



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월14일
(11) 등록번호 10-2277150
(24) 등록일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0045795
(22) 출원일자 2019년04월19일
심사청구일자 2019년04월19일
(65) 공개번호 10-2019-0124646
(43) 공개일자 2019년11월05일
(30) 우선권주장
1020180048261 2018년04월26일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.65 no.6
pp.1729-1737, 2013.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
윤진숙
서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 러
들로교수동 340호
성학준
서울특별시 강남구 선릉로126길 22 롯데캐슬프레
미어아파트 101동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인(유한), 이재영

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 박영관

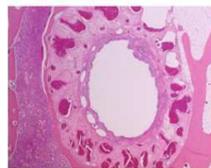
(54) 발명의 명칭 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

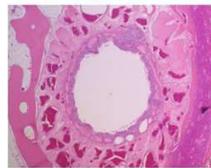
본 발명은 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 기존의 비루관 협착 동물 모델은 비루관 폐쇄가 안정적으로 유지되지 않고, 비루관 폐쇄 치료용 약물이나 가이드의 치료 효과를 정확하게 측정하기 전에 비루관 협착 효과가 저하되는 문제점이 있었다. 본 발명의 의한 비루관 협착 동물 모델은 장시간 안정적으로 비루관을 폐쇄시킴으로서 비루관 폐쇄 치료용 약물, 또는 가이드의 효과를 정확하게 평가 가능하므로, 의학 치료제 개발 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1

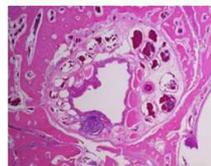
비교예 1



비교예 2



제조예 1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/10 (2013.01)
 A01K 2207/30 (2013.01)
 A01K 2227/107 (2013.01)
 A01K 2267/03 (2013.01)

(72) 발명자

신영민

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
 에비슨 의생명연구센터 525호

이정복

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 에비
 슨 의생명연구센터 525호

고재상

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 러들
 로교수동 344호

신우범

서울특별시 마포구 마포대로7길 22
 삼성래미안공덕3차아파트 308동 1505호

(56) 선행기술조사문헌

Genet Mol Res. vol.14 no.3 pp.7929-7936, 2015.
 Int Ophthalmol. vol.34 no.3 pp.465-476, 2014.
 J Ophthalmol. Article ID 3438041, 2017.
 PLoS One vol.12 no.6 e0178679, 2017.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016-31-0734
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	의료기관 창업 캠퍼스 연계 원천기술개발사업
연구과제명	형상기억 소재 기반 생체 대체 튜브형 그래프트 개발, 동물 모델에서의 성능검증 및
입상 시험	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2021.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 유착제와 하이드로겔을 혼합하는 단계; 및
- (b) 상기 (a)단계에서의 혼합물을 인간을 제외한 동물의 비루관에 주입하는 단계;를 포함하는, 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 유착제는 고장성식염수(hypertonic saline), 요오드(iodine), 폴리도카놀(polidocanol), 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate), 리포다당류(lipopolysaccharide), 에탄올아민 올레산(ethanolamine oleate), 염화 모루인산염(sodium morrhuate), 및 펩타이드(peptide)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 콜라젠(collagen), 피브린(fibrin), 아가로스(agarose), 한천(agar), 매트리지젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 및 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 혼합물 내 유착제 농도는 1×10^0 내지 $1 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$ 인, 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법.

청구항 5

유착제와 혼합된 하이드로겔이 인간을 제외한 동물의 비루관에 주입된, 비루관 폐쇄 동물모델.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 동물은 토끼인, 비루관 폐쇄 동물모델.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 유착제는 고장성식염수(hypertonic saline), 요오드(iodine), 폴리도카놀(polidocanol), 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate), 리포다당류(lipopolysaccharide), 에탄올아민 올레산(ethanolamine

oleate), 염화 모루인산염(sodium morrhuate), 및 펩타이드(peptide)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 비루관 폐쇄 동물모델.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 하이드로겔은 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로즈(agarose), 한천(agar), 매트릭젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 및 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 비루관 폐쇄 동물모델.

청구항 9

- (a) 제 5항의 비루관 폐쇄 동물모델에서 비루관 역류를 측정하는 단계;
- (b) 상기 동물모델에 비루관 폐쇄 치료용 후보 물질을 투여하고, 비루관 역류를 재측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (a)단계에서의 측정값보다 상기 (b)단계에서의 측정값이 낮을 경우, 상기 후보 물질을 비루관 폐쇄 치료용 물질로 판단하는 단계;를 포함하는, 비루관 폐쇄 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비루관은 눈에서 코로 통하는 배출로로서, 비루관이 좁아지고 막히거나 눈물배출기능이 떨어져서 눈물이 코로 배출되지 못하고 외부로 흘러 넘치는 질환을 눈물흘림(유루)증이라고 한다. 선천적인 경우와 후천적인 경우가 있는데, 특히 소아의 눈물 흘림은 선천적 비루관 폐쇄에 의한 경우가 많다. 비루관의 코 쪽 끝부분의 막이 열리지 않은 것에 의한 경우가 많고, 태어나면서부터 증상이 있을 수 있다. 성인의 경우, 대개 만성 염증이나 고령 등의 원인으로 눈물길이 후천적으로 폐쇄되는 것으로 알려져 있는데, 눈물길의 해부학적 폐쇄는 없으나, 눈물을 배출해주는 기능이 저하되어 유루증이 생기는 기능적 폐쇄가 이에 속한다. 최근에는 환경의 변화로 눈물이 과다하게 생성되어 눈물흘림이 생기는 경우가 증가하고 있다. 안구건조증 환자에서 외출 시 바람과 같은 자극에 의해 반사적으로 눈물이 많이 분비될 수 있고, 알레르기를 포함한 각종 결막염이나 각막질환, 눈꺼풀염, 눈꺼풀속 말림 등으로 눈에 대한 자극이 많은 경우에 생길 수 있다.

