



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월17일

(11) 등록번호 10-2511882

(24) 등록일자 2023년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/58 (2006.01) A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/58 (2013.01)

A61L 27/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7005687

(22) 출원일자(국제) 2015년08월05일

심사청구일자 2020년08월05일

(85) 번역문제출일자 2017년02월28일

(65) 공개번호 10-2017-0042621

(43) 공개일자 2017년04월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/043789

(87) 국제공개번호 WO 2016/022670

국제공개일자 2016년02월11일

(30) 우선권주장

62/033,599 2014년08월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

GB2484319 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 29 항

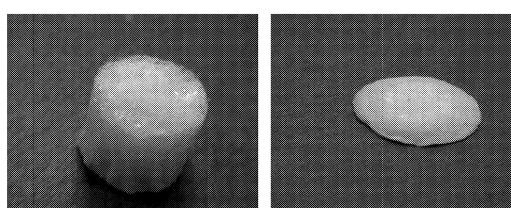
심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 골 및 연부 조직의 치유 및 재생을 강화하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 생분해성 재료, 그리고 골 및 연부 조직 성장 및 치유를 촉진하기 위한 그와 같은 조성물의 시험관 내 및 생체 내 사용 방법을 특징으로 한다.

대표도 - 도6

사진 비-압축
(5.5 mm 두께)

압축 (0.3 mm 두께)

비-압축 및 압축 젤라틴 + 10 % CW + 30 mg/mL 골 스펀지의 일반적인 눈에 보이는 외관의 디노라이트 이미지. 스펀지는 임의의 크기 (볼드에 따라 달라짐)로 제조된 이후 압축될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/18 (2013.01)
A61L 27/222 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/365 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 2300/30 (2013.01)
A61L 2300/404 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Isaac A. Rodriguez et al., "A Preliminary Evaluation of Lyophilized Gelatin Sponges, Enhanced with Platelet-Rich Plasma, Hydroxyapatite and Chitin Whiskers for Bone Regeneration", Cells (2013), Vol. 2*

Parthasarathy A. Madurantakam et al., "Compression of Multilayered Composite Electrospun Scaffolds: A Novel Strategy to Rapidly Enhance Mechanical Properties and Three Dimensionality of Bone Scaffolds*

W02010044042 A1*

Tao Wang et al., "Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings", Carbohydrate Polymers (2012), Vol. 88 (2012), pp. 75-88*

JP2007515950 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 100 중량부의 생분해성 중합체;
- b) 상기 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의 꿀; 및
- c) 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의, 1 nm 내지 10 μm 의 너비를 갖는 결정질 충전제를 포함하는, 연부 조직 성장 및 치유를 촉진하기 위한 조성물.

청구항 2

- a) 결정질 충전제를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계; 및
- b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 제1항의 조성물을 형성시키는 단계를 포함하는, 제1항의 조성물의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 용매가 2,2,2-트리플루오로에탄올, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (HFP), 9:1 아세트산:물, 물, 또는 식염수인 방법.

청구항 4

- a) 100 중량부의 생분해성 중합체;
- b) 상기 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의 꿀; 및
- c) 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의, 1 nm 내지 10 μm 의 너비를 갖는 결정질 충전제를 포함하는, 연부 조직 성장 및 치유를 촉진하기 위한 멤브레인.

청구항 5

- a) 결정질 충전제를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계; 및
- c) 상기 조성물을 전기방적하여 섬유를 형성시킴으로써, 제4항의 멤브레인을 형성시키는 단계를 포함하는, 제4항의 멤브레인의 제조 방법.

청구항 6

- a) 결정질 충전제를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하는 단계;
- c) 분산액으로부터 용매를 제거하여 스펀지를 형성시키는 단계; 및
- d) 상기 스펀지를 압축하여 제4항의 멤브레인을 형성시키는 단계를 포함하는, 제4항의 멤브레인의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 압축 단계가 적어도 3000 파운드의 압력으로 스펀지를 압축하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 멤브레인을 처리하여 블록, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 압축 멤브레인을 형성시키는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

청구항 9

적어도 2층의 제4항의 멤브레인을 포함하는 다중-층 멤브레인.

청구항 10

- a) 결정질 충전제를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계;
- c) 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시키는 단계;
- d) 상기 섬유를 수집하여 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인을 형성시키는 단계; 및
- e) 상기 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인들을 부착시켜 제9항의 다중-층 멤브레인을 형성시키는 단계를 포함하는, 제9항의 다중-층 멤브레인의 제조 방법.

청구항 11

- a) 100 중량부의 생분해성 중합체;
- b) 상기 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의 꿀; 및
- c) 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1 내지 300 중량부 양의, 1 nm 내지 10 μm 의 너비를 갖는 결정질 충전제를 포함하는, 연부 조직 성장 및 치유를 촉진하기 위한 섬유.

청구항 12

- a) 결정질 충전제를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계; 및
- c) 상기 조성물을 전기방직하여 제11항의 섬유를 형성시키는 단계를 포함하는, 제11항의 섬유의 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 꿀이 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 20 중량부 내지 약 70 중량부 범위의 재생 자극 또는 강화를 위한 유효량으로 존재하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 꿀이 10을 초과하는 고유 마누카 계수(Unique Manuka Factor) 등급을 갖는 것인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 생분해성 중합체가 단백질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 생분해성 중합체가 젤라틴 또는 콜라겐을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 생분해성 중합체가 폴리(락트산), 폴리디옥사논 (PDO), 또는 젤라틴 또는 콜라겐과 이들의 블렌드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 결정질 충전제가 키틴 휘스커 또는 히드록시아파타이트를 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 결정질 충전제가 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 15 중량부의 양으로 존재하는 키틴 휘스커를 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 키틴 휘스커가 약 200-400 nm의 평균 길이를 갖는 것인 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 키틴 휘스커가 약 3 μm 이하의 평균 너비를 갖는 것인 조성물.

청구항 22

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 추가적인 충전제 또는 적어도 1종의 추가적인 항생제를 추가적으로 포함하는 조성물.

청구항 23

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 꿀이 치료적 유효량으로 존재하는 것인 조성물.

청구항 24

제9항에 있어서, 가교 공정이 적용되는 다중-층 멤브레인.

청구항 25

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 골 표면을 조성물과 접촉시킴으로써 골 재생을 촉진하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 26

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 골 결손을 조성물과 접촉시킴으로써 골 결손의 치유를 촉진하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 27

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 골 결손을 조성물과 접촉시킴으로써 골 결손의 감염을 예방하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 28

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 손상된 조직을 조성물과 접촉시킴으로써 손상된 조직에서의 연부 조직 치유를 촉진하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 29

제1항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 조직을 조성물과 접촉시킴으로써 조직에서의 대식세포 반응을 촉진하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

배경 기술

- [0001] 임상적으로, 치열의 상실 후에는 상악 및 하악에서 골 흡수가 발생한다. 부분적 무치악(edentulism)은 성인 인구 중 40 %에 영향을 주고 있으며, 다음 15년 이내에 2억명의 개인을 넘어 증가할 것으로 추산되고 있다 (문헌 [Facts and Figures. 2012, American College of Prosthodontics]). 이러한 경우에, 골 흡수는 치조 융선(alveolar ridge)의 너비 및 높이가 감소되도록 하는데, 치아가 상실된 후 처음 1년 동안 골 너비의 50 % 상실이 발생하며, 그 중 3분의 2가 최초 3개월 이내에 발생한다 (문헌 [Schropp, L., et al., Int J Periodontics Restorative Dent, 2003. 23(4): p. 313-23]). 그 결과는 치아 임플란트에 의해 환자의 치열이 복구되기 전에, 이와 같이 상실된 골 구조를 대체하는 별도의 절차가 요구된다는 것이다. 결손 치조 융선을 높이 및 너비 둘 다에 대하여 이식하는 데에 가용한 다양한 수술 절차들이 존재하다. 이와 같은 골 이식을 실행하기 위해서는, 보통 동종이식 골 분말/미립자 또는 블록이 빈 공간에 위치됨으로써, 목표 골 재생을 위한 골전도성/골유도성(osteoconductive/osteoinductive) 신호를 제공한다. 이러한 절차들 중 많은 것이 골 이식편은 물론 연부 조직을 제자리에 유지하는 데에 유도 골 재생성(guided bone regenerative) (GBR) 멤브레인을 이용한다. 오늘날까지, 대형 결함의 치조 융선 골 이식을 위한 "이상적인" GBR 멤브레인은 여전히 개발되지 않고 있다 (문헌 [Bottino, M.C., et al., Dent Mater, 2012. 28(7): p. 703-21]; [Dimitriou, R., et al., BMC Med, 2012. 10: p. 81]).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0002] 발치시 멤브레인 장벽으로 사용되는 현행 생체재료들은 종종 취급하기가 어렵고, 빠르게 분해되며, 골 이식편 위의 조직의 완전하고 빠른 봉합에 중요한 상처 재생의 강화를 제공하지 않는다. 골 성장을 지지하고, 골 및 연부 조직 치유를 촉진하며 감염을 억제하게 되는 생분해성 재료에 대한 시급한 요구가 존재한다. 그와 같은 재료는 골 및 연부 조직에 영향을 주는 손상, 이상 및 장애를 치료하는 데에 유용할 것이다.

과제의 해결 수단

- [0003] [발명의 개요]
- [0004] 본원에서 기술되는 바와 같이, 본 발명은 골 및 연부 조직 성장 및 치유를 촉진하는 생분해성 장벽 재료, 및 그와 같은 재료의 시험관 내 및 생체 내 사용 방법을 특징으로 한다.
- [0005] 일 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 조성물을 제공한다:
- [0006] a) 생분해성 중합체; 및
- [0007] b) 골.
- [0008] 소정 실시양태에서, 상기 조성물은 c) 충전재를 추가적으로 포함한다.
- [0009] 소정 실시양태에서, 상기 생분해성 중합체는 단백질을 포함한다. 소정 실시양태에서, 상기 단백질은 젤라틴이다. 소정 실시양태에서, 단백질은 콜라겐이다.
- [0010] 소정 실시양태에서, 상기 생분해성 중합체는 폴리(락트산)를 포함한다.
- [0011] 소정 실시양태에서, 상기 골은 생분해성 중합체, 예컨대 젤라틴 100 중량부 대비 약 1 중량부 내지 약 300 중량부의 양으로 존재한다. 소정 실시양태에서, 골은 생분해성 중합체, 예컨대 젤라틴 100 중량부 대비 약 1 중량부 내지 약 100 중량부, 약 1 중량부 내지 약 50 중량부, 약 1 중량부 내지 약 15 중량부, 또는 특히 약 5 중량부 내지 약 10 중량부의 양으로 존재한다.
- [0012] 소정 실시양태에서, 상기 충전재는 생분해성 중합체 100 중량부 대비 1-300 중량부의 양으로 존재한다. 바람직하게는, 충전재는 약 1-100 중량부, 5-50 중량부, 또는 특히 10-20 중량부의 양으로 존재한다.
- [0013] 소정 실시양태에서, 충전재는 나노충전재, 마이크로충전재 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 상기 나노충전재는 약 1 nm 내지 약 999 nm 범위인 나노규모, 또는 약 1 μ m 미만의 평균 직경을 가진다. 소정 실시양태에서, 나노충전재는 적합하게는 약 990 nm 미만, 약 900 nm 미만, 약 800 nm 미만, 약 700 nm 미만, 약 600 nm 미만, 약 500 nm 미만, 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만, 또는 약 100 nm 미만의 평균 직경을 가진다.

소정 실시양태에서, 나노충전재는 적합하게는 약 1-100 nm, 약 10-80 nm, 약 25-75 nm, 또는 특히 약 50 nm의 평균 직경을 가진다. 상기 마이크로충전재는 적어도 약 1 μm 인 마이크로규모의 평균 직경을 가지는 마이크로-크기 충전재이다. 마이크로충전재는 적합하게는 약 10 μm 미만, 약 9 μm 미만, 약 8 μm 미만, 약 7 μm 미만, 약 6 μm 미만, 약 5 μm 미만, 약 4 μm 미만, 약 3 μm 미만, 약 2 μm 미만, 또는 특히 약 1-2 μm 의 평균 직경을 가진다.

[0014] 소정의 실시양태에서, 충전재는 키틴 휘스커(chitin whisker)를 포함한다. 소정 실시양태에서, 충전재는 히드록시아파타이트를 포함한다. 소정 실시양태에서, 충전재 (예컨대 키틴 휘스커)는 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 15 중량부의 양으로 존재한다. 소정 실시양태에서, 상기 키틴 휘스커는 약 25-75 nm의 평균 직경, 또는 특히 약 50 nm의 평균 직경을 가진다. 소정 실시양태에서, 키틴 휘스커는 약 200-400 nm, 약 250-300 nm, 또는 특히 약 280 nm의 평균 길이를 가진다.

[0015] 소정 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 1종 이상의 추가적인 충전재, 또는 적어도 1종 이상의 항생제와 같은 치료제를 추가적으로 포함한다. 소정 실시양태에서, 상기 치료제는 치료적 유효량의 꿀이다. 구체적인 실시양태에서, 조성물은 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 50 중량부 내지 약 300 중량부, 또는 약 100 중량부 내지 약 200 중량부 범위인 항박테리아-유효량의 꿀을 추가적으로 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 조성물은 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 10 중량부 내지 약 100 중량부, 약 20 중량부 내지 약 70 중량부, 또는 특히 약 50 중량부 범위인 재생 (세포 증식 및 세포 이동) 자극 또는 강화 유효량의 꿀을 추가적으로 포함한다. 치료 용도의 꿀은 상기한 꿀과 동일하거나 상이할 수 있다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 멤브레인을 제공한다:

[0017] a) 생분해성 중합체;

[0018] b) 꿀.

[0019] 소정 실시양태에서, 상기 멤브레인은 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0020] 또 다른 측면에서는, 다중-층 멤브레인이 적어도 2개의 본 발명 멤브레인 층을 포함한다.

[0021] 소정 실시양태에서, 상기 다중-층 멤브레인은 2-4개의 본 발명 멤브레인 층을 포함한다. 소정 실시양태에서, 다중-층 멤브레인은 4개의 멤브레인 층을 포함한다. 소정의 실시양태에서는, 적어도 2개의 층이 가교결합된다. 소정 실시양태에서, 상기 적어도 2개의 층은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드, 제니핀, 글루타르알데히드 또는 이들의 혼합물을 사용하여 가교결합된다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명 조성물 (즉 생분해성 중합체 및 꿀을 포함하는 조성물)의 제조 방법을 제공한다. 상기 조성물은 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 방법은 하기를 포함한다: 용매를 사용하여 생분해성 중합체 및 꿀을 조합하는 것에 의해 조성물을 형성시키는 단계.

[0023] 바람직하게는, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0024] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계; 및

[0025] b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계.

[0026] 소정 실시양태에서, 상기 용매는 2,2,2-트리플루오로에탄올, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (HFP) 또는 9:1 아세트산:물이다. 소정 실시양태에서, 용매는 조성물, 섬유 및/또는 멤브레인을 형성시키고 처리하는 데에 사용되는 조건하에서 꿀을 상당히 가용화하지 않는다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 섬유를 제공한다:

[0028] a) 생분해성 중합체; 및

[0029] b) 꿀.

