



(51) 국제특허분류:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/016892

(22) 국제출원일:

2018년 12월 28일 (28.12.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0183688 2017년 12월 29일 (29.12.2017) KR

(71) 출원인: (주) 비이에프메디칼 (BEF MEDICAL INC.)

[KR/KR]; 10871 경기도 파주시 청암로 28, 801동 1101호, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 안승욱 (AN, Seung Uk); 10871 경기도 파주시

청암로 28, 801동 1101호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구

로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국

내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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 역

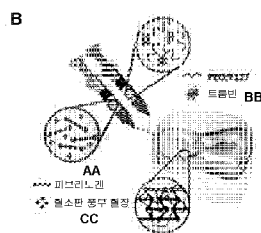
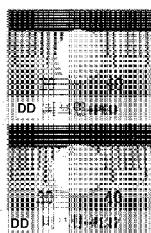
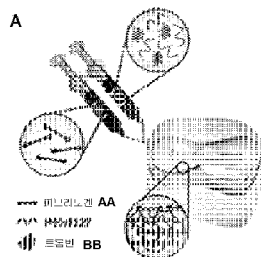
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,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

공개:

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

(54) Title: COMPOSITION FOR REGENERATION OF HUMAN FIBROUS CARTILAGE OR ELASTIC CARTILAGE

(54) 발명의 명칭: 인간 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물



AA ... Fibrinogen
BB ... Thrombin
CC ... Platelet-rich plasma
DD ... Fibrin

(57) Abstract: The present invention relates to a composition and a kit for regeneration and treatment of cartilage, preferably, fibrous cartilage or elastic cartilage and a regeneration method using the same. A composition and a kit for cartilage regeneration according to the present invention can be administered simply in a minimally invasive manner to a site in which fibrous cartilage or elastic cartilage is needed to be regenerated or restored from injury, exhibit resistance to degradation enzymes without toxicity within the body, and are attached to or detained at and thus retained at the injured, administered site, whereby behavioral improvement can be brought about in surrounding cells, which leads to effectively inducing defected tissues of the meniscus to be regenerated. Therefore, the composition of the present invention is useful as a mediator for aiding the regeneration of biological tissue defected regions in the biomaterials field.

(57) 요약서: 본 발명은 연골, 바람직하게는 섬유연골 또는 탄성연골을 재생 및 치료하기 위한 조성물, 키트, 및 이를 이용한 재생 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 연골 재생용 조성물 및 키트는 최소침습적 방법으로 간편하게 섬유연골 또는 탄성연골의 재생 또는 손상 회복이 필요한 부위에 투여가 가능하고, 체내 독성없이 분해 효소에 대한 저항성을 나타내며 손상된 주입부위에 접착 혹은 유지되어 머무름으로써, 주위 세포의 기능을 향상시켜 효과적인 반월상 연골판 결손조직의 재생을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 생체 조직 결손 부위의 재생을 도와주는 매개체로 바이오 생체 재료 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 인간 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 섬유연골 또는 탄성연골을 재생 및 치료하기 위한 조성물, 키트, 및 이를 이용한 재생 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 연골은 다른 결합조직과 같이 결합조직세포와 세포외기질로 구성되어 있지만, 고유결합조직과는 달리 단단하면서도 어느 정도 유연성이 있는 기질을 함유한 특수한 결합조직이다. 연골은 연골기질을 구성하는 섬유의 종류와 특성에 따라서 유리연골(hyaline cartilage), 탄성연골(elastic cartilage) 및 섬유연골(fibrous cartilage)로 분류된다. 유리연골은 주로 II형 아교질을 함유하고 있으며, 가장 흔한 종류의 연골이다. II형 아교질은 대부분 미세원섬유(microfibrils)의 형태로 나타나며 무형질의 주성분인 단백당과 굴절율(refractory index)이 거의 같기 때문에 섬유성분과 무형질은 균일한 물질로 관찰된다. 탄성연골은 기질 내에 탄력섬유가 풍부하다는 점에서 유리연골과 구별된다. 섬유연골은 다른 연골에 비해 무형질이 적으며, 아교섬유가 많고 이들 섬유는 대부분 일정한 방향으로 배열되어 있다. 섬유연골을 구성하는 아교섬유의 아교질은 I형 아교질인 차이점이 있다. 유리연골은 뼈의 관절면(articular surface), 늑연골(costal cartilage), 기관(trachea), 기관지(bronchus) 후두연골(laryngeal cartilage) 등에서 관찰된다. 탄성연골은 외이(external ear)와 후두덮개(epiglottis) 및 일부 후두연골을 구성하며, 섬유연골은 척추사이원반(intervertebral disc), 치골섬유연골결합(symphysis pubis), 관절내 반월상 연골판(meniscus), 및 관절내 섬유연골복합체(fibrocartilage complex) 등에 존재한다.
- [4] 섬유연골에 속하는 반월상 연골판(Meniscus)은 대퇴골과 경골의 관절면 사이에 위치하며 무릎 관절의 기능을 유지하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 구조물 중에 하나이다. 반월상 연골은 무릎관절의 하중과 스트레스를 분산시키고, 충격을 흡수하며, 관절연골에 윤활작용을 하고, 외부의 충격을 흡수하여 관절 연골을 보호하는 아주 중요한 역할을 한다. 이러한, 반월상 연골판은 무릎 관절의 중간에 위치한 반달모양의 물렁뼈로 형성되고, 연골판은 관절 사이에서 완충작용을 하는데, 서있거나 걷거나 달릴 때, 체중이 위에서 아래로 전달될 때, 관절 연골이 손상되지 않도록 충격을 흡수하는 역할을 한다.
- [5] 상세하게는, 반월상 연골판은 좌우 무릎 관절에 초승달 모양의 연골 2개가 각각 한쌍을 이루고 있고, 이를 각각 외측 반월상 연골판, 내측 반월상 연골판이라고 부른다. 그 사이를 전방 십자인대와 후방 십자인대가 가로지르며, 위쪽의

넙다리뼈와 아래쪽의 정강뼈를 연결한다.

- [6] 반월상 연골판은 운동선수에서 손상되는 경우가 많다. 이를 '반월상 연골판 파열'이라고 부르고, 반월상 연골판 파열은 일반적으로 운동 중 발생하는 경우가 많다. 하지만 50대 후반에서 60대 중반의 중년층에서는 퇴행성관절염이 어느 정도 진행돼 있는 경우, 갑작스럽게 반월상 연골판 뒤쪽이 끊어지면서 파열이 많이 발생되고, 중년 여성들은 쪼그려 앉거나 무릎을 많이 구부리는 가사 일을 오랜 기간 지속해오면서 반월상 연골판 부위가 파열되는 경우도 있다. 이렇게, 반월상 연골판이 찢어지거나 훼손되는 경우, 약물 복용이나 수술적 치료를 시행하게 된다. 세포외 기질의 콜라겐 구성요소는 연골판의 강도를 제공하는데 도움이 되고, 프로테오글리칸 ECM 구성 요소는 충격 흡수 기능에 기여하고 있다. 또한 초승달 모양의 조직은 vascularized된 외부 부분과, 내부 avascular 지역을 포함하고 있다. 조직 손상이 혈관이 분포한 외부 부분에 있는 경우에는 봉합술을 시행할 수 있는 경우가 있으나, 그렇지 못할 경우도 있으며, 혈관이 없는 avascular 영역에 있으면 자연 치유가 가능하지 않기 때문에 절제하는 시술을 시행하게 된다. 현재 수술적 치료법으로는 연골판 조직 손상의 크기나 위치에 따라 부분절제 (partial meniscectomy) 또는 아전절제술이나 전절제술 (subtotal or total meniscectomy)등으로 나뉘 수 있으며, 절제술에 의한 인한 조직의 제거는 궁극적으로 퇴행성 관절염을 유발하게 되므로 근본적인 치료법인 손상된 연골판의 재생 치료를 위한 의료 기술이 요구되고 있다.
- [7] 연골판 결손으로 인한 퇴행성 관절염의 발생을 막기 위한 치료 방법으로서, 현재 “동종 반월상 연골판 이식술”과 “합성 대체물을 이용한 반월상 연골판 재생치료”가 있으며, 동종 반월상 연골판 이식술은 연골판의 크기와 모양이 맞는 공여 이식물이 필요하고, 결손이 없는 환자의 연골판 부위도 모두 제거해야 하는 문제 및 이식물의 고정 등의 문제로 인해 아직 임상적 결과가 좋지 않다.
- [8] 반월판 연골판 재생을 위한 의료기기 개발 성과는 현재 세계적으로 초기 단계이며 현 상태로 의료기기로 개발되어 있는 Polyurethane을 이용한 의료기기 Actifit (Orteq Ltd.)와 Nusurface (Active Implants LLS) 및 Collagen을 주성분으로 하는 의료기기 Menaflex (ReGen Biologics, Inc.)가 개발되어 있으며, 제품 모두 현재 개발된 자국에서만 사용 허가를 받은 상태이고, 타 지역에서는 아직 임상시험 및 FDA 진행이 되지 않은 상태이다. 임상에 적용한 지 2년 이내이므로 매우 초기단계이고, 크기나 모양을 맞추어 주는 문제 및 대체물을 봉합술기를 통하여 고정해야 하는 기술적 문제가 큰 단점이다.
- [9] 지지체 기반의 이식술의 경우, 적절한 형태로 가공한 고분자 지지체를 부분 절제된 연골판과 봉합하는 방식이며, 상기 동종 반월상 연골판 이식술을 대체할 기술로 평가되고 있으나, 안정성 및 유효성이 아직 검증되지 않은 상태다. 또한, 지지체 기반 이식술은 특정한 형태의 지지체를 연골판 위치에 삽입해야 하므로 슬관절의 절개가 필수적인 문제점이 있다.
- [10] 따라서, 동종 반월상 연골판 이식술에서처럼 불필요하게 모든 연골판을 제거할

필요가 없고, 공여 연골판을 필요로 하지 않으며, 또한, 현재 시도되고 있는 대체물을 이용한 연골판 재생치료에서처럼 결손부위 크기나 모양을 맞추는 필요가 없고 봉합술기를 사용하지 않고도 더욱 우수한 재생치료가 이루어 질 수 있는 기술에 대한 필요성이 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명자는 슬관절의 절개 및 대체물의 삽입이 필수적으로 수반되는 종래 기술의 문제점을 해결하고 보다 간편한 최소 침습 슬관절 반월판 연골 재생 방법에 대하여 연구하던 중, 피브리노겐, 트롬빈 및 생리활성 고분자를 이용하여 제조된 하이드로겔을 이용하면 최소 침습적인 방법으로도 섬유연골인 반월상 연골판이 효과적으로 재생됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 따라서 본 발명의 목적은 피브리노겐, 트롬빈 및 생리활성 고분자를 이용하여 제조된 하이드로겔을 포함한 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물, 키트를 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명은 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 제공한다.

