



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0126533  
(43) 공개일자 2009년12월09일

(51) Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0052671

(22) 출원일자 2008년06월04일

심사청구일자 2008년06월04일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

최성곤

대구광역시 달서구 대곡동 1028 48/7

삼성래미안2차 203-204

학교법인 선목학원

대구 중구 남산3동 225-1

(72) 발명자

박관규

대구광역시 수성구 범물2동 송정타운 105동 701호

박지현

대구광역시 수성구 파동 327-1번지 가든빌라 가동 302호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

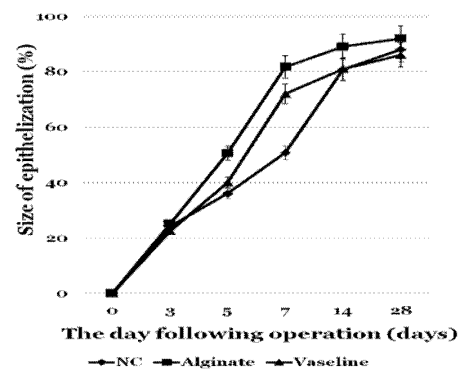
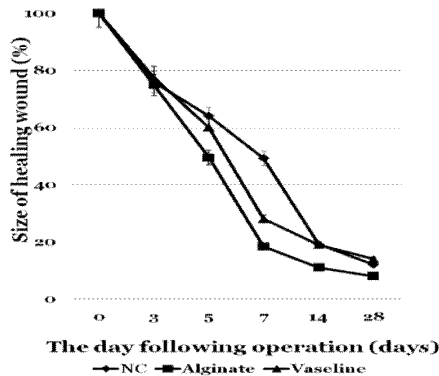
전체 청구항 수 : 총 3 항

#### (54) 창상 치료용 알진 조성물

#### (57) 요약

본 발명은 창상 치료에 효과적인 알진 함유 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 알진 드레싱에 관한 것으로, 본 발명에 따른 알진 드레싱은 창상 부위에 적용하였을 경우 창상의 크기를 시간이 지날수록 감소 시키, 창상의 상피화율을 높이며, TGF- $\beta$  1, 피브로넥틴 및 VEGF의 발현양이 현저히 감소시키는 반면 콜라겐-I의 발현양은 증가시킴으로써 창상 치료에 뛰어난 효과가 있다.

#### 대표도 - 도1



(72) 발명자

**이우람**

경상남도 창원군 부곡면 부곡리 155번지

**박대환**

대구광역시 수성구 범어동 유림노르웨이숲 108동  
303호

**채미현**

대구광역시 수성구 만촌동 메트로팰레스 306동  
1402호

**서승혁**

대구광역시 수성구 황금1동 롯데골드아파트 1419동  
401호

**정승원**

대구광역시 북구 침산남로 226 침산코오롱하늘채  
212동 705호

**최성곤**

대구광역시 달서구 대곡동 1028 48/7 삼성래미안  
2차 203-204

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008560

부처명 산업자원부

연구사업명 지방기술혁신사업

연구과제명 피부노화방지 및 치료용 알진 제품 개발

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2007년 7월 1일 ~ 2008년 6월 30일

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

미역으로부터 알긴산을 추출하는 단계;

상기에서 수득한 알긴산을 물에 녹인 후 탈색하는 단계;

상기에서 탈색된 알긴산 용액의 pH를 2-3으로 조정한 다음 침전시켜 알긴산 겔을 수득하는 단계;

수득한 겔에 에탄올을 첨가하고 교반하면서 pH를 중성으로 조정하는 단계; 및

상기 알긴산 겔을 원심 분리 후, 침전된 알긴산 겔을 냉동, 건조시켜 분말화하는 단계

로 이루어진 방법으로 제조된 창상 치료 활성을 갖는 알긴 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알긴 조성물을 1M HCl용액에 첨가한 후 열처리하는 단단계; 상기 알긴 조성물 용액을 pH 7.0으로 보정 후 활성탄을 첨가하여 교반한 후, 여과하는 단계; 및 여과된 알긴 조성물에 에탄올을 첨가하여 원심분리 침전물을 회수하여 추출하는 단계로 추가 처리하여 얻어진 것을 특징으로 하는 창상 치료 활성을 갖는 알긴 조성물.

### 청구항 3

제1항에 따른 창상 치료 활성을 갖는 알긴 조성물로 냉동 건조된 원판의 드레싱을 제작한 후 E.O (Ethylene Oxide) 가스로 멸균 처리하여 제조된 창상 치료용 드레싱.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

- <1> 본 발명은 창상 치료용 알긴 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 창상 치료에 효과적인 알진을 함유한 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 알긴 드레싱에 관한 것이다.