[0030] 상기 섬유는 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0031] 바람직한 측면에서, 상기 "섬유"에는 나노섬유, 마이크로섬유 또는 나노-마이크로섬유가 포함될 수 있다. 상기 섬유는 비제한적으로 상기 나노섬유, 마이크로섬유, 나노-마이크로섬유 또는 이들의 혼합물을 포함하는 그의 수 또는 총 두께까지 다발로 형성될 수 있다. 소정 실시양태에서, 상기 나노섬유는 약 1 nm 내지 약 950 nm 범위인 나노규모의 평균 직경 또는 두께를 가진다. 바람직하게는, 나노섬유는 적합하게는 약 100 nm 미만의 평균

직경 또는 두께를 가진다. 상기 마이크로섬유는 약 1 μm 내지 약 950 μm 범위인 마이크로규모의 평균 직경 또는 두께를 가진다. 바람직하게는, 마이크로섬유는 적합하게는 약 10 μm 미만의 평균 직경 또는 두께를 가진다. 또한, 상기 나노-마이크로섬유는 적합하게는 약 100 nm 내지 약 10 μm 범위의 평균 직경 또는 두께를 가진다.

- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 섬유의 제조 방법을 제공한다: 생분해성 중합체 및 꼴. 상기 섬유는 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0033] 용매를 사용하여 생분해성 중합체 및 꼴을 조합하는 것에 의해 조성물을 형성시키는 단계; 및
- [0034] 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시키는 단계.
- [0035] 바람직하게는, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0036] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0037] b) 생분해성 중합체 및 꼴을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계; 및
- [0038] c) 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시키는 단계.
- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 멤브레인의 제조 방법을 제공한다: 생분해성 중합체 및 꼴. 상기 멤브레인은 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0040] 용매를 사용하여 생분해성 중합체 및 꼴을 조합하는 것에 의해 조성물을 형성시키는 단계; 및
- [0041] 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시킴으로써, 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0042] 바람직하게는, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0043] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0044] b) 생분해성 중합체 및 꼴을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계; 및
- [0045] c) 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시킴으로써, 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명 멤브레인의 제조 방법을 제공하는 바, 상기 방법을 하기를 포함한다:
- [0047] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0048] b) 생분해성 중합체 및 꼴을 상기 분산액과 조합하는 단계;
- [0049] c) 분산액으로부터 용매를 제거하여 스펀지(sponge)를 형성시키는 단계; 및
- [0050] d) 상기 스펀지를 압축하여 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0051] 소정 실시양태에서, 상기 압축 단계는 적어도 3000 파운드의 압력으로 스펀지를 압축하는 것을 포함한다.
- [0052] 소정 실시양태에서, 상기 멤브레인은 블록(block), 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 압축 멤브레인을 형성하도록 추가적으로 처리된다.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 다중-층 멤브레인을 제공한다:
- [0054] a) 생분해성 중합체; 및
- [0055] b) 꼴.
- [0056] 상기 다중-층 멤브레인은 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명 다중-층 멤브레인의 제조 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0058] 용매를 사용하여 생분해성 중합체 및 꼴을 조합하는 것에 의해 조성물을 형성시키는 단계;
- [0059] 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시키는 단계;
- [0060] 상기 섬유를 수집하여 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인을 형성시키는 단계; 및
- [0061] 상기 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인들을 부착시켜 다중-층 멤브레인을 형성시키는 단계.

- [0062] 바람직하게는, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0063] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0064] b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하는 단계;
- [0065] c) 상기 조성물을 전기방적하여 섬유를 형성시키는 단계;
- [0066] d) 상기 섬유를 수집하여 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인을 형성시키는 단계; 및
- [0067] e) 상기 적어도 2개의 부직 메시 멤브레인들을 부착시켜 다중-층 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0068] 상기 다중-층 멤브레인은 압축될 수 있거나, 또는 압축되지 않을 수 있다.
- [0069] 또 다른 측면에서, 본 발명은 꿀 재생의 촉진 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 꿀 표면을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0070] 또 다른 측면에서, 본 발명은 꿀 결손 치유의 촉진 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 꿀 결손을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0071] 또 다른 측면에서, 본 발명은 꿀 결손의 감염 예방 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 꿀 결손을 또 다른 측면으로 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0072] 또 다른 측면에서, 본 발명은 손상된 조직에서의 연부 조직 치유의 촉진 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 손상된 조직을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0073] 또 다른 측면에서, 본 발명은 조직에서의 대식세포 반응의 촉진 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 조직을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0074] **[정의]**
- [0075] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. 하기의 참고문헌들이 본 발명에서 사용되는 용어들 중 많은 것의 일반적인 정의를 통상의 기술자에게 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)]; [The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)]; [The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 [Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에서 사용될 때, 달리 상술되지 않는 한, 하기의 용어들은 그들에 대하여 하기에서 부여되는 의미를 가진다.
- [0076] "작용제"는 임의의 소형 분자 화합물, 항체, 핵산 분자 또는 폴리펩티드, 또는 이들의 단편을 의미한다.
- [0077] "개선하다"는 질환 발생 또는 진행의 감소, 억제, 감쇠, 감축, 중지 또는 안정화를 의미한다.
- [0078] "변경"은 본원에서 기술되는 것들과 같은 표준 기술 공지의 방법에 의해 검출될 때의 변화 (증가 또는 감소)를 의미한다. 본원에서 사용될 때, 변경에는 10 %, 25 %, 40 %, 50 % 또는 그를 초과하는 변화가 포함된다.
- [0079] "연부 조직 질환 또는 손상"은 연부 조직 또는 조직의 정상적인 기능 또는 연결성을 붕괴시키는 임의의 질환, 장애 또는 외상을 의미한다.
- [0080] 본 개시에서, "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)", "함유하는" 및 "가지는" 등은 미국 특허법에서 그들에 대하여 부여되는 의미를 가질 수 있는데, "포함하다(include)", "포함하는(including)" 등을 의미할 수 있으며; "본질적으로 ~로 구성되는" 또는 "본질적으로 ~로 구성되다" 등은 미국 특허법에서 부여되는 의미를 가지는 바, 상기 용어는 개방-종료형이어서, 언급되는 것을 초과하는 존재에 의해 언급되는 것의 기본적인거나 신규한 특징이 변화되지 않는 한, 언급되는 것을 초과하는 존재를 가능케 하지만, 선행기술의 양태는 배제한다.
- [0081] "질환"은 세포, 조직, 또는 꿀을 포함한 기관의 정상적인 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 이상 또는 장애

를 의미한다.

- [0082] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 원하는 효과를 제공하거나 미치로 대상체에 비해 질환의 증상을 제거하는 데에 필요한 본 발명 조성물의 양을 의미한다. 질환의 치료 처리를 위하여 본 발명을 실시하는 데에 사용되는 세포성 조성물의 유효량은 투여 방식, 대상체의 연령, 체중 및 일반적인 건강에 따라 달라진다. 궁극적으로는, 주치의 또는 수의사가 적절한 양 및 투약 처방계획을 결정하게 된다. 그와 같은 양은 "치료적 유효량"으로 지칭된다. "이식"은 생체 내에서의 해당 기존 조직 (예컨대 골 또는 연부 조직)으로의 세포성 접촉 및 도입의 과정을 지칭한다.
- [0083] "골 치유를 강화하는 것"은 대조 조건에 비해 골 성장 또는 치유의 정도를 증가시키는 것을 의미한다. 바람직하게는, 상기 증가는 적어도 2-배, 2.5-배, 3-배 또는 그 이상까지이다.
- [0084] "마이크로규모"는 크기 100 nm 내지 999 μm 사이를 의미한다. 마이크로규모인 입자는 나노튜브보다 크기가 더 크다.
- [0085] 본원에서 사용될 때, "작용제를 수득하는 것"에서와 같은 "수득하는 것"에는 작용제를 합성하는 것, 구매하는 것, 또는 달리 획득하는 것이 포함된다.
- [0086] "참조"는 표준 또는 대조 조건을 의미한다.
- [0087] "대상체"는 비제한적으로 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함한 포유동물을 의미한다.
- [0088] 본원에서 제공되는 범위는 그 범위 내 값들 모두의 약기인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 구성되는 군에 속하는 임의의 수, 수 조합, 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0089] 본원에서 사용될 때, "치료하다", "치료하는", "치료" 등의 용어는 장애 및/또는 그와 연관되어 있는 증상을 감소시키거나 개선하는 것을 지칭한다. 배제되는 것은 아니지만, 장애 또는 이상을 치료하는 것이 그 장애, 이상 또는 그들과 연관되어 있는 증상이 완전히 제거될 것을 요구하는 것은 아님을 알고 있을 것이다.
- [0090] 구체적으로 언급되거나 문맥상 분명하지 않은 한, 본원에서 사용될 때, "또는"이라는 용어는 포괄적인 것으로 이해된다. 구체적으로 언급되거나 문맥상 분명하지 않은 한, 본원에서 사용될 때, "a", "an" 및 "the"라는 용어는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.
- [0091] 구체적으로 언급되거나 문맥상 분명하지 않은 한, 본원에서 사용될 때, "약"이라는 용어는 관련 기술분야의 정상적인 관용 범위 이내, 예를 들면 평균의 2 표준 편차 이내인 것으로 이해된다. 약은 언급된 값의 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 %, 0.05 % 또는 0.01 % 이내인 것으로 이해될 수 있다. 문맥상 분명하게 다르지 않은 한, 본원에서 제공되는 모든 숫자 값은 약이라는 용어에 의해 수식된다.
- [0092] 본원 변수의 임의 정의에서의 화학 기 목록에 대한 언급은 임의의 단일 기 또는 열거되는 기들의 조합으로써의 그 변수의 정의를 포함한다. 본원의 변수 또는 측면에 대한 실시양태의 언급은 임의의 단일 실시양태, 또는 임의의 다른 실시양태 또는 그의 일부와의 조합으로써의 그 실시양태를 포함한다.
- [0093] 본원에서 제공되는 임의의 조성물 또는 방법은 본원에서 제공되는 다른 조성물 및 방법들 중 어느 것 1종 이상과 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 도 1은 비-압축 및 압축 전기방적 젤라틴 + 15 % CW + 꿀 스캐폴드 (비-가교결합)들의 SEM 이미지를 나타낸다. 척도 막대 및 배율은 각각 10 μm 및 2k \times .
- 도 2는 도 1의 SEM 이미지를 사용한 피브라린트™ 자동화 섬유 직경 분석을 나타낸다. 상기 막대그래프는 마이크로미터로 나타낸, 평균 및 표준 편차와 함께 섬유 크기 분포를 나타낸다.
- 도 3A-3B는 압축 전기방적 멤브레인의 단축 인장 시험 결과를 나타낸다: A. 파단 변형률. B. 탄성 모듈러스.
- 도 4는 대표적인 성형가능한 수화 10 % 꿀 압축 멤브레인을 나타낸다.
- 도 5는 세포화된 (HDF) 압축 전기방적 멤브레인의 DAPI 이미지를 나타낸다. 척도 막대 및 배율은 각각 200 μm

및 10×.

도 6은 비-압축 및 압축 젤라틴 + 10 % CW + 30 mg/mL 꿀 스펀지의 일반적인 눈에 보이는 외관의 디노라이트 이미지를 나타낸다.

도 7은 스캐폴드 압축에 사용되는 카르버 수압 장치를 나타낸다.

도 8은 대표적인 기계적 시험 방법을 개략적으로 도시한다.

도 9는 각각 200 μm 및 100×인 척도 막대 및 배율을 포함하는, 비-압축 및 압축 젤라틴 + CW + MH 멤브레인의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 10A는 누적 평균 방출 측정치로 나타내었을 때의 젤라틴 + CW + MH 분해 결과 (BCA 검정)를 포함하는 그래프를 나타내며; 도 10B는 누적 % 방출 측정치로 나타내었을 때의 젤라틴 + CW + MH 분해 결과 (BCA 검정)를 포함하는 그래프를 나타낸다.

도 11은 세포화된 (HDF) 압축 젤라틴 + CW + MH 멤브레인의 DAPI 이미지를 나타낸다. 척도 막대 및 배율은 각각 100 μm 및 10×.

도 12는 대표적인 성형가능한 수화 멤브레인을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 본 발명은 꿀을 포함하는 생분해성 중합체-기재 재료 또는 매트릭스 (예컨대 섬유 또는 멤브레인); 그리고 손상 또는 이상 (예컨대 치과적 수술과 연관되어 있는 골 손상 또는 외상)을 개선하기 위한 그와 같은 조성물의 시험관 내 및 생체 내 사용 방법을 특징으로 한다.

[0096] 본 발명은 적어도 부분적으로 꿀을 포함하는 생분해성 멤브레인이 골 및 조직 성장 및 재생을 지지하고 촉진할 수 있다는 발견에 기초한다. 더하여, 상기 생분해성 멤브레인은 항박테리아-유효량의 꿀을 포함함으로써, 감염에 대한 항박테리아 장벽을 제공하며, 상처 치유를 위한 멸균 환경을 촉진한다.

[0097] 스캐폴드

[0098] 일반적으로, 본 발명의 재료는 생분해성 중합체 및 꿀 (예컨대 항박테리아, 살박테리아 및/또는 상처 치유량의 꿀)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 재료는 충전재를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0099] 다양한 생분해성 중합체가 관련 기술분야에 알려져 있다. 바람직한 생분해성 중합체에는 단백질 (예컨대 젤라틴 및 콜라겐), 자연-발생 단량체로부터 유래하는 중합체 (예컨대 폴리(락트산)(PLA)), 및 합성 단량체로부터 유래하는 중합체 (예컨대 폴리디옥사논 (PDO))가 포함된다. 바람직하게는, 생분해성 재료는 1년 미만, 더욱 바람직하게는 6개월 미만의 시간 기간에 걸쳐 분해되게 된다. 일반적으로, 생체적합성이며 섬유 및 멤브레인으로 성형 또는 형성될 수 있는 어떠한 생분해성 중합체도 본 발명의 재료에 사용될 수 있다. 생분해성 중합체들의 공중합체 또는 혼합물/블렌드 (다중-성분) 역시 사용될 수 있다.

[0100] 그 중 일부가 생분해성인 다른 생체적합성 중합체가 포함되는데, 예를 들면 그와 같은 중합체에는 하기가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다: 폴리(우레탄), 폴리(실록산) 또는 실리콘, 폴리(에틸렌), 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(2-히드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(비닐 알콜), 폴리(아크릴산), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌-co-비닐 아세테이트), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(메타크릴산), 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리(락티드-co-글리콜리드) (PLGA), 나일론, 폴리아미드, 폴리무수물, 폴리(에틸렌-co-비닐 알콜) (EVOH), 폴리카프로락톤, 폴리(비닐 아세테이트) (PVA), 폴리비닐히드록시드, 폴리(에틸렌 옥사이드) (PEO) 및 폴리오르소에스테르, 또는 생물학적으로 상용성이 되도록 개발될 수 있는 임의의 다른 유사 합성 중합체. 일부 바람직한 합성 매트릭스 재료에는 PLA, PGA, PLA와 PGA의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리(에틸렌-co-비닐 아세테이트) (EVOH), PVA 및 PEO가 포함된다. U.S. 특허 제7,374,774호 (본원에 참조로써 개재됨)도 참조하라.

