



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0014931
(43) 공개일자 2018년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 15/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 15/125 (2013.01)

A61L 2300/232 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0098350

(22) 출원일자 2016년08월02일

심사청구일자 2016년08월02일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(주)웰빙해피팜

경기도 구리시 별말로 188, 2층(토평동)

(72) 발명자

조용준

강원도 춘천시 우석로101번길 86, 110동 802호 (석사동, 대우아파트)

엄동열

경기도 구리시 동구릉로 114, 106동 704호 (인창동, 현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 9 항

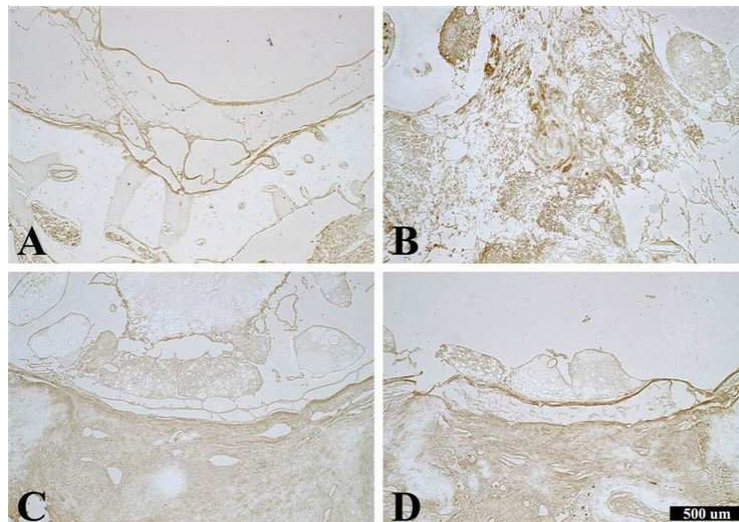
(54) 발명의 명칭 미소막 간격체 및 미소막 간격체-유착방지제 혼합물

(57) 요약

해결하고자 하는 과제: 유착 방지막이 형성될 때까지의 성능유지를 위해 강도를 유지하도록 해주며 흘러내림 현상을 개선한 유착방지제 첨가제를 제공하려는 것.

과제해결수단: 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액에 가교제를 가하여 가교반응한 후 두께 0.1 μ m~1mm, 직경 1~3 mm의 유착방지제 첨가용 미소막 간격체 (membrane spacer)를 제조하였다. 상기 미소막 간격체는 유착방지제 1ml당 30~60개를 가하고 혼합하여 사용하며, 실험 결과, 유착방지, 섬유화 억제, 신생혈관 억제, 항염증 효과가 시판 유착방지제와 유사하거나 좀 더 우수하였으며, 수술 부위에 적용시 흘러내림 방지 효과가 우수하였다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61L 2300/424 (2013.01)

A61L 2300/802 (2013.01)

(72) 발명자

소현숙

경기도 구리시 동구릉로 114, 106동 704호 (인창동, 현대아파트)

김은혜

경기도 구리시 원수택로32번길 59-30, B동 301호 (수택동, 미주아파트)

김대원

강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호

박용훈

서울특별시 노원구 동일로192길 80, 603호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0352889

부처명 (사)한국산학연합회

연구관리전문기관 (사)한국산학연합회

연구사업명 2015년도 산학협력 기술개발사업(첫걸음기술개발사업)

연구과제명 히알루론산 미소(微小) 간격체(spacer)를 함유한 유착방지제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액에 가교제를 가하여 가교반응한 후 제조되는 두께 $0.1\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$, 직경 $1\sim 3\text{ mm}$ 의 유착방지제 첨가용 미소막 간격체.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액은 카복시메틸셀룰로스 $0.1\sim 5\%(\text{w/v})$ 및 히알루론산 $0.5\sim 3\%(\text{w/v})$ 임을 특징으로 하는 유착방지제 첨가용 미소막 간격체.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 미소막 간격체는 유착방지제 1mL 당 $30\sim 60$ 개를 가하고 혼합하여 사용하는 것임을 특징으로 하는 유착방지제 첨가용 미소막 간격체.

청구항 4

카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액에 가교제를 가하여 가교반응한 후 제조되는 두께 $0.1\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$, 직경 $1\sim 3\text{ mm}$ 의 유착방지제 첨가용 미소막 간격체와 유착방지제를 혼합한 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 미소막 간격체는 유착방지제 1mL 당 $30\sim 60$ 개를 가하고 혼합하여 사용하는 것임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 유착방지제는 크림형, 젤형 및 액상 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

청구항 7

청구항 4에 있어서,

상기 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액은 카복시메틸셀룰로스 $0.1\sim 5\%(\text{w/v})$ 및 히알루론산 $0.5\sim 3\%(\text{w/v})$ 임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

청구항 8

청구항 4에 있어서,

상기 유착방지제는 카복시메틸셀룰로스와 폴리에틸렌글라이콜 혼합용액으로부터 제조됨을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 카복시메틸셀룰로스와 폴리에틸렌글라이콜 혼합용액은 카복시메틸셀룰로스 3~7% (w/v)와 폴리에틸렌글라이콜 1~5% (w/v)임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미소막 간격체 및 미소막 간격체-유착방지제 혼합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수술 후 발생하는 장기 및 조직의 유착은 손상된 조직세포가 증식하고 재생되는 과정에서 발생하는 자연스러운 현상이지만 과도한 유착이나 의도하지 않은 다른 장기 및 조직과의 유착은 장기의 기능 장애를 초래하여 경우에 따라서는 유착박리 재수술이 필요하며 생명을 위협하는 요인이 되기도 한다.

