

명세서

발명의 명칭: 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법

기술분야

- [1] 본 발명은 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생체 적합물질인 콜라겐을 기반으로 하는 조성물을 연골결손 부위에 이식 가능한 주사형태로 제조하여 외과적 절개 없이 주사침으로 적용부위에 직접 삽입으로 조직 수복을 도모하면 연골 조직 재생을 효과적으로 유도하므로 인간을 제외한 동물에게 수술과 관련된 부담을 덜어 주면서 쉽고 빠르게 연골 수복 및 재생을 유도할 수 있도록 한 것이며 이로 인해 제품의 품질과 신뢰성을 대폭 향상시키므로 사용자인 소비자들의 다양한 욕구(니즈)를 충족시켜 좋은 이미지를 심어줄 수 있도록 한 것이다.

배경기술

- [2] 주지하다시피 연골 손상의 원인은 낙상과 직접타격 또는 회전력과 같은 외상과 관절염, 골괴사, 염증성 관절염 또는 박리성 골연골염 등이 있다. 관절 연골은 림프, 혈관 신경분포가 없는 조직으로 스스로 치유능력이 다른 조직에 비해 현저히 낮은 편이고 병변의 크기 및 위치에 따라 다양한 수술방법에 따른 효과의 차이를 보인다.
- [3] 관절 연골은 매끈하며 극도로 미끄럽고 하얗게 밝은 빛을 띠는 물질로서 관절의 운동 시 마찰 및 마모 저항을 최소화하여 유지하는 역할을 하며, 한번 손상된 관절 연골은 정상적으로 생체 내에서 재생이 되지 않는 것으로 알려졌다. 생체 내 조직으로서 연골의 손상은 심한 통증 동반으로 일상생활의 어려움과 만성화된 경우 퇴행성 관절염으로 진행되어 연골 손상 시 손상된 연골조직을 재생하도록 하는 치료가 행해져야 퇴행성 관절염으로 진행을 막을 수 있다.
- [4] 손상된 연골 결손부위를 치료하는 방법은 비수술적인 방법인 약물이나, 물리치료, 관절 내 스테로이드 혹은 히알루론산 주사 등의 증상 통증완화 목적으로 하고 있지만 병의 치료에는 효과를 줄 수 없다. 그리고 수술적인 방법인 골수자극시술, 골 연골편 이식술이 시행되는데 연골이 파손되어 연화되거나 뼈가 드러나는 부분에 일차적인 골자극시술 후에 파손된 연골을 수복하여 통증을 완화하고 뼈에서 활액으로 흘러들어가는 혈액이 활액을 분해하고 활액 성능을 저하시키는 것을 막아준다. 하지만 골자극시술은 효과가 미비하고, 히알루론산은 단순히 일시적인 통증 감소 그리고 적합한 신생 연골 조직으로 유도되지 못하는 문제가 있다. 그리고 골 연골편 이식술은, 외과적 수술이 필요한 방법으로 난이도가 높고 비용적인 측면에서 부담이 되는 시술방법이다. 최근에는 손상된 연골관절을 치료하기 위하여 환자의 연골조직을 채취하여 연골세포를 분리 배양하여 손상된 부위에 다시 이식하는

자가연골 세포이식술이 시행되고 있다. 이 시술은 두 번의 수술과 조직을 채취하여 이식하는데 오랜 시간이 소요 되므로 환자 그리고 의료인의 부담으로 쉽게 접근할 수 없는 방법이다.

