



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0139262
(43) 공개일자 2014년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/765 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0059708
(22) 출원일자 2013년05월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 바이오리더스
대전광역시 유성구 테크노8로 13 (용산동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이일한
대전광역시 유성구 배울2로 6, 107동 603호 (관평동, 한화꿈에그린)
임용택
대전광역시 서구 둔산북로 160, 105동 904호 (둔산동, 한마루아파트)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 7 항

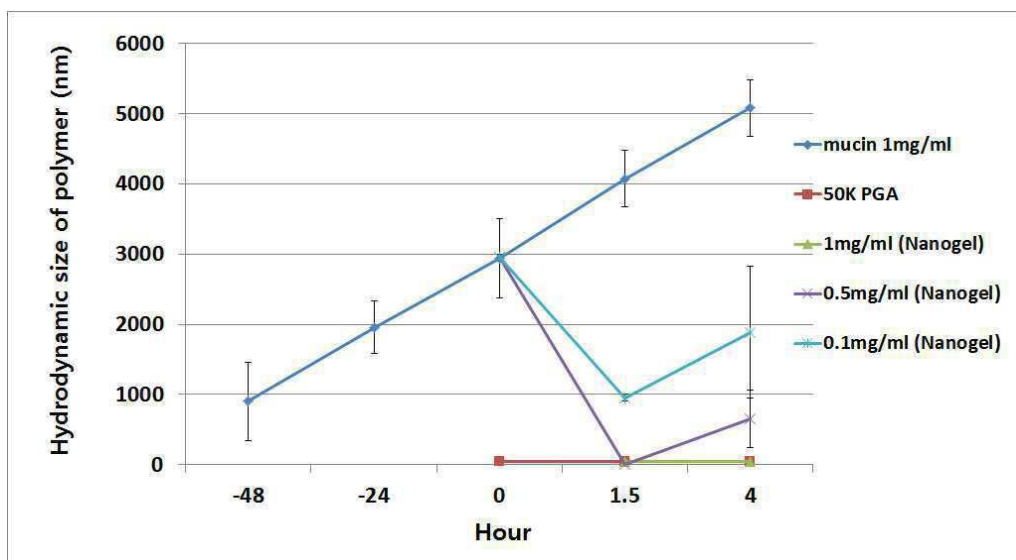
(54) 발명의 명칭 폴리감마글루탐산을 함유하는 점액 분산 또는 수화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 생체친화성 천연 고분자인 폴리감마글루탐산을 함유하는 점액분산 또는 수화용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 생체에서 과다 분비되고 높은 점성을 갖는 점액질을 효율적으로 분산(dispersion) 및 수화(hydration)시킴으로서, 점액관련 질환 질병을 치료하는데 유용하다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111918

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 고점막투과성 생체나노입자를 이용한 인플루엔자 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2011.10.01 ~ 2014.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액분산 또는 수화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리감마글루탐산은 분자량이 1-15,000 kDa 인 것을 특징으로 하는 점액분산 또는 수화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리감마글루탐산 나노젤은 폴리글루탐산-콜레스테롤 중합체 나노젤인 것을 특징으로 하는 점액분산 또는 수화용 조성물.