[0004] 유루증의 대부분이 해부학적 이상을 동반하지 않는 비루관 폐쇄인 경우이므로, 비수술적 치료로서 약물이나 가이드(튜브)를 삽입하여 비루관을 개통시켜 주는 치료가 시행된다. 다양한 약물 및 가이드가 비루관 개통을 위해 개발되고 있으나, 이의 효능을 정확히 평가할 동물 모델이 부재하여 전임상 실험에 한계가 있는 실정이다.

[0005] 따라서 본 발명은 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 의한 비루관 협착 동물 모델은 장시간 안정적으로 비루관을 폐쇄시킴으로서 비루관 폐쇄 치료용 약물, 또는 가이드의 효과를 정확하게 평가 가능하므로, 의학 치료제 개발 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 기존의 비루관 협착 동물 모델은 비루관 폐쇄가 안정적으로 유지되지 않고, 비루관 폐쇄 치료용 약물이나 가이드의 치료 효과를 정확하게 측정하기 전에 비루관 협착 효과가 저하되는 문제점이 있었다. 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 비루관 폐쇄가 안정적으로 유지되는 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0013] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에서 "비루관(nasolacrimal duct)"이란, 상악골이나 누골에 의해 만들어지는 골성의 비루관 내에 있는 막성의 관이다. 누골보다 크며, 전내측으로 내려가 하비도의 앞에 열린다(울면 코를 흘리는 이유는 된다). 다열원주 상피이지만 고유층에는 해면상의 정맥총이 발달한다. 비루관 폐쇄는 비루관이 좁아지고 막히는 것으로, 이로 인해서 눈물배출기능이 떨어져서 눈물이 코로 배출되지 못하고 외부로 흘러 넘치는 질환을 눈물흘림(유루)증이라고 한다. 선천적인 경우와 후천적인 경우가 있는데, 특히 소아의 눈물 흘림은 선천적 비루관 폐쇄에 의한 경우가 많다. 비루관의 코 쪽 끝부분의 막이 열리지 않은 것에 의한 경우가 많고, 태어나면서부터 증상이 있을 수 있다. 성인의 경우, 대개 만성 염증이나 고령 등의 원인으로 눈물길이 후천적으로 폐쇄되는 것으로 알려져 있는데, 눈물길의 해부학적 폐쇄는 없으나, 눈물을 배출해주는 기능이 저하되어 유루증이 생기는 기능적 폐쇄가 이에 속한다. 최근에는 환경의 변화로 눈물이 과다하게 생성되어 눈물흘림이 생기는 경우가 증가하고 있다. 안구건조증 환자에서 외출 시 바람과 같은 자극에 의해 반사적으로 눈물이 많이 분비될 수 있고, 알레르기를 포함한 각종 결막염이나 각막질환, 눈꺼풀염, 눈꺼풀속막립 등으로 눈에 대한 자극이 많은 경우에 생길 수 있다.

[0016] 유루증의 대부분이 해부학적 이상을 동반하지 않는 비루관 폐쇄인 경우이므로, 비수술적 치료로서 약물이나 가이더(튜브)를 삽입하여 비루관을 개통시켜 주는 치료가 시행된다. 다양한 약물 및 가이더가 비루관 개통을 위해 개발되고 있으나, 이의 효능을 정확히 평가할 동물 모델이 부재하여 전임상 실험에 한계가 있는 실정이다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서 "유착제(conglutination agent)", 또는 "유착 유발 물질"이란, 생체 재질의 약합을 유도하는 물질을 의미한다. 본 발명에 있어서 유착제는 염증을 유도하는 물질로서, 생체 조직에게서 염증을 유도할 수 있는 것이라면 제한 없이 이용 가능하나, 바람직하게는 고장성식염수(hypertonic saline), 요오드(iodine), 폴리도카놀(polidocanol), 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate), 리포다당류(lipopolysaccharide), 에탄올아민 올레산(ethanolamine oleate), 또는 염화 모루인산염(sodium morrhuate)이나, 더욱 바람직하게는 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate; STS), 또는 리포다당류(lipopolysaccharide; LPS)이다. 상기 LPS는 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 하부 세포 신호전달경로인 미토젠활성화단백질키나아제(mitogen-activated protein kinase; MAPK)의 활성화를 유도하며, 신호전달경로가 활성화되면 여러가지 염증성 매개 인자들이 발현됨으로써 염증 반응을 일으키는 물질로 알려져 있다. STS는 계면활성제로서 혈관의 내막에 직접적으로 영향을 줘서 혈전을 유발하는 작용이 있어, 주로 혈관질환에서 경화제로 사용되고 있다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에서 "하이드로겔(hydrogel)"이란, 물을 용매로 하여 응고되는 성질을 갖는 총체의 겔을 의미한다. 본 발명에 있어서 하이드로겔은 바람직하게는 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로스(agarose), 한천(agar), 매트릭젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 또는 젤라틴(gelatin)이고, 더욱 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 또는 젤라틴(gelatin)이나, 이에 한정하는 것은 아니다. 단일 성분으로서의 하이드로겔뿐만 아니라, 2종 이상의 하이드로겔이 중합된 것도 가능하다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에서 "염증"이란, 상해에 대한 생체조직 방어반응의 일종이다. 이러한 방어반응은