[0101] 본원에서 사용될 때의 "충전재"라는 용어는 중합체 섬유, 필라멘트 또는 멤브레인에 구조적 보강 또는 강성을 제공하는 유기 또는 무기 생체적합성 재료를 지칭한다. 상기 충전재는 결정질의 섬유 또는 입자일 수 있다. 대안적으로, 충전재는 적합하게는 막대, 섬유, 구체, 타원체, 다면체 결정 등의 형상을 가지지만, 충전재의 형상이 특히 거기에 제한되는 것은 아니다. 충전재는 약 1 nm 내지 약 950 nm 범위인 나노규모 (나노충전재)의 평균 직경을 가진다. 상기 나노충전재는 적합하게는 약 1-100 nm, 약 10-80 nm, 약 25-75 nm, 또는 특히 약

50 nm의 평균 직경을 가진다. 대안적으로, 충전제는 적어도 약 100 nm를 초과하는 마이크로규모 (마이크로충전제)의 평균 직경을 가진다. 상기 마이크로충전제는 적합하게는 약 10 μm 미만, 약 9 μm 미만, 약 8 μm 미만, 약 7 μm 미만, 약 6 μm 미만, 약 5 μm 미만, 약 4 μm 미만, 약 3 μm 미만, 약 2 μm 미만, 또는 특히 약 1 μm 미만의 평균 직경을 가진다. 예를 들면, 충전제는 나노결정질 또는 섬유 재료이며, 약 100 nm 미만의 평균 직경 또는 두께를 가지고, 유리하게는 약 500 nm 미만의 평균 길이를 가질 수 있다. 유리하게는, 나노충전제는 정전기적 전하를 보유할 수 있으며, 상처 부위에 이식 또는 적용되었을 때, 성장 인자에 부착되거나 또는 그것을 유인할 수 있다. 본 발명의 재료에 사용하기에 적합한 나노충전제 재료의 예에는 키틴 휘스커 및 히드록시아파타이트 나노결정이 포함된다. 비제한적으로, 나노충전제와 마이크로충전제를 포함하는 충전제 혼합물 역시 사용될 수 있다.

[0102] 본 발명의 재료는 또한 꿀을 포함한다. 어떠한 유형의 꿀도 사용될 수 있다. 꿀 유형의 예에는 마누카 (Manuka) 꿀, 랩토스페르뮴(Leptospermum) 꿀 또는 메밀 꿀이 포함된다. 상이한 꿀들의 혼합물 역시 사용될 수 있다. 예를 들면, 마누카 꿀은 10을 초과하는 UMF 등급을 가지는 활성이거나 치료용인 마누카 꿀이다. 꿀은 병원성 박테리아와 같은 박테리아의 성장 또는 확산을 억제하는 데에 효과적인 양으로 본 발명의 조성물 및 재료에 존재한다. 대표적인 박테리아에는 에스. 아우레우스(*S. aureus*) (메타실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA) 포함), 피. 진지발리스(*P. gingivalis*), 에스. 에피테르미디스(*S. epidermidis*), 엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 이. 콜리(*E. coli*), 피. 아에루지노사(*P. aeruginosa*), 이. 클로아카에(*E. cloacae*) 및 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)가 포함된다. 또한, 메밀 꿀은 치유 유효량으로 포함될 수 있다.

[0103] 사용될 꿀의 양은 부분적으로 본 발명의 조성물을 사용하여 치료될 상처 또는 손상의 특성; 억제될 박테리아의 유형; 꿀의 농도; 및 사용되는 구체적인 꿀의 항박테리아 특성에 따라 달라진다. 꿀의 항박테리아, 항미생물 및 살박테리아 특성은 메틸글리옥살 (MGO)의 농도, 고유 마누카 계수(Unique Manuka Factor) (UMF), 꿀 중 추가적인 폐놀계 화합물의 존재, 상처 pH, 꿀 pH, 및 꿀에 의해 가해지는 삼투압을 포함한 다양한 인자들에 따라 달라진다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면, 일상적인 것을 넘지 않는 실험을 사용하여 본 발명의 조성물에 사용하기에 적합한 꿀의 유형 및 양을 선택할 수 있을 것이다. 소정 실시양태에서, 꿀의 양은 생분해성 중합체의 중량을 기준으로 1 중량부 내지 15 중량부 (1-15 중량%)이다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 100 중량부의 생분해성 중합체 및 약 1 중량부 내지 약 15 중량부의 꿀을 포함한다. 조성물은 10-20 중량부의 충전제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본원에서 기술되는 바와 같이, 추가적인 화합물 또는 작용제가 존재할 수도 있다.

[0105] 바람직한 실시양태에서, 조성물은 또한 치료적 유효량의 꿀을 포함한다. 예를 들면, 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 50 중량부 내지 약 300 중량부, 또는 약 100 중량부 내지 약 200 중량부의 범위인 항박테리아-유효량의 꿀이 조성물에 첨가된다. 또한, 재생 (세포 증식 및 이동)을 자극하거나 강화하기 위한 추가량의 꿀이 조성물에 첨가되는데, 생분해성 중합체 100 중량부 대비 약 10 중량부 내지 약 100 중량부, 약 20 중량부 내지 약 70 중량부, 또는 특히 약 50 중량부의 범위이다.

[0106] 조성물의 제조 방법

[0107] 생분해성 중합체, 충전제 및 꿀을 포함하는 조성물은 어떠한 적합한 방법에 의해서도 제조될 수 있는데, 그 중 일부는 관련 기술분야에 알려져 있다. 일반적으로, 충전제가 용매 (충전제를 실질적으로 용해시키지는 않게 됨)에 현탁되거나 분산됨으로써, 분산액 또는 현탁액이 형성될 수 있으며; 이후 생분해성 중합체 및 꿀이 상기 분산액 또는 현탁액과 혼합됨으로써, 본 발명의 조성물이 형성된다. 소정 실시양태에서는, 항박테리아 효과 또는 재생의 강화를 위하여 치료적 유효량의 꿀이 추가적으로 조성물에 첨가된다. 소정 실시양태에서, 상기 용매는 2,2,2-트리플루오로에탄올, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (HFP) 또는 9:1 아세트산:물이다. 섬유 및 멤브레인으로의 조성물의 전기방적 또는 다른 처리를 촉진하기 위하여, 사용되는 용매의 양은 최소화되어야 한다.

[0108] 섬유 및 멤브레인의 제조 방법

[0109] 생분해성 중합체, 충전제, 및 항박테리아-유효량의 꿀을 포함하는 조성물은 임의의 적합한 방법에 의해 섬유 및 멤브레인을 제조하는 데에 사용될 수 있는데, 그 중 일부는 관련 기술분야에 알려져 있다. 일 실시양태에서, 섬유 또는 멤브레인은 전기방적에 의해 형성된다. 전기방적은 알려져 있는 기술이며 (예컨대 문헌 [Li et al., Biomaterials. 2005 Oct;26(30):5999-6008.] 참조), 전기방적 장치는 시중에서 구매할 수 있다. 예를 들면, 예컨대 생분해성 중합체를 포함하는 하전된 용액이 소형 개구부 또는 노즐 (보통 바늘 또는 피펫 팁)을 통하여

공급된다. 그의 전하로 인하여, 용액은 분사물로서 통상적으로 5-30 cm 떨어져 있는 접지된 수집 플레이트, 예컨대 금속 스크린, 플레이트 또는 회전 맨드릴을 향하여 취출된다. 분사물의 이동 동안, 용매는 점차적으로 증발되며, 하전된 섬유가 남아 접지된 표적상에 축적된다. 섬유상 전하는 결국 주위 환경으로 소산된다. 표적이 노즐 위치와 관련하여 이동하는 것이 가능할 경우, 특정 섬유 배향 (정렬 또는 무작위)이 달성될 수 있다.

- [0110] 본 발명의 조성물은 전기방직 섬유 조성물로 제조될 수 있다.
- [0111] 일 실시양태에서, 본 발명은 멤브레인의 제조 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0112] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0113] b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하여 조성물을 형성시키는 단계; 및
- [0114] c) 상기 조성물을 전기방직하여 섬유를 형성시킴으로써, 생분해성 중합체, 충전재, 및 항박테리아-유효량의 꿀을 포함하는 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0115] 소정 실시양태에서는, 단계 a)가 생략될 수 있고 생분해성 중합체 및 꿀이 용매와 조합되어 조성물을 형성할 수 있도록, 상기 조성물에 충전재가 첨가된다.
- [0116] 상기 방법은 전기방직 전에 적어도 1종의 추가적인 충전재, 적어도 1종의 치료제, 또는 치료적 유효량의 꿀을 조성물에 첨가하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 전기방직된 멤브레인은 다중 층으로 형성될 수 있다. 예를 들면, 다중-층 전기방직 멤브레인을 생성시키기 위하여, 상기 조성물은 하나의 층 또는 다른 층들의 상부에 추가적으로 전기방직될 수 있다.
- [0117] 또 다른 실시양태에서는, 생분해성 중합체, 충전재, 및 항박테리아-유효량의 꿀을 포함하는 분산액으로부터 용매가 제거됨으로써, 스펀지가 형성될 수 있다. 용매는 증발 또는 동결건조 (냉동-건조)에 의해 제거될 수 있다. 이에 따라 일 실시양태에서, 본 발명은 멤브레인의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0118] a) 충전재를 용매 중에 분산시켜 분산액을 형성시키는 단계;
- [0119] b) 생분해성 중합체 및 꿀을 상기 분산액과 조합하는 단계;
- [0120] c) 분산액으로부터 용매를 제거하여 스펀지를 형성시키는 단계; 및
- [0121] d) 상기 스펀지를 압축하여 생분해성 중합체, 충전재, 및 항박테리아-유효량의 꿀을 포함하는 멤브레인을 형성시키는 단계.
- [0122] 소정 실시양태에서는, 단계 a)가 생략될 수 있고 생분해성 중합체 및 꿀이 용매와 조합되어 조성물을 형성할 수 있도록, 상기 조성물에 충전재가 첨가된다.
- [0123] 상기 방법은 적어도 1종의 추가적인 충전재, 적어도 1종의 치료제, 또는 치료적 유효량의 꿀을 조성물에 첨가하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0124] 문맥상, 본원에서 "멤브레인"이라는 용어가 본원에서 기술되는 바와 같은 전기방직 매트/멤브레인 중 어느 하나의 압축 또는 스펀지 압축 후의 생성물을 지칭하는 데에 사용된다는 것은 알고 있을 것이다. 이에 따라, 본원에서 "멤브레인"에는 (문맥상 분명하게 다르지 않은 한) 압축된 섬유 및 압축된 스펀지 모두가 포함된다.
- [0125] 상기 스펀지는 압축 전에 동결건조될 수 있다.
- [0126] 소정 실시양태에서, 스펀지 (동결건조 또는 비-동결건조)는 적합하게는 예를 들면 꿀 이식 적용분야에 따른 그의 적용분야를 기준으로, 압축 전에 블록 또는 미립자 또는 마쇄된 형태로 처리될 수 있다.
- [0127] 대안적으로, 압축된 스펀지, 섬유 또는 멤브레인은 적합하게는 꿀 이식 적용분야에 따른 압축 후, 블록 또는 미립자 또는 마쇄된 형태로 처리될 수 있다.
- [0128] 대안적으로, 스펀지는 압축되지 않거나, 또는 팽창 잠재력만을 제공하도록 더 적은 압력 또는 실질적으로 덜한 압력을 사용하여 예컨대 손으로 압축된다.
- [0129] 다중-층 멤브레인은 적어도 2개의 멤브레인들을 부착시키는 단계에 의해 형성될 수 있다.
- [0130] 소정 실시양태에서, 다중-층 멤브레인은 다수의 스펀지 층들을 압축하는 단계에 의해 형성된다. 구체적인 실시양태에서, 다중-층 멤브레인은 다수의 해당 층들을 압축하는 단계에 의해 다수의 동결건조된 스펀지들로부터 형

성된다. 다중-층 멤브레인은 압축될 수 있거나, 또는 압축되지 않을 수 있다. 예를 들면, 다중-층 멤브레인은 본원에서 기술되는 방법들 중 어느 것에 의해 형성되는 다수의 멤브레인 층들을 압축하는 단계에 의해 형성될 수 있다. 일반적으로, 4,000-24,000 파운드의 압력으로의 2개 표면들 (예컨대 수압 프레스 중 예컨대 스테인리스강 플레이트 또는 블록들) 사이에서의 2-10개 멤브레인 (더욱 바람직하게는 2-4개 멤브레인)의 압축이 일반적으로 다중-층 멤브레인을 형성하는 멤브레인들의 압축 결합을 초래하게 된다.

[0131] 대안적으로, 다중-층 멤브레인은 다수의 용매를 사용하여 형성될 수 있다. 소정 실시양태에서는, 충전재를 용해시키고 다른 성분들 (예컨대 생분해성 중합체 및 꿀)을 조합하는 데에 상이한 밀도를 가지는 적어도 2종 이상의 용매가 사용된다. 예를 들면, 조성물로부터 제조된 용액과 상이한 용매들이 조합된 후, 조합된 용액이 용매의 밀도를 바탕으로 구별되는 층들을 형성할 수 있다. 용매를 제거한 후에는, 다중-층화된 스펀지 및 다중-층화된 멤브레인이 제조될 수 있다. 상기 다중-층 멤브레인은 압축될 수 있거나, 또는 압축되지 않을 수 있다.

[0132] 멤브레인들은 가교-결합 반응물을 사용하여 가교-결합될 수 있다. 이에 따라, 소정 실시양태에서, 본 발명은 적어도 2개의 층을 가지며 상기 적어도 2개의 층이 예를 들면 다중-층화된 멤브레인 구조를 안정화하기 위하여 가교결합되어 있는 다중-층 멤브레인을 제공한다. 대표적인 가교-결합 반응물에는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (또는 다른 카르보디이미드), 제니핀 또는 글루타르알데히드가 포함된다. 멤브레인들은 에탄올과 같은 용매 중 가교-결합제 (예컨대 20-40 mM)의 용액에 침지될 수 있다. 원하는 양의 가교-결합이 이루어진 경우, 멤브레인들은 용액으로부터 제거되어 사용 전에 세정될 수 있다.

[0133] 본 발명의 치료 방법에 사용하기 위한 멤브레인은 주변 연부 조직을 지지하기에 충분한 강성을 가지고, 그의 유리 전이 온도 (Tg)에서는 가단성(malleable)이나 냉각시에는 강성을 회복하며 (즉 제자리에서 형성된 형상을 유지함), 그것이 골유착(osseointegration)을 촉진하고 주변 연부 조직에 부정적인 영향을 주지는 않게 된다는 점에서 생체적합성이어야 한다. 상기 멤브레인은 6-9개월 이내에 흡수되어야 하는데, 하악 및 상악 골 이식편 수술에서 동종이식 골이 새로운 골로 굳어지는 데에 대략 6개월이 걸리기 때문이다. 본 발명의 멤브레인은 가요성이며, 가열시 성형가능하고, 냉각시 그의 형상을 유지하며, 분해 동안 덜 산성이고, 섬유질인 구조가 대식세포 (MAC) 반응을 조절하여 골 및 조직 (M2 MAC 표현형) 대 염증 (M1 MAC 표현형)의 재생을 가능케 하게 된다.

