

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 10월 13일 (13.10.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/126294 A2

(51) 국제특허분류:

A61M 5/19 (2006.01)

A61K 8/65 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2011/002401

(22) 국제출원일:

2011년 4월 6일 (06.04.2011)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0031193 2010년 4월 6일 (06.04.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 동
국대학교 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUN-

DATION) [KR/KR]; 서울시 중구 필동 3가 26번지,
100-715 Seoul (KR).

(72) 발명자: 겸

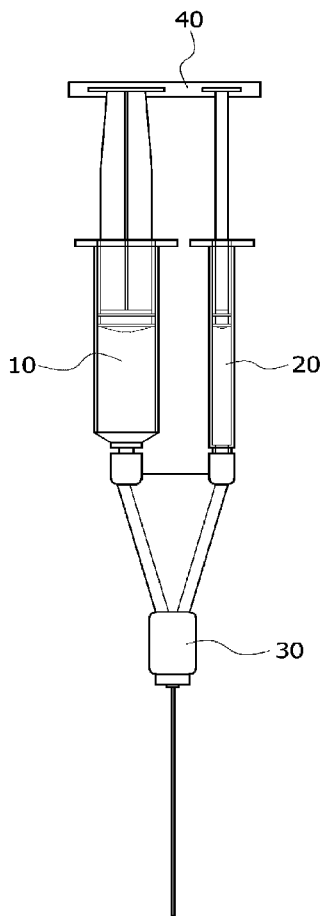
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 박정극 (PARK, Jung
Keug) [KR/KR]; 서울시 성동구 옥수동 100번지 옥수
하이츠아파트 102-1207, 133-765 Seoul (KR). 서영권
(SEO, Young Kwon) [KR/KR]; 서울시 성동구 성수 2
가 3동 현대아이파크아파트 104-1602, 133-726 Seoul
(KR). 한미정 (HAN, Mi Jung) [KR/KR]; 서울시 강북
구 미아 1동 791-3229, 142-100 Seoul (KR). 김성현
(KIM, Sung Hyun) [KR/KR]; 대전광역시 서구 둔산 3
동 국화아파트 603-903, 302-782 Daejeon (KR). 송계용
(SONG, Kye Yong) [KR/KR]; 서울시 서초구 방배동
922-6, 137-060 Seoul (KR). 이종호 (LEE, Jong Ho)
[KR/KR]; 서울시 서초구 반포동 1197 반포주공아파

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MULTI-SYRINGE FOR PRODUCING COLLAGEN HYDROGEL

(54) 발명의 명칭 : 콜라겐 하이드로겔 제조용 멀티 시린지

[Fig. 1]



(57) Abstract: Embodiments of the present invention relate to a multi-syringe able to inject collagen hydrogel into living bodies or implants, and also to a method for producing collagen hydrogel, and a multi-syringe is provided which comprises a first syringe containing a collagen preparation and a second syringe containing a sodium hydrogen carbonate preparation.

(57) 요약서: 본 발명의 실시예들은 콜라겐 하이드로젤을 생체 또는 임플란트에 주입할 수 있는 멀티 시린지 및 콜라겐 하이드로젤의 제조방법에 관한 것으로, 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지 및 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지를 포함하는 멀티 시린지를 제공한다.



트 70-202, 137-040 Seoul (KR). **홍국선 (HONG, Kug Sun)** [KR/KR]; 서울시 서초구 서초 4 동 삼풍아파트 11-1502, 137-779 Seoul (KR). **정현석 (JUNG, Hyun Suk)** [KR/KR]; 서울시 송파구 잠실동 잠실엘스 154-1802, 138-220 Seoul (KR). **방강미 (PANG, Kang Mi)** [KR/KR]; 서울시 영등포구 여의도동 광장아파트 10-603, 150-762 Seoul (KR). **윤희훈 (YOON, Hee Hoon)** [KR/KR]; 인천광역시 강화군 하점면 이강리 408, 417-873 Incheon (KR).

(74) **대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 서울시 강남구 역삼동 648-1 BYC 빌딩 5층, 135-080 Seoul (KR).

