



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0059308
(43) 공개일자 2018년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 31/04 (2006.01) A61L 31/06 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 31/041 (2013.01)
A61L 31/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0158729
(22) 출원일자 2016년11월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 비움텍
서울특별시 구로구 디지털로31길 19 (에이스테크노타워2,704호)
(72) 발명자
신남철
서울특별시 동작구 신대방1가길 38, 102동 1703호(신대방동, 동작상떼빌아파트)
(74) 대리인
특허법인 대아

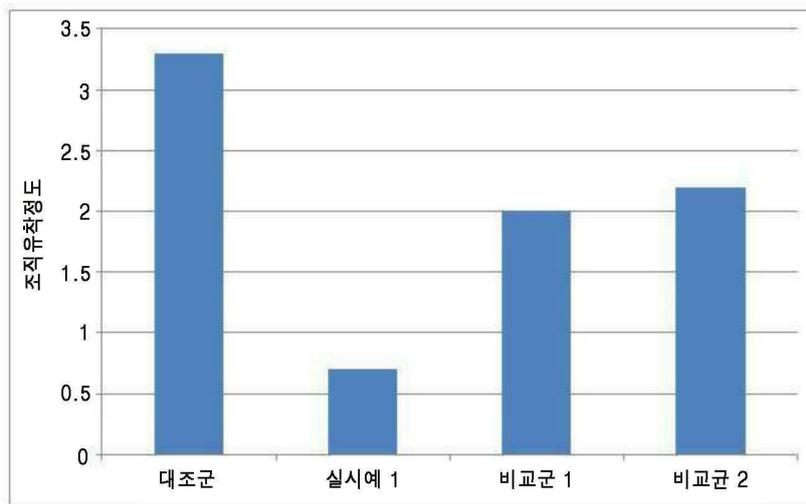
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **히알루론산 및 폴리감마글루탐산을 포함하는 유착 방지 조성물**

(57) 요약

본 발명은 히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 포함하는 유착방지용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 31/16 (2013.01)

A61L 2300/41 (2013.01)

A61L 2300/42 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 포함하는 유착방지용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 액상인 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 및 히알루로니다아제 저해제는 1: 0.005 내지 2.550의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 히알루론산 및 히알루로니다아제 저해제는 1: 0.01 내지 2.0의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 히알루로니다아제 저해제는 히알루론산의 생체 내 잔존 기간을 증가시키는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

항염증제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

항혈액응고제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 히알루로니다아제 저해제는 폴리감마글루탐산인 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상처에 적용 시 10일 이상 히알루론산이 잔존하는 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

유착 방지의 지속 시간이 증진된 것을 특징으로 하는 유착방지용 조성물.

청구항 11

히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 혼합하는 단계를 포함하는 유착방지용 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히알루론산 및 폴리감마글루탐산을 포함하는 유착 방지 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 유착(adhesion)이란 염증, 창상, 마찰, 수술 등에 의한 창상 등 상처의 치유 과정에서 섬유조직(fibrous tissue)이 과도하게 생성되거나, 혈액이 유출되어 응고하여 서로 분리되어 있어야 할 주변 장기 또는 조직이 서로 달라붙는 현상을 의미하는 것이다.

[0004] 유착은 모든 종류의 수술 후에 발생할 수 있으며, 이로 인하여 심각한 임상적 후유증이 발생할 수 있다.

[0006] 이러한 유착방지를 위한 여러 방법 중 하나로 방벽(barrier)을 사용하여 조직의 상처가 치유되는 동안 계면활성제와 유사하게 물리적인 장벽을 형성하여 인접한 조직 사이에 유착이 형성되는 것을 막아주는 유착방지재에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0008] 방벽용으로 사용되는 유착방지재는 형태상 크게 두 가지로 분류할 수 있는데, 첫째는 필름, 부직포, 스폰지형을 포함하는 막 형태의 방벽이며, 둘째는 겔 형을 포함한 용액형 방벽이다(한국등록특허 10-1624511호).

[0010] 막 형태의 유착방지 재료로는 산화재생 셀룰로오스(Oxydized-regenerated cellulose), 익스팬디드 PTFE(Expanded polyterafluoroethylene, 이하 ePTFE), 개질된 히알루론산과 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 및 화학적 가교제 등으로 구성된 필름 등이 있다.

