



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0118785

(43) 공개일자 2015년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0044843

(22) 출원일자 2014년04월15일

심사청구일자 2014년04월15일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

임재열

인천광역시 연수구 해송로30번길 19 웰카운티3단지 305-2202(송도동, 송도웰카운티3단지아파트)

김영모

서울특별시 양천구 목동동로 430, 607동 903호(목동, 목동6단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인네이트

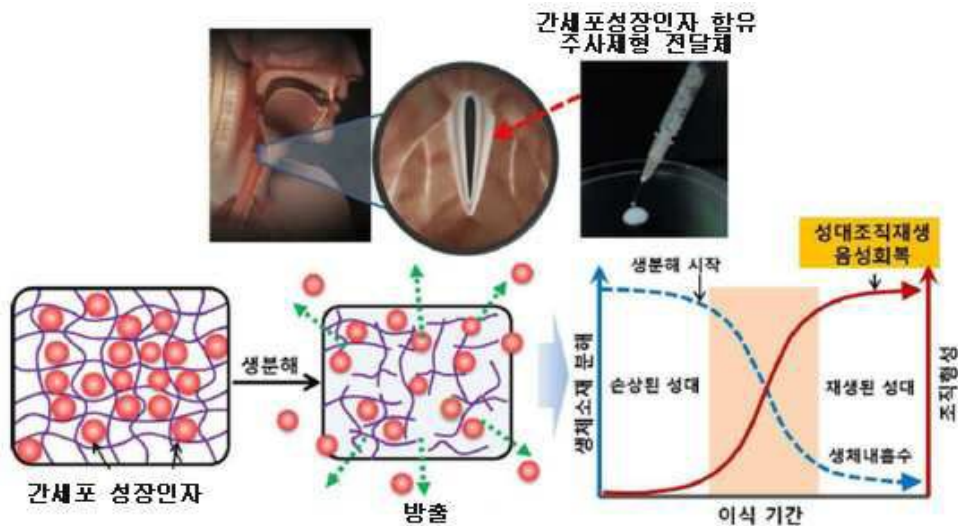
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 약물 전달체 및 이를 포함하는 성대 재생을 위한 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 간세포 성장인자가 소장점막하조직에 로딩, 부착되어 있는 약물 전달체 및 이를 함유하는 훼손된 성대 조직을 회복시켜 예를 들어 난치성 음성 이상 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약물 전달체는 다양한 제형으로 제조될 수 있으며, 특히 주사제 형태로 제형화가 가능하다. 따라서 성대 조직이 훼손된 환자의 성대 부위로 본 발명의 약물 전달체를 국소주입에 의해 투여하여 성대 조직을 회복, 치유할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최정석

인천광역시 중구 인항로 27 (신흥동3가)

김문석

인천광역시 남동구 백범로101번길 17, A동 403 (만수동, 우미빌라)

김다연

울산광역시 울주군 언양읍 반구대로 1291

이우기

경기도 군포시 산본로432번길 25, 1222-1302 (산본동, 한양목련아파트)

박순형

서울특별시 양천구 목동서로 280, 805동 606호 (신정동, 목동신시가지아파트8단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1625

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 성대고유세포의 병리적 역할 규명 및 유전체 분석을 통한 성대손상 제어인자 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)가 생체적합성 지지체인 소장점막하조직(small-intestine submucosa, SIS)에 로딩되어 있는 약물 전달체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 간세포 성장인자는 각각 상기 소장점막하조직에 0.1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 로딩되어 있는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 소장점막하조직은 인간 이외의 포유동물에서 유래된 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약물 전달체는 주사제 형태로 제형화되어 있는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 약물 전달체는 성대 조직의 재생을 위하여 사용되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 하나의 항에 기재되어 있는 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 음성 이상 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 약물 전달체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 훼손된 성대 조직에 직접 투여가 가능하여 훼손된 성대 조직을 회복, 치유, 재생할 수 있는 약물 전달체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

다른 동물과 달리 인간은 특정한 음성(voice)을 통하여 의사를 표현할 수 있다. 이처럼 음성은 인간에게 있어서 사회적 관계 설정의 기본 도구로서, 상당수의 노동인구(예를 들어 미국에서는 약 24%의 노동인구)가 음성을 기본 수단으로 하여 직업을 영위할 정도로 인간의 생존을 위한 필수적인 기능 중 하나이다. 또한 사회적 환경의 변화와 함께 삶의 질이 향상되면서 그 중요성은 더욱 중요시 되고 있다.

