

명세서

발명의 명칭: 조직 수복용 조성물 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 조직수복용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고분자를 이용한 조직수복용 조성물 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 사회의 구조가 변해가고 인구가 증가하면서 화상, 욕창, 외상, 성형, 난치성 궤양, 당뇨병 피부괴사 등의 환자의 수도 점점 증가함에 따라 이에 맞는 손상된 피부의 치료 방법도 발전하고 있다. 30년 전까지만 해도 화상으로 체표면적의 60% 이상이 손상되면 패혈증으로 사망하는 것이 보통이나, 최근에는 인공피부의 발전으로 수분손실과 감염을 막을 수 있어 사망률을 상당히 감소시킬 수 있게 되었다. 인공피부는 크게 창상피복재(wound dressing)와 배양피부(cultured skin)로 나뉜다.
- [3] 창상피복재는 국소적인 창상이나 상처 깊이가 심하지 않은 창상에 적용 가능하며, 식피가 가능할 때까지의 기간 동안 창상을 보호하거나, 자가 배양 피부가 완성 때까지 소요되는 3~4주 동안 상처를 보호하여 배양피부의 적용을 쉽게 하는 역할을 한다.
- [4] 배양피부는 심한 피부결손이나 광범위한 창상의 경우 반흔 조직을 최소화시키기 위한 치료방법에 사용되는 것으로서 세포배양 기술을 이용하여 피부세포를 충분히 증식시킨 후 영구 생착을 목적으로 이식된다. 하지만 배양피부의 경우는 박테리아, 진균류, 내독성 및 마이코플라스마(mycoplasma) 시험을 통한 안전성의 많은 검토가 필요하며, 여러 가지 바이러스 [HIV 1&2, HTLVII&III, CMV IgM, B형 및 C형 간염바이러스(Hepatitis B & C), 아테노바이러스] 시험을 거쳐 안정성을 확인하여 제조해야 하는 번거로움이 있다. 또한, 사체의 피부를 이식하는 경우 그것의 원산지 파악이 되지 않는 문제점과, 가공처리에 있어서 인체성분은 열가공이 불가능하기 때문에 위에서 언급한 치명적인 바이러스를 100% 멸균시킬 수 없는 단점을 지니고 있다. 그리고 세포를 배양하여 이식하는 데까지 걸리는 시간이 적어도 일주일 이상이 소요되므로 응급처치를 요구하는 환자의 경우에는 사용하기가 곤란하다.
- [5] 한편, 창상피복재의 경우에는 배양피부에 비해 광범위하게 적용이 가능하고 취급이 용이하며 응급처치를 요구하는 환자에게 적용할 수 있다는 장점이 있다. 그러나, 창상피복재는 일시적인 피복의 용도로 사용되었으므로 영구 생착에 어려움이 있다. 또한, 키틴, 키토산, 콜라겐과 같은 천연고분자의 창상피복재의 경우 기계적인 강도가 낮고 가격이 고가이며 대량 생산이 어렵고, 실리콘, 폴리우레탄 같은 합성고분자의 창상피복재의 경우 세포와의 친화성이 떨어지고

상처부위와의 밀착성 결여라는 단점을 가지고 있다.

- [6] 최근 히알루론산 젤을 이용한 제품들이 다수 개발되었는데, 히알루론산은 2주에서 2달 사이에 매우 빠르게 생체 내 재흡수가 일어나기 때문에 문제가 되었다. 이에, 한국 공개 특허 제10-2004-0072008호와 같이 히알루론산과 가교 물질을 서로 가교 연결하여 재흡수 기간을 연장시킨 제품이 판매되고 있다. 그러나, 이러한 가교제품도 가교물질의 독성으로 인한 문제점이 보고되고 있는 실정이다.
- [7] 이러한 문제로 최근 생체내 분해가 되는 고분자를 이용한 조직수복용 제품도 다수 개발되었는데, 기존 생체적합성 고분자를 이용한 필러 제형으로, 물에 녹지 않는 고분자를 마이크로사이즈의 입자로 가공한 후 점도가 있는 미디어(media)를 통해 분산시킨 제형으로 개발되어 사용되었다. 20 내지 50um의 폴리락트산(Poly lactic acid, PLA)입자를 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethylcellulose, CMC) 수용액에 분산시킨 제형 또는 20 내지 50um의 폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL) 입자를 CMC 및 글리세린(Glycerin) 수용액에 분산시킨 제형이 사용되었는데, 이는 주사 시 마이크로 입자가 바늘에 막히는 기술상의 불편함과 입자가 균일하게 분산되지 않아 균일한 조직 수복 효과가 나오지 못하는 문제점이 존재하였다.
- [8] 또한, Klaus Laeschke, 'Biocompatibility of Microparticles into Soft Tissue Fillers', "Semin Cutan Med Surg 23", 2004, 214-217에 따르면 고분자 기반의 조직수복용 제품의 경우 체내에서 식세포 작용(phagocytosis)을 피해서 장기간 효능을 발휘하기 위해서는 40um 이상의 입자 직경을 가져야 한다고 하였다. 하지만, 상기의 20um 이상의 입자 직경을 가지는 제형을 사용시 마이크로 입자가 바늘에 막히는 기술상의 불편함과 입자가 균일하게 분산되지 않아 균일한 조직 수복 효과가 나오지 못하는 문제점이 존재하였다.
- [9] 이러한 상기의 문제점을 개발하기 위한 조직수복용 제품의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 따라서 본 발명은 상기 문제를 해결하기 위하여 안출된 것으로, 독성이 없는 고분자를 이용하는 조직 수복용 조성물 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 전술한 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체를 포함하고, 상기 공중합체가 물에 분산된 콜로이드 상(phase)의 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 상기 조성물은 하기 수학적 1로 나타내는 K값의 범위가 0.3 내지 1.8인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [13] <수학적 1>

