



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월11일
(11) 등록번호 10-1865671
(24) 등록일자 2018년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/54 (2006.01) A61K 31/43 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01)
A61M 31/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/54 (2013.01)
A61K 31/43 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0028299
(22) 출원일자 2017년03월06일
심사청구일자 2017년03월06일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070063511 A
KR100478074 B1
KR1020130029291 A
KR1020130097409 A

(73) 특허권자
한남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 유성대로 1646 (전민동)
(72) 발명자
이진호
대전광역시 서구 둔산중로 20, 806호(탄방동, 아르누보팰리스)
이소리
대전광역시 동구 계족로 481 (용전동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이영수

전체 청구항 수 : 총 12 항

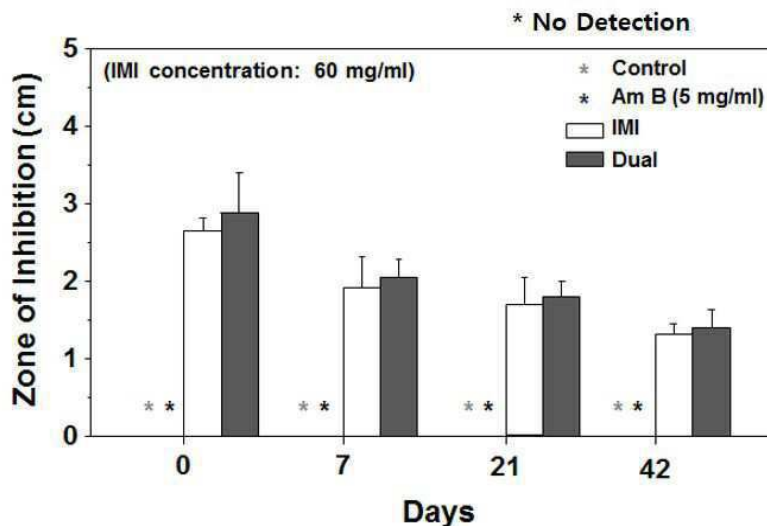
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **약물을 포함하는 기관 재생 유도관 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 그물 구조를 가지는 구조체, 및 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막층으로 이루어진 복합막 구조의 기관 재생 유도관에 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 포함하는 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관과 이의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명과 같이 항생제 및 항진균제를 기관 재생 유도관에 탑재시키는 경우, 상기 항생제 및 항진균제는 약 6주에 걸쳐 서방형으로 방출되는 효과를 가진다. 따라서, 약물을 포함하는 기관 재생 유도관은 효과적인 항생제의 효과로 기관지 염증을 지속적으로 치료할 수 있을 뿐 만 아니라, 항진균제의 효과로 다양한 세균으로부터 점막염증을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

- A61L 27/18 (2013.01)
- A61L 27/20 (2013.01)
- A61L 27/56 (2013.01)
- A61L 27/58 (2013.01)
- A61M 31/002 (2013.01)
- A61L 2300/406 (2013.01)
- A61L 2300/602 (2013.01)

권성근

서울특별시 강남구 압구정로 201, 78-803 (압구정동, 현대아파트)

(72) 발명자

김태호

대전광역시 동구 용운로 193 143동 402호 (용운동, 주공아파트1단지)

오세행

충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 104동 1101호(쌍용동, 현대아이파크홈타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C0184
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	보건산업진흥
연구사업명	보건의료연구개발사업 질환극복기술개발연구(질병중심 중개 중점연구)
연구과제명	생체활성인자/3D Printed scaffold 복합체를 이용한 기관 협착 부위 재생 기술 개발/기관 재생유도를 위한 생체활성형 미세다공관 개발
기여율	1/1
주관기관	한남대학교 산학협력단
연구기간	2014.06.01 ~ 2017.05.30
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

그물 구조를 가지는 구조체, 및

상기 그물 구조를 가지는 구조체 위에 형성된 평균 다공크기가 10~100 nm인 내표면과 평균 다공크기가 50~200 μm인 외표면으로 구성된 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층으로 이루어진 복합막 구조의 기관 재생 유도관이며,

상기 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층에는 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 탑재시킨 것을 특징으로 하는 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그물 구조를 가지는 구조체의 그물의 두께는 100~500 μm, 그물 간 간격(interval)은 500~1000 μm인 것인 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 그물 구조를 가지는 구조체는 굽힘 강도가 0.1~0.8 MPa를 만족하는 것인 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항생제는 Amoxicillin/clavulanic acid, Ampicillin/sulbactam, Piperacillin/tazobactam, Imipenem, Meropenem 중에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 항생제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 서방형으로 방출되는 것을 특징으로 하는 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항진균제는 Amphotericin B, Voriconazole, Posaconazole, Fluconazole 중에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 항진균제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 서방형으로 방출되는 것을 특징으로 하는 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항생제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 60 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것인 기관염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항진균제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 5 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것인 기관염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 그물 구조를 가지는 구조체 및 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층을 형성하는 고분자는 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 폴리락틱산 [poly(lactic acid)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리(락틱산-글리콜산) 공중합체 [poly(lactic acid-co-glycolic acid)], 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락틱산-카프로락톤 공중합체 [poly(lactic acid-co-ε-caprolactone)], 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체 (polyhydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥사논 (polydioxanone), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 생분해성 고분자이거나, 또는

상기 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 친수성 고분자를 0.1~20 중량부 더 포함하여 이루어지는 것인 기관염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리락티글리콜산 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 공중합체, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알콜, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류, 폴리옥시에틸렌 케스터 오일 유도체류, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 페티 에시드 에스터, 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상인 것인 기관염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 복합막 구조의 기관 재생 유도관은 원통형 하이드로젤 고분자를 지지체로 사용하여 제조되는 것인 기관염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 고분자는 알긴산 (alginic acid), 하이알론산 (hyaluronic acid), 카르복시메틸셀룰로우스 [carboxymethyl cellulose (CMC)], 덱스트란 (dextran), 하이드록시프로필메틸셀룰로우스 [hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)], 폴리하이드록시에틸렌메타크릴레이트[polyhydroethyl methacrylate (polyHEMA)], 폴리비닐피롤리돈 [poly(N-vinyl pyrrolidone (PVP)), 폴리아이소프로필아크릴아마이드 [poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm)], 폴리비닐알콜 [polyvinyl alcohol (PVA)], 폴리에틸렌옥사이드 [poly(ethylene

oxide) (PEO)], 및 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 (polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 친수성 고분자인 것인 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관.

