(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61L 27/24

(45) 공고일자 2004년10월15일
(11) 등록번호 10-0452221
(24) 등록일자 2004년10월01일

(21) 출원번호 10-2001-0074762
(22) 출원일자 2001년11월28일

(65) 공개번호 10-2003-0043522
(43) 공개일자 2003년06월02일

(73) 특허권자 서 활
서울 성북구 성북2동 295-4

(72) 발명자 서 활
서울 성북구 성북2동 295-4

(74) 대리인 박사룡

심사관 : 오정아

(54) 자가조직화 주입형 연조직 보형재 조성물

요약

본 발명은 해부학적 형태의 보완을 위하여 체내의 연조직에 주입하는 보형재료를 제조하는 방법에 관한 것으로, 자가조직의 구조체 역할을 하는 아텔로콜라겐(atelocollagen)과 히알루론산(hyaluronic acid), 섬유소원(fibrinogen) 복합용액과 트롬빈(thrombin)을 혼합하고, 플루로닉(pluronic)을 복합화 하여 주입하면, 체내에서 경화된 다음 자기세포의 재생과 함께 경시적으로 체내에서 자가조직으로 치환되는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

색인어

아텔로콜라겐, 히알루론산, 섬유소원, 트롬빈, 플루로닉, 연조직, 보형재료

명세서

도면의 간단한 설명

제 1도는 본 발명의 조성물의 콜라겐 분해효소에 의한 분해도를 비교한 그래프이본 제 2도는 발명의 조성물을 건조한 후의 주사전자현미경 사진이며,
제 3도는 본 조성물의 세포친화성 비교실험한 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 해부학적 형태의 보완을 위하여 체내의 연조직에 주입하는 보형재료 조성물을 제공하는 것이다.
자가조직의 구조체 역할을 하는 아텔로콜라겐과 히알루론산 및 섬유소원 복합용액을 트롬빈과 혼합하여 주입하면, 체내에서 경화된 다음 자기세포의 재생과 함께 경시적으로 체내에서 자가조직으로 치환된다.
인체의 모든 연조직은 콜라겐, 엘라스틴과 같은 주요 단백질과 글리코스아미노글리칸을 포함하는 세포외기질에 의해 해부학적구조를 유지하고 있다. 일반적으로 선천적 혹은 병적 요인에 의해 연조직의 해부학적 변형이 있는 경우 합성고분자 재료를 보형재료로 사용하여 그 형태를 복원하여 왔다. 대표적인 물질은 실리콘 으 로서, 분자량 300,000이상의 고형물을 주로 사용하고 있으며, 일부 메틸메타아크릴산 중 합체를 사용하기도 한다. 이들은 생체적합성이 뛰어나지만, 체내에 영구적인 이물로 존재하기 때문에 경시적으로 체내에서 섬유화를 일으키는 경향이 있다. 한편, 콜라겐 혹은 히알루론산과 같은 세포외기질 성분을 단독으로 주입하여 자가 조직과 일체화를 유도하는 방법이 고안 되었으나, 체내에 주입된 콜라겐은 콜라겐 분해효소에 의해 분해되며, 히알루론산의 경우 주위 조직세포의 세포주기변화에 따라 분해되므로, 체내 삽입후 6개월 이내에 소멸되므로 재시술을 요구하게 된다.
일반적으로 콜라겐은 세포외기질로서 세포 침윤을 유인하고 직접 결합하여 구조체의 역할 뿐만 아니라 수분과 결합하는 힘이 크기 때문에 조직의 긴장도를 유지하고 유연성을 유지하는 중요한 역할을 하며, 길이 약 300 나노미터, 직경 약 2.4 나노미터의 크기를 가진 콜라겐분자의 양측 말단에 존재하는 텔로펩타이드를 제거하면 인체에서의 면역반응을 일으키지 않는 장점을 가지게 되며, 이렇게 제조한 아텔로 콜라겐은 산 가용성으로 미량의 염산 또는 아세트산 등에 용해된다. 콜라겐분해효소는 EDTA, 디티오트레놀(dithiothrenol), 시스테인(cyteine), 코티손(cortisone), 데오필린(theophyline)등에 의해 활성이 방해를 받는다. 