청구항 4

폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 폴리감마글루탐산은 분자량이 1-15,000 kDa 인 것을 특징으로 하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 폴리감마글루탐산 나노젤은 폴리글루탐산-콜레스테롤 중합체 나노젤인 것을 특징으로 하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 점액 과분비 질환은 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF), 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD), 만성기관지염 (simple chronic bronchitis), 만성폐쇄성기관지염 (chronic obstructive bronchitis), 천식성 기관지염 (chronic asthmatic bronchitis), 폐기종 (emphysema), 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease) 및 소화기 질환으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 생체친화성 천연 고분자인 폴리감마글루탐산을 함유하는 점액분산 또는 수화용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 점막을 형성하는 주성분인 뮤신은 동물의 외분비 샘에서 분비되는 점성 물질을 통틀어 이르는 말로 당질과 결합된 복합 단백질이다. 이 뮤신엔 세포의 주성분인 단백질의 소화를 촉진하여 체내에서 유용한 작용을 하고, 위벽 보호 작용, 해독 작용을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 뮤신이 존재하는 기관은 구강, 비강, 후두, 위장관, 눈, 항문, 질이며 그 두께는 수 나노미터에서 170 마이크로미터까지 다양하다. 뮤신 네트워크의 구조는 여러 결합에 의해 유지되는데, 그 결합에는 이온 결합, 수소 결합, 디설피드 결합, 반데르발스결합, 뮤신끼리 얽힘 등이 있다. 이러한 결합들과 연결되는 점막 부착성 고분자에 대한 연구가 활발히 진행 되어 왔으며, 뮤신층에 존재하는 결합과 상호작용이 강한 특징을 가진 고분자가 주를 이루고 있다. 일반적으로 점막층은 복잡한 다공성 그물 구조를 가지고 있으며, 수 마이크로미터의 크기인 박테리아의 경우 일반적으로 점막층을 통과할 수 없으나, 점막층이 무너진 곳이나 얇은 곳에서는 일부 통과하는 것으로 알려져 있다. 10 나노미터 정도의 크기인 항체와 그보다 큰 플라스미드 DNA인 경우 점막층을 통과할 수는 있으나, 점막층에 존재하는 수많은 효소에 의해 분해 되므로, 점막층을 통과하기 어렵다. 200나노미터 이하의 크기인 바이러스의 경우, 뮤신과의 상호작용을 줄임으로써 빠르게 점막층을 통과할 수 있다 (Yang, M. et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 50(11):2597-2600, 2011).
- [0004] 점액질과 관련된 질병중에서 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF)은 폐, 간, 췌장, 비뇨기계, 생식기계 및 땀샘 등 신체의 여러 기관을 침범하는 유전질환이다. 이 질환에서는 점액이 정상적으로 만들어져야 하는 세포에서 두껍고 끈적거리는 점액이 만들어져 염분과 수분이 잘 조절되지 않는 상태가 된다. 폐에서 나오는 끈적한 점액이 병원균 이동을 막기 때문에 세균 감염이 잘 발생한다. 또한, 기관지 안에 있는 점액 분비선에 영향을 주어 비정상적으로 진하고 끈적끈적한 점액이 만들어지고, 진한 점액으로 인하여, 기도 폐쇄, 박테리아의 성장의 촉진, 염증과 감염 등이 생긴다.
- [0005] 또한, 만성기관지염 (simple chronic bronchitis), 만성폐쇄성기관지염 (chronic obstructive bronchitis), 천식성 기관지염 (chronic asthmatic bronchitis), 폐기종 (emphysema), 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease)을 유발할 수 있다. 췌장에서는 끈적한 점액이 췌장액의 이동을 막아서 소화 장애를 일으키고 지방 및 지용성 비타민의 흡수 장애가 나타난다. 이로 인해 영양 장애까지 나타날 수 있는데 이는 아기에게 흔하다. 그 외에도 낭포성 섬유증으로 인해 부비동염, 비염, 식도염, 췌장염, 간경변, 직장탈출증, 당뇨, 불임(특히 남성) 등이 나타날 수 있다.
- [0006] 상기 질병들은 점성의 축적과 저조한 분산, 부적절한 뮤신의 구조의 형성과, 역기능적인 점액층 클리어런스 (clearance)와 연관이 있다. 즉 과도한 점액질 분비와 점성에 의해 나타나는 현상들이다. 그러므로 이렇게 과도하게 분비되는 점액과 점성을 낮출 수 있다면, 위 질병을 치료하는데 도움이 될 것이다. 기존의 치료제는 뮤신을 라이시스(lysis)하는 약물이 대부분이나 부작용이 많다고 보고되고 있다 (Rubin, B. K. et al., *Paediatric Respiratory Reviews*, 7 Suppl 1, S215-219, 2006).