청구항 13

원통형 하이드로겔 지지체를 제조하는 단계,

상기 원통형 하이드로겔 지지체에 그물 구조를 가지는 구조체를 씌우는 단계,

상기 그물 구조의 구조체로 씌운 하이드로겔 지지체를 항생제와 항진균제가 도입된 고분자 용액에 함침시켜 상기 고분자 용액에 사용된 용매와 상기 하이드로겔 지지체에 사용된 비용매인 물의 치환에 의해 상기 구조체 위에 비대칭 구조의 미세다공성막 층을 형성시키는 단계, 및

상기 원통형 하이드로겔 지지체를 제거하는 단계를 거쳐, 그물 구조를 가지는 구조체/비대칭 구조의 미세다공성막 층으로 이루어진 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 탑재시킨 복합막 구조의 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물을 포함하여 기관염증 치료에 효과적인 기관 재생 유도관과 이의 제조방법에 관한 것으로서, 상세하게는 항생제 및 항진균제를 포함하여 기관 염증 치료에 효과적인 기관 재생 유도관과 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기관 내 삽관 또는 인공 기관 대체물 이식에 있어 많은 합병증의 가능성이 있을 수 있다. 그 중에서도 기관 내 삽관 후 또는 인공기관 대체물 이식 후 2차 감염으로 인한 기관지염을 대표적 예로 들 수 있다.

[0003] 기관지염은 기관에 염증이 생긴 것으로 기침이나 가래 등의 호흡기 증상을 일으키는 병의 총칭이다. 인공기관 대체물 이식 후 이러한 기관지염이 생겨 가래가 증가하면 기도가 막히고 호흡 곤란 증상이 발생하게 된다.

[0004] 일반적으로 기관지염을 치료할 수 있는 좋은 방법으로 항생제와 항진균제를 고려할 수 있다. 항생제란 미생물에 의하여 생산되는 화학물질로서 저농도에서 다른 미생물의 증식을 억제하거나 죽이는 능력을 가진 화학물질이라고 정의하며, 세균을 죽이거나 “불활화” 시키는 물질을 말한다. “불활화”란 다양한 방식으로 세균을 억제한다는 뜻으로, 성장발육억제, 활동억제, 번식억제 등의 의미가 내포되어 있다. 즉 세균의 성장발육과 대사활동, 번식 등을 방해하고 교란하거나 세균을 죽이는 약물을 의미한다.

[0005] 또한 항진균제는 곰팡이 또는 진균류에 의한 점막염을 치료하는 약물로, 가장 효과적인 항진균제로는 폴리엔계 항생물질로 알려져 있다.

[0006] 현재까지 나온 문헌에 의하면, 기관지의 골격유지 및 섬모를 형성시켜 기관지에 이물질이 들어오는 것을 막아주는 연구가 많이 진행되어 왔으나, 이러한 연구들이 가래가 끊어 호흡이 곤란해지는 현상을 억제해 주지는 못하고 있는 실정이다. 기관지 내 가래 치료법으로는 보통 항생제 또는 항진균제 약물을 주사제 또는 경구 투여하는 방법이 있지만, 이러한 약물치료법은 기관지에 약물이 직접 전달되는 것이 아니라 간접적으로 전달되는 방식이기 때문에 기관지까지 약물의 효능이 전달되기엔 부족함이 있다.

[0007] 또한 주기적으로 이러한 약물들을 투여하여야 하기 때문에 환자를 치료하는 데 있어 번거로워 한 번의 처리만으로 약물이 가래 치료 기간 동안 서방형으로 방출될 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Oh SH, Kim JH, Kim JM, Lee JH. Asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 membrane for effective guided bone regeneration. J Biomater Sci Polym Ed. 2006;17:1375-1387

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명에서는 보다 효과적으로 가래 증상을 나타내는 기관지염을 치료하고자 항생제와 항진균제와 같은 약물을 기관 재생 유도관에 탑재시켜 상기 약물들이 서방형으로 방출될 수 있도록 유도하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 항생제와 항진균제와 같은 약물을 도입한 기관 재생 유도관을 제조하여 항생제와 항진균제를 서방형 방출시켜 지속적으로 가래를 치료할 수 있는 기관 재생 유도관을 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 항생제와 항진균제와 같은 약물을 도입한 기관 재생 유도관의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명에 따른 기관염증 치료용 기관 재생 유도관은 그물 구조를 가지는 생분해성 고분자 구조체, 및 비대칭 구조를 가지는 생분해성 고분자 미세다공성막 층으로 이루어진 복합막 구조의 기관 재생 유도관에 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 포함하는 것을 그 특징으로 한다.

[0013] 상기 그물 구조를 가지는 구조체의 그물의 두께는 100~500 μm , 그물 간 간격(interval)은 500~1000 μm 인 것이 바람직하다.

[0014] 상기 그물 구조를 가지는 구조체는 굽힘강도 (flexural strength)가 0.1 ~ 0.8 Mpa인 것이 바람직하다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항생제는 Amoxicillin/clavulanic acid, Ampicillin/sulbactam, Piperacillin/tazobactam, Imipenem, Meropenem 중에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 항생제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 서방형 방출되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항진균제는 Amphotericin B, Voriconazole, Posaconazole, Fluconazole 중에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 항진균제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 서방형 방출되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항생제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 60 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항진균제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 5 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것이 바람직하다.

[0019] 상기 비대칭 미세다공성막 층은 평균 다공크기가 10~100 nm인 내표면, 및 평균 다공크기가 50~200 μm 인 외표면으로 구성된 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 그물 구조를 가지는 구조체 및 비대칭 미세다공성막을 형성하는 고분자는 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 폴리락틱산 [poly(lactic acid)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리(락틱산-글리콜산) 공중합체 [poly(lactic acid-co-glycolic acid)], 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락틱산-카프로락톤 공중합체 [poly(lactic acid-co- ϵ -caprolactone)], 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체 (polyhydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥사논 (polydioxanone), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 생분해성 고분자이거나, 또는 상기 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 친수성 고분자를 0.1~20 중량부 더 포함하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0021] 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 (polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체 (PEO-PPO 공중합체; Pluronic series), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 (polyethylene oxide-poly(lactic acid) 공중합체(PEO-PLA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락티글리콜산 [polyethylene oxide-