- [0003] 음성은 성대 및 후두기관에 의해 만들어진 소리를 말하며, 호기시 성도를 지나는 공기에너지가 성대의 진동에 의해 소리에너지로 변환된다. 성대의 진동에 의해 생성되는 성대음은 공명과 조음 과정을 거쳐 목소리로 완성된다. 음성을 생성하는 체계는 호흡중추로서의 폐, 발성중추로서의 후두(larynx)내 성대(vocal cords), 공명 및 조음 기관으로서의 인두 및 구강으로 구성되어 있다. 이 중 음성을 생성하는 성대는 고유의 다층구조(multi-layered structure)의 진동(vibration)을 통하여 공기에너지를 소리에너지로 변환하며 이 때 성대의 고유의 다층구조의 생역학적(biomechanical) 특성이 성대의 진동과 음성의 질을 결정하는 매우 중요한 요소이다.
- [0004] 성대는 후두를 앞뒤로 가로지르는 두 개의 점막 주름이 V자처럼 이루어져 있는데, 이 주름을 통해 허파에서 공기가 후두를 지나가면서 목소리를 만들어낸다. 성대는 공기를 들이쉴 때 점막 주름이 이완되면서 열리고, 숨을 참거나 목소리를 낼 때는 긴장되어 좁아진다. 한 쌍의 성대 사이를 성대문틈새(성대열)라 하는데, 성대와 성대문틈새를 합쳐서 발성장치인 성대문(성문)이라고 한다. 성대 위로 한 쌍의 실주름이 있는데, 발성 역할이 없어 거짓성대(가성대)라고 부른다.목의 위쪽에 위치하며, 방폐연골과 반지연골 상단에 있는 한 쌍의 모뿔연골 사이에 있다.
- [0005] 음성을 생성하는 성대의 다층구조는 음색, 음질, 음의 높낮이를 결정하는 핵심 요소가 되며, 이 다층구조는 "Body-Cover theory (Hirano, 1981)"로 설명될 수 있는데, body에 해당하는 성대근층과, cover에 해당하는 상피층(Reinke 공간) 사이에 전이 영역인 성대인대가 존재한다. 각각의 층 내에는 성대의 생역학적 특성(점, 탄성)을 결정하는 세포인 섬유아세포(fibroblast) 및 단백질인 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 히알루론산(hyaluronic acid) 등이 유기적으로 결합되어 있으며, 음성의 음색과 음질은 성대 조직 내의 생역학적 특성(점·탄성)에 의해 결정된다. 이러한 성대의 생역학적 특성은 성대 다층 구조내의 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM) 성분과 조성에 의해 결정된다.
- [0006] 최근에는 흡연, 환경오염에 따른 후두암 발생, 수술 및 방사선 치료, 음성 오남용, 외상, 노화에 따른 성대 위축 등으로 인하여 난치성 음성 장애가 과거에 비하여 빈번하게 발생하고 있다. 난치성 음성장애 질환은 성대손상으로 인한 성대진동이상, 성대마비나 위축에 의한 성문폐쇄부전으로 인한 음성장애로 분류할 수 있다.
- [0007] 성대진동이상은 수술, 염증, 오남용, 외상, 방사선 치료 등으로 성대가 손상된 경우 발생하며 거친 목소리, 음성피로, 경부 통증으로 사회생활 영위의 어려움을 겪게 된다. 치료로 음성치료 및 수술적 치료를 시행하나 아직까지 손상된 성대조직을 근본적으로 재생할 수 있는 치료방법은 없다. 음성의 폐쇄부전은 수술, 갑상선·폐·식도암, 노인성 성대에 의한 성대 마비로 애성(원목소리), 호흡곤란, 연하곤란, 흡인, 흡인성 폐렴 등이 발생한다. 성대 내부로 이물을 주입하는 수술이나 후두골격수술을 시행하는 치료를 시행하기도 하나 성대 내부로 이물을 주입하는 시술에서는 대부분 일시적인 효과만을 보일 뿐이며, 수술적 치료의 경우 침습적이라는 단점이 있다.
- [0008] 따라서 음성장애는 고식적 약물, 수술 치료로는 성대 고유의 고도의 음성생성 기능을 회복시키기 어려운 난치병으로 아직까지 근본적인 해결 방법은 개발되지 못하였다. 이와 같은 난치성 음성장애 질환을 치료하기 위해서는 비가역적 원인에 따른 성대 조직의 변화에 대한 이해를 바탕으로 음성 장애를 유발하는 성대의 메커니즘을 규명하고 이를 통해 손상된 성대의 기능을 보존하기 위한 치료전략을 수립하여야 할 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해소하기 위하여 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 훼손된 성대 조직의 재생을 위하여 생체활성인자가 지지체에 로딩, 부착되어 있는 약물 전달체를 제공하고자 하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 훼손된 성대 조직으로 투여가 가능하여 훼손된 성대 조직을 회복할 수 있는 약물 전달체를 제공하고자 하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 생체적합성이 우수하고 다양한 형태로 제형화가 가능하여 손상된 성대 조직을 회복, 치유하여 성대 이상 질환을 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 후술하는 발명의 구성 및 도면을 통하여 더욱 분명해질 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 전술한 목적을 가지는 본 발명은 생체활성인자로서 간세포 성장인자가 생체적합성이 우수하고 다양한 제형화가 가능한 소장점막하조직에 로딩, 부착되어 있는 약물 전달체 및 이러한 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 성대 조직의 회복 및/또는 치유를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0014] 즉, 본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명은 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)가 생체적합성 지지체인 소장점막하조직(small-intestine submucosa, SIS)에 로딩되어 있는 약물 전달체를 제공한다.

[0015] 예시적으로, 상기 간세포 성장인자는 각각 상기 소장점막하조직에 0.1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 로딩될 수 있다.

[0016] 예시적인 실시형태에서, 상기 소장점막하조직은 인간 이외의 포유동물에서 유래될 수 있으며, 예를 들어 소, 돼지, 토끼 또는 쥐에서 유래된 소장점막하조직을 사용할 수 있다.

[0017] 예시적으로 상기 약물 전달체는 주사제 형태로 제형화될 수 있으며, 상기 약물 전달체는 손상된 성대 조직을 재생하는데 활용될 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 전술한 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 음성 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0019]

발명의 효과

[0020] 본 발명에서는 간세포 성장인자가 소장점막하조직에 부착, 로딩되어 있는 약물 전달체 및 이러한 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 손상된 성대 조직을 회복, 재생하는 약학적 조성물을 제안하고 있다.

[0021] 본 발명에 따른 약물 전달체는 간세포 성장인자가 소장점막하조직에 로딩되어 있으며, 이들 소재는 다양한 형태로 제형화가 가능하다. 따라서 본 발명에 따른 약물 전달체 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 주사제 형태로 제형화하여 인체의 성대 조직으로의 국소 투여가 가능하기 때문에, 손상된 성대 조직으로의 생착율을 및 약학적 활성을 최적화할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 약물 전달체는 손상된 성대 조직을 회복, 재생시킬 수 있는 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

[0022] 아울러, 본 발명에 따른 약물 전달체를 사용하여 간세포 성장인자를 장기간 지속적으로 손상된 성대 조직으로 방출, 분비할 수 있기 때문에, 손상된 성대 조직의 치유에 매우 효과가 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 발명에 따른 약물 전달체를 유효 성분으로 활용하여 다양한 원인에 의하여 유발되는 난치성 음성 이상 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 약물 전달체를 주사제 형태로 제형화하여 손상된 성대 조직으로 투여함으로써, 손상된 성대 조직을 회복, 치유하는 과정을 개략적으로 도시한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 돼지 소장점막하조직(SIS) 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자의 누적 방출량을 측정한 그래프이다.

도 3a는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 토끼의 성대 조직에 상처를 유도하고, 소장점막하조직 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자로 구성되는 약물전달체를 투여한 뒤, 3개월이 경과한 시점에서 토끼 성대주름을 H-E, Masson's trichrome, 및 Verhoeff's van Gieson 염색법으로 염색한 조직을 촬영한 사진이다. 도 3a에서 bar는 100 μm 이다.

도 3b의 좌측은 Manson's trichrome 염색에서 푸른색으로 나타나는 콜라겐 영역을 양적으로 측정한 그래프이고, 도 3b의 우측은 Verhoeff's van Geison 염색에서 검은색으로 나타나는 엘라스틴 영역을 양적으로 측정한 그래프이다. 도 3b에서 *는 $P < 0.05$ 를, **는 $P < 0.01$ 를 의미한다.

