(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 3 월 9 일 (09.03.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/039294 A1

(51) 국제특허분류:
A61L 27/52 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009682

(22) 국제출원일: 2016 년 8 월 31 일 (31.08.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0124690 2015 년 9 월 3 일 (03.09.2015) KR

(71) 출원인: **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제컴퍼스내), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **이덕원 (LEE, Deok Won)**; 05278 서울시 강동구 동남로 892 (상일동, 강동경희대학교병원 4 층 치과병원 구강악안면외과), Seoul (KR). **김은철 (KIM, Eun Cheol)**; 06078 서울시 강남구 영동대로 128 길 15, 1 동 802 호(삼성동, 홍실아파트), Seoul (KR).

(74) 대리인: **고영갑 (KO, Young Kap)**; 13636 경기도 성남시 분당구 성남대로 69, 410 호 (구미동,로드랜드 EZ 타워), Gyeonggi-do (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

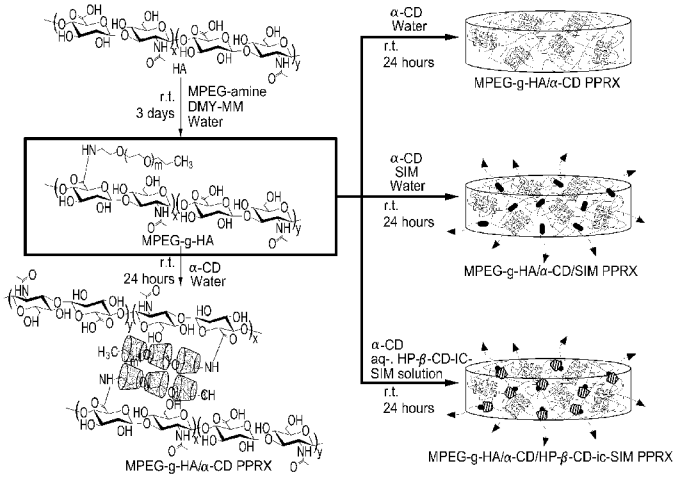
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: MACROMOLECULE-BASED HYDROGEL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 거대분자 기반 하이드로겔 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention provides a hydrogel composition containing: a polyrotaxane or Pseudopolyrotaxane (PPRX)-structured macromolecular hydrogel; and a bone formation promoting drug. The polyrotaxane or Pseudopolyrotaxane-structured macromolecule-based hydrogel composition according to the present invention improves the water solubility of a bone formation promoting compound capsulated in the hydrogel, thereby sustainedly releasing the bone formation promoting compound for a long period of time. Especially, in the hydrogel composition containing a bone formation promoting compound capsulated in the hydrogel in a form of an inclusion complex, the bone formation promoting compound is promptly released and the new bone formation is promoted. Therefore, the macromolecule-based hydrogel composition according to the present invention can be used as a biocompatible scaffold for bone tissue regeneration.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/039294 A1

본 발명은 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자 하이드로겔 및 골 형성 촉진 약물을 포함하는 하이드로겔 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산 구조의 거대분자 기반 하이드로겔 조성물은 하이드로겔에 캡슐화된 골 형성 촉진 화합물의 수 용해도를 개선시켜 골 형성 촉진 화합물을 장기간 지속적으로 방출할 수 있다. 특히, 골 형성 촉진 화합물이 포접 복합체의 형태로 하이드로겔에 캡슐화된 하이드로겔 조성물에서는 골 형성 촉진 화합물이 빠르게 방출되고 신생골 형성이 증진된다. 따라서, 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물은 골 조직 재생을 위한 생체 친화적 스캐폴드로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 거대분자 기반 하이드로겔 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 거대분자 기반 하이드로겔 조성물 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 폴리로탁산(polyrotaxane) 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자 하이드로겔 안에 골 형성 촉진 화합물이 포함된 형태의 조성물 및 이의 골 조직 재생 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 골 질환 및 골절에 의한 골 손실은 정형외과, 신경외과, 성형외과, 치과에서 흔한 진단이다. 골 재생은 약물이나 물리치료와 같은 전통적인 방법으로 유도될 수 있고, 광범위한 골 손 실의 경우 그 골은 수술에 의해 제거될 수 있다. 자가이식(Autografting)은 다른 가능한 방법들에 비해 골 손실을 치료하는 이상적인 방법이다. 그러나, 수술적 치료방법은 환자의 조직에 손상을 주기 때문에 약간의 한계를 가지고 있다. 나아가, 다른 2가지 타입의 이식 기법인 동종이식(allografting)과 이종이식(xenografting)은 면역학적 거부반응과 병원균 전파의 위험이 있기 때문에 임상적인 적용에 한계를 가진다. 최근에는, 조직공학이 이런 문제점들을 극복할 수 있는 이상적인 방법으로 부상하고 있다.

[3] 조직공학 용도의 지지체(Scaffold) 중에서, 하이드로겔(hydrogel)은 유연성, 강도 및 최적의 수분 함량을 부여할 수 있는 3차원적인 네트워크를 가지고 있다. 보고된 연구 결과에 의하면, 하이드로겔은 특히 골 재생 성장 인자 및 약물을 모두 함유할 수 있기 때문에 골 조직공학 용도의 지지체(Scaffold)로 특히 중요하다. 하이드로겔은 가교결합 되었는지 여부에 따라 물리적 물질 또는 화학적 물질로 분류될 수 있다. 화학적 하이드로겔은 가교결합제의 첨가에 의해 형성된다. 화학적 하이드로겔은 미반응 물질의 존재 때문에 세포독성을 유발한다. 반면, 물리적 하이드로겔은 정전기적 상호작용, pH 및 온도와 같은 물리적인 특성들의 변경에 의해 형성되거나 포접 복합체(inclusion complexes) 형태로 형성되기 때문에 세포독성이 없다.

[4] 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 및 폴리로탁산(Polyrotaxane, PRX)은 물리적 하이드로겔로서, 호스트(host) 분자와 게스트(guest) 분자 간의 포접 복합체(Inclusion complex) 형태로 이루어진다. 포접 복합체에서, 게스트에 해당하는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 및 폴리프로필렌글리콜(polypropylene glycol, PPG)과 같은 고분자는 호스트에 해당하는 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 관통하여 끼워진다[T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, H. Arima, and K. Uekama, Design and evaluation of polypseudorotaxanes of pegylated insulin with cyclodextrins as sustained release system. Biomaterials 29, 3866 (2008).; A. Harada, and M.

Kamachi, Complex formation between poly(ethylene glycol) and α-cyclodextrin. Macromolecules 23, 2821 (1990).; A. Harada, J. Li, and M. Kamachi, The molecular necklace: a rotaxane containing many threaded α-cyclodextrins. Nature 356, 325 (1992).]. 하이드로겔은 독특한 구조적 성질 때문에 인 비트로(in vitro) 조직공학 용도의 지지체(Scaffold) 뿐만 아니라 약물/유전물질 전달을 위한 운반체로 도입되어 왔다. 그러나, 하이드로겔을 생체에 적용한 사례는 매우 드물다.

[5] 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 및 폴리로탁산(Polyrotaxane, PRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔을 조직 재생 용도로 적용하는 선행기술을 살펴보면, 대한민국 등록특허공보 제10-0714742호에는 복수의 고리형 분자(예를 들어 α-사이클로덱스트린)를 관통시킨 선형 분자(예를 들어 폴리에틸렌글리콜)의 양쪽 말단에 가수분해성 결합에 의하여 부피가 큰 치환기를 갖는 생체친화성 기(예를 들어 아미노산, 올리고펩티드 등)가 도입된 폴리로탁산에 대하여, 이웃하는 폴리로탁산 1 분자 중에 포함되는 고리형 분자끼리를 가교용 선형 분자(예를 들어 폴리에틸렌글리콜비스아민)를 통하여 가교결합으로 가교한 그물코 구조의 폴리로탁산 히드로겔을 포함하는 조직 재생용 기재가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1263639호에는 인체 내에 매식될 수 있는 임플란트 베이스; 상기 임플란트 베이스의 표면에 화학결합되고, 생체적합성 선형고분자와 상기 생체적합성 선형고분자에 끼워진 고리형 분자와 상기 고리형 분자가 상기 생체적합성 선형고분자에서 이탈하지 않도록 상기 생체적합성 선형고분자의 양쪽 끝단에 가수분해 가능하도록 화학결합된 캡핑 분자를 포함하는 폴리로탁산; 및 상기 폴리로탁산에 가수분해 가능하도록 화학결합된 생체활성물질을 포함하며 상기 폴리로탁산은 인체 내의 효소에 의해 가수분해되는 것을 특징으로 하는 치과용 임플란트 재료가 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 골 형성 촉진 약물을 장시간 동안 지속적으로 방출할 수 있고 동시에 신생골 형성을 증진시킬 수 있는 하이드로겔 조성물 및 이의 용도를 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명의 발명자들은 히알루론산에 그래프트 결합된 메톡시 폴리에틸렌글리콜의 선형 사슬에 α-사이클로덱스트린을 관통시켜 형성한 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자 하이드로겔 및 상기 하이드로겔 안에 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 또는 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 포접 복합체(HP-β-CD-*ic*-SIM)를 캡슐화하여 거대분자 기반 하이드로겔 조성물을 제조하였다. 이후, 거대분자 하이드로겔 및 거대분자 기반 하이드로겔

조성물을 골 결손 부위에 식립하고 골 형성 활성을 마이크로-CT 분석과 조직학적 분석을 통해 평가하고 거대분자 기반 하이드로겔 조성물이 생체 내 골조직 공학 스캐폴드(Scaffold)로 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[8] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔 및 상기 하이드로겔 안에 배치된 골 형성 촉진 약물을 포함하는 하이드로겔 조성물을 제공한다. 상기 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자는 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 결 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체 및 상기 그래프트 공중합체의 선형 고분자에 끼워져 있는 다수의 고리형 분자로 구성되고, 상기 생체적합성 고분자는 카르복실기를 가진다.

발명의 효과

[9] 본 발명에 따른 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산 구조의 거대분자 기반 하이드로겔 조성물은 하이드로겔에 캡슐화된 골 형성 촉진 화합물의 수용해도를 개선시켜 골 형성 촉진 화합물을 장기간 지속적으로 방출할 수 있다. 특히, 골 형성 촉진 화합물이 포접 복합체의 형태로 하이드로겔에 캡슐화된 하이드로겔 조성물에서는 골 형성 촉진 화합물이 빠르게 방출되고 신생골 형성이 증진된다. 따라서, 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물은 골 조직 재생을 위한 생체 친화적 스캐폴드로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 MPEG-g-HA/α-CD 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX), MPEG-g-HA/α-CD/SIM 유사폴리로탁산 및 MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM 유사폴리로탁산의 제조 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

[11] 도 2는 2가지 타입의 하이드로겔인 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로부터 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 방출 역학을 나타낸 것이다.