[0012] 용액형 유착방지 재료로는 락테이트링거 용액, 텍스트란-70 용액, 헤파린 용액, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Carboxymethyl cellulose) 용액, 히알루론산 용액, 콘드로이틴설페이트(Chondroitin sulfate) 용액, 폴리에틸

렌글리콜(Polyethylene glycol) 용액, 텍스트란-70 용액, 헤파린 용액 등이 있다. 이들은 복막의 치유가 일어나는 동안에 섬유소로 덮인 표면을 서로 뜨도록 부유시키는 것이 주된 기전으로, 조직들을 서로 분리시켜 유착을 억제할 목적으로 사용했던 제제들이다.

[0014] 그러나 이러한 용해형 유착방지 재료들은 복강 내에서 흡수가 과하게 빨라 일어나 생체 내에서 오래 지속되지 못하여 효과적인 유착 방지가 어려운 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명자들의 목적은 생체 내 지속 시간이 긴 유착 방지 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 포함하는 유착방지용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 유착 방지 조성물은 생체 내 지속 시간이 증진되어 유착 방지 효능이 오래 지속되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 실시예 1 및 비교군 1 및 2의 유착 방지 효과를 보여준다.

도 2는 마우스에 실시예 1 및 비교군 1 및 2를 적용한 후 14일째 조직 내 유착 유무를 육안으로 관찰한 사진이다((a): 대조군, (b): 실시예 1, (c): 비교군 1).

도 3은 폴리감마글루탐산의 생체 내 잔존량을 보여준다.

도 4는 히알루론산 및 폴리감마글루탐산의 비율에 따른 히알루론산의 생체 내 잔존 기간의 차이를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은

[0022] 히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 포함하는 유착방지용 조성물에 대한 것이다.

[0024] 또한 본 발명은

[0025] 히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 혼합하는 단계를 포함하는 유착방지용 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.

[0027] 이하, 본 발명을 자세하게 설명한다.

[0029] 히알루로니다아제 저해제

[0030] 본 발명의 히알루로니다아제 저해제는 히알루로니다아제에 의한 히알루론산 분해를 억제하는 효능을 갖는다. 이로써 본 발명의 히알루로니다아제 저해제는 상처에 적용된 유착방지용 조성물이 체내에서 분해, 배출을 억제하여 히알루론산의 생체 내 잔존 기간을 증가시키고, 이로써 유착방지용 조성물의 지속 시간을 증진시킨다.

- [0032] 상기 히알루로디아제 저해제는 바람직하게는 폴리감마글루탐산(γ -PGA)이다. 상기 폴리감마글루탐산은 높은 점탄성과 접착력을 제공하여 수술 후 조직에서의 유착방지제의 지속력을 효과적으로 높여준다.
- [0034] 히알루론산
- [0035] 본 발명의 히알루론산은 유착 방지용 조성물에 일반적으로 사용되는 히알루론산이면 되고 특별히 제한되지 않는다.
- [0037] 유착방지용 조성물
- [0038] 본 발명은 히알루로니다아제 저해제 및 히알루론산을 포함하는 유착방지용 조성물에 대한 것이다. 상기 히알루론산 및 히알루로니다아제 저해제는 1: 0.005 내지 2.550의 중량비로 포함되며, 바람직하게는 상기 히알루론산 및 히알루로니다아제 저해제는 1: 0.01 내지 2.0의 중량비로 포함된다. 상기 범위를 유지함으로써, 유착방지용 조성물에 사용된 히알루론산의 생체 내 잔존 기간을 증가시키게 되어, 유착 효능을 증진시키게 된다.
- [0040] 본 발명의 유착방지용 조성물은 상처에 적용 시 10일 이상 히알루론산이 체내에 잔존하게 한다. 이로써 본 발명의 유착 방지의 지속 시간을 증진시킨다.
- [0042] 본 발명의 유착방지용 조성물은 액상이다. 상기 액상은, 고상을 제외한 유동성이 있는 재질을 가리키며, 겔상을 포함한다.
- [0044] 본 발명의 유착방지용 조성물은 항염증제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 항염증제는 디플루니살, 로니졸락, 로녹시카프, 록소프로펜, 메크로페남산, 메페남산, 멜록시카프, 모니플루메이트, 베노틸레이트, 브로멜라인, 살리실산 이미다졸, 세라티오렙티다제, 세레콕시브, 숄린당, 시녹시카프, 아세메타신, 아세클로페낙, 아스피린, 알미노프로펜, 암페나나트륨, 에몰파존, 에토돌락, 염산벤지다민, 염산프로파세타몰, 옥사프로진, 이부프로펜, 이부프로삼, 인도메타신, 잘토프로펜, 케토롤락, 케토프로펜, 나부메톤, 나프록센, 니메수리드, 텍사메타손, 텍시부프로펜, 디클로페낙, 피라지노부타존, 클로닉신, 탈니플루메이트, 테녹시카프, 툴메틴나트륨, 툴페남산, 티아프로펜산, 페노프로펜, 펜티아작, 펠루비프로펜, 프라노프로펜, 피록시카프, 프로제스토젠스, 플루르비프로펜, 플루페남산, 글루카메타신 및 프로글루메타신으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명의 유착방지용 조성물은 항혈액응고제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 항혈액응고제는 에녹사파린, 레피루딘, 헤파린, 저분자량 헤파린, 안크로드, 와파린 및 다나파로이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0050] <재료 및 방법>
- [0051] 실험 동물로는 마우스(Balb/C)를 사용하였다. 이들 마우스들은 (주) 오리엔트바이오로부터 공급받았으며, 온도 20±3℃, 상대습도 40-70%, 환기횟수 13-18 /hr, 조명시간 12시간 (오전 7시-오후 7시), 조도 200-300 Lux의 조건으로서 시판사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