조직상해, 반응, 회복의 3단계를 거친다. 관여하는 조직은 종말혈관상이며 혈액과 결합조직에서 일어나는 일련의 변화와 같은 전형적인 예에서는 원인을 제거하면 손상조직을 수복할 수 있도록 작용한다. 상해의 원인, 정도, 수식인자, 침윤조직이 다양하기 때문에 반응 양상 또한 다양하다. 초발반응은 비만세포에서의 히스타민 방출, 혈액응고 제XII인자(하겐만 인자)의 활성화로 염증 제1상(相)(침출)즉시형(30분에서 극대)이 생긴다. 혈관 내외의 혈장성분이 활성화한 단백질 가수분해효소에 의한 연쇄반응에서 펩티드성 염증인자(시토키닌 등)를 형성하게 되고 제1상 지연반응, 제2상 세포침윤을 일으킨다. 유주세포에 의해 탐식(貪食) 및 살균 처리된 대식세포가 파괴한 조직편 등을 식작용으로 제거하여 제3상 혈관, 섬유 등의 회복과정에 들어간다. 염증인자는 펩티드성 이외에 지질성인자(프로스타글란딘, 류코트린, 혈소판 활성화인자), 활성화효소, NO 등의 자유라디칼, 세포 접착분자, 면역계, 응고인자 등이 관여한다.

[0023] 본 발명에 있어서 염증은 비루관 협착 동물 모델을 제조하기 위한 수단으로 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 스크리닝은, 본 발명에 의한 비루관 협착 동물 모델에 비루관 폐쇄 치료용 후보 물질을 투여하고, 상기 후보물질에 의하여 비루관 폐쇄가 예방되거나, 치료되거나, 대조군 물질에 비하여 예후가 증진된 경우에 후보물질을 비루관 폐쇄 예방제 또는 치료제로 결정하는 것이다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에서, (a) 유착제와 하이드로겔을 혼합하는 단계; 및, (b) (a)단계에서의 혼합물을 동물의 비루관에 주입하는 단계;를 포함하는 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법을 제공하고, 상기 유착제는 고장성식염수(hypertonic saline), 요오드(iodine), 폴리도카놀(polidocanol), 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate), 리포다당류(lipopolysaccharide), 에탄올아민 올레산(ethanolamine oleate), 염화 모루인산염(sodium morrhuate), 및 펩타이드(peptide)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 하이드로겔은 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로즈(agarose), 한천(agar), 매트리지겔(matrigel), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 및 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 혼합물 내 유착제 농도는 1×10^0 내지 $1 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$ 인 비루관 폐쇄 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 다른 구체예에서, 유착제와 혼합된 하이드로겔이 비루관에 주입된 비루관 폐쇄 동물모델을 제공하고, 상기 동물은 토끼인 비루관 폐쇄 동물모델을 제공하며, 유착제는 고장성식염수(hypertonic saline), 요오드(iodine), 폴리도카놀(polidocanol), 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate), 리포다당류(lipopolysaccharide), 에탄올아민 올레산(ethanolamine oleate), 염화 모루인산염(sodium morrhuate), 및 펩타이드(peptide)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 비루관 폐쇄 동물모델을 제공하며, 상기 하이드로겔은 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로즈(agarose), 한천(agar), 매트리지겔(matrigel), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 및 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 비루관 폐쇄 동물모델을 제공한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구체예에서, (a) 제 1항의 비루관 폐쇄 동물모델에서 비루관 역류를 측정하는 단계; (b) 상기 동물모델에 비루관 폐쇄 치료용 후보 물질을 투여하고, 비루관 역류를 재측정하는 단계; 및 (c) 상기 (a)단계에서의 측정값보다 (b)단계에서의 측정값이 낮을 경우, 상기 후보 물질을 비루관 폐쇄 치료용 물질로 판단하는 단계;를 포함하는 비루관 폐쇄 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0035] 기존의 비루관 협착 동물 모델은 비루관 폐쇄가 안정적으로 유지되지 않고, 비루관 폐쇄 치료용 약물이거나 가이더의 치료 효과를 정확하게 측정하기 전에 비루관 협착 효과가 저하되는 문제점이 있었다. 본 발명은 비루관 폐쇄가 안정적으로 유지되는 비루관 협착 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 동물 모델은 유착 유발 물질을 함유한 하이드로겔을 이용함으로써 비루관 협착 유지 효과가 장기간 지속되는 동물 모델을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 정상 개체, 유착제 투여, 또는 유착제+하이드로겔 투여한 토끼들의 비루관