(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,

KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 콜라겐 하이드로젤 제조용 멀티 시린지

기술분야

- [1] 본 발명은 콜라겐 하이드로젤을 생체 또는 임플란트에 주입할 수 있는 멀티 시린지 및 콜라겐 하이드로젤의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체 조직 공학은 질병 또는 사고로 인하여 생체 조직이나 장기의 손상을 입은 경우에 있어서, 손상된 조직 및 장기의 복원에 초점을 맞추고 있는 연구 분야이다. 이와 관련하여, 생체 조직 재생용 지지체로서 주사가능한 젤을 이용하는 방법이 널리 연구되고 있는데, 이와 같이 주사가능한 젤을 이용하는 방법은 외과적 시술없이 필요한 부위에 용이하게 주입할 수 있으므로 환자의 회복기간, 고통, 비용 등을 감소시킬 수 있다는 장점이 있다. 상기 주사가능한 젤로서 현재까지 콜라겐젤, 키토산젤, 알긴산젤 등 천연 고분자를 이용한 젤과 PGA, PLGA, 폴리카프로락탐 등의 합성 고분자를 이용하여 제조된 젤 등이 사용되어 왔다.
- [3] 그러나 종래의 젤은 합성고분자 또는 천연고분자에 온도감응성 고분자나 pH 민감형 고분자를 중합시켜 제조된 것으로 체내에서 염증반응을 유발시킬 수 있는 문제점이 존재한다. 이를 해결하기 위해, 천연 고분자를 직접 이용하는 방법이 연구되고 있으나, 초기의 높은 점도로 인해 체내 주입이 곤란하고 세포 성장인자나 생리활성물질들이 균일하게 혼합되지 않는다는 문제점이 존재하였다. 또한 점도를 낮추는 경우에는, 물성이 저하되는 문제점이 존재하여, 젤의 효용성이 감소되는 문제점이 존재하였다.
- [4] 따라서 본 발명의 발명자들은 이식시 우려되는 면역반응을 줄이고, 생체조직과 좀더 유사하면서 조직친화성 및 물성이 우수한 하이드로젤 제조 및 주입방법을 개발하기 위해 연구한 결과, 콜라겐 제제와 성장인자나 생리활성물질들이 포함된 탄산수소나트륨 제제를 각각의 주사기에 주입하고, 이를 동시에 체내 또는 임플란트에 주입하는 방법을 고안하였다. 이 방법을 사용하면, 양 제제 주입시는 아직 젤 형성 전이기 때문에 점도가 높지 않아 체내 주입이 용이하고, 또한 점도가 낮은 탄산수소나트륨 제제에 성장인자나 생리활성물질등을 자유롭게 포함하여 사용할 수 있다. 또한 양 제제의 점도가 낮으므로, 양 제제가 주입시 멀티 시린지 내에서 균일하게 혼합될 수 있다. 젤의 형성은 양 제제 주입 후 이를 35 내지 40°C에서 5 내지 30분 처리한 후에 이루어지며, 이러한 과정은 양 제제를 체내에 주입한 경우 자연스럽게 수반되게 된다. 이렇게 형성된 젤은 물성이 우수하고, 가교제 및 합성 고분자를 이용하지 않아 이식 후 면역반응을 실질적으로 일으키지 않는다는 장점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 물성이 우수하고 이식 후 면역반응을 실질적으로 일으키지 않는 하이드로겔을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 실시예들은 상기 과제를 해결하기 위하여
 [7] 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지 및 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지를 포함하는 멀티 시린지를 제공한다.
 [8] 또한 본 발명의 실시예들은, 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지 및 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지를 동물의 체내 또는 임플란트에 동시에 주입하는 단계를 포함하는 하이드로겔 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명의 실시예들에 따른 하이드로겔은 천연고분자로만 구성되어 이식 후 면역반응을 실질적으로 일으키지 않아 생체적합성이 우수하며, 점도 높은 하이드로겔에 균일하게 성장인자나 생리활성물질을 혼합할 수 있어 체내 또는 임플란트에 효과적으로 주입할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 멀티 시린지의 모식도이다.
 [11] 도 2는 다양한 콜라겐의 pH에 대한 겔 형성 실험 결과 사진이다.
 [12] 도 3은 pH3.0, pH4.0 콜라겐 제제를 사용한 겔 형성 실험 결과 사진이다.
 [13] 도 4는 다양한 탄산수소나트륨 제제 조성에 따른 생검 결과 사진이다.
 [14] 도 5는 실시예 2의 각 실험군에 대한 MT염색 사진이다.
 [15] 도 6은 실시예 3의 각 실험군에 대한 압축강도 측정 결과이다.
 [16] 도 7은 실시예 4의 각 실험군에 대한 생검 결과 사진이다.
 [17] 도 8은 실시예 4의 각 실험군에 대한 MT염색 사진이다.
 [18] 도 9는 실시예 4의 각 실험군에 대한 von-kossa염색 결과 사진이다.
 [19] 도 10은 실시예 5의 겔 형성 실험 결과 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 본 발명의 실시예들은 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지 및 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지를 포함하는 멀티 시린지를 제공한다.
 [21] 본 발명의 발명자들은 이식시 우려되는 면역반응을 줄이고, 생체조직과 좀더 유사하면서 조직친화성 및 물성이 우수한 하이드로겔 제조 및 주입방법을 개발하기 위해 연구한 결과, 콜라겐 제제와 성장인자나 생리활성물질들이 포함된 탄산수소나트륨 제제를 각각의 주사기에 주입하여 상기 멀티 시린지를 형성한 후 이를 이용하여 각 제제를 동시에 체내 또는 임플란트에 주입하는 방법을 통해 제조된 하이드로겔이 체내 주입이 용이하고, 각 성분이 균일하게 혼합되며, 가교제 및 합성 고분자를 이용하지 않아 이식 후 면역반응을 실질적으로 일으키지 않음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [22] 상기 면역반응을 실질적으로 일으키지 않는다 함은 주입 후 통상의 기간동안 항생제 투여 한 후에 별도의 염증반응, 삼출물 등이 발견되지 않고, 생체내에서 생착이 잘 이루어짐을 의미한다.
- [23] 또한 상기 멀티 시린지란 하나의 유출구로 복수개의 시린지의 내부 용액이 혼합되어 유출될 수 있는 장치를 의미하는 것으로, 본 발명의 한 구체예에서, 상기 멀티 시린지를 구성하는 시린지의 개수는 2 내지 3개일 수 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 멀티 시린지는 도 1과 같은 구조물일 수 있다.
- [25] 도 1을 참조하면 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지(10)과 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지(20)가 연결부(30)을 통해 연결되어 있으며, 상기 연결부(30)에서 제 1 시린지 내부 용액과 제 2 시린지 내부 용액이 섞여 하나의 유출구로 유출되게 된다
- [26] 상기 유출은 양 제제의 비율이 동일하게 유지되면서 이루어져야 하는 바, 주입 속도를 같게 하기 위해 양 시린지의 피스톤을 고정시켜주는 보조기구(40)가 사용될 수 있다.
- [27] 제 1 시린지와 제 2 시린지는 주입 비율의 조절을 위해 적절한 용량으로 선택될 수 있다.
- [28]
- [29] 본 발명의 한 구체예에서, 제 1 시린지 내부의 콜라겐 제제의 pH는 2.5 내지 4.5, 3 내지 4.3 또는 3.5 내지 4.2 일 수 있다.
- [30] 본 발명의 또 다른 구체예에서 상기 콜라겐 제제에 포함된 콜라겐의 양은 10 내지 100 mg/ml, 10 내지 70 mg/ml, 10 내지 50 mg/ml, 10 내지 30 mg/ml 또는 15 내지 25 mg/ml일 수 있다.
- [31] 상기 콜라겐은 세포의 부착, 이동 및 증식을 촉진시킨다. 이는 불용성 콜라겐과 가용성 콜라겐 모두 사용 가능하며, 구체적으로는 이에 제한되는 것은 아니나 소와 같은 포유동물로부터 유래된 것, 경골어류의 피부와 같은 해양생물로부터 유래된 것 등을 사용할 수 있다.
- [32] 상기 해양생물의 구체적인 예로는 무색소 피부를 갖는 어류, 보다 구체적으로는 서대, 문치가자미, 터봇, 브릴과 같은 가자미류 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [33] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 콜라겐 이외에 추가로 메틸화된 콜라겐(methylated collagen) 및 석시닐화된 콜라겐(succinylated collagen)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 사용할 수 있다.
- [34] 메틸화된 콜라겐은 양성극성을 띄고 석시닐화된 콜라겐은 음성극성을 띄기 때문에 혼합되어지는 성장인자 및 생리활성물질의 극성에 따라 용출속도를 용이하게 조절할 수 있다.
- [35] 메틸화된 콜라겐이 사용되는 경우, 이는 총 콜라겐의 양 100중량부 대비 5 내지 40중량부 또는 5 내지 35 중량부를 사용할 수 있고, 석시닐화된 콜라겐을

사용하는 경우, 이는 총 콜라겐의 양 100중량부 대비 5 내지 60중량부, 5 내지 55 중량부 또는 10 내지 40 중량부를 사용할 수 있다.