- [5] 따라서 연골 결손을 위한 간단한 시술방법인 콜라겐을 기반으로 하는 혼합 조성물인 생체 적합 물질을 이식하는 새로운 방법이 요구되며, 초기에 연골결손을 치료하는 방법에 유용하며, 추후에 발생하는 연골세포이식 및 인공관절 수술 같은 큰 수술을 요구하는 환자의 수를 감소시킬 수 있다.
- [6] 최근 생체적합 물질을 연골 결손 부위에 적용하고자 하는 시도가 많이 이루어진다.
- [7] 인체의 구조는 세포와 생물학적으로 생성된 고분자 형태로 구성되어 있다. 단백질이 대표적인 물질이며 인체 내에 존재하는 물질로 천연재료를 이용한다면, 천연상태에 가까운 형태로 적용되며, 인체조직의 재생을 기대할 수 있다. 천연조직을 의료용 생체조직으로 사용하여, 인공재료에 결합되어 있는 생물학적 기능을 제공함으로써 인체 내에 삽입되어 주위조직 사이에 생체적합성을 지니도록 환경을 제공하거나 더 나아가 천연 조직과 같은 생체 조직으로 역할을 할 수 있다.
- [8] 특히 콜라겐은 구조 단백질 성분으로, 진피, 건/힘줄, 혈관, 연골 같이 인체를 구성하는 연조직과 경조직을 구성하는 포유류의 전체 단백질의 1/3을 차지하는 단백질이다.
- [9] 콜라겐을 현재 의료용으로 사용하고 있는 분야는 지혈제, 창성피복제, 주름개선 등의 다양한 목적으로 사용되고 있다. 오랜 기간 동안 의료용으로 사용된 콜라겐 제품은 아직까지 안전성 문제없이 사용되고 있다.
- [10] 콜라겐의 특성인 낮은 항원성/ 높은 생체 적합성 및 생체 흡수성/세포의 부착, 성장, 분화 유도, 혈액응고, 지혈효과, 다른 고분자와의 적합성의 장점이 있다.
- [11] 그리고 콜라겐을 기반으로 하는 물질은 콜라겐과 히알루론산, 피브린글루를 혼합하는 조성물을 이용한 조성물이 연골 수복 및 재생에 탁월한 효과를 발휘할 수 있다.
- [12] 생체적합 물질인 히알루론산은 생체 고분자 일종인 고점도의 선형 다당류 물질로서, 담벼슬, 관절액, 피부 등에서 발견되었다. 히알루론산은 높은 윤활력 등으로 현재 안과 수술보조제 및 변형성 관절염 치료약으로 사용되어 왔다.
- [13] 현재 시중에 판매되는 히알루론산 10 mg / mL 농도의 제품은 변형성 슬관절증, 건관절 주위염으로 인한 통증을 없애 주는 관절기능 개선제로서 일시적인 통증완화 효과 및 염증이 심한 경우 등의 문제점이 있다.
- [14] 상기한 문제점을 해결하기 위해 종래에는 선행기술이 출원 및 등록된바 있다. 즉, 선행기술 1은 대한민국특허등록 제1114773호(2012.02.02)(출원번호 제2009-0101388호)(명칭: 연골조직 수복용 조성물의 제조방법)가 등록된바 있다.
- [15] 그리고 선행기술 2는 대한민국공개특허 제2004-0008125호(2004.01.28)(출원번호 제2003-7010108호)(명칭: 활액 유도된

조직 또는 세포를 사용하여 관절 연골 내의 결함 또는 병변을 치료 및 수복하기 위한 조성물 및 방법)가 출원된바 있다.

- [16] 또한 선행기술 3은 대한민국특허등록 제684932호(2007.02.13)(출원번호 제2005-0030837호)(명칭: 중간엽 줄기세포와 초음파 자극을 이용하여 연골조직을 재생하는 방법)가 등록된바 있다.

- [17] 그러나 상기한 종래 기술들도 다음과 같은 많은 문제점이 발생 되었다.

- [18] 즉, 상기 종래 기술은 신생 연골 재생을 위한 신체 적합한 콜라겐과 혼합 조성물을 제공하지 못하는 커다란 문제점이 발생 되었다.

- [19] 또한 상기 종래의 기술은 혼합 조성물을 주사방식으로 적용하지 못하여 불편해 편리하고 효과적으로 손상된 연골 조직부위를 안정화시켜 연골 재생 유도를 촉진시킬 수 없다는 커다란 문제점도 발생 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 제반 문제점을 해소하기 위하여 안출한 것으로, 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL인 콜라겐; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL인 히알루론산; 및 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하여 이루어진 연골조직 수복용 조성물이 구비됨을 제1목적으로 한 것이고, 상기한 기술적 구성에 의한 본 발명의 제2목적은 생체 적합물질인 콜라겐을 기반으로 하는 조성물을 연골결손 부위에 이식 가능한 주사형태로 조직 수복을 도모하면 연골 조직 재생을 효과적으로 유도하므로 인간을 제외한 동물에게 수술과 관련된 부담을 덜어 주면서 쉽고 빠르게 연골 수복 및 재생을 유도할 수 있도록 한 것이며, 또한 제3목적은 신생 연골 재생을 위한 신체 적합한 콜라겐과 혼합 조성물을 개발한 것이고, 특히 제4목적은 혼합 조성물을 주사방식으로 적용하여 외과적 수술을 동반하지 않는 간편하고 효과적으로 손상된 연골 조직부위를 안정화시킬 수 있도록 한 것이며, 그리고 제5목적은 연골 결손으로 인한 통증을 감소시킬 수 있도록 한 것이고, 아울러 제6목적은 연골 재생 유도를 촉진시킬 수 있도록 한 것이며, 제7목적은 이로 인해 제품의 품질과 신뢰성을 대폭 향상시키므로 사용자인 소비자들의 다양한 욕구(니즈)를 충족시켜 좋은 이미지를 심어줄 수 있도록 한 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [21] 이러한 목적 달성을 위하여 본 발명은 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산; 및 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하여 이루어짐을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물을 제공한다.