- [0053] 마우스 생체 내 투여된 실시예 1의 조성물의 정량 분석은, 실시예 2의 조성물 내 폴리감마글루탐산에 Gd를 부착하고, ICP-MS(Inductivity Coupled Plasma Mass Spectrometer, X-series, Thermo Elemental, 한국기초과학지원 연구원 환경과학연구부)를 이용하여 정량화하여 수행하였다.
- [0055] 폴리감마글루탐산은 바이오리더스사 제품 및 휴메딕스사 제품을 구입하여 사용하였고, 히알루론산은 신평제약 제품 및 엘지생명과학 제품을 구입하여 사용하였다.
- [0057] <실시예 1>
- [0058] Bz-DTPA를 200mg/ml 농도가 되도록 클로로포름에 용해하고, 450 μ l를 분취하여 여기에 1ml TFA를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 TFA를 제거하고 1M 탄산수소나트륨 10ml를 첨가하였다. PBS버퍼 용액에서 dialysis 시킨 후 입자의 동결을 위해 초저온 냉동기를 이용하여 -80 $^{\circ}$ C의 온도에서 6시간 동안 동결 후 건조기에서 -80~-85 $^{\circ}$ C의 온도와 5 Pa의 압력을 유지하면서 48시간 이상 건조하였다. 건조된 물질을 100mg/ml 농도로 준비하고, 100mM 아세트산 나트륨에 100mg/ml 농도의 히알루론산 용액 370 μ l를 분취하여 준비된 용액과 혼합하여 약 30분간 반응시킨 후 건조하였다. 폴리감마글루탐산의 농도가 10 mg/ml인 용액 10ml에 EDC/NHS 반응시킨 후 히알루론산 용액 10ml를 본 발명의 혼합용액을 만들었다.
- [0060] <실시예 2>
- [0061] Bz-DTPA를 200 mg/ml 농도가 되도록 클로로포름에 용해하여 450 μ l를 분취하여 1 ml TFA를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 TFA를 제거하고 1M 탄산수소나트륨 10 ml를 첨가하였다. PBS 버퍼 용액에서 dialysis 시킨 후 입자의 동결을 위해 초저온 냉동기를 이용하여 -80 $^{\circ}$ C의 온도에서 6 시간 동안 동결 후 동결 건조기에서 -80 ~ -85 $^{\circ}$ C의 온도와 5 Pa의 압력을 유지하면서 48 시간 이상 건조하였다. 건조 된 물질을 100 mg/ml 농도가 되도록 준비 한 후 100 mM 아세트산 나트륨에 100 mg/ml 농도로 염화 가돌리늄을 용해한 용액 370 μ l를 분 취하여 준비된 용액에 넣고 약 30분간 반응시켰다. 반응 후 dialysis 및 건조를 수행하였다. 폴리감마글루탐산의 농도가 10 mg/ml인 용액 10 ml에 EDC/NHS 반응시킨 후 건조 된 Bz-DTPA-Gd 110 mg을 첨가 하여 폴리감마글루탐산-Bz-DTPA-Gd 합성한다. 합성 된 물질을 0.22 μ m 인 멤브레인 필터로 필터하고 dialysis 후 건조하였다.
- [0063] <비교군 1>
- [0064] 시판 유착방지제를 구입하여 사용하였다. 이는 sodium hyaluronate 100 중량부에 대하여, hydroxyethylstaarch 50 중량부, sodium chloride 85 중량부, sodium phosphate, dibasic 0.64 중량부 포함하고, 주입을 위한 정제수를 10000 중량부 포함하는 유착방지제이다.
- [0066] <비교군 2>
- [0067] 시판 유착방지제를 구입하여 사용하였다. 이는 poloxamer, 젤라틴 및 키토산을 포함하는 제품이다.
- [0069] <실험예 1> γ -PGA의 히알루로니다아제 저해능 평가
- [0070] γ -PGA의 히알루로니다아제 저해능을 평가하였다. 먼저, PGA 농도가 0.002% 내지 0.008%가 되도록 400unit/ml의 히알루로니다아제에 PGA 용액을 첨가한 후 0.4mg/ml의 히알루론산과 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 결과 IC50은 약 0.0025%로 나타났다. 반면, 0.008%의 γ -PGA 용액에서 거의 100%의 저해활성을 확인했다.
- [0072] <실험예 2>
- [0073] 상기 실시예 1, 비교군 1 및 비교군 2에 대하여 겔 잔존 시간을 평가하였다. 먼저, 상기 조성물들을 1 ml 씩 염