[0003] 현재 사용되고 있는 유착방지법은 크게 세 가지로 분류된다. 첫째, 수술시 섬세한 주의를 기울여 불필요한 시술로 인한 조직손상과 이물질에 의한 유착을 최소화하는 방법이며 둘째, 염증성 반응과 유착 형성 이전에 근거하여 약물 치료로 유착을 억제하는 것이다. 마지막으로, 수술 후 유착방지막 (anti-adhesion barrier)을 사용하여 상처 부위를 감싸거나 덮어줌으로써 주변조직과의 접촉을 차단하여 유착을 방지하는 방법이 있다. 최근에는 세 번째 방법이 임상에서 널리 사용되고 있으며 그 중요성이 부각되고 있다.

[0004] 1994년 미국 통계 자료에 의하면, 복부 수술 후 유착으로 인한 합병증의 치료에 사용된 비용이 13억 달러에 이른다고 보고되었다. 이러한 유착을 방지하기 위해서 복강경이나 최소 침습 수술기법들은 외상, 이물질 노출, 조직 건조를 최소화하거나 방지하고 지혈을 돕는 기복 (pneumoperitoneum)의 효과로 인해 유착 방지에 도움이 된다. 그러나 이러한 방법들은 유착형성을 줄일 수는 있지만 없앨 수는 없는 한계가 있다. 따라서 수술 후 유착방지제 (antiadhesive agent)의 사용을 고려해야 한다. 약물 제제로는 유착 형성을 방지하는 섬유소 용해제 (fibrinolytic agent), 항응고제, 항염증제, 감염 방지를 위한 항생제, 기타 호르몬제 등이 사용되며 유착 방지막은 고형 (내인성 및 외인성), 액체형, 그리고 겔형 등이 있다.

[0005] 최근 들어 물리적 장벽을 사용하는 유착방지제들이 개발되어 사용되고 있다. 유착방지제 (Anti-adhesive agent)는 유착이 예상되는 부위에 일정기간 물리적인 장벽으로 남아 인접한 조직 사이에 유착이 형성되는 것을 막아주는 역할을 하며, 일정기간 후에는 분해 혹은 생체 내에 흡수되어 이물질로 남지 않아야 한다. 그러나 현재 개발된 유착방지제들이 유착 방지에 일정 부분 효과가 있다고 입증은 되어 있으나, 임상의에게 유착 방지에 대한 확실한 믿음을 주는 제품은 적으며, 또한 제품군별 유착 방지의 효과를 구체적으로 비교 평가하는 연구도 부족한 상태다.

[0006] 알려진 바에 따르면 외과 수술의 3% 정도가 유착과 관련이 있다고 한다. 유착은 수술한 조직 혹은 장기에 주변 조직이 달라붙는 현상을 의미한다. 미국에서는 2001년 유착을 박리하기 위한 수술이 54,500건 정도 실시되었을 정도로 유착은 수술을 진행하는 임상 의사들에게는 널리 알려진 수술 후유증이다. 유착은 다양한 수술 분야, 즉 외과, 산부인과, 이비인후과, 신경외과, 정형외과 등 거의 모든 수술이 필요한 분야에서 수술 후 합병증으로 발생한다.

[0007] 복부수술 후 유착에 의해 발생하는 합병증으로는 소장폐쇄가 49~74%, 불임이 15~20%, 만성 골반통증이 20~50%, 후속 수술시 장천공이 19% 정도에 이르는 것으로 알려져 있다. 또한 이비인후과의 만성 비부비동염 (축농증)의

치치를 위한 비강 내시경술 후 재발물이 환자의 7.6%에서 38%에 이르고 있다. 외국의 이비인후과 전문학술지에 의하면 이로 인해 재수술을 받는 환자의 56%에서 유착이 발생되어 있었다고 보고되었다. 한편, 산부인과의 경우 불완전한 유산, 사산, 재발성 유산 등에 대한 소파술 등의 수술 후 20-50%에서 자궁내막에 유착이 발생하며, 이러한 유착으로 인해 불임, 무월경, 습관성 유산 등이 초래되는 것으로 알려져 있다.

[0008] 정리하자면, 수술 후에 97%가 유착이 발생하며, 그 중 5-7%가 큰 문제를 야기할 수 있다. 복부 유착은 소장 폐색을 일으키는 원인 중 54-74%를 차지하며, 골반 유착은 최초의 부인과 수술 후 이차 복강경 검사를 한 환자의 55~100%에서 관찰된다. 미국에서만 복부 유착 치료와 관련한 입원 보험료로 약 12억 달러가 소비되었다고 한다.