- [36] 상기 콜라겐 제제는 산성 용액에 상기 콜라겐, 메틸화된 콜라겐 및 석시닐화된 콜라겐으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 용해하여 제조하는데, 이 경우 사용될 수 있는 산성 용액으로는 아세트산 또는 염산 수용액이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[37]

- [38] 본 발명의 한 구체예에서, 제 2 시린지 내부의 탄산수소나트륨 제제에 포함된 탄산수소나트륨의 양은 0.07 내지 0.1 g/ml 또는 0.08 내지 0.09 g/ml일 수 있다. 상기 탄산수소나트륨 제제는 시중에서 생체 주입용으로 판매되는 탄산수소나트륨 완충용액을 구입하여 사용할 수 있다.

- [39] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 탄산수소나트륨 제제는 탄산수소나트륨 외에 하이드록시 아파타이트, 골형성 단백질, 히아루론산 및 글리코사미노글리칸으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.

- [40] 하이드록시 아파타이트(HAp)는 염기성 인산칼슘으로, 화학식은 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 이다. 이는 인체의 뼈나 치아의 무기질 성분과 매우 유사하며, 생체독성이 없을 뿐 아니라 계면에 골유도를 촉진하기 때문에, 인공 이식물의 코팅 재료로 널리 사용되고 있는 대표적인 생체재료이다.

- [41] 본 발명의 또다른 구체예에서, 하이드록시 아파타이트 입자는 1 내지 500nm의 직경을 가질 수 있으며, 0.0001 내지 1g/ml, 0.001 내지 0.5g/ml 또는 0.005 내지 0.2g/ml의 농도로 사용할 수 있다.

- [42] 골형성 단백질(bone morphogeneic protein, BMP)은 골융합을 촉진하기 위해 사용되는 것으로, 0.1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 내지 5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 0.1 내지 2 $\mu\text{g/ml}$ 을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 BMP-2 또는 BMP-12가 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [43] 히아루론산은 n-아세틸글루코사민과 글로크론산이 서로 결합한 산성 뮤코다당의 일종으로 콘드로이틴황산 등과 함께 포유동물의 결합조직에 널리 분포되어 있다. 이는 결합조직 내에서 세포간극에 수분을 유지하며, 또 조직내에 젤상의 매트릭스를 형성해서 세포를 유지하고, 피부의 윤활성과 유연성을 갖게 하며, 외력 및 세균감염을 방지하는 것으로 알려져 있다.

- [44] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 히아루론산은 0.1 내지 30mg/ml, 1 내지 20mg/ml 또는 7내지 20mg/ml을 사용할 수 있다.

- [45] 글리코사미노글리칸은 콜라겐간에 가교 역할을 수행한다. 구체적으로 이에 제한되는 것은 아니나, 콘드로이틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파란, 헤파란 설페이트 및 더마탄 설페이트 등을 사용할 수 있다.

- [46] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 글리코사미노글리칸은 0.1 내지 20mg/ml, 1 내지 8 mg/ml 또는 3 내지 7mg/ml을 사용할 수 있다.

- [47] 본 발명의 구체예에서, 제 1 시린지의 부피는 제 2 시린지 부피의 2 내지 15배, 3 내지 12배 또는 5 내지 10배일 수 있다.
- [48]
- [49] 또한 본 발명의 실시예들은 제 1 시린지에 포함된 콜라겐 제제 및 제 2 시린지에 포함된 탄산수소나트륨 제제를 인간을 포함한 동물의 체내 또는 임플란트에 동시에 임의의 비율을 유지하며 주입하는 단계를 포함하는 하이드로겔 제조방법을 제공한다.
- [50] 본 발명의 한 구체예에서, 동시에 주입한다는 것은 제 1 시린지와 제 2 시린지 내용물의 투입이 동시에 임의의 비율을 유지하며 주입된다는 것을 의미하며, 상기 비율은 탄산수소나트륨 제제 1 부피부 대비 콜라겐 제제 2 내지 15 부피부, 3 내지 12 부피부 또는 5 내지 10부피부가 적당하다.
- [51] 동물은 바람직하게는 인간을 포함한 모든 척추동물이며, 더욱 바람직하게는 포유류가 이에 해당할 수 있다.
- [52] 이러한 주입은 상기 동물의 체내로 이루어지거나, 임플란트의 내부로 이루어질 수 있다.
- [53] 또한 주입 후 5 내지 30분 또는 10 내지 20분 동안 35 내지 40°C 또는 36 내지 38°C로 처리하여 주입된 물질의 겔화를 유도하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [54] 본 발명의 한 구체예에서는 콜라겐 제제; 탄산수소나트륨 제제; 제 1 시린지; 및 제 2 시린지를 포함하는 하이드로겔 제조용 키트를 제공한다. 상기 키트에서 콜라겐 제제의 부피는 탄산수소나트륨 제제 부피의 2 내지 15배, 3 내지 12배 또는 5 내지 10배일 수 있다. 상기 키트는 사용 직전 멀티 시린지 형태로 조립되어 양 내용물을 동시에 일정한 비율을 유지하며 주입할 수 있도록 사용될 수 있다.

[55]

발명의 실시를 위한 형태

- [56] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [57]
- [58] <실시예 1> 콜라겐 제제의 최적 pH 선별
- [59] 아텔로 콜라겐(바이오랜드, 한국) 20mg/ml을 염산 수용액에 용해시켜 pH2.0, pH3.0, pH4.0, pH5.0, pH7.0, pH 8.0의 콜라겐 제제를 제조하였다.
- [60] 탄산수소나트륨 제제로는 현재 임상에서 사용되고 있는 8.4% 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 완충용액을 사용하였다.
- [61] 각각의 pH의 콜라겐을 10ml 용 시린지에 넣고, 탄산수소나트륨 제제를 1ml용 시린지에 넣은 뒤, 글루용 아답터에 2개의 시린지를 각각 장착하여 멀티

시린지를 형성하였다.