[12] 도 3은 3가지 타입의 PPRX 하이드로겔을 실험 동물에 이식하고 4주 후에 평가된 4가지 샘플 각각의 대표적인 CT 이미지이다.

[13] 도 4는 3가지 타입의 PPRX 하이드로겔을 실험 동물에 식립하고 4주 후에 평가된 4가지 샘플의 골 부피(Bone vloume, BV)를 나타낸 것이고, 도 5는 골 표면적(bone surface, BS)을 나타낸 것이고, 도 6은 해면골소주 넘버(trabecular number, Tb.N)를 나타낸 것이고, 도 7은 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)를 나타낸 것이고, 도 8은 해면골소주 간격(trabecular separation, Tb.Sp)을 나타낸 것이다.

[14] 도 9는 하이드로겔 샘플의 식립 4주 후에 Haematoxylin and eosin(H&E) 으로 염색된 두개골 결손 부위의 이미지이고, 도 10은 Goldner's Trichrome 으로 염색된

두개골 결손 부위의 이미지이다.

발명의 실시를 위한 형태

[15] 본 발명에서 사용되는 용어인 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)은 선형 고분자의 사슬에 다수의 고리형 분자가 꼬치 형태로 끼워져 있는 구조의 화합물을 의미하고, 폴리로탁산(polyrotaxane)은 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)의 양쪽 말단에 고리형 분자가 이탈하지 않도록 부피가 큰 봉쇄기를 도입한 구조의 화합물을 의미한다. 상기 선형 고분자는 폴리에틸렌글리콜, 폴리이소프렌, 폴리이소부틸렌, 폴리부타디엔, 폴리프로필렌글리콜, 폴리테트라히드로푸란, 폴리다이메틸실록산, 폴리에틸렌글리콜과 폴리프로필렌글리콜과의 공중합체, 폴리메틸비닐에테르, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 고리형 분자는 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 봉쇄기는 다이니트로페닐기류, 사이클로덱스트린류, 아다만탄기류, 트리틸기류, 플루오레세인류, 피렌류, 치환 벤젠류, 치환될 수 있는 다핵 방향족류 및 스테로이드류로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 봉쇄기의 구체적인 예로는 2,4-다이니트로페닐기, 3,5-다이니트로페닐기, 벤질옥시카르보닐 기, 9-프레오닐메틸옥시카르보닐 기, 벤질에스테르 기, 제 3 부틸카르보닐 기, 아미노산 제 3 부틸에스테르 기 등이 있다.

[16] 본 발명에서 사용되는 용어인 포접 복합체(inclusion complex)는 호스트(host) 분자에 존재하는 공동(cavity) 안에 게스트(guest) 분자가 위치하는 형태의 복합체를 의미한다. 포접 복합체를 형성하는 대표적인 호스트(host) 분자로는 사이클로덱스트린이 있다.

[17]

[18] 거대분자 기반 하이드로겔 조성물

[19] 본 발명의 일 측면은 거대분자(Supermolecule) 기반의 하이드로겔 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물은 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔 및 상기 하이드로겔 안에 배치된 골 형성 촉진 약물을 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 하이드로겔 조성물을 주요 구성성분 별로 나누어 설명한다.

[20]

[21] (1) 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔

[22] 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서, 하이드로겔을 형성하는

폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자는 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 결 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체 및 상기 그래프트 공중합체의 선형 고분자에 끼워져 있는 다수의 고리형 분자로 구성된다.

[23] 상기 생체적합성 고분자는 선형 고분자의 말단과 반응할 수 있는 카르복실기를 가지는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리아스파틱산[Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산[Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산[Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 키토산(Chitosan) 및 그의 유도체, 글라이콜 키토산(Glycol chitosan) 등이 있다. 본 발명에서 생체적합성 고분자는 하이드로겔 형성 능력 및 선형 고분자와의 결합성, 생체적합성 등을 고려할 때 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 또는 히알루론산 테트라부틸암모늄에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있고, 하이드로겔 제조의 편의성을 고려할 때 히알루론산 나트륨인 것이 바람직하다. 또한, 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 히알루론산 염(hyaluronic acid salt)의 분자량(Mw)은 선형 고분자와의 반응성 등을 고려할 때 50,000 내지 1,000,000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하고, 100,000 내지 500,000의 범위에서 선택되는 것이 더 바람직하다.

[24] 상기 선형 고분자는 일 말단에 비 반응성기를 가지고 다른 말단에 생체적합성 고분자의 카르복실기와 반응하여 에스테르 결합 또는 아마이드 결합을 형성할 수 있는 반응성기를 가지는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않는다. 상기 비 반응성기는 생체적합성 고분자의 카르복실기와 반응하지 않는 -H, 알킬기, 알콕시기, 카르복실기, 에스테르기 등에서 선택될 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 반응성기는 -OH, 아민기(특히, 아미노기) 등에서 선택될 수 있다. 본 발명에서 상기 선형 고분자는 히알루론산과의 반응성 내지 고리형 분자로의 포접성 등을 고려할 때 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리부틸렌글리콜과 같은 폴리알킬렌글리콜의 양 말단에 비 반응성기와 반응성기가 각각 도입된 변형 폴리알킬렌글리콜인 것이 바람직하다. 예를 들어, 변형 폴리알킬렌글리콜은 일 말단에 알킬기(예를 들어, 탄소 수가 1 내지 4인 알킬기)가 도입되고 다른 말단에 아미노기가 도입될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 변형 폴리알킬렌글리콜의 구체적인 예로는 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine) 메톡시 폴리프로필렌글리콜 아민(Methoxy polypropylene glycol amine), 메톡시 폴리부틸렌글리콜 아민(Methoxy polybutylene glycol amine), 에폭시 폴리에틸렌글리콜 아민(Eethoxy polyethylene glycol amine), 에톡시 폴리프로필렌글리콜 아민(Eethoxy polypropylene glycol amine) 등이 있으며,

히알루론산과의 반응성, 생체 친화성 내지 고리형 분자로의 포접성 등을 고려할 때 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine)인 것이 바람직하다. 상기 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine)의 중량평균분자량(Mw)은 히알루론산과의 반응성 내지 고리형 분자로의 포접성 등을 고려할 때 1,000 내지 10,000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하고, 1,500 내지 5,000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하다. 본 발명에서 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine)이 히알루론산에 결합되어 그래트프 공중합체를 형성하는 경우 히알루론산 대 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민의 몰비는 1:50 내지 1:200인 것이 바람직하고, 1:75 내지 1:150인 것이 더 바람직하나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine)이 히알루론산에 결합되어 그래트프 공중합체를 형성하는 경우 히알루론산 대 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민의 중량비는 1:0.5 내지 1:2.5인 것이 바람직하고, 1:1 내지 1:2인 것이 더 바람직하다.

[25] 상기 그래프트 공중합체의 선형 고분자에 끼워지는 다수의 고리형 분자는 선형 고분자를 관통할 수 있는 소정의 공동(cavity)을 가지는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 생체 친화성 내지 피포접성을 고려할 때 사이클로덱스트린인 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 고리형 분자는 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin), β-사이클로덱스트린 또는 γ-사이클로덱스트린에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있고, 피포접성을 고려할 때 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin)인 것이 바람직하다. 또한, 상기 고리형 분자는 다이메틸사이클로덱스트린, 글루코실사이클로덱스트린 등과 같은 사이클로덱스트린 유도체에서 선택될 수도 있다. 본 발명에서 그래프트 공중합체를 구성하는 선형 고분자가 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민이고, 그래프트 공중합체를 구성하는 선형 고분자의 사슬에 끼워지는 고리형 분자가 α-사이클로덱스트린인 경우 선형 고분자 대 고리형 분자의 중량비는 1:1 내지 1:4인 것이 바람직하고, 1:1.5 내지 1:2.5인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명에서 그래프트 공중합체가 메톡시 폴리에틸렌글리콜로 그래프트된 히알루론산이고, 메톡시 폴리에틸렌글리콜 사슬에 끼워지는 고리형 분자가 α-사이클로덱스트린인 경우 그래프트 공중합체 대 고리형 분자의 중량비는 1:0.5 내지 1:2인 것이 바람직하고, 1:0.8 내지 1:1.5인 것이 더 바람직하다.

[26]

[27] (2) 골 형성 촉진 약물

[28] 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서, 골 형성 촉진 약물은 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔 안에 균일하게 배치되며, 바람직하게는 하이드로겔에 의해 캡슐화된다. 상기 골 형성 촉진 약물은 골 형성을 촉진하는 것으로 알려진 공지의 저분자량 화합물이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는

수 용해도가 낮은 약물에서 선택된다. 예를 들어, 상기 골 형성 촉진 약물은 비스포스포네이트계 약물, 스타틴계 약물 등에서 선택될 수 있고, 구체적으로 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2 (Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 골 형성 촉진 약물은 하이드로겔 안에서의 캡슐화 용이성 내지 신생골 형성 활성 등을 고려할 때, 스타틴계 약물에서 선택되는 것이 바람직하고, 심바스타틴(simastatin)인 것이 더 바람직하다. 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서 상기 골 형성 촉진 약물의 함량은 하이드로겔 100 ㎎ 당 1~20 ㎎인 것이 바람직하고, 2~10 ㎎인 것이 더 바람직하다.