협착 유도 결과를 비교한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 유착제+하이드로겔 투여한 토끼들의 비루관 내벽 염증세포 침윤을 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 정상 개체, 마찰 모델(Friction model), 또는 유착제+하이드로겔 투여한 토끼들의 비루관 협착 유도 결과를 비교한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 정상 개체, 또는 유착제+하이드로겔 투여한 토끼들의 비루관 협착 유도 결과를 비교한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 유착제+하이드로겔 투여한 토끼들의 비루관 내벽 염증세포 침윤을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 비루관 협착 동물 모델용으로 생체 내에서 이용하기에 적합한 하이드로겔 농도를 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 최적의 비루관 협착 효과를 유도하기 위한 생체 내 유착제+하이드로겔 혼합물의 주입 방법을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 유착제+하이드로겔 혼합물로부터 방출되는 유착제를 정량적으로 평가한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] **실시예 1. 유착제+하이드로겔 혼합물의 비루관 협착 효과 확인**

[0041] 비루관 협착 동물 모델을 제조하기 위해 페이스트(paste) 성상의 하이드로겔을 제작하고, 유착 유발 물질을 혼합하였다. 유착제를 단독으로 사용하는 경우와 유착제와 하이드로겔을 혼합하여 사용하는 경우의 비루관 협착 효과를 비교하기 위하여, 하기 표 1과 같이 제조예 및 비교예를 제조하였다.

표 1

[0042] 비교예 1	아무런 처치도 하지 않은 정상 개체
비교예 2	유착제만 투여
제조예 1	유착제+하이드로겔 투여(젤라틴+STS)

[0043] 보다 구체적으로, 비교예 2는 테트라데실황산나트륨(sodium tetradecyl sulfate; STS)을 30mg/mL의 농도로 준비하여 1mL씩 2주 간격으로 2번 투여하였고, 제조예 1은 10wt%의 젤라틴과 100mg/mL의 STS를 1:2의 비율로 혼합하여 STS의 농도가 40 mg/mL이 되도록 준비한 후 토끼의 코쪽을 통하여 비루관에 주입하였다. 한달 후, 조직학적 분석을 위해 토끼를 희생하였다. 사후 처치를 포함한 모든 동물실험은 연세대학교 동물실험 윤리위원회에서 제시하는 가이드라인에 준하여 실시하였다. 수득된 토끼의 비루관 조직은 횡행 절단하여 포르말린에 1주간 고정하고, 48시간 탈칼슘하고, 5mm 두께로 절단하여 파라핀 포매 후, 조직 슬라이드 제작하여 헤마톡실린&에오진 염색하였다. 상기 결과를 도 1과 도 2에 나타내었다.

[0044] 실험결과, 비루관 협착을 유도하지 않은 정상 토끼(비교예 1)는 안검 주변이 말라있고, 식염수가 비루관 역류없이 통과하였다. 유착제만 투여한 토끼(비교예 2)는 비루관 내벽의 조직학적 형태와 내부 공간의 단면 면적이 정상 토끼(비교예 1)과 유의한 차이가 없었다. 그러나 유착제와 하이드로겔을 혼합하여 주입한 토끼(제조예 1)의 경우, 비루관이 협착되어 안검 주변이 눈물로 젖어있고, 비루관 역류시험에서 식염수 일부가 역류하였다. 또한 조직학적 분석 결과, 비교예 1과 2에 비하여 비루관을 둘러싼 해면체가 현저히 감소되었고, 중한 염증세포 침윤이 발생한 것을 확인하였다. 상기의 결과로부터 본 발명의 유착제와 하이드로겔 혼합물을 이용한 비루관 협착 동물 모델이 비루관 폐쇄 효과가 현저함을 확인하였다.

[0046] **실시예 2. 종래 비루관 협착 동물 모델과의 비루관 협착 효과 비교**

[0047] 종래의 비루관 협착 동물 모델 제조는 기구 마찰(Ballooning Friction)을 반복적으로 시행하여 비루관을 폐쇄시키는 마찰 모델(Friction model)을 이용하였다. 종래의 마찰 모델과 본원발명의 유착제+하이드로겔 혼합물의 비루관 협착 효과를 비교하기 위하여, 하기 표 2과 같이 제조예 및 비교예를 제조하였다.

표 2

[0048]	비교예 1	아무런 처치도 하지 않은 정상 개체
	비교예 3	마찰 모델(Friction model)
	제조예 1	유착제+하이드로겔 투여(젤라틴+STS)

[0049] 보다 구체적으로, 비교예 3은 1주, 3주, 4주차에 기구 마찰을 반복적으로 시행하였다. 조직학적 분석을 위한 프로세스는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 상기 표 2의 비교 결과를 도 3에 나타내었다.