[22] 또한 본 발명은 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐을 제조하는 단계; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산을 제조하는 단계; 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하는 단계; 및 상기 혼합된 연골조직 수복용 조성물을 원심분리기를 이용하여 기포를 제거하는 단계가 포함됨을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[23] 또한 본 발명은 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 무릎 관절 연골을 결손 시키기 위해 드릴을 이용하여 2~4cm²의 결손 부위를 유발하는 단계; 콜라겐 기반의 조성물이 충전된 주사용기에 주사침을 연결하는 단계; 및 봉합사를 이용하여 절단부위를 봉합하고 주사기 담긴 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐과 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산 그리고 이들을 상호 혼합한 연골조직 수복용 조성물을 돼지 무릎의 관절강 (활액으로 채워진 공간)에 직접 주사하는 단계;를 거쳐 이루어지는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법을 제공한다.

발명의 효과

[24] 상기에서 상세히 살펴본 바와 같이 본 발명은 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산; 및 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하여 이루어진 연골조직 수복용 조성물이 구비되는 것이다.

[25] 상기한 기술적 구성에 의한 본 발명은 생체 적합물질인 콜라겐을 기반으로 하는 조성물을 연골결손 부위에 이식 가능한 주사형태로 조직 수복을 도모하면 연골 조직 재생을 효과적으로 유도하므로 인간을 제외한 동물에게 수술과 관련된 부담을 덜어 주면서 쉽고 빠르게 연골 수복 및 재생을 유도할 수 있도록 한 것이다.

[26] 또한 본 발명은 신생 연골 재생을 위한 신체 적합한 콜라겐과 혼합 조성물을 개발한 것이다.

[27] 특히 본 발명은 혼합 조성물을 주사방식으로 적용하여 간편하고 효과적으로 손상된 연골 조직부위를 안정화시킬 수 있도록 한 것이다.

[28] 그리고 본 발명은 연골 결손으로 인한 통증을 감소시킬 수 있도록 한 것이다.

[29] 아울러 본 발명은 연골 재생 유도를 촉진시킬 수 있도록 한 것이다.

[30] 본 발명은 상기한 효과로 인해 제품의 품질과 신뢰성을 대폭 향상시키므로 사용자인 소비자들의 다양한 욕구(니즈)를 충족시켜 좋은 이미지를 심어줄 수 있도록 한 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[31] 도 1은 연골조직 수복용 조성물을 혼합하는 방법의 사진.

- [32] 도 2는 연골조직 수복용 조성물을 양방향 주사기로 혼합하는 사진.
- [33] 도 3은 주사형으로 제조된 연골 수복재의 사진.
- [34] 도 4는 주사 후 효과 확인을 위해 수복재를 청색 염색의 사진.
- [35] 도 5는 주사용 수복재의 효과 확인을 위한 연골 결손 유발 사진.
- [36] 도 6은 체내 직접 주사를 위해 주사침을 연결하여 준비하는 사진.
- [37] 도 7은 돼지 무릎 연골 결손 부위에 직접 주사하여 사용하는 사진.
- [38] 도 8은 주입 후 효과를 확인한 결과 결손 부위가 수복재로 채워진 사진.
- [39] 도 9는 채워진 조성물은 물에 씻기지 않고 유지되는 사진.
- [40] 도 10은 콜라겐과 피브린글루 혼합 조성물의 이식 후, 이식물 형태 사진.
- [41] 도 11과 12는 피브린글루에서의 연골세포 증식의 형광현미경 사진.
- [42] 도 13과 14는 3% 콜라겐/피브린글루 혼합 조성물에서의 연골세포 증식의 형광현미경 사진.
- [43] 도 15와 16은 6% 콜라겐/피브린글루 혼합 조성물에서의 연골세포 증식의 형광현미경 사진.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 이하에서는 상기한 효과 달성을 위한 본 발명의 바람직한 실시 예를 첨부된 도면에 따라 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [45] 본 발명에 적용된 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법은 도 1 내지 도 10에 도시된 바와 같이 구성되는 것이다.
- [46] 하기에서 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 것이다.
- [47] 그리고 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기능을 고려하여 설정된 용어들로서 이는 생산자의 의도 또는 관례에 따라 달라질 수 있으므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [48] 먼저, 본 발명은 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐;과 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산; 및 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하여 이루어진 연골조직 수복용 조성물을 제공한다.
- [49] 상기한 본 발명 연골조직 수복용 조성물은, 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐을 제조하는 단계; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산을 제조하는 단계; 상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하는 단계; 및 상기 혼합된 연골조직 수복용 조성물을 원심분리기를 이용하여 기포를 제거하는 단계를 거쳐 제조하게 된다.
- [50] 특히 상기 원심분리는 1~30°C의 실온을 유지하고, 2,000~5,000 G로

