



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0015196
(43) 공개일자 2011년02월15일

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0072792

(22) 출원일자 2009년08월07일

심사청구일자 2009년08월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이상현

서울시 강남구 도곡2동 삼성타워팰리스 F동 406호

설동근

서울시 중구 신당4동 동아약수하이츠 111동 106호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

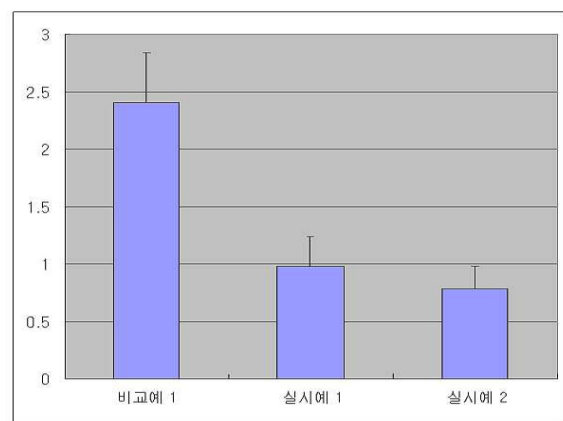
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 추간판용 서방성 치료제 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 말단에 광가교결합 가능한 작용기를 갖는 수용성의 생체적합성 중합체를 가교결합시켜 제조된 온도변화에 따라 직경이 변화하는 온도민감성 나노운반체 및 상기 나노운반체 내에 포함된 카이모파파인(chymopapain)을 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판용 서방성 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

태기용

광주광역시 북구 오룡동 광주과학기술원 교수아파트 A동 104호

황선욱

서울시 서초구 방배본동 3277 방배아이파크아파트 402동 1006호

더비, 리차드

미합중국 캘리포니아 94015 달리씨티 슈트 310 캠퍼스 드라이브 901 스피널 다이그노스틱스 엔드 트리트먼트 센터

홍영기

서울시 성북구 안암동 103-47

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0120070002049302008

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 특정기초연구

연구과제명 나노 서방출 시스템을 이용한 척추 디스크 통증 질환 치료제 개발 기반 연구

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008-09-01 ~ 2009-08-31

특허청구의 범위

청구항 1

말단에 광가교결합 가능한 작용기를 갖는 수용성의 생체적합성 중합체를 가교결합시켜 제조된 온도변화에 따라 직경이 변화하는 온도민감성 나노운반체; 및

상기 나노운반체 내에 포함된 카이모파파인(chymopapain)을 포함하는 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 나노운반체의 공극의 크기가 0 내지 10℃에서, 35 내지 45℃에서 보다 3 내지 20배 이상 큰 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 광가교결합 가능한 작용기는 아크릴레이트, 다이아크릴레이트, 올리고아크릴레이트, 메타크릴레이트, 다이메타크릴레이트, 올리고메타크릴레이트, 쿠마린, 타이민 및 시나메이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상인 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 생체적합성 중합체는 폴리에틸렌글라이콜, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 블록 공중합체, 알킬셀룰로오스, 하이드록시알킬셀룰로오스, 헤파린, 히아루론산, 키토산, 텍스트란 및 알지네이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상인 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

청구항 5

(A) 말단에 광가교결합 가능한 작용기를 갖는 수용성의 생체적합성 중합체를 가교결합시켜 제조된 온도변화에 따라 직경이 변화하는 온도민감성 나노운반체 및 카이모파파인을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및

(B) 상기 혼합물을 인큐베이팅(incubating)하여 상기 카이모파파인을 상기 나노운반체 내부로 자연적으로 포집(spontaneous encapsulation)시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 (B) 단계는 0 내지 20℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 주간판용 서방성 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 주간판용 서방성 치료제에 관한 것으로서, 더 상세하게는 온도민감성 나노운반체 내에 함유된 카이모파파인(chymopapain)을 포함하는 주간판용 서방성 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 주간판 탈출증은 일반적으로 장기간의 보존적 요법으로 치유되는 경향이 있다. 그러나 보존적 요법이 듣지 않아

어쩔 수 없이 보다 침습적인 치료를 고려해야 하는 경우가 있다. 이러한 침습적인 치료를 위한 수술을 시행하기 전 단계로서 카이모파파인 치료와 같은 중재시술을 시도해볼 수 있다.