플에 넣고, 상온의 밀실에 보관하면서 정기적으로 하루 한번씩 겔의 잔류 부피를 확인하여, 겔 잔존 시간을 측정하였다. 이 때, 앰플에 남은 겔이 육안으로 보이지 않을 때까지의 시간을 겔 잔존 시간으로 정하였다.

[0075] 그 결과, 실시예 1의 조성물이 비교군 1 및 2에 비하여 더 오래 남아 있는 것이 확인되었다. 그러므로 γ -PGA의 히알루로니다아제 저해능에 의하여, 겔의 분해가 억제되고 지속력이 증가되는 것으로 판단되었다(표 1).

표 1

	실시예	비교군 1	비교군 2
겔 잔존 시간(일)	14	8	6

[0079] <실험예 3> 유착 방지 효능

[0080] 동물 시험을 통하여 본 발명의 유착방지제 조성물의 유착 방지 효능을 평가하였다.

[0082] 먼저, 마우스를 개복하고, 1 x 1cm 크기의 장막 표면을 출혈이 일어날 정도로 손상을 가하였다. 그리고 손상 부위에 실시예 1, 비교군 1 및 비교군 2의 조성물들을 각각 1 ml씩 균일하게 도포한 후 피부층을 연속 봉합하였다. 그리고 대조군으로는 유착방지를 위한 시료를 아무 것도 처리하지 않은 군을 이용하였다.

[0084] 수술 14일 경과 후, 조직의 유착 정도를 육안으로 평가하였다. 그리고, 유착 정도를 0 내지 3.5 사이의 숫자로 나타내었다. (0: 유착이 없음; 1: 손상 부위의 30% 정도로 유착이 이루어짐, 2: 손상 부위의 50% 정도로 유착이 이루어짐, 3: 손상부위의 70% 정도로 유착이 이루어짐). 그 결과, 실시예 1의 조성물은 비교군 1 및 2보다 유착 방지 효능이 우수한 것으로 나타났다(도 1 및 도 2, (a): 대조군, (b): 실시예 1, (c): 비교군 1).

[0086] <실험예 4> 유착 형성 방지 후 생체 흡수 및 배출 시험

[0087] 실시예 2의 조성물을 근육주사 투여 방법을 이용하여 마우스에 투입하였다(시간 별로 3마리 씩 총 15마리 이용). 그리고 투입 후, 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후에 실시예 2의 조성물의 생체 내 장기 별 분포를 분석함으로써, 체내에서의 대사거동을 분석하였다. 이 때, 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후 마우스로부터 장기(간, 비장, 폐, 신장)를 적출하고, 이를 건조하여, ICP-MS를 이용하여 조성물에 사용된 폴리감마글루탐산의 분포를 분석하였다.

[0089] 근육주사 전 폴리감마글루탐산에 부착된 Gd의 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정한 결과 약 24 %의 부착율을 확인하였다. 이를 기초로, 근육주사에 시간에 따른 각 장기에 분포하는 폴리감마글루탐산의 양을 정량화 할 수 있었다.

[0091] 그 결과, 마우스들에서 일반 중독 증상이 관찰되지 않았으며, 모든 장기들에서도 이상 소견은 발견되지 않았다.

[0093] 한편, 근육주사를 통하여 마우스내에 도입된 폴리감마글루탐산은 초기에 대부분이 간에 축적되었으며, 2주 동안 관찰결과, 시간에 따라 간에 축적된 양이 점점 감소하는 경향을 보였다. 비장과 폐에서도 비슷한 경향이 관찰되었다(도 3).