- [0007] 그 중 대표적인 약물로는 디옥시리보뉴클리어즈 (deoxyribonuclease), 아세틸시스테인(N-acetylcystein)이 있는데, 이 경우, 기도 점막의 심각한 수용화를 초래한다는 문제점을 갖고 있다. 그러므로, 두 가지 관점에서 새로운 치료제 개발이 요구된다. 첫째는 이미 존재하고 있는 뭉친(aggregation) 뮤신을 분산 시켜야 하고, 둘째는 새로 형성되는 뮤신 매트릭스를 기존의 뮤신 네트워크의 변성 없이 수화(hydration) 시키는 것이다. 이전 연구자에 의하면 칼슘이온(Ca^{2+})의 제거나 킬레이팅(chelating)은 뮤신 네트워크의 스웰링(swelling), 수화(hydration), 분산(dispersion)을 초래한다고 알려져 있다. 친 박사(Dr. Chin)의 연구에 의하면 이디티에(EDTA)와 같은 칼슘이온 킬레이트가 낭포성섬유증에서 뮤신의 분산에 도움이 되지만, 그 결과로, 카르복실기화(carboxylation)된 폴리스티렌(polystyrene)을 처리한 뮤신의 경우, 뭉친 뮤신(aggregated mucin)의 분산(dispersion)이 증가된 것을 확인하였고 (Chen, E.Y. et al., *Scientific Reports*, Vol.2 Article number 211, 2012), 그 효과는 사이즈가 적을수록 더 크다고 보고하였다. 하지만, 폴리스티렌 고분자와 같은 비 분해성 합성 고분자는 체내 약물로 활용되는데 많은 문제점을 갖고 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 뮤신의 분산 및 수화 효과를 나타내는 생체고분자를 개발하고자 예의 노력한 결과, 폴리글루탐산이 체내에서 과도하게 분비되어 뭉쳐지는 뮤신을 분산시키고, 수화시키는 효과를 가진다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 생체유래 고분자를 함유하는 점액의 분산 및 수화용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 생체유래 고분자를 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또다른 목적은 생체유래 고분자를 이용한 점액의 분산 및 수화방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액분산 또는 수화용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 뭉친 점액에 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 처리하는 것을 특징으로 하는 점액의 분산 및 수화 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 생체에서 과다 분비되고 높은 점성을 갖는 점액질을 효율적으로 분산(dispersion) 및 수화(hydration)시킴으로서, 점액관련 질환 질병을 치료하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 분자량 (50kDa, 500kDa, 500 kDa)에 따른 폴리감마글루탐산의 수력학적 크기를 나타낸 것이다.
- 도 2는 50kDa-폴리감마글루탐산과 나노젤의 점액 분산 및 수화 특성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 500kDa-폴리감마글루탐산과 나노젤의 점액 분산 및 수화 특성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 5000kDa-폴리감마글루탐산과 나노젤의 점액 분산 및 수화 특성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 일 관점에서, 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액분산 또는 수화용 조성물 및 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 이용한 점액의 분산 및 수화방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 폴리감마글루탐산은 카르복실기를 가지는 폴리펩타이드로서, 고분자량의 폴리감마글루탐산을 생산하는 내염성 균주 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 청국장 균주를 이용하여 생산된다(대한민국 등록특허 제 500796호). 또한, 폴리감마글루탐산을 함유하는 항암조성물, 면역보강제, 면역증강제, 바이러스 감염 억제에 대한 특허(대한민국 등록특허 제496606호, 제517114호, 제475406호, 제0873179호)들도 출원되었다. 또한, 물질의 의약품도에 대한 연구가 지속적으로 진행되면서 계속적으로 다양한 효능들이 밝혀지고 있다.
- [0019] 폴리감마글루탐산은 풍부한 카르복실기(COO⁻)를 가지고 있어, 과도한 점성을 띠는 점액에 처리할 경우, 스웰링(swelling), 수화(hydration), 분산(dispersion)효과가 있으며, 칼슘이온의 킬레이트와 뮤신의 사이알릭(sialic), 설페이트(sulfate), 카르복실 기능성 그룹(carboxyl functional group)과 같은 음이온성 물질과 정전기적 반발력을 초래할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 분자량이 50 kDa, 500 kDa, 5000 kDa 인 폴리감마글루탐산을 이용하여 점액질의 분산 및 수화효과를 시험하였다. 도 1~4에 나타난 바와 같이 폴리감마글루탐산이 1 mg/ml 농도로 사용되었을 때, 뮤신의 크기가 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노젤을 다양한 농도(1mg/mL, 500 µg/mL, 10 µg/mL)로 처리하였을 때, 농도가 높아질수록 뮤신의 분산에 더 큰 효과를 보임을 확인