도 4a는 발명의 예시적인 실시예에 따라 토끼의 성대 조직에 상처를 유도하고, 소장점막하조직 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자로 구성되는 약물전달체를 투여한 뒤, 면역조직학적 염색을 이용하여 성대주름의 세포의 기질에서의 변화를 측정한 사진이다.

도 4b는 재생된 성대주름의 세포의 기질의 함량에 대한 Densitometry 분석 결과를 나타낸다. 도 4b에서 *는 $P < 0.05$ 를, **는 $P < 0.01$ 을 의미한다.

도 5는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 토끼의 성대 조직에 상처를 유도하고, 소장점막하조직 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자로 구성되는 약물전달체의 투여 전 및 후의 성대주름의 내시경 사진이다.

도 6은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 토끼의 성대 조직에 상처를 유도하고, 소장점막하조직 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자로 구성되는 약물전달체를 투여한 뒤, 점막 파동을 측정한 결과이다. 도 6에서 *는 $P < 0.05$ 를, **는 $P < 0.01$ 을, ***는 $P < 0.001$ 을 의미한다.

도 6은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 토끼의 성대 조직에 상처를 유도하고, 소장점막하조직 현탁액에 로딩된 간세포 성장인자로 구성되는 약물전달체를 투여한 뒤, 성대 조직의 점탄성을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하, 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명은 손상된 성대 조직의 재생을 위하여 소장점막하조직에 간세포성장인자가 로딩되어 있는 약물 전달체 및 이를 이용하여 손상된 성대 조직을 회복, 재생하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 간세포 성장인자를 소장점막하조직에 로딩한 약물 전달 시스템 및 이를 활용하여 손상된 성대 조직을 치유하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0025]

본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 간세포 성장인자가 소장점막하조직에 로딩되어 있는 약물 전달체를 이용하여 손상된 성대 조직의 회복 및 재생을 위한 모식도가 도 1에 도시되어 있다. 본 발명은 손상된 성대 조직의 보존 및/또는 재생과 회복을 위하여 조직공학 및 재생의학에서 사용되고 있는 조직활성인자(간세포 성장인자)와 이러한 조직활성인자의 전달을 위한 지지체(소장점막하조직)를 이용하여 손상된 성대 조직을 회복, 재생시키는 치료 기술을 확립하기 위한 것이다.

[0026]

본 발명에 따르면 조직 재생을 위한 물질을 적절한 지지체에 부착하여 이를 복잡한 성대의 미세 다층 구조에 적용하여 재생 물질이 손상된 성대 조직에 장기간 안정적으로 전달할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 약물 전달체는 주사제 형태로 제형화될 수 있기 때문에, 성대 조직으로의 국소 투여가 가능하고, 조직 재생 물질의 방출 등을 조절함으로써 성대 반흔의 치료 및 조직 재생에 활용될 수 있다.

[0027]

다양한 원인에 의하여 유발되는 난치성 음성 장애는 성대 손상으로 인한 성대 진동이상, 성대마비나 위축에 의한 성문폐쇄부전으로 인한 음성 장애로 분류될 수 있다. 하지만 현재까지 수술적 치료 방법 이외에는 이러한 난치성 음성 장애를 근본적으로 치료하지 못하였다. 이에 본 발명은 적절한 조직재생인자를 적절한 지지체에 부착한 약물 전달체를 활용하는 경우, 손상된 성대 조직을 회복, 재생시킬 수 있으며, 이에 따라 난치성 음성 장애를 치료할 수 있다는 점에 근거하고 있다. 본 발명에 따른 약물 전달체 및 이를 함유하는 약학적 조성물은 다양한 형태로 제형화될 수 있으며, 예시적으로 도 1에 도시된 것과 같이 주사제 형태로 개발될 수 있다. 따라서 손상된 성대 조직으로 직접적으로 투여함으로써 효율적으로 손상된 성대 조직을 재생시킬 수 있다.

[0028]

각종 세포의 분열이나 성장 및 분화를 촉진하는 조직성장인자는 생체기능을 조절함으로써 질환을 예방하고 치료가 가능하다. 이 중에서 성대 창상치유 촉진을 위한 혈관형성인자(Angiogenic factor)를 체내의 손상 조직으로 전달하였을 경우, 세포의 이식이 없이도 병변 부위주변에 내재하는 세포들의 조직재생을 촉진한다. 본 발명에 따라 지지체에 부착되는 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)는 생체활성인자의 하나이다. 각종 세포의 분열이나 성장 및 분화를 촉진하는 생체활성인자들은 생체 기능을 조절함으로써 질환의 예방 및 치료에 활용될 수 있다. 특히 생체활성인자들을 체내의 손상조직으로 전달하였을 경우, 세포의 이식 없이 병변 부위의 주변에 내재하는 세포들의 조직 재생을 촉진할 수 있다.

[0029]

특히 훼손되거나 손상된 조직이 치유될 때, 손상된 조직 내의 세포에서 분비되는 염증 매개체에 의하여 상처 치유반응이 개시된다. 상처 치유반응은 혈액응고 활성화, 염증반응, 근섬유모세포 활성화, 혈관신생 및 세포 재생 등의 일련의 반응으로 구성되고, 다양한 사이토카인이나 성장인자에 의해 조정된다. 하지만, 이러한 자극이 장기간 지속되면 섬유화 인자와 항섬유화 인자 사이의 균형이 파괴되고 손상된 조직이 섬유모세포로 치환되어 결

합조직으로 변형되는 섬유화를 초래하게 된다. 이러한 섬유화 과정에서 가장 중요한 신호전달 물질이 형질전환 성장인자-베타1(transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)이다.