[0009] 수술 후 유착 방지는 합병증을 줄일 수 있어 매우 중요하므로 이를 위해 세심한 수술적 방법과 유착방지제가 사용되고 있으나 현재 유착방지의 효과가 아주 뛰어난 독보적인 제품은 없는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 1. Ae-gyeong Oh; Trends of Anti-adhesion Adjuvant. Biomater. Res. (2013) 17(4): 138-145

(비특허문헌 0002) 2. Kim DW, Eum WS, Jang SH, Park J, Heo DH, Sheen SH, Lee HR, Kweon H, Kang SW, Lee KG, Cho SY, Jin HJ, Cho YJ, Choi SY. ; A transparent artificial dura mater made of silk fibroin as an inhibitor of inflammation in craniotomized rats. J Neurosurg 114:485-490, 2011

(비특허문헌 0003) 3. Do Heum Yoon, Keung Nyun Kim, Dong Ah Shin, Jong Eun Lee, Jung Goen Lee , Do Hoon Kim; Preventive Effect of Anti-adhesion Barrier Gel for Peridural Fibrosis in Rat Laminectomy Model. J Korean Neurosurg Soc 34: 456-460, 2003

(비특허문헌 0004) 4. Kjell Olmarker; Reduction of adhesion formation and promotion of woundhealing after laminectomy by pharmacological inhibition of pro-inflammatory cytokines: an experimental study in the rat. Eur Spine J (2010) 19:2117-2121

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목표는 현재 임상에서 널리 사용되는 유착방지제와 비교하여 좀 더 우수한 물성의 유착방지제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명자들은 그동안 국내산 유착방지제의 단점으로 지적되어 왔던 사용시 흘러내림 현상을 개선한 좀 더 이상적인 유착방지제를 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 외과 수술 후 손상조직과 주변 조직이 서로 엉켜붙는 유착은 상처의 회복에 있어 자연스러운 현상이다. 하지만, 너무 과도한 유착이나 이로 인해 발생하는 염증 반응은 2차 수술을 시행해야 하는 요인이 되고, 심한 경우에는 생명에 위협을 준다. 척추 수술 후 발생하는 경막 주위의 유착은 신경근의 이동을 막고 고통에 이르게 한다. 이러한 유착을 방지하기 위해 시중에 유착방지제가 판매되고 있다. 약물 제제로는 유착 형성을 방지하는 섬유소 용해제 (fibrinolytic agent), 항응고제, 항염증제, 감염 방지를 위한 항생제, 기타 호르몬제 등이 사용되며, 유착방지막은 고형, 액체형, 젤형 등이 있다. 그럼에도 불구하고 유착방지 효과가 아주 뛰어난 제품은 없다. 게다가 유착방지 제품의 가격도 비교적 고가인 경우가 많아서, 시판 중인 유착방지제보다 성능이 좋으면서 가격 또한 저렴한 유착방지제의 개발이 필요하다.

[0014] 본 발명자들은 오랜 연구 끝에 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산을 혼합한 재질로 얇은 막을 작은 크기로 한 간격체 (spacer)를 제조하여 유착방지제 겔에 혼합함으로써 유착방지제 겔의 흐름도를 좀 더 느리게 함으로써 종래 유착방지제의 사용시 흘러내림 문제를 해결할 수 있었다.

[0015] 본 발명의 미소막 간격체는 유착방지제에 혼합하여 사용한다. 바람직하게는 유착방지제 1ml 당 직경 2mm 내외의

미소막 간격체를 30~60개 가하여 잘 혼합하여 사용한다.