히알루론산은 글리코스아미노글리칸(GAG)의 일종지만, 통상적인 GAG가 단백질과 결합하여 프로테오글리칸의 형태로 존재하고 있는 것과는 달리 단독으로.존재하는 다당류로서 대량의 수분을 보유할 수 있으며, 수분의 흡수에 따라 그 속에 섬유성 단백질이 쉽게 채워질 수 있는 겔상의 구조를 형성한다. 섬유소원은 혈장(plasma)에 존재하는 글로브린형 당단백으로서, 섬유소원 분자의 아르기닌과 글라이신 사이를 가수 분해하는 효소인 트롬빈과 섭씨 35도 이상에서 반응하면 비결정성 고체인 섬유소(fibrin)을 형성하면서 응고되는 물질이며, 섬유소는 약산성(pH 6.0 - 6.8)용액에서 팽윤하여 gel을 형성하는 특성을 가지고 있다. 한편 플루로닉(pluronic)은 조직배양용 배지제조시 gel화에 사용하는 물질로서, 생체내 비 분해성으로서 뛰어난 조직 적합성을 가지고 있으며, 특히 저온에서는 쉽게 수용화 되지만, 실온이 되면 gel로 변하는 특성을 지니고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 해부학적 형태의 보완을 위하여 체내의 연조직에 주입하는 보형재료를 제조하는 방법에 관한 것으로, 자가조직의 구조체 역할을 하는 아텔로콜라겐(atelocollagen)과 히알루론산(hyaluronic acid), 섬유소원(fibrinogen) 복합용액과 트롬빈(thrombin)을 혼합하고, 플루로닉(pluronic)을 복합화 하여 주입하면, 체내에서 경화된 다음 자기세포의 재생과 함께 경시적으로 체내에서 자가조직으로 치환되는 자가조직화 주입형 연조직보형재 조성물을 제공함에 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 종래의 이물질주입과는 전혀 상이한 자가 조직화 주입형 연조직 보형제 조성물을 제공하는 것이다.
본 발명은 체내 연조직의 주요성분인 콜라겐을 비면역화 처리한 아텔로콜라겐과 히알루론산을 사용하여 생체적합성이 우수한 구조기질을 제공하고, 인체내 주입하면 섬유소원과 트롬빈의 결합에 의해 체내에서 가교화를 이루어 섬유소가 되어 견고한 구조기질이 형성되므로서 콜라겐분해효소 활성억제제와 함의 생분해효소에 의한 체내 분해가 지연되며, 플루로닉이 초기형태를 형성 유지하도록 하여 연조직의 해부학적 형태를 보완하는 재료를 제조하기 위해 고안되었으며 다음과 같은 구체적인 방법을 실시예로서 설명한다.
본 발명에서는 아텔로 콜라겐을 물에 0. 5 ~ 2중량%로 용해한 다음, 별도로 물에 히알루론산을 0,5 ~ 2중량%로 용해한다. 두 용액을 합한후 0.2 ~ 10중량%의 데오필린액을 첨가한다.
이렇게 제조된 용액에 알칼리를 가하여 pH를 6.0 ~ 8.0으로 조정한다. 이 때 사용될 수 있는 알칼리로는 수산화칼륨, 수산화나토륨, 수산화리튬, 탄산나트륨, 탄산칼륨등에서 선택된 알칼리를 사용할 수 있다.
이렇게 pH가 조절된 용액에 섬유소원 5 ~ 50mg을 첨가한다.
1000unit/mg의 트롬빈을 40mM의 염화칼슘 용액으로 희석하여 약 125unit/mg 용액을 제조한다.
별도로 물에 플루로닉 1 ~ 10중량%의 용액을 제조한다.
이 플루로닉 용액에 약 20ml에 트롬빈 5 ~ 50mg을 혼합한다.
트롬빈 용액에 플로로닉 용액을 혼합하고, 섭씨 4도이하에서 냉장보관한다.
다음에 실시예로서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
[실시예]
실시예 1
1. 섭씨 2 - 8도에서 증류수 100ml에 1N 초산용액 2mL를 첨가한 후 아텔로콜 라겐 1g을 넣고 200 - 400 rpm의 속도로 교반하면서 완전히 녹인다.
2. 실온에서 증류수 100ml에 히알루론산 1g을 넣고 100 - 200 rpm의 속도로 교반하면서 완전히 녹인다.