[29] 또한, 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서, 골 형성 촉진 약물은 바람직하게는 약물의 방출 거동을 고려할 때 포접 복합체(inclusion complex)의 형태로 하이드로겔 안에 배치되고, 더 바람직하게는 포접 복합체(inclusion complex)의 형태를 유지한 채 하이드로겔에 의해 캡슐화된다. 예를 들어, 상기 골 형성 촉진 약물은 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자에 포접된 포접 복합체(inclusion complex)의 형태로 하이드로겔 안에 배치될 수 있다. 상기 호스트(host) 분자에 포접되는 골 형성 촉진 약물은 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2 (Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 상기 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자는 사이클로덱스트린 또는 사이클로덱스트린 유도체 등에서 선택될 수 있으며, 하이드로겔 안에 배치된 골 형성 촉진 약물의 수 용해도를 향상시키고 장시간의 지속적인 골 형성

촉진 약물의 방출 특성을 유지하면서 동시에 방출 속도를 가속화시키는 관점에서 사이클로덱스트린 유도체인 것이 바람직하다. 상기 호스트(host) 분자로 작용하는 사이클로덱스트린 유도체는 2,6-다이메틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-γ-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-γ-사이클로덱스트린, (2-카르복시메톡시)프로필-β-사이클로덱스트린 또는 술포부틸에테르-7-β-사이클로덱스트린에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있고, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린인 것이 바람직하다. 본 발명에서 골 형성 촉진 약물이 심바스타틴(simastatin)이고, 심바스타틴(simastatin)을 포접하는 호스트(host) 분자가 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린인 경우 골 형성 촉진 약물 대 호스트(host) 분자의 혼합 중량비는 1:1 내지 1:5인 것이 바람직하고, 1:2 내지 1:4인 것이 더 바람직하다.

[30] 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 하이드로겔 조성물의 경우, 상기 생체적합성 고분자는 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되고, 상기 선형 고분자는 일 말단에 알킬기가 도입되고 다른 말단에 아미노기가 도입된 변형 폴리알킬렌글리콜이고, 상기 고리형 분자는 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin), β-사이클로덱스트린 또는 γ-사이클로덱스트린에서 선택되며, 상기 골 형성 촉진 약물은 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin) 또는 심바스타틴(simastatin)에서 선택된다. 또한, 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서 골 형성 촉진 약물은 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자에 포접된 포접 복합체(inclusion complex)의 형태로 하이드로겔에 의해 캡슐화된다. 이때, 상기 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자는 2,6-다이메틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-γ-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-γ-사이클로덱스트린, (2-카르복시메톡시)프로필-β-사이클로덱스트린 또는 술포부틸에테르-7-β-사이클로덱스트린에서 선택되는 것이 바람직하다.

[31]

[32] <u>거대분자(Supermolecule) 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법</u>

[33] 본 발명의 일 측면은 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 곁 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체의 수용액에 고리형 분자, 그리고 골 형성 촉진

약물 용액을 첨가하고 반응시키는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 다른 예에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 결 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체의 수용액에 고리형 분자, 그리고 골 형성 촉진 약물이 호스트(host) 분자에 포접된 포접 복합체 용액을 첨가하고 반응시키는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 반응 산물을 동결건조하여 하이드로겔 조성물을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 고리형 분자는 그래프트 공중합체를 구성하는 선형 고분자에 끼워져 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔을 형성하고, 동시에 골 형성 촉진 약물 또는 골 형성 촉진 약물을 함유하는 포접 복합체는 하이드로겔 안으로 캡슐화된다. 한편, 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 반응 산물을 동결건조하기 전에 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자 양 말단에 봉쇄기를 도입하여 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔을 폴리로탁산 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔로 전환시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[34] 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 그래프트 공중합체를 구성하는 생체적합성 고분자, 선형 고분자, 선형 고분자에 끼워지는 고리형 분자, 하이드로겔 안에 배치되는 골 형성 촉진 약물, 골 형성 촉진 약물을 포접하기 위한 호스트(host) 분자의 종류 및 사용량은 거대분자 기반 하이드로겔 조성물에서 전술한 내용과 동일하므로 구체적인 설명을 생략한다.

[35] 본 발명에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 사용되는 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 결 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체는 (a) 카르복실기를 가지는 생체적합성 고분자 및 카르복실기 활성화제의 혼합 수용액에 선형 고분자를 첨가하고 반응시켜 생체적합성 고분자의 카르복실기와 선형 고분자의 말단에 존재하는 아미노기 사이에 아마이드 결합을 형성시키는 단계; 및 (b) 반응 산물을 투석하여 불순물을 제거하고 동결건조하는 단계로 이루어진 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 카르복실기 활성화제는 1,3,5-트리아진(1,3,5-triazine) 고리를 함유하는 화합물로서, 히알루론산과 같은 생체적합성 고분자에 존재하는 카르복실기를 반응성 중간체인 에스테르기로 전환시키는 역할을 한다. 이러한 카르복실기 활성화제의 종류로는 시아누릭 클로라이드(Cyanuric chloride), 2-클로로-4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진(2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine), 2-클로로-4,6-다이페닐-1,3,5-트리아진(2-chloro-4,6-diphenyl-1,3,5-triazine), 2-클로로-4-메톡시-6-페닐-1,3,5-트리아진(2-chloro-4-methoxy-6-phenyl-1,3,5-triazine), 2-클로로-4-페닐-6-메톡시-1,3,5-트리아진(2-chloro-4-phenyl-6-methoxy-1,3,5-triazi

ne), 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM) 등이 있고, 카르복실기 활성화 수준을 고려할 때 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM)인 것이 바람직하다.

[36] 또한, 본 발명의 일 예에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 사용되는 골 형성 촉진 약물 용액은 골 형성 촉진 약물의 수 용해성이 낮기 때문에 골 형성 촉진 약물을 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올에 용해시켜 제조하는 것이 바람직하다.

[37] 또한, 본 발명의 다른 예에 따른 거대분자 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 사용되는 포접 복합체 용액은 골 형성 촉진 약물 용액을 호스트(host) 분자 수용액에 첨가하고 혼합하여 제조한다. 이때, 골 형성 촉진 약물 용액은 골 형성 촉진 약물의 수 용해성이 낮기 때문에 골 형성 촉진 약물을 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올에 용해시켜 제조하는 것이 바람직하다.

[38]

[39] 골 조직 재생용 스캐폴드

[40] 본 발명의 일 측면은 두개골 결손 등과 같이 골 손상 내지 골 손실이 발생하였을 때 골 결손 부위에 식립되어 골 결손 부위를 지지하고, 골 결손 부위 주위의 자가 조직으로부터 자가 골 재생을 유도할 수 있는 골 조직 재생용 스캐폴드(Scaffold)를 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 골 조직 재생용 스캐폴드(Scaffold)는 전술한 거대분자(Supermolecule) 기반 하이드로겔 조성물을 포함하거나 거대분자(Supermolecule) 기반의 하이드로겔 조성물로 이루어질 수 있다. 특히, 본 발명의 일 예에 따른 거대분자(Supermolecule) 기반의 하이드로겔 조성물에서 골 형성 촉진 약물이 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자에 포접된 포접 복합체(inclusion complex)의 형태로 하이드로겔에 의해 캡슐화되는 경우, 골 형성 촉진 약물의 수 용해도가 증가하여 방출 특성이 향상되고, 그로 인해 골 조직 재생용 스캐폴드의 신생골 형성 활성이 향상된다.

[41]

[42] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[43]

[44] **1. 실험 재료**

[45] 히알루론산(Hyaluronic acid, HA; Mw : 100~150 kDa)과 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine; Mw : 2,000)은 각각 Lifecore Biomedical, LLC(Chaska, MN, USA)와 Creative PEGWorks(NC, USA)에서 구입하였다. α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin,

α-CD), 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(2-Hydrxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) 및 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 Sigma-Aldrich(MO, USA)에서 구입하였다. 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM)은 Wako Pure Chemical Industries(Osaka, Japan)로부터 공급되었다. Ketalar™ 과 Lidocaine™(Yuhan Co., Ltd., Seoul, Korea), Rompun™(Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea), Betadine®(Purdue Pharma L.P., CA, USA), 및 Ethicon Vicryl®과 Ethicon Ethilon®(Johnson & Johnson Services, Inc., NJ, USA)이 동물실험에 사용되었다. 모든 화학물질은 추가적인 정제 없이 공급받은 상태로 사용되었다.

[46]

[47] **2. MPEG-*g*-HA/α-CD 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX), MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM 유사폴리로탁산 및 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM 유사폴리로탁산의 제조**

[48] 도 1은 MPEG-g-HA/α-CD 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX), MPEG-g-HA/α-CD/SIM 유사폴리로탁산 및 MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM 유사폴리로탁산의 제조 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

[49] 히알루론산(HA) 6.7 μmol(1.0 g)과 DMT-MM 0.7 mmol(0.2 g)을 증류수 300㎖에 용해시킨 용액에 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine) 0.7 mmol(1.4g)을 첨가하고, 혼합물을 상온에서 3일 동안 반응하도록 두었다. 상기 반응은 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine)의 일 말단에 존재하는 아민기와 히알루론산(HA)의 카르복실기 간의 축합 반응이고, 이를 통해 아마이드 결합(amide bond)이 형성된다. 반응 산물을 투석 튜브(MWCO : 2,000)로 3일 동안 투석하여 DMT-MM을 제거하였다. 정제된 반응 산물을 -90℃에서 7일 동안 동결건조하여 메톡시 폴리에틸렌글리콜이 아마이드 결합(amide bond)에 의해 히알루론산(HA)에 그래프트된 형태의 변형 히알루론산(MPEG-g-HA)를 수득하였다.