[0003] 카이모파파인은 1941년 제이센(Jasen)과 볼스(Balls)가 파파야(papaya) 나무의 수액으로부터 분리한 단백질을 효소로서, 추간판 수핵 내에 주입했을 때 프로테오글리칸(proteoglycan)을 선택적으로 분해시키는 작용이 있다. 이러한 작용을 이용해 1964년 스미스(Smith)는 임상적으로 요추 추간판 탈출증 치료에 만족할 만한 결과를 얻었다고 보고하였으며, 카이모파파인을 통한 수핵 제거술을 화학적 용해술(chemonucleolysis)이라 명명하였다. 카이모파파인 시술이 처음 도입되었을 당시는 척추수술의 대안으로서 대단한 각광을 받았고, 이후 이중맹검시술 모형에서 그 치료적 효과가 매우 의미가 있다는 것이 밝혀졌다.

[0004] 한편, 카이모파파인을 통한 치료의 원리는, 수핵성형술(nucleoplasty)이나 자동화된 경피적 수핵제거술(automated percutaneous lumbar disectomy) 치료의 이론적 근거와 상통한다. 즉 수핵의 부분적 제거만으로도 수핵의 내압이 크게 감소하여 탈출된 추간판에 부하되는 압력이 줄어들고 그에 따라 탈출부위가 축소되어 신경근에 대한 압박이 풀리게 되는 것이다. 즉 종래의 카이모파파인을 이용한 치료는 추간판 병변 부위에 초점을 맞추어 직접 접근을 하는 것이 아니라, 추간판 내압의 전반적 감소를 통해 이차적으로 탈출된 추간판의 자연회복이 유도되기를 기대한다.

[0005] 하지만 상술한 바와 같이 탈출된 추간판의 자연회복을 유도하는 방법은 병변 부위에 대한 직접적 처치를 하는 수술적 시술에 비해 효율이 저하된다. 또한, 치료가 가능한 대상군의 범위가 추간판의 내압저하 효과를 잘 발휘할 수 있는 좀더 건강한 추간판을 지닌 사람으로 제한될 수 있다. 또한, 이러한 시술에서 치료를 위한 병변부위의 수핵이 아니라, 상대적으로 건강한 중심영역의 수핵이라는 점은 치료에 따른 또 다른 잠재적 문제점을 야기할 수도 있다. 즉, 카이모파파인에 의한 수핵용해술 후, 영상학적 소견을 보면 시술 전에 비해 추간판의 높이가 낮아지고, 수핵의 T2 조영상이 저하되며, 종말판(end-plate)의 변화가 발견된다. 이것은 카이모파파인 시술이 비록 탈출 수핵을 위축시켜 신경근에 대한 압박은 풀어낸다 할지라도, 시술받은 추간판의 전반적 영역에 퇴행화를 가속화시키는 것으로 해석될 수 있다. 또한, 역학적 관점에서 볼 때 시술로 인해 수핵의 중심부가 손상되게 되면, 이후 추간판에 가해지는 부하를 받아내는 기능에도 저하가 올 수 있다.

[0006] 기존의 카이모파파인 제제는 추간판 내 주입 시, 넓게 확산되는 성질이 있어 추간판의 탈출부위만을 선택적으로 제거하지 못하고, 추간판의 전체적 퇴행화를 유발하는 부작용이 문제가 되어왔다.

[0007]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 카이모파파인의 주입지점인 돌출된 수핵에 안정적으로 머물며, 국소적으로 작용하여 전체 추간판으로 넓게 퍼지지 않고 탈출된 병변부위만을 선택적으로 제거할 수 있는 추간판탈출 질환용 서방성 치료제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 말단에 광가교결합 가능한 작용기를 갖는 수용성의 생체적합성 중합체를 가교결합시켜 제조된 온도변화에 따라 직경이 변화하는 온도민감성 나노운반체 및 상기 나노운반체 내에 포함된 카이모파파인(chymopapain)을 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판용 서방성 치료제를 제공한다.