[0095] 그러므로 근육주사를 통하여 마우스에 도입된 폴리감마글루탐산이 시간에 따라, 신장을 통하여 배출되는 꾸준히

배출되는 것을 ICP-MS를 통하여 확인할 수 있었으며, 시간에 따라서 배출되는 양이 점점 감소되는 경향을 통하여, 체내의 간, 비장, 폐 등에 축적되었던 폴리감마글루탐산이 생체 내의 대사작용이나 분해에 의해 신장을 통하여 배출된다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 투여한 폴리감마글루탐산이 체내 대사 작용에 의하여 분해되거나 체외로 배출되는 것을 의미한다.

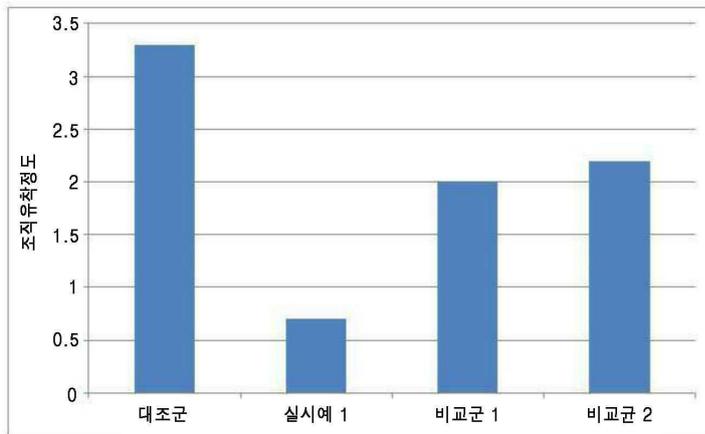
[0097] <실험예 5> 폴리감마글루탐산의 농도에 따른 히알루론산 잔존능 평가

[0098] 유착 억제 조성물 내 폴리감마글루탐산와 히알루론산의 비율(중량%에 따른 중량비)에 따른 히알루론산의 잔존능을 평가하였다. 이 때, 생체(37 °C) 모의 환경에 시료들을 도포하여 Hemo-Vac 흡입을 통한 시료의 잔존량을 평가하였다. 시료의 잔존량은 색소를 적용하여 흡광도 측정을 통하여 측정하였다(Elisa 흡광도 분석기).

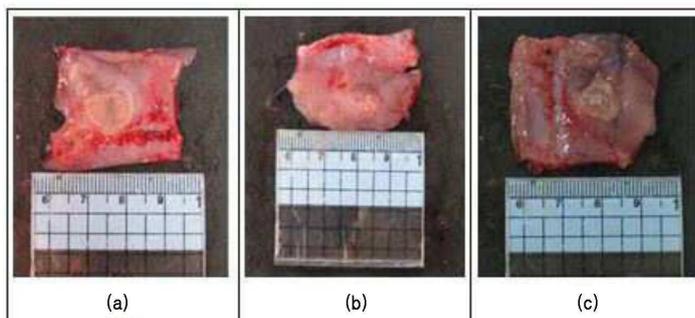
[0100] 그 결과, 히알루론산 0.50 중량% 내지 1.00 중량%, 폴리감마글루탐산 0.01 내지 1 중량%에서 히알루론산이 특히 오래 유지되는 것이 확인되었다(도 4, HA: 히알루론산, γ -PGA: 폴리감마글루탐산).

도면

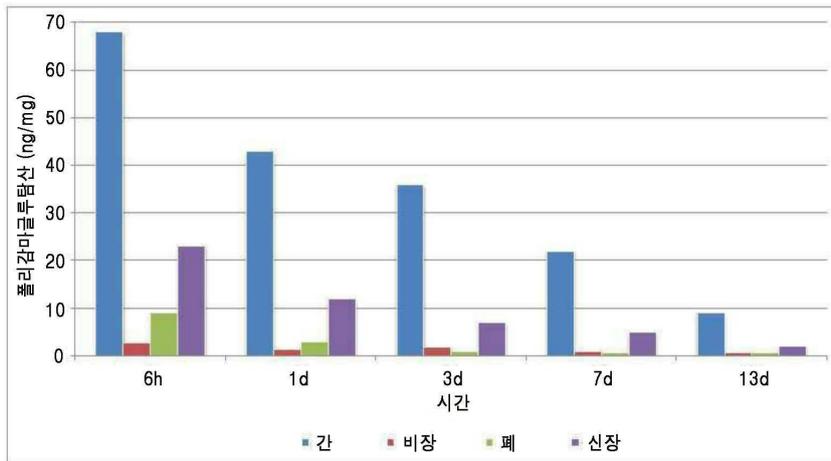
도면1



도면2



도면3



도면4