- [14] $K=(m_{100} * M_h^2 * 10)/(M_l * HLB^2)$
- [15] 수학식 1에서, m_{100} 은 수용액 100g중 중합체의 몰수이고, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M_l 는 소수성 부분의 분자량이고, HLB 는 하기 수학식2로 나타낸 값이다.
- [16] <수학식 2>
- [17] $HLB=20 * M_h / M$
- [18] 수학식 2에서, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M 은 분자 전체의 분자량이다.
- [19] 또한, 상기 수학식 2에 의한 HLB 의 값은 1 내지 14의 범위의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 조직수복용 조성물을 제공한다.
- [20] 또한, 상기 소수성 생체적합성 고분자는 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 폴리락트산, 폴리디옥사논, 폴리트리메틸카르보네이트, 폴리하이드록시부틸레이트 및 이를 포함하는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 고분자인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [21] 또한, 상기 친수성 생체적합성 고분자는 메톡시폴리에틸렌글리콜, 디히드록시폴리에틸렌글리콜, 모노알콕시폴리에틸렌글리콜 및 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 고분자인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [22] 또한, 상기 공중합체의 결합 구조는 하기 화학식 1, 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [23] [화학식 1]
- [24] X-Y
- [25] [화학식 2]
- [26] Y-X-Y
- [27] [화학식 3]
- [28] X-Y-X
- [29] 화학식 1 내지 3에서, X는 친수성 생체적합성 고분자이고, Y는 소수성 생체적합성 고분자이다.
- [30] 또한, 상기 친수성 생체적합성 고분자는 분자량이 300 내지 20,000g/mol인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [31] 또한, 상기 소수성 생체적합성 고분자는 분자량이 1,000 내지 30,000g/mol인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [32] 또한, 상기 공중합체는 분자량이 1,300 내지 50,000g/mol인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [33] 또한, 상기 공중합체의 콜로이드 용액 내의 농도는 10 내지 50중량%인 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [34] 또한, 상기 콜로이드 상은 탁도가 물을 첨가하는 경우 변화가 없거나 증가하는 것을 특징으로 하는 조직 수복용 조성물을 제공한다.

- [35] 또한, 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자를 중합시켜 중합체를 제조하는 단계 및 상기 중합체를 물에 가하여 콜로이드 용액을 얻는 단계를 포함하는 조직 수복용 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [36] 본 발명에 따르면, 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체를 포함하여 생체 내 주입 시 독성이 없어 안전하고, 응급환자에게 사용이 가능한 콜로이드 상의 조직 수복용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 PBS 및 콜로이드 수용액을 주입하고 난 후 시료의 누출 여부를 DSLR(D3000, Nikon, Japan)로 촬영한 사진이고,
[38] 도 2는 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 피부두께를 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고,
[39] 도 3은 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 콜라겐을 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고,
[40] 도 4는 PBS를 주입한 후 시간경과에 따른 피부두께를 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고,
[41] 도 5는 PBS를 주입한 후 시간경과에 따른 콜라겐을 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고,
[42] 도 6은 PBS 및 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 피부두께를 나타낸 그래프이고,
[43] 도 7은 콜로이드 수용액을 DSLR(D3000, Nikon, Japan)로 촬영한 사진이고,
[44] 도 8은 본원발명과 표준액의 탁도를 DSLR(D3000, Nikon, Japan)로 촬영하여 비교한 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [45] 이하 바람직한 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예의 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한, 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.

- [46]
- [47] 본 발명자들은 응급환자에게 사용이 가능하고 비교적 저렴한 가격으로 제조가 가능하며 독성이 없는 안전한 조직 수복용 조성물을 만들기 위하여 생체적합성 고분자를 연구한 결과, 친수성 생체적합성 고분자와 소수성 생체적합성 고분자를 중합시킨 공중합체가 생체 내에서 독성이 없이 안전하게 조직을 수복시킬 수 있고 응급환자에게 적용이 가능함을 발견하고 본 발명에 이르게 되었다.
- [48] 따라서 본 발명은 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체를 포함하고, 상기 공중합체가 물에 분산된 콜로이드 상(phase)의 조직 수복용 조성물을 개시한다.
- [49] 상기 콜로이드란 분자나 이온보다는 큰 미립자가 기체 또는 액체 중에 분산된 상태를 콜로이드 상태라고 하며, 콜로이드 상태로 되어 있는 전체를 콜로이드라고 한다.
- [50] 기존의 필러 제품은 육안으로 입자크기를 식별할 수 있으나, 본 발명에서 상기 콜로이드 상의 입자 크기는 육안으로 식별할 수 없으며 불용성 이물이 존재하지 않는 상태로서, 상기 불용성 이물이란, 미국 약전(USP)의 일반 시험법인 불용성 미립자 시험법에 따라 깨끗하게 닦은 용기에 용액 제제를 넣고 백색광원 바로 아래, 약 2750 내지 3000lx 밝기의 위치에서 육안으로 관찰 시 쉽게 검출되는 불용성 이물질을 말한다.
- [51] 본 발명에서 상기 입자크기는 육안으로 식별할 수 없는 경우로서, 상기 조성물을 체내에 주입 시 고분자간의 결합으로 매트릭스 구조를 형성하여 식균작용이 일어나지 않고 피부 내에서 장기간 조직 수복효능을 발휘할 수 있다.
- [52] 본 발명에서 상기 조성물의 하기 수학적 1로 나타내는 K값의 범위가 0.3 내지 1.8일 수 있고 바람직하게는 0.4 내지 1.5일 수 있다. 상기 K값이 0.3 미만이거나 1.8을 초과하게 되면 제형으로의 효능이 저하될 수 있다.
- [53] <수학적 1>
- [54]
$$K = (m_{100} * M_h^{2*10}) / (M_l * HLB^2)$$
- [55] 수학적 1에서, m_{100} 은 수용액 100g중 중합체의 몰수이고, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M_l 는 소수성 부분의 분자량이고, HLB는 하기 수학적 2로 나타낸 값이다.
- [56] <수학적 2>
- [57]
$$HLB = 20 * M_h / M$$
- [58] 수학적 2에서, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M 은 분자 전체의 분자량이다.
- [59] 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체가 물에 녹아 용해된 콜로이드 수용액에서, 수용액 100g에 녹아있는 상기 공중합체의 몰수가 상기 소수성 생체적합성 고분자 분자량, 상기 친수성 생체적합성 고분자의 분자량 및 혼합비율에 따라 일정한 값을 가지지 않아 본 발명인 조직 수복용 조성물의 조직 수복효능의 범위를 설정할 수 없었다. 이에