[50] 첫 번째 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)을 제조하기 위해 상기 히알루론산 유도체(MPEG-g-HA) 100㎎을 증류수 20㎖에 녹여 MPEG-*g*-HA 수용액을 제조하였다. 이후, MPEG-*g*-HA 수용액에 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD) 0.1 mmol(0.1 g)을 첨가한 후, 상온에서 1일 동안 저어서 MPEG-*g*-HA의 MPEG 선형 사슬에 α-사이클로덱스트린의 개구부가 끼워진 형태의 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔을 생성시켰다. 이후, 반응 산물을 -90℃에서 7일 동안 동결건조한 후 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

[51] 두 번째 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)을 제조하기 위해 상기 히알루론산 유도체(MPEG-g-HA) 100㎎을 증류수 20㎖에 녹여 MPEG-*g*-HA

수용액을 제조하였다. 또한, 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 0.02 mmol(10㎎)을 에탄올 10㎖에 용해시켜 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 용액을 제조하였다. 이후, MPEG-*g*-HA 수용액에 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD) 0.1 mmol(0.1 g)과 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 용액을 첨가하고, 상온에서 1일 동안 저어서 MPEG-*g*-HA의 MPEG 선형 고리에 α-사이클로덱스트린의 개구부가 끼워진 형태의 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 캡슐화된 심바스타틴(Simvastatin, SIM)으로 이루어진 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX 하이드로겔을 생성시켰다. 이후, 반응 산물을 -90℃에서 7일 동안 동결건조한 후 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

[52] 세 번째 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)을 제조하기 위해 상기 히알루론산 유도체(MPEG-g-HA) 100㎎을 증류수 20㎖에 녹여 MPEG-*g*-HA 수용액을 제조하였다. 또한, 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 0.02 mmol(10㎎)을 에탄올 10㎖에 용해시켜 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 용액을 제조한 후, 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 용액을 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(2-Hydrxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) 수용액(증류수 10㎖에 HP-β-CD 28㎎을 용해시켜 제조함)에 천전히 적하하고 혼합하여 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 포접 복합체(HP-β-CD-*ic*-SIM) 용액을 제조하였다. 이후, MPEG-*g*-HA 수용액에 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD) 0.1 mmol(0.1 g)과 HP-β-CD-*ic*-SIM 용액을 첨가하고, 상온에서 1일 동안 저어서 MPEG-*g*-HA의 MPEG 선형 고리에 α-사이클로덱스트린의 개구부가 끼워진 형태의 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 캡슐화된 HP-β-CD-*ic*-SIM 으로 이루어진 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX 하이드로겔을 생성시켰다. 이후, 반응 산물을 -90℃에서 7일 동안 동결건조한 후 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

[53] 상기 두 번째 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 및 세 번째 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX)을 제조하는 과정에서, 심바스타틴(Simvastatin, SIM) 또는 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 포접 복합체(HP-β-CD-*ic*-SIM)는 히알루론산 유도체(MPEG-g-HA)의 MPEG 선형 사슬에 α-사이클로덱스트린의 개구부가 끼워져 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔이 형성되는 동안 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔 안으로 캡슐화된다.

[54]

[55] **2. 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 인 비트로(in vitro) 방출 역학**

[56] 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 인 비트로(in vitro) 방출 역학은 투석막(MWCO : 20 kDa)과 원뿔 바이얼(conical vial)로 구성된 변형된 확산 장치를 이용하여 연구되었다.

[57] 2가지 타입의 하이드로겔인 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 MPEG-*g*

-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX 100㎎을 각각의 투석막 안에 넣고, 투석막의 입구를 봉쇄하였다. 이후, 투석막을 37℃의 인산 완충용액(PBS, pH 7.4, 50㎖) 안에 위치시키고, 미리 설정한 시간 간격으로 PBS 5㎖를 추출하고, 추출된 PBS와 동일한 부피의 새로운 매질을 추가하였다. 추출된 PBS의 흡광도를 자외선-가시광선(Ultraviolet-Visible, UV-Vis) 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 235 ㎚의 파장에서 측정하였다.

[58] 도 2는 2가지 타입의 하이드로겔인 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로부터 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 방출 역학을 나타낸 것이다. 도 2에서 보이는 바와 같이 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX에 비해 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX에서 더 급격하게 방출되었다. 2가지 타입의 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 하이드로겔인 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로부터 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 초기 버스트(initial burst)는 1일 이내에 각각 53.7% 및 40.5% 이었다. 2가지 타입의 하이드로겔에서 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 방출은 28일 동안 지속되었고, MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로부터 방출된 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 누적량은 각각 9.05㎎ 및 9.33㎎ 이었다.

[59]

[60] **3. 인 비보(in vivo) 동물 실험**

[61] (1) 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 하이드로겔의 이식

[62] 인 비보(in vivo) 동물 시험은 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the KyungHee University Hospital at Gangdong (no. KHNMC AP 2014-004)에 의해 승인되었다. 16 마리의 흰쥐(~ 30 g, n=4, Korea)에 91% ketamine hydrochloride(Ketalar™)와 9% xylazine(Rumpun™)으로 이루어진 용액을 근육 주사하여 마취시켰다. 수술 부위를 베타딘(betadine)으로 소독한 후에, 2% 리도카인(lidocaine) 용액을 국소 마취제로 적용하였다. 이후, 마이크로-CT(Micro-CT) 분석과 조직학적 평가(Histological evaluation)를 위해 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX, MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX 및 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX를 두개골 결손 부위에 식립하였다. 골막을 재흡수성 Ethicon Vicryl로 봉합하고, 피부를 Ethicon Ethilon으로 봉합하였다. 이식 4주 후에, 쥐를 희생시켰다.

[63]

[64] (2) 마이크로-CT(Micro-CT) 분석

[65] 쥐를 희생시킨 후, 두개골 결손 부위를 10%(v/v) 중성 완충포르말린(neutral buffered formalin) 용액에 고정시켰다. 회수된 샘플의 마이크로-CT(Micro-CT; SkyScan 1173, SKYSCAN, Kartuizersweg 3B 2550 Kontich, Belgium) 분석을 통해 골 부피(Bone vloume, BV), 골 표면적(bone surface, BS), 해면골소주

넘버(trabecular number, Tb.N), 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th) 및 해면골소주 간격(trabecular separation, Tb.Sp)을 검사하였다. 스캔한 자료는 Skyscan™ CT-analyser software로 분석되었다.

[66] 도 3은 3가지 타입의 PPRX 하이드로겔을 실험 동물에 이식하고 4주 후에 평가된 4가지 샘플 각각의 대표적인 CT 이미지이다. 도 3에서 보이는 바와 같이 골 형성 활성도는 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔을 두개골 결손 부위에 주입함으로써 증진되었다. 이러한 결과는 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 하이드로겔 자체가 신생골 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 하이드로겔 속으로 캡슐화된 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 골 형성 활성도를 증진시키는 것으로 나타났다. 특히, 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 개선된 수 용해도는 골 형성 활성도의 증진에 강한 영향을 주었다. 도 4는 3가지 타입의 PPRX 하이드로겔을 실험 동물에 식립하고 4주 후에 평가된 4가지 샘플의 골 부피(Bone vloume, BV)를 나타낸 것이고, 도 5는 골 표면적(bone surface, BS)을 나타낸 것이고, 도 6은 해면골소주 넘버(trabecular number, Tb.N)를 나타낸 것이고, 도 7은 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)를 나타낸 것이고, 도 8은 해면골소주 간격(trabecular separation, Tb.Sp)을 나타낸 것이다. 도 4 내지 도 8에서 "PPRX I"은 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX를 의미하고, "PPRX II"는 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX를 의미하고, "PPRX III"는 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX를 의미한다. 도 4 내지 도 8에서 보이는 바와 같이 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic* -SIM PPRX는 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX 보다 1.17배 큰 골 부피(Bone vloume, BV) 및 1.02배 큰 골 표면적(bone surface, BS)을 가졌다. 더구나, 해면골소주 넘버(trabecular number, Tb.N) 및 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)는 심바스타틴(Simvastatin, SIM)을 포함하는 하이드로겔에서 크게 향상되었다. 한편, 심바스타틴(Simvastatin, SIM)을 포함하는 하이드로겔은 더 작은 해면골소주 간격(trabecular separation, Tb.Sp)을 보였다.

[67]

[68] (3) Haematoxylin과 eosin(H&E) 염색 및 Goldner's Trichrome 염색

[69] 쥐를 희생시킨 후, 두개골 결손 부위를 10%(v/v) 중성 완충포르말린(neutral buffered formalin) 용액에 고정시켰다. 조직을 4℃에서 하룻밤 동안 고정한 후, 인산 완충 용액(PBS)에 현탁하였다. 석회화된 샘플을 파라핀 안에 포매하고, 40㎛ 두께의 조직 절편을 표준 프로토콜에 따라 Haematoxylin and eosin(H&E) 용액과 Goldner's Trichrome 용액으로 염색하였다. 염색된 조직 절편을 형광 현미경(fluorescence microscopy; AX70, TR-62A02, Olympus, Tokyo, Japan)으로 시각화하였다.

[70] 도 9는 하이드로겔 샘플의 식립 4주 후에 Haematoxylin and eosin(H&E) 으로 염색된 두개골 결손 부위의 이미지이고, 도 10은 Goldner's Trichrome 으로 염색된 두개골 결손 부위의 이미지이다. H&E로 염색된 모든 샘플에서 골 형성 및 골 흡수와 관련된 3가지 타입의 세포들인 골아세포(osteoblasts, Ob),

골세포(osteocytes, Oc) 및 파골세포(osteoclasts, Ocl)가 관찰되었다. 라운드된 골단위(osteons)와 골세포는 골소강(lacunae)에 위치하였고, 골아세포(osteoblast)에 의해 둘러싸여 있었다. 특히, 신생골(red color)의 성장은 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX가 식립되었을 때 양쪽 가장자리에서 안쪽으로 가장 활발히 진행되었고, 이는 Goldner's Trichrome 으로 염색에 의해 확인되었다. 3가지 타입의 PPRX가 식립된 결손 부위에는 PPRX를 식립하지 않은 대조군 부위에 비해 식립 4주 후 세포와 골단위(osteons)가 현저하게 채워졌다. MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로 채워진 많은 영역의 두개골 결손 부위에서 골 형성 활성도가 증가하였다.

[71]

[72] **4. 토의(Discussion)**

[73] 3-하이드록시-3-메틸글루타릴 코엔자임 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 환원효소(reductase)의 저해제인 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해 사용되는 스타틴(statin) 계열의 약물에 속한다. 또한, 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 재조합 인간 골 형성 단백질 2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)을 증가시켜 골아세포의 분화를 촉진하고 인 비트로(in virto) 및 인 비보(in vivo) 상에서 신생골 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[G. Mundy, R. Garrett, S. Harris, J. Chan, D. Chen, G. Rossini, B. Boyce, M. Zhao, and G. Gutierrez, Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 286, 1946 (1999).]

[74] 그러나, 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 낮은 수 용해도로 인해 생체 이용도가 낮다. 지용성 약물의 수 용해도와 생체 이용도를 개선하기 위해, 지용성 약물은 고분자 하이드로겔, 고체 분산체, 마이크로에멀젼, 초임계 유체, 사이클로덱스트린 포접 복합체(Cyclodextrin inclusion complexes), 덴드리머 복합체(dendrimer complexes), 마이크로 입자 또는 나노 입자의 안쪽으로 캡슐화된다[M. S. Bae, D. H. Yang, J. B. Lee, D. N. Heo, Y. D. Kwon, I. C. Youn, K. Choi, J. H. Hong, G. T. Kim, Y. S. Choi, E. H. Hwang, and I. K. Kwon, Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold. Biomaterials 32, 8161 (2011).].