poly(lactic-co-glycolic acid)] 공중합체 (PEO-PLGA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 (polyethylene oxide-polycaprolactone) 공중합체 (PEO-PCL), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리비닐알콜 (PVA), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류 (polyoxyethylene alkyl ethers; Brij Series), 폴리옥시에틸렌 캐스터 오일 유도체류 (polyoxyethylene castor oil derivatives; Cremophores), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 페티 에시드 에스터류 (polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters; Tween Series), 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류 (polyoxyethylene stearates)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0022] 상기 복합막 구조의 기관 재생 유도관은 원통형 하이드로겔을 지지체로 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 상기 원통형 하이드로겔 지지체로 사용되는 고분자는 알긴산 (alginic acid), 하이알론산 (hyaluronic acid), 카르복시메틸셀룰로우스 [carboxymethyl cellulose (CMC)], 텍스트란 (dextran), 하이드록시프로필메틸셀룰로우스 [hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)], 폴리하이드록시에틸렌메타크릴레이트 [polyhydroethyl methacrylate (polyHEMA)], 폴리비닐피롤리돈 [poly(*N*-vinyl pyrrolidone (PVP)), 폴리아이소프로필아크릴아마이드 [poly(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm)], 폴리비닐알콜[polyvinyl alcohol (PVA)], 폴리에틸렌옥사이드 [poly(ethylene oxide) (PEO)], 및 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 (polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 친수성 고분자일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에 따른 약물을 포함하는 그물 구조를 가지는 생분해성 고분자 구조체/비대칭 미세다공성막 층으로 이루어진 복합막 구조의 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관의 제조방법은 원통형 하이드로겔 지지체를 제조하는 단계, 상기 원통형 하이드로겔 지지체에 그물 구조를 가지는 구조체를 씌우는 단계, 상기 그물 구조의 구조체로 씌운 하이드로겔 지지체를 항생제와 항진균제가 도입된 고분자 용액에 함침시켜 상기 구조체 위에 비대칭 구조의 미세다공성막 층을 형성시키는 단계, 및 상기 원통형 하이드로겔 지지체를 제거하는 단계를 거쳐, 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 탑재시킨 복합막 구조의 기관 염증 치료용 기관 재생 유도관을 제조하는 것을 그 특징으로 한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에서는 기관 내 삽관 또는 인공기관 대체물 이식 후 2차적으로 발생하는 기관지염을 치료하고자 항생제와 항진균제와 같은 약물이 도입된 기관 재생 유도관을 제조하였다.

[0026] 본 발명에 따른 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관은 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관으로부터 모두 40일 이상 서방형으로 방출되며, 세포 독성이 없고, 기관지염의 원인균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Candida albicans* 박테리아를 사멸시키는 효과를 가진다.

[0027] 이와 같은 결과로부터, 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관은 서방형 방출이 가능하며 서방형 방출로 인해 오랫동안 우수한 항균 효과와 항진균 효과를 가지고 있어, 효과적으로 기관지염과 점막염증을 치료할 수 있는 기관 재생 유도관이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명에 따른 그물 구조를 가지는 구조체의 도면이며 (a, 그물의 두께; b, 그물 간 간격),
- 도 2는 본 발명에 따른 복합막 구조의 기관 재생 유도관의 구조이고,
- 도 3은 본 발명에 따른 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관의 제조 과정을 모식한 것이며,
- 도 4는 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 세포 독성 평가 결과이고,
- 도 5는 Imipenem만 도입한 군 (IMI)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 군 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 Imipenem 탑재량과 방출 거동을 나타낸 결과이며,
- 도 6은 Amphotericin B만 도입된 군 (Am B)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 군 (Dual)의 기관 재생

유도관에서의 Amphotericin B의 탐재량과 방출거동을 나타낸 결과이고,

도 7은 *Pseudomonas aeruginosa*가 배양된 Petri-dish에서 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 박테리아 사멸 가능성 평가 결과이며,

도 8은 *Candida albicans*가 배양된 Petri-dish에서 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 Amphotericin B 농도에 따른 박테리아 사멸 가능성 평가 결과이고,

도 9는 *Pseudomonas aeruginosa*가 배양된 Petri-dish에서 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 Zone of inhibition (ZOI) 측정 결과이며,

도 10은 *Candida albicans*가 배양된 Petri-dish에서 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)의 기관 재생 유도관에서의 Amphotericin B 농도에 따른 ZOI 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는 (comprising)"은 언급한 형상들, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0032] 본 발명은 기관 내 삼관 또는 인공기관 대체물 이식 후 2차적으로 발생하는 기관지염을 효과적으로 치료할 수 있도록 항생제 및 항진균제 약물이 도입된 기관 재생 유도관과 그 제조방법에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에 따른 복합막 구조의 기관 재생 유도관은 그물 구조를 가지는 생분해성 고분자 구조체, 및 비대칭 구조를 가지는 생분해성 고분자 미세다공성막 층으로 이루어진 복합막 구조의 기관 재생 유도관에 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 포함하는 것을 그 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명의 기관 재생 유도관은 말 그대로 내부가 비어 있는 튜브 형태의 구조를 가지는 것을 의미하며, 상기 유도관의 굵기 및 길이는 사용되는 용도에 따라 다양하게 선택될 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0035] 본 발명에서는 튜브 형태의 기관 재생 유도관을 제조함에 있어, 종래 지지체로 사용되는 재료가 물성이 약하여 최종 제조되는 유도관의 형태가 체내 이식시 찌그러지거나 변형되는 문제를 해결하고자 상기 지지체의 표면을 그물 구조를 가지는 생분해성 고분자 구조체로 감싼 다음 생분해성 고분자 다공막 층을 형성시켜 최종 복합막 구조의 기관 재생 유도관을 제조한 것이다.
- [0036] 본 발명에 따른 “그물 구조를 가지는 구조체” 라는 것은 다음 도 1에서 보는 바와 같이, 일정한 간격으로 가로와 세로로 반복되어 그물 형태 (메쉬, mesh)를 이루는 것을 의미한다.
- [0037] 상기 그물 구조를 가지는 구조체의 그물의 두께 (a)는 100~500 μm , 그물 간 간격 (b, interval)은 500~1000 μm 인 것이 바람직하다. 상기 그물 구조를 가지는 구조체의 그물 두께 (a)가 100 μm 미만인 경우에는 물성이 약하고, 또한 500 μm 를 초과하는 경우 두께가 두꺼워 제조가 어렵다는 문제가 있어 바람직하지 못하다.
- [0038] 또한, 상기 그물 구조체의 그물 간 간격 (b)이 500 μm 미만인 경우에는 간격이 좁아 원통형 지지체로 사용되는 하이드로겔 내에서 수분이 빠져나오지 못해 고분자 다공막 층이 원활히 형성되지 못하고, 또한 1000 μm 를 초과하는 경우 물성이 약한 문제가 있어 바람직하지 못하다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 상기 그물 구조를 가지는 구조체는 굽힘 강도 (Flexural strength)가 0.1~0.8 MPa의 범위

를 만족하여야 본 발명에 따른 기관 재생 유도관을 기관 이식할 경우 외부의 힘을 견딜 수 있다.