[0134] 본 발명 멤브레인의 크기 및 두께는 예정된 용도에 따라 달라질 수 있다. 멤브레인은 원하는 크기로 방적될 수 있거나, 또는 원하는 크기로 스펀지가 캐스팅된 후, 이어서 원하는 밀도 및 두께로 압축될 수 있다. 예를 들어, 장벽 멤브레인은 통상적으로 두께가 0.1-0.4 mm 사이이므로, 스펀지는 적합하게는 약 0.1-0.4 mm의 두께로 압축될 수 있다.

[0135] 멤브레인은 임의의 형상 (원형, 정사각형, 직사각형, 불규칙)을 가질 수 있다. 대표적인 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 1 내지 20 mm의 너비 및 1 내지 20 mm의 길이를 가진다. 소정 실시양태에서, 멤브레인은 두께 1 mm 미만, 두께 0.5 mm 미만, 두께 0.3 mm 미만, 또는 두께 100 마이크로미터 미만이다.

[0136] 소정 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 적어도 90 %, 100 %, 110 % 또는 120 %의 파단 변형률(strain at break)을 가진다. 소정 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 적어도 약 5 mPa, 또는 10, 15, 20 또는 25 mPa의 탄성 모듈러스를 가진다. 소정 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 적어도 약 0.26 N의 최대 압축 부하를 가진다.

[0137] 치료 및 예방적 적용

[0138] 본 발명은 골 또는 연부 조직 질환 또는 손상과 연관되어 있는 이상을 개선하는 데에 유용한 재료의 즉석 공급을 제공한다. 본 발명의 조성물 및 재료는 손상되거나 질환에 걸린 조직 또는 기관에 투여 (예컨대 직접적인 것 또는 간접적인 것)되어, 거기에 이식됨으로써, 표적 조직 (예컨대 골, 근육, 치은, 잇몸, 점막, 피부)과의 기능적 연결을 확립한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 골 치유를 강화한다. 손상된 조직 또는 기관의 복구 방법은 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외 중 어느 하나에서 수행될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 멤브레인은 치과 적용분야, 예컨대 하악 및 상악 골 이식 수술에서 사용된다.

[0139] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 골 재생의 촉진 방법을 제공하며, 상기 방법은 골 표면을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 실시양태에서, 상기 방법은 소켓 보존(socket preservation), 용선 확대, 굴(sinus) 이식 또는 골 이식을 포함한 골에서의 수술 절차 후의 골 재생의 촉진 방법이다.

[0140] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 골 결손 치유의 촉진 방법을 제공하며, 상기 방법은 골 결손을 본 발명의 조성물, 섬유, 압축 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비

-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0141] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 골 결손의 감염 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 골 결손을 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0142] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 손상된 조직에서의 연부 조직 치유의 촉진 방법을 제공하며, 상기 방법은 손상된 조직을 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0143] 상기 측면의 소정 실시양태에서, 상기 방법은 소켓 보존, 용선 확대, 굴 이식 또는 굴 이식을 포함한 굴에서의 수술 절차 후의 골 재생의 촉진 방법이다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 조직에서의 대식세포 반응의 촉진 방법을 제공하며, 상기 방법은 조직을 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인, 미립자, 팽창성 멤브레인, 비-압축 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 (압축 또는 비-압축)과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0145] **투여**

[0146] 본 발명의 조성물, 섬유 및 멤브레인은 직접적으로 해당 조직 또는 기관에 제공될 수 있다 (예컨대 골 또는 조직 표면에서의 직접적인 적용, 또는 수술 이식에 의함). 멤브레인은 골 또는 조직 결함, 상처, 피부/상처 치유, 잇몸 퇴축 또는 수술 부위를 덮거나, 둘러싸거나, 충전하거나, 또는 달리 그와 접촉하도록 적용될 수 있다. 원할 경우, 대상체 골 또는 임의 유형의 골 이식 재료/이식물, 즉 동종이거나, 이종이거나, 이물성형성이거나, 또는 유전학적으로 제조된 골로부터의 골 세포를 포함한 생체 내 세포의 생성 또는 분화를 증가시키거나, 유지하거나 또는 증진하도록, 상기 조성물, 섬유 또는 멤브레인의 투여 전, 동안 또는 후에 확대 및 분화 작용제가 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물에는 제약 조성물이 포함된다. 본 발명의 치료 조성물 또는 재료 (예컨대 제약 조성물)를 투여할 때, 그것은 일반적으로 단위 투약 형태로 제제화되게 된다. 추가적인 치료제는 섬유에 적용되거나, 또는 제작 동안 섬유 내에 도입될 수 있다.

[0147] **제제**

[0148] 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인은 멸균 제제로 편리하게 제공될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 액체, 액체 현탁액, 젤, 점성 조성물, 또는 고체 조성물로 제공된다. 액체, 젤 및 점성 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 점성 조성물은 적절한 점성 범위 내로 제제화됨으로써, 특정 조직과의 더 긴 접촉 기간을 제공할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 담체를 포함할 수 있으며, 그것은 예를 들면, 물, 식염수, 포스페이티드 완충 식염수, 폴리올 (예를 들면 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다.

[0149] 멸균 주사가능 용액은 원하는 만큼 세포 (예컨대 배아 줄기 세포, 뉴런 전구체(neuronal progenitor), 분화된 뉴런)를 도입하는 것에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과의 혼합물로 존재할 수 있다. 조성물은 원하는 투여 및 제조 경로에 따라 습윤제, 분산제 또는 에멀션화제 (예컨대 메틸셀룰로스), pH 완충제, 젤화 또는 점도 강화 첨가제, 보존제, 향미제, 색소 등과 같은 보조 물질을 함유할 수 있다. 본원에 참조로써 개재되는 표준 교재, 예컨대 문헌 ["REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]이 과도한 실험 없이 적합한 제제를 제조하는 데에 참고될 수 있다.

[0150] 향미생물 보존제, 항산화제, 킬레이팅제 및 완충제를 포함하여, 조성물의 안정성 및 멸균성을 강화하는 다양한 첨가제들이 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아 및 항진균 작용제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 확보될 수 있다. 조성물은 등장성일 수 있는데, 다시 말하자면 그것은 혈액 및 누액과 동일한 삼투압을 가질 수 있다. 원하는 본 발명 조성물의 등장은 나트륨 클로라이드, 또는 다른 제약상 허용되는 작용제 예컨대 텍스트로스, 붕산, 나트륨 타르타레이트, 프로필렌 글리콜, 또는 다른 무기 또는 유기 용질을 사용하여 달성될 수 있다. 나트륨 이온을 함유하는 완충제에는 나트륨 클로라이드가 특히 바람직하다.

[0151] 원할 경우, 조성물의 점도는 제약상 허용되는 증점제를 사용하여 선택된 수준으로 유지될 수 있다. 메틸셀룰로스가 바람직한데, 그것이 용이하고도 경제적으로 구입가능하며, 다루기가 용이하기 때문이다. 다른 적합한 증점제에는 예를 들면 크산탄 검, 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 카르보머 등이 포함된다.

더하여, 은 염이 증점제로 사용될 수 있다. U.S. 특허 제8,367,094호; U.S. 특허 제8,173,151호; 및 U.S. 특허 제7,998,498호 (본원에 참조로써 개재됨)도 참조하라. 은 염은 조성물의 항박테리아 효과를 더 향상시키기 위하여 첨가될 수 있다. 증점제의 바람직한 농도는 선택되는 작용제에 따라 달라지게 된다. 중요한 점은 선택된 점도를 달성하게 되는 양을 사용하는 것이다. 분명히, 적합한 담체 및 기타 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로, 및 구체적인 투약 형태, 예컨대 액체 투약 형태의 특성 (예컨대 조성물이 용액, 현탁액, 젤 또는 또 다른 액체 형태, 예컨대 시간 방출 형태 또는 액체-충전 형태로 제제화되어야 하는지 여부)에 따라 달라지게 된다.

[0152] 섬유 및 멤브레인 가요성을 향상시키기 위해서는, 글리세린 또는 유사 성분들이 혼합물에 첨가될 수 있다.

[0153] 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인과 함께 전달될 수 있는 대표적인 작용제에는 항생제 (예컨대 항박테리아 은 염 포함), 진통제, 항응고제, 면역억제제가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니데, 치료 용 물질은 마취제, 수면제, 진정제, 수면 유도제, 항정신병제, 항우울제, 항알레르기제, 항협심증제, 항관절염 제, 항천식제, 항당뇨병제, 항설사 약물, 항경련제, 항통풍제, 항히스타민제, 항가려움제, 구토제, 항구토제, 항연축제, 식욕 억제제, 신경활성 물질, 신경전달 작용제, 길항제, 수용체 차단제, 재흡수 조절제, 베타-아드레날린 차단제, 칼슘 채널 차단제, 디술파람, 근육 이완제, 진통제, 해열제, 자극제, 항콜린에스테라제 작용제, 부교감신경흥분작용제, 호르몬, 항혈전제, 혈전용해제, 이뮤노글로불린, 호르몬 작용제, 호르몬 길항제, 비타민, 항신생물제, 제산제, 소화제, 완하제, 설사제, 방부제, 이노제, 소독제, 살진균제, 살외부기생충제, 항 기생충제, 중금속, 중금속 길항제, 킬레이팅제, 알칼로이드, 염, 이온, 오토코이드, 디지탈리스, 심장 글리코시 드, 항부정맥제, 항고혈압제, 혈관확장제, 혈관수축제, 항무스카린제, 신경절 자극제, 신경절 차단제, 신경근 차단제, 아드레날린 신경 억제제, 항-산화제, 항-염증제, 상처 관리 생성물, 항종양제, 항혈관생성제, 항원 작 용제, 상처 치유제, 식물 추출물, 성장 인자, 성장 호르몬, 시토카인, 이뮤노글로불린, 완화제, 보습제, 항-거 부 약물, 살정자제, 컨디셔너, 항박테리아제, 항진균제, 항바이러스제, 신경안정제, 콜레스테롤-감소 약물, 진 해제, 히스타민-차단 약물 및 모노아민 옥시다제 억제제로 구성되는 군에서 선택된다. 다른 작용제로는 액티빈 A, 아드레노메둘린, 산성 FGF, 염기성 섬유모세포 성장 인자, 안지오텐신, 안지오프이오텐-1, 안지오프이오텐-2, 안지오프이오텐-3, 안지오프이오텐-4, 안지오프이오텐-5, 안지오프이오텐-6, 안지오프이오텐-7, 안지오프이오텐-8, 안지오프이오텐-9, 안지오프이오텐-10, 안지오프이오텐-11, 안지오프이오텐-12, 안지오프이오텐-13, 안지오프이오텐-14, 안지오프이오텐-15, 안지오프이오텐-16, 안지오프이오텐-17, 안지오프이오텐-18, 안지오프이오텐-19, 안지오프이오텐-20, 안지오프이오텐-21, 안지오프이오텐-22, 안지오프이오텐-23, 안지오프이오텐-24, 안지오프이오텐-25, 안지오프이오텐-26, 안지오프이오텐-27, 안지오프이오텐-28, 안지오프이오텐-29, 안지오프이오텐-30, 안지오프이오텐-31, 안지오프이오텐-32, 안지오프이오텐-33, 안지오프이오텐-34, 안지오프이오텐-35, 안지오프이오텐-36, 안지오프이오텐-37, 안지오프이오텐-38, 안지오프이오텐-39, 안지오프이오텐-40, 안지오프이오텐-41, 안지오프이오텐-42, 안지오프이오텐-43, 안지오프이오텐-44, 안지오프이오텐-45, 안지오프이오텐-46, 안지오프이오텐-47, 안지오프이오텐-48, 안지오프이오텐-49, 안지오프이오텐-50, 안지오프이오텐-51, 안지오프이오텐-52, 안지오프이오텐-53, 안지오프이오텐-54, 안지오프이오텐-55, 안지오프이오텐-56, 안지오프이오텐-57, 안지오프이오텐-58, 안지오프이오텐-59, 안지오프이오텐-60, 안지오프이오텐-61, 안지오프이오텐-62, 안지오프이오텐-63, 안지오프이오텐-64, 안지오프이오텐-65, 안지오프이오텐-66, 안지오프이오텐-67, 안지오프이오텐-68, 안지오프이오텐-69, 안지오프이오텐-70, 안지오프이오텐-71, 안지오프이오텐-72, 안지오프이오텐-73, 안지오프이오텐-74, 안지오프이오텐-75, 안지오프이오텐-76, 안지오프이오텐-77, 안지오프이오텐-78, 안지오프이오텐-79, 안지오프이오텐-80, 안지오프이오텐-81, 안지오프이오텐-82, 안지오프이오텐-83, 안지오프이오텐-84, 안지오프이오텐-85, 안지오프이오텐-86, 안지오프이오텐-87, 안지오프이오텐-88, 안지오프이오텐-89, 안지오프이오텐-90, 안지오프이오텐-91, 안지오프이오텐-92, 안지오프이오텐-93, 안지오프이오텐-94, 안지오프이오텐-95, 안지오프이오텐-96, 안지오프이오텐-97, 안지오프이오텐-98, 안지오프이오텐-99, 안지오프이오텐-100, 안지오프이오텐-101, 안지오프이오텐-102, 안지오프이오텐-103, 안지오프이오텐-104, 안지오프이오텐-105, 안지오프이오텐-106, 안지오프이오텐-107, 안지오프이오텐-108, 안지오프이오텐-109, 안지오프이오텐-110, 안지오프이오텐-111, 안지오프이오텐-112, 안지오프이오텐-113, 안지오프이오텐-114, 안지오프이오텐-115, 안지오프이오텐-116, 안지오프이오텐-117, 안지오프이오텐-118, 안지오프이오텐-119, 안지오프이오텐-120, 안지오프이오텐-121, 안지오프이오텐-122, 안지오프이오텐-123, 안지오프이오텐-124, 안지오프이오텐-125, 안지오프이오텐-126, 안지오프이오텐-127, 안지오프이오텐-128, 안지오프이오텐-129, 안지오프이오텐-130, 안지오프이오텐-131, 안지오프이오텐-132, 안지오프이오텐-133, 안지오프이오텐-134, 안지오프이오텐-135, 안지오프이오텐-136, 안지오프이오텐-137, 안지오프이오텐-138, 안지오프이오텐-139, 안지오프이오텐-140, 안지오프이오텐-141, 안지오프이오텐-142, 안지오프이오텐-143, 안지오프이오텐-144, 안지오프이오텐-145, 안지오프이오텐-146, 안지오프이오텐-147, 안지오프이오텐-148, 안지오프이오텐-149, 안지오프이오텐-150, 안지오프이오텐-151, 안지오프이오텐-152, 안지오프이오텐-153, 안지오프이오텐-154, 안지오프이오텐-155, 안지오프이오텐-156, 안지오프이오텐-157, 안지오프이오텐-158, 안지오프이오텐-159, 안지오프이오텐-160, 안지오프이오텐-161, 안지오프이오텐-162, 안지오프이오텐-163, 안지오프이오텐-164, 안지오프이오텐-165, 안지오프이오텐-166, 안지오프이오텐-167, 안지오프이오텐-168, 안지오프이오텐-169, 안지오프이오텐-170, 안지오프이오텐-171, 안지오프이오텐-172, 안지오프이오텐-173, 안지오프이오텐-174, 안지오프이오텐-175, 안지오프이오텐-176, 안지오프이오텐-177, 안지오프이오텐-178, 안지오프이오텐-179, 안지오프이오텐-180, 안지오프이오텐-181, 안지오프이오텐-182, 안지오프이오텐-183, 안지오프이오텐-184, 안지오프이오텐-185, 안지오프이오텐-186, 안지오프이오텐-187, 안지오프이오텐-188, 안지오프이오텐-189, 안지오프이오텐-190, 안지오프이오텐-191, 안지오프이오텐-192, 안지오프이오텐-193, 안지오프이오텐-194, 안지오프이오텐-195, 안지오프이오텐-196, 안지오프이오텐-197, 안지오프이오텐-198, 안지오프이오텐-199, 안지오프이오텐-200, 안지오프이오텐-201, 안지오프이오텐-202, 안지오프이오텐-203, 안지오프이오텐-204, 안지오프이오텐-205, 안지오프이오텐-206, 안지오프이오텐-207, 안지오프이오텐-208, 안지오프이오텐-209, 안지오프이오텐-210, 안지오프이오텐-211, 안지오프이오텐-212, 안지오프이오텐-213, 안지오프이오텐-214, 안지오프이오텐-215, 안지오프이오텐-216, 안지오프이오텐-217, 안지오프이오텐-218, 안지오프이오텐-219, 안지오프이오텐-220, 안지오프이오텐-221, 안지오프이오텐-222, 안지오프이오텐-223, 안지오프이오텐-224, 안지오프이오텐-225, 안지오프이오텐-226, 안지오프이오텐-227, 안지오프이오텐-228, 안지오프이오텐-229, 안지오프이오텐-230, 안지오프이오텐-231, 안지오프이오텐-232, 안지오프이오텐-233, 안지오프이오텐-234, 안지오프이오텐-235, 안지오프이오텐-236, 안지오프이오텐-237, 안지오프이

[0154] 관련 기술분야 통상의 기술자라면, 조성물의 중합체 성분이 화학적으로 불활성이어서 본 발명에서 기술되는 바와 같은 세포의 생존력 또는 효능에 영향을 주지 않게 되도록 선택되어야 한다는 것을 알고 있을 것이다. 화학 및 제약 원리 기술자라면, 이는 문제가 되지 않을 것인 바, 아니면 표준 교재의 참조, 또는 그의 개시내용 및 거기에서 인용되는 문헌에 나오는 간단한 실험에 의해 (과도한 실험을 포함하지 않음) 문제가 용이하게 회피될 수 있다.