원심분리함을 특징으로 한다.

- [51] 상기와 같이 제조된 연골조직 수복용 조성물은, 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 무릎 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 2~4cm²의 결손 부위를 유발하는 단계; 콜라겐 기반의 조성물이 충전된 주사용기에 주사침을 연결하는 단계; 및 봉합사를 이용하여 절단부위를 봉합하고 주사기 담긴 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐과 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산 그리고 이들을 상호 혼합한 연골조직 수복용 조성물을 돼지 무릎의 관절강(활액으로 채워진 공간)에 직접 주사하는 단계를 거쳐 연골조직 수복용 조성물을 사용하게 된다.
- [52] 한편, 본 발명은 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐을 제조하는 단계; 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산을 제조하는 단계; 및 콜라겐 60 mg / mL 와 히알루론산 5 mg / mL이 9:1~1:9의 비율로 혼합된 검체 또는 콜라겐 60 mg / mL와 히알루론산 20 mg / mL가 5:5의 비율로 혼합된 검체를 제조하는 단계;에 의해 연골조직 수복용 조성물을 제조할 수 있음은 물론이다.
- [53] 또 한편으로 본 발명은,
- [54] (1) 주사용기에 담긴 콜라겐 용액과 피브린글루 제품을 준비하는 단계;
- [55] (2) 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 무릎 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 2~4cm²의 결손 부위를 유발하는 단계;
- [56] (3) 주사기 담긴 콜라겐 제품을 돼지 무릎 연골 결손부위에 주사하여 채운 후 피브린글루를 콜라겐 위에 덮어 겔 화 시켜 단단히 고정하는 단계;
- [57] (4) 상기 (3)의 방식과 반대로 돼지 연골 결손부위에 피브린글루를 도포하여 겔 화 시킨 후 콜라겐을 피브린글루 겔 내부에 주입하여 연골 결손 부위를 채우는 단계;
- [58] (5) 주사 부위 10cm 위에서 주사기를 이용하여 멸균주사용수를 아래 방향으로 뿌려서(25 mL) 흐르는 용수에 대한 저항성을 확인하여 겔의 결손부위 고착 상태를 관찰하는 단계;를 거쳐 연골조직 수복용 조성물을 사용하게 된다.
- [59] 그리고 본 발명은 고 점도의 콜라겐과 히알루론산 또는 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물인 연골 수복용 조성물을 프리필드 실린지 주사기에 충전하여 주사가 가능한 형태로 연골조직 수복용 조성물을 사용하게 된다.
- [60] 또한 본 발명은 주사형 연골 주입제에 주사침을 연결하여 적용부위의 외과적 절개 없이 주사침으로 적용부위에 직접 삽입하여 돼지 무릎의 관절강(활액으로 채워진 공간)에 직접 연골 수복용 조성물 주입하여 연골조직 수복용 조성물을 사용하게 된다.
- [61] 마지막으로 본 발명은 연골 2~4cm²를 인위적으로 결손 하여 실험체를 만들고, 연골 수복용 조성물을 청색으로 염색하여 실험체에 주입하고, 이후 이식부위를 열고 직접 결손부위에 채워진 성상을 육안으로 확인함과 아울러 결손부위 고착 상태를 물에 대한 씻김성으로 확인하여 연골조직 수복용 조성물을 사용하게

된다.