효 과

[0010] 본 발명의 추간판용 서방성 치료제는 돌출된 수핵에 안정적으로 머물며 주변으로 넓게 퍼지지 않아, 건강한 추간판 조직을 보존하며 돌출된 부위만을 선택적으로 제거하는 기능을 갖춘다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명에서, 생체적합성이란 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직 적합성(tissue compatibility)을 가지고 있는 것을 의미한다. 본 발명에서, 수용성의 생체적합성 중합체는 물 또는 물-혼합성 용매(water-miscible solvent: 메탄올, 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴, N,N-다이메틸프롬아마이드, 다이메틸설폭사이드 등)에 용해되는 것을 말하며, 바람직하게는 물에 용해되는 것을 말한다. 본 발명에

서, 수용성의 생체적합성 중합체는 소수성 및 친수성 부분 모두를 가지고 있어 계면활성제와 유사한 양상을 나타내는 중합체를 이용할 수 있는데, 이 경우 소수성 부분을 추가적으로 도입시켜 폴락사머(poloxamer)와 같은 성질을 나타내는 것이 바람직하다.

- [0012] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0013] 본 발명의 주간관용 서방성 치료제는 온도민감성 나노운반체 및 상기 온도민감성 나노운반체 내에 포함된 카이모파파인(chymopapain)을 포함한다.
- [0014] 상기 온도민감성 나노운반체는 온도가 낮아지면 그 직경이 증가하고, 온도가 높아지면 그 직경이 감소한다. 보다 자세하게 설명하면, 상기 온도민감성 나노운반체의 직경은 0 내지 10℃에서, 35 내지 45℃에 비하여 바람직하게는 3 내지 20배 증가되고, 더 바람직하게는 4 내지 15배 증가되고, 보다 더 바람직하게는 5 내지 12배, 가장 바람직하게는 7 내지 10배 증가된다. 상기 온도민감성 나노운반체는 상술한 특성 때문에, 카이모파파인이 0 내지 10℃에서 나노운반체 내에 다량 포함되었다가 신체 내의 온도인 35 내지 45℃에서 서방형으로 방출될 수 있다.
- [0015] 상기 온도민감성 나노운반체의 직경은 최소 50nm이고 최대 500nm로, 보다 바람직하게는 50nm 내지 400nm이고, 가장 바람직하게는 50 내지 300nm이다. 상술한 범위는 온도에 따라 변화하는 온도민감성 나노운반체의 직경을 모두 포괄하는 범위이다. 상기 온도민감성 나노운반체는 35 내지 45℃에서 바람직하게는 공극 크기가 3-20nm이고, 보다 바람직하게는 3-15nm, 가장 바람직하게는 5-10nm이다.
- [0016] 상기 온도민감성 나노운반체는 수화젤이 아닌 나노입자(nanoparticulate)이고, 둥근 형상을 갖는 나노입자 형태인 것이 바람직하다.
- [0017] 상기 나노운반체의 다분산(polydispersity) 지수는 바람직하게는 0.01 내지 0.1이다. 상술한 범위를 만족하면, 안정적인 다분산 분포를 갖는 나노입자로 인정될 수 있다.
- [0018] 상기 온도민감성 나노운반체는 말단에 광가교결합 가능한 작용기를 갖는 수용성의 생체적합성 중합체를 가교결합시켜 제조되고, 온도변화에 따라 직경이 변화된다.
- [0019] 상기 생체적합성 중합체는 중심부, 즉 말단을 제외한 부분이 바람직하게는 폴리에틸렌글라이콜, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 블록 공중합체, 알킬셀룰로오스, 하이드록시알킬 셀룰로오스, 헤파린, 히아루론산, 키토산, 텍스트란 또는 알지네이트 구조를 갖는 중합체이다.
- [0020] 상기 생체적합성 중합체는 중심부가 보다 바람직하게는 폴락사머 계열의 중합체이다.
- [0021] 상기 생체적합성 중합체는 가장 바람직하게는 하기 화학식 1로 표시되는 중합체이다.
- [0022] <화학식 1>
- [0023] $(PC1)-(PE)_x(PP0)_y(PE)_z-(PC2)$
- [0024] 상기 화학식 1에서, PE는 에틸렌옥사이드, PP0는 프로필렌옥사이드, PC1 및 PC2는 광가교결합 가능한 작용기를 나타내고, x, y 및 z는 각각 독립적으로 1~10,000의 정수이다.
- [0025] 상기 광가교결합 가능한 작용기는 C=C 이중결합을 갖는 작용기인 것이 바람직하고, 상기 C=C 이중결합을 갖는 작용기의 예로는 아크릴레이트, 다이아크릴레이트, 올리고아크릴레이트, 메타크릴레이트, 다이메타크릴레이트, 올리고메타크릴레이트, 쿠마린, 타이민 및 시나메이트 등을 들 수 있다. 상기 광가교결합 가능한 작용기는 보다 바람직하게는 아크릴레이트, 다이아크릴레이트, 올리고아크릴레이트, 메타크릴레이트, 다이메타크릴레이트 또는 올리고메타크릴레이트이고, 가장 바람직하게는 아크릴레이트이다.
- [0026] 본 발명의 주간관용 서방성 치료제에 포함되는 카이모파파인(chymopapain)은 파파야(papaya) 나무의 수액으로부터 분리한 단백질 분해 효소이다. 주간관 수핵은 젤리형태의 단백질이기 때문에 디스크 질환으로 팽윤된, 즉 돌출된 수핵 내에 주입했을 때 프로테오글리칸(proteoglycan)에 선택적으로 작용하여 이를 가수분해시키는 작용을 한다. 따라서, 상기 카이모파파인은 통증을 유발하는 돌출된 수핵을 선택적으로 제거할 수 있다. 상기와 같이 돌출된 수핵이 선택적으로 제거되면 수핵의 전체 용적이 줄어들며, 이로 인해 수핵의 내압이 줄어들게 된다. 수