- [0030] 본 발명에 따라 사용되는 간세포 성장인자는 간세포의 DNA 합성을 촉진하고 세포 증식을 유도할 뿐만 아니라, TGF- $\beta 1$ 의 활성화에 의한 섬유화 과정을 억제하는 단백질이다. 단백질 분해에 의해 활성화된 HGF는 외배엽과 내배엽 세포 기원 세포에 존재하는 c-MET proto-oncogene 수용체에 결합하여 MAPK 신호전달 경로, PI3K-Akt 신호전달 경로 등을 통하여 항세포자멸사(anti-apoptosis), 항염증, 항섬유화, 및 신생혈관생성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0031] 마찬가지로 성대 조직이 손상될 때, 섬유화인자와 항섬유화인자 사이의 균형이 파괴되고 손상 조직이 결합조직으로 변형되는 섬유화를 초래된다. 성대 조직손상(섬유화) 완화를 위한 항섬유화인자(Antifibrotic factor)의 추가적 전달이 필요하며, 특히 섬유화 과정에서 가장 중요한 신호전달 물질인 TGF- $\beta 1$ 을 효과적으로 조절할 수 있는 간세포성장인자(HGF) 등을 활용하여 조직 손상을 예방하거나 또는 재생하는데 활용될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따르면 후술하는 적절한 지지체에 간세포 성장인자가 로딩, 부착되어 손상된 성대 조직을 효율적으로 회복, 재생시킨다. 특히 본 발명에서 소장점막하조직에 로딩된 간세포 성장인자를 성대 조직으로 투여하면 장기간 성대 조직에 잔류하여, 성대주름(vocal fold)의 세포외기질에 다량 존재하는 히알루론산의 합성을 촉진하고 콜라겐의 생성을 감소시켜 성대주름의 섬유아세포에 영향을 미친다. 예시적으로, 간세포 성장인자는 지지체에 0.1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 로딩될 수 있다. 본 발명에 따르면 간세포 성장인자의 투여를 통하여 손상된 성대 조직의 기능을 효율적으로 회복, 재생시킬 수 있으며, 장기간 손상된 성대 조직으로 방출될 수 있도록 조절하여 효율적으로 음성 이상 질환을 치료하는데 활용될 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따라 간세포 성장인자를 생체 내로 전달하기 위하여 사용되는 지지체는 생체적합성 물질로 제조될 수 있는데, 바람직하게는 소장점막하조직(small-intestine submucosa, SIS)이다. 세포가 존재하지 않고 면역거부 반응이 거의 일어나지 않는 SIS는 콜라겐 I, III형 및 소량의 IV, V, VI으로 구성되어 있다. 콜라겐은 뼈, 이, 연골, 건 등을 구성하는 당단백질로서 세포와의 친화력이 매우 우수하고, 생체 내 거부반응이 적은 천연재료이다. 또한 SIS는 피브로넥틴, 글리코사미노글리칸, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린 설페이트, 헤파린을 포함하는 세포외기질이며 또한 사이토카인으로 섬유아세포 성장인자, 신경성장인자, 상피세포 성장인자, 인슐린 성장인자 및 전환성장인자를 다량 함유하고 있다.
- [0034] 이처럼, 소장점막하조직 내에 ECM 및 사이토카인이 존재하기 때문에 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 줌으로써 조직재생 이외에도 많은 분야에 응용될 수 있다. 소장점막하조직은 90% 이상의 수분흡수 능력을 가지며, 약 60 ~ 90 일간의 분해기간을 갖는 생분해성 기질로서 자체의 기계적 물성도 비교적 양호하다.
- [0035] 소장점막하조직에 함유된 이들 인자들은 세포의 기능적인 면인 세포 점착이나 성장 및 분화 등에 영향을 주며 상처 치유나 조직 재생에 유용하게 작용할 수 있다. 특히 소장점막하조직은 패치의 형태로 제작이 가능할 뿐만 아니라, 동결과쇄를 이용하여 분말 형태로 제조하여 주사제형 전달체로서 적용될 수 있으며 모든 제형에서 간세포 성장인자를 용이하게 부착할 수 있기 때문에 이를 응용하여 조직을 재생하는데 이용될 수 있다.
- [0036] 기존에 조직활성인자를 전달할 때 전신 투여 및 구강 투여 방식이 사용되었으나, 이러한 투여 경로에서는 나쁜 약물 동력학적 프로파일 및 상대적으로 큰 사이즈, 조직 내부로의 낮은 침투성, 높은 농도에서의 독성의 위험성이 있어 적용에 한계가 있었다. 하지만, 본 발명에 따르면 간세포 성장인자를 통제할 수 있으며 국부적으로 원하는 위치에 전달할 수 있다. 아울러, 생체 내 독성이 적고 생체적합성이 있는 천연 소재를 활용하여 이러한 문제점을 해소하였다. 특히 소장점막하조직은 동결과쇄를 이용하여 분말 형태로 제조하여 주사제형 전달체로 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 모든 제형에서 다양한 조직활성인자를 함유할 수 있다는 이점을 가지고 있다.
- [0037] 예를 들어, 본 발명에 따라 소장점막하조직에 부착되는 간세포 성장인자로 구성되는 약물 전달체는 도 1에 도시한 것과 같이 주사제형 전달체로도 활용될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 약물 전달체는 주사를 통한 국소주입의 약물 전달이 가능하다. 간세포 성장인자와 같은 조직활성인자는 때때로 종양 발생과 연관이 있다고 알려져 있기 때문에, 전신 투여 방식에 비하여 주사제 형태로 국소 투여가 가능한 본 발명의 약물 전달체는 상당한 이

점을 갖게 된다. 더욱이 본 발명의 약물 전달체에서 간세포 성장인자는 점진적으로 서서히 방출되기 때문에 손상된 성대 조직의 재생에 효과적으로 작용할 수 있다.

[0038]

따라서 본 발명에 따른 약물 전달체에 함유되어 있는 간세포 성장인자가 표적 조직인 성대 조직으로 전달될 때 중간에 침착되어 표적 조직으로 전달되지 못하는 양을 크게 줄일 수 있는 이점을 갖게 된다. 더욱이 본 발명의 약물 전달체를 사용하면, 지지체에 부착, 로딩되어 있는 간세포 성장인자가 서서히 성대 조직으로 방출, 분비되므로, 손상된 성대 조직을 효율적으로 재생하는데 활용될 수 있다. 본 발명의 약물 전달체에서 지지체로 사용되는 소장점막하조직은 인간을 제외한 포유류의 소장점막하조직을 사용할 수 있다. 예를 들어 소, 돼지, 토끼 및 쥐 중에서 선택된 포유류 유래의 소장점막하조직을 사용할 수 있다. 또한 예시적인 실시형태에서 소장점막하조직은 하이드로겔 상태의 것을 사용할 수 있다.