3. 섭씨 2 - 8도에서, 2에서 제조된 용액에 1에서 제조된 용액을 첨가한 다음, 60- 100rpm의 속도로 교반하면서 0.5 % 무수테오필린(theophyline anhydrate)용액 5 -10ml를 첨가한다.
4. 실온에서 3에서 제조된 용액에 2N 수산화나트륨용액을 사용하여 pH 7.4로 조정한다.
5. 실온에서 섬유소원 10 - 20 mg을 4에서 제조된 용액에 100 - 200 rpm의 속도로 교반하면서 첨가한다.
6. 1000unit/mg의 트롬빈을 40mM의 염화칼슘용액으로 희석하여 125unit/mg 용액을 제조한다.
7. 섭씨 2 - 8도에서 증류수 20 ml를 100 - 200rpm의 속도로 교반하면서 플루로닉 분말을 첨가하여 2 - 5% 플루로닉 용액을 제조한다.
8. 섭씨 2 - 8도에서 트롬빈 10 - 20 mg을 7에서 제조한 2 - 5% 플루로닉 용액에 혼합한다.
9. 섭씨 2 - 8도에서 6에서 제조된 용액에 8에서 제조된 용액을 혼합한 다음, 60 -100 rpm의 속도로 12시간 교반한다.
10. 제조된 용액을 섭씨 4도 이하에서 냉장보관한다.
다음에 실험예로서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
실험예 1
본 발명의 조성물의 콜라겐 분해효소에 의한 분해도 비교
본 발명의 조성물을 가교화제이 농도에 따라 여러군으로 나누어 콜라겐 분해효소에 의한 분해정도를 가교화정도를 비교실험하였다. 표준물질로는 어떠한 처리도 하지 않은 시편을 선택하여 사용하였다. 일정시간후에 콜라겐 분해효소에 의해 분해되어 나온 콜라겐의 양을 뉴만 amp; 로간(Newman amp; Logan)방법을 사용하여 가교화 정도를 측정하였다.
그 결과를 제 1도에 나타내었다.
제 1도에서
' non-treated' 는 비처리된 아텔로콜라겐-히알루론산 용액을 의미하며,
' 50mM EDC treated'는 50밀리몰 에틸디메틸카보디이미드 처리 아텔로콜라겐-히알루론산 용액을 의미하며,
' 0.25M EDTA treated'는 0 25몰 EDTA 처리 아텔로콜라겐-히알루론산 용액을 의미하며,
' 0.25M EDTA/0.5% theophyllin treated'란 0.25몰 EDTA와 0.5% 데오필린 이중처리 아텔로콜라겐-히알루론산 용액을 의미하며,
' 50mM edc/0.5 theophyllin treated'란 50밀리몰 EDC와 0.5% 데오필린 이중처리 아텔로콜라겐-히알루론산을 의미한다.
상기 도1에서 확인되는 바와 같이, 50밀리몰 EDC와 0.5% 데오필린을 이용하여 이중처리한 아텔로콜라겐-히알루론산 복합용액의 경우 콜라겐분해효소에 의한 아텔로콜라겐이 용해를 관찰할 수 없으며, 이는 데오필린에 의해 콜라겐 분해효소의 작용이 방해되기 때문을 보인다.
실험예 2
화학처리된 칼라겐-히알루론산 용액의 점도 측정
본 발명에 의하여 제조된 물질 데오필린을 처리한 군, EDTA를 처리한 군과 어떠한 처리도 하지 않은 군으로 나누어 일정량을 취하여 점도측정기(Brookfielf Programmable CV- II + Viscometer)를 사용하여 측정하였다.
그 결과는 다음의 표 1에 나타내었다
표 1 :