[0050] 실험 결과, 마찰 모델 토끼(비교예 3)는 정상 토끼(비교예 1)에 비해 약간의 비루관 내벽 비후, 및 경한 염증세포의 침윤이 관찰되었으나, 유착제와 하이드로겔을 혼합하여 주입한 토끼(제조예 1)와 같은 현저한 협착은 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이로써 본원발명의 유착제+하이드로겔 혼합물이 종래의 마찰 모델보다 비루관 협착 효과가 현저함을 알 수 있었다.

[0052] **실시예 3. 다양한 유착제+하이드로겔 혼합물의 제조, 및 비루관 협착 효과 확인**

[0053] 상기 실시예 1의 제조예 1 이외에 다른 유착제+하이드로겔 혼합물의 조합으로도 비루관 협착 효과가 있는지 확인하였다. 이를 위해, 하기 표 3과 같이 제조예 및 비교예를 제조하였다.

표 3

[0054]	비교예 1	아무런 처치도 하지 않은 정상 개체
	제조예 1	유착제+하이드로겔 투여(젤라틴+STS)
	제조예 2	유착제+하이드로겔 투여(PCL+LPS)

[0055] 보다 구체적으로, 제조예 2는 20wt%의 mPEG-PCL과 1mg/mL의 리포 다당류(Lipopolysaccharide; LPS)를 1:2의 비율로 혼합하여 LPS의 농도가 100 ug/mL이 되도록 준비하였다. 토끼 비루관에 투여 방법 및 조직학적 분석을 위한 프로세스는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 상기 표 3의 비교 결과를 도 4와 도 5에 나타내었다.

[0056] 실험결과, PCL+LPS 투여한 토끼(제조예 2)도 정상 토끼(비교예 1)와 비교해서 현저한 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이로써 다양한 조합의 유착제+하이드로겔 혼합물이 비루관 협착 동물 모델을 제조하기 위해 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0058] **실시예 4. 생체 주입을 위한 하이드로겔의 조건 평가**

[0059] 하이드로겔은 물을 용매로 하여 응고되는 성질을 갖는 젤로서 제형이 변화되는 것이므로, 비루관 협착 동물 모델용으로 생체 내에서 이용하기에 적합한 농도를 시험하였다. 이를 위해, 10 wt% 내지 20 wt%의 PEG-PCL 겔을 제조하고, 이를 60℃에서 5분간 용해하여 PEG-PCL 용액을 준비하였다. 상기 시료들을 상온, 또는 37℃에 보관한 결과, 20 wt%의 PEG-PCL 용액이 37℃에서 5분 후 응고되어 겔 형태를 나타내었다. 상기 결과를 도 6에 나타내었다. 이로써 생체 내에서 이용하기에 가장 바람직한 PEG-PCL 농도는 20 wt%임을 알 수 있었다.

[0060] 또한 최적의 비루관 협착 효과를 유도하기 위한 생체 내 주입 방법을 평가하였다. 이를 위해, FITC가 표지된 염증성 단백질(Ac-SDKP)을 25℃에서 최종 농도 75 ug/ml이 되도록 mPEG-PCL 겔과 혼합하여 준비하고, 하기 표 4와 같이 동물 개체에 투여하였다.

표 4

[0061]	제조예 3	PCL+Ac-SDKP 혼합물을 1ml씩 10회 투여
	제조예 4	PCL+Ac-SDKP 혼합물을 10ml씩 1회 투여

[0062] PCL+Ac-SDKP 혼합물 개체에 투여하고 7일 후, 생체 내 이미징 시스템 (IVIS)을 사용하여 생체 내 PCL+Ac-SDKP 혼합물을 영상화하고, 조직에 남아있는 펩타이드의 형광 강도를 IVIS 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 상

기 결과를 도 7에 나타내었다. 실험 결과, 시료를 1ml씩 10회 투여한 경우(제조예 3)보다 10ml씩 1회 투여한 경우(제조예 4)에 형광이 더 강하게 발현되어, 보다 많은 펩타이드가 방출되고 있는 것으로 분석되었다. 이것은 효과적인 비루관 협착 모델 제조를 위해서 동물 개체에 다량의 유착제를 초기 투여하는 것이 중요하다는 것을 의미한다.

[0064] **실시예 5. 유착제+하이드로겔 혼합물에서의 유착제 방출 확인**

[0065] 한 종류, 또는 두 종류 이상의 유착제를 동시에 포함하는 유착제+하이드로겔 혼합물을 제조하는 경우에 유착제들의 방출이 어느 정도로 이루어지는지 여부를 평가하였다. 이를 위해 하기 표 5와 같이 유착제+하이드로겔 혼합물을 제조하여 동물 개체에 투여하였다.