[0039]

이와 같이 본 발명에 따르면 성대 조직의 재생을 위한 조직재생인자를 전달하기 위하여 예를 들어 주사제를 통한 국소 주입 약물 전달이 가능하다. 따라서 본 발명에 따른 조직 재생용 약물 전달체를 사용하여 성대 조직에 전달할 때 조직재생인자로 사용되는 간세포 성장인자의 활성을 최적화함으로써, 성대 조직의 재생 효과를 크게 향상시킬 수 있다. 본 발명의 예시적인 실시예에서 확인한 바에 따르면 간세포 성장인자가 소장점막하조직에 부착되어 있는 약물 전달체를 사용하면 간세포 성장인자가 점진적으로 성대 조직으로 방출될 수 있다(도 2 참조). 실제 동물 모델에 본 발명의 약물 전달체를 투여하면 성대 조직에서 콜라겐의 침착이 줄어드는 반면에 히알루론산의 생성이 증가한다(도 3a 내지 도 3b, 도 4a 및 도 4b). 아울러, 본 발명에 따라 상처를 유발한 성대 조직으로, 소장점막하조직에 로딩된 간세포 성장인자를 성대 조직에 투여하면 상처가 크게 감소하였으며(도 5 참조), 점막 파동이 크게 높아진다(도 6 참조). 아울러, 본 발명의 약물 전달체를 투여하면 성대 조직의 점탄성이 낮아진다(도 7 참조).

[0040]

따라서 본 발명의 다른 관점에 따르면 간세포 성장인자가 소장점막하조직과 같은 지지체에 로딩, 부착되어 있는 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 음성 이상 질환의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약물 전달체를 포함한 약학적 조성물은 주사제 형태의 제형으로 제조되어 손상된 성대 조직으로 주입될 수 있고, 손상된 성대 조직을 회복, 재생시켜 난치성 음성 이상 질환을 치료하는데 활용될 수 있다.

[0041]

예를 들어 전술한 본 발명의 약물 전달체를 유효 성분으로 함유하는 음성 이상 질환의 치료를 위한 약학적 조성물은 약물 전달체 단독으로도 사용될 수 있지만, 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가 성분을 포함할 수 있다. 추가 성분으로는 약학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0042]

예를 들어 본 발명에 따른 약물 전달체를 포함하는 음성 이상 질환의 치료를 위한 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액과 같은 국소투여를 위한 형태로 제형화될 수 있다.

[0043]

예를 들어 본 발명에 따른 약물 전달체는 임상 투여 시에 비경구의 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 통상적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제와 같은 희석제 또는 부형제 등을 더욱 포함할 수 있다.

[0044]

사용될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다.

[0045]

예를 들어 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 및 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥 주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.

[0046]

비경구 투여를 위한 형태로는 치약, 구강세정제, 국소 투여제(크림, 연고, 드레싱 용액, 분무제, 기타 도포제 등) 등을 들 수 있다. 상기 국소 투여제의 제형의 일례로는, 약물 전달체를 천연 섬유 또는 합성 섬유로 만든 거즈 등의 담체에 함침시킨 것일 수 있다. 상기 크림 또는 연고의 경우, 구강건조증을 초래하고 있는 손상된 타

액션 부위나 그 주위에 직접 도포하는데 적합할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.

[0048] 아울러, 본 발명에 따라 음성 이상 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.

[0049] 이하, 예시적인 실시예를 참조하면서 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하지만, 본 발명의 기술적 사상이 하기 실시예에 기재된 내용으로 한정되는 것은 결코 아니다.

[0050] 실시예 1 : 약물 전달체의 제조

[0051] 소장점막하조직(SIS)을 제조하기 위하여, 시장에서 판매되는 돼지(Finish pig, F1; Land race + Yorkshire, 6개월에 약 100 kg)를 약 4시간 동안 희생시켜 돼지의 공장 부위를 채집하였다. 돼지 공장에서 SIS를 분리하기 위하여 지방을 제거한 뒤, 물로 세척하였다. 장막과 근육을 기계적으로 제거하여 SIS를 얻었다. 이어서 SIS를 식염수로 세척하고, 동결건조기(FD 8505, 일신랩, 대전, 한국)를 사용하여 48시간 동안 -80℃에서 동결 건조하였다. 이어서 건조된 SIS를 동결분쇄기(6700, SPEX Inc. USA)를 사용하여 -198℃에서 분쇄하여 입자 크기가 10-20 μ m인 SIS 분말을 얻었다. 수득된 SIS 분말을 3% 아세트산 및 0.1% 펩신이 함유된 수용액 10 ml 용기에 첨가한 뒤, 48시간 동안 교반하였다. 이어서, 용액은 동결 건조하여 최종적인 SIS 분말을 제조하였다. SIS 분말을 에틸렌옥사이드 가스를 사용하여 살균하고 인산완충용액(PBS)에 분산시켜 최종 농도가 20%가 되도록 하였다. 이어서 간세포 성장인자(HGF) 200 ng/mL을 함유하는 소장점막하조직 현탁액(suspension)을 제조하여 후술하는 실험에 사용하였다.

[0052] 실시예 2 : HGF가 로딩된 SIS 서스펜션의 생체의 방출의 동역학 측정

[0053] 간세포 성장인자가 로딩된 SIS 현탁액을 마이크로피펫을 이용하여 24-웰 배양 플레이트로 옮긴 뒤, 인산완충용액(PBS)을 웰에 첨가하였다. 방출된 HGF를 함유하는 상층액을 1, 2, 5, 10, 14, 21일에 채집하였으며, 시간 경과에 따라 방출된 HGF의 양은 HGF-ELISA 키트(R&D System, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정하였다. 본 실시예에 따라 생체외에서 HGF의 방출량을 측정한 결과가 도 2에 도시되어 있다. 로딩 후 21일째에 SIS 현탁액 지지체로부터 방출된 HGF의 누적량은 4.1 μ l/ml이었다.

[0054] 실시예 3 : 동물 실험

[0055] 40마리의 뉴질랜드산 백색 토끼(3.1 ~ 3.8 kg)를 5개의 그룹 i) 성대에 상처를 주지 않은 그룹(정상군), ii) 성대에 상처를 주고 인산완충용액(PBS)을 투여한 그룹(성대상처군, PBS군) iii) 성대에 상처를 주고 SIS 현탁액만을 투여한 그룹(SIS군), iv) 성대에 상처를 주고 HGF로 처리한 그룹(HGF군), v) 성대에 상처를 주로 HGF가 로딩된 SIS 현탁액으로 처리한 그룹(HGF/SIS군)으로 구분하였다.