- [62] 양 주사기의 피스톤을 동시에 눌러 10:1의 부피비로 양 제제가 동시에 혼합되어 주사바늘을 통하여 섞여 주사되도록 하였고, 15분간 37°C로 처리하여 겔화를 유도하였다.
- [63] 도 2을 참조하면, 다양한 pH의 콜라겐 중 pH3과 pH4의 콜라겐을 사용한 실험군에서만 겔이 생성되었으며, 그 외의 pH에서는 겔이 형성되지 아니함을 알 수 있었다.
- [64] 도 3은 상기와 동일한 조건에서 8.4% 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 완충용액에 0.015g/ml 하이드록시아파타이트와 1 $\mu\text{g/ml}$ BMP-2를 첨가하고, pH3.0, pH4.0인 상기 콜라겐 제제와 혼합하여 겔을 형성한 결과 사진으로, 겔이 형성된 것을 확인할 수 있다.

[65]

[66] <실시예 2> 탄산수소나트륨 제제 조성 및 혼합비율에 따른 동물효능평가

- [67] 2% (w/v) 아텔로 콜라겐(pH4.0, 바이오랜드, 한국), 2% (w/v) 히아루론산(pH3.0, 바이오랜드, 한국), 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액, 주사용수(하트만주사액)를 각각 준비하였다. 탄산수소나트륨함유 하트만 주사용수는 하트만 주사용수에 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액을 10%(v/v) 혼합하여 제조하였으며, 히아루론산 함유 탄산수소나트륨은 2% 히아루론산과 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액을 50%(v/v) 혼합하여 제조하였고, 탄산수소나트륨과 히아루론산 함유 하트만 주사용수는 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액을 하트만용액에 10%(v/v) 혼합하여 제조한 뒤 2% 히아루론산을 50%(v/v) 혼합하여 제조하였다.

- [68] A: 2%콜라겐 : 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액 = 10 ml : 1 ml 비율로 주사
- [69] B: 2%콜라겐 : 8.4% 탄산수소나트륨 완충용액 = 1 ml : 1 ml 비율로 주사
- [70] C: 2%콜라겐 : 탄산수소나트륨 함유하트만 주사용수= 10 ml : 1 ml 비율로 주사
- [71] D: 2%콜라겐 : 탄산수소나트륨 함유하트만 주사용수= 1 ml : 1 ml 비율로 주사
- [72] E: 2%콜라겐 : 히아루론산 함유 탄산수소나트륨 = 10 ml : 1 ml 비율로 주사
- [73] F: 2%콜라겐 : 히아루론산 함유 탄산수소나트륨 = 1 ml : 1 ml 비율로 주사
- [74] G: 2%콜라겐 : 탄산수소나트륨과 히아루론산 함유 하트만 주사용수 = 10 ml : 1 ml 비율로 주사
- [75] H: 2%콜라겐 : 탄산수소나트륨과 히아루론산 함유 하트만 주사용수 = 1 ml : 1 ml 비율로 주사

- [76] 도 4은 다양한 탄산수소나트륨 제제 조성에 따른 염증 및 분해도 평가를 위하여 마우스 피하에 주입후 2주후 생검한 결과로서 완충용액을 10% 혼합한 조성(좌)이 50% 혼합한 조성(우)보다 형태를 잘 유지하고 있는 것을 확인한 결과이다.

- [77] 도 5는 상기 시료를 주입한 후 1주 후에 MT염색을 시행한 결과로서 완충용액이 50%(v/v) 혼합군(B,D,F,H)에서 10%(v/v) 혼합군(A,C,E,G)보다 염증세포가 더 관찰되었으며, 완충용액이 50%(v/v) 혼합군(B,D,F,H)에서 10%(v/v)

혼합군(A,C,E,G)보다 좀 더 콜라겐이 흡수된 것을 관찰할 수 있다.

[78]

[79] <실시예 3> 탄산수소나트륨 제제 및 혼합비율에 따른 압축강도 측정

[80] 상기 실시예 2에서 제조된 다양한 완충용액의 조성 및 혼합비율에 따라 주입된 콜라겐 하이드로젤을 2주후 추출하여 이를 2×2 mm의 크기로 자른 뒤 물성 측정기 (Universal testing machine, HOUSFIELD, 영국)로 1 mm/min의 속도로 압력을 가하여 압축강도(compression test)를 측정하였다.

[81] 도 6에 나타낸 바와 같이, 히아루론산 함유 탄산수소나트륨을 10%(v/v) 비율로 함께 주사한 실험군(E)에서 기계적 압축강도가 가장 향상되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[82]

[83] <실시예 4> 탄산수소나트륨 제제 조성 및 혼합비율에 따른 동물효능평가

[84] 탄산수소나트륨 제제에 다양한 혼합물을 첨가하여 제조된 콜라겐 하이드로젤의 골형성 동물 효능 평가를 위해 마우스를 모델로 하여 실험하였다.

[85] 2% (w/v) 아텔로 콜라겐(pH4.0, 바이오랜드, 한국)을 5ml 시린지에 주입하고, 하기의 A 내지 F의 조합으로 구성된 탄산수소나트륨 제제를 1ml 시린지에 주입한 후 글루용 아답터에 동시에 장착하여 멀티 시린지 제조 후, 양 조성물의 비율을 일정하게 유지하면서 마우스 피하에 주사하였다. 주사 후 약 2주 후 생검하였다.

[86] A: 8.4% 탄산수소나트륨

[87] B: 8.4% 탄산수소나트륨 + 하이드록시아파타이트 0.015g/ml

[88] C: 8.4% 탄산수소나트륨 + 하이드록시아파타이트 0.015g/ml+BMP-2 0.1 µg/ml

[89] D: 8.4%탄산수소나트륨 + 히아루론산 20%(v/v)

[90] E: 8.4%탄산수소나트륨에 + 히아루론산 20%(v/v) + 하이드록시아파타이트 0.015g/ml

[91] F: 8.4%탄산수소나트륨 + 히아루론산 20%(v/v) + 하이드록시아파타이트 0.015g/ml + BMP-2 0.1 µg/ml

[92]

[93] 상기 조합에 따라 제조된 하이드로젤을 관찰한 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 탄산수소나트륨(A)과 히아루론산이 10% 함유된 탄산수소나트륨(D)을 완충용액으로 주사한 군은 형태가 구겨지는 약한 물성을 보였으나, 나노하이드록시아파타이트(B, E) 및/또는 BMP-2(C, F)를 추가로 함유한 완충용액 주입군에서는 단단한 물성을 보였다.