핵 내압의 감소는 수핵이 방사상으로 팽창하려는 힘을 감소시켜 신경근을 압박하고 있던 탈출된 수핵이 안쪽으로 수렴하게 하는 기능을 발휘하여 통증을 감소시킨다.

[0027] 이와 같이, 본 발명의 추간관용 서방성 치료제는 0 내지 10℃에서 다량의 카이모파파인을 함유하는 나노운반체를 포함하고 35 내지 45℃에서는 나노운반체의 직경이 감소하므로, 신체 내에서 카이모파파인을 4 내지 7일에 걸쳐 서서히 방출시킬 수 있다. 이로 인해, 본 발명의 추간관용 서방성 치료제는 장시간 동안 디스크 내에 머물면서 카이모파파인을 서서히 방출시켜 돌출된 수핵을 선택적으로 제거할 수 있고, 안정적이고 국소적으로도 적용될 수 있다. 또한, 본 발명의 추간관용 서방성 치료제는 용적에 대비한 표면적이 커서 적은 양으로도 극대화 효과를 발휘할 수 있다.

[0028] 이하 본 발명의 추간관용 서방성 치료제의 제조방법을 설명한다.

[0029] 우선, 본 발명의 추간관용 서방성 치료제의 제조방법은 (A) 나노운반체 및 카이모파파인을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0030] 여기서, 상기 나노운반체는 상기 생체적합성 중합체를 가시광선 또는 자외선을 조사하고 상기 생체적합성 중합체의 말단에 결합된 광가교결합 가능한 작용기를 통하여 가교결합시켜 제조된다.

[0031] 보다 상세하게 설명하면, 상기 생체적합성 중합체는 바람직하게는 수용액에 분산된 상태로 제공하고, 바람직하게는 자외선을 조사한다. 또한, 상기 분산액 상태인 중합체에 개시제를 첨가하여 가교결합시킨다. 이때 상기 개시제의 종류는 특별히 제한되지 않고, 자외선 또는 가시광선의 조사에 의해 라디칼(radical) 반응을 유발할 수 있는 라디칼 광개시제(radical photoinitiator)인 것이 바람직하다. 상기 광개시제의 예로는 에틸 에오신, 2,2-다이메톡시-2-페닐 아세토페논, 2-메톡시-2-페닐아세토페논, 2-하이드록시-1-[4-(2-하이드록시에톡시)페닐]-2-메틸-1-프로판온(Irgaure 2959 또는 Darocur 2959), 캄포르퀴논(camphorquinone), 아세토페논, 아세토페논 벤질 케탈, 1-하이드록시사이클로헥시페닐 케톤, 2,2-다이메톡시-2-페닐아세토페논, 잔톤, 플루오레논, 벤즈알데하이드, 플루오렌, 안트라퀴논, 트리페닐아민, 카르바졸, 3-메틸아세토페논, 4-클로로벤조페논, 4,4'-다이메톡시벤조페논, 4,4'-다이아미노벤조페논, 벤조인 프로필 에테르, 벤조인 에틸에테르, 벤질 다이메틸 케탈, 1-(4-이소프로필페닐)-2-하이드록시-2-메틸프로판-1-온, 2-하이드록시-2-메틸-1-페닐프로판-1-온, 티옥산톤, 다이에틸티옥산톤, 2-이소프로필티옥산톤, 2-클로로티오티옥산톤, 2-메틸-1-[4-(메틸티오)페닐]-2-모르폴리노-프로판-1-온, 2,4,6-트리메틸벤조일 다이페닐포스핀 옥사이드 및 비스-(2,6-다이메톡시벤조일)-2,4,4-트리메틸펜틸 포스핀 옥사이드 등을 들 수 있다.