[75] 우리는 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 수 용해도를 개선하기 위한 이중 시스템(dual system)을 설계하였다. 상기 이중 시스템은 심바스타틴(Simvastatin, SIM)과 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(2-Hydrxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) 간의 포접 복합체(HP-β-CD-*ic*-SIM) 및 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX 하이드로겔[T. Nakama, T. Ooya, and N. Yui, Tempaerature- and pH-controlled hydrogelation of poly(ethylene glycol)-grafted hyaluronic acid by inclusion complexation with α-cyclodextrin. Polymer J. 36, 338 (2004).] 안에서 캡슐화된 HP-β-CD-*ic*-SIM 으로 구성된다. 신생골 형성을 평가하는데에 있어서, 유사폴리로탁산(PPRX)은 불포화된 수용액 안에서 해리되기 때문에 인

비트로(in vitro) 실험을 수행할 수 없었다. 따라서, 두개골 결손 모델 토기를 이용하여 인 비보(in vivo) 동물 실험을 수행하였고, MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX의 신생골 형성 향상 효과를 MPEG-*g*-HA/α-CD PPRX 및 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX의 효과와 비교하였다.

[76] 심바스타틴(Simvastatin, SIM)은 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(2-Hydrxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD)의 내부 공간에 채워질 수 있고, 그로 인해 수 용해도가 증가한다는 사실은 알려져 있다[S. W. Jun, M. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Park, S. Lee, J. S. Woo, and S. J. Hwang, Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. Eur. J. Pharm. 66, 413 (2007).]. 또한, α-사이클로덱스트린(α-CD)을 메톡시 폴리에틸렌글리콜 아민(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine) 사슬을 관통하는 형태로 끼우면, 유사폴리로탁산(PPRX)이 형성된다.

[77] MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX로부터 심바스타틴(Simvastatin, SIM)의 방출 역학은 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX의 결과와 다르게 나타났다. HP-β-CD-*ic*-SIM은 SIM 보다 하이드로겔부터 더 빠르게 방출되었는데, 이는 포접 복합체 형성 후에 수 용해도가 향상되었기 때문이다. MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX에서 HP-β-CD-*ic*-SIM의 빠른 방출은 rhBMP-2의 발현을 증가시키고 결국 신생골 형성의 증진을 유발한다(도 2 및 도 3 참조). 반면, MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX에서 SIM이 방출되기 위해서는 MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX가 해리되어야 하고, 만약 PPRX 하이드로겔이 그 구조를 유지하면 SIM의 방출이 저해된다.

[78] 마이크로-CT(Micro-CT)는 3차원적인 해면골(Trabecular Bone) 구조의 분석 및 비파괴적 평가를 위해 사용될 수 있는 부상하고 있는 기술이다[I. Kallai, O. Mizrahi, W. Tawackoli, Z. Gazit, G. Pelled, and D. Gazit, Microcomputed tomography-based structural analysis of various bone tissue regeneration models. Nature Protocols 6, 105 (2011).]. MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX는 가장 높은 BV, BS, Tb.N 및 Tb.Th를 보였고, 가장 낮은 Tb.Sp를 보였다. 이러한 사항들은 신생골 형성으로 정량적으로 분석하는데 있어서 중요한 인자이다[J. H. Lee, S.-J. Jang, H.-R. Baek, K. M. Lee, B.-S. Chang, and C.-K. Lee, Synergistic induction of early stage of bone formation by combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and epidermal growth factor. J. Tissue Eng. Regen. Med. 9, 447 (2015).]. BV 및 BS와 같은 파라미터에 기초하여, 우리는 MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX가 식립된 두개골 결손 부위에서 신생골이 더 활발하게 형성된다고 결론지었다. 또한, Tb.N, Tb.Th 및 Tb.Sp의 결과는 신생 해면골소주 대(trabecular rods)가 신생골의 3차원 네트워크 안에서 더 조밀하게 형성되었음을 의미한다.

[79] 신체의 신생골은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)가 골전구세포(osteoprogenitors), 전조골세포(preosteoblasts), 골아세포(osteoblasts), steocytic osteoblasts, 그리고 최종적으로 골세포(osteocytes)로 연속적으로 분화함으로써 형성된다[T. J. Heino, and T. A. Hentunen, Differentiation of osteoblasts and osteocytes form mesenchymal stem cells. Current Stem Cell Research & Therapy 3, 131 (2008).]. BMP-2는 전체적인 분화 과정에 영향을 주고 신생골 형성을 촉진한다. SIM은 줄기세포의 골형성 분화를 유도하는데에 필수적인 계기를 제공할 수 있다. MPEG-*g*-HA/α-CD/SIM PPRX와 비교할 때, MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX으로부터 방출된 SIM은 더 나은 수 용해도 때문에 두개골 결손 부위 주위에서 줄기세포의 골형성 분화를 자극할 수 있다.

[80] 골 리모델링 과정 동안, 작은 골은 파골세포(osteoclasts)에 의해 재흡수되고 이어서 재흡수된 골을 대체할 수 있는 파골세포(osteoclasts)들이 모여든다. 골 리모델링 과정은 골격 전체에서 비동기적으로(asynchronously) 발생한다. 골세포(osteocytes)는 골전구세포(osteoprogenitors)에서 유도되고 성숙한 골에서 가장 흔하게 발견된다.

[81] H&E 염색을 통해 모든 샘플에서 골아세포(osteoblasts), 골세포(osteocytes) 및 파골세포(osteoclasts)가 존재한다는 것을 알 수 있고, 이는 신생골이 모든 샘플에서 골 리모델링 과정에 의해 형성된다는 것을 의미한다. 특히, 이러한 3가지 세포 타입의 두개골 결손 부위로 활발하게 퍼져나갔고, MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX가 식립된 부위에서 신생골이 더 풍부하게 생성되었다. 우리는 SIM의 수 용해도가 두개골 결손 부위에서 신생골 형성을 증진하는데에 중요한 역할을 한다고 결론지었다.

[82]

[83] **5. 결론(Conclusion)**

[84] 우리는 심바스타틴(Simvastatin, SIM)과 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(2-Hydrxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) 간의 포접 복합체(HP-β-CD-*ic*-SIM), 그리고 MPEG-*g*-HA 고분자와 α-CD로 이루어진 거대분자 하이드로겔에 기초하여 이중 시스템(dual system)을 설계하고 제조하였다. 그 뒤에, 우리는 토끼 모델 동물을 이용하여 두개골 결손 부위에서 신생골 형성의 증진에 대한 이중 시스템의 영향을 조사하였다. 마이크로-CT, H&E 염색 및 Goldner's trichrome 염색에 의해 평가한 결과, MPEG-*g*-HA/α-CD/HP-β-CD-*ic*-SIM PPRX가 식립된 두개골 결손 부위에서 신생골이 더 풍부하게 생성되었다. 우리의 결과들은 SIM의 수 용해도가 신생골 형성에 영향을 주었다는 것을 의미한다.

[85]

[86] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의

보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된
특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자로 이루어진 하이드로겔 및 상기 하이드로겔 안에 배치된 골 형성 촉진 약물을 포함하는 하이드로겔 조성물로서,
상기 폴리로탁산 또는 유사폴리로탁산(Pseudopolyrotaxane, PPRX) 구조의 거대분자는 주 사슬인 생체적합성 고분자에 선형 고분자가 결 사슬의 형태로 결합되어 있는 그래프트 공중합체 및 상기 그래프트 공중합체의 선형 고분자에 끼워져 있는 다수의 고리형 분자로 구성되고
상기 생체적합성 고분자는 카르복실기를 가지는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 히알루론산 염(hyaluronic acid salt)의 중량평균분자량(Mw)은 50,000 내지 1,000,000의 범위에서 선택되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 선형 고분자는 일 말단에 비 반응성기를 가지고 다른 말단에 생체적합성 고분자의 카르복실기와 반응하여 에스테르 결합 또는 아마이드 결합을 형성할 수 있는 반응성기를 가지는 것을 특징으로 하이드로겔 조성물.

[청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 선형 고분자는 일 말단에 알킬기가 도입되고 다른 말단에 아미노기가 도입된 변형 폴리알킬렌글리콜인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 고리형 분자는 사이클로덱스트린 또는 사이클로덱스트린 유도체인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 골 형성 촉진 약물은 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2 (Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 골 형성 촉진 약물은 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자에 포접된 포접 복합체(inclusion complex)의 형태로 하이드로겔 안에 배치되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

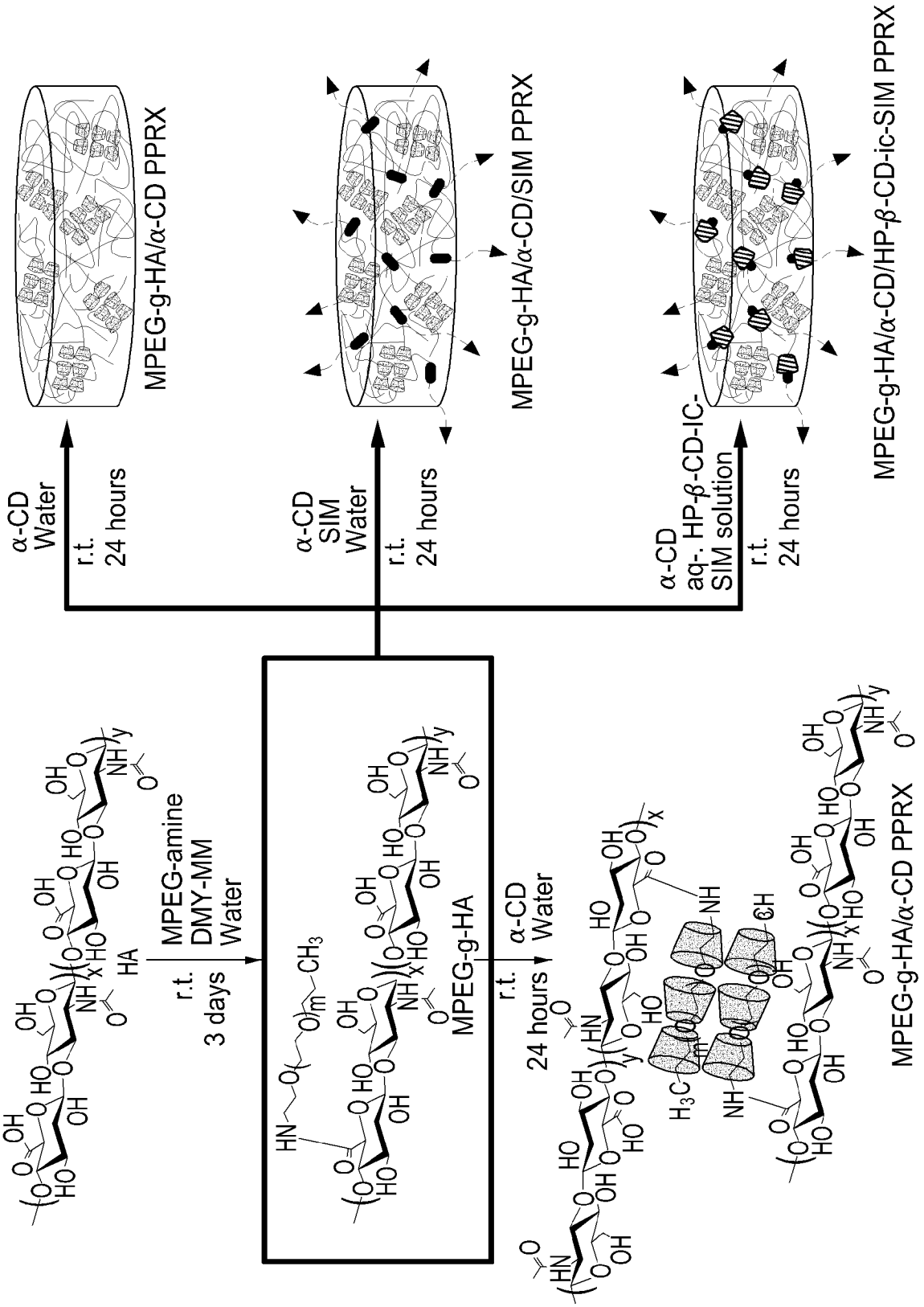
[청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 골 형성 촉진 약물은 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2 (Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 10] 제 8항에 있어서, 상기 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자는 사이클로덱스트린 또는 사이클로덱스트린 유도체인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