- [0040] 또한, 상기 그물 구조를 가지는 구조체는 그 위에 형성되는 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층과 동일한 재료를 사용하는 것이 바람직하다. 즉, 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 폴리락틱산 [poly(lactic acid)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리(락틱산-글리콜산) 공중합체 [poly(lactic acid-co-glycolic acid)], 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락틱산-카프로락톤 공중합체 [poly(lactic acid-co-ε-caprolactone)], 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체 (polyhydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥사논 (polydioxanone), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 생분해성 고분자이거나, 또는 상기 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 친수성 고분자를 0.1~20 중량부 더 포함하여 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0041] 한편, 본 발명에 따른 기관 재생 유도관을 제조하기 위한 고분자 지지체는 원통 형태의 하이드로겔 친수성 고분자를 사용하는데, 예를 들어, 알긴산 (alginate), 하이알론산 (hyaluronic acid), 카르복시메틸셀룰로오스 [carboxymethyl cellulose (CMC)], 덱스트란 (dextran), 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 [hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)], 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 [polyhydroethyl methacrylate (polyHEMA)], 폴리비닐피롤리돈 [poly(*N*-vinyl pyrrolidone (PVP)), 폴리아이소프로필아크릴아마이드 [poly(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm)], 폴리비닐알콜 [polyvinyl alcohol (PVA)], 폴리에틸렌옥사이드 [poly(ethylene oxide) (PEO)], 및 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 (polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0042] 상기 원통형 하이드로겔 고분자 지지체는 친수성 고분자 수용액을 제조하고 각각의 용도에 적합한 굵기와 길이를 가지는 원통형 몰드에 넣어 가교시켜 사용하는 것이 바람직하다.
- [0043] 상기 친수성 고분자 수용액의 농도는 0.1~50 중량%인 것이 기관재생용 지지체의 안정한 구조 획득 측면에서 바람직하다.
- [0044] 본 발명에 따른 고분자 지지체는 하이드로겔 형태를 가지는 것이 구조적인 면에서 바람직하며, 하이드로겔 형성을 위한 재료의 가교는 적절한 가교제의 사용, 자외선 또는 열의 적용 등을 포함하여 상기 재료를 가교시킬 수 있는 방법이면 특별히 한정되지 않고 공지된 방법을 어느 것이나 사용해도 무방하다.
- [0045] 또한, 상기 하이드로겔 고분자 지지체는 이후의 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층이 그 외부에 형성되는 경우, 최종적으로는 기관 재생 유도관으로부터 제거되는 것으로 튜브 형태의 유도관 제조를 위하여 일시적으로 사용되는 것이다.
- [0046] 그러나, 하이드로겔 고분자 지지체만을 이용하는 경우 최종 제조되는 기관 재생 유도관의 형태가 변형될 수 있어, 본 발명에서는 상기 상세히 설명한 바와 같이 그물 구조의 구조체를 상기 하이드로겔 고분자 지지체를 감싼 상태에서 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0047] 또한, 본 발명의 기관재생유도관의 최외각에 형성되는 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막 층은 평균 다공크기가 10~100 nm인 내표면, 및 평균 다공크기가 50~200 μm인 외표면으로 구성된 비대칭 다공성 구조를 가지는 것이 바람직하다.
- [0048] 즉, 내표면 (하이드로겔과 접촉된 면)은 산소와 영양분을 통해 주변 조직이 잘 접촉되어 섬모상피층이 재생될 수 있는 약 100 nm의 다공크기를, 외표면은 산소와 영양분을 잘 전달하며 연골 조직과 같은 주변 조직과 잘 결합하여 기관 재생 유도관이 보다 안정하게 인체에 존재할 수 있도록 비교적 큰 다공크기 (약 150 μm)를 가지는 선택적 투과가 가능한 비대칭 다공구조를 나타내 기관재생에 효과적인 형태의 구조인 것이 바람직하다.
- [0049] 이러한 비대칭 다공성 구조는 용매-비용매 치환 (solvent-nonsolvent exchange)에 의해 용매와 비용매 간의 상분리 현상으로 형성되는 것으로, 구체적으로는 그물 구조의 구조체로 감싼 원통형 하이드로겔 고분자 지지체를 상기 생분해성 고분자 용액에 함침시켜 접촉하는 순간, 용매-비용매 치환 (solvent-nonsolvent exchange)에 의해 고분자 용액에 사용된 용매인 Tetraglycol, N,N-dimethylacetamide과 비용매인 하이드로겔 고분자 지지체 중의 물이 만나 서로 교환되고 물의 확산 (diffusion)으로 인해 침전이 형성된다. 이를 30분 동안 증류수에 침전시킨 후 잔여의 용매를 제거하기 위해 증류수에 완전히 세척하게 되면, 상기 하이드로겔 고분자 지지체는 제거

되면서, 그물 구조의 구조체와 비대칭 미세다공성 막으로 이루어진 복합막 기관 재생 유도관을 제조할 수 있다.

- [0050] 이러한 생분해성 고분자 비대칭 미세다공성막 층은 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 폴리락틱산 [poly(lactic acid)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리(락틱산-글리콜산) 공중합체 [poly(lactic acid-co-glycolic acid)], 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락틱산-카프로락톤 공중합체 [poly(lactic acid-co-ε-caprolactone)], 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체(polyhydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥사논 (polydioxanone), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 생분해성 고분자이거나, 또는 상기 생분해성 고분자 100중량부에 대하여 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 친수성 고분자를 0.1~20 중량부 더 포함하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 생분해성 고분자 중에서도 폴리카프로락톤 (PCL)은 물성, 유연성 및 생체적합성이 우수하고 생분해 기간이 길어 기관재생유도관을 제조를 위한 재료로서 가장 바람직하다.
- [0052] 또한, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드(polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체 (PEO-PPO 공중합체; Pluronic series), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 (polyethylene oxide-poly(lactic acid) 공중합체(PEO-PLA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락티글리콜산 [polyethylene oxide-poly(lactic-co-glycolic acid)] 공중합체 (PEO-PLGA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 (polyethylene oxide-polycaprolactone) 공중합체 (PEO-PCL), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리비닐알콜 (PVA), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류 (polyoxyethylene alkyl ethers; Brij Series), 폴리옥시에틸렌 케스터 오일 유도체류 (polyoxyethylene castor oil derivatives; Cremophores), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 페티 에시드 에스테르류 (polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters; Tween Series), 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류 (polyoxyethylene stearates)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 이 중에서 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 공중합체인 Pluronic series가 가장 바람직하다.
- [0053] 본 발명에서는 특별히 그물 구조를 가지는 구조체, 및 비대칭 구조를 가지는 미세다공성막으로 이루어진 복합막 구조의 기관 재생 유도관에 항생제 및 항진균제 중에서 선택되는 1종 이상의 약물을 포함하여, 기관내 삽관 또는 인공기관 대체물 이식 후 2차적으로 발생하는 기관지염을 효과적으로 치료할 수 있도록 하였다.
- [0054] 본 발명에 따른 기관 재생 유도관에 포함되는 항생제는 세균의 성장발육과 대사활동, 번식 등을 방해하고 교란 하거나 세균을 죽이는 약물로서, Amoxicillin/clavulanic acid, Ampicillin/sulbactam, Piperacillin/tazobactam, Imipenem, Meropenem 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0055] 상기 항생제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 60 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것이 기관지 염증 치료에 효과적인 농도이면서 세포 독성을 일으키지 않고 기관지 상피세포의 생존률을 70% 이상으로 유지할 수 있어 바람직하다.
- [0056] 이러한 기관 재생 유도관에 포함된 상기 항생제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 40일 이상 서방형 방출되는 것을 특징으로 한다. 따라서, 기관내 삽관 또는 인공기관 대체물 이식 후 2차적으로 발생하는 기관지염을 지속적으로 치료할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명에 따른 기관 재생 유도관에 포함되는 항진균제는 곰팡이 또는 진균류에 의한 점막염을 치료하는 약물로서, 본 발명에서는 Amphotericin B, Voriconazole, Posaconazole, Fluconazole 중에서 선택되는 1종 이상이 바람직하다.
- [0058] 상기 항진균제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 5 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것이 진균 작용에 효과적인 농도이면서 세포 독성을 일으키지 않고 기관지 상피세포의 생존률을 70% 이상으로 유지할 수 있어 바람직하다.
- [0059] 이러한 기관 재생 유도관에 포함된 상기 항진균제는 상기 기관 재생 유도관으로부터 40일 이상 서방형 방출되는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관은 곰팡이, 진균류, 박테리아 등에 의한 점막염을 효과적으로 치료할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 약물을 포함하는 복합막 구조의 기관 재생 유도관의 제조방법은 다음 도 3에서 도식한 바와 같이, 원통형 하이드로겔 지지체를 제조하는 단계, 상기 원통형 하이드로겔 지지체에 그물 구조를 가지는 구조체를 씌우는 단계, 상기 그물 구조의 구조체로 씌운 하이드로겔 지지체를 항생제와 항진균제가 도입된 생분해성 고분자 용액에 함침시켜 상기 구조체 위에 생분해성 고분자 비대칭 미세다공성막 층을 형성시키는 단계, 및 상