- [0016] 본 발명의 미소막 간격체-유착방지제 혼합물의 유착방지 효능, 염증억제 효능 등을 알아보기 위하여 여러 가지 실험을 수행하였다. 척수경질막 섬유화 정도를 확인하기 위하여 Masson trichrome 염색을 수행한 결과 (도 8), 섬유화를 확인할 수 있었으며, 본 발명의 미소막 간격체-유착방지제 혼합물 처리군에서 섬유화가 가장 잘 억제된 것을 확인할 수 있다. 척추 수술부위의 신생 혈관 형성을 확인하기 위해 MMP-2, MMP-9 RT-PCR로 확인한 결과, 본 발명의 미소막 간격체-유착방지제 혼합물 처리군에서 시판 유착방지제를 처리했을 때와 비교하여 유사하거나 좀 더 좋은 유착 방지효과를 얻을 수 있었다 (도 4).
- [0017] 웨스턴 블롯 결과 (도 3), 세포와 세포 접합인자인 CD34 항체로 확인했을 때 비처리군, 시판 유착방지제, 본 발명의 미소막 간격체-유착방지제 혼합물 처리군 순으로 유착 정도를 확인할 수 있었다.
- [0018] 염증인자들을 확인하기 위해 웨스턴 블롯과 RT-PCR을 수행한 결과 (도 5, 도 6), 본 발명 시험군인 미소막 간격체-유착방지제 혼합물 처리군에서 COX-2와 iNOS와 같은 염증인자들이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 친염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β , IL-12의 RT-PCR 결과에서도 미소막 간격체와 유착방지제 혼합물 처리군에서 염증인자 감소 효과를 확인할 수 있었다.
- [0019] 동물 실험을 통해 유착 생성 메커니즘에 따른 유착방지제와 혼합한 미소막 간격체의 섬유화 억제 효과와 신생혈관 억제효과, 항염증 효과를 확인한 결과, 미소막 간격체의 유착방지제와 혼합 사용 가능성을 확인하였다.
- [0020] 본 발명은 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액에 가교제를 가하여 가교반응한 후 제조된 두께 0.1 μ m~1mm, 직경 1~3mm의 유착방지제 첨가용 미소막 간격체에 관한 것이다. 위의 두께와 직경 범위일 때 유착방지제와 잘 혼합되며, 홀러내림 현상을 효과적으로 방지할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액이 카복시메틸셀룰로스 0.1~5% (w/v) 및 히알루론산 0.5~3% (w/v)을 포함함을 특징으로 한다. 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산의 농도 범위가 위 범위를 벗어나면 삼투압이 지나치게 높아지거나 낮아지고 흐름도 및 막 침강속도가 지나치게 빨라지거나 지나치게 느려져 홀러내림 현상 방지 목적을 달성하기가 어려워진다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 미소막 간격체를 유착방지제 1mL당 30~60개를 가하고 혼합하여 사용하는 것임을 특징으로 하는 유착방지제 첨가용 미소막 간격체에 관한 것이다. 미소막 간격체를 너무 소량 가하면 홀러내림 방지 등의 목표가 실현되기 어렵고, 지나치게 많으면 흐름성이 낮아져 손상 부위에 적용하기가 용이하지 않다.
- [0023] 또한, 본 발명은 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액에 가교제를 가하여 가교반응한 후 제조되는 두께 0.1 μ m~1mm, 직경 1~3mm의 유착방지제 첨가용 미소막 간격체와 유착방지제를 혼합한 미소막 간격체-유착방지제 혼합물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 미소막 간격체를 유착방지제 1mL당 30~60개를 가하고 혼합하여 사용하는 것임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 유착방지제 재질은 큰 제한이 없고, 바람직하게는 1종 이상의 생분해성 재료를 이용하여 제조한다. 본 발명의 상기 유착방지제는 좀 더 바람직하게는 카복시메틸셀룰로스와 폴리에틸렌글라이콜 혼합용액으로부터 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 유착방지제가 카복시메틸셀룰로스 3~7% (w/v) 및 폴리에틸렌글라이콜 1~5% (w/v)을 포함하는 혼합용액으로부터 제조됨을 특징으로 한다. 카복시메틸셀룰로스의 경우 점증제로서 3% 미만의 경우 낮은 점도로 인해 홀러내림이 증가하여 유착방지 효율이 떨어지고, 7%를 초과하면 점성이 높아져서 주입압이 증가하여 인체 내에 주입할 경우 환자에게 통증을 유발하는 등의 문제를 발생시킬 수 있다. 폴리에틸렌글라이콜의 경우에는 카복시메틸셀룰로스와 폴리에틸렌글라이콜의 고분자 연쇄 사이에서 수소결합에 의한 인력이 작용하게 되는데 1~5% 농도범위 외에서는 카복시메틸셀룰로스의 경우와 마찬가지로 적절한 점도의 유지가 어려운 문제가 발생한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 유착방지제가 크림형, 겔형 및 액상 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 카복시메틸셀룰로스와 히알루론산 혼합용액이 카복시메틸셀룰로스 0.1~5%(w/v) 및 히알루론산 0.5~3%(w/v)를 포함함을 특징으로 하는 미소막 간격체-유착방지제 혼합물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 유착방지제용 미소막 간격체를 유착방지제와 혼합하여 사용하면 유착방지, 섬유화 억제, 신생혈관 억제, 항염증 효과가 시판 유착방지제와 유사하거나 좀 더 우수하였으며, 수술 부위에 적용시 흘러내림 방지 효과가 우수하였다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 미소막 간격체를 투명한 유리 용기에 넣고 촬영한 사진이다.

도 2는 본 발명의 미소막 간격체를 다량 제조하기 위한 주형이다.

도 3은 유착반응의 과정인 염증반응 확인을 위해 CD34와 ED1으로 웨스턴 블롯한 결과이다.

도 4는 척추 수술부위와 척수경질막 사이의 유착을 확인하기 위해 MMP-2, MMP-9으로 이 부위의 조직에 대해 RT-PCR을 진행한 결과이다.

도 5와 도 6은 각종 염증인자 확인을 위해 웨스턴 블롯 및 RT-PCR을 수행한 결과이다.

도 7은 염증을 확인하기 위해 H&E 염색을 수행한 결과이다.

도 8은 척수경질막의 섬유질 형성을 확인하기 위해 Masson trichrome 염색을 수행한 결과이다. 청색 부분은 섬유질을 나타낸다.

도 9는 염증을 평가하기 위해 COX-2 항체로 면역조직화학 염색을 수행한 결과이다.

상기 도 7~도 9에서 A: sham, B: 척추 수술 후 아무 것도 처리하지 않은 대조군, C: 본 발명의 척추 유착방지제 겔 + 미소막 간격체 (이하 "WHP"와 혼용함) 혼합 겔 처리군, D: 시판 Medishield 항유착 겔 처리군을 말한다.

도 10은 대조군 및 실험군에 대하여 흐름도를 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 구체적으로 살펴본다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0032] 1. 미소막 간격체 제조조건 수립

[0033] 가) 0.5% (w/v) 카복시메틸셀룰로스(CMC)와 1% (w/v) 히알루론산을 증류수에 충분히 용해한 후 실온에서 단순 건조하여 막 (60Φ, 26ml 기준)을 제조하였다.