[15] 또한 본 발명은 상기 연골 재생용 조성물을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 스캐폴드를 제공한다.

[16] 또한 본 발명은 피브리노겐 용액을 포함하는 제1구획; 및 트롬빈 및 생리활성 고분자를 포함하는 제2구획을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트를 제공한다.

[17] 또한 본 발명은 1) 피브리노겐 10 내지 1000mg/ml 를 제1용액으로 준비하는 단계; 2) 트롬빈 및 생리활성 고분자를 혼합하여 제2용액을 준비하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[18] 또한 본 발명은 본 발명의 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생 방법을 제공한다.

[19] 또한 본 발명은 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[20] 또한 본 발명은 본 발명의 섬유연골 탄성연골 재생용 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환

치료 방법을 제공한다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명에 따른 연골 재생용 조성물 및 키트는 최소침습적 방법으로 간편하게 섬유연골 또는 탄성연골의 재생 또는 손상 회복이 필요한 부위에 주입이 가능하고, 체내 독성없이 분해 효소에 대한 저항성을 나타내며 손상된 주입부위에 접착 혹은 유치되어 머무름으로써, 주위 세포의 거동을 향상시켜 효과적인 반월상 연골판과 같은 섬유연골 또는 탄성연골 결손조직의 재생을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 생체 조직 결손 부위의 재생을 도와주는 매개체로 바이오 생체 재료 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 본 발명에 따른 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물 및 키트의 모식도 및 이를 통해 제조된 하이드로겔을 나타낸 도이다. 도 1의 A는 피브리노겐 및 트롬빈과 폴리에틸렌옥사이드(PEO) 또는 플루로닉(F127)의 혼합물을 포함하는 주사기 형태의 키트와 피브린 및 피브린과 상호침투복합체(interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자를 이용하여 제조된 본 발명의 하이드로겔을 나타낸 도이다.

[25] 도 1의 B는 피브리노겐, 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 및 트롬빈과 폴리에틸렌옥사이드(PEO) 또는 플루로닉(F127)의 혼합물을 포함하는 주사기 형태의 키트와 피브린 및 피브린과 상호침투복합체(interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자를 이용하여 제조된 본 발명의 하이드로겔을 나타낸 도이다.

[26] 도 2는 트롬빈 농도 변화에 따른 하이드로겔의 탄성률을 나타낸 도이다. 도 2의 A는 전단 탄성률을 나타낸 도이다. 도 2의 B는 압축탄성률을 나타낸 도이다 (student t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[27] 도 3은 트롬빈 농도 1250U/ml 조건 하에서 폴리에틸렌옥사이드 (PEO)와 플루로닉 127 (F127)의 농도변화에 따른 하이드로겔의 압축 탄성률 및 전단 탄성률 변화를 나타낸 도이다. 도 3의 A는 트롬빈, PEO를 이용하여 제조된 하이드로겔의 PEO 농도에 따른 압축 탄성률 변화를 나타낸 도이다. 도 3의 B는 트롬빈, F127을 이용하여 제조된 하이드로겔의 F127 농도에 따른 압축 탄성률 변화를 나타낸 도이다. 도 3의 C는 제조된 하이드로겔의 PEO 농도에 따른 전단 탄성률 변화를 나타낸 도이다. (student t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[28] 도 4는 트롬빈 농도 1250U/ml, 폴리에틸렌옥사이드 (PEO) 5.0 %, 플루로닉 127 (F127) 10.0 %의 조건 하에서, PRP 첨가에 따른 전단 탄성률 변화를 나타낸 도이다. 도 4의 A는 피브린-PEO 하이드로겔 (Fb/PEO) 과 PRP 첨가 하이드로겔 (Fb/PEO+PRP)의 전단 탄성률을 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 4의 B는

피브린-F127 하이드로겔 (Fb/F127) 과 PRP 첨가 하이드로겔 (Fb/F127+PRP) 의 전단 탄성률을 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 4의 C는 피브린, 피브린-PEO, 피브린-PEO-PRP, 피브린-F127, 피브린-F127-PRP 하이드로겔의 전단 탄성률 비교 그래프를 나타낸 도이다 (그래프 상단에 있는 *, **, ***은 피브린 그룹과의 비교 시 통계학적 유의성을 나타낸다.)

[29] 도 5는 제작된 피브린-F127, 피브린-PEO 하이드로겔 및 대조군 피브린 단독 처리군의 트립신 효소 처리시 분해양상을 나타낸 도이다.

[30] 도 6는 제작된 하이드로겔과 혼합된 세포의 24시간 후 세포생존율을 나타낸 도이다. 도 6의 A 는 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다. 도 6의 B는 세포 생존도를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 7은 가토의 반월상 연골판 손상 부위가 재생되는 결과를 나타낸 도이다. 도 7의 A는 반월상 연골판 손상 1주일 후, 피브린, 피브린-PEO, 피브린-F127 하이드로겔을 주입하여 4주, 8주, 12주에 관찰된 반월상 연골판이 재생된 모습을 보여주는 육안적 결과이다. 도 7의 B는 재생된 반월상 연골판의 면적을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[32] 도 8은 가토의 반월상 연골판 손상 부위가 재생되는 결과를 나타낸 도이다. 도 8의 A는 반월상 연골판 손상 1주일 후, 피브린-PEO, 피브린-F127 하이드로겔을 주입하여 4주, 8주, 12주에 관찰된 반월상 연골판이 재생되는 모습을 보여주는 Hematoxylin & Eosin (H&E), Safranin O 염색 및 Type I collagen에 대한 면역염색 결과 (x40)를 나타낸 도이다. 도 8의 B는 Histological tissue quality score 를 나타낸 도이다 (A. 반월판 절제술(Meniscectomy), B. 반월판 절제술+피브린 단독 처리군, C 반월판 절제술+피브린+PEO, D. 반월판 절제술+피브린 +F127).

[33] 도 9는 가토의 반월상 연골판 손상 부위가 재생된 반월상 연골판의 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[36] 본 발명은 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 제공한다.

[37] 본 발명에 따른 하이드로겔은 피브리노겐과 트롬빈의 작용으로 형성되는 피브린 고분자망에 생리활성 고분자의 고분자 사슬이 무작위적으로 침투되어 상호 침투 복합체를 형성하고 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 이와 같이 상호 침투 복합체 구조가 형성된 하이드로겔은 세포 독성을 나타내지 않아 생체 적합성이 우수할 뿐만 아니라, 최소 침습적 방법으로도 섬유연골 또는 탄성연골의 재생이 필요한 부위에 주입이 가능하다. 또한 주입 부위에 장시간 분해되지 않고 손상된 부위에 접착 혹은 유치되어 머무를 수 있으며, 주위

세포의 거동을 향상시켜 섬유연골 또는 탄성연골의 재생을 효과적으로 유도할 수 있어 섬유연골 및 탄성연골의 재생, 더욱 바람직하게는半月상 연골판 재생에 효과적이다.

[38] 본 발명에 있어서, 생리활성 고분자는, 피브린 고분자망에 무작위적으로 침투하여 상호 침투 복합체 하이드로겔을 형성할 수 있는 고분자를 제한없이 포함할 수 있으며, 예컨대 알긴산염, 키토산, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 셀룰로스, 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(락트산)(PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, 텍스트란, 텍스트란-PEG, 전분, 콜라겐 기저 겔, 아가로스, 플루론산, 헤파란 설페이트, 글리코사미노글리칸, 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 공중합체(P(EO-co-PO)) 및 플루로닉/플록사머로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, 이하 PEO) 또는 플루로닉 127 (Fluronic F127, 이하 F127) 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[39] 본 발명에 있어서, 재생의 대상이 되는 연골은 유리연골(hyaline cartilage), 섬유연골(fibrocartilage) 또는 탄성연골(elastic cartilage) 중에서 섬유연골 또는 탄성연골일 수 있다. 섬유연골은 하얀 섬유성 조직과 연골성 조직이 다양한 비율로 섞여있는 연골로, 압박에는 강하지만 잘 찢어지고 치밀한 상태로 배열되어 있다. 섬유연골은 유리연골이나 결합 조직과 연결되어 존재하며 뒤틀림이나 압박이 일어나는 부위에서 완충 작용을 하여 제한된 움직임이 가능하도록 하고 탄력을 유지하는 것을 특징으로 한다. 유리연골은 주로 II 형 아교질로 구성되고, 섬유성분과 무형질이 균일하게 관찰되나, 탄성연골은 기질 내에 탄력섬유가 풍부하다는 점에서 유리연골과 차이점이 있고 섬유연골은 유리연골 및 탄성연골과 비교하여 무형질이 적으며 아교섬유가 많고 일정한 배열로 연결되어 있다는 점에서 뚜렷한 차이점을 갖는다. 특히 섬유연골을 구성하는 아교 섬유의 아교질은 I 형 아교질로 차이점이 있으며, 섬유연골은 탄성연골, 유리연골과 달리 뚜렷한 연골막이 없다. 섬유연골에서 충판을 이루는 I형 아교섬유다발은 이웃한 충판과 직각으로 배열되는 것으로 알려져 있으며, 다른 연골과 달리 섬유연골의 이러한 특징적 배열에 의하여 척추 사이 원판 등에서 특별한 탄성을 가지고 체중 부하 등에 의해 생성되는 압력에 잘 견딜 수 있게 한다.

[40] 본 발명에 있어서 바람직한 재생, 손상 회복의 대상이 되는 섬유연골 또는 탄성연골은 추간원판이나 관절순, 관절半月 부위에 존재하는 다양한 섬유연골 및 외이(external ear), 후두덮개(epiglottis) 및 일부 후두연골 부위에 존재하는 다양한 탄성연골을 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 추간판 연골(intervertebral disc), 치골섬유연골결합(symphysis pubis) 연골,半月상 연골판(meniscus), 관절내 섬유연골복합체(fibrocartilage complex), 악관절 연골, 복장빗장관절(sternoclavicular joint)의 관절원반, 비구순(acetabular fossa) 연골,

외이(external ear), 후두덮개(epiglottis) 및 후두연골로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 일 수 있다.