기 원통형 하이드로겔 지지체를 제거하는 단계를 거쳐, 그물 구조를 가지는 구조체/비대칭 미세다공성막 층의 복합막으로 이루어진 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관을 제조할 수 있다.

- [0061] 상기 원통형 하이드로겔 고분자 지지체는 해당 고분자를 용매인 물에 용해시켜 수용액을 제조하고, 이를 다양한 굵기와 길이를 가지는 형태로 만들기 위하여 상기 고분자 수용액을 다양한 굵기 (1 ~ 100 mm)와 길이 (10 ~ 250 mm)의 원통형 몰드에 넣어 가교시켜 사용하는 것이 바람직하다. 상기 고분자 수용액의 농도는 0.1 ~ 5 중량%인 것이 기관 재생 유도관의 안정한 구조 획득 측면에서 바람직하다.
- [0062] 그 다음, 상기 제조된 다양한 굵기와 길이를 가지는 원통형의 하이드로겔 고분자 지지체에 그물 구조를 가지는 구조체를 씌우는 단계이다.
- [0063] 상기 그물 구조를 가지는 구조체 그물의 두께는 100~500 μm , 그물 간 간격 (interval)은 500~1000 μm 인 것이 바람직하다.
- [0064] 또한, 본 발명에 따른 상기 그물 구조를 가지는 구조체는 굽힘 강도 (Flexural strength)가 0.1~0.8 MPa의 범위를 만족하여야 본 발명에 따른 기관 재생 유도관을 기관 이식할 경우 외부의 힘을 견딜 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 그물 구조를 가지는 생분해성 고분자 구조체는 그 위에 형성되는 생분해성 고분자 비대칭 미세다공성막 층과 동일한 재료를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0066] 또한, 상기 그물 구조의 구조체로 씌운 하이드로겔 지지체를 생분해성 고분자 용액에 함침 침전법을 이용하여 상기 구조체 위에 비대칭 미세다공막 층을 형성시키는 단계이다.
- [0067] 상기 생분해성 고분자 비대칭 미세다공막 층은 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 폴리락틱산 [poly(lactic acid)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리(락틱산-글리콜산) 공중합체[poly(lactic acid-co-glycolic acid)], 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락틱산-카프로락톤 공중합체 [poly(lactic acid-co- ϵ -caprolactone)], 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발리릭산 공중합체(polyhydroxybutyric acid-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥사논 (polydioxanone), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 생분해성 고분자이거나, 또는 상기 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여 중량평균분자량 1,000~1,000,000 g/mol인 친수성 고분자를 0.1~20 중량부 더 포함하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0068] 상기 생분해성 고분자 중에서도 폴리카프로락톤 (PCL)은 물성, 유연성 및 생체적합성이 우수하고 생분해 기간이 길어 기관재생유도관을 제조를 위한 재료로서 가장 바람직하다.
- [0069] 또한, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드(polyethylene oxide-polypropyleneoxide) 공중합체 (PEO-PPO 공중합체; Pluronic series), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락틱산 (polyethylene oxide-poly(lactic acid) 공중합체(PEO-PLA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리락티글리콜산 [polyethylene oxide-poly(lactic-co-glycolic acid)] 공중합체 (PEO-PLGA), 폴리에틸렌옥사이드-폴리카프로락톤 (polyethylene oxide-polycaprolactone) 공중합체 (PEO-PCL), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리비닐알콜 (PVA), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르류 (polyoxyethylene alkyl ethers; Brij Series), 폴리옥시에틸렌 케스터 오일 유도체류 (polyoxyethylene castor oil derivatives; Cremophores), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 페티 에시드 에스터류 (polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters; Tween Series), 및 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류 (polyoxyethylene stearates)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 이 중에서 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 공중합체인 Pluronic series가 가장 바람직하다.
- [0070] 상기 사용되는 생분해성 고분자 용액의 농도는 0.1 ~ 50 중량%인 것이 최종 제조되는 기관 재생 유도관의 물성 유지와 비대칭 구조의 미세다공성막의 구조를 얻기 위한 측면에서 바람직하다.
- [0071] 또한, 상기 생분해성 고분자 용액 제조시 사용되는 용매는 테트라글리콜 (Tetraglycol), 1-메틸-2-피롤리디논 [1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP)], 트리아세틴 (triacetin), 및 벤질 알콜 (benzyl alcohol)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 인체 무해한 것이 바람직하다.
- [0072] 또한, 본 발명에서는 상기 고분자 용액에 항생제 및 항진균제를 혼합시켜 사용하는 것이 바람직하다.