[0034] 나) 위에서 제조한 막에 0.3% (w/v) 가교제 EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)를 적량 부가한 후 15℃에서 48시간 동안 가교반응을 진행하였다.

[0035] 다) 위에서 가교반응한 가교막을 순수 에탄올로 세척한 다음 PBS로 세척하고 실온에서 건조하였다.

[0036] 라) 건조한 가교막을 지름 2mm가 되도록 펀칭하여 미소막 간격체를 제조하였다.

[0037] 2. 미소막 간격체 제조를 위한 주형 제작

[0038] 실제 미소막 간격체를 제조할 경우 한꺼번에 대량의 미소막 간격체를 제조해야 하므로, 대량 제조용 미소막 간격체 제조를 위한 주형은 성균관대 3D 프린팅 하이브센터에 의뢰하여 제작하였다 (도 2). 각 구멍의 크기는 2x2mm, 높이는 7mm로 제작하였고, 주형의 재질은 PLA (poly L-lactic acid)이다.

[0039] 3. 미소막 간격체와 혼합할 척추 유착방지제 겔 제조조건 수립

[0040] 미소막 간격체는 척추 유착방지제 겔과 적절한 점성도로 혼합된 상태를 유지해야 하므로, 겔의 흐름도와 미소막 간격체의 겔 내의 침강속도를 비교하며 평가하였다 (표 2). 또한, 체내에서 체액과 겔 성분의 삼투압 차이를 알아보기 위해 척추 유착방지제 겔의 삼투압도 평가하여 최종적으로 적절한 겔 조건인 5% 카복시메틸셀룰로스와 3% PEO (polyethyleneoxide) 400이 혼합된 척추 유착방지제 겔을 선별하였다.

[0041] 선별된 척추 유착방지제 겔의 삼투압이 인체 체액의 삼투압 값인 290mOsm/kg보다 좀 더 높게 측정되었으나, 척추 유착방지제 겔은 상처 난 부위에서 흘러나오는 체액에 의해 지속적으로 희석될 수 있기 때문에 문제가 되지

량을 것으로 판단하였다.

[0042] **4. 미소막 간격체와 척추 유착방지제와의 통합조건 수립**

[0043] 제조된 미소막 간격체와 척추 유착방지제의 혼합물을 동물실험에 활용하기 위해 몇 가지 조건으로 척추 유착방지 혼합물을 제조하였다. 미소막 간격체의 밀도를 0, 30 및 60개/ml 척추 유착방지제 조건으로 제조하고 멸균처리하였다. 이때 미소막 간격체와 척추 유착방지제가 혼합된 혼합물을 상온에 보관하였을 때 시간 경과에 따라 혼합물 내에서 미소막 간격체의 변형 및 용해 여부를 관찰하였으나, 한 달 이상 특별한 변화는 관측되지 않았다.

[0044] **5. 동물 실험**

[0045] 한림대학교 실험동물센터에서 제공되는 랫트를 사용하였다. 동물은 23℃, 60% 습도 조건에서 12시간 밝게/12시간 어둡게 하여 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 접근할 수 있도록 공급하였다. 실험동물 취급 및 관리는 실험동물 취급 및 관리는 최근의 국제법과 정책에 따라 수행하였고 [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996], 한림대 병원 연구동물 관리 및 사용에 관한 위원회에서 승인받았다. 모든 실험에서는 이용되는 동물 수와 본 발명에서 사용되는 공정에 의한 고통을 최소화하기 위해 노력하였다.

[0046] 10주령 이후의 스프래그-돌리 랫트를 이용해 실험을 진행했다. 체중은 250~300g이었다. 마취는 졸레틸:럼폰을 9:1 비율로 혼합하여 체중 100g 당 40ul의 양을 근육주사로 투여했다. 그 후 요추 (lumbar vertebrae)를 제거하고 척수경질막 (spinal dura mater)을 노출시켰다. 삼균, 척추 수술 후 아무 것도 처리하지 않은 대조군, 본 발명의 척추 유착방지제 + 미소막 간격체 혼합물 처리군 (이하 "WHP"로 표시함), 시판 Medishield 항유착 겔 처리군으로 나누어 실험을 수행했다. 이후 절개부위를 봉합사로 봉합하고 7일 후와 14일 후 확인 실험을 수행했다.

[0047] **6. 역전사 PCR (RT-PCR)**

[0048] 수술 7일 및 14일 후의 랫트를 CO₂를 이용해서 희생시킨 다음 수술부위의 경막과 주변 조직을 채취하였다. 채취한 조직을 액체 질소로 균질화한 후 트리졸 제제 키트 (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 얻어내고 IL-6, IL-1β, IL-12, GAPDH, MMP-2, MMP-9 프라이머를 이용하여 역전사한 후 SDS-PAGE로 확인하였다. 10,000U의 역전사 효소를 이용하였고, 1μg/μl 농도의 oligo-dT 프라이머를 사용했다.