[0032] 상술한 바와 같이, 상기 나노운반체의 제조방법은 유기 분산상을 사용하지 않으며 수용액 분산상 단독에서 실시된다. 즉 단일상(single phase)에서 나노운반체의 제조가 모두 이루어진다. 보다 상세하게는 생체적합성 중합체 및 개시제가 분산된 수용액에 광을 조사함으로써, 나노운반체의 제조가 이루어진다.

[0033] 본 발명의 추간관용 서방성 치료제의 제조방법은 (B) 상기 혼합물을 인큐베이팅(incubating)하여 상기 카이모파파인을 상기 나노운반체 내부로 자연적으로 포집(spontaneous encapsulation)시키는 단계를 포함한다.

[0034] 상기 (B) 단계는 바람직하게는 0 내지 10℃, 보다 바람직하게는 4 내지 6℃의 온도에서 수행한다. 또한, 유기분산상이 아닌 수용액 분산상에서 수행된다.

[0035] 상기 (B) 단계는 추가적인 처리 없이 나노운반체와 카이모파파인이 만날(contacting) 수 있는 환경만 제공해 주면 카이모파파인이 자연스럽게 나노운반체에 로딩되는 것으로 포집효율은 90% 이상이다. 이러한 자연적 포집으로 인해 카이모파파인의 안정성을 크게 증가시킬 수 있다.

[0036] 본 발명의 추간관용 서방성 치료제의 제조방법은 종래기술이 갖고 있는 유해한 유기용매의 이용, 복잡한 과정, 높은 생산 단가 및 낮은 로딩 등의 문제점을 해결할 수 있다. 또한 종래기술에서 통상적으로 이용되는 고속 균질화 과정 또는 초음파 처리과정을 필요로 하지 않기 때문에, 본 발명의 방법은 로딩되는 약물의 변성 또는 응집을 피할 수 있다.