[41] 본 발명에 있어 반월상 연골판이란, 대퇴골과 경골의 관절면 사이에 위치하며 무릎 관절의 기능을 유지하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 구조물 중에 하나이며, 무릎관절의 하중과 스트레스를 분산시키고, 충격을 흡수하며, 관절 연골에 윤활작용을 하고, 외부의 충격을 흡수하여 관절 연골을 보호하는 아주 중요한 역할을 한다. 이러한, 반월상 연골판은 무릎 관절의 중간에 위치한 반달모양의 연골로 형성되고, 연골판은 관절사이에서 완충작용을 하는데, 서있거나 걷거나 달릴 때, 체중이 위에서 아래로 전달될 때, 관절 연골이 손상되지 않도록 충격을 흡수하는 역할을 한다. 따라서 연골판은 퇴행성 관절염의 예방에 있어 매우 중요함이 알려져 있다.

[42] 본 발명의 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔은 생체의 트립신에 분해 저항성을 나타내고, 동일한 조건에서 피브린의 분해 시간과 비교하였을 때 60 내지 84 시간 이상 더 분해 저항성을 갖고 오래도록 겔 형태를 유지할 수 있으므로 체내에서 목적 부위에 오래 잔류하여 섬유연골 재생을 더욱 효과적으로 유도할 수 있다.

[43] 본 발명의 하이드로겔은 100 radian / sec 진동수 조건 하에서 15 내지 40 kPa의 전단 탄성률을 나타낼 수 있으며, 10 내지 200 kPa의 압축 탄성률을 나타낼 수 있다. 본 발명의 하이드로겔이 상기와 같은 탄성률을 나타냄으로써, 섬유연골 재생 시 딱딱하지 않고 유연성과 탄성을 유지할 수 있고, 이를 통해 섬유연골 결손 부위의 크기와 형태에 무관하게 쉽게 투여가 가능하고 투여된 하이드로겔 내로 주위 세포가 유입되어 조직 재생을 일으키는 장점이 있다.

[44]

[45] 본 발명의 조성물은 혈소판 풍부 혈장 (platelet-rich plasma, PRP) 을 더 포함할 수 있다. 혈소판 풍부 혈장은 하이드로겔의 준비 물질인 피브리노겐과 혼합한 형태로 제공될 수 있으며, 혈소판 풍부 혈장을 더 포함하는 경우 100 radian / sec 진동수 조건 하에서 더욱 우수한 전단 탄성률을 나타낼 수 있다.

[46] 본 발명의 조성물은 섬유연골 재생을 위한 하이드로겔 조성물 형태이며, 주사기 등을 이용하여 최소 침습적으로 섬유연골 또는 탄성연골의 재생이 필요한 부위에 효과적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용일 수 있으며, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 지지체로 사용될 수 있다.

[47] 따라서 본 발명은 본 발명의 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 스캐폴드를 제공한다.

[48]

[49] 또한 본 발명은 피브리노겐 용액을 포함하는 제1구획; 및 트롬빈 및 생리활성 고분자를 포함하는 제2구획을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트를

제공한다.

- [50] 본 발명의 키트는 2개 이상의 구획으로 이루어져 있으며, 피브리노겐 용액과 트롬빈 및 생리활성 고분자를 각각 나누어 포함하는 것을 목적으로 한다. 예컨대 바람직하게는 피브린-PEO 또는 피브린-F217 하이드로겔의 제조 물질을 각각 나누어 포함하는 것을 목적으로 한다. 제1구획의 제1용액과 제2구획의 제2용액은 더블 시린지 (이중 주사기) 의 시린지 내에서 혼합이 이루어질 수 있으며, 즉각적으로 피브린 형성 및 상호 침투 복합체 구조 형성을 통해 3차원적 구조의 하이드로겔이 형성될 수 있다.
- [51] 제1구획에는 피브리노겐 외에 혈소판 풍부 혈장을 더 포함할 수 있다. 혈소판 풍부 혈장을 더 포함하여 하이드로겔을 제조하는 경우 더욱 우수한 전단 탄성률을 나타낼 수 있고, 피브리노겐과 혈소판 풍부 혈장은 1:0.1 내지 1:1 부피비, 바람직하게는 1:0.1 내지 1:0.8 의 부피비로 혼합하여 제1구획에 포함될 수 있다.
- [52] 본 발명의 키트는 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 제조하기 위한 제조물질인 제1용액 및 제2용액을 각각의 구획에 포함하는 것을 목적으로 하며, 제1구획은 제1용액으로 피브리노겐을 10 내지 1000mg/ml 농도, 바람직하게는 10 내지 500mg/ml 의 농도, 더욱 바람직하게는 50 내지 200mg/ml 농도로 포함할 수 있다. 제1구획에는 항섬유소 용해제가 제1용액에 추가적으로 포함될 수 있으며, 예컨대 아프로티닌이 바람직하게는 0.5mg/ml (3 내지 8 TIU/mg) 이 되도록 추가적으로 포함될 수 있고, KTU 단위로 환산 시, 100 내지 5500 KIU/ml, 바람직하게는 1950 내지 5200 KIU/ml 농도로 포함될 수 있다. 제2구획에는 제2용액이 포함될 수 있으며, 제2용액에는 트롬빈 및 생리활성 고분자가 포함될 수 있다. 상기 트롬빈은 제2용액 내 100 내지 5000 Unit(U)/ml 포함될 수 있으며, 바람직하게는 250 U/ml 내지 3000 U/ml 농도, 더욱 바람직하게는 250 내지 2800 U/ml 농도로 포함될 수 있다. 트롬빈은 최종 혼합 조성물 내에서 최종 농도가 250 U/ml 내지 1250 U/ml 일 수 있고, 염화칼슘(CaCl_2)이 5 내지 50 mg/ml 포함될 수 있으며, 바람직하게는 5 (w/v)% 가 되도록 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 생리활성 고분자는 피브린 고분자망에 무작위적으로 침투하여 상호 침투 복합체 하이드로겔을 형성할 수 있는 고분자를 제한없이 포함할 수 있으며, 예컨대 알긴산염, 키토산, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 셀룰로스, 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(락트산)(PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, 덱스트란, 덱스트란-PEG, 전분, 콜라겐 기저 겔, 아가로스, 플루론산, 헤파란 설페이트, 글리코사미노글리칸, 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 공중합체(P(EO-co-PO)) 및 플루로닉/폴록사머로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 PEO 또는 F127 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 생리활성 고분자가

PEO 인 경우, 이는 최종 혼합 조성물 내에서 PEO 의 농도가 1 내지 10% (w/v), 바람직하게는 1 내지 5 % (w/v) 가 되도록 제2 용액 내에 2 내지 20 % (w/v)로 포함될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 10(w/v) % 로 포함될 수 있다. 또한 상기 생리활성 고분자가 F127인 경우 이는 최종 혼합 조성물 내에서 F127의 농도가 1 내지 20(w/v) %, 바람직하게는 3 내지 10 (w/v) %이 되도록, 제2용액 내에 2 내지 40(w/v) %, 바람직하게는 6 내지 20 (w/v) %로 포함될 수 있다.

[53] 본 발명에 있어, 키트는 의료적 목적으로 사용되는 의료 기기와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며 바람직한 형태는 더블 시린지 형태일 수 있다.

[54]

[55] 또한 본 발명은 1) 피브리노젠 10 내지 1000mg/ml 를 제1용액으로 준비하는 단계; 2) 트롬빈 및 생리활성 고분자를 혼합하여 제2용액을 준비하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[56] 본 발명의 제조방법에 따르면, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 하이드로겔의 준비물질 제조 단계를 포함하여, 섬유연골 또는 탄성연골 재생이 필요한 개체에 치료/시술이 필요한 경우 신속하게 하이드로겔을 제조하여 최소 침습적 방법을 통해 관절강 내로 하이드로겔을 주입할 수 있다. 즉 본 발명의 제조방법은 피브리노젠을 주성분으로 하는 제1용액의 준비과정 및 트롬빈과 생리활성 고분자, 바람직하게는 PEO 또는 F127의 혼합물을 주성분으로 하는 제2용액의 준비과정, 그리고 제1용액과 제2용액이 더블 시린지 내에서 혼합되어 고형화되며 체내에 주입되는 과정을 포함할 수 있다.

[57] 따라서 본 발명은 3) 상기 제1용액 및 제2용액을 혼합하여 피브린과 생리활성 고분자가 상호침투복합체 (IPN) 구조를 형성하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 하이드로겔을 제조하는 단계; 를 더 포함할 수 있다.

[58] 또한 본 발명의 제조방법에 있어서, 제1용액에는 혈소판 풍부 혈장을 더 포함할 수 있으며, 피브리노젠과 혈소판 풍부 혈장을 1:1 내지 1:2의 부피비로 더 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[59] 본 발명의 제1용액 또는 제2용액에는 섬유연골 또는 탄성연골 재생에 필요한 생리 활성 물질이 더 포함될 수 있으며, 상기 생리 활성 물질은 세포배양배지 또는 성장인자 일 수 있다.

[60]

[61] 또한 본 발명은 본 발명의 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생 방법을 제공한다.

[62] 또한 본 발명은 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[63] 또한 본 발명은 본 발명의 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 치료를

필요로 하는 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환 치료 방법을 제공한다.

- [64] 본 발명의 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물을 투여하는 단계는 본 발명의 키트에 포함된 제1용액과 제2용액이 혼합되어 즉시 형성되는, 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 투여하는 것을 특징으로 하며, 상기 제조된 하이드로겔은 최소 침습적 방법을 통해 관절강에 주입되고, 오랜 시간 주입 부위에 분해 효소 저항성을 나타내며 손상된 부위에 접착 혹은 유치되어 머무르면서, 주위 세포의 거동을 향상시켜 섬유연골 또는 탄성연골, 바람직하게는 손상된 슬관절 반월상 연골판을 효과적으로 재생시킬 수 있다. 재생된 반월상 연골판은 전단 및 압축 탄성력이 매우 우수하며, 정상 연골판의 50 내지 80%의 강도를 유지할 수 있어, 상용화된 피브린 단독 하이드로겔 대비 강도가 우수하고, 섬유연골 또는 탄성연골 재생 및 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환 치료에 매우 효과적이다.