[94] 도8은이식 2주후 생검한 뒤 MT염색을 실시한 결과로서, 나노하이드록시아파타이트(B, E)와 BMP-2첨가군(C, F)에서 약간의 단핵세포가 관찰되나 상처치유단계에 일어나는 온화한 조직학적 결과이고, 완충용액만 혼합된 군(A, D)에서는 염증반응이 거의 관찰되지 않았다.

[95] 도9은이식 2주후 생검한 뒤 von-kossa염색을 실시한 결과로서,

나노하이드록시아파타이트 첨가군(B, C, E, F)에서 많은 칼슘침착이 관찰되었다.

[96]

[97] <실시예 5> 메틸화된 콜라겐(methylated collagen) 및 석시닐화된

콜라겐(succinylated collagen)이 혼합된 하이드로젤 제조

[98] 콜라겐의 표면의 극성을 조절하기 위하여 메틸화된 콜라겐과 석시닐화된 콜라겐을 제조한 뒤 이들 콜라겐을 함유한 하이드로젤을 제조하였다. 먼저 음전하를 띤 석시닐화된 콜라겐을 제조하기 위하여 콜라겐을 NaOH를 사용하여 pH9.0으로 적정하였다. 그 후 아세톤과 succinic anhydrous를 첨가하고 다시 pH 4.2로 적정한 후 동결 건조하였다. 양전하를 띤 메틸화된 콜라겐은 콜라겐을 메탄올에 녹인 후 sodiumsulfate를 첨가하고 동결 건조하여 제조하였다. 각각의 제조된 극성 콜라겐을 10mg/ml의 농도로 녹인후 pH4.0의 콜라겐과 다양한 비율로 혼합한 후 본 발명의 콜라겐 제제와 탄산수소나트륨 제제를 7:3의 비율로 주사하였다.

[99] 도 10에 나타낸 바와 같이, 메틸화된 콜라겐(A, B)은 콜라겐에 30%이상 혼합될 경우 젤화속도가 늦어졌으나, 석시닐화된 콜라겐(C, D)은 콜라겐에 50%까지 혼합되어도 젤화 속도가 유지되고 있음을 관찰할 수 있었다(A-D). 콜라겐과 메틸화된 콜라겐(E) 또는 석시닐화된 콜라겐(F)이 각각 30% 혼합되고, 히아루론산, 나노하이드록시아파타이트, 그리고 BMP-2가 함유된 하이드로젤 역시 37°C 에서 15분 처리 후 젤이 잘 형성되고 있음을 관찰할 수 있었다.

[100]

[101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

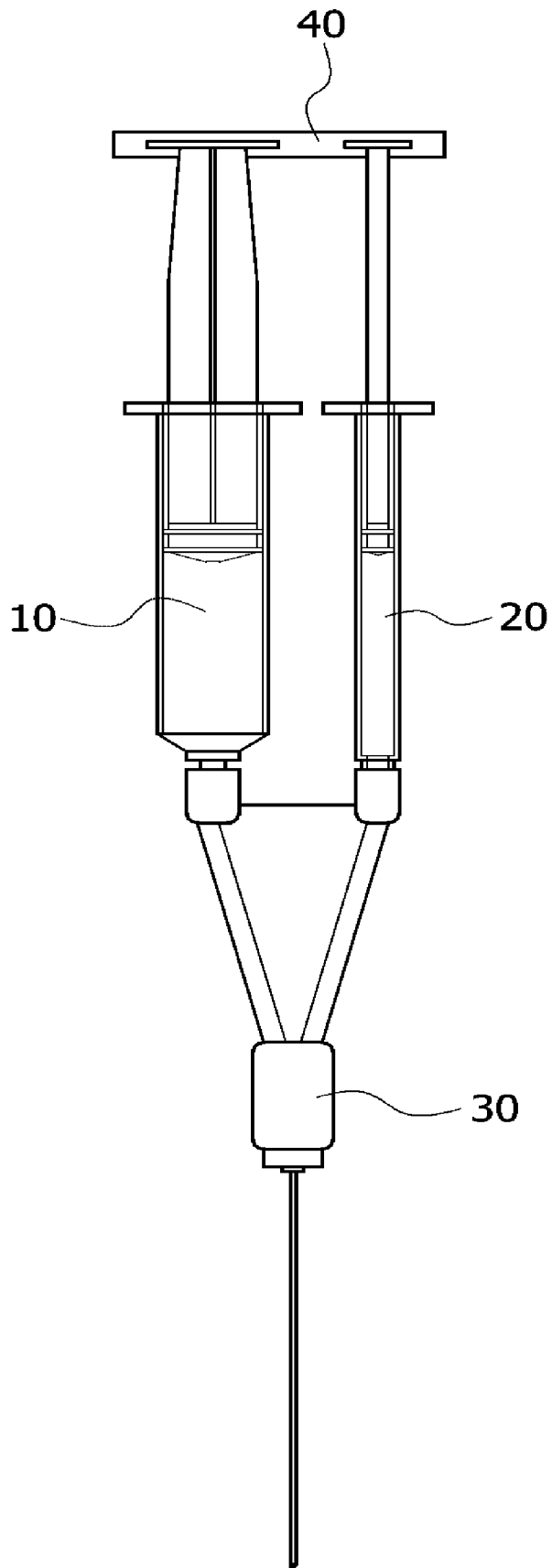
[102]