Sample	점도 (cP)	rpm	신뢰도
Untreated Col-HA solution	2414	6	49.2%
EDTA treated	1854	10	61.1%
Theophyllin treated	1912	10	63.7%

상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, 데오필린으로 처리한 아텔로콜라겐-히알루론산 복합용액은 비처리 용액의 약 5/6배에 해당하는 점도를 가지고 있다.
실험예 3
본 발명의 조성물을 건조한 후 주사전자현미경에 의하여 관찰하였다.
그 결과를 도 2의 A 및 B에 나타내었다.
A는 데오필린 처리 아텔로콜라겐-히알루론산 복합용액이며,
B는 A용액에 섬유소원 및 트롬빈 첨가후 프루로닉과 복합화시킨 용액이다. 섬유소원과 트롬빈의 응고에 의해 A의 아텔로콜라겐-히알루론산 섬유성 물질이 플로로닉과 밀착결합하여 구제체를 형성하고 있다.
실험예 4
본 조성물의 세포친화성 비교실험
세포독성 시험시 L929섬유아세포를 일정 농도로 배양한 후 본 발명의 조성물을 간접추출법에 의한 세포독성시험을 실시하였다.
그 결과를 도 3에 나타내었다.
도 3에서,
A는 음성대조군-폴리에틸렌필름,
B는 양성대조군-폴리우레탄 필름,
C는 본 발명에 의해 제조된 조성물을 건조한 필름이다.
음성대조군의 표면에는 세포의 부착이 없었으며, 양성대조군의 표면에는 세포의 점착을 관찰할 수 있다. 본 발명의 조성물의 경우, 세포가 점착된 다음 용질이 내부까지 증식하였으므로, 뛰어난 세포친화성을 가지고 있다고 볼 수 있다.

발명의 효과

본 발명에 의해 제조되는 자가조직화 주입형 연조직 보형재 조성물은 피하주사 혹은 평활근내 주사를 통하여 체내 전달되면, 플루로닉의 gel화에 소요되는 30분 이내에 임의로 형태를 부여할 수 있으며, 제공된 비면역성 아텔로콜라겐과 히알루론산을 사용하여 생체적합성이 우수한 구조기질을 제공하여 주위 세포의 접착과 성장을 서서히 유도하여 자가조직의 재생을 유도하며, 섬유소원과 트롬빈의 결합에 의해 체내에서 가교화를 이루어 섬유소가 되어 견고한 구조기질이 형성되므로서 콜라겐분해효소 활성억제제를 처리한 아텔로콜라겐의 체내 분해 억제에 대해 상승효 과를 얻을 수 있어 체내 분해가 억제되며, 생체내 비분해성 플루로닉이 제공한 초기형태를 유지하도록 하여 재생된 자가조직에 의해 보정된 해부학적형태가 계속 유지될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

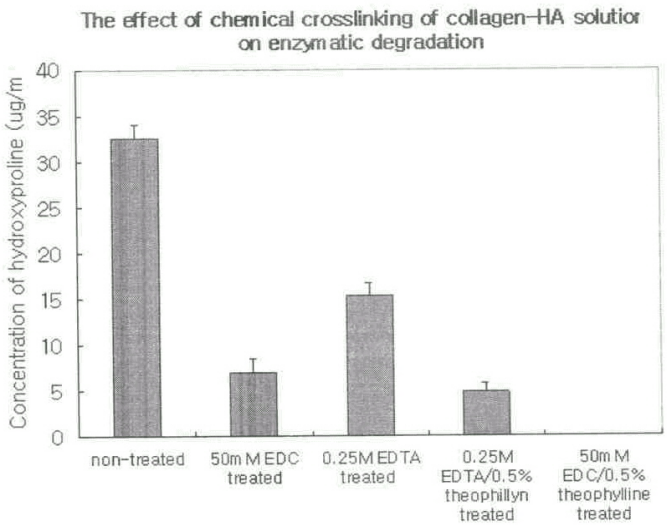
아텔로콜라겐과 히알루론산 및 섬유소원과 트롬빈 및 데오필린을 물에 용해하여 복합화한 연조직내 주입형 보형재료 조성물.