- [0073] 상기 항생제는 비대칭 미세다공성막 층을 형성하는 고분자 용액 중 60 mg/ml 이하의 농도로, 또한, 본 발명에 따른 상기 항진균제는 5 mg/ml 이하의 농도로 포함되는 것이 각 약물의 효과를 발휘하면서 세포 독성을 일으키지 않고 기관지 상피세포의 생존율을 70% 이상으로 유지할 수 있어 바람직하다.
- [0074] 또한, 상기 항생제와 항진균제는 각각 독립적으로 포함시킬 수도 있고, 혼합시켜 포함할 수도 있으며, 상기 농도 범위 내에서 용도에 따라 적절히 조절할 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 상기 비대칭 구조의 미세다공성막 층은 용매-비용매 치환 (solvent-nonsolvent exchange)에 의해 고분자 용액에 사용된 용매인 Tetraglycol, N,N-dimethylacetamide과 비용매인 하이드로겔 고분자 지지체 중의 물이 만나 서로 교환되고 물의 확산 (diffusion)으로 인해 침전이 형성된다. 이를 30분 동안 증류수에 침전시킨 후 잔여의 용매를 제거하기 위해 증류수에 완전히 세척하게 되면, 상기 하이드로겔 고분자 지지체는 제거되면서, 그물 구조의 구조체와 생분해성 고분자로 이루어진 비대칭 미세다공성 막으로 이루어진 복합막 구조의 기관재생유도관을 제조할 수 있다.
- [0076] 본 발명에서는 하이드로겔 고분자 지지체의 표면을 그물 구조의 구조체로 감싼 형태를 가지나, 상기 생분해성 고분자에 함침시키게 되면, 상기 생분해성 고분자 용액들이 상기 구조체의 그물 구조들 사이를 통과하여 하이드로겔 고분자 지지체까지 확산되는 것이다.
- [0077] 또한, 본 발명과 같이 항생제 및 항진균제를 기관 재생 유도관에 탑재시키는 경우, 상기 항생제 및 항진균제는 40일 이상 서방형으로 방출되는 효과를 가진다.
- [0078] 따라서, 이러한 본 발명에 따른 약물을 포함하는 기관 재생 유도관은 효과적인 항생제의 효과로 기관지 염증을 지속적으로 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 항진균제의 효과로 다양한 세균으로부터 점막염증을 효과적으로 치료할 수 있다.
- [0079] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 이하의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 이하의 실시예에서는 특정 화합물을 이용하여 예시하였으나, 이들의 균등물을 사용한 경우에 있어서도 동등 유사한 정도의 효과를 발휘할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0080] **실시예 1~3**
- [0081] 1) 항생제와 항진균제가 도입된 고분자 용액 제조
- [0082] PCL (12 wt%)과 Pluronic F127 (5 wt%, PCL base)을 혼합하고, 이들을 Tetraglycol과 N,N-dimethylacetamide이 2:1의 비율로 혼합된 용매를 사용하여 90 °C에서 용해시켜 고분자 용액을 제조하였다.
- [0083] 상기 고분자 용액에 항생제인 Imipenem 60 mg/ml, 항진균제인 Amphotericin B를 각각 0.2, 2, 5, 10, 20 mg/ml로 첨가하여 항생제, 항진균제, 및 이들 두 가지 약물 모두가 도입된 고분자 용액을 제조하였다.
- [0084] 구체적으로는 항생제인 Imipenem만 포함된 그룹 (IMI), 항진균제인 Amphotericin B만 포함된 그룹 (Am B), 및 상기 항생제인 Imipenem와 항진균제인 Amphotericin B가 모두 포함된 그룹 (Dual)으로 나누어 실험하였다.
- [0085]
- [0086] 2) 원통형 폴리비닐알콜 하이드로겔 제조
- [0087] 15 wt% PVA 수용액을 Freezing/Thawing 과정을 반복하여 물리적으로 가교시켜 다량의 수분을 함유한 원통형 하이드로겔을 제조하였다.
- [0088] 3) 비대칭 미세다공성 복합막 제조
- [0089] 상기 제조된 원통형 PVA 하이드로겔에 상기 원통형 하이드로겔의 외부 직경과 동일한 내부 직경을 가지는 3D

printed mesh (재료, PCL; 그물 구조를 이루는 그물(strand)의 두께 300 μm , 그물 간 간격 900 μm , 굽힘강도 0.19 MPa)를 씌웠다.

[0090] 상기 그물 구조를 가지는 구조체로 씌운 PVA 하이드로겔을 상기 항생제와 항진균제가 도입된 PCL/Pluronic F127 혼합 고분자 용액에 함침시켰다.

[0091] PVA 하이드로겔과 고분자 용액이 접촉하는 순간, 용매-비용매 치환 (solvent-nonsolvent exchange)에 의해 용매인 Tetraglycol, N,N-dimethylacetamide과 비용매인 물이 만나 서로 교환되고 물의 확산(diffusion)으로 인해 침전이 형성되었다.

[0092] 이를 30분 동안 증류수에 침전시키게 되면, 상기 PVA 하이드로겔은 제거되며, 잔여의 용매를 제거하기 위해 증류수에 완전히 세척 후 진공 건조하여 항생제와 항진균제가 도입된 비대칭 미세다공성 막/3D printed mesh 복합 막 구조의 기관 재생 유도관을 제조하였다.

[0093] **대조군**

[0094] 상기 실시예 1에서 항생제와 항진균제가 도입되지 않은 기관 재생 유도관을 대조군 (Control)으로 사용하여 본 발명과 비교하였다.

[0095] **실험예 1 : 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관의 세포 독성 평가**

[0096] 기관 재생 유도관에 들어가는 항생제와 항진균제의 적절한 농도를 알아내기 위해 정해진 기준 시험 샘플 1 cm^2 , 세포배양액 1 ml에 맞추어 세포독성 실험을 진행하였다. 각각의 농도별 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관에 airway epithelial cell basal medium (ATCC)에 bronchial epithelial cell growth kit (ATCC)를 첨가한 배양액을 채운 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 항온조에서 60 rpm으로 흔들어주면서 1일 유지하여 기관 재생 유도관으로부터 방출된 시료를 얻었다.

[0097] 기관지 내에 가장 많이 존재하는 기관지 상피세포 (Human bronchial epithelial cells)를 사용하였고, airway epithelial cell basal medium에 bronchial epithelial cell growth kit를 첨가한 배양액에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 의 조건에서 배양하였으며, 세포들이 80 % 정도 confluence를 이루면 0.25 % trypsin/EDTA를 이용하여 분리한 후, 2회 계대배양하여 본 실험에 사용하였다.

[0098] 항생제와 항진균제의 적정 농도를 분석하기 위하여, MTS assay를 이용하여 세포독성을 관찰하였다. 세포를 96-well plate에 1 x 10⁴ 개의 세포를 분주하여 24시간 동안 airway epithelial cell basal medium에 bronchial epithelial cell growth kit 를 첨가한 배양액에서 배양시켰다.

[0099] 세포가 80% 정도 confluence 된 후, 세포배양액을 제거하고 완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)로 세척한 다음 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 Imipenem만 도입된 그룹(IMI), Amphotericin B만 도입된 그룹(Am B), Imipenem과 Amphotericin B가 모두 도입된 그룹 (Dual)을 세포 배양액에서 하루 동안 방출시켜 방출된 시료 200 μL 을 well에 다시 채워 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 의 조건에서 하루 동안 배양하였다. 하루 뒤 well의 세포배양액과 방출된 시료를 모두 제거한 후, PBS로 세척한 다음 혈청을 포함하지 않은 세포배양액 100 μL 에 MTS (Promega) 용액 20 μL 씩 넣고, 1시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 microplate reader (ELISA reader, TECAN)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0100] 다음 도 4를 참조하면, 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관 (Dual)에서 항생제와 항진균제의 농도에 따른 세포 독성을 평가해본 결과 Amphotericin B (항진균제)의 농도가 10 mg/ml 이상일 때 기관지 상피세포의 생존률이 70 % 이하로 나타나 세포 독성에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0101] 따라서, Imipenem (항생제)의 농도가 60 mg/ml 이고, Amphotericin B (항진균제)의 농도가 5 mg/ml 이하일 때 기관지 상피세포의 생존률이 70 % 이상으로 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

[0102] 실험예 2 : 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관의 항생제와 항진균제의 탐재량 및 방출거동

[0103] 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관을 Dichloromethane에 녹인 후 UV/VIS spectrometer (UV-3600, Shimadzu)을 사용하여 항생제와 항진균제의 실제 도입된 탐재량을 정량 분석하였다.