- [62] 한편 본 발명은 상기의 구성부를 적용함에 있어 다양하게 변형될 수 있고 여러 가지 형태를 취할 수 있다.
- [63] 그리고 본 발명은 상기의 상세한 설명에서 언급되는 특별한 형태로 한정되는 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 오히려 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신과 범위 내에 있는 모든 변형물과 균등물 및 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [64] 상기와 같이 구성된 본 발명 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법의 작용효과를 설명하면 다음과 같다.
- [65] 우선, 본 발명은 생체 적합물질인 콜라겐을 기반으로 하는 조성물을 연골결손 부위에 이식 가능한 주사형태로 조직 수복을 도모하여 재생 효과적으로 유도하므로 사람을 제외한 동물에게 수술과 관련된 부담을 덜어 주면서 쉽고 빠르게 연골 수복 및 재생을 유도할 수 있도록 한 것이다.
- [66] 그리고 본 발명은 연골 결손을 간단한 시술로 가능하도록 한 것으로, 외과적 절개 수술 없이 간단한 주입식 조성물 이식방법으로 진행하는 간편한 시술방법으로 연골 결손 치료가 초기에 가능하므로 관절수술을 필요로 하는 환자수를 감소시킬 수 있도록 한 것이다. 더욱이 상기한 예방적인 치료방법에 의해 골 관절염이 발생하는 환자수가 감소하는 효과를 제공하게 된다.
- [67] 이를 위한 본 발명의 실시예는 다음과 같다.
- [68]
- [69] (실시예1)
- [70] 콜라겐과 히알루론산 혼합 제품을 이용하여 동물의 연골 결손 부위에 적용하는 방법
- [71] 목적: 돼지 무릎 연골 결손 부위에 주사방식의 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물의 적용 가능성 확인
- [72] 1. 농도 5, 10, 20, 30, 60 mg / mL 콜라겐과 5, 10, 20 mg / mL 의 히알루론산을 제조한다.
- [73] 콜라겐 농도: 본 제품의 용도인 연골 수복을 위하여 결손 부위에 채워져 형태를 유지하기 위해 콜라겐 농도는 5 mg / mL이상이 요구되며, 의료용 목적(주사형)의 제품제조 공정 특성 (무균제조)상 60 mg / mL 이상의 초 고점도로 제조 및 실사용 및 적용이 어렵다. 상기의 이유로 콜라겐 농도는 5 mg /mL 이상 그리고 60 mg /mL 이하로 범위를 설정한다.
- [74] 히알루론산 농도: 히알루론산 본연의 특성 (점성 등)을 유지한 채 의료용 목적제조 (무균제조)로 20 mg /mL 이상 제조는 어렵고, 콜라겐과의 혼합이 쉽지 않다. 또한 제품에 요구되는 성질(점성)을 유지하기 위해서는 최소 5 mg /mL 이상이 요구된다. 그리고 콜라겐 기반에 히알루론산을 첨가하여 연골 부위에 작용하여 윤활력을 상승시켜 연골의 굽힘 운동에 도움을 준다. 상기 이유로 콜라겐에 히알루론산을 첨가하고 히알루론산 농도는 5 mg /mL 이상 그리고 20

mg /mL 이하로 범위를 설정한다.

- [75] 콜라겐, 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물 제조
- [76] 혼합 방법 A: 콜라겐 용액과 원료용액 혼합 방법
- [77] 1) 준비된 콜라겐을 물 또는 생리학적 인산염 완충용액에 희석하여 원하는 농도의 콜라겐 용액을 제조한다.
- [78] 2) 준비된 히알루론산 (분말형태) 물 혹은 생리학적 인산염 완충용액에 적절한 농도로 희석하여 제조한다.
- [79] 3) 준비된 용액은 짧은 시간 혼합이 용이한 양방향 주사기 혼합방식, 또는 혼합기(rolling)를 이용하여 혼합한다(도 1, 2).
- [80] 4) 혼합에 사용되는 원료 및 용액은 사전에 냉장조건 (2 ~ 8°C)에서 보관된 것을 사용하면 혼합이 쉽고 원활하게 이루어진다.
- [81] 혼합 방법 B: 콜라겐 용액에 원료(분말)을 직접 혼합하는 방법
- [82] 1) 준비된 콜라겐을 물 또는 생리학적 인산염 완충용액에 희석하여 원하는 농도의 콜라겐 용액을 제조한다.
- [83] 2) 적정 농도의 콜라겐을 용매로 히알루론산 (분말형태)를 넣어 혼합한다.
- [84] 3) 준비된 용액은 짧은 시간 혼합이 용이한 양방향 주사기 혼합방식, 또는 혼합 스틱을 이용하여 직접 혼합한다.
- [85] 4) 고농도의 제품을 제조하는데 필요한 혼합방식이며, 혼합 시 주위 환경이 저온 유지 상태에서 혼합이 쉽고 원활하게 이루어진다.
- [86] 콜라겐 기반 조성물을 주입이 가능한 주사형으로 제조
- [87] 1) 콜라겐 및 혼합된 콜라겐 기반 조성물을 원심분리를 이용하여 기포를 제거한다.
- [88] 2) 원심분리 조건은 실온 (1~ 30°C)를 유지하고 원심분리효과(G 값)은 2,000 ~ 5,000 G
- [89] 3) 주사용기에 고점도 펌프를 이용하여 충전한다. 이때 아래 부분부터 조금씩 윗부분으로 노즐을 올려 빈공간이 생기지 않게 주의한다.
- [90] 4) 주사용기 후면에 진공을 이용하여 흡자를 투입하여 완전히 밀봉하여 주사용기에서 액이 누출 되지 않게 한다(도 3).
- [91] 5) 충전된 주사용기는 콜라겐 고유의 특성을 보존하기 위하여 실온보관 (1 ~30)한다.
- [92] 용액은 얼지 않아야 하고 고온에 의해 변성이 일어나지 않는 조건에서 보관이 필수
- [93] 2. 체내 주입 후 효과를 확인하기 위하여 준비된 검체는 소량의 청색 염색약 (Trypan blue, 단백질에 결합)으로 염색을 한다(도 4).
- [94] 3. 사용 방법 및 효과 확인
- [95] 1) 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 무릎 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 크고(약 4 cm²) 작은(약 2 cm²) 결손 부위를 유발한다(도 5).