- [65] 상기 섬유연골 또는 탄성연골 결손이란, 섬유연골, 섬유연골 조직 및/또는 관절조직(활막, 관절포, 연골하골 등)이 기계적 자극이나 염증 반응에 의해 상해된 섬유연골 손상 혹은 기타 선천적 혹은 후천적 요인에 의한 탄성연골 손상 혹은 결손을 말한다. 이러한 섬유연골 또는 탄성연골 결손으로 인한 질환은 바람직하게는 섬유연골 또는 탄성연골의 손상 또는 결손으로 인해 발생하는 질환일 수 있고, 더욱 바람직하게는 척추사이원판 탈출증, 치골간판 손상, 악관절 손상, 복장빋장관절의 관절원반 손상, 손목 관절의 삼각섬유연골 복합체 파열, 척골 충돌 증후군, 퇴행성 관절염, 반월상 연골판 손상, 류마티스성 관절염, 외이(external ear) 결손, 및 후두덮개(epiglottis) 또는 후두연골 결손으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 척추사이원판 탈출증은 디스크라고도 불리며, 척추체간 혹은 치골 사이에서도 발생할 수 있다. 상기 퇴행성 관절염 및 류마티스성 관절염은 섬유연골 또는 탄성연골의 손상에 의하여 발생 혹은 악화될 수 있는 질환으로, 섬유연골 또는 탄성연골의 손상 회복 및 재생을 통해 치료 혹은 호전될 수 있다. 이와 관련하여 당 분야에서는 슬관절의 초기 퇴행성 골관절염 치료를 위하여 연골판 절제술시 최소한의 절제를 하거나, 연골판 결손이 심한 경우에 연골판 이식술과 같은 수술적 방법을 수행하여 섬유연골 또는 탄성연골의 소실을 최소화하거나 대체하는 방법을 통해 퇴행성 골관절염의 발생을 줄일 수 있음이 알려져 있다.

- [66] 치료 방법은 조성물을 표적 부위, 예컨대 관절로 직접 주사 또는 이식하는 것을 포함할 수 있다. 조성물의 투여는 종종, 일, 주, 주 당 수회, 격월, 월당 수회, 월단위의 빈도로, 또는 증상의 경감을 제공하기 위해 필요한 만큼의 빈도로 실행될 수 있다. 관절 내 사용의 경우, 관절의 크기 및 상태의 심각도에 따라, 투여되는 조성물의 양을 조절할 수 있다. 당 관절로의 후속 투여의 빈도는 상기 관절에서의 증상의 재발 시간에 따라 간격을 두게 된다.

- [67] 임의의 특정 환자에 대한 특정 투여량 수준은 채택된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 전반적 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배설률, 약물 조합 및 치료 중인 특정 질환의 극심도를 포함하는 다양한 인자에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 약물 조성물은 투여량 단위로 제조되고 투여될 수 있다. 그러나, 특별한 상황에서, 더 많거나 더 낮은 용량 단위가 적절할 수 있다. 상기 투여량 단위의 투여는 상기 조성물의 일회 투여 및 또한 특정 간격으로 분할된 용량의 복수 투여 둘 모두에 의해 진행되거나 또는 투여는 수개의 더 작은 용량 단위로 실행될 수 있다.
- [68] 일 구체예에서, 섬유연골 또는 탄성연골 결손질환은 반월상 연골판 손상이고, 상기 조성물은, 예를 들어, 무릎과 같은, 관절 공간에 투여된다.
- [69] 예를 들어, 무릎 반월상 연골판 손상을 갖는 개체는 무릎 당 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml 이상의 주사를 1, 2, 또는 3회 맞을 수 있다. 다른 관절의 경우, 투여되는 부피는 그 관절의 크기에 기초하여 조정될 수 있다.
- [70] 그러나, 임의의 특정 환자에 대한 특정 투여량 수준은 채택된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 전반적 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배설률, 약물 조합 및 치료 중인 특정 질환의 극심도를 포함하는 다양한 인자에 의존적으로 변경될 수 있다.
- [71] 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 포함되는 상기 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물에 더하여 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [72] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [73] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화합으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[74]

발명의 실시를 위한 형태

- [75] 실시예 1. 하이드로겔 제조용 제1용액 및 제2용액 제조
- [76] 결손된 인체 조직 재생을 최소 침습적 방법만으로 달성하기 위하여, 하이드로겔 제조물질인 제1용액 및 제2용액을 제조하였다.
- [77]
- [78] **1.1 피브린과 폴리에틸렌옥사이드 (PEO) 를 이용한 하이드로겔 제조물질 제조**
- [79] 피브린과 PEO를 이용한 하이드로겔의 제조물질인 제1용액 및 제2용액을 제조하였다. 제1용액은 피브리노젠 (Sigma-Aldrich) 10 내지 1000 mg/ml 및 아프로티닌 (Sigma-Aldrich) 100 ~ 5500 KIU/ml를 혼합하여 제조하였다. 제2용액은 트롬빈(이연제약) 분말이 100 내지 2500 Unit(U)/mL의 농도로 용해된 용제에 PEO 와 염화칼슘을 37°C에서 용해시켜 제조하였으며, PEO의 농도는 1 내지 100 mg/ml, 그리고 염화칼슘의 농도는 5 내지 50 mg/ml 로 하여 제조하였다. 이와 같이 제조된 제1용액과 제2용액을 혼합하여 제조되는 상호침투복합체 구조를 형성하는 하이드로겔을 '피브린-PEO'로 명명하였다.
- [80]
- [81] **1.2. 피브린과 플루로닉 127 (F127) 을 이용한 하이드로겔 제조 물질 제조**
- [82] 피브린과 F127 를 이용한 하이드로겔의 제조물질인 제1용액 및 제2용액을 제조하였다. 제1용액은 상기 실시예 1.1 에서 명시된 구성과 동일하게 제조하였으며, 제2용액의 준비과정에 있어서 F127 (Sigma Aldrich, P2443) 은 2 내지 200 mg/ml 농도로 이용하고, 0 내지 4°C의 ice bath에서 트롬빈 용액에 용해시켜 제조하였다. 이와 같이 제조된 제1용액과 제2용액을 혼합하여 제조되는 상호침투복합체 구조를 형성하는 하이드로겔을 '피브린-F127'로 명명하였다.
- [83]
- [84] **1.3. PRP가 함유된 피브린과 PEO 을 이용한 하이드로겔 제조 물질 제조**
- [85] 제1용액으로 피브린과 토끼 혈액에서 분리하여 얻은 혈소판풍부 혈장 (Platelet-Rich Plasma, PRP) 을 포함하고, 제2용액으로 PEO 및 트롬빈을 포함하는 PRP 가 함유된 피브린-PEO 하이드로겔 제조물질을 제조하였다. 피브리노젠 용액과 혈소판 풍부 혈장을 1.0: 0.1 ~ 1.0: 0.7 부피비로 혼합하여 제1용액을 제조하였고, 제2용액은 실시예 1.1 과 동일하게 제조하였다. 이와 같이 제조된 제1용액과 제2용액을 혼합하여 제조되는 상호침투복합체 구조를 형성하는 하이드로겔을 '피브린-PEO-PRP'로 명명하였다.
- [86]
- [87] **1.4. PRP가 함유된 피브린과 F127을 이용한 하이드로겔 제조 물질 제조**
- [88] 제1용액으로 피브린과 토끼 혈액에서 분리하여 얻은 혈소판풍부 혈장 (Platelet-Rich Plasma, PRP) 을 포함하고, 제2용액으로 플루로닉 127 및 트롬빈을 포함하는 상호침투 고분자망을 제조하였다. 피브리노젠 용액과 혈소판 풍부 혈장을 1.0: 0.1 ~ 1.0: 0.7 부피비로 혼합하여 제1용액을 제조하였고, 제2용액은 실시예 1.2와 동일하게 제조하였다. 이와 같이 제조된 제1용액과 제2용액을

혼합하여 제조되는 상호침투복합체 구조를 형성하는 하이드로겔을 '피브린-F127-PRP'로 명명하였다.

[89]

[90] **1.5 즉각적인 겔화 확인**

[91] 상기 제조된 실시예 1.1 내지 1.4에서 제1용액과 제2용액을 각각 더블 시린지의 1구획 및 2구획에 포함시켰으며, 시술 시 각각의 용액이 개별 구획에서 흘러나와 합쳐지면서 즉각적으로 겔화되어 3차원 구조체를 형성할 수 있도록 제조하였다. 이의 모식도 및 고형화된 하이드로겔을 도 1에 나타내었다.

[92] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에서 실시예 1.1 내지 1.4의 하이드로겔 제조 물질은 모두 즉각적인 겔화를 통해 3차원 구조체 하이드로겔을 형성하였음을 확인하였다. 이와 같이 제조된 하이드로겔은 피브린의 사이 사이에 PEO 또는 F127 이 부분 침투하여 IPN(interpenetrating polymer network) 을 형성하여 제조되는 것을 특징으로 한다.

[93]

[94] **실시예 2. 트롬빈 농도에 따른 하이드로겔의 압축 및 전단탄성률 확인**

[95] 피브리노겐과 트롬빈의 농도 조합에 따라 생성되는 하이드로겔의 탄성률 변화를 확인하기 위하여, 하이드로겔을 직경 8.0 mm의 틀에 제작하여 전단탄성률과 압축탄성률을 측정하였다. 전단탄성률은 rheometer (ARES-LS, TA Instruments)를 이용하여 측정하였고 plate 간격은 900 μm 로 설정하고 진동수 조건은 0.1에서 100 Hz로 조절하였다. 압축탄성률은 만능인장시험기(Instron 5966, Instron Corporation)를 이용해 측정하였다. 응력-변형률 그래프에서 탄성구간을 가지는 구간의 기울기를 이용해 압축탄성률(E) 값을 도출하였다. 피브리노겐의 농도는 일정한 농도인 100mg/ml 로 고정하고 트롬빈의 최종 농도가 250 U/mL, 500 U/mL 및 1250 U/mL 이 되도록 혼합되기 전 제2용액의 트롬빈의 농도를 500, 1000, 2500 U/mL로 조절하여 하이드로겔을 제조하였으며, 제조 후 전단 탄성률과 압축 탄성률을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[96] 도 2에 나타낸 바와 같이, 피브리노겐 및 트롬빈으로 제조된 하이드로겔에서 트롬빈 농도 변화에 따른 구성된 단순 고분자망 하이드로겔의 전단 탄성률 변화 그래프 (A), 압축 탄성률 변화 그래프 (B) 를 확인한 결과, 트롬빈 농도를 250, 500, 1250 U/ml 순으로 증가시켰을 때, 피브린 하이드로겔의 전단 탄성률은 100 rad/s 에서 각각 14.1 ± 1.0 , 14.7 ± 0.7 , 15.4 ± 0.6 kPa 순으로 증가했음을 확인하였다. 또한 압축 탄성률 또한 트롬빈의 농도가 증가할수록 증가하여 트롬빈 농도를 250, 500, 1250 U/ml 순으로 증가시켰을 때, 피브린 하이드로겔의 압축 탄성률은 각각 29.9 ± 3.1 , 43.1 ± 5.2 , 93.6 ± 9.0 kPa 순으로 증가했음을 확인하였다.