할 수 있었다.

- [0021] 또한, 본 발명의 일양태에서는 폴리감마글루탐산과 콜레스테롤-아민을 반응시켜 제조한 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노젤을 사용하여, 점액질의 분산 및 수화효과를 확인하였다. 그 결과, 도 2~4에 나타난 바와 같이 뮤신이 분산 및 수화되어, 뮤신의 크기가 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.
- [0022] 다른 관점에서, 본 발명은 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 함유하는 점액 과분비 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤의 점액 분산 및 수화능은 과도한 점액질 분비에 의해 발생하는 질환의 치료 및 증상개선에 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서, 점액은 구강, 비강, 호흡기 점막, 안 점막, 생식기 점막, 피부궤양 부위 등에 점막 층에 존재하는 점액질을 의미한다.
- [0025] 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF)은 폐, 간, 췌장, 비뇨기계, 생식기계 및 땀샘 등 기관의 세포에서 두껍고 끈적거리는 점액이 만들어져 염분과 수분이 잘 조절되지 않는 상태가 된다. 낭포성 섬유증으로 인하여, 2차적으로 부비동염, 비염, 식도염, 췌장염, 간경변, 직장탈출증, 당뇨, 불임(특히 남성) 등이 나타날 수 있다.
- [0026] 폴리감마글루탐산 또는 폴리감마글루탐산 나노젤을 낭포성 섬유증 환자에 투여하면, 과도하게 분비된 점액이 분산 및 수화되어 환자의 불편함이 줄어들며, 상기 2차 질병으로의 발병도 예방할 수 있다.
- [0027] 또한, 점액질의 과다분비는 만성기관지염 (simple chronic bronchitis), 만성폐쇄성기관지염 (chronic obstructive bronchitis), 천식성 기관지염 (chronic asthmatic bronchitis), 폐기종 (emphysema), 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease)을 유발할 수 있다. 췌장에서는 과도한 점액질 분비는 췌장액의 이동을 막아서 소화 장애를 일으키고 지방 및 지용성 비타민의 흡수 장애가 나타난다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 점액 과다분비 질환은 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF), 만성 폐쇄성 폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD), 만성기관지염 (simple chronic bronchitis), 만성폐쇄성기관지염 (chronic obstructive bronchitis), 천식성 기관지염 (chronic asthmatic bronchitis), 폐기종 (emphysema), 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease), 소화질환 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0030] <실시예 1> 폴리감마글루탐산 나노젤 합성
- [0031] 콜레스테롤-아민을 합성하기 위하여, 에틸렌다이아민(250mmol)을 250ml 톨루엔에 용해시키고, 2.25g 콜레스테롤을 50ml 톨루엔에 용해시켜 10분정도의 시간을 가지고 에틸렌다이아민 용액에 떨어뜨린다. 혼합용액을 이룬 후 즉시 실온에서 16시간동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후 탈이온수를 이용하여 여러번 행구어낸어, 맑아진 유기층을 마그네슘 설페이트를 이용하여 건조시켰다. 건조된 용액에서 톨루엔을 회전증발시키고, 20ml 디클로로메탄과 20ml 메탄올을 섞은 용액으로 여러번 행구어내고 1PTFE 필터를 이용하여 여과하여, 백색고체형태의 콜레스테롤-아민을 제조하였다.
- [0032] 폴리감마글루탐산(1g, (주)바이오리더스, 한국)을 40℃에서 10ml DMSO(10ml)에 하루 정도 용해시키고, 상기 제조된 콜레스테롤-아민(1g, 충남대학교 제공)을 실온에서 10ml THF(Tetrahydrofuran, 시그마알드리치, 미국)에 용해시켰다. 콜레스테롤-아민 용액을 폴리감마글루탐산 용액에 천천히 떨어뜨리고 섞인 두 용액에 CDI(1g, (Carbodiimide, 시그마알드리치, 미국) 을 넣어준 후 40℃에서 하루정도 반응시켰다. 반응된 용액을 실온에서 식힌 후 회전증발을 통해 THF를 제거하였다. 위 용액을 아세톤을 통해 침전시키고 원심분리를 통해 용매와 용질을 충분히 분리시켜 아세톤을 제거하고 40℃에서 남아 있는 아세톤을 건조시켰다. 건조된 시료를 탈이온수에 넣고 탄산수소나트륨을 최초 반응시킨 폴리감마글루탐산과 같은 몰수로 넣어 폴리감마글루탐산을 중화시켰다. 완전히 녹인 용액에 amberlite (5 g, 시그마알드리치, 미국)로 2시간정도 교반하여 반응하지 않은 콜레스테롤 및 불순물을 제거한다. 메쉬를 통해 amberlite를 제거하고 셀룰로오스 멤브레인 튜브(MWCO 12,000,

시그마알드리치, 미국)을 이용하여 2일간 투석하였다. 투석된 용액을 동결건조를 통해 시료로 얻었다. 상기 나노마이셀을 NMR로 분석하여 콜레스테롤 도입량을 측정하였다. NMR 분석결과 1.7 mol % 콜레스테롤이 결합되었음을 확인 하였다.