- [0037] 이하에서 실시예 및 시험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 이하의 제조예, 실시예 및 시험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 제조예 1 및 제조예 2: 나노운반체의 제조
- [0039] <제조예 1>
- [0040] 플루오닉 F-127(상품명: PF 127, 제조사: BASF Corp.) 5g 및 10배 물의 아크릴로일 클로라이드(제조사: Aldrich)와 트리에틸아민(제조사: Aldrich)을 50ml 무수 톨루엔에서 24시간 동안 아르곤 대기 하에서 교반시켜 플루오닉 F-127의 히드록시기를 아크릴화하였다. 아크릴화된 플루오닉 F-127을 무수 다이에틸 에테르에서 침전시키고 여과한 다음 진공 하에서 3일 동안 건조시켰다. 아크릴화 정도는 300MHz ¹H-NMR 스펙트로미터(JNM-LA300WB FT-NMR Spectrometer, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였고, 98% 이상 아크릴 작용기로 치환된 다이아크릴레이트 플루오닉 F-127(이하, DA-PF 127 이라 함)이 제조됨을 확인하였다.
- [0041] DA-PF 127을 탈이온수에 용해하여 10.0%(w/w)의 전구체 용액을 제조한 뒤, 0.77%(w/w)의 농도를 갖는 희석된 전구체 용액을 제조하였다. 희석된 전구체 용액에 70% 에탄올에 녹인 광개시제 이가큐어 2959(상품명, 제조사: Ciba Specialty Chemicals Inc.)를 0.05%(w/w)양으로 첨가하였다. 이어서, 필터를 제거한 1.3mW/cm² 자외선 램프(VL-4.LC, 8W, Vilber Lourmat, France)를 광원으로 15분간 조사하여 플루오닉-기반 나노운반체를 제조하였다.
- [0042] <제조예 2>
- [0043] 플루오닉 F-68(상품명: PF 68, 제조사: BASF Corp.) 5g 및 10배 물의 아크릴로일 클로라이드(제조사: Aldrich)와 트리에틸아민(제조사: Aldrich)을 50ml 무수 톨루엔에서 24시간 동안 아르곤 대기 하에서 교반시켜 플루오닉 F-127의 히드록시기를 아크릴화하였다. 아크릴화된 플루오닉 F-68을 무수 다이에틸 에테르에서 침전시키고 여과한 다음 진공 하에서 3일 동안 건조시켰다. 아크릴화 정도는 300MHz ¹H-NMR 스펙트로미터(JNM-LA300WB FT-NMR Spectrometer, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였고, 98% 이상 아크릴 작용기로 치환된 다이아크릴레이트 플루오닉 F-68(이하, DA-PF 68 이라 함)이 제조됨을 확인하였다.
- [0044] DA-PF 68을 탈이온수에 용해하여 10.0%(w/w)의 전구체 용액을 제조한 뒤, 0.50%(w/w)의 농도를 갖는 희석된 전구체 용액을 제조하였다. 희석된 전구체 용액에 70% 에탄올에 녹인 광개시제 이가큐어 2959(상품명, 제조사: Ciba Specialty Chemicals Inc.)를 0.05%(w/w)양으로 첨가하였다. 이어서, 필터를 제거한 1.3mW/cm² 자외선 램프(VL-4.LC, 8W, Vilber Lourmat, France)를 광원으로 15분간 조사하여 플루오닉-기반 나노운반체를 제조하였다.
- [0045] 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1: 추간관용 치료제의 제조
- [0046] <실시예 1>
- [0047] 제조예 1의 나노운반체(300μl)에 카이모파파인(200 units/50μl)을 첨가한 용액을 4℃에 12시간 동안 방치하여 카이모파파인이 자발적으로 팽창된 나노운반체 안으로 충전(loading)되도록 하여 추간관용 서방성 치료제를 제조하였다.
- [0048] <실시예 2>
- [0049] 제조예 2의 나노운반체(300μl)에 카이모파파인(200 units/50μl)을 첨가한 용액을 4℃에 12시간 동안 방치하여 카이모파파인이 자발적으로 팽창된 나노운반체 안으로 충전(loading)되도록 하여 추간관용 서방성 치료제를 제조하였다.
- [0050] <비교예 1>
- [0051] 추간관용 치료제로 카이모파파인(200 units) 단독을 제공하였다.
- [0052] 시험예: 추간관용 치료제의 특성 평가
- [0053] <용해면적 평가>
- [0054] 우선, 카테바(cadaver)의 척추뼈(vertebral body)를 횡단면으로 톱질하여 3개의 추간관 부위를 적출하였다. 각

추간판은 위아래의 종말판(endplate)을 포함하는 척추뼈(vertebral body)에 둘러싸인 상태였다.

[0055] 3개의 추간판에 실시예 1의 추간판용 치료제, 실시예 2의 추간판용 치료제, 비교예 1의 추간판용 치료제를 추간판의 앞쪽에서 뒤쪽으로 횡방향 중심선에 따라 주입하였다.

[0056] 여기서, 비교예 1의 추간판용 치료제는 1ml의 주사기를 사용하여 주입하였다.

[0057] 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 추간판용 치료제를 주입한 후, 1주일 후 추간판을 횡방향으로 절개하여, 추간판 내부에 진입한 주사바늘의 끝부분이 놓인 지점을 중심으로, 수핵이 용해되어있는 모습을 육안적으로 살펴보고, 조직검사를 시행하였다.

[0058] 각 추간판들을 10%의 뉴트럴 버퍼드 포르말린(neutral buffered formalin)에 1주일간 고정시키고, 에틸렌 디아민 테트라 아세트산(ethylene diamine tetra acetic acid)에 탈회(decalcification) 시킨 후 파라핀 절편 하였다. 각 조직들을 파라핀에 함몰한 후 박절기(microtome)를 이용해 5 μ m의 두께로 절편내고 헤마톡실린/에오신(H&E) 염색 후 광학현미경(Olympus)으로 관찰하며 추간판 세포의 손상된 용적을 측정하였다. 각군의 손상된 용적의 차이에 대한 통계적 의미를 구하기 위해 SPSS12.0 K프로그램을 사용하였다.