- [96] 2) 콜라겐 등이 충전된 주사용기에 주사침을 연결한다. 이때 주사침 길이는 1 1/2 inch(38mm) 이상인 것을 사용한다(도 6).
- [97] 3) 봉합사를 이용하여 절단부위를 봉합하고 주사기 담긴 각각의 농도의 제품을 돼지 무릎의 관절강(활액으로 채워진 공간)에 직접 주사한다(도 7).
- [98] 4) 무릎관절운동(CPM: Continuous Passive Motion)을 진행하여 절손부위에 자연적으로 채워져 주입된 물질이 작용하도록 돕는다. 그리고 봉합된 부분을 절단하여 제품을 주입한 연골 부분을 노출시켜 관찰한다.
- [99] 4. 결과: 연골 절손 부위에 주입한 제품이 절손 유발부위에 스스로 채워져 시술자가 선호할 정도의 효과를 보였다(도 8).
- [100]
- [101] (실시예2)
- [102] 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물의 점착성 확인 실험
- [103] 1. 실시예 1과 동일한 방법으로 주사기에 담긴 농도 10, 30, 60 mg / mL (1, 3, 6%) 콜라겐과 5, 10, 20 mg / mL (0.5, 1.0, 2.0%)의 히알루론산을 준비한다. 그리고 콜라겐 60 mg / mL 와 히알루론산 5 mg / mL 가 9:1 ~ 1:9비율로 혼합된 검체와 콜라겐 60 mg / mL 와 히알루론산 20 mg / mL 5:5비율로 혼합된 검체를 준비한다. 이때 콜라겐과 히알루론산의 혼합 조성물의 효과는 기존의 콜라겐은 특성 (생체적합한 연골 구성성분, 생분해)과 히알루론산의 특성인 뛰어난 윤활력 등의 효과를 더해 연골수복에 적합한 조성물을 제조한다.
- [104] 2. 콜라겐과 히알루론산 혼합 비율에 따른 점도 측정
- [105] 각각의 검체는 점도측정기(Viscometer, DV-1 + PRO)를 이용하여 점도를 측정한다
- [106] - 측정항목: 점도측정
- [107] - 측정온도: 4°C
- [108] - 측정 RPM: 0.5
- [109] - Spindle: # SC4-15
- [110] 표 1

[Table 1]

검체	점도 (CP, 10 ³)	비고
6% 콜라겐	147	최고 점도
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (9:1)	142	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (8:2)	106	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (7:3)	79	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (6:4)	64	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (5:5)	57	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (4:6)	46	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (3:7)	22	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (2:8)	15	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (1:9)	3	-
0.5% 히알루론산	0.5	최저 점도

- [111] 3. 콜라겐과 히알루론산 혼합 비율에 따른 점착성 시험
- [112] 각각의 검체는 물성측정기(Rheometer, CR-500 DX)를 이용하여 물질 검착 거리를 측정하여 점착성을 비교 한다.
- [113] 시료대 이동 속도 (10mm/sec.)
- [114] 시료대 이동 중 점착이 끊어지는 지점의 이동거리를 측정한다
- [115] 표 2

[Table 2]

검체	물질점착거리 (mm)	비고
1% 콜라겐	19	-
3% 콜라겐	47	-
6% 콜라겐	61	최고 점착성
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (9:1)	55	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (8:2)	49	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (7:3)	42	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (6:4)	39	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (5:5)	36	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (4:6)	35	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (3:7)	32	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (2:8)	25	-
6% 콜라겐 + 0.5% 히알루론산 (1:9)	19	-
6% 콜라겐 + 2.0% 히알루론산 (5:5)	43	-
0.5% 히알루론산	13	최저 점착성
1.0% 히알루론산	19	-
2.0% 히알루론산	23	-

[116] 결과: 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물의 점착력이 확인되며, 콜라겐 함량이 높을수록 점착성이 높게 관찰되었다.