[0104] 또한, 항생제와 항진균제의 방출실험은 EP tube를 이용하여 수행하였다. EP tube에 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관 1 cm²을 넣고 1 ml 완충용액을 채운 후, 37 °C의 항온조에서 100 rpm으로 흔들어주면서 일정 시간 (6주 동안) 유지하였다. 이때 사용된 완충용액은 약물의 방출에 가장 민감하게 작용하는 삼투압농도 및 이온농도 등이 인체 내 환경과 매우 유사한 PBS (pH ~7.4)가 사용되었다. 정해진 시간마다 원심분리기를 사용하여 완충용액을 채취하고 다시 새로운 완충용액을 교환해 주는 방법으로 방출된 시료를 채취하였고, 완충용액으로 용출된 항생제와 항진균제의 분석을 위해 UV/VIS spectrometer (UV-3600, Shimadzu)을 사용하여 정량 분석하였다.

[0105] 다음 도 5에 나타났듯이, Imipenem의 탐재량은 Imipenem만 도입한 군(IMI)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 군 (Dual)이 유사한 양 탐재된 것을 확인할 수 있었고, Imipenem과 Amphotericin B 모두 6주 이상 서서히 방출되는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 다음 도 6의 결과에서와 같이, Amphotericin B의 탐재량 또한 Amphotericin B만 도입된 군 (Am B)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 군 (Dual)이 유사한 양 탐재된 것을 확인할 수 있었다.

[0107] 또한, Amphotericin B의 농도에 관계없이 Amphotericin B의 방출거동에서 유사한 서방형 방출거동을 보였으며, 그 중 Amphotericin B의 농도가 5 mg/ml 일 때 기관 재생 유도관 내에 포함된 약물이 거의 다 방출됨을 확인할 수 있었다.

[0108] 실험예 3 : 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관의 박테리아 사멸 가능성 평가

[0109] 항생제와 항진균제가 도입된 기관 재생 유도관이 지속적인 항균성을 나타내는지를 알아보기 위해 Kirby-bauer (KB) test를 사용하여 박테리아 사멸 가능성 여부를 평가하였다. 대표적인 기관지 염증의 박테리아인 *Candida albicans* (Gram-positive)와 *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative) 로 균주를 사용하였으며, Kirby-bauer (KB) test를 하기 위해 배지가 담긴 Petri-dish에 각각의 균주를 면봉으로 발라주었다. 균주가 뿌려진 Petri-dish를 12시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 배양된 균의 수는 1x10⁸개 정도 되며, 균이 배양된 Petri-dish에 기관 재생 유도관을 1 cm² 크기로 잘라 놓고 박테리아가 사멸되는 영역 (Zone of inhibition, ZOI)이 생기는지를 확인하였다.

[0110] Control로 Imipenem과 Amphotericin B가 도입되지 않은 기관 재생 유도관을 놓은 경우는 박테리아를 사멸시키지 못하여 불투명하게 나타나고, Imipenem과 Amphotericin B가 도입된 기관 재생 유도관의 경우 박테리아를 사멸시켜 투명하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 박테리아가 사멸되는 영역 (ZOI)의 직경을 측정하여 항균성을 확인하였다.

[0111] 이때, 샘플의 준비는 Imipenem (60 mg/ml)만 도입된 기관 재생 유도관, Amphotericin B (0.2, 2, 5 mg/ml)만 도입된 기관 재생 유도관, Imipenem과 Amphotericin B를 Dual로 도입된 기관 재생 유도관 1 cm²에 완충용액 1 ml을 채운 후, 37 °C의 항온조에서 100 rpm으로 흔들어주면서 일정기간 (0일, 1, 3, 6주) 유지하였다. 정해진 기간마다 완충용액을 채취하고 다시 새로운 완충 용액을 교환해주는 방법으로 방출을 하였고, 일정기간에 따라 방출용액을 제외한 샘플만을 채취하여 실험을 진행하였다.

[0112] 다음 도 7을 참조하면, *Pseudomonas aeruginosa*가 배양된 Petri-dish에서는 항생제와 항진균제가 도입되지 않은 기관 재생 유도관 (Control)과 *Pseudomonas aeruginosa*에 유효하지 않은 약물인 Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B)에서는 박테리아를 사멸시키는 능력이 없어 clean zone이 형성되지 않았으며, Imipenem이 도입된 그룹 (IMI)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 그룹 (Dual)에서는 뚜렷한 clean zone이 형성되는 것을 확

인할 수 있었다.

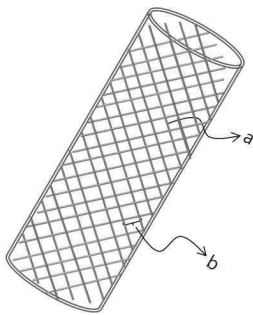
[0113] 또한, *Candida albicans*가 배양된 Petri-dish에서는 항생제와 항진균제가 도입되지 않은 그룹 (Control)과 *Candida albicans*에 유효하지 않은 약물인 Imipenem이 도입된 그룹 (IMI)에서는 박테리아를 사멸 시키는 능력이 없어 clean zone이 형성되지 않았으며 Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 그룹 (Dual)에서는 Amphotericin B의 농도가 5 mg/ml 일 때, 6주 이상 가장 뚜렷한 clean zone이 형성되는 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조).

[0114] ZOI의 직경을 측정해 본 결과, *Pseudomonas aeruginosa*가 배양된 Petri-dish에서는 Imipenem만 도입된 그룹 (IMI)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 그룹 (Dual)에서 6주 이상 지속적인 항균효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (도 9).

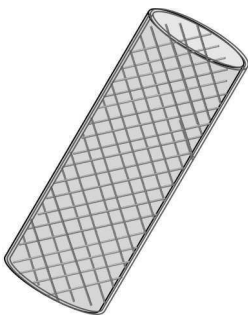
[0115] 또한, *Candida albicans*가 배양된 Petri-dish에서 ZOI의 직경을 측정해 본 결과, Amphotericin B만 도입된 그룹 (Am B)과 Imipenem과 Amphotericin B 모두 도입된 그룹 (Dual)에서 Amphotericin B의 농도가 5 mg/ml일 때 6주 이상 가장 우수한 항균 효과를 나타내어 박테리아를 사멸시키는 것을 확인하였다 (도 10).