[97]

[98] **실시예 3. PEO 및 F127 추가에 따른 압축 탄성률 확인**

[99] 제2용액으로 PEO 또는 F127을 추가하였을 때의 하이드로겔의 압축탄성률을 측정하였다. 제1용액의 피브리노겐의 농도는 일정한 농도인 100mg/ml 로

고정하였다. 최종 혼합 조성물 내 트롬빈의 농도가 1250U/ml 이 되도록 제2 용액 중 트롬빈의 농도를 2500 U/mL로 고정하고, 최종 혼합 조성물 내 PEO의 농도가 1.0, 3.0, 5.0 % (w/v)가 되도록 제2용액 중 PEO의 농도를 2.0, 6.0, 10.0 % (w/v)으로 변화시켰으며, 최종 혼합 조성물 내 F127 농도가 3.0, 7.0, 10.0 % (w/v) 이 되도록 6.0, 14.0, 20.0 % (w/v)로 변화시켜 제2용액을 제조하였다. 각 제조예에 따른 압축 탄성률 변화를 확인하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[100] 도 3에 나타낸 바와 같이, PEO 농도를 1.0, 3.0, 5.0 % (w/v)로 혼합하여 하이드로겔을 제작하였을 때, 각각 103.3 ± 4.9 kPa, 108.4 ± 4.8 kPa, 120.1 ± 3.3 kPa 의 압축탄성률 (A) 을 나타냈고, F127의 농도를 3.0, 7.0, 10.0 % (w/v)로 혼합하여 하이드로겔을 제작하였을 때, 각각 72.0 ± 4.3 kPa, 122.0 ± 9.6 kPa, 156.0 ± 9.8 kPa의 압축탄성률 (B) 을 나타냈다.

[101] 또한 트롬빈 농도 1250 U/ml 조건 하에서 PEO 농도 변화에 따라 형성된 피브린-PEO 하이드로겔의 전단 탄성률 변화를 확인한 결과, PEO 농도를 1.0, 3.0, 5.0 % 순으로 증가시켰을 때, 제조된 피브린-PEO 하이드로겔의 전단 탄성률은 100rad/s 조건에서 각각 15.4 ± 1.3 , 18.5 ± 1.2 , 21.5 ± 1.5 kPa 순으로 증가했음을 확인하였다.

[102]

[103] 실시예 4. PEO 및 F127에 PRP 추가에 따른 압축 탄성률 확인

[104] 트롬빈 2500 U/mL, PEO 10.0 % 또는 F127 20.0 % 를 혼합하여 제2용액을 제조하였다. 제1용액은 피브리노젠을 200mg/ml 로 하고, 혈소판풍부 혈장 (PRP) 을 제1용액과 1:1의 부피비로 혼합하여 제조하여 최종 피브리노젠의 농도가 100mg/ml 이 되도록 하였으며, 제1용액과 제2용액을 혼합하여 즉각적인 고체화를 통해 하이드로겔을 제작하였다. 제조된 하이드로겔은 피브린-PEO-PRP 또는 피브린-F127-RPR 로 명명하였다. 혈소판 풍부 혈장이 하이드로겔의 물성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈소판풍부 혈장을 포함하지 않은 실험군 (피브린-PEO, 피브린-F127), 피브린 단독 포함 실험군을 통해 전단 탄성률 변화를 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 4 및 표 1 에 나타내었다.

[105]

[106] [표1]

100 rad/s에서의 전단 탄성률 (kPa)	
피브린+PEO	21.2 ± 2.98
피브린+PEO+PRP	30.59 ± 2.39
피브린+F127	23.88 ± 2.55
피브린+F127+PRP	31.32 ± 4.65

[107] 도 4 및 표 1에 나타낸 바와 같이, 전단 탄성률을 측정된 결과, 피브린에 PEO,

F127이 혼합된 그룹 모두 동일한 조건에서 혈소판 풍부 혈장이 첨가되었을 때 더 높은 전단 탄성률을 나타내었다.

[108]

[109] 실시예 5. 체내 지속 효과확인을 위한 효소 분해 양상 비교

[110] 본 발명의 제1용액 및 제2용액의 혼합을 통해 제조되는 하이드로겔의 효소처리 하에서 분해양상을 in vitro에서 확인하고자 트립신 0.00125 % 용액에 하이드로겔을 담근 후, 시간별로 그 무게를 측정하여 최초 무게와 비교하여 분해속도를 측정하였다. 구체적으로 피브린 기반 하이드로겔의 체내 주입 시 피브린 분해 양상을 예상하기 위해 대표적인 피브린 단백질 분해 효소인 트립신을 사용하여 체외에서 분해 양상을 확인하였으며, 0.00125% 트립신/EDTA 조건 하에서 대조군 피브린 하이드로겔과 실시예 4에서 제조한 피브린+PEO, 피브린+PEO+PRP, 피브린+F127, 피브린+F127+PRP 을 통해 제조된 하이드로겔의 분해 양상을 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

[111] 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군인 피브린 하이드로겔은 트립신 처리 120 시간 경과 이전에 완전히 분해되었으나, 본 발명에서 제작한 하이드로겔 중 피브린+PEO 군은 192 시간, 피브린+F127 은 264 시간에 도달해야만 분해되는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에서 제작한 하이드로겔은 PEO 또는 F127의 부분 상호침투 효과로 인해 대조군 피브린 하이드로겔에 비해 평균 72시간 분해를 늦출 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 하이드로겔을 이용하면 보다 오랜 시간 체내에 머물며 목적하는 효과를 달성할 수 있음을 확인하였다.

[112]

[113] 실시예 6. 생체 적합성 확인

[114] 실시예 4에서 제조한 피브린-PEO 또는 피브린-F127 하이드로겔이 치료제로 사용하는데 적합한지 여부를 확인하기 위하여 생체적합성 확인 실험을 수행하였다. 토끼 연골에서 얻은 섬유성 연골세포(fibrochondrocyte)를 피브리노겐을 포함하는 제 1용액에 1×10^5 cell/mL의 농도로 혼합한 뒤 이를 PEO 또는 F127을 포함하는 제2용액과 혼합하여 하이드로겔을 제작하였으며, 하이드로겔 내부에 세포를 캡슐화시켰다. 이후 하이드로겔을 24시간동안 F-12 배지에서 배양하고 Live/Dead assay kit (Invitrogen)를 사용해 살아있는 세포와 사멸된 세포를 각각 염색하여 형광현미경(AMF4300, EVOS, Life Technology)을 이용해 관찰하였다. 10 배율 이미지 4 개를 촬영하고 아래 식을 이용하여 세포 생존율을 계산, 비교하고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[115] 세포생존율 = 생존한 세포 수 / 전체 세포 수 $\times$ 100

[116] 도 6에 나타낸 바와 같이, 대조군 피브린 하이드로겔과 비교한 결과, PEO 또는 F127을 포함하여 제조된 하이드로겔 역시 붉은색으로 염색된 사멸된 세포가 거의 관찰되지 않았으며, 시간 별, 하이드로겔 세포 생존/사멸 형광 이미지를 확인한 결과 본 발명에서 제조한 피브린-PEO 및 피브린-F127 하이드로겔 모두에서 대조군 피브린 하이드로겔과 비교 시 세포 생존의 차이가 없음을

확인하였다. 따라서 본 발명에서 제조된 하이드로겔은 모두 생체 내 투여 시 생체에 오래 잔존함에도 생체 적합성이 우수함을 확인하였다.

[117]

[118] 실시예 7. 반월상 연골 손상 동물모델에서 반월상 연골판 재생 효과 검증

[119] 상기 실시예 4 에서 제조된 피브린과 PEO 또는 피브린과 F127 를 이용하여 제조되는 하이드로겔이 반월상 연골판 손상 동물모델에서 반월상 연골판 재생 효과를 나타내는지 검증하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[120] 보다 구체적으로, 가토(rabbit) 관절 연골 손상 동물모델을 제작하기 위하여, 건강한 가토를 선택하여 체중에 따른 적절한 양의 케타민과 럼폰으로 주사마취한 후, 가토가 충분히 전신마취가 되었음을 확인하고, 양쪽 하지의 슬관절 부위를 면도한 후, 자세를 유지시키면서 반창고로 고정하였다. 양측 슬관절 부위를 포비돈으로 소독하고, 슬개골을 축지하여 위치를 확인한 후, 슬관절의 위, 아래, 슬개골의 내측을 지나는 절개선을 따라 방정중 접근(paramedian approach)으로 슬관절 내에 도달하고, 슬개골을 외측으로 젖히면서 슬관절을 굴곡시켜 관절 내부를 관찰하였다. 특이한 병적 소견이 없음을 확인한 후, 반월상 연골판을 3분의 2 이상 제거 (meniscectomy) 하였다. 상기와 같이 반월상 연골판 손상을 유발하고, 이후 슬개골을 원래 위치로 되돌린 후, 슬개골 주위의 연부 조직을 흡수성 실로 봉합하고, 피부를 비흡수성실로 봉합하였다. 가토가 마취에서 깨어나는 것을 확인한 후 자유롭게 움직일 수 있도록 허용하였으며, 수술 후 5일간 감염을 막기 위해 진통제와 항생제를 투여하였다. 일주일 뒤에, 준비된 더블시린지(double syringe) 주사기 1 구획에는 피브리노겐 100mg/mL, 아프로티닌 0.5 mg/mL을, 주사기 2 구획에는 트롬빈 2500 U/mL, 염화칼슘 5 (w/v)% 또는 트롬빈 2500 U/mL, 염화칼슘 5 (w/v)% 과 PEO 10.0 %, 또는 트롬빈 2500 U/mL, 염화칼슘 5 (w/v)% 과 F127 20.0% 을 넣은 뒤, 상기 동물 모델의 왼쪽에 피부를 절개하지 않고, 반월상 연골판 손상 부위에 주입하였다. 반대측 다리에는 아무것도 처리하지 않았다. 4주, 8주 및 16주가 경과한 후, 각 가토로부터 손상 및 치료를 수행하였던 반월상 연골판을 떼어 내어 육안적 평가를 실시하였으며, 이를 재생된 반월상 연골판의 면적을 image J 프로그램을 사용하여 측정하여 평가하였다. 또한 조직을 고정한 후, H&E, Safranin O 염색 및 Type I collagen 에 대한 면역염색을 수행하였으며, Histological tissue quality score 를 이용한 정량화를 통해 재생된 반월상 연골판을 분석하였다. 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[121] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 피브린만 단독으로 포함하여 제조된 대조군 하이드로겔에 비해 피브린-PEO 및 피브린-F127 하이드로겔을 주입한 군에서는 4주부터 fibrous 한 조직이 생성되기 시작하여 12주에는 반월상 연골판 조직과 유사한 조직이 생성되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 가토의 반월상 연골판 손상 1주일 후에 피브린-PEO 및 피브린-F127 하이드로겔을 피부 절개 없이 주입하더라도 4주, 8주, 12주에 반월상 연골판이 재생될 수 있음을 보여주는