[0049] IL-6 전방 프라이머: 5'-AGGATACCACTCCCAACAGACCT-3',

[0050] IL-6 후방 프라이머: 5'-CAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC-3',

[0051] IL-1β 전방 프라이머: 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',

[0052] IL-1β 후방 프라이머: 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3',

[0053] IL-12 p40(β) 전방 프라이머: 5'-CCAAGAACTTGCAGCTGAAG-3',

[0054] IL-12 p40(β) 후방 프라이머: 5'-TGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3',

[0055] IL-12(α) p35 전방 프라이머: 5'-GATGAGCTGATGCAGGCC-3',

[0056] IL-12(α) p35 후방 프라이머: 5'-AGTCCTCCACCTCGTTGTCCGTGA-3',

[0057] MMP-2 전방 프라이머: 5'-ACCTGGATGC-CGTCGTGGAC-3',

[0058] MMP-2 후방 프라이머: 5'-GTGGCAGCACCAGGGCAGC-3',

[0059] MMP-9 전방 프라이머: 5'-CCTGCCAGTTTCCATTCATC-3',

[0060] MMP-9 후방 프라이머: 5'-CTACGGCCACTACTGTGCCT-3',

[0061] GAPDH 전방 프라이머: 5'-CAAAGCCAGAGTCCTTCAGA-3',

[0062] GAPDH 후방 프라이머: 5'-GATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'.

[0063] **7. 웨스턴 블롯 분석**

[0064] 척수경질막 노출 수술을 한 랫트들은 각가 7일 및 14일 후에 희생시켜 척수경질막과 근처 조직을 박리해내었다. 시료를 채취하여 웨스턴 블롯을 진행했다. 폴리아크릴아마이드 젤을 전개한 후에 나이트로셀룰로스 막으로 전이

했다. TBS-T 완충용액에 5% 농도로 탈지분유를 녹여 만든 용액으로 한 시간 동안 블로킹했다. 1차 항체로 신생 혈관 내피세포를 확인하기 위해 CD34 항체를 사용했고, 대식세포 생성을 확인하기 위해 ED1 항체를 각각 한 시간 처리했다. 그 후 2차 항체를 한 시간 동안 처리하고, 화학발광기질을 사용하여 탐지했다.

[0065] 또한, 염증반응 확인을 위해 대표적인 염증인자인 COX2와 iNOS를 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0066] 8. 면역조직화학 분석

[0067] 12주령 이후의 랫트로 수술을 진행하고, 7일 후 조직을 확인했다. 랫트를 마취시킨 후 4% 파라포름알데하이드를 0.1M PBS (pH 7.4)에 녹인 용액으로 관류시켰다. 파란편이 들어있는 4% 파라포름알데하이드로 시편을 고정하였다. 시편은 6mm의 두께로 절단했다. 그 후에 염증도를 평가하기 위한 H&E 염색, COX-2 항체 염색, 섬유화도 평가를 위한 Masson trichrome 염색을 수행했다.

[0068] 9. 흐름성 시험

[0069] 가로 20cm, 세로 20cm, 두께 5mm 유리판을 제작하여, 37℃ 분위기 하 (체내 조건)에서 미소막 간격체를 첨가하지 않은 대조군과 미소막 간격체를 혼합한 실험군으로 나눈 후 각각 1ml씩 유리판 상위에 분주한 후, 수직 (90°)으로 유지하여 바닥까지 흘러내린 시간을 측정하였다. 측정은 10회 반복하여 평균 내었다. 단, 실험군에는 미소막 간격체를 60개/ml 포함하는 것을 이용하였다.

[0070] 결과: 척추 유착유발 동물모델의 제조

[0071] 12주령 이상 랫트의 요추 일부분을 제거하고, 주위 근육들을 제거한 후에 척추 신경이 드러나게 하였다. 삼군, 노출된 척수경질막에 아무것도 처리하지 않은 비처리군, 척추 수술 후 본 발명의 유착방지제와 미소막 간격체 혼합물을 처리한 군, 시판 유착방지제를 처리한 군과 같이 네 개의 군으로 나누었다. 상기 비처리군, 본 발명 유착방지제와 미소막 간격체 혼합물 처리군, 시판 유착방지제 처리군은 처리 (또는 비처리) 후 봉합하여 척추 동물모델을 만들었다. 7일 또는 14일 후 실험에 사용한 랫트들을 CO₂를 이용해서 희생시키고, 조직염색을 진행했다. 척수경질막 섬유화를 확인하기 위해 Masson trichrome 염색을 진행했다. 대조군에서만 척추를 확인할 수 있었다. 그 외의 시험군에서는 척추가 제거되어 보이지 않았다. 파란색으로 보이는 부분이 유착으로 인한 섬유화를 보여주는 결과이다. 본 발명의 유착방지제와 미소막 간격체를 혼합한 혼합물이 시판 유착방지제를 처리한 것과 유사하거나 좀 더 우수한 섬유화 억제 효과를 나타내었다.

[0072] 척추 수술부위와 척수경질막 사이의 유착 정도를 확인하기 위해 MMP-2 (Matrix metalloproteinase-2), MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) 항체를 이용하여 RT-PCR을 진행했다. 이 부위의 조직을 채취해 MMP-2, MMP-9 프라이머를 이용하여 RT-PCR 진행한 결과, 본 발명의 유착방지제와 미소막 간격체를 혼합한 혼합물이 시판 유착방지제를 처리한 것과 유사하거나 좀 더 우수한 유착 방지 효과를 나타내었다.