[0155] 투약량

[0156] 본 발명의 조성물, 섬유 또는 멤브레인은 상처-치유 또는 다른 특성을 제공하는 데에 효과적인 양으로 적용되거나 이식될 수 있다. 소정 실시양태에서, 본 발명의 멤브레인은 상처 부위로의 병원성 박테리아의 침윤을 예방하는 데에 효과적인 장벽을 제공한다. 통상의 기술자라면, 본 발명의 방법에서 투여될 본 발명 조성물, 섬유 또는 멤브레인의 양을 용이하게 결정할 수 있다. 물론, 동물 또는 인간에게 투여될 임의의 조성물, 그리고 임의의 구체적인 투여 방법에 따라 하기를 측정하는 것이 바람직하다: 예컨대 적합한 동물 모델 예컨대 마우스와 같은 설치류에서 치사 투여량 (LD) 및 LD₅₀을 측정하는 것에 의한 독성; 및 적합한 반응을 도출하는 조성물(들)의 투여량, 그 안의 성분 농도 및 조성물(들)의 투여 시점. 그와 같은 측정들은 통상 기술자의 지식, 본 개시

및 본원에서 인용되는 문헌으로 볼 때, 과도한 실험을 필요로 하지 않는다. 또한, 순차적 투여를 위한 시점도 과도한 실험 없이 확인될 수 있다.

[0157] 전달 방법

[0158] 본 발명의 조성물 (예컨대 세포를 포함하는 스캐폴드)은 직접적으로 해당 조직 또는 기관, 예컨대 손상 또는 질환에 의해 손상된 조직에 제공될 수 있다 (예컨대 중추 또는 말초 신경계로의 투여에 의한). 조성물은 다양한 투여 경로에 의해 그를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 일반적으로 말하자면, 투여 방법은 임상적으로 허용되지 않는 부정적인 효과를 야기하지 않으면서 효과적인 수준의 활성 화합물을 생성시키는 임의의 양식을 의미하는 의학적으로 허용되는 임의의 투여 양식을 사용하여 실시될 수 있다. 그와 같은 투여 양식에는 수술적 이식 또는 주사 (예컨대 근육내, 심장-내, 안구내, 뇌실내)가 포함된다.

[0159] 키트

[0160] 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인은 추가적인 반응물과 함께 키트로써 공급될 수 있다. 상기 키트는 재료 (예컨대 멤브레인)의 준비를 위한 지침, 치료 처방계획, 반응물 및 장비 (시험관, 반응 용기, 바늘, 주사기 등)를 포함할 수 있다. 표지 또는 별도 삽입물의 형태로 본 발명에 따라 키트 중에 제공되는 상기 지침은 적합한 작동 파라미터들에 관한 것일 수 있다.

[0161] 일 실시양태에서, 본 발명의 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인은 골 또는 연부 조직의 손상 또는 질환의 치료 또는 예방에 유용하다. 본 발명은 그와 같은 손상 또는 질환, 및/또는 세포의 상실, 또는 조직 구조, 기능 또는 활성의 상실을 특징으로 하는 그의 증상을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 치료적 유효량의 본원에서 기술되는 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인을 대상체 (예컨대 인간과 같은 포유동물)에게 투여하는 단계를 포함한다. 이에 따라, 일 실시양태는 세포의 상실, 또는 조직 구조, 기능 또는 활성의 상실을 특징으로 하는 질환, 이상 또는 장애에 걸려 있거나 거기에 민감성인 대상체의 치료 방법이다. 상기 방법은 질환, 이상 또는 장애, 또는 그 증상이 치료되도록 하는 조건하에서 질환, 이상 또는 장애, 또는 그 증상을 치료하기에 충분한 치료량으로 본원의 세포의 상실, 또는 조직 구조, 기능 또는 활성의 상실을 특징으로 하는 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0162] 본원의 방법은 유효량의 본원에서 기술되는 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인을 대상체 (해당 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 대상체 포함)에게 투여함으로써 그와 같은 효과를 산출하는 단계를 포함한다. 해당 치료를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것은 대상체 또는 건강 관리 전문가의 판단에 속할 수 있으며, 주관적이거나 (예컨대 의견) 또는 객관적 (예컨대 시험 또는 진단 방법에 의해 측정가능)일 수 있다.

[0163] 본 발명의 치료 방법 (예방적 치료 포함)은 일반적으로 포유동물, 특히 인간을 포함한 그를 필요로 하는 대상체 (예컨대 동물, 인간)에 대한 본원 조성물, 예컨대 본원에서 기술되는 조성물, 섬유, 멤브레인 또는 다중-층 멤브레인 치료적 유효량의 투여를 포함한다. 그와 같은 치료는 적합하게는 질환, 장애 또는 그 증상에 걸려 있거나, 그것을 보유하거나, 그에 대해 민감성이거나, 또는 그의 위험성이 있는 대상체, 특히 인간에게 투여되게 된다. "위험성이 있는" 대상체의 결정은 진단 시험, 또는 대상체 또는 건강 관리 제공자의 의견에 따른 (예컨대 유전자 시험, 효소 또는 단백질 마커, 마커 (본원에서 정의되는 바와 같은 것), 가족 이력 등) 객관적이거나 주관적인 결정에 의해 이루어질 수 있다.

[0164] 본 발명의 검정, 스크리닝 및 치료 방법을 실행하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 관련 기술분야 통상의 기술자에게 제공하기 위하여 하기의 실시예를 제시하는 바, 본 발명자들이 해당 발명으로 간주하는 것의 영역을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0165] [실시예]

[0166] 실시예 1. 섬유 및 멤브레인의 제조

[0167] 본 연구의 목적은 6-12주 이내에 분해됨으로써 이식편의 유지를 가능케 하면서도 상부 조직의 더 빠른 봉합을 촉진하는, 항박테리아 및 재생 특성을 가지는 멤브레인을 조작하는 것이었다. 이를 달성하기 위하여, 전기방적 젤라틴 + 키틴 휘스커 (CW) + 꿀 멤브레인을 제조하고, 이어서 압축하였다. 압축된 멤브레인은 증가된 취급성을 가지며, 다공성이 덜하고, 비-압축 섬유 직경을 유지한다. 덜 다공성인 스캐폴드는 조직 봉합을 위한 유도 재생(guided regeneration)을 제공하는 본 적용분야에 바람직하다. 또한, 더 큰 섬유 및 꿀 (특성상 항미생물임)의 첨가는 독립적으로 전구-재생 반응을 강화할 수 있는 것으로 기록되어 있다. 키틴 휘스커 (CW)는 떠오르는 신규 충전제로써, 합성 및 천연 중합체 구조 모두를 보강하는 것으로 밝혀진 바 있다. 우수한 생체적합성

및 생분해성 역시 그것이 가장 유망한 충전재 중 하나게 되게 한다.

[0168] 일부 실험에서, 젤라틴을 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (HFP) 또는 9:1 아세트산:탈이온 (DI)수에 용해시키고, 메디허니(MEDIHONEY)® 또는 마누카가드(MANUKAGARD)® (0-50 중량%)와 함께 전기방적하였다. 용매로서 HFP 또는 아세트산:DI수를 사용한 전기방적은 각각 마이크로미터- 및 나노-크기의 섬유를 포함하는 스캐폴드로 이어졌다. 수압 프레스를 사용하여 멤브레인 (25 mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드를 사용하여 가교결합된 것 및 가교-결합되지 않은 것)을 압축하였다 (1개 층 또는 다수의 층). 압축된 멤브레인은 증가된 취급성을 가지며, 다공성이 덜하고, 비-압축 섬유 직경을 유지한다. 덜 다공성인 스캐폴드는 조직 봉합을 위한 유도 재생을 제공하는 본 적용분야에 바람직하다. 또한, 더 큰 섬유 및 꿀 (특정상 항미생물임)의 첨가는 독립적으로 전구-재생 반응을 증진할 수 있는 것으로 기록되어 있다. 본 연구는 추가적으로 복합 멤브레인상에 접종된 인간 진피 섬유모세포의 재생 반응을 분석할 것이다.

[0169] 재료 및 방법

[0170] 미미한 변형을 가한 듀프레스법(Dufresne's method) (문헌 [Ji, Y-L, *et al. Carbohydrate Polymers*, 87, 2313-2319, 2012])에 따라 CW를 제조하였다. 원하는 양의 CW (젤라틴의 15 중량%)를 초음파처리기에 의해 2,2,2-트리플루오로에탄올 (TFE)에 재분산시켰다. 젤라틴 (유형 B)을 140 mg/mL로 CW 용액에 첨가하였다. 다음에, 메디허니® (100 % 활성 렙토스페르뮴 꿀)를 젤라틴의 0, 5, 10 중량%로 젤라틴 + CW 용액에 첨가하였다. 용액을 혼합하고, 37 °C에서 밤새 인큐베이션함으로써, 모든 성분들의 완전한 용해/혼합을 확보하였다. 용액을 5 mL 주사기에 적재하고, 하기의 파라미터들을 사용하여 전기방적하였다: 5 mL/시간, +22 kV, 및 5 인치의 공기 간극 거리. 1 인치 (직경) 회전 접지 스테인리스강 맨드릴에서 섬유를 수집하였다.

[0171] 스캐폴드를 압축함으로써, 향상된 기계적 완전성을 가지면서도 섬유질 나노구조를 유지하는 다층 멤브레인을 생성시켰다. 수압 프레스에서 금속 압반들 사용하여 4500 파운드로 30초 동안, 동일한 스캐폴드의 4개 층을 압축하였다. 각 스캐폴드 (0, 5, 10 중량%의 꿀)의 비-압축 및 압축 샘플들을 주사 전자 현미경 (SEM)을 사용하여 +20 kV로 영상화함으로써, 섬유 직경 및 일반적인 다공성을 관찰하였다. 압축 및 비-압축 모두에 있어서, 피브라퀀트(FibraQuant)™ 1.3 소프트웨어 (나노스캐폴드 테크놀로지스(nanoScaffold Technologies), LLC 사)를 사용하여 평균 섬유 직경 및 표준 편차를 계산하는 것에 의해, 모든 비-가교결합 스캐폴드 유형들의 섬유 직경을 추가적으로 분석하였다.

[0172] 전체 4-층 멤브레인의 가교결합은 에탄올 중 40 mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC)를 함유하는 중간 페트리 디쉬에 실온에서 21시간 동안 각 멤브레인을 위치시키는 것에 의해 달성하였다. 완료시, 멤브레인을 에탄올에 침지하고, 6 mm 디스크를 펀칭하여 세포 연구에 사용하였다.

[0173] 기계적 시험에는 견-골(dog-bone) 펀칭물 (최고 좁은 지점에서의 2.71 mm 너비와 18.63 mm의 길이)을 사용하였다. 단축 인장 시험은 100 N 로드 셀(cell), 1 mm/초의 연장 속도 및 7.7 mm의 개시 그림간 거리를 사용하여 견-골 샘플 (n=3)에서 수행하였다. 탄성 모듈러스 및 파단 변형률은 응력-변형률 결과로부터 계산하였다.

[0174] 멤브레인의 임상 적응성/성형성(adaptability/formability)은 건조 및 수화 (30분 동안 0.9 % NaCl) 조건 양자하에서 구강 외과에 의해 점수화하였다. 콜라플러그(COLLAPLUG)® 콜라겐 멤브레인 (zimmer 덴탈(Zimmer Dental) 사)을 대조로 사용하였는데, 그것이 소켓 보존 수술의 현행 멤브레인 장벽 표준들 중 하나이기 때문이다.

[0175] 세포 생존력 (DAPI)

[0176] 압축 멤브레인의 6 mm 펀칭물을 30분 에탄올 침지를 통한 가교결합 후 이어지는 3회의 10분 PBS 세척 후, 바로 소독하였다. 인간 진피 섬유모세포 (HDF)를 96 웰 플레이트에서 5,000 세포/웰로 스캐폴드 펀칭물 (n=3)상에 접종하였다. 연구를 1, 3 및 7일의 시점으로 7일에 걸쳐 완료하였다. 매 시점에 배지 교체를 수행하였다. 각 시점 후, 세포화된(cellularized) 스캐폴드를 10 % 완충 포르말린 중에 고정시켰다. 다음에, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 세포 핵 염색을 수행하였다. 생존 세포들을 가시화하기 위하여, 올림푸스(Olympus) 형광 현미경을 사용하여 스캐폴드를 영상화하였다.

[0177] 결과, 논의 및 결론

[0178] 비-압축 및 압축 전기방적 젤라틴 + 15 % CW + 꿀 스캐폴드 (비-가교결합)의 SEM 이미지들을 도 1에 나타내었다. 섬유 크기 분포는 도 2에 나타내었다. 도 3은 파단 변형률 (3A) 및 탄성 모듈러스 (3B) 측정치를 나타낸다.

[0179] 적응성/성형성

[0180] 하기 표 1은 가변량의 꿀을 보유하는 건조 및 수화 멤브레인의 임상 적응성 평가를 나타낸다. 최고 멤브레인 (습윤): 0 % 및 10 % 꿀. 최악 멤브레인 (습윤): 콜라플러그 대조 (형상을 유지하지 못하였음, 적응에 어려움). 임상적 의의: 압축 멤브레인은 사용 전에 수화될 필요가 있음. 성형성은 더 적은 층 또는 더 많은 층들을 압축하는 것에 의해 조절될 수 있다 (도 4).