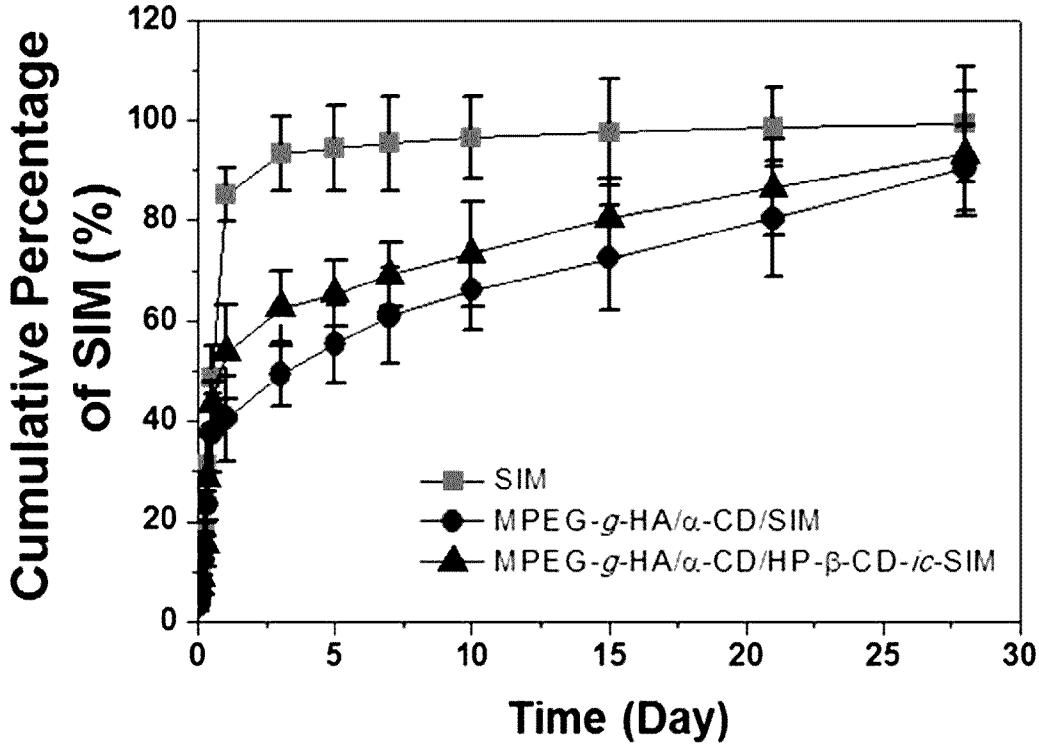
[청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 호스트(host) 분자로 작용하는 고리형 분자는 2,6-다이메틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시에틸-γ-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-γ-사이클로덱스트린, (2-카르복시메톡시)프로필-β-사이클로덱스트린 또는 술포부틸에테르-7-β-사이클로덱스트린에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

[청구항 12] 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 하이드로겔 조성물을 포함하는 골 조직 재생용 스캐폴드.

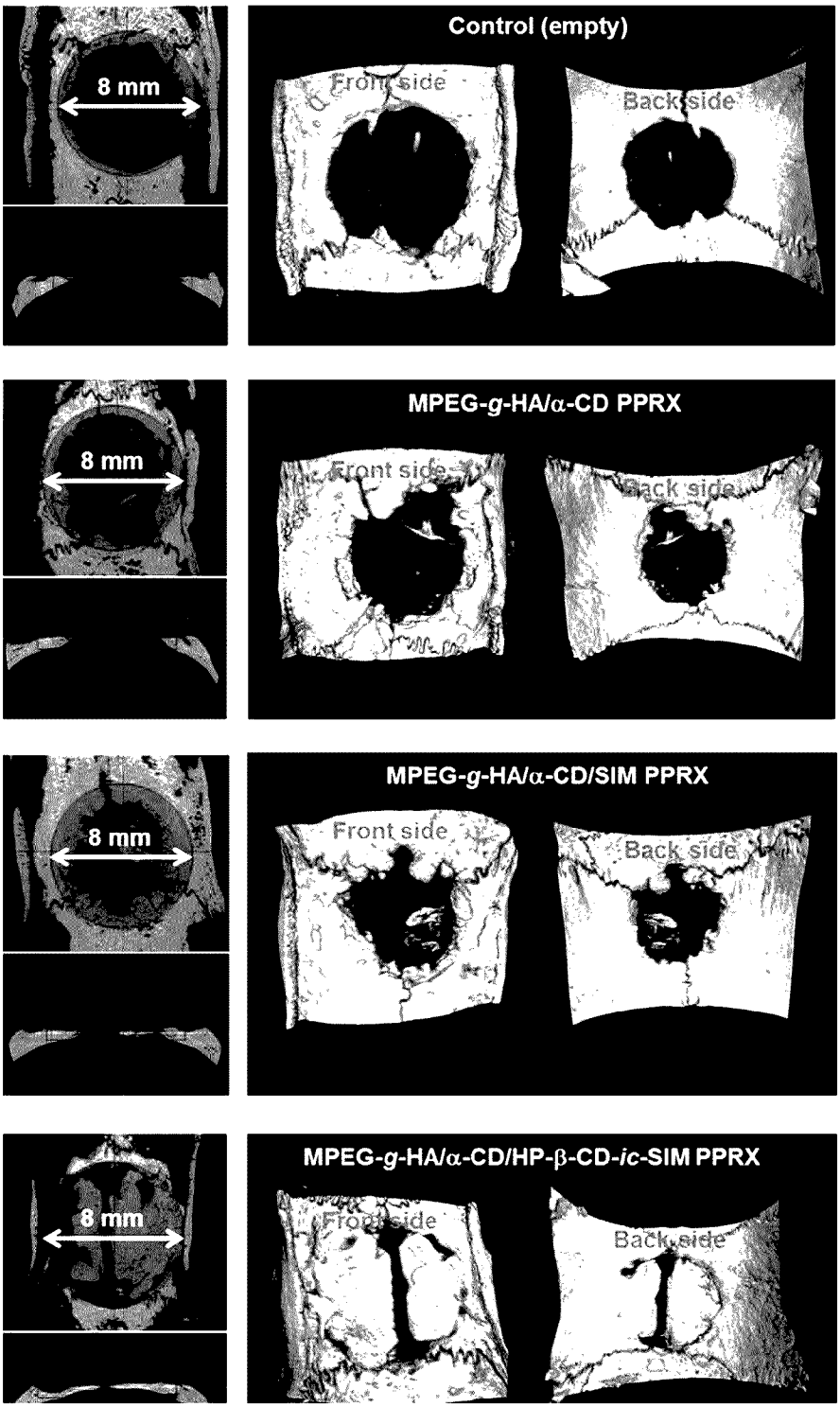
[도1]


HA
MPEG-amine
DMY-MM
Water
r.t.
3 days
MPEG-g-HA
α-CD
Water
r.t.
24 hours
α-CD
Water
r.t.
24 hours
MPEG-g-HA/α-CD PPRX
α-CD
SIM
Water
r.t.
24 hours
MPEG-g-HA/α-CD/SIM PPRX
α-CD
aq-. HP-β-CD-IC-
SIM solution
r.t.
24 hours
MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-ic-SIM PPRX

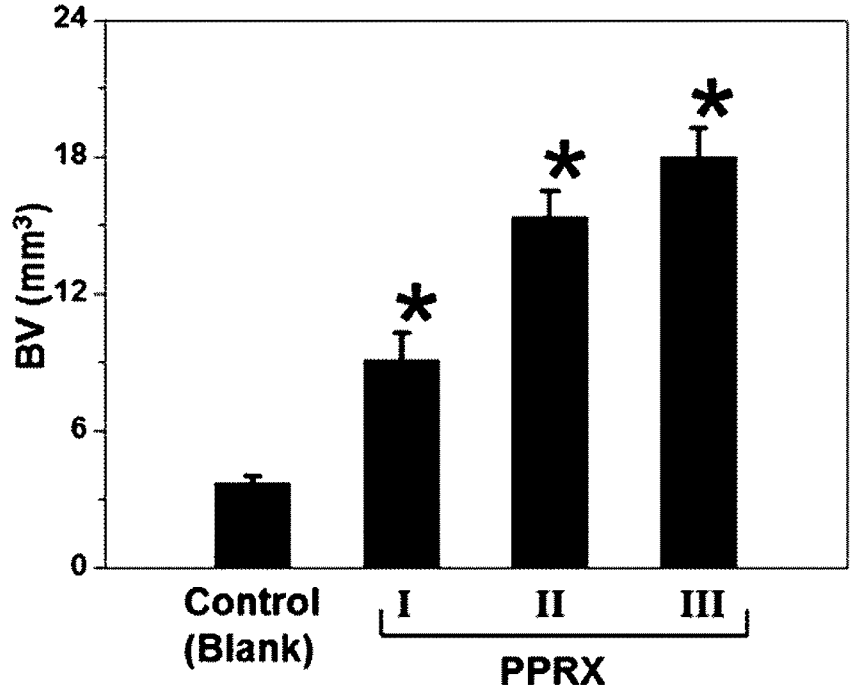
[도2]