[117]

[118] (실시예3)

[119] 콜라겐과 히알루론산을 각각 이식 후 물에 대한 씻김성 확인 시험

[120] 목적: 주입된 제품이 결손부위의 지속적인 부착(고착)하여 채워주는 효과를 방해하는 요소에 대한 저항성 확인

[121] 1. 실시예 1과 같은 방법으로 주사기에 담긴 농도 30, 60 mg / mL (3, 6%) 콜라겐과 10, 20 mg / mL (1, 2%)의 히알루론산을 준비한다.

[122] 2. 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 크고(약 4 cm²) 작은(약 2 cm²) 결손 부위를 유발한다.

[123] 3. 주사기 담긴 각각의 농도의 제품을 돼지 무릎 연골 결손부위에 주사하여 채운다.

- [124] 4. 주사 부위 10 cm 위에서 주사기를 이용하여 주사용수를 아래 방향으로 뿌려준다 (25 mL)
- [125] 5. 연골 결손 부위에 채워진 제품이 흐르는 주사용수에 대한 저항성을 육안 확인한다.
- [126] 6. 결과: 연골결손 부위에 채워진 제품은 흐르는 물에 저항(씻겨지지 않음)하여 지속적으로 부착하여 결손부위를 채워진 상태를 유지한다(도 9).
- [127]
- [128] (실시예4)
- [129] 연골 결손 부위에 콜라겐과 피브린 글루 적용 방법 및 조성물에서의 세포증식 시험
- [130] 목적: 주사방식의 콜라겐과 피브린 글루 적용방법 가능성 확인과 콜라겐과 피브린글루가 적용된 연골결손 수복에 도움을 준다.
- [131] 1. 실시예 1번과 같은 방법으로 주사용기에 담긴 6% 콜라겐 용액을 준비하고 피브린 글루 제품을 준비한다. 이때 사용되는 피부린 글루 제품의 기본 규격은 피브노젠 농도 71~127 mg/mL, 트롬빈 농도 400~600 IU/mL, (일반적인 상업용 제품 규격)
- [132] 2. 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 무릎 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 크고(약 4 cm²) 작은(약 2 cm²) 결손 부위를 유발한다.
- [133] 3. 주사기 담긴 6% 농도의 콜라겐 제품을 돼지 무릎 연골 결손부위에 주사하여 채운 후 피브린글루를 콜라겐 위에 덮어 겔 화 시켜 단단히 고정한다.
- [134] 4. “3”의 방식과 반대로 돼지 연골 결손부위에 피브린글루를 도포하여 겔 화 시킨 후 6% 콜라겐을 피브린글루 겔 내부에 주입하여 연골 결손 부위를 채운다.
- [135] 5. 주사 부위 10 cm 위에서 주사기를 이용하여 멸균주사용수를 아래 방향으로 뿌려서 (25 mL) 흐르는 용수에 대한 저항성을 확인하여 겔 상태를 관찰한다.
- [136] 결과: 연골결손 부위에 채워져 견고한 겔 형태를 유지하고 흐르는 물에 저항하여 지속적으로 부착하여 결손부위를 채워진 채 유지한다(도 10).
- [137] 6. 콜라겐과 피브린글루 혼합 조성물에서의 연골세포의 세포 증식 실험을 진행한다.
- [138] 혼합 조성물에 준비된 연골세포 (1.2 X 10⁷ cells / 2mL)을 혼합한다.
- [139] 37°C 조건에서 7일간 CO₂ 배양을 진행한다.
- [140] Calcein-AM 분석 방법을 통한 연골세포의 증식을 형광현미경으로 관찰한다.
- [141] (좌측부터: 피브린글루, 3% 콜라겐/피브린글루 혼합 조성물, 6% 콜라겐/피브린글루 혼합 조성물)
- [142] 표 3

[Table 3]

개시(0일)	도 11	도 13	도 15
7일	도 12	도 14	도 16

- [143] 결과: 조성물에서의 세포 증식 확인 결과, 피브린 글루만 사용한 것 보다 콜라겐 3%, 콜라겐 6%와 피브린 글루 혼합 조성 물에서의 세포 증식이 높게 관찰되었다.