[0181] <표 1>

[0182] 구강 외과에 의해 점수화된 (상부) 건조 (D) 및 수화 (습윤, W) 압축 멤브레인 및 콜라플러그 대조의 임상 적응성.

	0	1	2	3	4
0% 꿀		D			W
5% 꿀		W	D		
10% 꿀	D				W
콜라플러그	W				D
척도 0 = 성형되지 못함, 부서지거나 찢겨나가는 것 중 어느 하나임 4 = 용이하게 성형될 수 있음, 취급시 구조 유지					

[0183]

[0184] 전기방적 및 압축

[0185] 도 5는 압축된 전기방적 멤브레인들의 이미지를 나타낸다. 섬유질 구조 및 치수를 유지하면서 압축이 달성되었다. 압축-후 일부 섬유 접합이 관찰되었는데, 결정화 상태의 꿀에 의한 것일 가능성이 가장 컸다. 더 많이 (건조기에서) 탈수된 스캐폴드는 더 많은 결정질 꿀 구조, 및 궁극적으로 압축시의 더 적은 비-접합 섬유를 결과하게 된다.

[0186] 기계적 시험

[0187] 90-120 % 사이 변형률에서 모든 스캐폴드가 실패하였다 (유의성 있는 차이 없음). 10 % 꿀을 함유하는 스캐폴드는 0 % 꿀에 비해 상당히 더 높은 모듈러스 값을 가졌다. 이는 처음에는 예상치 못한 것이며, 직관적으로는 더 많은 꿀이 스캐폴드가 덜 강성이 되도록 할 것이기 때문이다. 기계적 시험이 에탄올로부터 바로 수행되었기 때문에 꿀이 탈수된 (더 결정질인) 상태로 존재하였으며, 그것이 모듈러스의 증가를 야기한 것으로 가설을 세웠다. 향후 연구는 글리세린, 그리고 덜 결정질인 꿀 구조를 유도할 가능성이 가장 커서 덜 강성인 스캐폴드로 이어지게 될 PBS를 사용하여 수화된 샘플의 분석을 도입하게 될 것이다.

[0188] 세포 생존력

[0189] 각 시점에 모든 스캐폴드 표면에서 생존가능 세포 (HDF)는 가시적이었다. 시각적으로는 어떤 차이를 측정하는 것이 어려웠다. 그러나, 향후 연구는 세포 증식 및 세포 분비 재생 마커 및 세포의 매트릭스를 분석하게 될 것이다.

[0190] 실시예 2. 스펀지의 제조

[0191] 탈이온수 중 30 mg/mL 젤라틴 용액을 사용하여 스펀지를 제조하고, 37 °C로 가열함으로써, 모든 젤라틴이 용액 중에 존재하도록 하였다. 10 % CW (키틴 휘스커)를 젤라틴 용액에 첨가하고, 초음파처리하였다. 다음에, 0-30 mg/mL의 꿀을 젤라틴 + CW 용액에 첨가하였다. 꿀을 용액에 첨가한 후, 25 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC)를 젤라틴 + CW + 꿀 용액에 첨가하고, 즉시 원통형 몰드로 옮겨, -80 °C로 냉동하고, 동결건조하였다. 수압 프레스를 사용하여 30초 동안 4,500 파운드로, 건조 스펀지를 압축하였다.

[0192] 도 6은 비-압축 및 압축 젤라틴 + 10 % CW + 30 mg/mL 꿀 스펀지의 전반적인 눈에 보이는 외관의 디노라이트 (DinoLite) 이미지를 나타낸다. 비압축: 5.5 mm 두께; 압축: 0.3 mm 두께.

[0193] 스펀지는 임의의 크기 (몰드에 따라 달라짐)로 제조된 이후 압축될 수 있다.

- [0194] 미립자는 추가적인 단계를 사용하여 동결건조된 멤브레인과 유사하게 형성된다. 미립자는 동결건조된 멤브레인과의 조합으로써 사용될 수 있다. 복합 용액이 냉동된 후, 냉동된 재료는 마쇄되어 (예컨대 블렌더 사용) "쇄빙(crushed ice)"과 유사한 것을 형성할 수 있다. 다음에, 이와 같은 쇄빙은 밤새 동결건조되어 미립자를 형성한다. 미립자는 골 재생용으로 예정되기 때문에, 골전도성을 강화하기 위하여 충전재 (예컨대 히드록시아파타이트)의 농도가 증가되게 된다 (예를 들면 50 % 이상까지). 미립자의 개발 및 개선은 잘 일치되는 입자 크기를 수득하기 위하여 제조 과정을 최적화하는 것으로 구성될 수 있다. 이는 냉동된 복합재의 블렌딩을 조절하여 쇄빙을 달성하는 것에 의해, 또는 더 크게 동결건조된 조각들을 더 작은 것으로 동결분쇄하는 것 (액체 질소 중에서)에 의해 달성될 수 있다. 균일하고/정해진 미립자 크기를 수득하기 위하여, 입자 크기는 체 또는 등가의 기술을 사용하여 크기별로 여과될 수 있다. 다수의 입자 크기 달성 방법들 ("쇄빙"의 동결건조 대 더 큰 (mm-크기) 미립자의 동결분쇄)이 수행되어 미립자 크기를 최적화할 수 있다. 바람직하게는, 미립자는 약 100 μm 내지 약 10 mm, 또는 특히 약 1 mm 내지 약 5 mm 범위의 크기 또는 평균 직경을 가진다.
- [0195] 본 발명 조성물의 건조 및 수화 압축 멤브레인 모두가 사용 전에는 수화되어야 하며, 가위를 사용하여 용이하게 절단/재단될 수 있어야 하고, 큰 취급성을 가져야 한다. 수화시, 멤브레인은 더 가요성이 됨으로써, 이식시 수술 부위 내에서 용이하게 조작될 수 있다. 초기에 수화된 후에는, 콜라플러그®와 같은 기존 멤브레인에서는 취급성만이 눈에 띄는 개선이다. 겨우 수일 수화된 후, 바이오-가이드(BIO-GIDE)®과 같은 현행 천연 생분해성 멤브레인은 그의 기계적 완전성을 상실하기 시작한다.
- [0196] **실시예 3. 골 이식 적용분야용 압축 멤브레인**
- [0197] 추가적으로, 뛰어난 생체적합성 및 생분해성 역시 그것을 가장 유망한 충전재 중 하나가 되게 한다. 세포 반응 및 유도 조직 재생 (GTR)을 추가적으로 증진하기 위하여, 이러한 압축 멤브레인은 필름-유사 재료의 장점을 생체활성 표면과 조합한다. 젤라틴 + CW + MH 멤브레인은 강화된 생체적합성 및 생분해성을 나타내는데, 이는 현행 임상 제품들에 대한 대안으로서의 그의 용도를 제안한다.
- [0198] 방법 및 재료
- [0199] 스캐폴드 제조
- [0200] 30 mg/mL 젤라틴 용액을 사용하여 스캐폴드를 제조하였다. 10 % CW (젤라틴의 중량%)를 DI수에 분산시키고, 마이크로팁을 사용하여 2 % 진폭으로 30초 동안 초음파처리하였다. 다음에, 젤라틴 및 0, 5 또는 25 % MH (젤라틴의 중량%)를 37 °C에서 1시간 동안의 인큐베이션을 통하여 CW 용액 내에 가용화하였다. 균일한 용액을 달성한 후, 40 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 EDC 가교-결합제를 첨가하고, 간단하게 혼합하여, 즉시 소형 페트리 디쉬로 옮기고, -80 °C에서 밤새 냉동시켜, 동결건조하였다. 다음에, 동결건조된 스펀지를 4 mm 두께 절편으로 슬라이싱하고, 수압 프레스 (도 7)를 사용하여 4500 파운드로 30초 동안 압축함으로써, 최종 멤브레인 (300-400 μm 사이 두께)을 생성시켰다.
- [0201] 분해
- [0202] 14일에 걸쳐 각 6 mm 스캐폴드로부터의 단백질 방출을 정량하는 것에 의해, 방출 동역학을 통한 스캐폴드 분해를 연구하였다. 스캐폴드를 1× PBS 중에서 37 °C로 인큐베이션하였는데, PBS는 매 시점에 대체하였다. 1, 4, 7, 11 및 14일 후, 피어스(Pierce) BCA 단백질 검정을 사용하여 일반적인 단백질에 대해 방출물을 분석하였다. 젤라틴 및 MH는 구별할 수 없었으며, 모두 정량적 누적 평균 농도 결과에 기여하였다. 이를 설명하기 위하여, 총 개시 단백질 함량으로서의 완전히 분해된 비-가교결합 스캐폴드를 사용하여 누적 % 방출을 계산하였다: % 방출 = (방출)/(총 개시 함량)*100.
- [0203] 세포 유착
- [0204] 각 스캐폴드 유형의 6 mm 디스크를 96-웰 플레이트에 적재하였다. 현행 임상 멤브레인, 게이스트리치 바이오-가이드(GEISTLICH BIO-GIDE)® (콜라겐) 및 KLS 마틴 리소브(MARTIN RESORB)-X® (폴리락트산, PLA 필름)을 편칭하여 임상 대조로 사용하였다. 세포 접종 전에 모든 멤브레인을 소독하였다 (30분 에탄올 및 3회의 10분 PBS 세척). 20,000개의 인간 진피 섬유모세포 (HDF)를 멤브레인상에 접종하고, 14일 동안 배양하였다. 1, 7 및 14일 후, 배지를 제거하고, 냉동하면서 세포화된 멤브레인을 10 % 포르말린 중에 고정하였다. 고정된 스캐폴드를 4'-6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)을 사용하여 염색하고, 그의 세포 접종된 표면을 형광 영상화하여 세포 부착을 가시화하였다.
- [0205] 기계적 시험

[0206] 단축 압박 압축 시스템을 사용하여 수화된 무세포 스캐폴드를 분석함으로써, 최대 적재량을 측정하였다. 직사각형 (2.5×0.5 cm)을 절단하여, 단부들을 1 cm 간격으로 고정함으로써, 아치 형태로 고정하였다 (도 8). 상부 압박을 스캐폴드 표면으로 낮추고, 하기의 파라미터들을 사용하였다: 10 mm/분의 시험 속도 및 250개 샘플/초의 데이터 획득 속도. 상부 압박이 고정부에 도달할 때까지 압축을 계속하였다. 이와 같은 접촉이 이루어지기 직전에 시험을 종료하고, 스캐폴드에 의해 발휘되는 최대의 힘을 뉴턴 (N)으로 기록하였다.

[0207] 임상 적응성/성형성

[0208] 수화 후, 건조 및 수화 (30분 동안 0.9 % NaCl) 조건 양자하에서 모든 젤라틴 + CW + MH 멤브레인을 구강 외과 의에 의해 점수화하였다. KLS 마틴, 바이오-가이드 및 콜라플러그® (콜라겐 멤브레인, 짐머 덴탈 사)를 임상 대조 멤브레인으로 사용하였다.

[0209] 논의 및 결론

[0210] 스편지 및 압축

[0211] 모든 젤라틴 + CW + MH 스캐폴드가 동일한 비-압축 (다공성) 및 압축 (다공성이 덜함) 표면 구조를 나타내었으며, 스캐폴드 유형들 간에 가시적인 구별가능한 차이가 없었다 (도 9). 세포가 처음에는 스캐폴드를 전체로 이동하는 다공성 멤브레인과 비교할 때, 압축된 표면은 GTR을 위한 주형을 제공한다.

[0212] 분해

[0213] 5 % MH의 첨가는 0 % MH와 비교하여 유사한 농도 방출 프로파일로 이어졌으며, 둘 다 14일 후에는 정체기를 개시하였다 (도 10A-10B). +25 % MH 멤브레인은 14일에 걸쳐 더 선형인 방출 프로파일을 나타내었고, 이는 일정한 속도로의 분해를 시사한다. 1일 후, 0 %, +5 % 및 +25 % MH는 각각 총 개시 함량 중 17 %, 17 % 및 22 %를 방출하였다. 14일 후, 0 %, +5 % 및 플러스 25 % MH는 각각 총 개시 함량 중 44 %, 34 % 및 49 %를 방출하였다. 누적 % 방출 그래프는 흥미로운 프로파일을 나타내었는데, 5 % MH의 첨가가 스캐폴드의 분해 속도를 느리게 한다는 것을 암시하였다. 임의량의 MH 첨가는 분해 속도를 증가시킬 것으로 생각되었었기 때문에 (+25 % MH 그래프에 드러나 있음), 이는 예상치 못한 것이었다. 데이터는 다양한 농도의 MH의 도입만을 바탕으로 한 조절가능한 분해 속도에 대한 이해를 제공한다.

[0214] 적응성/성형성

[0215] 건조 (D) 및 수화 (습윤, W) 압축 멤브레인들, 그리고 바이오-가이드, KLS 마틴 및 콜라플러그 대조의 임상 적응성을 구강 외과에 의해 점수화하였다. 수화된 경우, 모든 젤라틴 + CW + MH 멤브레인들이 바이오-가이드 대조와 유사하게 취급되었으며, 도입된 MH의 백분율이 더 높을수록 증가된 멤브레인 찢김으로 이어졌다 (표 2). 그러나, 건조 젤라틴 + CW + MH 멤브레인들은 대조에 비해 더 큰 적응성을 가졌다. 외과의의 손에서, 압축 멤브레인은 임상 콜라겐 멤브레인과 유사하게 취급되었다 (도 12).

[0216] <표 2>

[0217] 적응성/성형성

	1	2	3	4	5
0% MH			W		D
+5% MH		W			D
+25% MH		W			D
바이오-가이드		W	D		
KLS 마틴		D		W	
콜라플러그	W				D

최도

1 = 형성되지 못함, 부서지거나 찢겨져 나감

5 = 용이하게 형성될 수 있음, 취급시 구조 유지

[0218]

[0219] 압축 시험

[0220] 모든 젤라틴 + CW + MH 멤브레인은 0.02-0.03 N의 범위 내에서 최대의 힘을 발휘한 반면, 바이오-가이드 및 KLS 마틴 대조는 각각 0 N 및 0.75 N을 발휘하였다. 젤라틴 + CW + MH 멤브레인은 시험에서 아치를 유지하지 않게 되는 바이오-가이드 대조에 비해 개선된 기계적 특성을 나타내었다 (표 3). 더 높은 KLS 마틴 값이 예상되는데, 그것이 비-다공성 PLA 필름이기 때문이다.

[0221] <표 3>

[0222] 압축 시험

0% MH	+5% MH	+25% MH	바이오-가이드	KLS 마틴
0.03 N	0.03 N	0.02 N	0 N	0.75 N

[0223]

[0224] 세포 부착

[0225] MH의 첨가는 0 % MH 및 바이오-가이드 멤브레인에 비해 1일차에 세포 부착을 상당히 증가시켰다 (도 11). KLS 마틴 멤브레인 또한 많은 수의 세포를 부착시켰는데, 그의 2D 필름 표면이 조직 배양 플라스틱과 유사하기 때문이다. KLS 마틴 (PLA)의 결점은 산성 미세환경으로 이어지는 그의 분해이다. 7 및 14일 후, 모든 젤라틴 + CW + MH 멤브레인은 세포로 피복되었으며, 바이오-가이드 대조는 여전히 눈에 띄는 세포 부착을 나타내지 않았다. 7 및 14일에는 형광 영상화가 더 어려워졌는데, 세포가 멤브레인을 개조함에 따른 세포의 일부 이동으로 인한 것일 가능성이 가장 컸다. 향후의 연구는 세포 증식, 생존력, 분비되는 재생 마커 및 세포외 매트릭스 생성을 분석하게 될 것이다.