[0056] 각 그룹의 토끼에 0.05 mg/kg의 glycopyrrolate와 5 mg/kg의 xylazine으로 예비 투여한 뒤, 15 mg/kg의 zolazepam을 근육 주사하여 마취하였다. 이후 후두내시경(Karl Storz, Tübingen, 독일)과 귀내시경(Carl Zeiss Ltd., Weyl Garden City, 영국)을 사용하여 후두 내부를 관찰하고, 미세수술 장치를 사용하여 성대주름의 상피와 기저막을 절개하여 성대에 상처를 유발하였다. 이후에 각각의 토끼 그룹별로 PBS, SIS, HGF 및 HGF/SIS를 25G 길이의 바늘을 갖는 Hamilton 주사기를 이용하여 투여하였다(성대상처군은 50 μ l PBS; SIS군은 50 μ l SIS 현탁액; HGF군은 200 ng/50 μ l; HGF/SIS군은 200 ng/50 μ l SIS 현탁액).

실시예 3 : 조직병리학적 및 면역학적 평가

(1) 조직병리학적 평가

약물을 투여하고 3개월 후에 각 그룹의 토끼를 희생시킨 뒤 조직학적 분석을 위하여 후두를 채집하였다. 후두 샘플을 파라핀 블록에 심은 뒤, 박편절단기(microtome)를 사용하여 후두를 4 μ m의 절편으로 만들고, 성대주름의 전면, 중앙 및 배면 부위의 절편을 제조하였다. 표준 병리학 프로토콜을 사용하여, 각 그룹에 대하여 만들어진 총 12개의 슬라이드를 hematoxylin 및 eosin(H-E), Masson's trichrome(콜라겐), Verhoeff's van Gieson(엘라스틴 섬유) 또는 alcian blue(히알루론산)로 염색하였다. 슬라이드를 광학현미경을 사용하여 분석하였으며, MetaMorph 소프트웨어(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, 미국)를 사용하여 콜라겐, 엘라스틴 및 히알루론산의 농도를 측정하였다. 도 3a 내지 도 3b에 도시된 염색 결과 및 양적 측정 결과에서 알 수 있는 것처럼, PBS군에 비하여 HGF/SIS군에서 콜라겐(Masson's trichrome 염색에서 푸른색으로 나타남)이 덜 침착되었으며, 콜라겐의 조직 내 배열이 양호하였다. 엘라스틴(Verhoeff's van Gieson 염색에서 검은색으로 나타남)의 생성은 유의미한 차이를 보이지 않았으나, HGF/SIS군에서 엘라스틴이 덜 얽혀 있었다. 또한, 히알루론산(alcian blue 염색에서 푸른색)의 형성과 관련해서 HGF/SIS군은 PBS군에 비하여 히알루론산이 훨씬 많이 생성되었다.

(2) 면역조직학적 평가

계속해서, 면역조직학적 점검을 위하여, 절단된 후두의 파라핀 절편을 자일렌에 침지하여 파라핀을 제거하고, 에탄올로 수화한 뒤 PBS로 세척하였다. 1% 소혈청알부민(BSA)을 함유하는 차단 용액을 사용하여 비-특이적 결합을 차단하였다. 슬라이드에 장착된 절편을 type I 콜라겐(1:100 희석, ABBotect, CA, 미국) 및 fibronectin(1:50 희석, Abcam, Cambridge, 영국)에 대한 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 슬라이드를 2차 Alexafluor 488-conjugated 항-토끼 IgG 항체와 Alexafluor 488-conjugated 항-마우스 IgG 항체(희석 1:500, Invitronge, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 상온의 그늘에서 1시간 동안 처리하였다. 이어서 절편을 4'6-디아미디노-2-페닐인돌 디하이드로클로라이드(DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 3-5시간 염색하여 세포의 핵을 염색하였다. 음성컨트롤로 1차 항체로 처리하지 않은 슬라이드를 포함하였으며, 공초점 레이저 현미경으로 처리하였다. type I 콜라겐과 fibronectin의 함량은 MetaMorph 소프트웨어를 사용하여 측정하였다. 도 4a 및 도 4b에서 알 수 있는 것처럼, PBS군에 비하여 HGF/SIS군에서 type I 콜라겐의 침착이 크게 감소하였으며, fibronectin은 그룹 사이에서 유의미한 차이를 보이지 않았다.

실시예 4 : 현미경 평가 및 고속 카메라 영상

성대 조직에 상처를 주고 1개월 및 3개월 후, 모든 그룹의 토끼에 대한 현미경 검사와 성대주름에서의 상처 형태를 현미경으로 분석하였다. 도 5에 도시된 것과 같이, 약물전달체를 투여하고 3개월이 경과한 시점에서, PBS군에서는 상당한 fibrotic scar band가 관찰되었으나, HGF/SIS군에서는 그 밴드가 크게 감소하여 상당한 회복이 있었음을 확인하였다.

이어서, 안락사 후에 각 그룹으로부터 얻어진 2개의 후두를 절단하여 점막 파동을 위해 생체외(ex vivo) 평가를 수행하였다. 절단된 후두를 떼어내고 성대 사이로 air flow를 유도할 수 있는 테이블에 이를 고정한 뒤, air flow를 이용하여 성대의 파동을 유도하였으며, 이 파동은 고속카메라를 이용하여 기록하고 kymograph를 이용하여 분석하였다. 각 그룹당 6개의 후두를 사용하여 성대주름 진동의 고속카메라 영상을 수행하였다. 점막 파동의 진동은 영상 분석 소프트웨어를 사용하고, 정상 성대주름에 대하여 normalize하여 개방 및 폐쇄 상의 파동분석기에서 픽셀의 크기를 측정하는 방법으로 측정하였다. 도 6에 도시된 것처럼 HGF/SIS군에서 점막파동(MW)의 진폭 크기가 PBS군이나 HGF군에 비하여 크게 높아졌다.

실시예 5 : 기능적 점탄성 평가

상처를 유도하고 3개월 후, 희생된 토끼 그룹당 4개의 후두를 제거하여 성대주름의 점탄성을 평가하였다. 근육 및 결합 조직이 없는 성대주름을 수술 현미경을 사용하여 확대하면서 절개하였다. 점탄성 측정이 수행될 때까지 절개된 성대주름은 통상적인 식염수에 37°C에서 보관하였다. 기능적 유량 평가와 관련된 점탄성 측정을 위한 점탄성 파라미터로서, 직선 점탄성 이론에 따라 적용된 주파수의 함수로서 elastic modulus(G')와 viscous

modulus(G'')을 측정하였다. 주파수에 대한 점탄성 파라미터의 의존성은 파워 법칙(G' 또는 $G = ax^b$; a 는 크기, b 는 log-log 스케일의 기울기)를 이용하였다. 본 실시예에 따른 결과가 도 7에 도시되어 있으며, 하기 표 1에서 측정 결과를 나타내고 있다. HGF/SIS군에서 채집한 성대주름 조직의 평균 elastic modulus(G') 및 평균 viscous modulus(G'')은 PBS군에 비하여 유의미하게 낮았다($P < 0.05$). 반면, HGF군은 상처가 유발된 성대주름의 점탄성을 회복시키지 못하였다($P > 0.05$)