본 발명은 조직 수복용 조성물의 조직 수복효능의 범위를 도출해 내기 위하여 상기 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체가 물에 녹아 용해된 콜로이드 수용액에서, 수용액 100g에 녹아있는 상기 공중합체의 몰수와 친수성 생체적합성 고분자, 소수성 생체적합성 고분자 및 HLB의 상관관계를 연구한 결과 일정한 값을 확인하였고 이를 K값이라고 정하였다.

- [60] 즉, 본 발명에서 상기 K값은 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자가 중합된 공중합체가 분산된 콜로이드 상에서 측정된 수용액 100g에 녹아있는 고분자의 몰수, 소수성 생체적합성 고분자의 분자량, 친수성 생체적합성 고분자의 분자량 및 HLB값의 관계를 나타낸 값이다.
- [61] 상기 콜로이드 상에서 K값은 상기 수용액 100g에 녹아있는 고분자의 몰수, 상기 소수성 생체적합성 고분자의 분자량, 상기 친수성 생체적합성 고분자의 분자량 및 상기 HLB에 따라 일정한 값을 나타낸다.
- [62] 상기 제형의 효능이란, 체내에 도입되기 전에는 공중합체 중 친수성 고분자의 역할이 크게 작용하여 용매와 고분자의 상호작용으로 인해 육안으로 식별 가능한 불용성 이물이 없이 수용액 중에 골고루 안정적으로 분산된 콜로이드 상을 형성하게 되나, 체내에 도입된 이후에는 체내 환경의 영향으로 소수성 고분자의 역할이 크게 작용하여 수용액 중에 고분자가 안정적으로 분산된 구조가 무너지면서 고분자 간의 결합으로 형성된 매트릭스 구조가 콜라겐을 유도하여 조직을 수복하게 되는 것을 말한다.
- [63] 또한, 상기 조직 수복이란 피부 조직 등의 외상이나 염증 등의 원인으로 조직에 피사, 결손이 생겼을 대에 그 조직을 본래의 상태로 되돌리려고 하는 기전을 말한다.
- [64] 본 발명에서 고분자 분자량은 수평균분자량(Number Average Molecular Weight, Mn)을 의미한다. 수평균분자량이란 분자량 분포를 갖는 고분자 화합물의 성분 분자 종의 분자량을 수분율 혹은 몰 분율로 평균하여 얻게 되는 평균 분자량을 의미한다.
- [65] 상기 수학적 식 2에 의한 HLB의 값은 1 내지 14의 범위일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 12이며 더욱 바람직하게는 2.5 내지 10의 범위일 수 있다. HLB의 값이 1 미만이면 상기 중합된 고분자가 물에 용해되지 않을 수 있고, 14를 초과하면 체내 주입시 체내로 흡수되어 제형으로의 효능이 없을 수 있다.
- [66] 본 발명에서 HLB값(Hydrophile-Lipophile Balance)이란 양친성 고분자의 물과 기름에 대한 친화성 정도를 나타내는 값이다. HLB가 크다는 것은 친수성 고분자의 비율이 높고, 작다는 것은 친수성 고분자의 비율이 낮다는 것을 가리킨다.
- [67] 상기 소수성 생체적합성 고분자는 상기 수학적 식 1에 따른 K값에 부합되도록, 폴리글리콜산 (polyglycolic acid), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락트산 (polylactic acid), 폴리디옥사논 (polydioxanone), 폴리트리메틸카르보네이트