#### 배경기술

- <2> 창상은 해부학적으로 조직의 연속성이 파괴된 것을 의미하며 손상에 따른 창상 치유의 결과로 반흔이 형성된다. 창상 및 화상에 의해 유발되는 광범위한 피부 결손의 경우 신속하고 효과적인 치료가 요구되며 피부 이식의 치료 방법이 이용된다.
- <3> 피부의 창상치유는 파괴된 조직의 회복이라는 생물학적인 과정을 의미하며 기질침착(matrix deposition), 상피화(epithelialization)와 구축(contraction)과 같은 3가지의 기초적인 기전에 의해서 치유된다. 이 기전들은 각각 창상의 종류에 따라 다양하게 일어나며 반흔을 형성하거나 조직의 재생을 유도하지만, 재생보다는 반흔을 형성함으로써 복원되는 것이 일반적이다. 따라서 반흔 형성이 최소화되면서 빠른 창상 치유속도를 유지하는 것이 가장 이상적인 창상 치료라 할 수 있다. 지금까지 개발된 창상 치료제는 광범위한 창상 및 화상으로 인한 피부 결손의 치료에 있어 효과가 만족스럽지 못하며 부작용 및 한계가 있다. 따라서 보다 효과적이고 우수한 창상치료제의 개발이 요구된다.
- <4> 알긴(alginate)은 인체친화성인 강한 천연소재로서 갈색해조류의 세포벽을 이루는 성분이며 만누론산(mannuronic acid)과 글루론산(guluronic acid)의 블록으로 이루어진 이형다당류이다. 최근에 창상치유를 촉진하고 조직재생을 활성화하는 여러 가지 드레싱 재료 및 물질이 소개되고 있는데 그 중 알진은 무독성, 점성용액 및 겔을 형성하는 물성과 더불어서 조직 내에 이식되었을 때 염증의 정도가 미약하고 조직세포의 접근, 부착, 함입 및 성장을 촉진할 뿐만 아니라 알진에 의해 생성이 촉진된 세포들은 그 표현형이 잘 유지되어 조직재생을 위한 이식물질로서의 가능성이 보인다. 이러한 알진은 무독성과 점성용액 및 겔을 형성하는 기계적 성질로 인해 피부의 보습효과를 나타내어 창상치유를 촉진시킨다. 또한 혈액응고의 전구물질로 작용하여 지혈작용을 한다.
- <5> 종래 알진을 창상에 적용한 기술로서, 대한민국 특허출원 제10-1996-7001623호 "알기네이트 창상 드레싱"에 만

누로네이트의 함량이 50% 내지 80%이고, 분자량이 7000 내지 40000이며, 일가이온 대 이가이온의 함량비가 10 내지 30대 70 내지 90으로 특정화된 알기네이트를 함유하는 창상 드레싱이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-1994-0023549호 "창상 이식제"에 알지네이트 유도체를 포함하는 창상 이식제가 개시되어 있으며, 대한민국 특허출원 제10-2004-0000989호 "창상피복용 드레싱제"에 섬유상 흡수층에 소디움알지네이트를 함유하는 창상피복용 드레싱제가 개시되어 있다.

- <6> 하지만 상기의 문헌들은 흡수도에 중점을 두어 드레싱제 개발에 목적을 두고 있으나 알진의 창상과 관련된 분자생물학적 활성인 사이토카인들 [transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1), fibronectin, vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen-I]의 발현양 감소를 확인한 바 없다.
- <7> 본 발명자들은 창상부위의 치료와 반흔 형성의 최소화를 위한 효과적인 창상 드레싱 소재를 알아보기 위해 예의 연구를 거듭한 결과 천연소재인 알진의 상기와 같은 특징에 착안하여 창상에 대한 분자생물학적 활성을 확인함으로써 본 발명에 이르게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <8> 따라서 본 발명의 목적은 창상 치료에 효과적인 알진을 함유한 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 알진 드레싱을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