결과이다. 따라서 피브린-PEO 및 피브린-F127 하이드로겔을 이용하면, 손상된 슬관절 반월상 연골판 부위에서 주위 세포의 거동으로 인해 연골판 세포를 우수한 효율로 생성할 수 있어, 효과적으로 반월상 연골판 손상을 치료할 수 있음을 확인하였다.

[122]

[123] 실시예 8. 재생된 반월상 연골판의 압축강도 시험

[124] 반월상 연골 지지체의 중요한 물성은 외부에서 가해지는 힘에 견딜 수 있는 압축 강도이다. 따라서 상기 실시예 7에서 12주째 재생된 반월상 연골판을 4mm 편치를 이용해 2군데로 샘플을 잘라낸 후 인장력 측정기로 압축강도를 측정하여, 본 발명의 피브린-PEO 및 피브린-F127 하이드로겔을 주입하여 재생된 반월상 연골판의 강도를 확인하고 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[125] 도 9에 나타낸 바와 같이, 아무것도 처리 하지 않은 (meniscectomy only)군과 피브린을 단독 처리한 군에 비해 피브린-PEO, 피브린-F127 하이드로겔의 주입을 통해 재생된 조직의 압축강도가 눈에 띄게 증가하는 것을 확인하였다. 구체적으로 아무것도 처리하지 않은 Meniscectomy only에서 Mpa 값은 203.3 ± 43.2 , 피브린을 단독 주입한 군에서는 844.9 ± 32.6 의 압축 강도를 확인하였으며, 피브린+PEO 하이드로겔을 주입한 군에서는 4086.7 ± 542.1 , 피브린+F127 하이드로겔을 주입한 군에서는 3406.8 ± 312.1 , 그리고 Normal meniscus 의 경우에는 6688.6 ± 1012.5 값을 확인하였다. 따라서 본 발명의 피브린+PEO 하이드로겔 및 피브린+F127 하이드로겔을 주입하여 재생된 반월상 연골판의 강도가 정상 연골판의 60% 이상 되는 것을 확인하여 연골판 재생에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

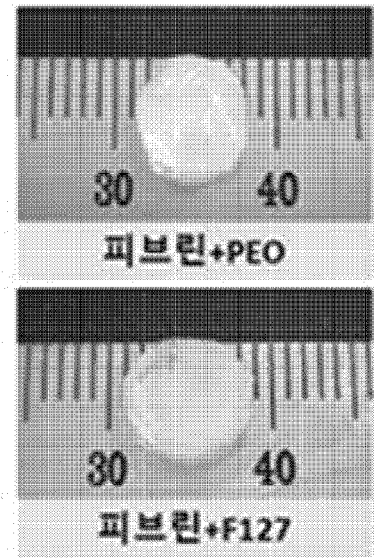
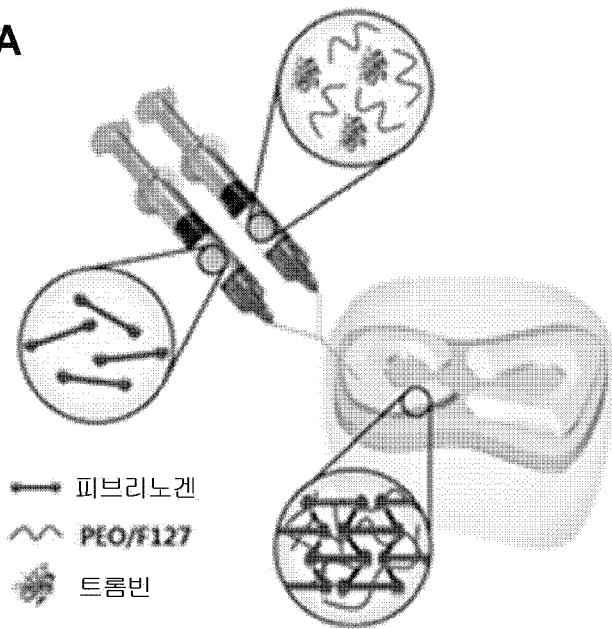
청구범위

- [청구항 1] 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, PEO) 및 플루로닉 (Fluronic) 으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종인, 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 섬유연골 또는 탄성연골은 추간판 연골(intervertebral disc), 치골섬유연골결합(symphysis pubis) 연골, 반월상 연골판(meniscus), 관절내 섬유연골복합체 (fibrocartilage complex), 악관절 연골, 복장빗장관절 (sternoclavicular joint) 의 관절원반, 비구순 (acetabular fossa) 연골, 외이(external ear), 후두덮개(epiglottis) 및 후두연골로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 하이드로겔은 트립신 분해 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 하이드로겔은 100 radian/sec 의 조건 하에서 15 내지 40 kPa 의 전단 탄성률 또는 10 내지 200kPa 의 압축 탄성률을 갖는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 스캐폴드.
- [청구항 8] 피브리노겐 용액을 포함하는 제1구획; 및 트롬빈 및 생리활성 고분자를 포함하는 제2구획을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 제1구획은 혈소판 풍부 혈장 (platelet-rich plasma, PRP)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 피브리노겐은 10 내지 1000mg/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 트롬빈은 100 U/ml 내지 5000 U/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 생리활성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드이며, 2 내지 20 % (w/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.

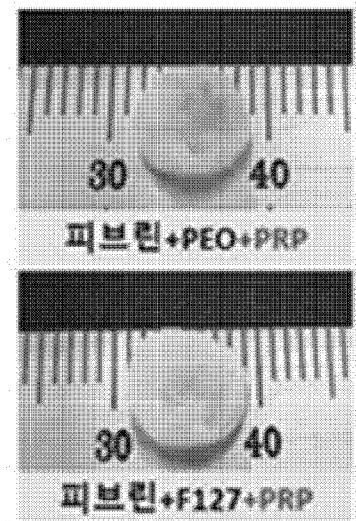
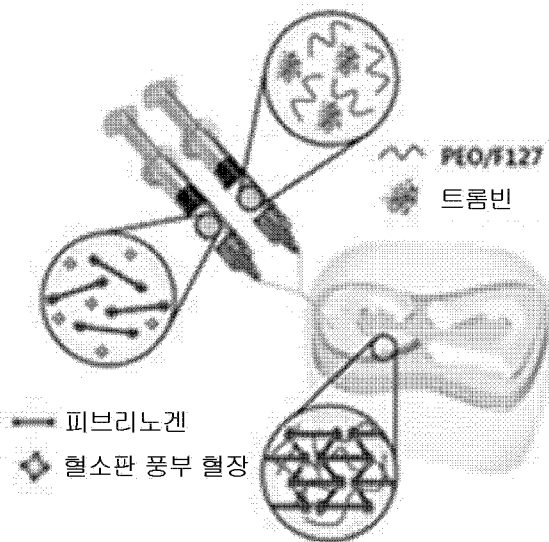
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 생리활성 고분자는 플록사머 127이며, 2 내지 40 % (w/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 14] 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키트는 더블 시린지 형태인 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 키트.
- [청구항 15] 1) 피브리노젠 10 내지 1000mg/ml 를 제1용액으로 준비하는 단계;
2) 트롬빈 및 생리활성 고분자를 혼합하여 제2용액을 준비하는 단계;를 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물의 제조방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 3) 상기 제1용액 및 제2용액을 혼합하여 피브린과 생리활성 고분자가 상호침투복합체 (IPN) 구조를 형성하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 하이드로겔을 제조하는 단계;를 더 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물의 제조방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 1) 단계의 제1용액은 혈소판 풍부 혈장을 더 포함하며, 피브리노젠과 혈소판 풍부 혈장을 1:1 내지 1:2의 부피비로 혼합하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 섬유연골 또는 탄성연골 재생용 조성물의 제조방법.
- [청구항 18] 피브린; 및 피브린과 상호침투복합체 (interpenetrating polymer network, IPN) 구조를 형성하는 생리활성 고분자;를 포함하는 하이드로겔을 포함하는 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환은 척추사이원판 탈출증, 치골간관 손상, 악관절 손상, 복장빗장관절의 관절원반 손상, 손목 관절의 삼각섬유연골 복합체 파열, 척골 충돌 증후군, 퇴행성 관절염, 반월상 연골판 손상, 류마티스성 관절염, 외이(external ear) 결손, 및 후두덮개(epiglottis) 또는 후두연골 결손으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 섬유연골 또는 탄성연골 결손 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[도1]

A

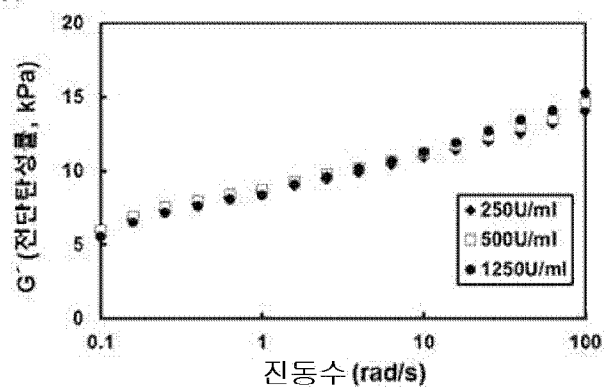


B

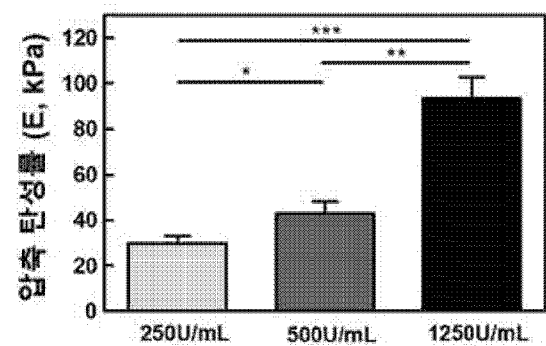


[도2]