- (polythree methyl carbonate), 폴리하이드록시부틸레이트 (polyhydroxybutyrate) 및 이를 포함하는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 고분자일 수 있으며, 바람직하게는 폴리카프로락톤일 수 있다.
- [68] 상기 친수성 생체적합성 고분자는 상기 수학식 1에 따른 K값에 부합되도록, 메톡시폴리에틸렌글리콜 (methoxy polyethylene glycol), 디히드록시폴리에틸렌글리콜 (dihydroxy polyethylene glycol), 모노알콕시폴리에틸렌글리콜 (mono alkoxy polyethylene glycol) 및 폴리에틸렌글리콜로 (polyethylene glycol)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 고분자일 수 있고, 바람직하게는 메톡시폴리에틸렌글리콜일 수 있다.
- [69] 상기 공중합체의 결합 구조는 하기 화학식 1로 표시될 수 있고, 화학식 2로 표시될 수 있고 또는 화학식 3의 구조로 표시될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] [화학식 1]
- [71] X-Y
- [72] [화학식 2]
- [73] Y-X-Y
- [74] [화학식 3]
- [75] X-Y-X
- [76] 화학식 1 내지 3에서, X는 친수성 생체적합성 고분자이고, Y는 소수성 생체적합성 고분자이다.
- [77] 상기 친수성 생체적합성 고분자의 분자량은 상기 수학식 1에 따른 K값에 부합되도록, 300 내지 20,000g/mol일 수 있고, 바람직하게는 700 내지 15,000g/mol일 수 있고, 더욱 바람직하게는 1,000 내지 10,000g/mol일 수 있다.
- [78] 상기 소수성 생체적합성 고분자의 분자량은 상기 수학식 1에 따른 K값에 부합되도록, 1,000 내지 30,000g/mol일 수 있고, 바람직하게는 1,500 내지 27,500g/mol일 수 있고, 더욱 바람직하게는 2,000 내지 25,000g/mol일 수 있다.
- [79] 상기 공중합체의 분자량은 상기 수학식 1에 따른 K값에 부합되도록, 1,300 내지 50,000g/mol일 수 있고, 바람직하게는 2,200 내지 42,500g/mol일 수 있고, 더욱 바람직하게는 3,000 내지 35,000g/mol일 수 있다.
- [80] 상기 공중합체의 콜로이드 용액 내의 농도는 상기 수학식 1에 따른 K값에 부합되도록 10 내지 50중량%일 수 있고, 바람직하게는 13 내지 48중량%일 수 있고, 더욱 바람직하게는 15 내지 45중량%일 수 있다. 50%를 초과하면 콜로이드상 수용액이 점도가 매우 높은 젤 성상을 띄게 되어 주사기를 통한 주입이 매우 어려워질 수 있고, 10% 미만이면 제형으로서의 효능이 없을 수 있다.
- [81] 상기 콜로이드 상은 탁도가 물을 첨가한 경우에 있어 변화가 없거나 증가한다. 일반적인 콜로이드 상은 물을 가하는 경우에는 탁도가 감소하지만, 본원발명의

콜로이드 상의 탁도는 감소하지 않는다. 상기 본원발명에서 콜로이드 상으로 분산된 고분자는 친수성 생체고분자와 소수성 생체고분자가 함께 물에 녹을 수 있는 구조를 형성하고 있다. 그러나 물을 가하는 경우 친수성 생체고분자 및 소수성 생체고분자가 형성하고 있는 가용화된 구조가 깨지게 된다. 따라서, 상기와 같이 물을 가하는 경우 소수성 생체고분자 상호 간의 결합이 형성되어 탁도에 변화가 없거나 오히려 증가하게 된다.

- [82] 본 발명은 다른 양태로서 상기 조직 수복용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [83] 상기 제조방법은, 소수성 생체적합성 고분자 및 친수성 생체적합성 고분자를 중합시켜 공중합체를 제조하는 단계 및 상기 공중합체를 물에 가하여 콜로이드 용액을 얻는 단계를 포함한다.
- [84] 이때, 상기 공중합체가 물에 분산된 콜로이드 용액의 경우, 공중합체의 녹는점 내지 물의 끓는점 사이의 온도로 가열함으로써 입자의 크기를 육안으로 식별할 수 없으며 불용성 이물이 존재하지 않는 콜로이드 상이 형성된다.
- [85] 상기 제조방법으로 제조된 조직 수복용 조성물은 피부 내에 주입되면 콜라겐을 형성하는 조직 수복효과를 보인다.
- [86] 이하, 본 발명에 따른 구체적인 제조예 및 실시예를 들어 설명한다. 제조예 및 실시예의 기재 중에서 사용한 화학물의 약호는 다음과 같다.
- [87] - mPEG : 메톡시폴리에틸렌글리콜 (methoxypolyethylene glycol)
- [88] - PCL : 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)
- [89]
- [90] 제조예 1 : mPEG2000-PCL2000 고분자 제형의 제조
- [91] 친수성 생체적합성 고분자로써 분자량 2,000g/mol인 메톡시폴리에틸렌글리콜 (methoxypolyethleneglycol)에 소수성 생체적합성 고분자로써 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 단량체를 촉매하에서 중합하여 공중합체(mPEG2000-PCL2000)를 제조하였다.
- [92]
- [93] 제조예 2 : mPEG2000-PCL4000 고분자 제형의 제조
- [94] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 4,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [95]
- [96] 제조예 3 : mPEG2000-PCL5000 고분자 제형의 제조
- [97] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [98]
- [99] 제조예 4 : mPEG2000-PCL7500 고분자 제형의 제조
- [100] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신

분자량 7,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.

[101]

[102] 제조예 5 : mPEG2000-PCL10000 고분자 제형의 제조

[103] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.

[104]

[105] 제조예 6 : mPEG2000-PCL12500 고분자 제형의 제조

[106] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 12,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.

[107]

[108] 제조예 7 : mPEG2000-PCL15000 고분자 제형의 제조

[109] 제조예 1에서 분자량 2,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 15,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.

[110]

[111] 제조예 8 : mPEG5000-PCL5000 고분자 제형의 제조

[112] 친수성 생체적합성 고분자로써 분자량 5,000g/mol인 메톡시폴리에틸렌글리콜 (methoxypolyethleneglycol)에 소수성 생체적합성 고분자로써 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 단량체를 촉매 하에서 중합하여 공중합체 (mPEG5000-PCL5000)을 제조하였다.

[113]

[114] 제조예 9 : mPEG5000-PCL7500 고분자 제형의 제조

[115] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 7,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.

[116]

[117] 제조예 10 : mPEG5000-PCL10000 고분자 제형의 제조

[118] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.

[119]

[120] 제조예 11 : mPEG5000-PCL12500 고분자 제형의 제조

[121] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 12,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.