[0073] 유착을 확인하기 위하여 이 부위의 조직을 채취해 시료로 만들어 웨스턴 블롯을 진행했다. 마찬가지로 ED1 항체로 대식세포 생성을 확인했고, CD34 항체로 신생혈관 내피세포를 확인했다.

[0074] 조직 유착 과정 중 일어나는 염증 반응을 확인하기 위해 COX-2 항체를 이용하여 조직 면역염색을 진행한 결과, 비처리군에서 척수경질막 쪽의 세포 사멸 정도가 증가한 것을 확인했다. 대조적으로 본 발명의 유착방지제와 미소막 간격체를 혼합한 혼합물 처리군은 항염증 효과가 있는 것을 확인했고, 시판 유착방지제 처리군도 항염증 효과가 있었다. 이 부위의 조직으로 주요 염증 인자들 (COX2, iNOS, IL-6, IL-1β, IL-12)을 확인한 결과, 본 발명의 유착방지제와 미소막 간격체를 혼합한 혼합물이 시판 유착방지제를 처리한 것과 유사하거나 우수한 항염증 효능을 나타냄을 확인했다.

[0075] 아래 표 2는 유착도 평가방법으로 본 발명의 실시예에 의한 척추 유착방지제 + 미소막 간격체 혼합물 처리군 등을 평가한 결과를 표로 나타낸 것이다.

[0076] * 유착 정도 평가점수

[0077] 0: 유착현상 없음, 1: 쉽게 확인할 수 있는 평면을 가진 아주 약한 필름상의 유착, 2: 살짝 떼어내면 떨어질 정도의 약한 유착, 3: 세게 떼어내면 떨어지는 정도의 보통의 유착, 4: 분리하기 어려운 강한 유착.

표 1

[0078]

구분	농도	삼투압 mOsm/kg	흐름도	막 침강속도
대조군: 유착방지제	2% CMC + 1% PEG	646	0.5초	-
	3% CMC + 2% PEG	700	1초	-
	5% CMC + 3% PEG	792	9초	약 30분
실험군: 미소막 간격체 + 유착방지제	미소막 간격체 (1% HA + 1% CMC) + 유착방지제 (5% CMC + 3% PEG)	606	7초	약 15분
	미소막 간격체 (1% HA + 0.5% CMC) + 유착방지제 (5% CMC + 3% PEG)	753	15초	약 40분

표 2

[0079]

시료	점수
대조군 (삼군)	0
유착 유발 수술 후 비처리군	4
유착 유발 수술 후 유착방지제와 미소막 간격체를 혼합한 혼합물 처리군	1
유착 유발 수술 후 시판 유착방지제 처리군	1

표 3

[0080]

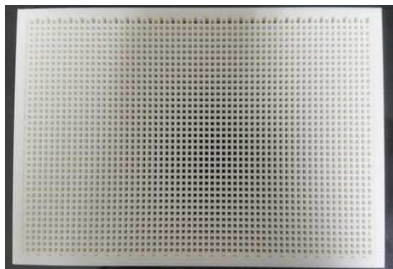
횟수	시간(분)	
	대조군	실험군
1	3.6	6.1
2	4.2	6.5
3	4.5	5.8
4	3.7	6.8
5	3.5	6.7
6	3.1	6.2
7	4.2	5.5
8	4.6	5.9
9	3.5	6.3
10	3.7	6.6
평균	3.86	6.24