표 5

[0066]	제조예 5	콜라겐+C16 혼합물 투여
	제조예 6	콜라겐+Ac-SDKP 혼합물 투여
	제조예 7	콜라겐+C16+Ac-SDKP 혼합물 투여

[0067] 보다 구체적으로, 제조예 5와 제조예 6은 C16, 또는 Ac-SDKP 펩타이드 75 mg을 포함하는 콜라겐 겔로 준비하였고, 제조예 7은 C16, 및 Ac-SDKP 펩타이드 각 75 mg을 포함하는 콜라겐 겔로 준비하였다. 상기 시료들의 겔화 후, 겔 충전된 인공 지지체를 37℃ PBS에서 14일간 배양하면서, 1, 3, 7, 또는 14일에 고속 액체 크로마토그래피로 PBS 완충액 내로 방출된 펩타이드를 정량하였다. 이를 도 8, 표 6, 및 표 7에 나타내었다.

표 6

[0068]	C16 펩타이드 방출량	1일(환산%)	3일(환산%)	7일(환산%)	10일(환산%)
	제조예 5	42(100%)	44(100%)	49(100%)	58(100%)
	제조예 7	43(102%)	40(91%)	43(88%)	50(86%)

표 7

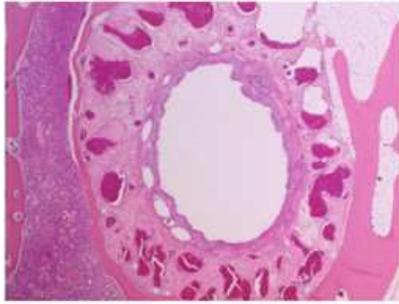
[0069]	Ac-SDKP 펩타이드 방출량	1일(환산%)	3일(환산%)	7일(환산%)	10일(환산%)
	제조예 6	30(100%)	39(100%)	45(100%)	49(100%)
	제조예 7	29(97%)	26(67%)	31(69%)	36(73%)

[0071] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

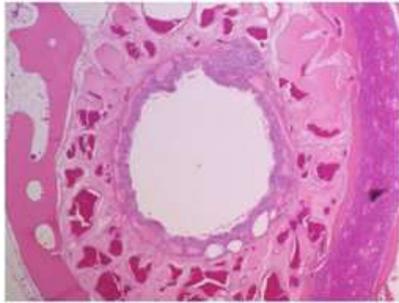
도면

도면1

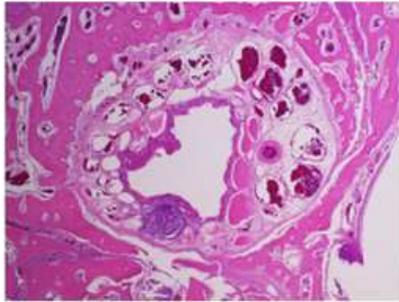
비교예 1



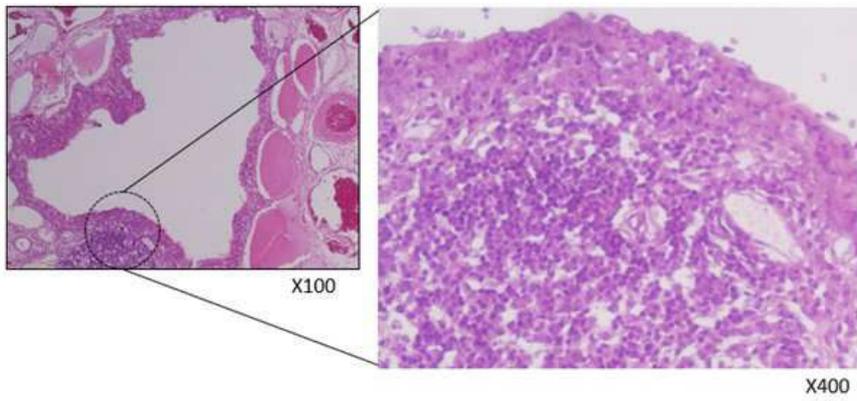
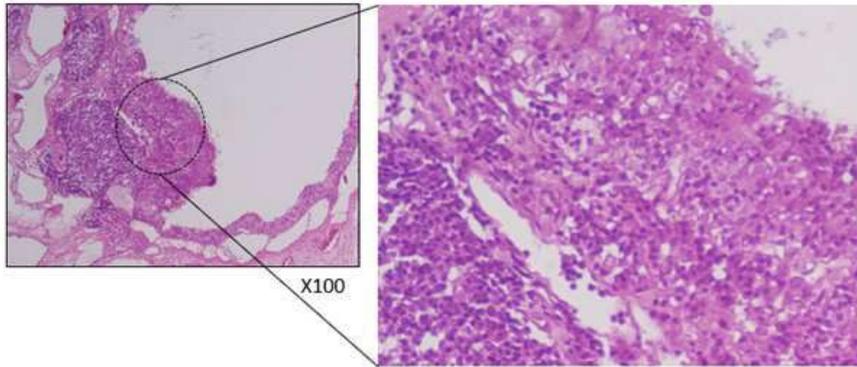
비교예 2