- [122]
- [123] 제조예 12 : mPEG5000-PCL15000 고분자 제형의 제조
- [124] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 15,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [125]
- [126] 제조예 13 : mPEG5000-PCL17500 고분자 제형의 제조
- [127] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 17,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [128]
- [129] 제조예 14 : mPEG5000-PCL20000 고분자 제형의 제조
- [130] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 20,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [131]
- [132] 제조예 15 : mPEG5000-PCL25000 고분자 제형의 제조
- [133] 제조예 8에서 분자량 5,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 25,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 8과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [134]
- [135] 제조예 16 : mPEG10000-PCL10000 고분자 제형의 제조
- [136] 친수성 생체적합성 고분자로써 분자량 10,000g/mol인 메톡시폴리에틸렌글리콜 (methoxypolyethleneglycol)에 소수성 생체적합성 고분자로써 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 단량체를 축매 하에서 중합하여 공중합체 (mPEG10000-PCL10000)을 제조하였다.
- [137]
- [138] 제조예 17 : mPEG10000-PCL12500 고분자 제형의 제조
- [139] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 12,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [140]
- [141] 제조예 18 : mPEG10000-PCL15000 고분자 제형의 제조
- [142] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 15,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [143]
- [144] 제조예 19 : mPEG10000-PCL17500 고분자 제형의 제조

- [145] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 17,500g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [146]
- [147] 제조예 20 : mPEG10000-PCL20000 고분자 제형의 제조
- [148] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 20,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [149]
- [150] 제조예 21 : mPEG10000-PCL25000 고분자 제형의 제조
- [151] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 25,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [152]
- [153] 제조예 22 : mPEG10000-PCL30000 고분자 제형의 제조
- [154] 제조예 16에서 분자량 10,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone) 대신 분자량 30,000g/mol인 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)으로 중합한 것을 제외하고는 제조예 16과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [155]
- [156] 실시예 1
- [157] 상기 제조예 1 내지 22에 의해 제조된 고분자에 물을 가하여 80°C 온도로 가열 후 혼합하여 고분자 5중량%의 콜로이드 수용액을 제조하였다.
- [158]
- [159] 실시예 2
- [160] 실시예 1에서 고분자 10중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.
- [161]
- [162] 실시예 3
- [163] 실시예 1에서 고분자 15중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.
- [164]
- [165] 실시예 4
- [166] 실시예 1에서 고분자 20중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.
- [167]
- [168] 실시예 5
- [169] 실시예 1에서 고분자 25중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[170]

[171] 실시예 6

[172] 실시예 1에서 고분자 30중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[173]

[174] 실시예 7

[175] 실시예 1에서 고분자 35중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[176]

[177] 실시예 8

[178] 실시예 1에서 고분자 40중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[179]

[180] 실시예 9

[181] 실시예 1에서 고분자 45중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[182]

[183] 실시예 10

[184] 실시예 1에서 고분자 50중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[185]

[186] 실시예 11

[187] 실시예 1에서 고분자 55중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[188]

[189] 실시예 12

[190] 실시예 1에서 고분자 60중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[191]

[192] 실시예 13

[193] 실시예 1에서 고분자 65중량%의 콜로이드 수용액을 제조한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 콜로이드 수용액을 제조하였다.

[194]

[195] 실험예 1

[196] 이상의 실시예 1 내지 13에 따라 제조된 조직 수복용 조성물에 대해 수용액 100g중 고분자의 물수를 측정하고, 하기 수학식 1에 따른 K값을 측정하였다. 이에 따라 제형의 효능을 평가(제형의 효능이 있는 부분은 하이라이트 처리)하였고, 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[197] <수학식 1>

[198] $K=(m_{100} * M_h^2 * 10)/(M_l * HLB^2)$ [199] 수학식 1에서, m_{100} 은 수용액 100g중 중합체의 몰수이고, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M_l 는 소수성 부분의 분자량이고, HLB는 하기 수학식2로 나타낸 값이다.

[200] <수학식 2>

[201] $HLB=20 * M_h / M$ [202] 수학식 2에서, M_h 는 친수성 부분의 분자량이고, M 은 분자 전체의 분자량이다.

[203]

[204] [표1]