[0059] 하기 표 1은 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 추간판용 치료제를 추간판에 적용하였을 때, 횡절개된 추간판 표본의 용해면적을 나타낸 것이고, 도 1은 이를 그래프로 나타낸 것이다.

표 1

	실시예 1	실시예 2	비교예 1
용해면적(cm^2)	0.98 ± 0.25	0.78 ± 0.19	2.4 ± 0.43

[0061] 표 1 및 도 1을 참조하면, 실시예 1 및 실시예 2의 추간판용 서방성 치료제는 비교예 1의 추간판용 치료제보다 적은 범위에서 수핵의 용해가 일어남을 알 수 있다. 하지만, 나노운반체만 차이가 있는 실시예 1 및 실시예 2의 추간판용 치료제의 경우에는 용해면적의 차이가 미비하였다.

[0062] 도 2 내지 도 4는 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 추간판용 치료제를 적용한 횡절개된 추간판 표본의 사진을 각각 나타낸 것이다.

[0063] 도 4를 비교예 1의 추간판용 치료제를 적용한 추간판에 적용한 경우 광범위한 범위에서 수핵용해가 나타났다. 그러나, 도 2 및 도 3을 참조하면 실시예 1 및 실시예 2의 추간판용 치료제의 경우, 국소적인 수핵용해만 나타났다.

[0064] 도 5 및 도 6은 실시예 2 및 비교예 1의 추간판용 치료제를 적용한 추간판의 광학현미경 사진(200배 확대)을 각각 나타낸 것이다.

[0065] 도 5를 참조하면, 실시예 2의 추간판용 치료제가 추간판의 국소적인 영역에만 적용되어, 병변 부위 외에 영역에 선 추간판의 기본 구조가 상대적으로 보다 잘 유지되어 있다. 도 6을 참조하면, 추간판에 붉은 무정형 물질(amorphous eosinophilic material)이 넓게 퍼져 있으며 추간판의 기질과 세포들이 전반적인 구조적 변형을 일으킨 것을 알 수 있다.

[0066] <서방출 특성 평가>

[0067] 실시예 1의 추간판용 치료제의 카이모파파인의 방출특성을 평가하였다.

[0068] 우선, 실시예 1의 추간판용 치료제 용액을 투석막(dialysis bag, Cellulose Ester, MWCO 300,000)에 넣은 후, 무한 희석조건을 만족하는 과량의 PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, with 0.05% NaN_3) 용액을 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 100rpm으로 교반하면서 방출패턴을 분석하였다. 이의 결과를 도 7에 나타내었다.

[0069] 한편, 방출된 카이모파파인을 회수하여 그 양을 coomassie Plus-Bradford TM assay(PIERCE, Rockford, IL, USA) 단백질 정량법을 이용하여 정량하였다.

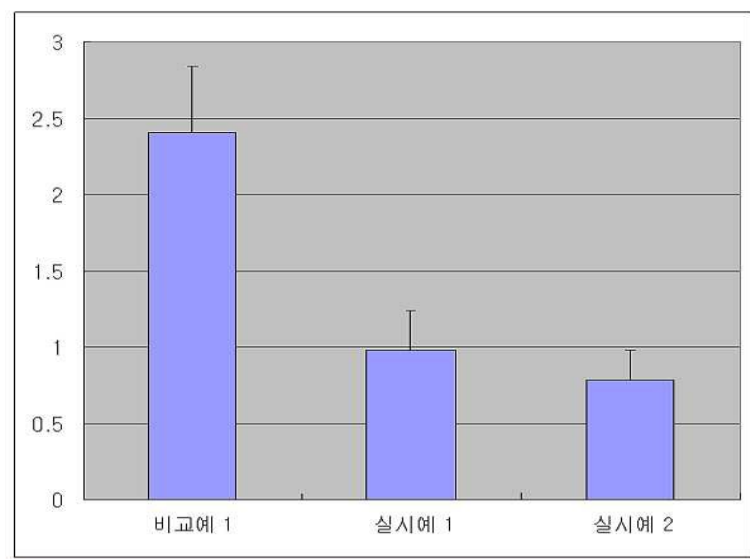
[0070] 도 7을 참조하면, 실시예 1의 추간판용 치료제는 카이모파파인이 4 내지 7일에 걸쳐 서서히 방출되는 것을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