- <9> 상기와 같은 본 발명의 목적은 알진 조성물 및 이를 함유하는 알진 드레싱을 제조한 후, 이를 흰쥐의 창상모델에 적용하여 시간 경과에 따른 창상의 크기 및 창상의 상피화율을 조사하고, TGF- $\beta$ 1, 피브로넥틴, VEGF 및 콜라겐-I의 발현량을 확인함으로써 달성하였다.
- <10> 본 발명은 창상 치료 활성을 갖는 알진 조성물을 제공한다.
- <11> 본 발명에 따른 알진 조성물은 미역으로부터 알진산을 추출하는 단계; 상기에서 수득한 알진산을 물에 녹인 후 탈색하는 단계; 상기에서 탈색된 알진산 용액의 pH를 2-3으로 조정한 다음 침전시켜 알진산 겔을 수득하는 단계; 수득한 겔에 에탄올을 첨가하고 교반하면서 pH를 중성으로 조정하는 단계; 및 상기 알진산 겔을 원심 분리 후, 침전된 알진산 겔을 냉동, 건조시켜 분말화하는 단계로 이루어진 방법으로 제조된다.
- <12> 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 알진 조성물은, 건조된 미역을 분쇄하여 0.025%  $H_2SO_4$  용액에 1시간 침전 후 물로 세척하는 단계; 상기 용액에 5%  $Na_2CO_3$  용액을 첨가한 후 열처리 하는 단계; 상기 용액에 물을 첨가하고 교반한 후 알진산을 추출하는 단계; 상기에서 분리한 상등액에 에탄올을 첨가하여 알진산을 수득하는 단계; 상기에서 수득한 알진산을 물에 녹여 0.05% NaOCl을 첨가하여 탈색하는 단계; 상기에서 탈색된 알진산 용액의 pH를 2-3으로 조정한 다음 침전시켜 알진산 겔을 수득하는 단계; 수득한 겔에 에탄올을 첨가하고 교반하면서 pH를 중성으로 조정하는 단계; 상기 알진산 겔을 에탄올로 세척하고 원심 분리 후 침전된 알진산 겔을 냉동, 건조시켜 분말화하는 단계로 이루어진 방법에 의해 제조된다.
- <13> 상기에서 제조된 알진산 조성물 분말은 경우에 따라 이온물질을 제거하기 위해 알진산 분말을 물에 녹인 다음 투석하여 에탄올로 재침전하여 냉동, 건조 후 사용할 수 있다.
- <14> 특히 저분자 알진 조성물을 제조하기 위해 산가수분해, 열처리 방법을 이용할 수 있다. 이를 위하여 알진 조성물을 1M HCl용액에 0.5% W/V의 농도로 첨가한 후 1시간 30분 내지 3시간 동안 121℃에서 열처리한다. 알진산 용액을 pH 7.0으로 보정 후 활성탄을 0.2% 첨가하여 12시간 교반한 뒤 기공크기 0.2  $\mu m$ 의 반투막 여과기를 이용하여 2-3번 여과한다. 이들 여과된 알진 조성물의 2배량의 에탄올을 첨가하여 원심분리 침전물을 회수하여 추출하여 최종 알진 조성물을 얻을 수 있다.
- <15> 또한 본 발명은 상기 알진 조성물을 유효 성분으로 함유하는 창상 치료용 드레싱을 제공한다.
- <16> 본 발명에 따른 드레싱은 알진산 조성물을 사용하여 냉동 건조된 원판의 드레싱으로 제작하여 사용할 수 있다. 이는 실제 실험에 있어서 겔 상태의 알진산은 전층결손부위에서 부착 및 유지가 어려운 관계로 냉동 건조된 원판의 드레싱을 제작한 후 E.O (Ethylene Oxide) 가스로 멸균 처리하여 사용한다.
- <17> 상기와 같은 본 발명의 창상 치료용 알진 드레싱의 창상부위의 치료 효과 및 반흔 형성의 최소화 여부를 알아보

기 위해 흰쥐의 창상모델에 처리하고, 창상 모델로부터 창상치유와 관련된 사이토카인[transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1), fibronectin, vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen-I]의 발현양을 확인한 결과, 반흔 형성과 구축에 중요한 성장인자인 TGF- $\beta$ 1, 피브로넥틴과 반흔 형성과정에서 중요한 과정인 신생혈관 생성인자인 VEGF 발현양의 감소 및 창상 치유과정에서 상피화 관련 사이토카인인 콜라겐-I 발현양의 증가함을 확인함으로써 창상부위의 치료 및 반흔의 형성을 최소화할 뿐만 아니라 알진이 새로운 드레싱 소재로서 이용가치가 있을 것으로 예상된다.

## 효 과

<18> 본 발명에 따른 알진 드레싱은 창상 부위에 적용하였을 경우 창상의 크기를 시간이 지날수록 감소시키, 창상의 상피화율을 높이며, TGF- $\beta$ 1, 피브로넥틴 및 VEGF의 발현양이 현저히 감소시키는 반면 콜라겐-I의 발현양은 증가시키므로써 창상 치료에 뛰어난 효과가 있어, 본 발명은 의약산업에 있어 매우 유용한 발명인 것이다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> 이하 본 발명의 바람직한 실시형태를 하기의 실시예를 참고로 보다 상세하게 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### <20> 실시예 1 : 알진 조성물의 제조

<21> 부산시 기장군 유래의 건조된 미역의 건량을 측정한 후 작은 입자로 분쇄하여 0.025% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 1시간 침전 후 물로 여러번 세척하였다. 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가한 후 60℃에서 3시간 동안 열처리 후 다시 3배량의 물을 첨가하고 알진산의 추출을 위해 12시간 교반하였다. 교반 후 원심 분리한 상등액에 동량의 에탄올을 첨가하고 얻어진 알진산을 물에 녹여 0.05% NaOCl을 첨가하여 탈색하였다. 알진산 용액의 pH를 2-3으로 조정하여 다음 침전된 겔을 얻었다. 다음으로 50% 에탄올을 첨가하여 12시간 동안 교반하면서 pH를 중성으로 조정하고, 이들 겔을 60%와 90% 에탄올을 사용하여 세척하고 원심 분리 후 침전된 알진산 겔을 냉동, 건조시켜 분말화하였다.