산업상 이용가능성

- [144] 본 발명 연골조직 수복용 조성물과 제조방법 및 이의 사용방법의 기술적 사상은 실제로 동일결과를 반복 실시 가능한 것으로, 특히 이와 같은 본 발명을 실시함으로써 기술발전을 촉진하여 산업발전에 이바지할 수 있어 보호할 가치가 충분히 있다.

청구범위

- [청구항 1] 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐;
물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산; 및
상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하여 이루어짐을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물.
- [청구항 2] 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐을 제조하는 단계;
물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산을 제조하는 단계;
상기 콜라겐과 히알루론산을 양방향 주사기 또는 혼합기를 이용하여 상호 혼합하는 단계; 및
상기 혼합된 연골조직 수복용 조성물을 원심분리기를 이용하여 기포를 제거하는 단계;가 포함됨을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 제조방법.
- [청구항 3] 청구항 2 에 있어서,
상기 원심분리는 1~30°C의 실온을 유지하고, 2,000~5,000 G로 원심분리함을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 제조방법.
- [청구항 4] 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 관절 연골을 결손 시키고 드릴을 이용하여 2~4cm²의 결손 부위를 유발하는 단계;
콜라겐이 충전된 주사용기에 주사침을 연결하는 단계; 및
봉합사를 이용하여 절단부위를 봉합하고 주사기 담긴 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐과 농도가 5 ~ 20 mg / mL 인 히알루론산 그리고 이들을 상호 혼합한 연골조직 수복용 조성물을 돼지 무릎의 관절강(활액으로 채워진 공간)에 직접 주사하는 단계;를 거쳐 이루어지는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법.
- [청구항 5] 물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 60 mg / mL 인 콜라겐을 제조하는 단계;
물 또는 생리학적 인산염 완충용액을 제외한 희석된 농도가 5 ~ 20 mg / mL인 히알루론산을 제조하는 단계; 및
콜라겐 60 mg / mL와 히알루론산 5 mg / mL가 9:1~1:9의 비율로 혼합된 검체 또는 콜라겐 60 mg / mL와 히알루론산 20 mg / mL가 5:5의 비율로 혼합된 검체를 제조하는 단계;가 포함됨을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 제조방법.

- [청구항 6] (1) 주사용기에 담긴 콜라겐 용액과 피브린 글루 제품을 준비하는 단계;
 (2) 돼지 다리를 거치대에 고정한 후, 외과적 장비를 이용하여 관절 연골을 절손 시키고 드릴을 이용하여 2~4㎤의 절손 부위를 유발하는 단계;
 (3) 주사기 담긴 콜라겐 제품을 돼지 무릎 연골 절손부위에 주사하여 채운 후 피브린글루를 콜라겐 위에 덮어 겔 화 시켜 단단히 고정하는 단계;
 (4) 상기 (3)의 방식과 반대로 돼지 연골 절손부위에 피브린글루를 도포하여 겔 화 시킨 후 콜라겐을 피브린글루 겔 내부에 주입하여 연골 절손 부위를 채우는 단계;
 (5) 주사 부위 10cm 위에서 주사기를 이용하여 멸균주사용수를 아래 방향으로 뿌려서(25 mL) 흐르는 용수에 대한 저항성을 확인하여 겔 상태를 관찰하는 단계;가 포함됨을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법.
- [청구항 7] 고 점도의 콜라겐과 히일루론산 또는 콜라겐과 히알루론산 혼합 조성물을 연골 수복용 조성물을 프리필드 실린지 주사기에 주입하여 주사가 가능한 형태로 사용함을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법.
- [청구항 8] 주사형 연골 주입제에 주사침을 연결하여 적용부위의 외과적 절개 없이 주사침으로 적용부위에 삽입하여 돼지 무릎의 관절강(활액으로 채워진 공간)에 직접 연골 수복용 조성물 주입함을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법.
- [청구항 9] 연골 2~4㎤를 인위적으로 절손하여 실험체를 만들고, 연골 수복용 조성물을 청색으로 염색하여 실험체에 주입하고, 이후 이식부위를 열고 직접 절손부위에 채워진 성상을 육안으로 확인함과 아울러 조성물이 절손부위에 고착 정도를 물에 대한 씻김성도 확인함을 특징으로 하는 연골조직 수복용 조성물의 사용방법.