[0226] 기타 실시양태

[0227] 전기한 설명으로부터, 다양한 용도 및 조건에 그것을 채택하기 위하여 본원에서 기술되는 본 발명에 대해 변화 및 변형들이 이루어질 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 그와 같은 실시양태들 역시 하기하는 청구범위의 영역에 속하는 것이다.

[0228] 본원의 변수에 대한 임의의 한정 중 요소 목록에 대한 언급은 열거된 요소들 중 임의의 단독 요소 또는 조합 (또는 하위조합)으로써의 그 변수에 대한 한정을 포함한다. 본원의 실시양태에 대한 언급은 임의의 단독 실시양태, 또는 임의의 다른 실시양태 또는 그 일부와의 조합으로써의 그 실시양태를 포함한다.

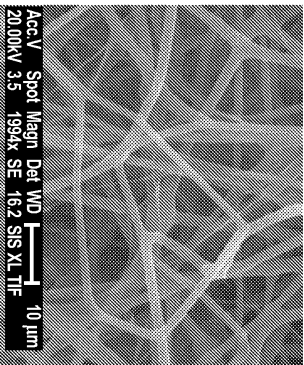
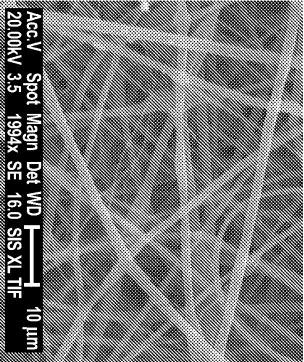
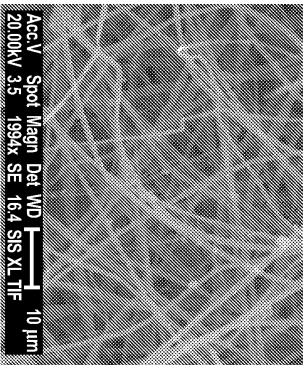
[0229] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개들은 각 독립적인 특허 및 공개가 참조로써 개재되는 것으로 구체적이고도 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도까지 본원에 참조로써 개재된다.

0 % 콜

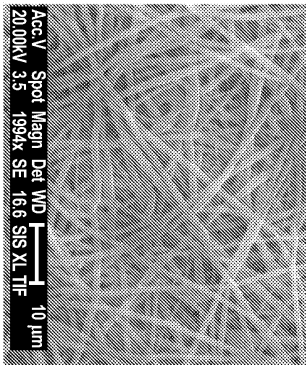
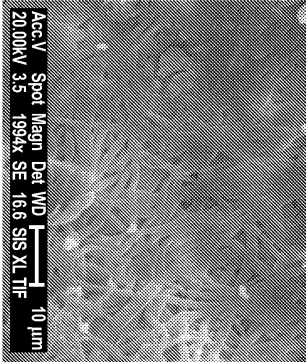
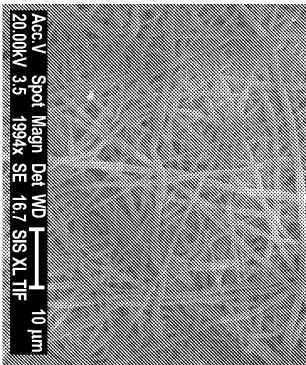
5 % 콜

10 % 콜

비-압축



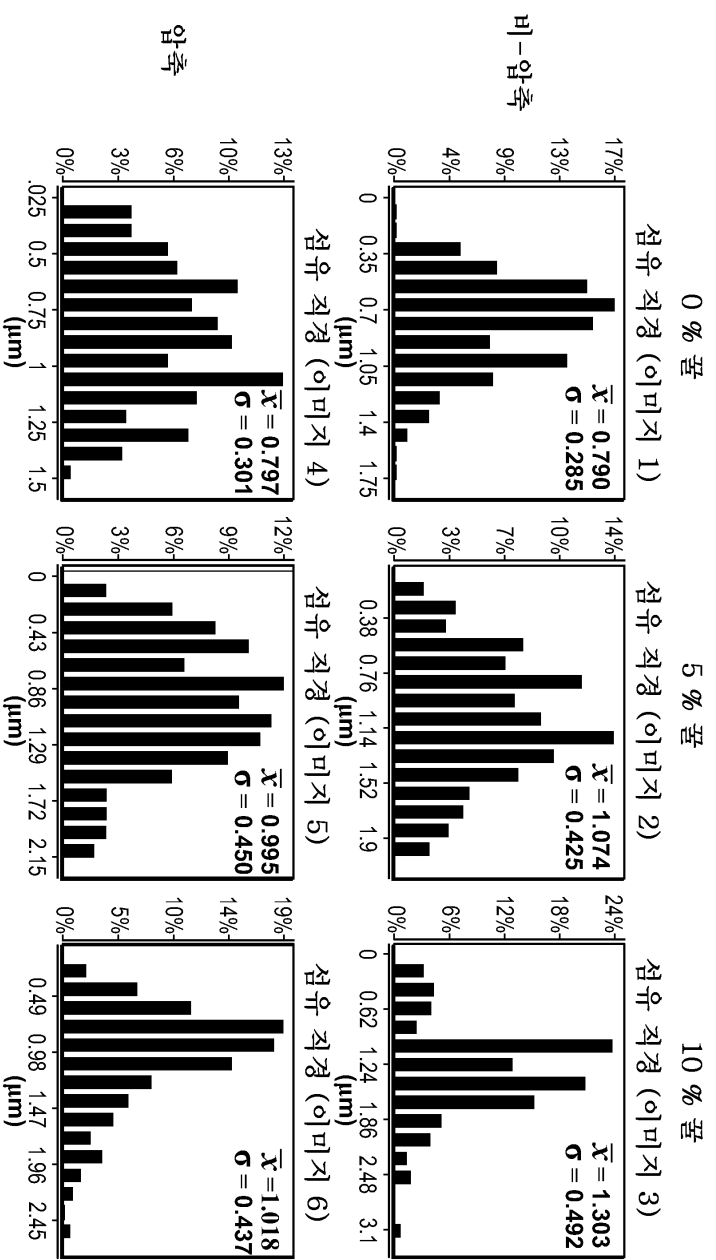
압축



비-압축 및 압축 전기방직 젤라틴 + 15 % CW + 콜 스케폴드 (비-가교결합)의 SEM 이미지.
최도 막대 및 배율은 각각 10 μm 및 2kx .

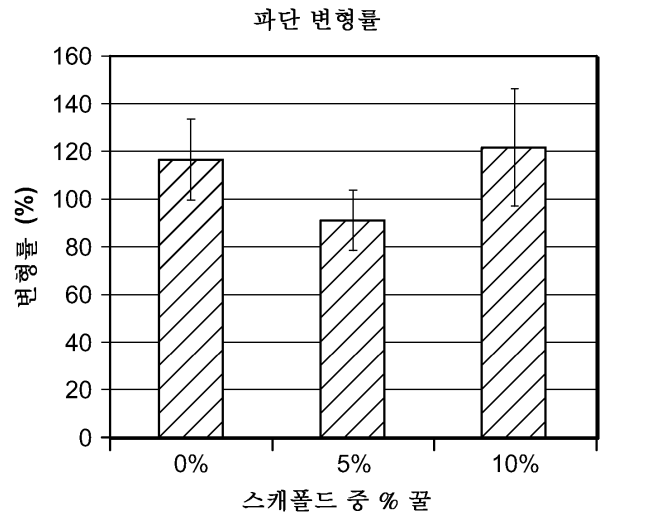
도면1

면도



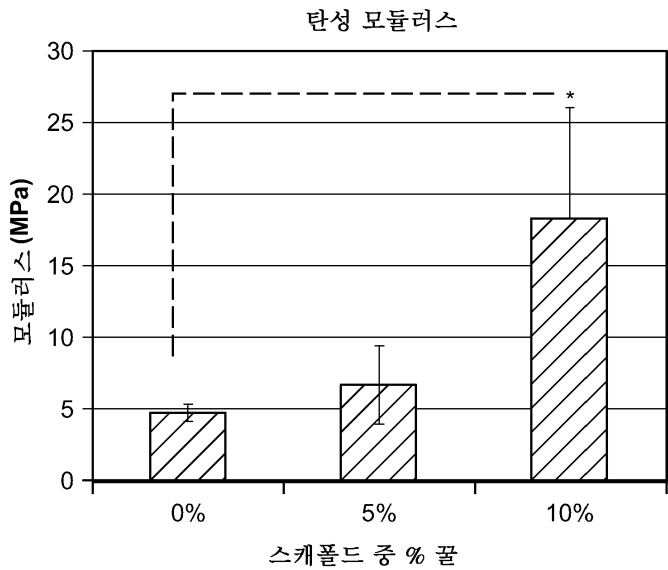
도 1의 SEM 이미지를 사용한 피크라퀀트™ 자동화 점유 직경 분석. 상기 막대그래프는 마이크로미터로 나타낸, 평균 및 표준 편차 σ 와 함께 점유 크기 분포를 나타낸다.

도면3



압축 전기방적 멤브레인의 단축 인장 시험 (파단 변형률)

도 3A

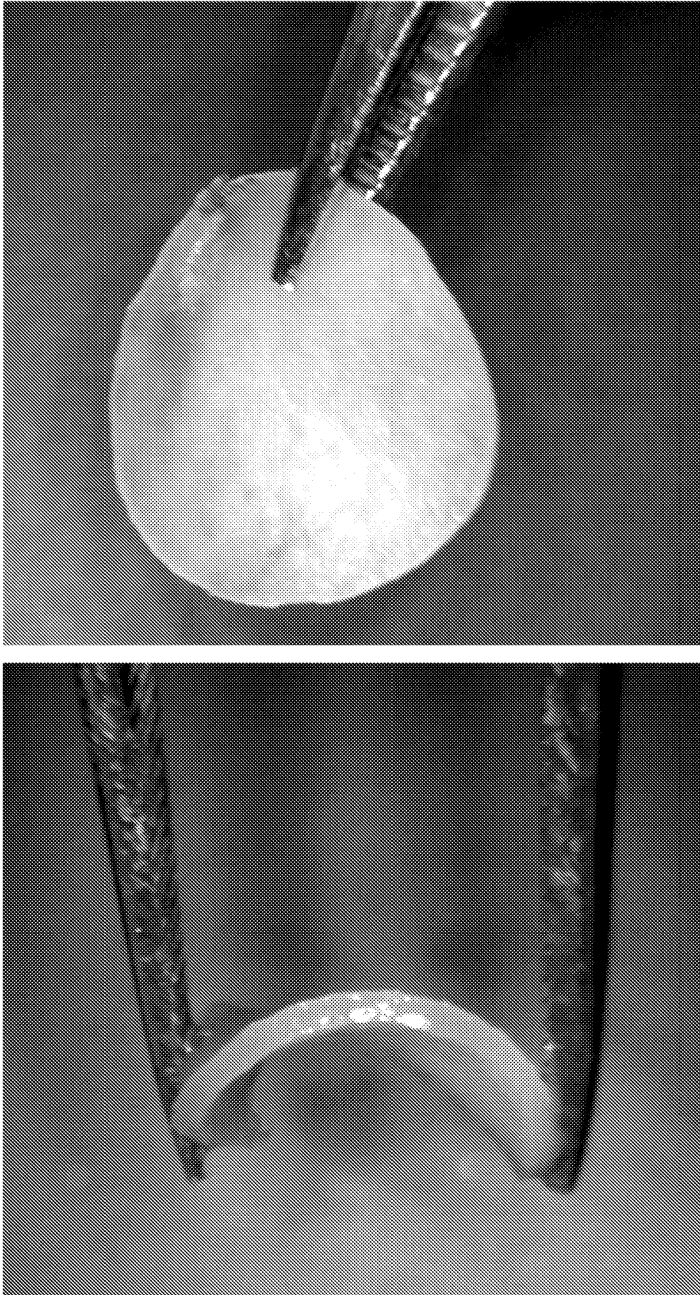


압축 전기방적 멤브레인의 단축 인장 시험 (탄성 모듈러스)