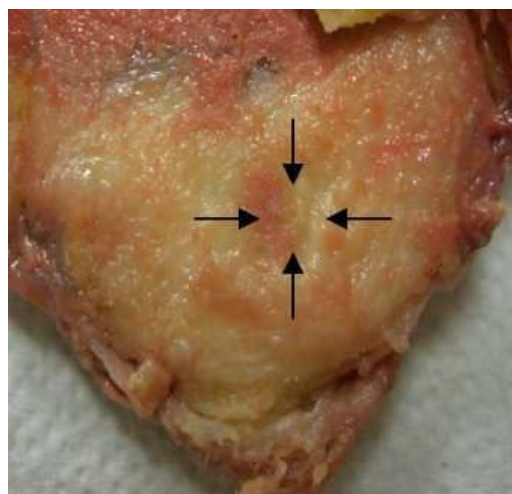
- [0071] 도 1은 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1에 따른 횡절개된 추간관 표본의 용해면적을 나타낸 그래프이다.
- [0072] 도 2 내지 도 4는 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 추간관용 치료제를 적용한 횡절개된 추간관 표본의 사진을 각각 나타낸 것이다.
- [0073] 도 5 및 도 6은 실시예 2 및 비교예 1의 추간관용 치료제를 적용한 추간관의 광학현미경 사진(200배 확대)을 각각 나타낸 것이다.
- [0074] 도 7은 실시예 1의 추간관용 치료제의 카이모파파인 방출량을 시간에 따라 나타낸 그래프이다.

도면

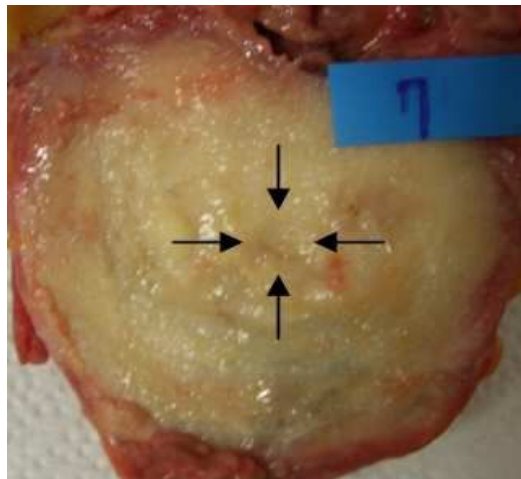
도면1



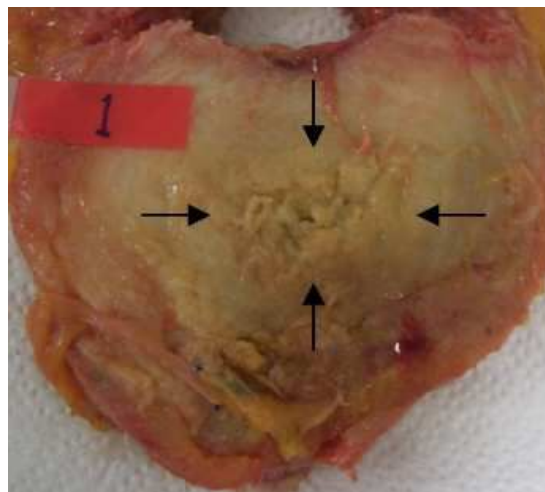
도면2



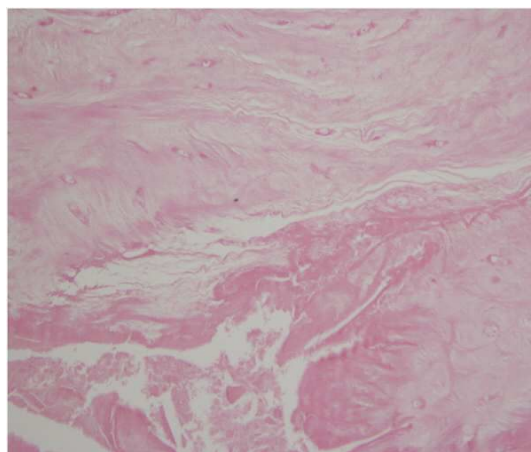
도면3



도면4



도면5



도면6



도면7