<22> 경우에 따라 이온물질을 제거하기 위해 알진산 분말을 물에 녹인 다음 투석하여 에탄올로 재침전하여 냉동, 건조 후 사용하였다. 특히 저분자 알진산을 만들기 위해 산가수분해, 열처리 방법을 이용하였다. 알진산은 1M HCl 용액에 0.5% W/V의 농도를 첨가한 후 1시간 30분에서 3시간 동안 121℃에서 열처리하였다. 알진산 용액을 pH 7.0으로 보정 후 활성탄을 0.2% 첨가하여 12시간 교반한 뒤 기공크기 0.2  $\mu$ m의 반투막 여과기를 이용하여 2-3번 여과하였다. 이들 여과된 알진산의 2배량의 에탄올을 첨가하여 원심분리 침전물을 회수하여 최종 추출하였다.

### <23> 실시예 2 : 알진 조성물을 이용한 알진 드레싱의 제조

<24> 동물실험에 사용된 알진 드레싱은 냉동 건조된 원판의 드레싱을 제작하여 사용하였다. 이는 실제 실험에 있어서 겔 상태의 알진산은 전층결손부위에서 부착 및 유지가 어려운 관계로 냉동 건조된 원판의 드레싱을 제작한 후 E.O (Ethylene Oxide) 가스로 멸균 처리하여 사용하였다.

### <25> 실험예 1 : 알진 드레싱을 이용한 창상 치유 효과

<26> 실험동물로는 8주된 스프라귀-다우리종 수컷흰쥐를 샘타코(주)에서 구입하였으며 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 창상 모델은 흰쥐의 등에 직경 2cm의 원형의 피부전층창상을 제작하여 각 창상에 적용한 드레싱 재료에 따라서 C군(무처리군), V군(대조군, 바셀린처리군), A군(알진처리군)로 나누었으며 시술 후 모든 창상이 치유될 때까지 필요시 수시로 드레싱을 하였다.

<27> 창상 시술 후 1, 3, 5, 7, 14, 28, 40일째 창상의 테두리를 멸균처리한 투명한 필름에 그린 후 컴퓨터 스캔과 영상 분석장치(NIH image analysis system, Bio-optics Co. USA)를 이용하여 창상 치유율과 창상 상피화율을 구하였다.

<28> 도 1에 도시한 바와 같이, 흰쥐의 창상모델에서 창상 치유율과 상피화율을 확인한 결과는, 창상부위는 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 알진 처리군에서 창상 부위의 크기가 시간이 지날수록 작아짐을 확인하였고(좌), 창상의 상피화를 역시 알진 처리군에서 더 높아짐을 확인하였다 (우).

<29> 창상 시술 후 1, 3, 5, 7, 14, 28, 40일째 적출한 창상조직은 흰쥐의 조직학적인 평가를 위하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매한 후 6  $\mu$ m 두께로 잘라 헤마톡실린에오진 염색(H&E stain)을 통해 재상피화 및 혈관생성의 정도를 확인하였다.