제조예 1

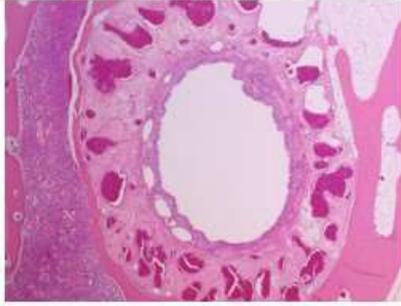


도면2

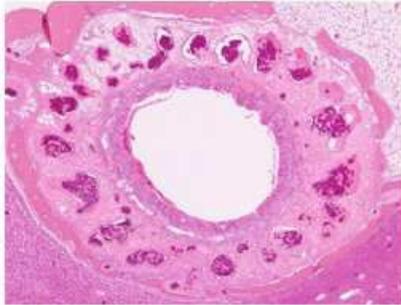


도면3

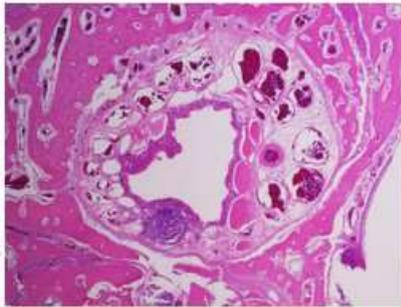
비교예 1



비교예 3

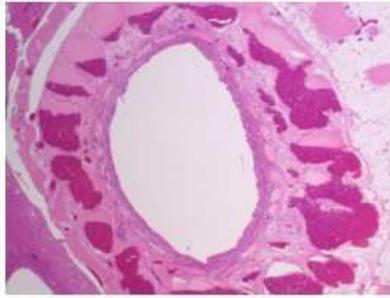


제조예 1

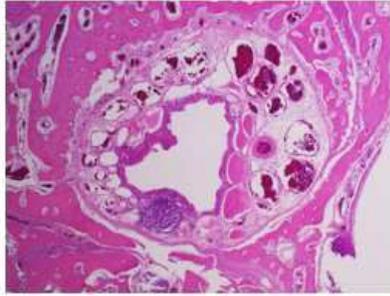


도면4

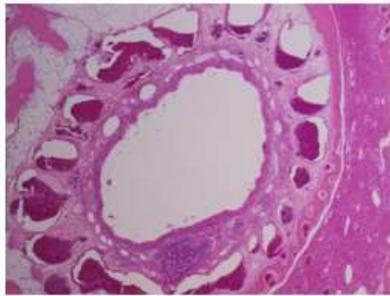
비교예 1



제조예 1