청구범위

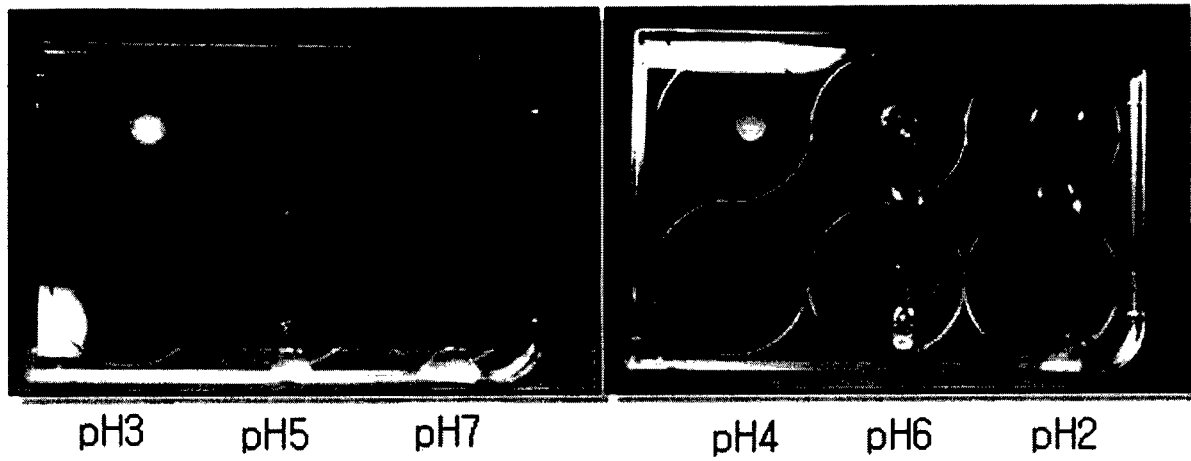
- [청구항 1] 콜라겐 제제가 포함된 제 1 시린지 및 탄산수소나트륨 제제가 포함된 제 2 시린지를 포함하는 멀티 시린지.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 콜라겐 제제의 pH는 2.5 내지 4.5인 멀티 시린지.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 콜라겐 제제에 포함된 콜라겐의 양은 10 내지 100 mg/ml 인 멀티 시린지.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 콜라겐 제제의 콜라겐은 메틸화된 콜라겐(methylated collagen) 및 석시닐화된 콜라겐(succinylated collagen)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 멀티 시린지.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
메틸화된 콜라겐의 양은 총 콜라겐의 양 100중량부 대비 40중량부 미만이고, 석시닐화된 콜라겐의 양은 총 콜라겐의 양 100중량부 대비 60중량부 미만인 멀티 시린지.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 탄산수소나트륨 제제에 포함된 탄산수소나트륨의 양은 0.07 내지 0.1 g/ml 인 멀티 시린지.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 탄산수소나트륨 제제는 탄산수소나트륨 외에 하이드록시 아파타이트, 골형성 단백질, 히아루론산 및 글리코사미노글리칸으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 혼합물을 추가로 포함하는 것인 멀티 시린지.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
제 1 시린지의 부피는 제 2 시린지 부피의 2 내지 15배인 멀티 시린지.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 멀티 시린지는 제 1 시린지와 제 2 시린지가 연결부를 통해 연결되고, 연결부에서 콜라겐 제제와 탄산수소나트륨 제제가 혼합되어 하나의 유출구로 유출되는 구조를 포함하는 것인 멀티 시린지.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 제 1 시린지와 제 2 시린지의 피스톤을 연결하는 보조기구를 추가로 포함하는 멀티 시린지.
- [청구항 11] 제 1 시린지에 포함된 콜라겐 제제 및 제 2 시린지에 포함된 탄산수소나트륨 제제를 인간을 제외한 동물의 체내에 동시에 임의의 비율을 유지하며 주입하는 단계를 포함하는 하이드로겔

- 제조방법.
- [청구항 12] 제 1 시린지에 포함된 콜라겐 제제 및 제 2 시린지에 포함된 탄산수소나트륨 제제를 임플란트에 동시에 임의의 비율을 유지하며 주입하는 단계를 포함하는 하이드로겔 제조방법.
- [청구항 13] 제11항 또는 제12항에 있어서,
주입 후 5 내지 30분간 35 내지 40°C로 처리하여 주입된 물질의 겔화를 유도하는 단계를 추가로 포함하는 하이드로겔 제조방법.
- [청구항 14] 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 임의의 비율은
탄산수소나트륨 제제 1 부피부 대비 콜라겐 제제 2 내지 15 부피부인 하이드로겔 제조방법.
- [청구항 15] 콜라겐 제제; 탄산수소나트륨 제제; 제 1 시린지; 및 제 2 시린지를 포함하는 하이드로겔 제조용 키트.

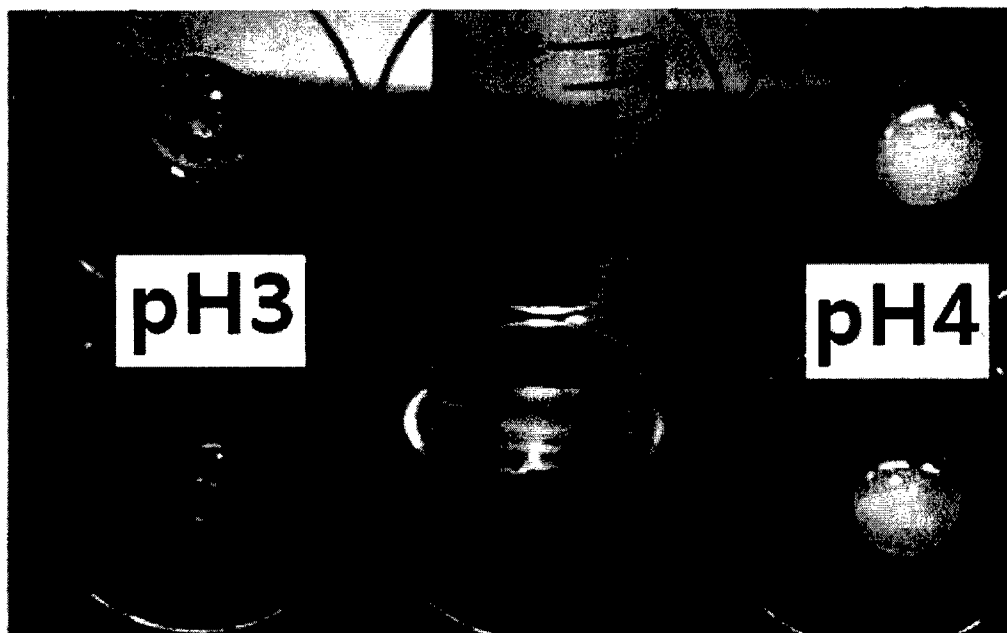
[Fig. 1]