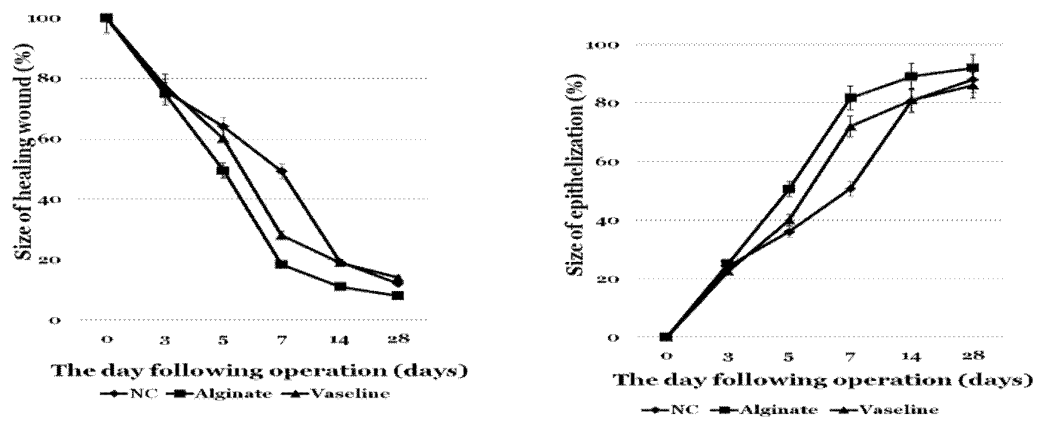
- <30> 3가지 실험군 (무처리군, 대조군, 알진 처리군)에서 창상부위의 패틴, 치유 및 반흔의 크기를 도 2에 나타내었다. 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 알진 처리군에서는 창상부위가 시간일 지날수록 더 빨리 치유가 되는 것을 확인할 수 있었다.
- <31> 흰쥐의 창상모델에서 일수 별로 적출한 창상조직은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 단백질을 분리한 후 반흔 형성에 중요하게 관여하는 염증관련 cytokine인 TGF- $\beta$ 1의 발현양을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이 알진 처리군에서 TGF- $\beta$ 1의 발현양은 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 감소함을 확인하였다.
- <32> 흰쥐의 창상모델에서 일수 별로 적출한 창상조직은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 단백질을 분리한 후 반흔형성 및 구축에 관여하는 사이토카인인 피브로넥틴의 발현양을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 알진 처리군에서 피브로넥틴의 발현양이 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 현저히 감소함을 확인하였다.
- <33> 흰쥐의 창상모델에서 일수 별로 적출한 창상조직은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 단백질을 분리한 후 반흔 형성과정에서 매우 중요한 과정 중 신생혈관을 생성하는 인자인 VEGF의 발현양을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 알진 처리군에서 VEGF의 발현양은 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 감소함을 확인하였다.
- <34> 흰쥐의 창상모델에서 일수 별로 적출한 창상조직은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 단백질을 분리한 후 창상 치유과정에서 피부의 재 상피화를 유발하는 콜라겐-I의 발현양을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이 알진 처리군에서 콜라겐-I의 발현양은 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 증가함을 확인하였다.
