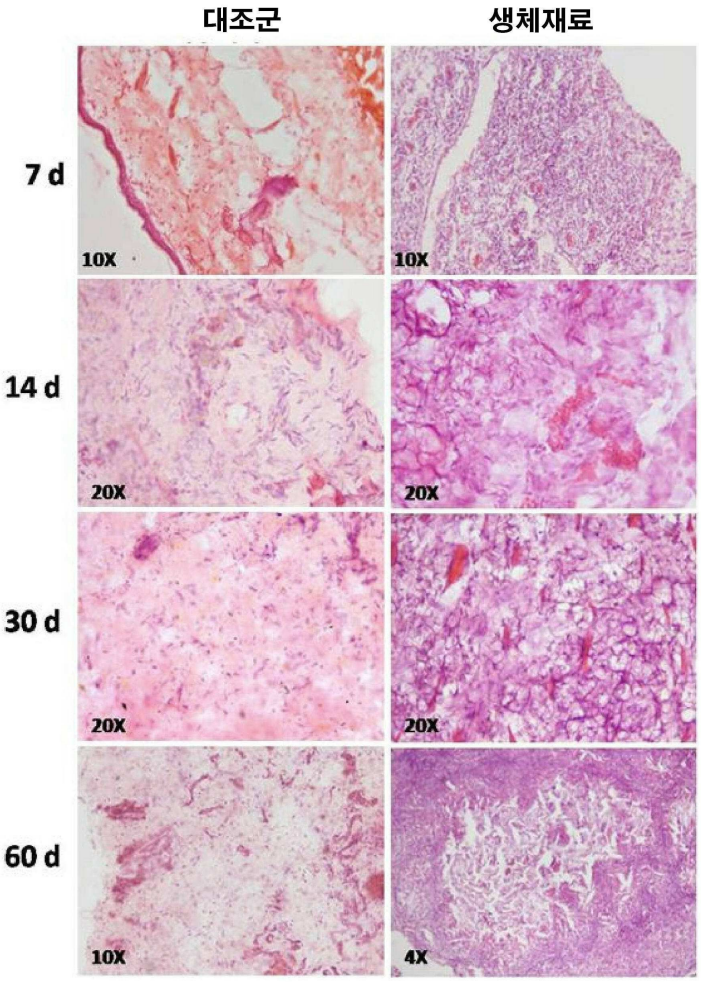
도면10


생체재료 대조군
a
b
1 cm
c
d

도면11


a
b
c
d
1 cm
1 cm
1 cm
1 cm

도면12


대조군
생체재료
7 d
14 d
30 d
60 d
10X
10X
20X
20X
20X
20X
10X
4X

도면13