표 1

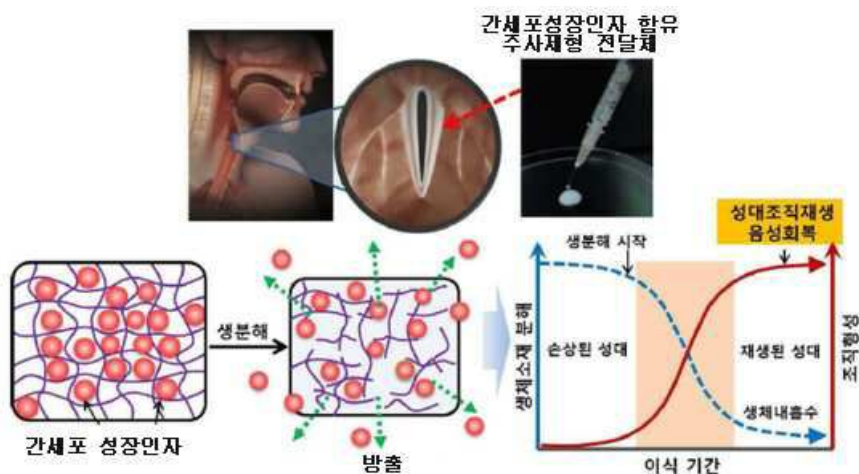
성대주름 조직에 대하여 적용된 주파수에 대한 평균 elastic modulus(G') 및 평균 viscous modulus(G'') 측정 결과

$G' = ax^b$	$a(\text{Pa.s})$	b	R^2
정상군	168 ± 65	0.164	0.782
PBS군	331 ± 153	0.123	0.858
SIS군	471 ± 148	0.092	0.811
HGF군	362 ± 72	0.158	0.908
HGF/SIS군	292 ± 139	0.167	0.837
$G'' = ax^b$			
정상군	74 ± 36	0.15	0.613
PBS군	115 ± 66	0.092	0.387
SIS군	135 ± 55	0.076	0.459
HGF군	124 ± 27	0.11	0.804
HGF/SIS군	109 ± 55	0.173	0.742

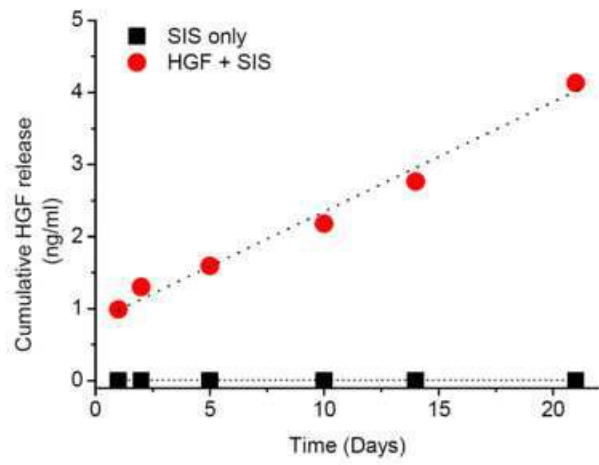
상기에서는 본 발명의 예시적인 실시 형태에 기초하여 본 발명을 설명하였으나, 본 발명은 전술한 실시예에 기재된 기술로 한정되는 것은 결코 아니다. 오히려 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 전술한 실시예에 기초하여 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있을 것이다. 하지만, 이러한 변형과 변경은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 사실은, 첨부하는 청구의 범위를 통하여 더욱 분명해질 것이다.