- <35> 흰쥐의 창상모델에서 시술 5일째 적출한 창상조직은 면역조직화학염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 도 7 내지 9에서 보는 바와 같이 TGF- $\beta$ 1, 피브로넥틴, VEGF의 발현양이 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 현저히 감소함을 확인하였다.
- <36> 흰쥐의 창상모델에서 시술 5일째 적출한 창상조직은 면역조직화학염색을 한후 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 도 10에 나타낸 바와 같이 콜라겐-I의 발현양이 무처리군과 대조군(바셀린 처리군)보다 증가함을 확인하였다.

### 도면의 간단한 설명

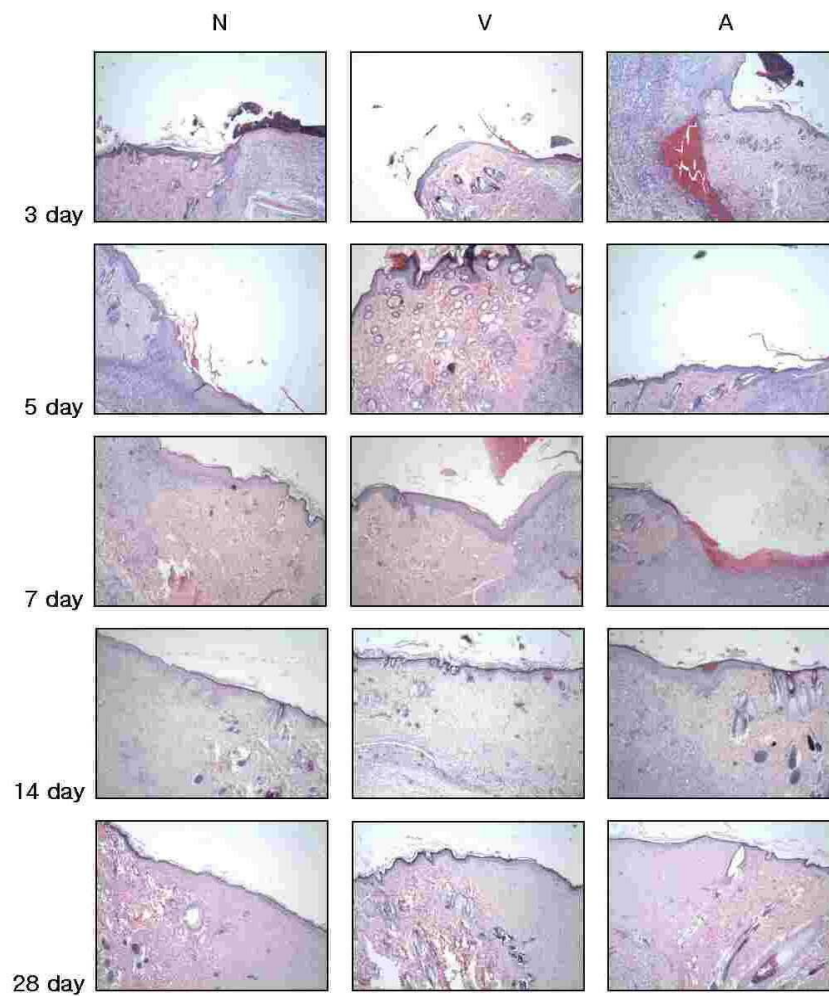
- <37> 도 1은 흰쥐의 창상모델에서 창상 부위의 창상 치유율(좌)과 창상 상피화율(우)을 나타낸 그래프이다.
- <38> 도 2는 흰쥐의 창상모델에서 창상부위의 헤마톡실린과 에로신(hematoxylin & eosin) 염색.( $\times 40$ , N; 무처리군, V; 대조군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 사진이다.
- <39> 도 3은 흰쥐의 창상모델에서 알진에 의한 TGF- $\beta$ 1 발현양 확인(N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 그래프이다.
- <40> 도 4는 흰쥐의 창상모델에서 알진에 의한 피브로넥틴의 발현양 확인(N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 그래프이다
- <41> 도 5는 흰쥐의 창상모델에서 알진에 의한 VEGF의 발현양 확인(N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 그래프이다.
- <42> 도 6은 흰쥐의 창상모델에서 알진에 의한 콜라겐-I의 발현양 확인(N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 그래프이다.
- <43> 도 7은 흰쥐의 창상모델에서 창상부위의 면역조직화학염색에 의한 TGF- $\beta$ 1 발현양 확인 (N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 사진이다.
- <44> 도 8은 흰쥐의 창상모델에서 창상부위의 면역조직화학염색에 의한 피브로넥틴 발현양 확인 (N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 사진이다.
- <45> 도 9는 흰쥐의 창상모델에서 창상부위의 면역조직화학염색에 의한 VEGF 발현양 확인 (N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군) 결과를 나타낸 사진이다.
- <46> 도 10은 흰쥐의 창상모델에서 창상부위의 면역조직화학염색에 의한 콜라겐-I 발현양 확인 (N; 무처리군, V; 바셀린 처리군, A; 알진 처리군)결과를 나타낸 사진이다.