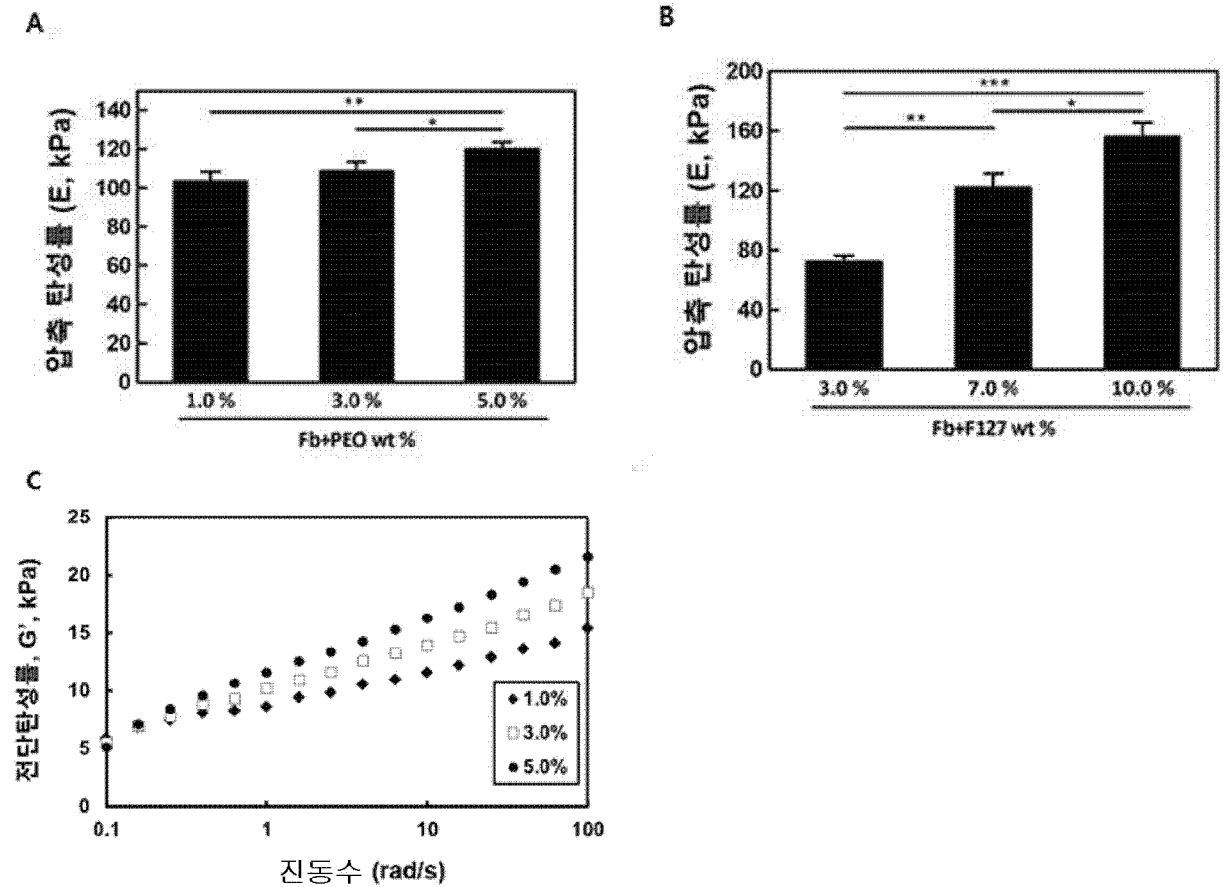
A



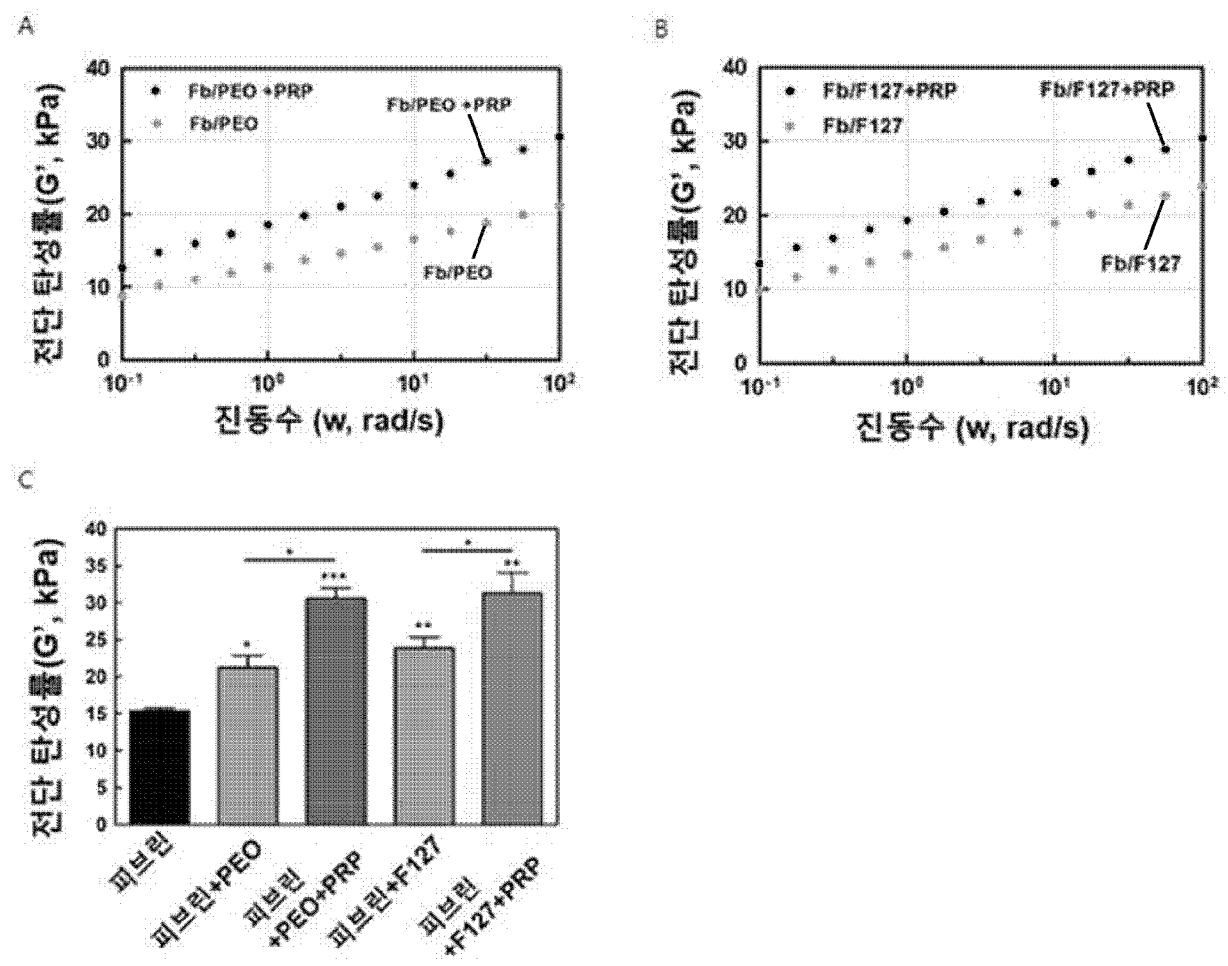
B



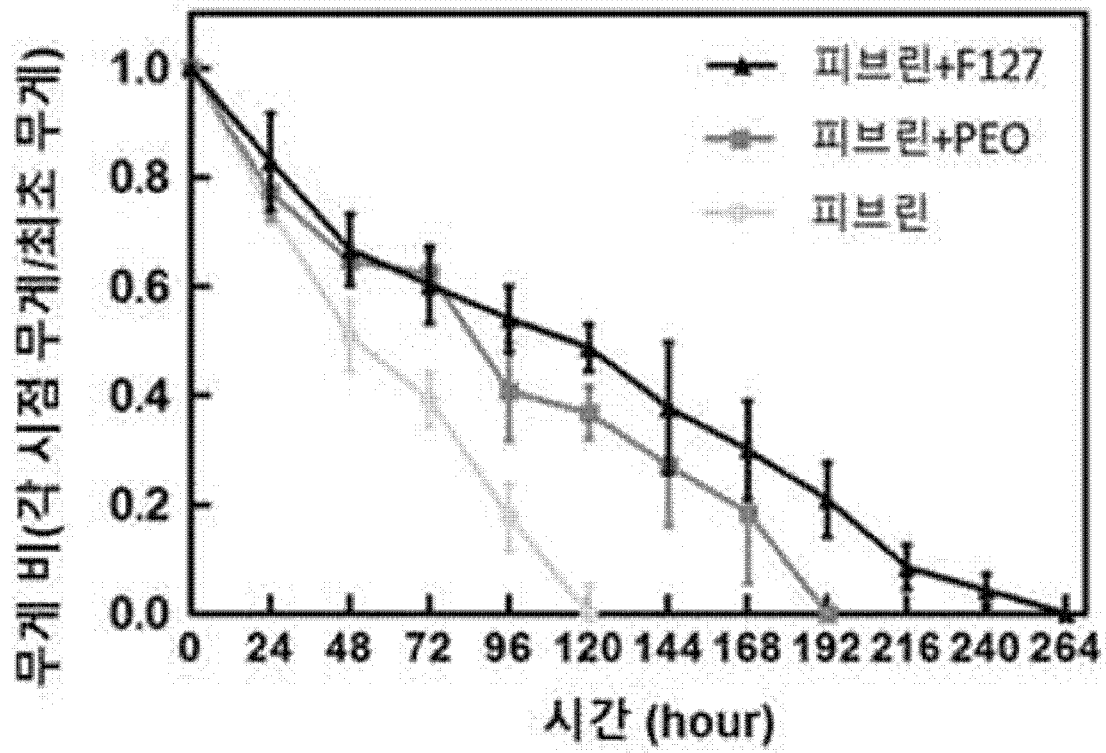
[도3]