Cumulative Percentage of SIM (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Time (Day)
SIM
MPEG-g-HA/α-CD/SIM
MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-ic-SIM

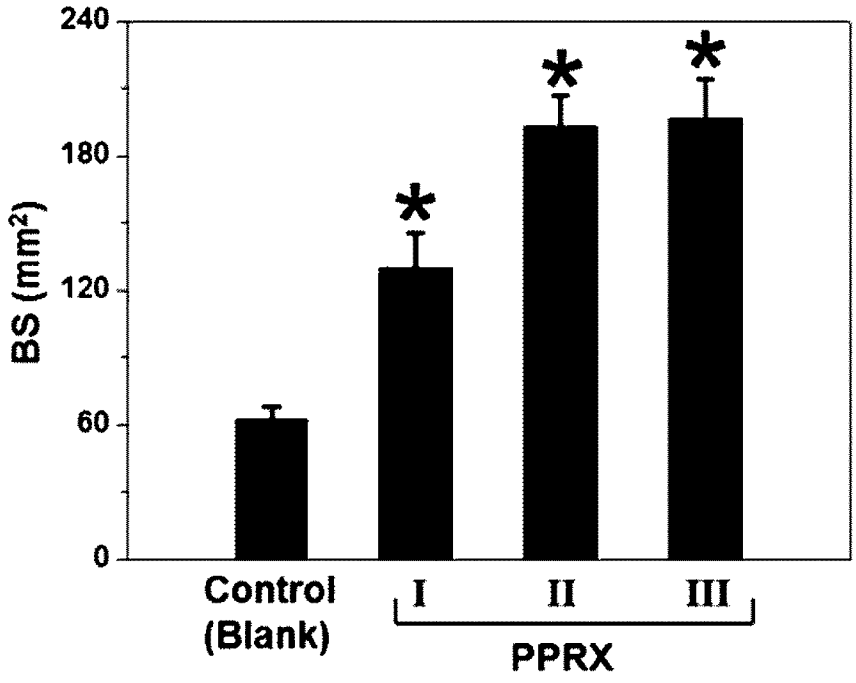
[도3]


8 mm
Control (empty)
Front side
Back side
8 mm
MPEG-g-HA/α-CD PPRX
Front side
Back side
8 mm
MPEG-g-HA/α-CD/SIM PPRX
Front side
Back side
8 mm
MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-ic-SIM PPRX
Front side
Back side

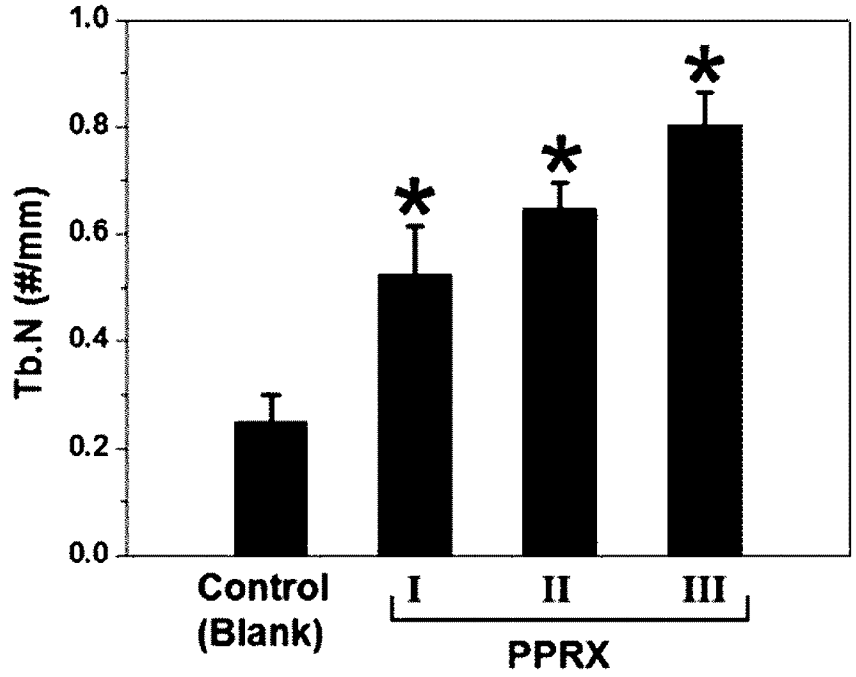
[도4]


24
18
12
6
0
BV (mm³)
*
*
*
Control
(Blank)
I
II
III
PPRX

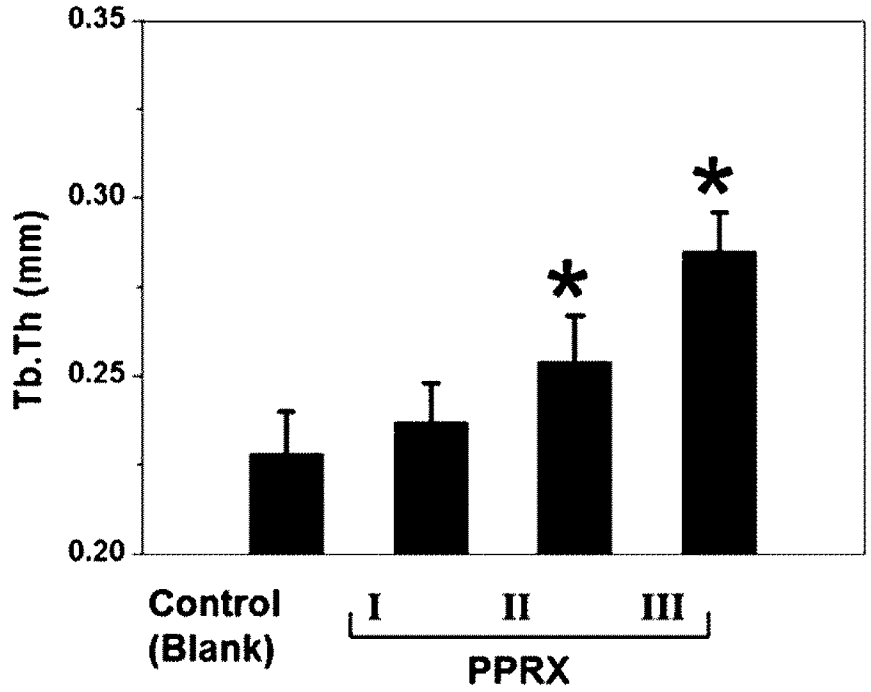
[도5]


240
180
120
60
0
BS (mm²)
*
*
*
Control
(Blank)
I
II
III
PPRX

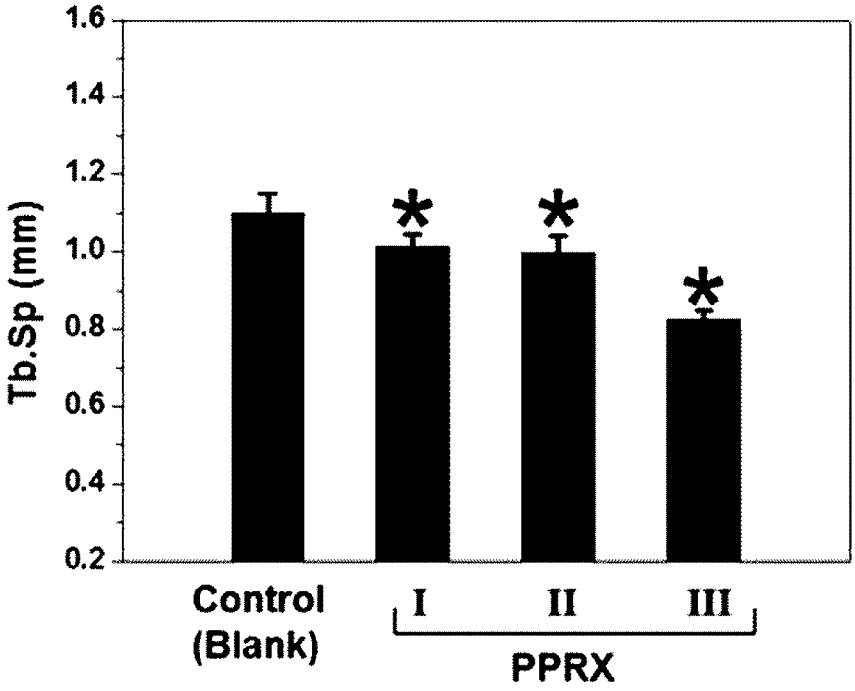
[도6]


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Tb.N (#/mm)
*
*
*
Control
(Blank)
I
II
III
PPRX