도면

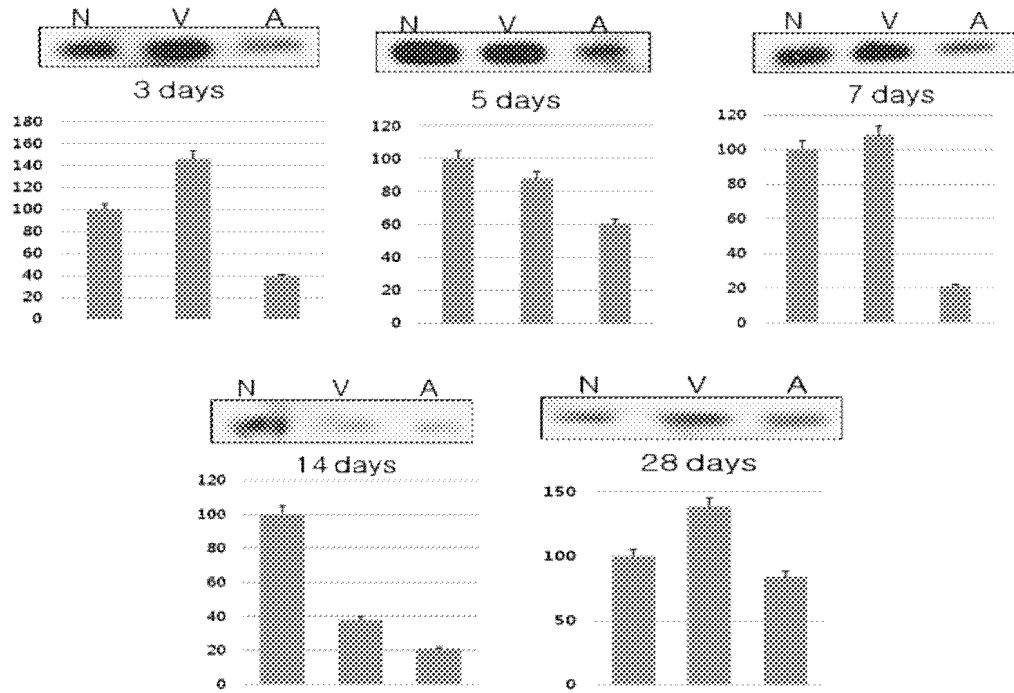
도면1



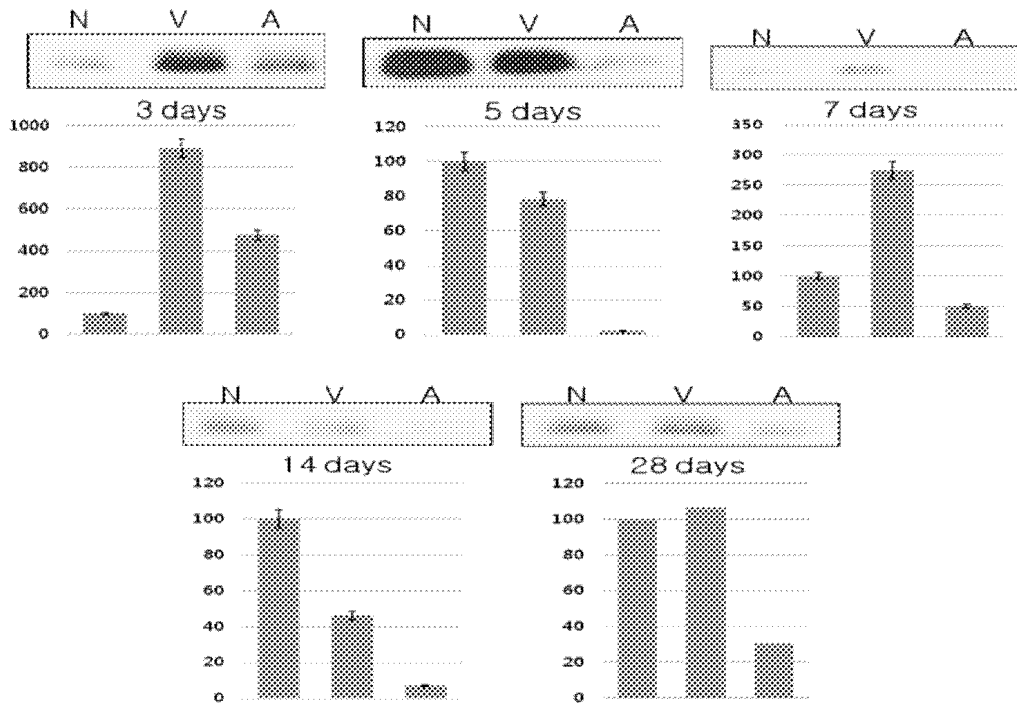
도면2



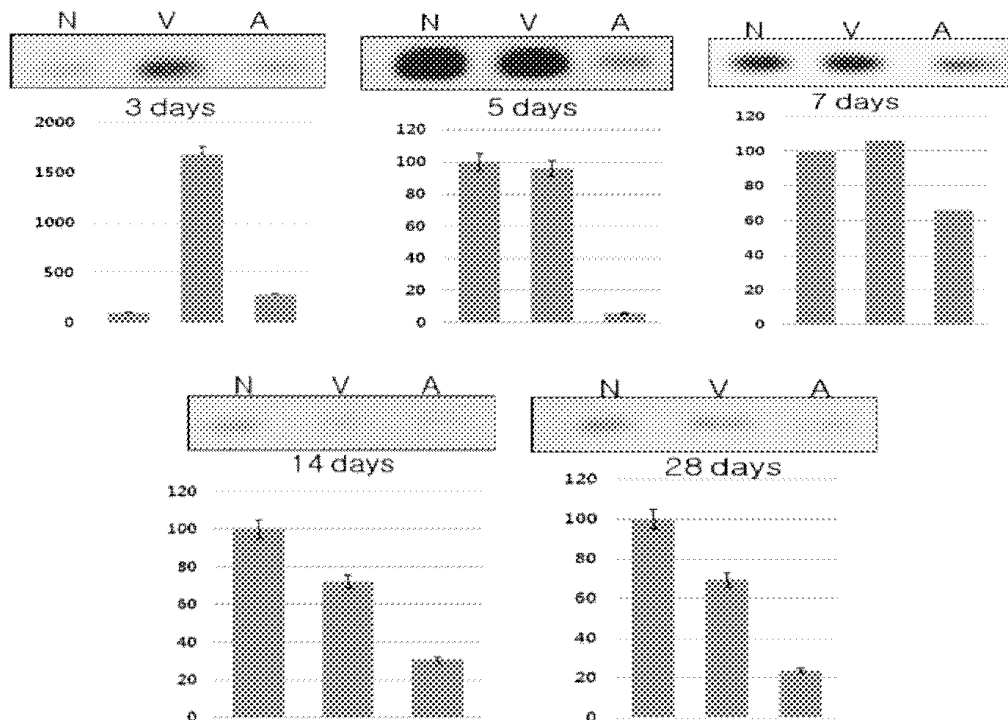
도면3



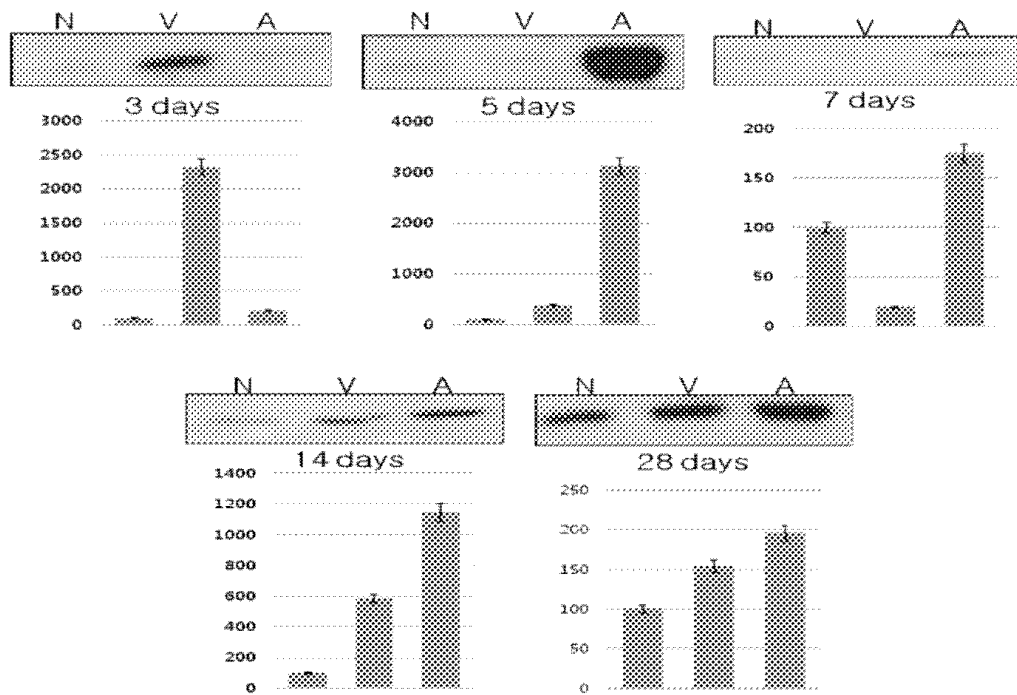