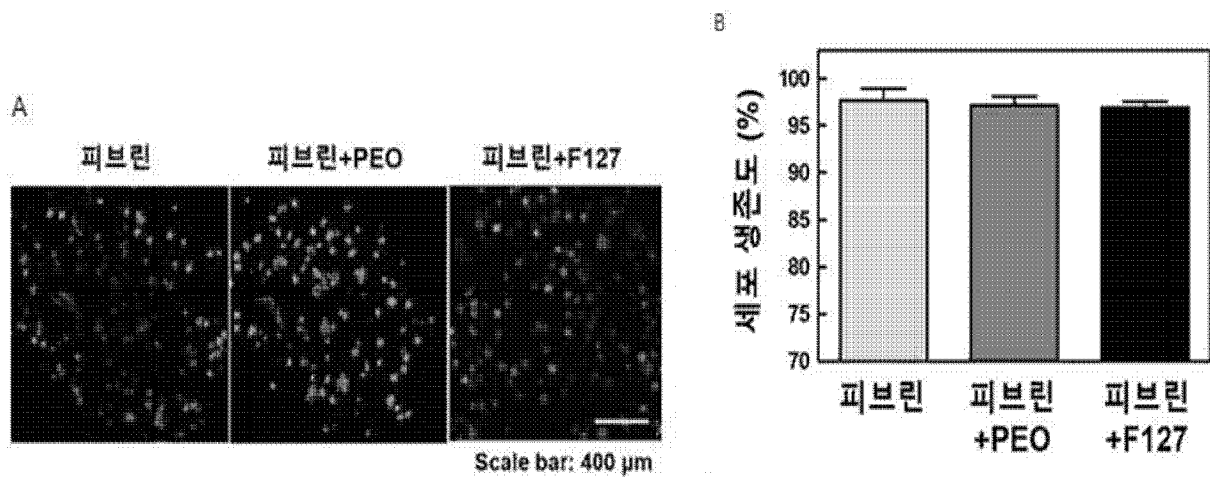
[도4]



[도5]

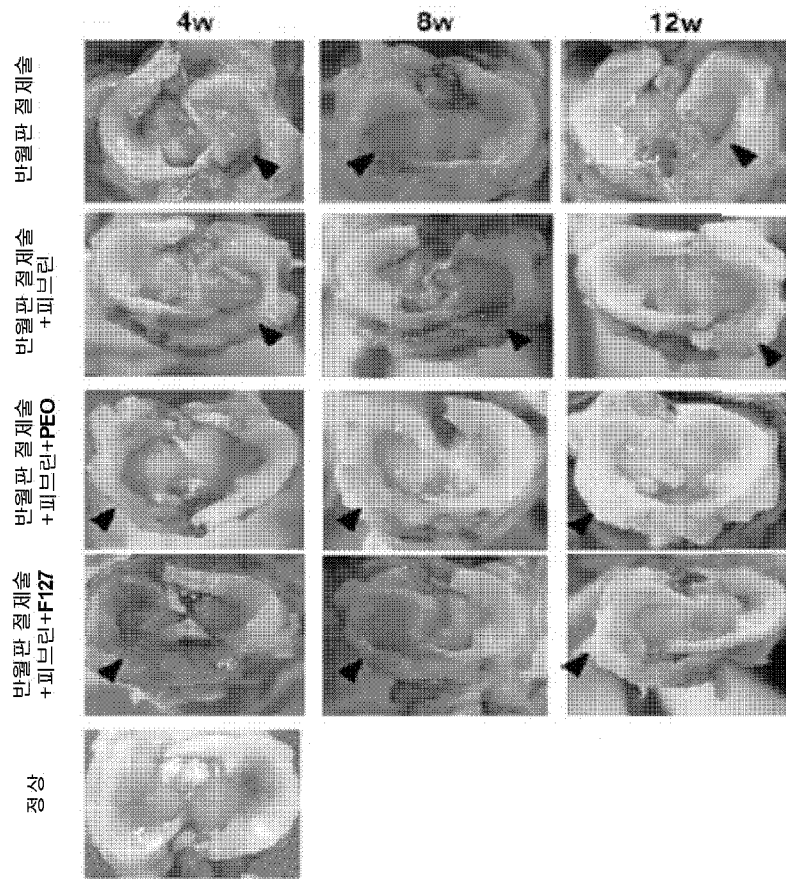


[도6]

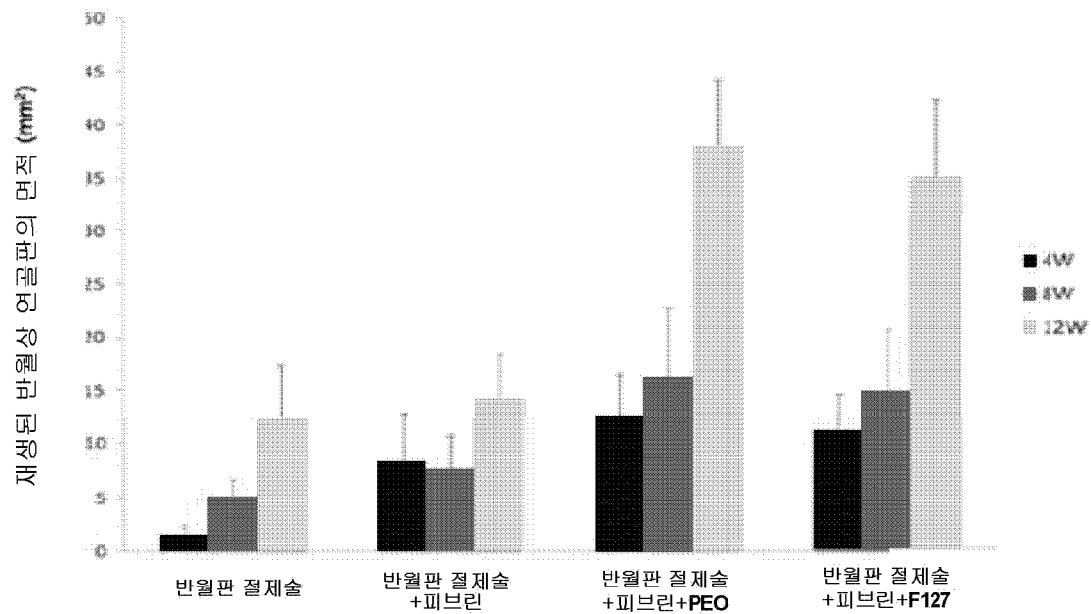


[도7]

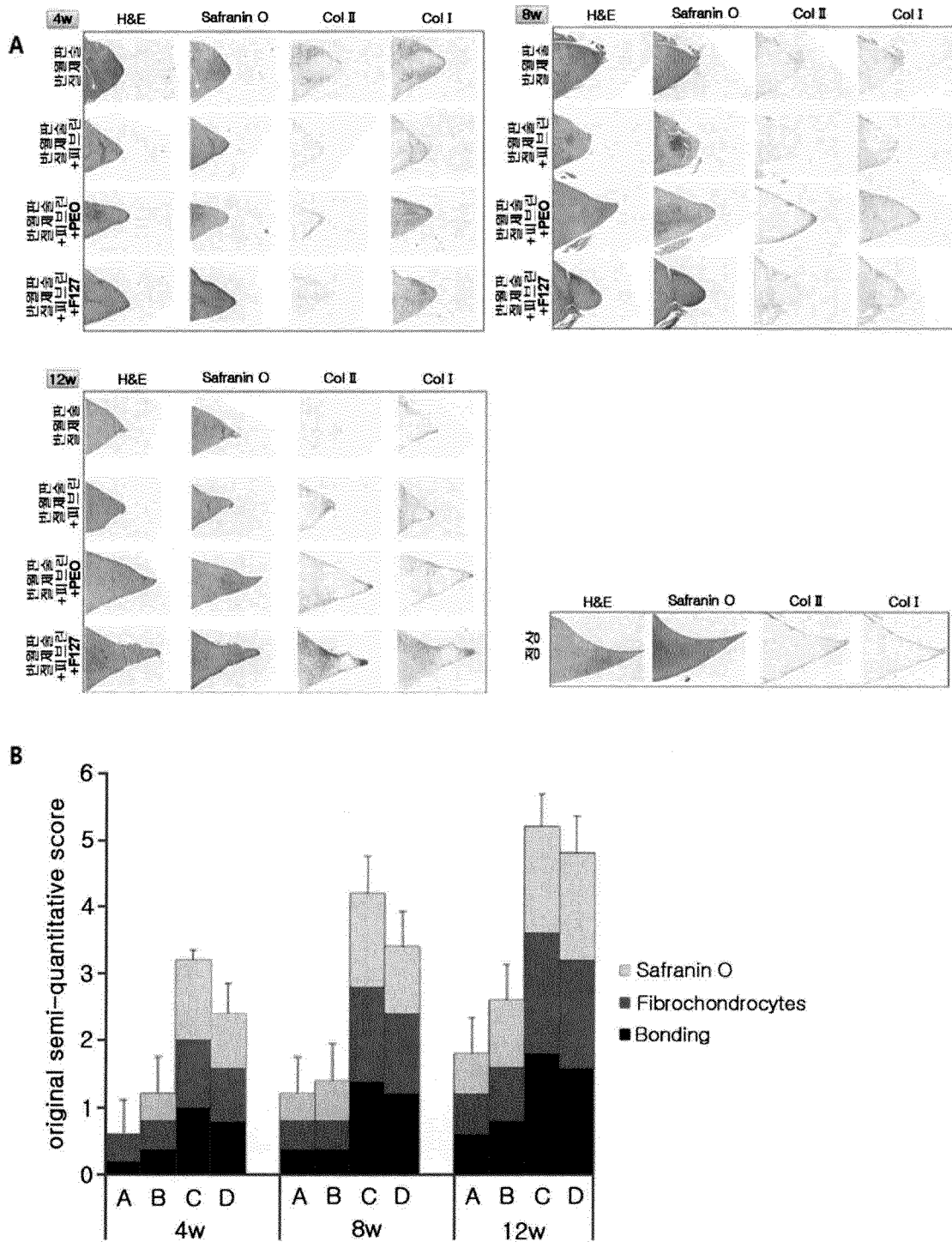
A



B



[도 8]



[도9]