[Fig. 2]



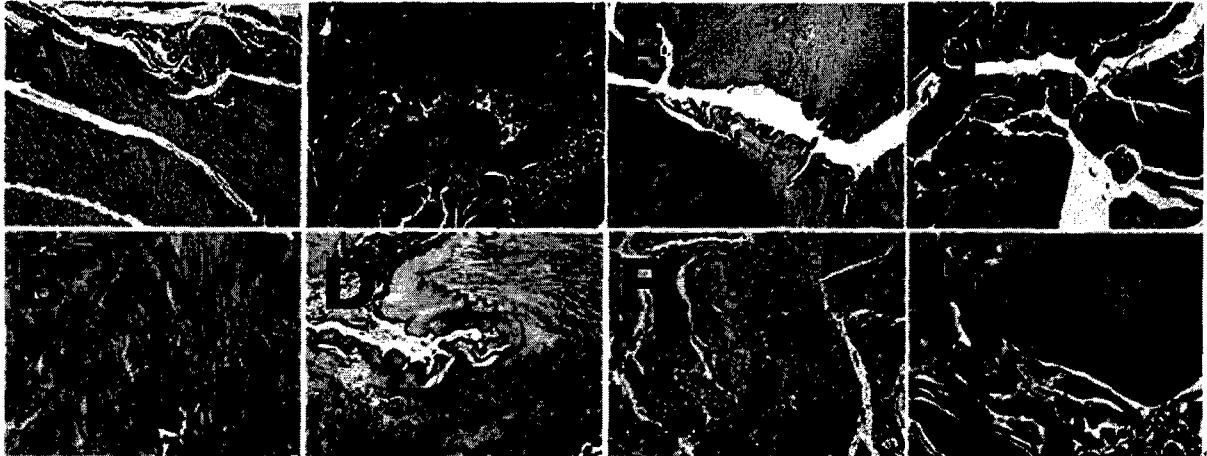
[Fig. 3]



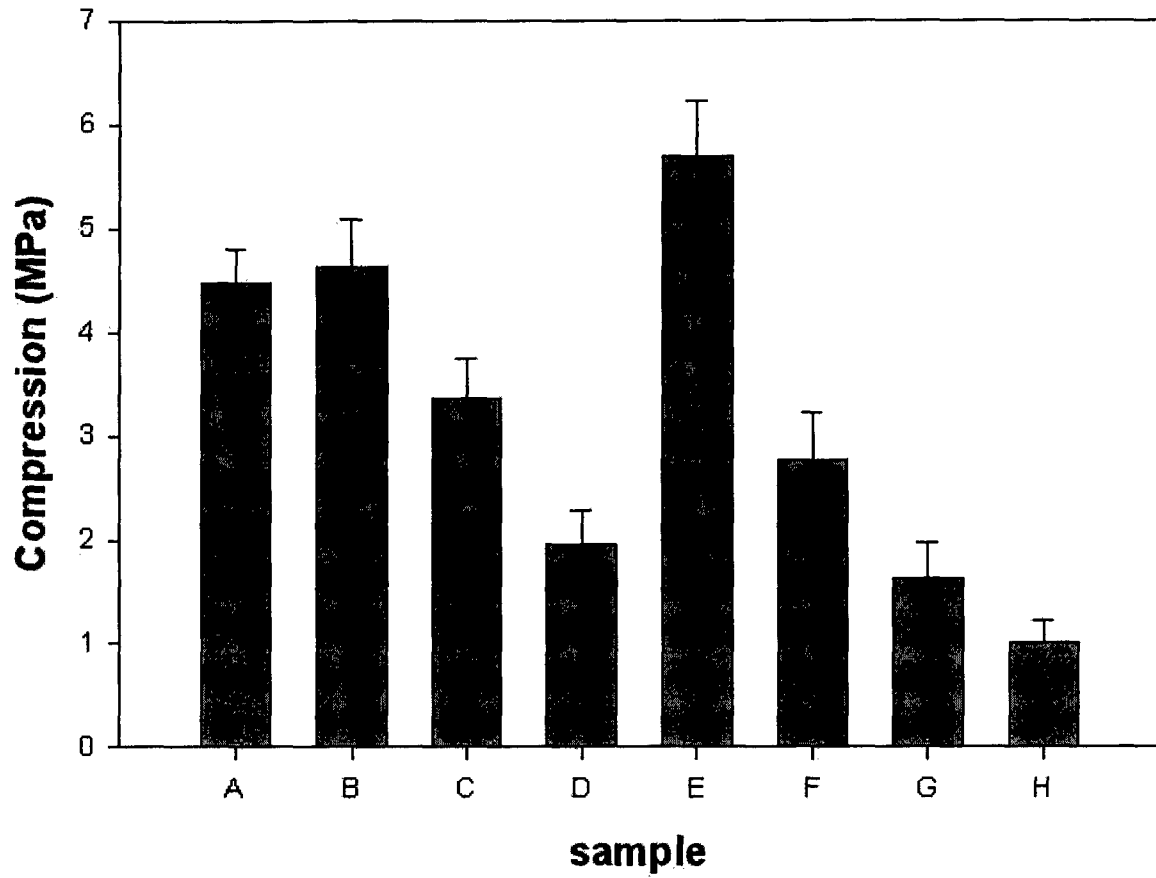
[Fig. 4]