도면4



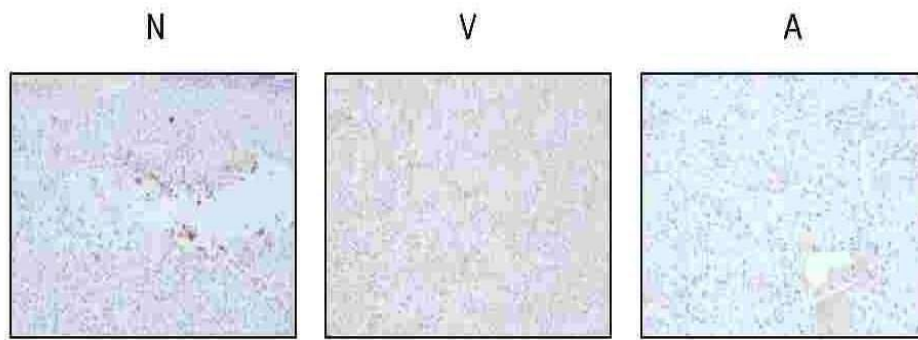
도면5



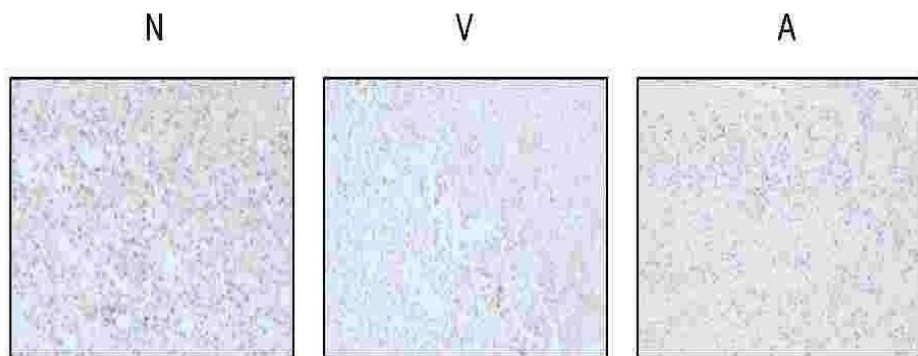
도면6



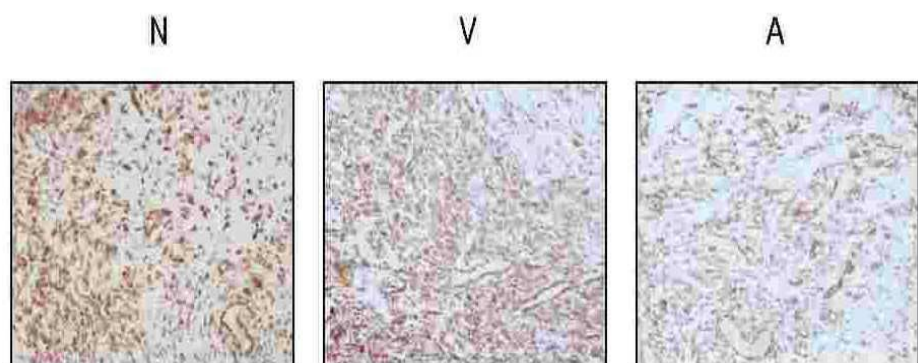
도면7



도면8



도면9



도면10