청구항 2.

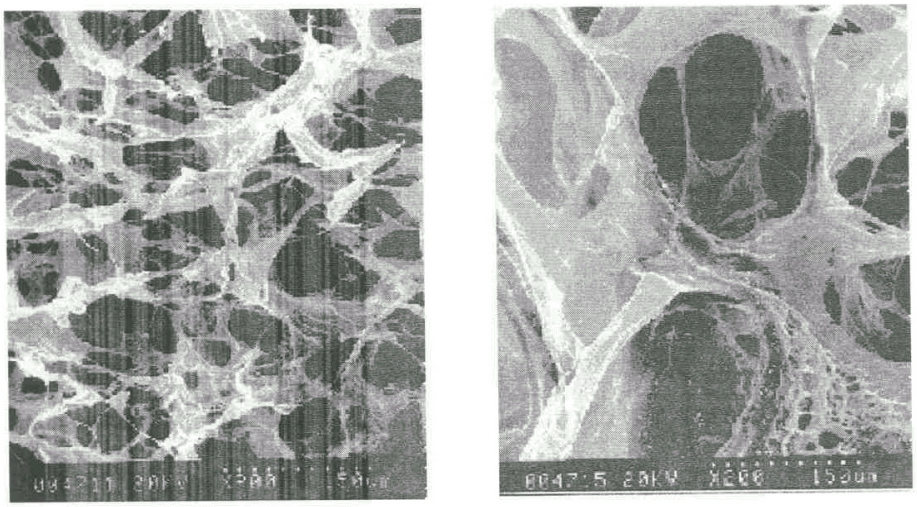
제 1항에 있어서, 아텔로콜라겐 0.1 ~ 5g, 히알루론산을 0.1 - 5g, 데오필린 0.01 ~ 0.1g, 섬유소원 0.001 ~ 0.2중량%, 트롬빈 50 ~ 1000unit를 첨가하고 물을 가하여 용해하고 pH를 약 중성으로 조절하고 전체를 100ml로 조절하여 제조된 연조직내 주입형 보형재료 조성물.

도면

도면1

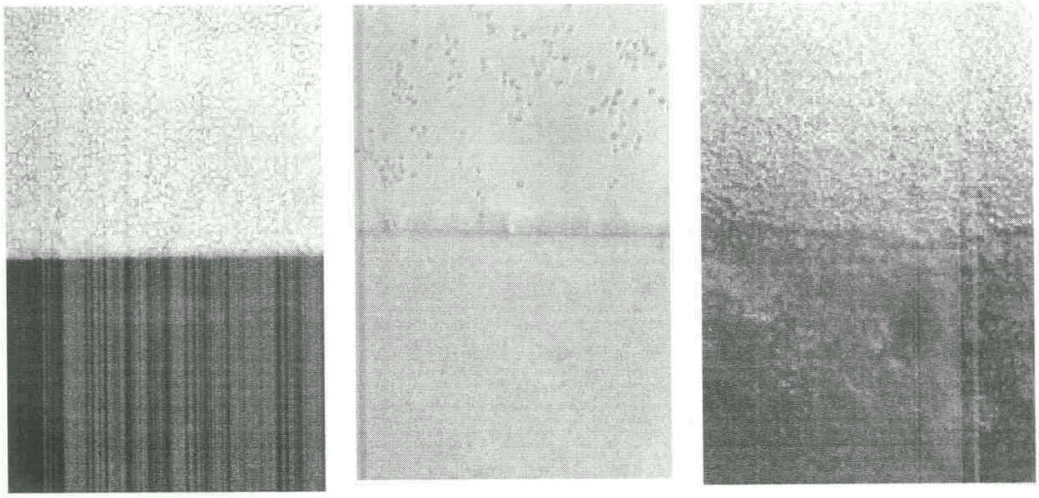


도면2



A B

도면3



A B C