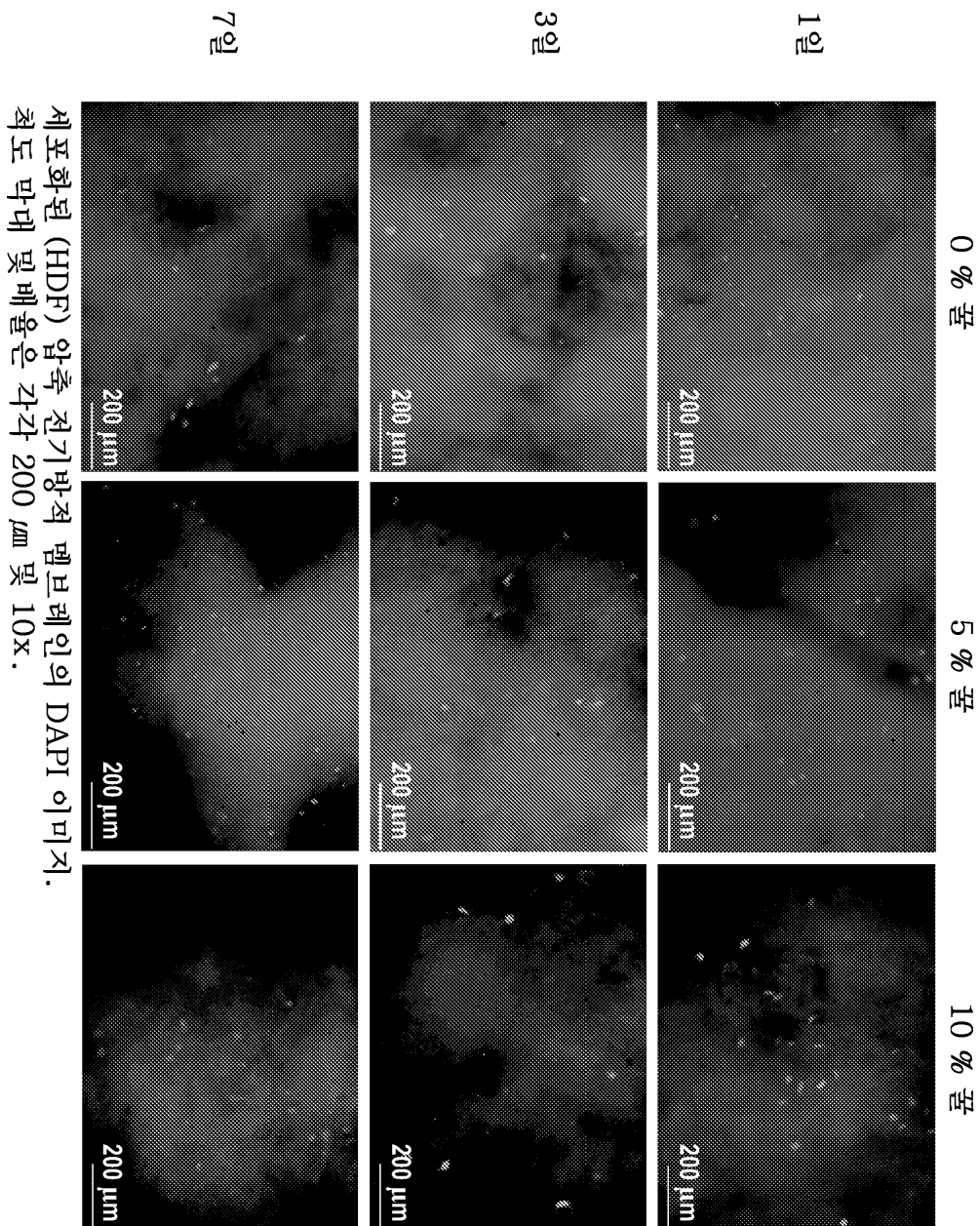
도 3B

도면4

성형가능한 수화 10% 폴 압축 멤브레인



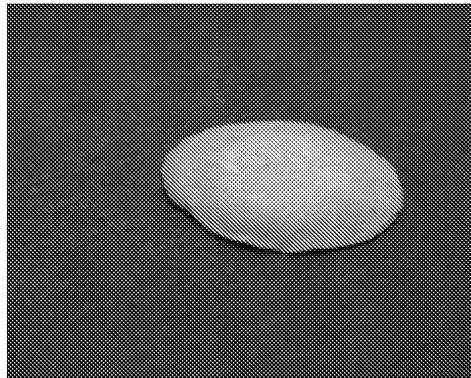
도면5



도면6



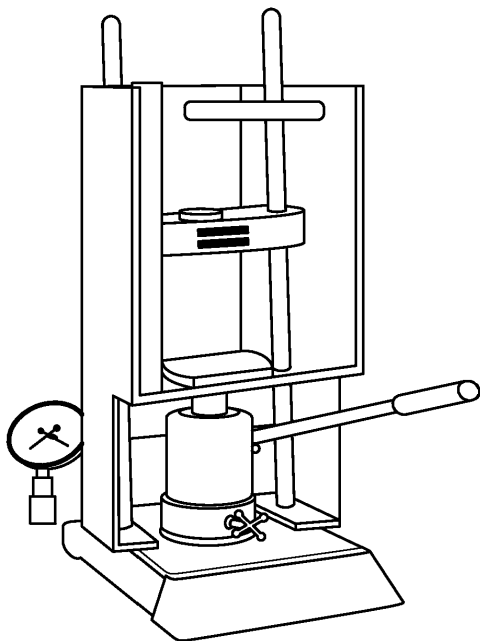
사진 비-압축
(5.5 mm 두께)



압축 (0.3 mm 두께)

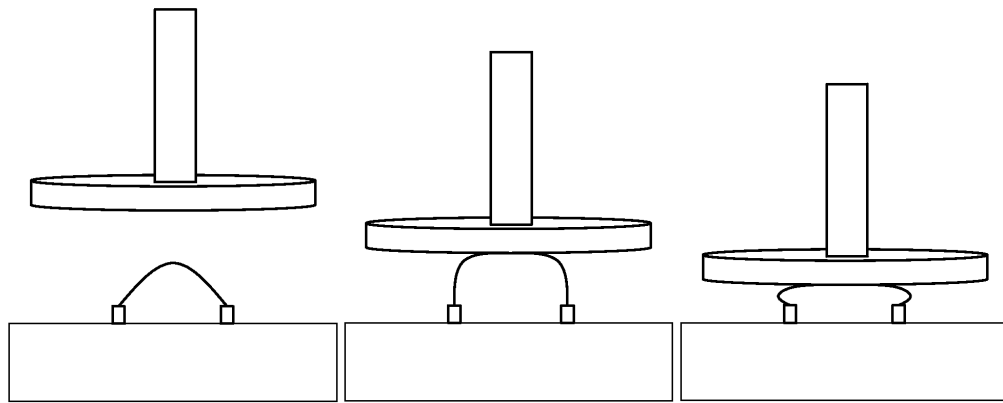
비-압축 및 압축 젤라틴 + 10 % CW + 30 mg/mL 꿀 스펀지의 일반적인 눈에 보이는 외관의 디노라이트 이미지. 스펀지는 임의의 크기 (몰드에 따라 달라짐)로 제조된 이후 압축될 수 있다.

도면7



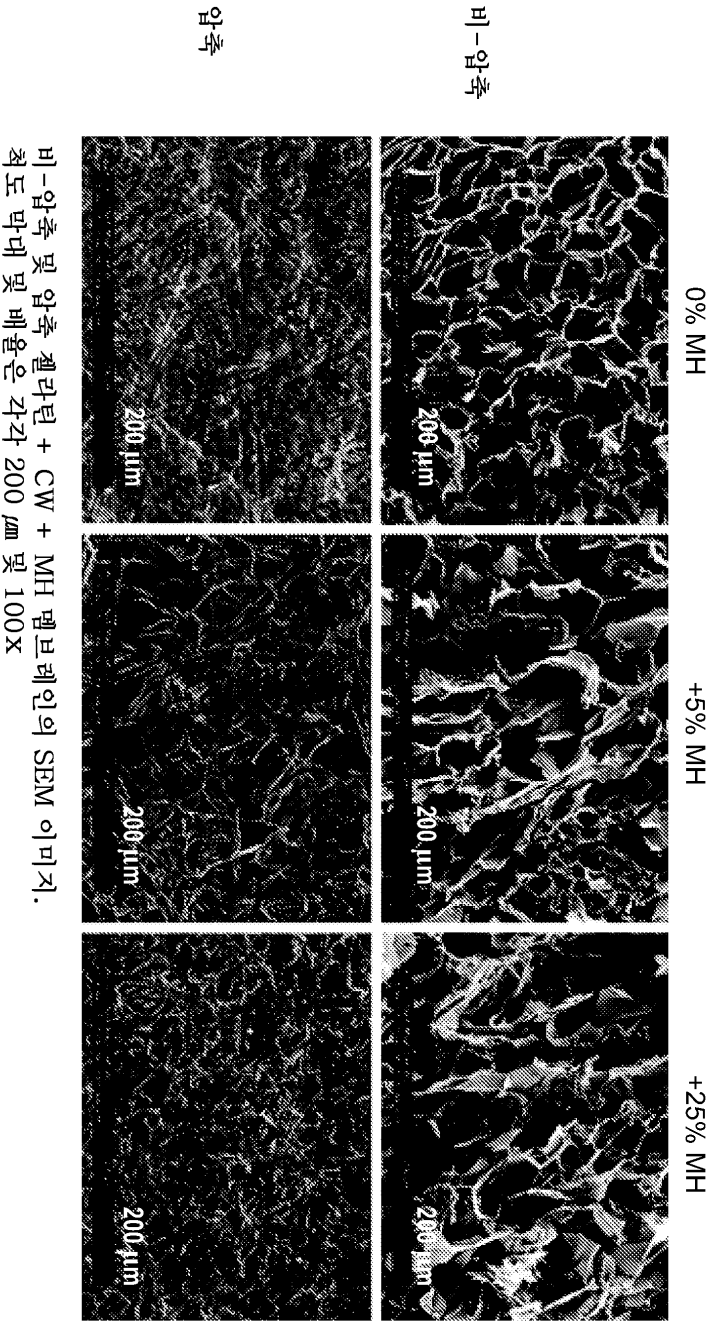
스캐폴드 압축에 사용되는 카르버 수압 장치

도면8

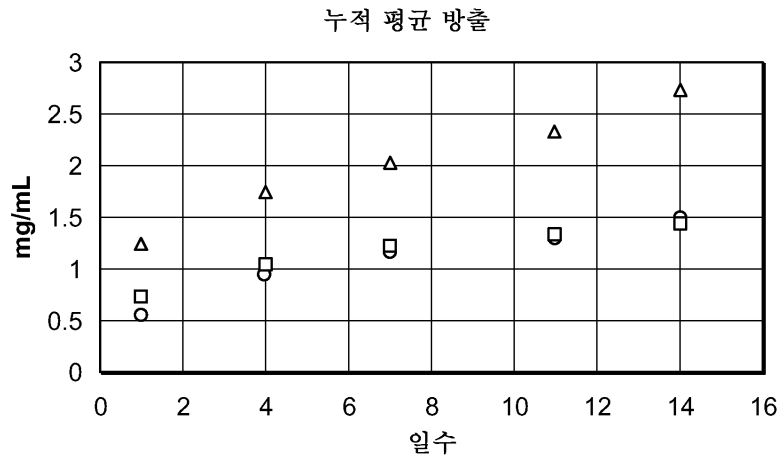


기계적 시험 개략도

도면9

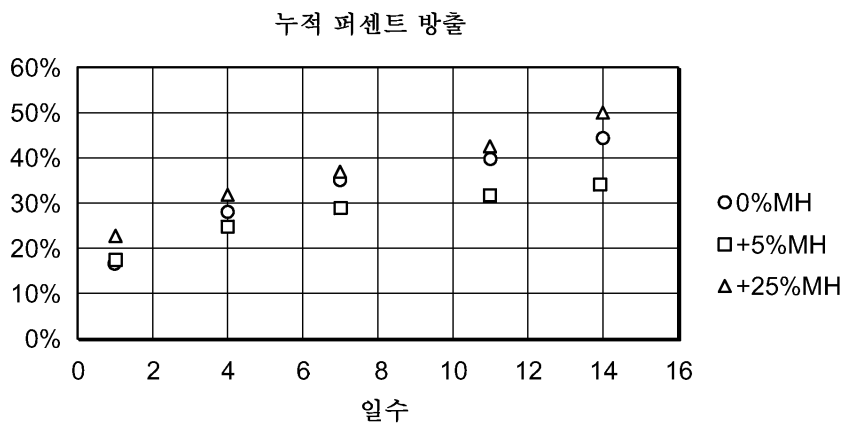


도면10



누적 평균 방출 측정치로 나타내었을 때의 젤라틴 + CW + MH
분해 결과 (BCA 검정)

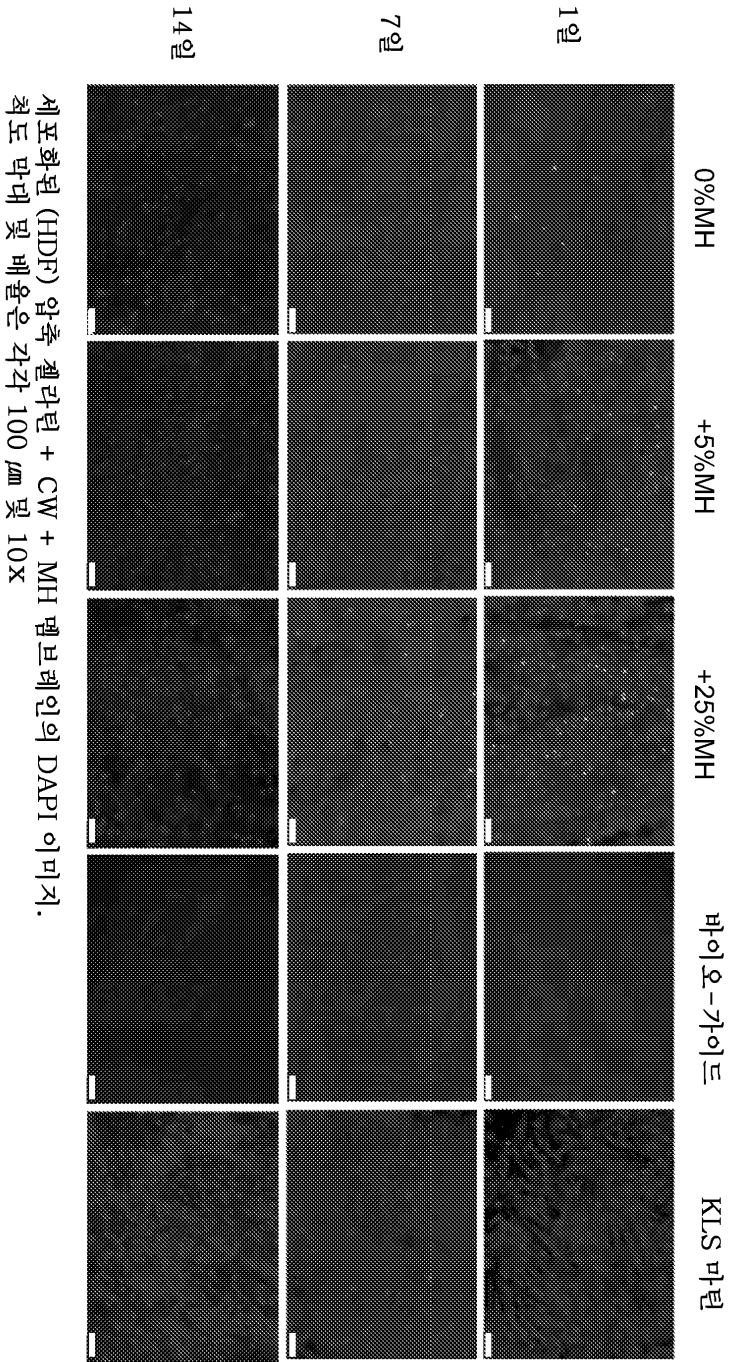
도 10A



누적 퍼센트 방출 측정치로 나타낸 젤라틴 + CW + MH
분해 결과 (BCA 검정)

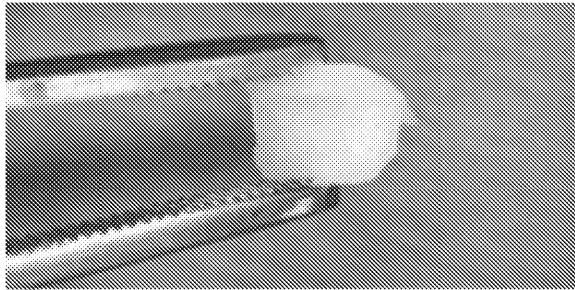
도 10B

도면11

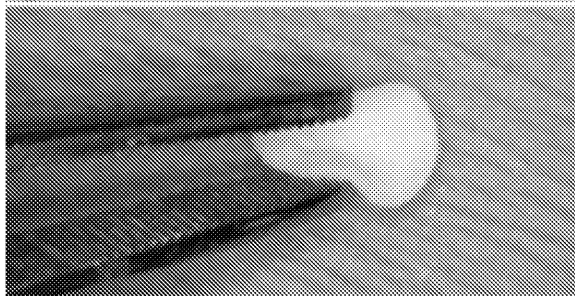


도면12

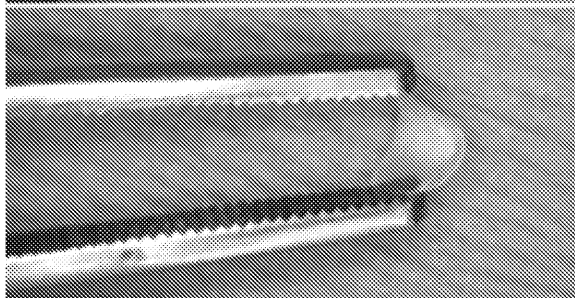
+5% MH



바이오-가이드



KLS 마틴



성형가능 수화 멤브레인