수용액 중 고분자 농도 (중량%)				5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%
수용액 100g 중 고분자 몰수	mPEG	PCL	HLB	0.0013	0.0025	0.0038	0.0050	0.0063	0.0075	0.0088	0.0100	0.0113	0.0125	0.0138	0.0150	0.0163
	2000	2000	10.00	0.0008	0.0017	0.0025	0.0033	0.0042	0.0050	0.0058	0.0067	0.0075	0.0083	0.0092	0.0100	0.0108
	2000	4000	6.67	0.0007	0.0014	0.0021	0.0028	0.0035	0.0043	0.0050	0.0057	0.0064	0.0071	0.0079	0.0086	0.0093
	2000	5000	5.71	0.0005	0.0011	0.0016	0.0021	0.0026	0.0031	0.0036	0.0041	0.0047	0.0053	0.0058	0.0063	0.0068
	2000	7500	4.21	0.0004	0.0008	0.0012	0.0017	0.0021	0.0026	0.0031	0.0036	0.0042	0.0047	0.0053	0.0058	0.0063
	2000	10000	3.33	0.0003	0.0006	0.0009	0.0013	0.0017	0.0021	0.0026	0.0031	0.0036	0.0042	0.0046	0.0050	0.0054
	2000	12500	2.76	0.0003	0.0007	0.0010	0.0014	0.0017	0.0021	0.0026	0.0031	0.0036	0.0041	0.0046	0.0050	0.0054
	2000	15000	2.35	0.0003	0.0006	0.0009	0.0012	0.0015	0.0018	0.0021	0.0024	0.0028	0.0032	0.0036	0.0040	0.0043
	5000	5000	10.00	0.0005	0.0010	0.0015	0.0020	0.0025	0.0030	0.0035	0.0040	0.0045	0.0050	0.0055	0.0060	0.0065
	5000	7500	8.00	0.0004	0.0008	0.0012	0.0016	0.0020	0.0024	0.0028	0.0032	0.0036	0.0040	0.0044	0.0048	0.0052
	5000	10000	6.67	0.0003	0.0007	0.0010	0.0013	0.0017	0.0020	0.0023	0.0027	0.0030	0.0033	0.0037	0.0040	0.0043
	5000	12500	5.71	0.0003	0.0006	0.0009	0.0011	0.0014	0.0017	0.0020	0.0023	0.0026	0.0029	0.0031	0.0034	0.0037
	5000	15000	5.00	0.0003	0.0005	0.0008	0.0010	0.0013	0.0015	0.0018	0.0020	0.0023	0.0025	0.0028	0.0030	0.0033
	5000	17500	4.44	0.0002	0.0004	0.0007	0.0009	0.0011	0.0013	0.0016	0.0018	0.0020	0.0022	0.0024	0.0027	0.0029
	5000	20000	4.00	0.0002	0.0004	0.0006	0.0008	0.0010	0.0012	0.0014	0.0016	0.0018	0.0020	0.0022	0.0024	0.0026
	5000	25000	3.33	0.0002	0.0003	0.0005	0.0007	0.0009	0.0010	0.0012	0.0013	0.0015	0.0017	0.0018	0.0020	0.0022
	10000	10000	10.00	0.0003	0.0006	0.0009	0.0010	0.0013	0.0015	0.0018	0.0020	0.0023	0.0025	0.0028	0.0030	0.0033
	10000	12500	8.89	0.0002	0.0004	0.0007	0.0009	0.0011	0.0013	0.0016	0.0018	0.0020	0.0022	0.0024	0.0027	0.0029
	10000	15000	8.00	0.0002	0.0004	0.0006	0.0008	0.0010	0.0012	0.0014	0.0016	0.0018	0.0020	0.0022	0.0024	0.0026
	10000	17500	7.27	0.0002	0.0004	0.0005	0.0007	0.0009	0.0011	0.0013	0.0015	0.0016	0.0018	0.0020	0.0022	0.0024
	10000	20000	6.67	0.0002	0.0003	0.0005	0.0007	0.0009	0.0010	0.0012	0.0013	0.0015	0.0017	0.0018	0.0020	0.0022
	10000	25000	5.71	0.0001	0.0003	0.0004	0.0006	0.0007	0.0009	0.0010	0.0011	0.0013	0.0014	0.0016	0.0017	0.0019
	10000	30000	5.00	0.0001	0.0003	0.0004	0.0005	0.0006	0.0008	0.0009	0.0010	0.0011	0.0013	0.0014	0.0015	0.0016

[205]

[206] [표2]

수용액 중 고분자 농도 (중량%)				5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%
K factor	mPEG	PCL	HLB	0.2500	0.5000	0.7500	1.0000	1.2500	1.5000	1.7500	2.0000	2.2500	2.5000	2.7500	3.0000	3.2500
	2000	2000	10.00	0.1875	0.3750	0.5625	0.7500	0.9375	1.1250	1.3125	1.5000	1.6875	1.8750	2.0625	2.2500	2.4375
	2000	4000	6.67	0.1750	0.3500	0.5250	0.7000	0.8750	1.0500	1.2250	1.4000	1.5750	1.7500	1.9250	2.1000	2.2750
	2000	5000	5.71	0.1583	0.3167	0.4750	0.6333	0.7917	0.9500	1.1083	1.2667	1.4250	1.5833	1.7417	1.9000	2.0583
	2000	7500	4.21	0.1500	0.3000	0.4500	0.6000	0.7500	0.9000	1.0500	1.2000	1.3500	1.5000	1.6500	1.8000	1.9500
	2000	10000	3.33	0.1450	0.2900	0.4350	0.5800	0.7250	0.8700	1.0150	1.1600	1.3050	1.4500	1.5950	1.7400	1.8850
	2000	12500	2.76	0.1417	0.2833	0.4250	0.5667	0.7083	0.8500	0.9917	1.1333	1.2750	1.4167	1.5583	1.7000	1.8417
	2000	15000	2.35	0.1350	0.2700	0.4050	0.5400	0.6750	0.8100	0.9450	1.0800	1.2150	1.3500	1.4850	1.6200	1.7550
	5000	5000	10.00	0.2083	0.4167	0.6250	0.8333	1.0417	1.2500	1.4583	1.6667	1.8750	2.0833	2.2917	2.5000	2.7083
	5000	7500	8.00	0.1875	0.3750	0.5625	0.7500	0.9375	1.1250	1.3125	1.5000	1.6875	1.8750	2.0625	2.2500	2.4375
	5000	10000	6.67	0.1750	0.3500	0.5250	0.7000	0.8750	1.0500	1.2250	1.4000	1.5750	1.7500	1.9250	2.1000	2.2750
	5000	12500	5.71	0.1667	0.3333	0.5000	0.6667	0.8333	1.0000	1.1667	1.3333	1.5000	1.6667	1.8333	2.0000	2.1667
	5000	15000	5.00	0.1607	0.3214	0.4821	0.6429	0.8036	0.9643	1.1250	1.2857	1.4464	1.6071	1.7679	1.9286	2.0893
	5000	20000	4.00	0.1563	0.3125	0.4688	0.6250	0.7813	0.9375	1.0938	1.2500	1.4063	1.5625	1.7188	1.8750	2.0313
	5000	25000	3.33	0.1500	0.3000	0.4500	0.6000	0.7500	0.9000	1.0500	1.2000	1.3500	1.5000	1.6500	1.8000	1.9500
	10000	10000	10.00	0.2500	0.5000	0.7500	1.0000	1.2500	1.5000	1.7500	2.0000	2.2500	2.5000	2.7500	3.0000	3.2500
	10000	12500	8.89	0.2250	0.4500	0.6750	0.9000	1.1250	1.3500	1.5750	1.8000	2.0250	2.2500	2.4750	2.7000	2.9250
	10000	15000	8.00	0.2083	0.4167	0.6250	0.8333	1.0417	1.2500	1.4583	1.6667	1.8750	2.0833	2.2917	2.5000	2.7083
	10000	17500	7.27	0.1964	0.3929	0.5893	0.7857	0.9821	1.1786	1.3750	1.5714	1.7679	1.9643	2.1607	2.3571	2.5536
	10000	20000	6.67	0.1875	0.3750	0.5625	0.7500	0.9375	1.1250	1.3125	1.5000	1.6875	1.8750	2.0625	2.2500	2.4375
	10000	25000	5.71	0.1750	0.3500	0.5250	0.7000	0.8750	1.0500	1.2250	1.4000	1.5750	1.7500	1.9250	2.1000	2.2750
	10000	30000	5.00	0.1667	0.3333	0.5000	0.6667	0.8333	1.0000	1.1667	1.3333	1.5000	1.6667	1.8333	2.0000	2.1667