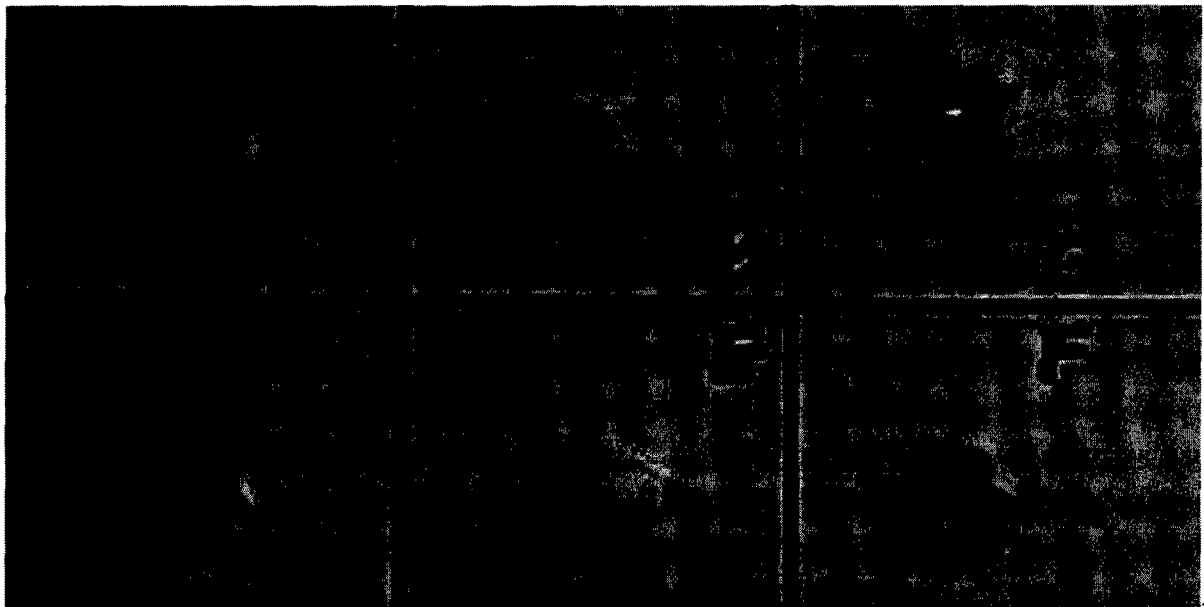
[Fig. 5]



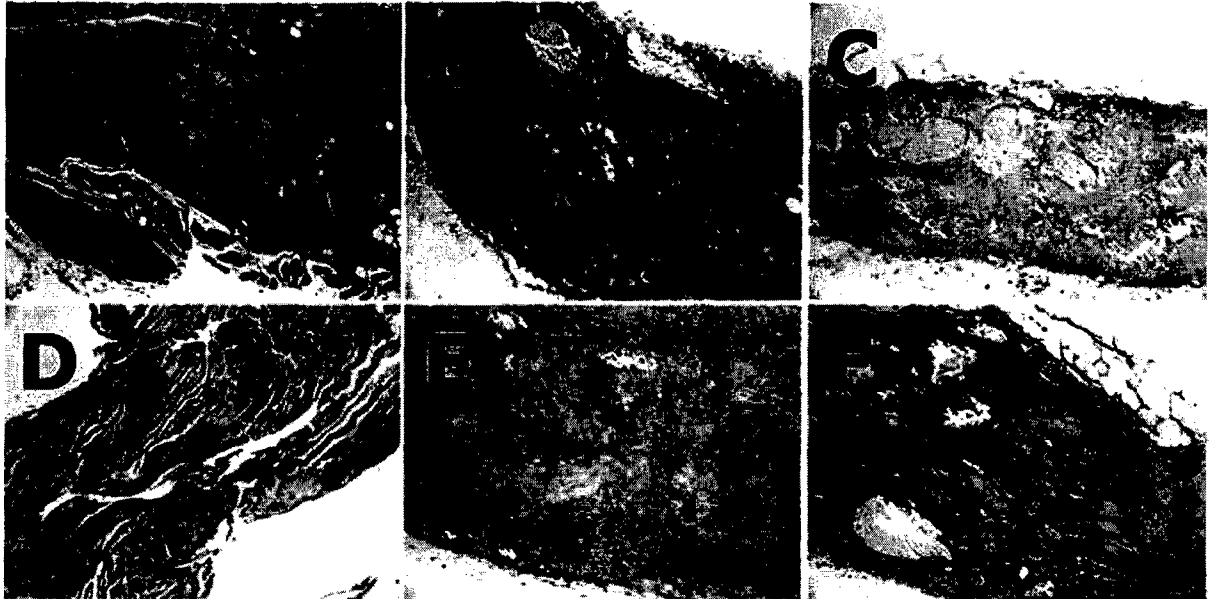
[Fig. 6]



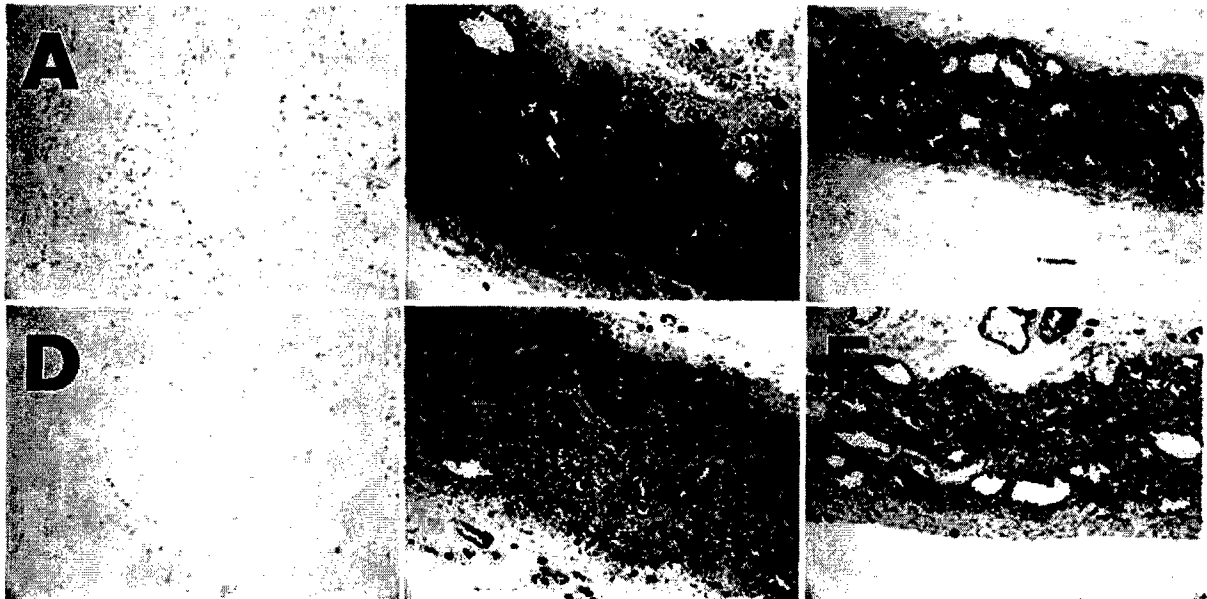
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