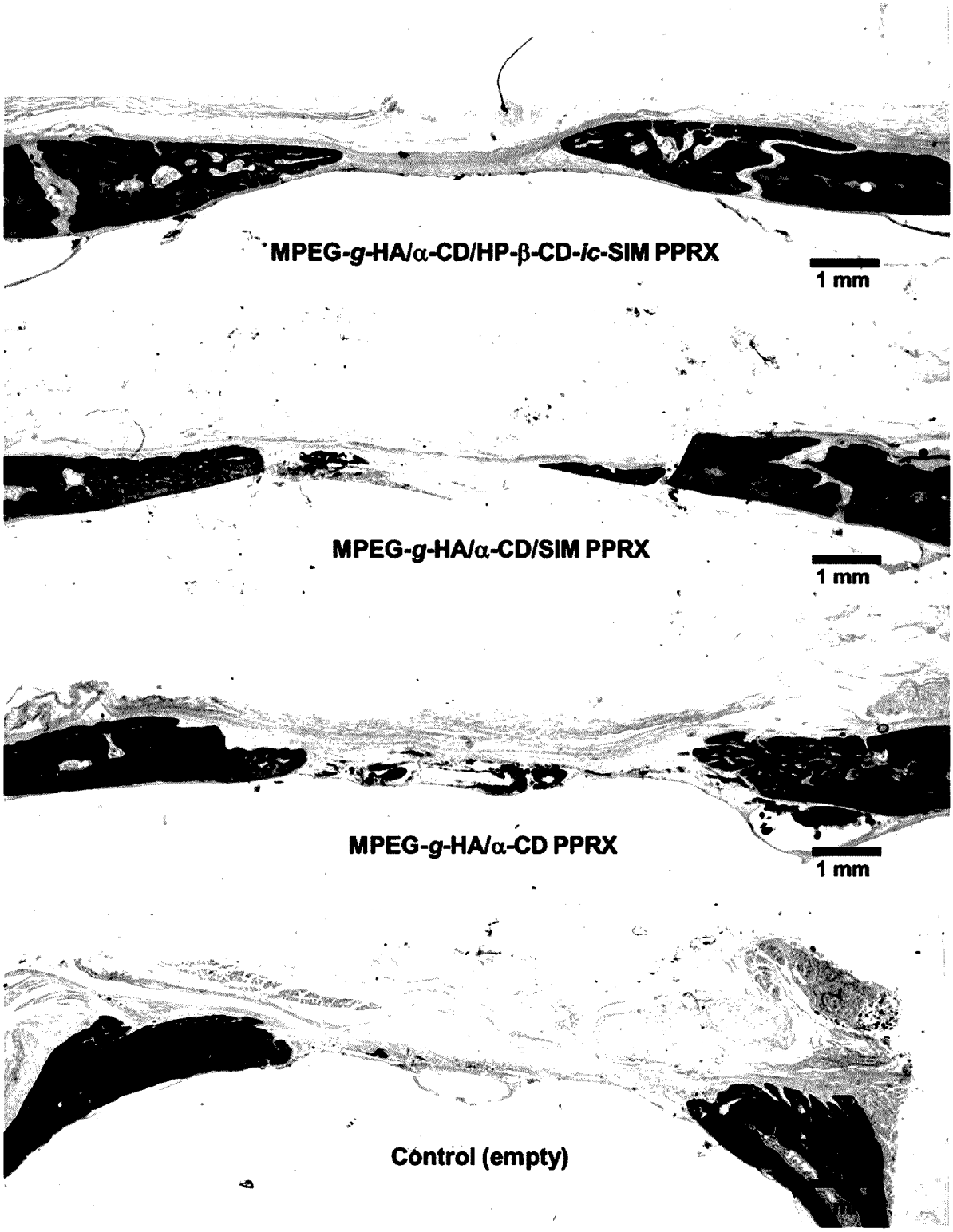
[도7]


0.35
0.30
0.25
0.20
Tb.Th (mm)
*
*
Control
(Blank)
I
II
III
PPRX

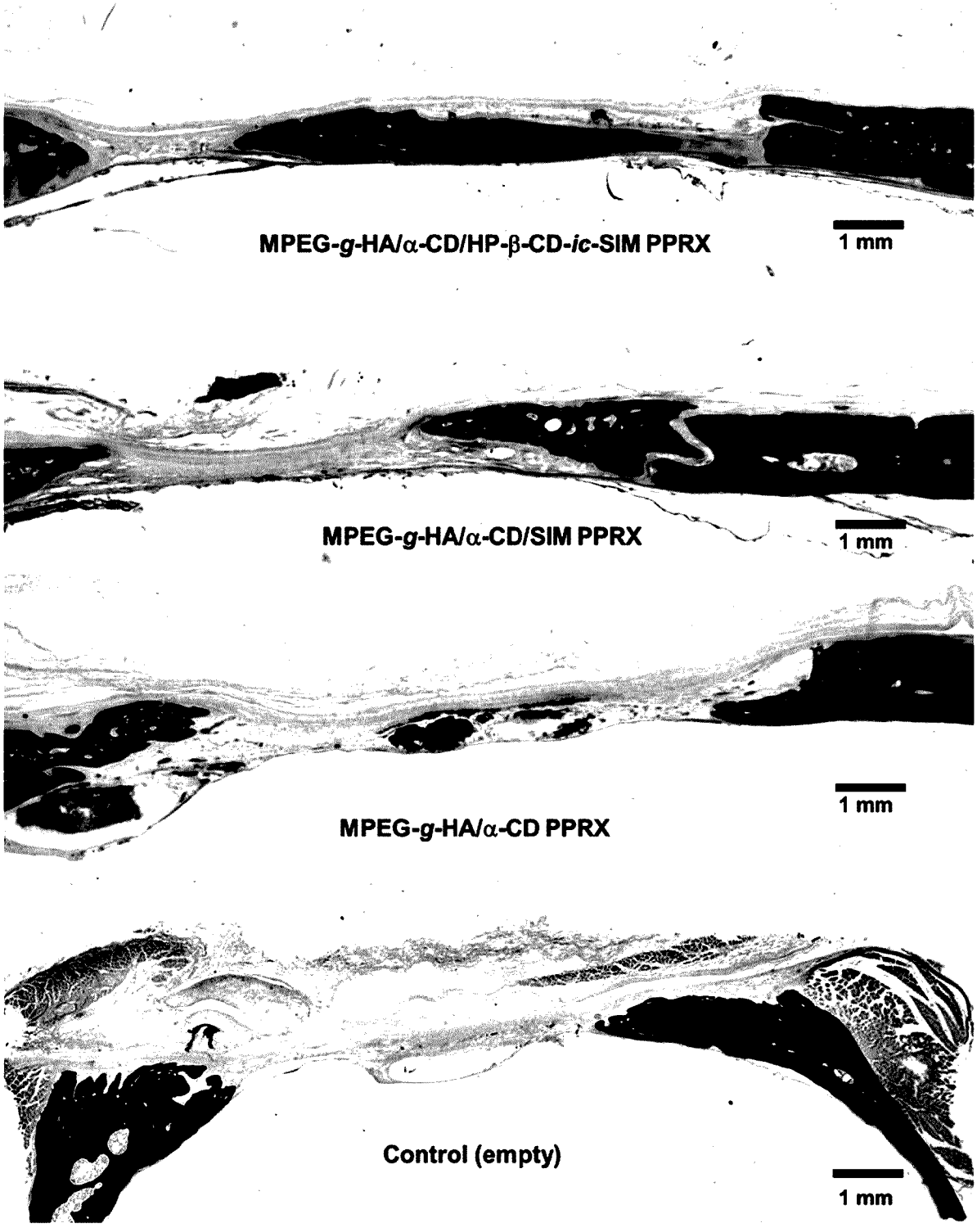
[도8]



[도9]


MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-ic-SIM PPRX
1 mm
MPEG-g-HA/α-CD/SIM PPRX
1 mm
MPEG-g-HA/α-CD PPRX
1 mm
Control (empty)

[도10]


MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-ic-SIM PPRX
1 mm
MPEG-g-HA/α-CD/SIM PPRX
1 mm
MPEG-g-HA/α-CD PPRX
1 mm
Control (empty)
1 mm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/009682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/52(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, A61L 27/20(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/52; A61C 8/00; A61L 27/14; A61L 27/54; A61L 27/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: polyrotaxane, hydro-gel, cyclodextrin, bone, drug, methoxy polyethylene glycol amine, amine bonding, ester bonding, hyaluronic acid, amino group, condensation reaction, linear polymer, delivery, change

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG, Y. et al., Targeted Polysaccharide Nanoparticle for Adamplation Prodrug Delivery, Journal of Medicinal Chemistry, 2013, vol. 56, pages 9725-9736 See introduction; result and discussion; scheme 1.	1-12
A	KR 10-1263639 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 10 May 2013 See paragraphs [0024]-[0077]; claims 1-13, 15, 16; figures 1-8.	1-12
A	LONG, Y. et al., Supramolecular Self-assembly of Monoend-functionalized Methoxy Poly(ethylene glycol) and α-cyclodextrin: from Micells to Hydrogel, Journal of Biomaterials Applications, 2012, vol. 27, pages 333-344 See the entire document.	1-12
A	PARK, K. M. et al., In Situ Supramolecular Assembly and Modular Modification of Hyaluronic Acid Hydrogels for 3D Cellular Engineering, ACS Nano, 2012, vol. 6, pages 2960-2968 See the entire document.	1-12
A	ZHANG, J. et al., Hydrophobic Pharmaceuticals Mediated Self-assembly of β-cyclodextrin Containing Hydrophilic Copolymers: Novel Chemical Responsive Nano-vehicles for Drug Delivery, Journal of Controlled Release, 2010, vol. 145, pages 116-123 See the entire document.	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 NOVEMBER 2016 (21.11.2016)	**21 NOVEMBER 2016 (21.11.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/009682

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1263639 B1	10/05/2013	KR 10-2012-0133588 A	11/12/2012

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/009682

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/52(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, A61L 27/20(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61L 27/52; A61C 8/00; A61L 27/14; A61L 27/54; A61L 27/20

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 폴리로탁산, 하이드로겔, 사이클로덱스트린, 뼈, 약물, 메톡시 폴리에틸렌글라이콜아민, 아민결합, 에스터결합, 히알루론산, 아미노기, 축합반응, 선형고분자, 전달, 변형

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	YANG, Y. 등, Targeted polysaccharide nanoparticle for adamplation prodrug delivery, Journal of Medicinal Chemistry, 2013년, 56권, 페이지 9725-9736 INTRODUCTION; RESULT AND DISCUSSION; Scheme 1 참조.	1-12
A	KR 10-1263639 B1 (경희대학교 산학협력단) 2013.05.10 단락 [0024]-[0077]; 청구항 1-13, 15, 16; 도면 1-8 참조.	1-12
A	LONG, Y. 등, Supramolecular self-assembly of monoend-functionalized methoxy poly(ethylene glycol) and α-cyclodextrin:from micells to hydrogel, Journal of Biomaterials Applications, 2012년, 27권, 페이지 333-344 전체문서 참조.	1-12
A	PARK, K. M. 등, In situ supramolecular assembly and modular modification of hyaluronic acid hydrogels for 3D cellular engineering, ACS Nano, 2012년, 6권, 페이지 2960-2968 전체문서 참조.	1-12
A	ZHANG, J. 등, Hydrophobic pharmaceuticals mediated self-assembly of β-cyclodextrin containing hydrophilic copolymers: Novel chemical responsive nano-vehicles for drug delivery, Journal of Controlled Release, 2010년, 145권, 페이지 116-123 전체문서 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 11월 21일 (21.11.2016)	2016년 11월 21일 (21.11.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이은규
전화번호 +82-42-481-3580

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/009682

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1263639 B1	2013/05/10	KR 10-2012-0133588 A	2012/12/11