도면

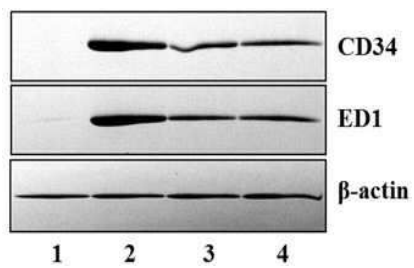
도면1



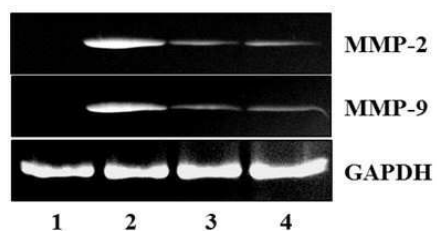
도면2



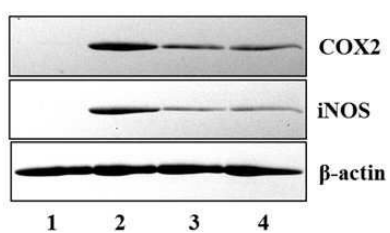
도면3



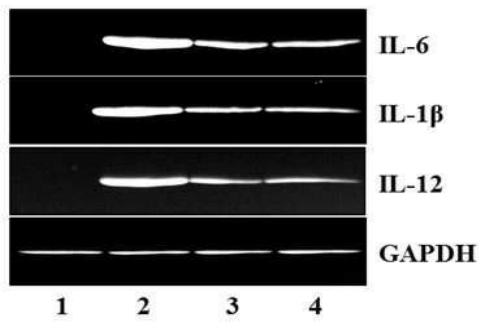
도면4



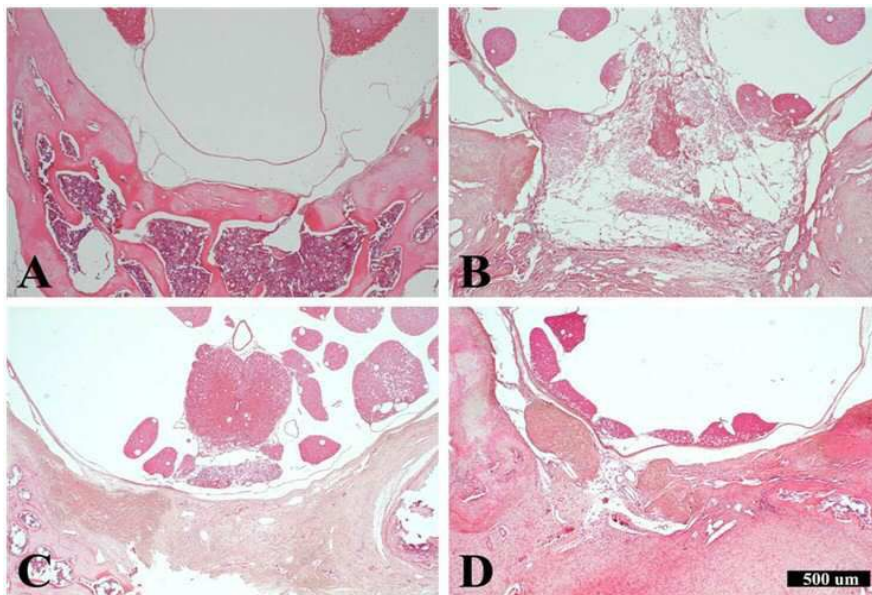
도면5



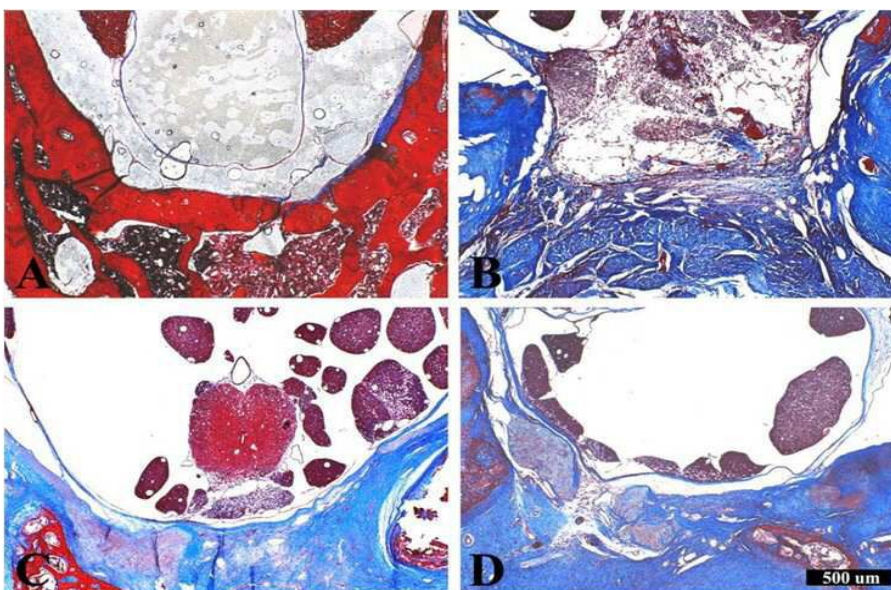
도면6



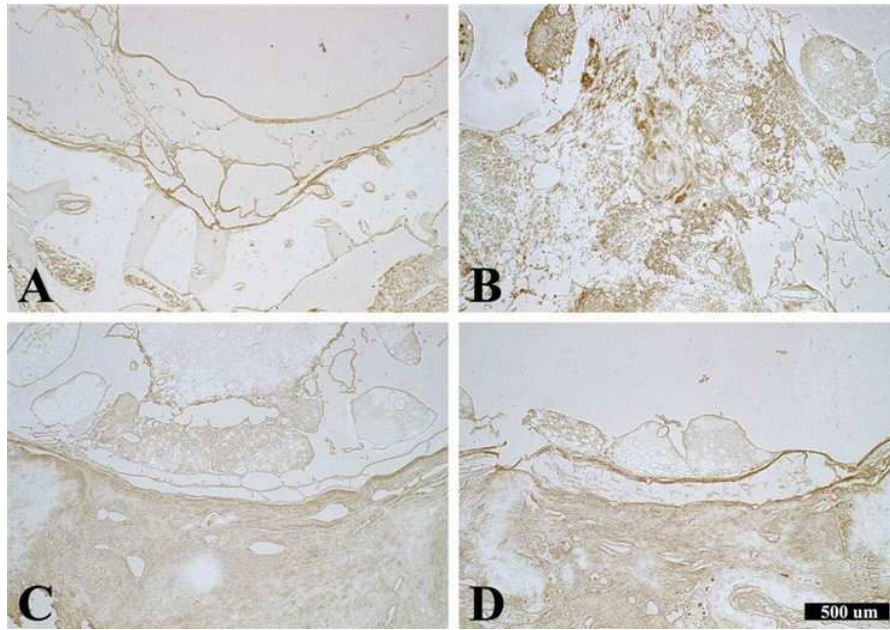
도면7



도면8



도면9



도면10