[207] 표 1을 참조하면, 수용액 100g중 녹아있는 고분자의 몰수를 알 수 있고, 일정한 농도에서 HLB값이 낮을수록 몰수가 감소함을 알 수 있다.

[208] 농도가 45중량%를 초과하면 콜로이드 수용액의 점성이 강해져 주사로 주입이 어려워지고, 15중량% 미만이면 체내 주입시 체내로 흡수되어 제형의 효능이 없었다.

[209] 또한, HLB이 2.5미만이면 소수성 생체적합성 고분자의 비율이 높아 물을 가하는 경우 고분자가 용해되지 않고, 10을 초과하면 체내로 주입시 체내로

흡수되어 제형의 효능이 없었다.

- [210] 그러나 표 1에서 친수성 생체고분자 및 소수성 생체고분자의 비율이 아닌 중합시킨 중합체의 분자량으로 판단 시, mPEG 2,000g/mol과 mPEG 5,000g/mol을 비교해보면 mPEG 2,000g/mol일 때, 수용액 100g중 고분자의 몰수가 mPEG 5,000g/mol일 때보다 증가하였다. 따라서, 수용액 100g중 고분자의 몰수가 일정하다고 볼 수 없으므로 이를 일정한 값으로 환산하고, 이를 통해 본 발명에 따른 조직 수복용 조성물의 형성범위를 측정하기 위하여 K값을 도출하였다.
- [211] 표 2를 참조하면, 표 1과는 달리, 친수성 생체고분자 및 소수성 생체고분자의 분자량과 HLB의 값과의 관계를 파악할 수 있고, 친수성 생체고분자의 분자량이 동일한 경우, 소수성 생체고분자의 분자량이 증가할수록 K값은 감소한다. 이는 친수성 생체고분자 및 소수성 생체고분자의 비율로 판단하는 경우에도 동일하다. 또한, 친수성 생체고분자의 분자량이 다르다고 하더라도 친수성 생체고분자 및 소수성 생체고분자의 비율이 동일한 경우에는 K값이 매우 유사한 값을 가지는 것을 알 수 있다.
- [212] 상기 K값은 후술하는 일정 농도 범위 내에서 일정한 값을 가지며 이 범위 내에서 제형의 효능을 확인할 수 있다. 또한, K값은 약 0.12 내지 3.26으로 환산되고, 제형의 효능이 있는 부분은 0.4 내지 1.5의 범위이다.
- [213] 또한, 콜로이드 수용액에서 농도 15 내지 45중량%, HLB 2.5 내지 10 및 K값은 0.4 내지 1.5에서 제형으로서의 효능이 있음을 확인할 수 있다.

[214]

[215] 실험예 2

- [216] 본 발명에 따른 조직 수복용 조성물을 하기 방법에 따라 탁도를 측정하기 위해 제조예 3을 이용하여 제조된 콜로이드 상을 사용하였고, 이에 대한 결과를 하기도 8에 나타내었다. 탁도 표준액으로 4000NTU의 formazin turbidity standard를 사용하였다.

[217]

[218] <측정방법>

- [219] (1) 표준액 및 상기 제조예 3을 이용하여 제조된 콜로이드 상을 각각 2배, 5배, 10배 및 20배로 희석한 용액을 만들어 바이알에 담아 비교용 시료를 제조하였고, 희석된 표준 용액의 탁도는 각각 4000, 2000, 800, 400 및 200NTU이다.
- [220] (2) 탁도 비교용 시료들의 바이알 바깥쪽을 닦고 백색 LED광원 아래 약 1000 lx 밝기에서 육안으로 희석에 따른 탁도 변화와 동일 희석비율에서의 탁도 차이를 관찰하였다.
- [221]
- [222] 도 8은 본원발명과 표준액의 탁도를 DSLR(D3000, NIcon, Japan)로 촬영하여 비교한 사진이다.
- [223] 도 8을 참고하면, 표준액의 경우 왼쪽에서 오른쪽으로, 희석이 될수록 탁도가 낮아지는 것을 알 수 있다.