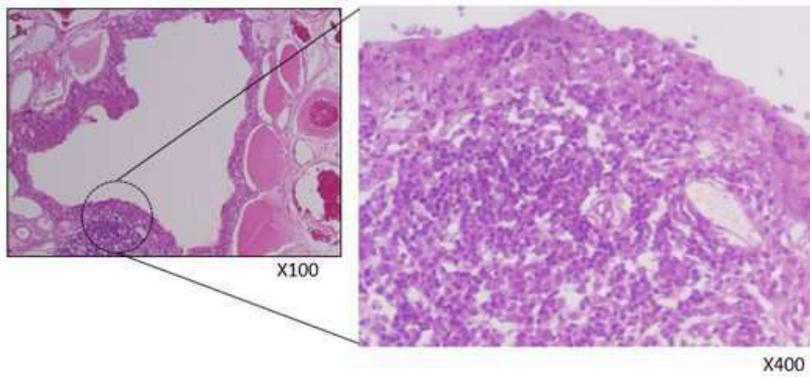


제조예 2

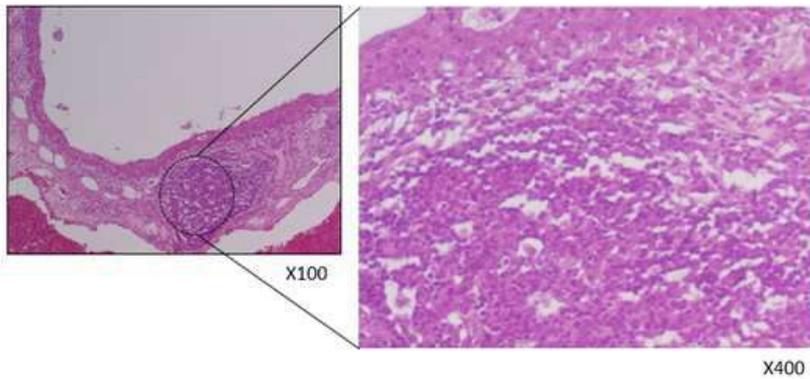


도면5

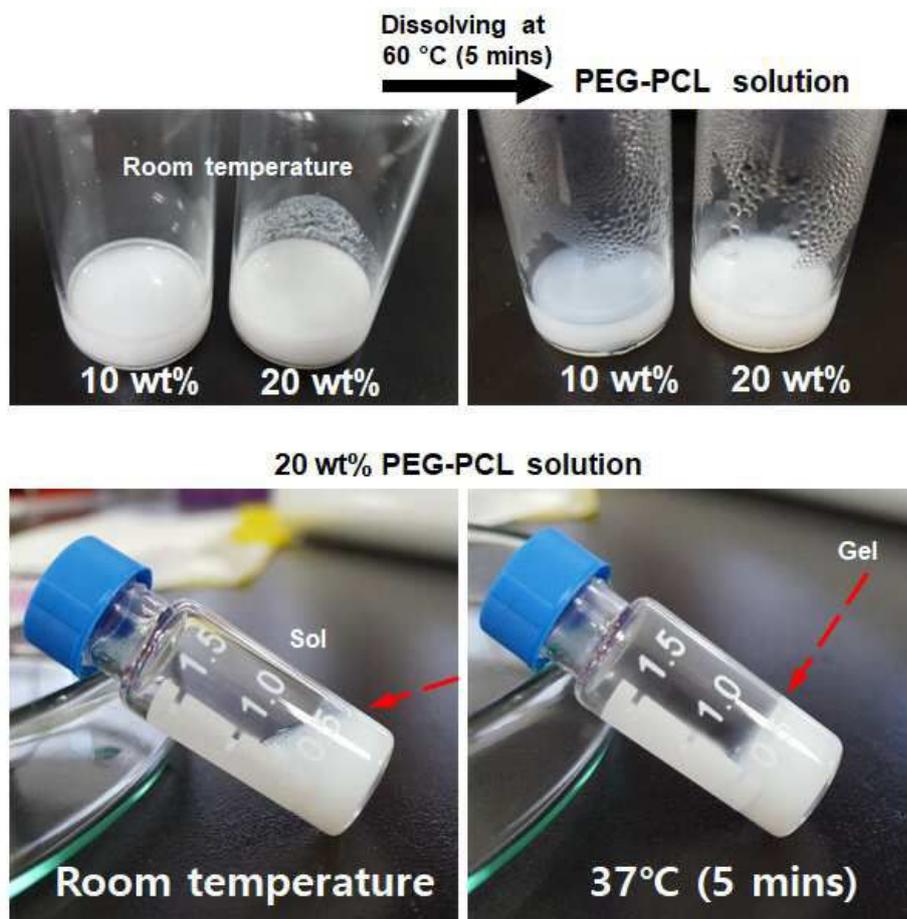
제조예 1



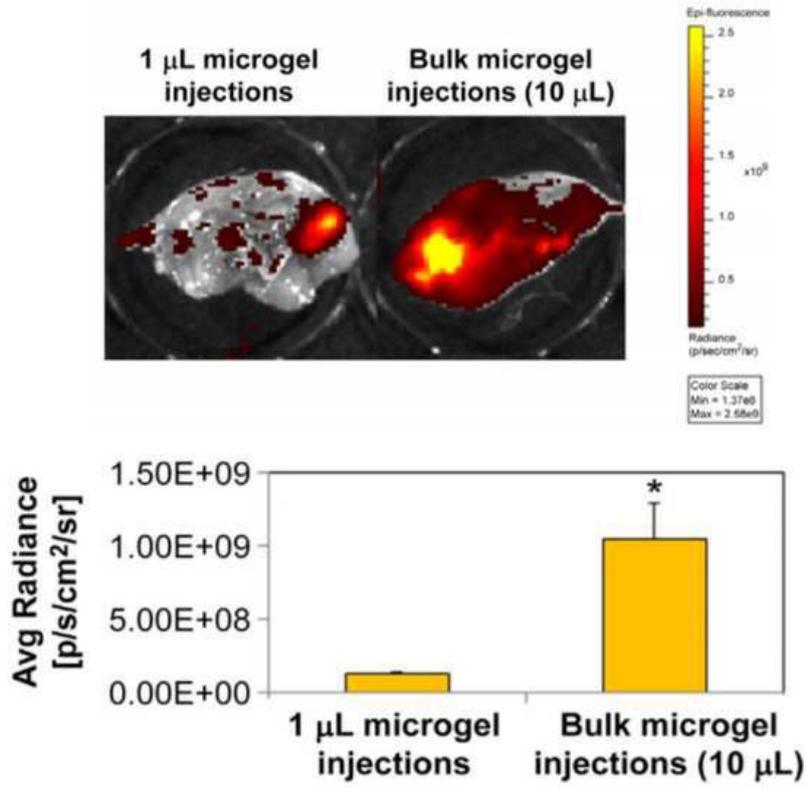
제조예 2



도면6

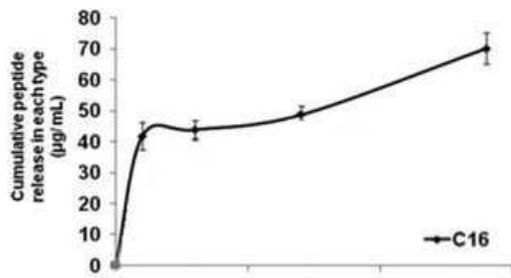


도면7

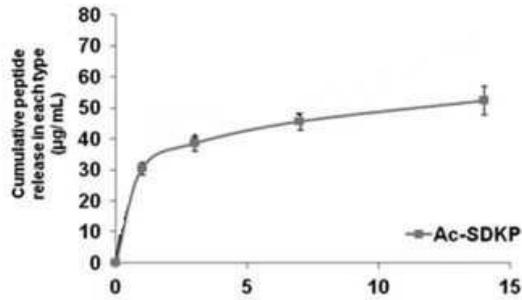


도면8

제조예 5



제조예 6



제조예 7