도면

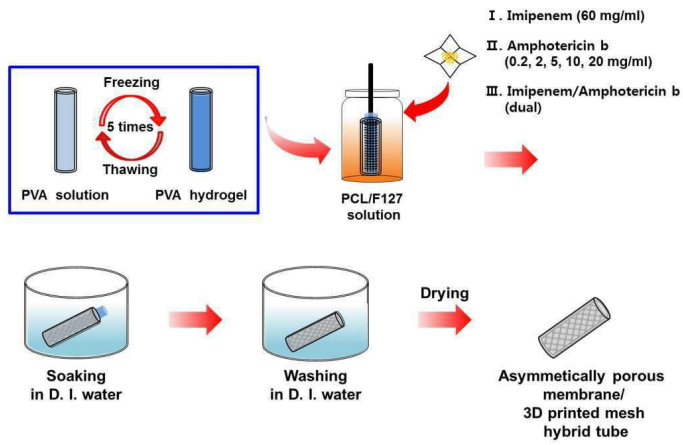
도면1



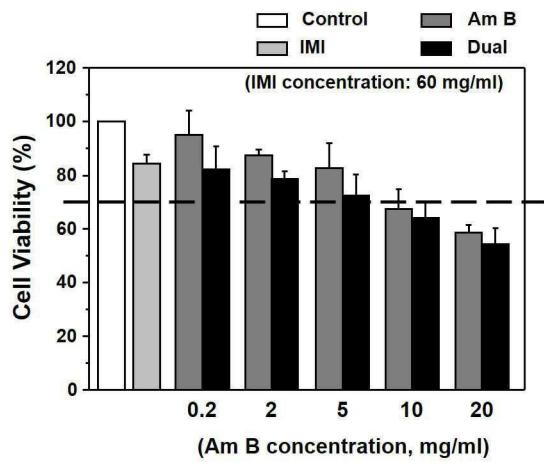
도면2



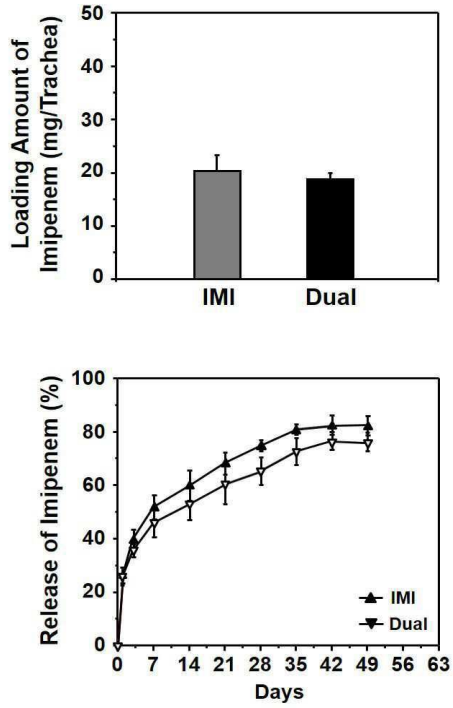
도면3



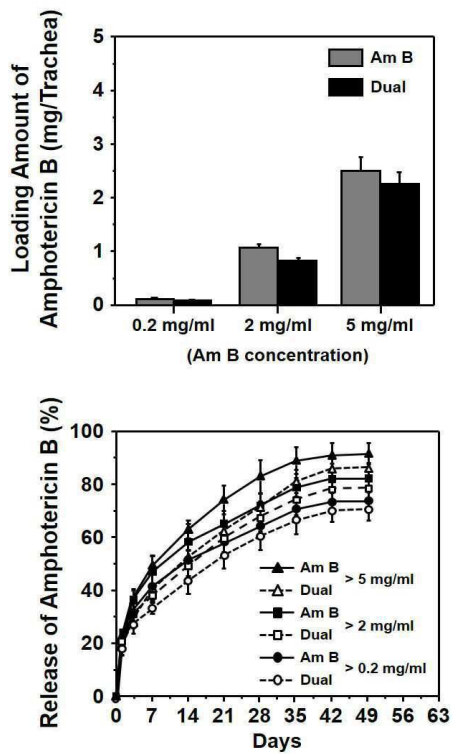
도면4



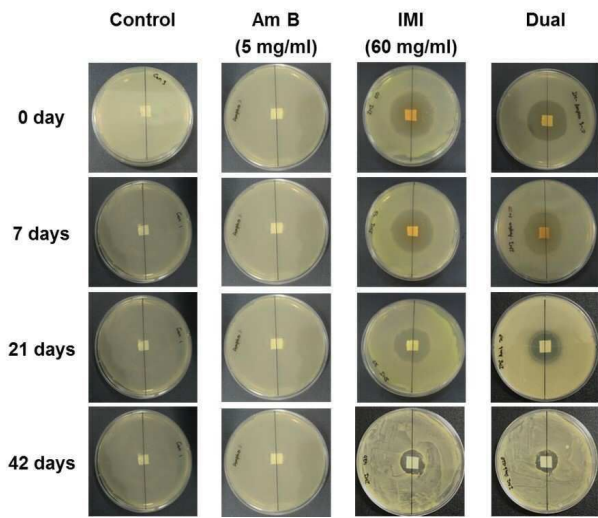
도면5



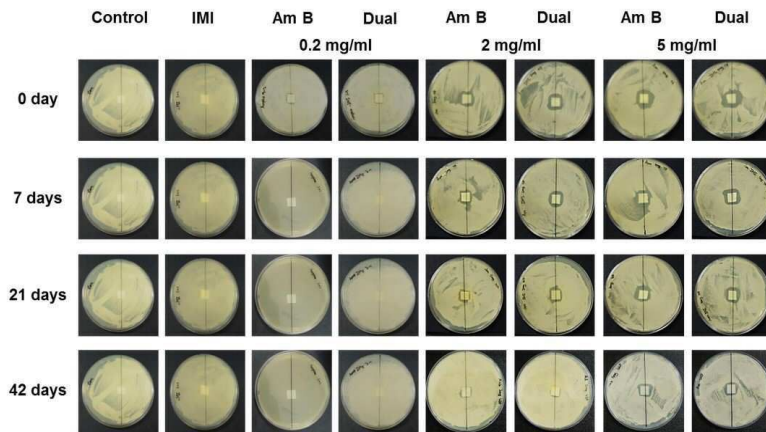
도면6



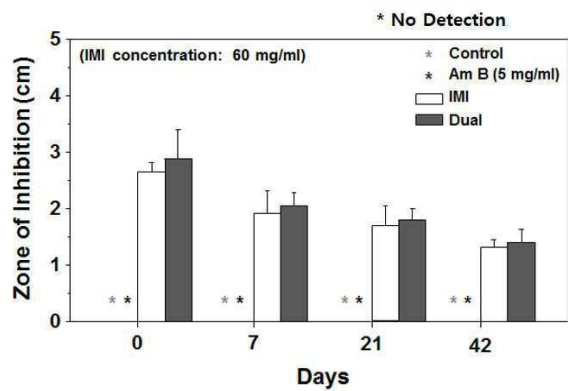
도면7



도면8



도면9



도면10