- [224] 반면, 본원발명의 경우 왼쪽에서 오른쪽으로, 희석이 되더라도 탁도는 낮아지지 않고, 오히려 원액보다 진해진 경우를 육안으로 확인할 수 있다.
- [225]
- [226] 실험예 3
- [227] 본 발명에 따른 조직 수복용 조성물의 제형으로서의 효능 검증을 위해 동물실험을 시행하였다.
- [228] 시험동물로 생후 6주의 SD Rat(오리엔트 바이오에서 구입)를 사용하였다.
- [229] 상기 실험은 생후 6주의 SD Rat 한 개체당 8개소로 한측은 인산완충식염수(PBS)로, 반대측은 시험물질 군으로 지정하여 총 10마리의 Rat을 3군으로 세분화하였다. 실험기간 동안 사육 환경은 온도 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간 12시간으로 설정하였고, 먹이는 자유롭게 먹을 수 있게 하였다.
- [230] 각 군별 Rat의 정중선을 중심으로 왼쪽 피하층에 음성대조군으로 PBS를 주입하였고, 오른쪽 피하층에 상기 제조예 3에서 제조한 고분자를 물에 녹여 제조한 콜로이드 수용액(농도 25%, HLB 5.7, K값 0.8864)을 $250\mu\text{L}$ 씩 일정하게 주입하여 주입 직후 시료의 누출 여부를 관찰하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [231] 상기 콜로이드 수용액 및 PBS 투여 직후(0'hr), 1주, 2주, 4주 및 6주경과 후에 실험동물을 희생시켜, 시료 주입 부위의 피부 조직과 주입하지 않은 피부 조직을 적출하여 10% neutral buffered formalin 용액에 고정하였다. 그 후, 파라핀(paraffin)에 포매하여 굳히고, $5\mu\text{m}$ 절편을 제작하였다. Hematoxylin and Eosin(H&E)으로 염색한 후 염증/이물반응을 하기 표 3에 따라 평가하고, 시료 주입에 따른 피부 전층(진피층, 피하층)의 두께증가를 광학 현미경을 통해 관찰하였고, 그 결과를 도 2, 4 및 6에 각각 나타내었다.
- [232] 또한, 콜로이드 수용액 및 PBS의 신생콜라겐 생합성력을 평가하기 위하여 Masson's Trichrome(MT)으로 염색한 후 조직 내의 콜라겐 형성을 관찰하였다. 주입된 시료의 생체조직 적합성은 주요한 기준이 되는 하기 표 3에 따라 염증 및 이물반응 확인을 통하여 평가하였다. 광학 현미경을 이용하여 조직 슬라이드를 40배, 100배, 200배, 400배율로 관찰한 후 각 슬라이드별 주요 조직학적 특징을 판독하였고, 그 결과를 도 3 및 5에 나타내었다.
- [233] 또한, 상기 주입된 콜로이드 수용액에 의한 염증과 이물반응 정도를 4단계로 나누어 PBS 투여군에서 관찰되는 염증과 이물반응을 no inflammation으로 설정하고 염증반응이나 이물반응이 심화 될수록 almost clear(score 1), mild(score 2), moderate(score 3), severe(score 4)로 하기 표 3에 따라 평가한다(Duranti et al. Dermatol Surg 1998;24:1317-25).
- [234]

[235] [표3]

Grade		Foreign body granuloma
score 0	No inflammation	No visible reaction
score 1	almost clear	Slight reaction with a few inflammatory cells
score 2	mild	Clear inflammatory reaction with one or two giant cells
score 3	moderate	Fibrous tissue with inflammatory cells, lymphocytes and giant cells
score 4	severe	Granuloma with encapsulated implant-clear foreign body reaction

[236] 도 1은 PBS 및 콜로이드 수용액을 주입하고 난 후 시료의 누출 여부를 DSLR(D3000, Nikon, Japan)로 촬영한 사진이고, 도 2는 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 피부두께를 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고, 도 3은 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 콜라겐을 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이다. 또한, 도 4는 PBS를 주입한 후 시간경과에 따른 피부두께를 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고, 도 5는 PBS를 주입한 후 시간경과에 따른 콜라겐을 광학 현미경을 통해 촬영한 사진이고, 도 6은 PBS 및 콜로이드 수용액을 주입한 후 시간 경과에 따른 피부두께를 나타낸 그래프이다.

[237]

[238] 도 1을 참조하면, PBS 및 콜로이드 수용액을 투여한 직후에 관찰하면 누출되는 시료가 없음을 확인할 수 있다.

[239] 도 2, 4 및 6을 참조하면, H&E 염색으로 조직병리학적 평가한 결과, 콜로이드 수용액을 주입한 조직 피하층에서 콜로이드 수용액 주입에 따라 피하층의 두께 또한 6주까지 시간 경과에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있고, 그에 따른 증가 폭이 PBS를 주입한 도 4에 비하여 확연히 향상된 것을 알 수 있다.

[240] 도 3 및 5를 참조하면, MT 염색으로 조직병리학적 평가한 결과 콜로이드 수용액을 주입한 조직 피하층에서 콜로이드 수용액 주입에 의한 콜라겐 형성이 확인되었고, 콜라겐 형성에 따라 피하층의 두께 또한 6주까지 시간 경과에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있고, 그에 따른 증가 폭이 PBS를 주입한 도 5에 비하여 확연히 향상된 것을 알 수 있다.

[241] 또한, 도 2 내지 5를 참조하면, 상기 표 3에 따라 이물반응 평가시 콜로이드 수용액 주입에 의한 큰 이물반응이 보이지 않고 섬유조직의 염증세포, 림프구 및 거대세포가 거의 보이지 않는 Score 1로 콜로이드 수용액 투여 전과 차이가 없음을 확인하였다.

[242] 이와 같이, 본 발명에 따라 농도, HLB 및 K값을 충족하는 경우 독성이 없는 생체적합성 고분자를 이용하는 조직 수복용 조성물 및 이의 제조방법을 제공할 수 있게 된다.

[243]

[244] 이상으로 본 발명의 바람직한 실시예를 도면을 참고하여 상세하게 설명하였다.

본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

- [245] 따라서, 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미, 범위 및 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.