도면

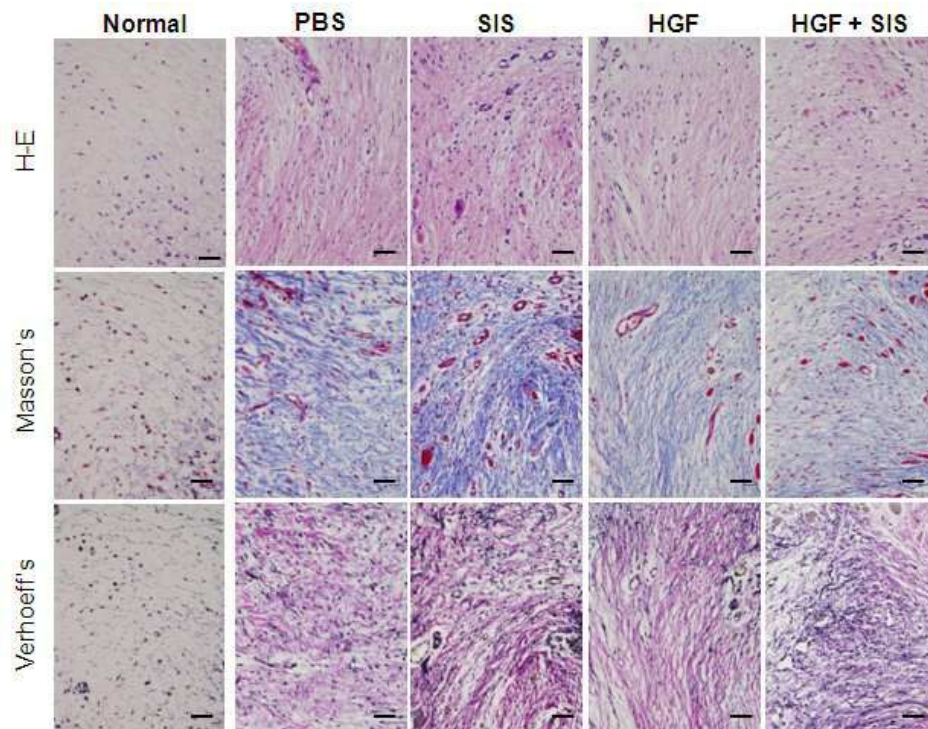
도면1



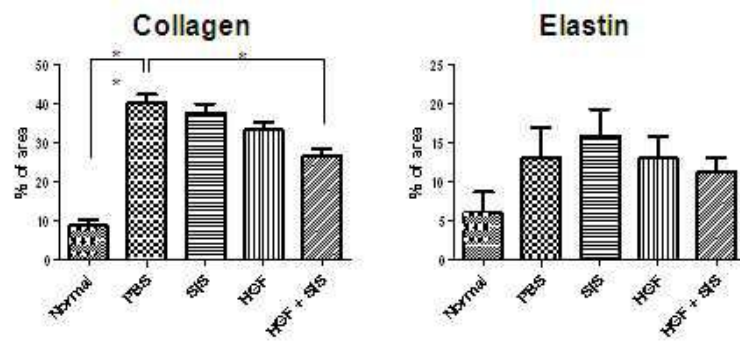
도면2



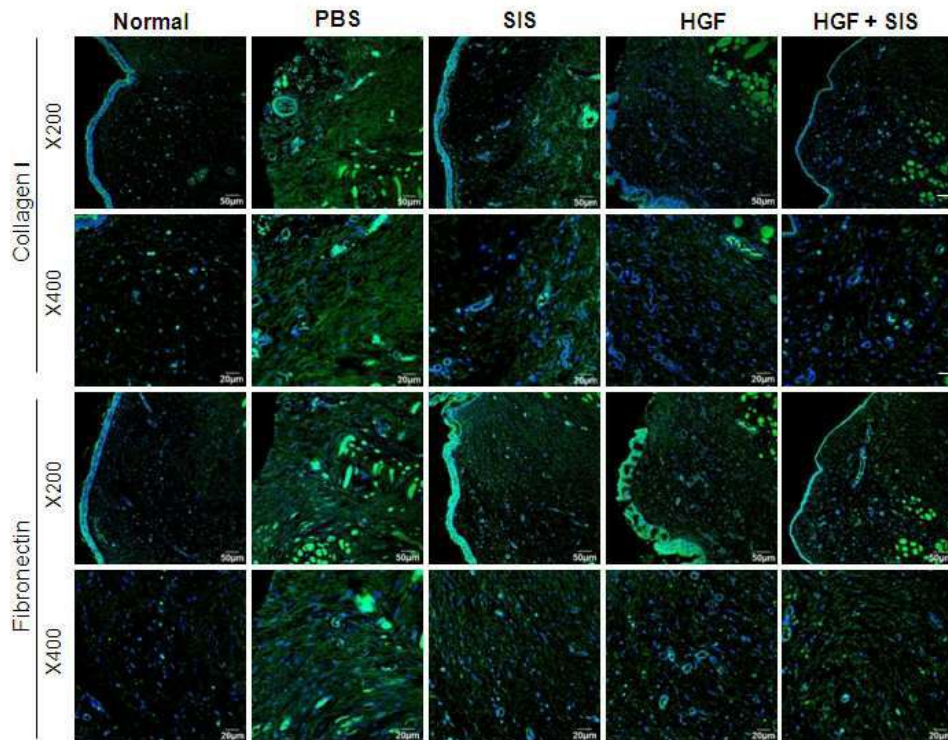
도면3a



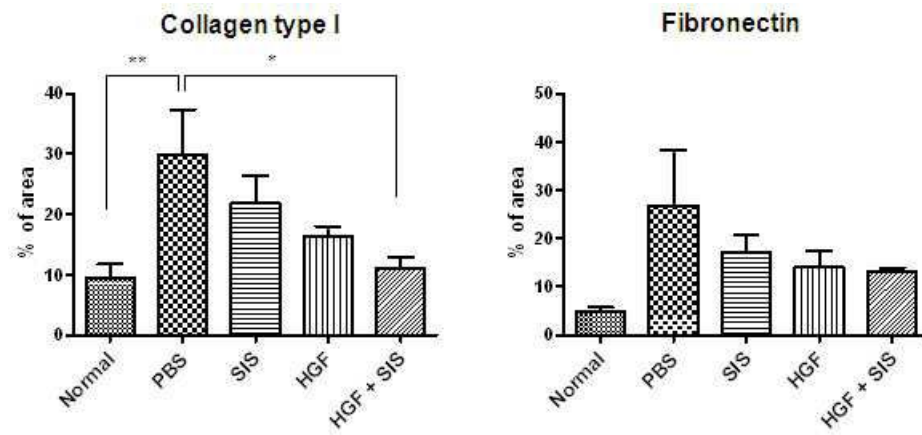
도면3b



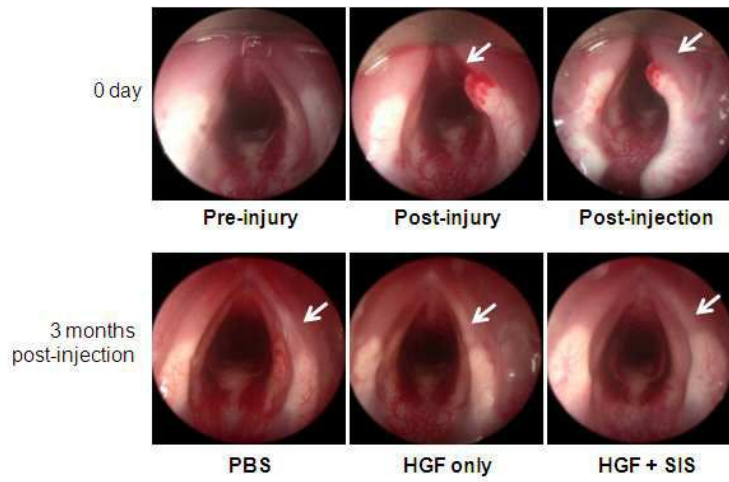
도면4a



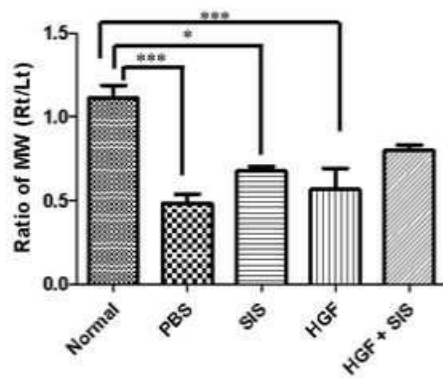
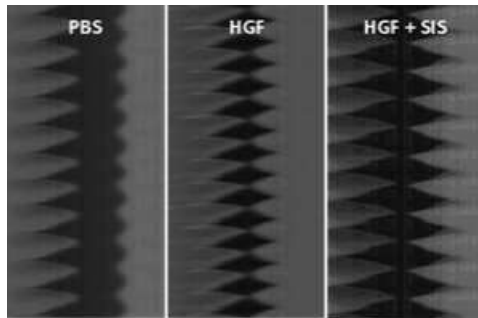
도면4b



도면5



도면6



도면7