[0033] <실시예 2> 폴리감마글루탐산의 점액질 수화 및 분산효과 실험

[0034] 폴리감마글루탐산의 점액질 수화 및 분산효과 실험은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 먼저 Pocrine gastric mucin(시그마알드리치, 미국)을 1mg/L 농도로 1.2mM Ca^{2+} , 20mM Tris-HCl, 10mM MES with HBSS buffer에 완전히 녹였다. 0.1N HCl로 세척한 0.2 μm PES membrane filter로 filtration하였다. 이후에 48시간 동안 뮤신이 뭉치도록 정치한 후, 시간별로 뮤신의 크기를 DLS (Dynamic Light Scattering, 오즈가, 일본)로 측정하였다.

[0035] 48시간이 지난 후에, 폴리감마글루탐산((주)바이오리더스, 한국) 및 실시예 1에서 제조한 폴리감마글루탐산 나노젤을 분자량별(50, 500, 5000 kDa)로 1mg/mL, 500 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 넣고 0시간, 1.5시간, 4시간 후 DLS로 사이즈를 측정하였다.

[0036] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 분자량 (50kDa, 500kDa, 5000kDa)에 따른 폴리감마글루탐산의 수력학적 크기 (hydrodynamic size)는 분자량이 커질수록 수력학적 크기도 증가함을 알 수 있다.

[0037] 도 2에 보면, 점막층 고분자 (1 mg/ml)의 수력학적 크기는 시간이 지남에 따라서 크기가 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이것은 점막층이 점점 뭉치는 현상이 일어나고 있음을 보여준다. 그러나, 50kDa-폴리감마글루탐산 0.1 mg/ml 을 가했을 때, 수력학적 크기는 측정할 수 없을 정도로 작아지는 것을 볼 수 있는데, 이것은 뭉친 점막층이 수화되거나 분산되었음을 의미한다.

[0038] 또한 약 0.1-0.5 mg/ml 의 폴리감마글루탐산 나노젤이 도입되었을 때, 1.5 시간 후에는 점막층의 크기가 급격하게 줄어 들었으며, 4 시간이 지난 후에는 그 크기가 다시 증가하는 것으로 보아, 점막 층이 다시 뭉치는 현상이 일어남을 알 수 있었다. 하지만 약 1 mg/ml 농도 이상에서는 시간이 지나도 점막층이 수화되고 잘 분산되어 있어, 그 크기를 측정할 수 없었다.

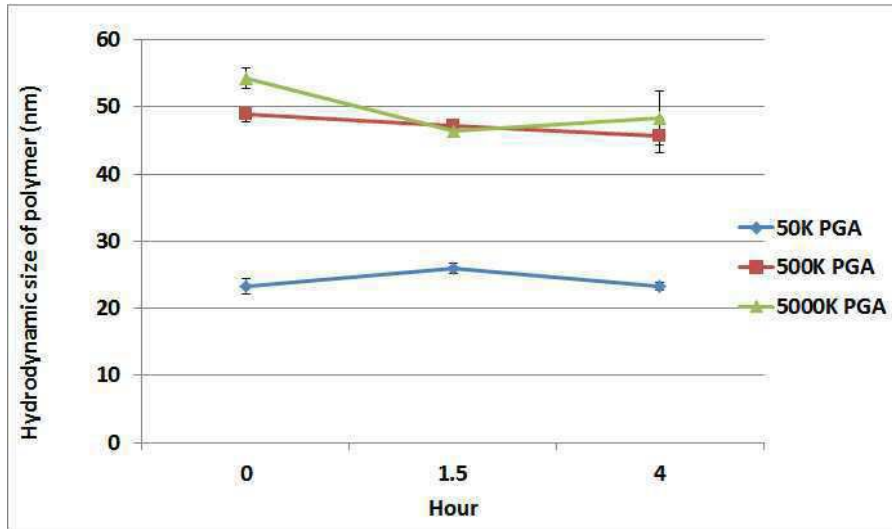
[0039] 도 3과 도 4에서는 폴리감마글루탐산의 분자량을 500 kDa 와 5000 kDa로 증가시킨 폴리감마글루탐산과 그 나노젤의 점액 분산 및 수화 특성을 보여 주는데, 앞서 경우와 비슷한 경향을 보였다. 폴리감마글루탐산이 1 mg/ml 농도로 사용되었을 때, 뮤신의 크기가 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노젤을 다양한 농도(1mg/mL, 500 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였을 때, 농도가 높아질수록 뮤신의 분산에 더 큰 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

[0040]

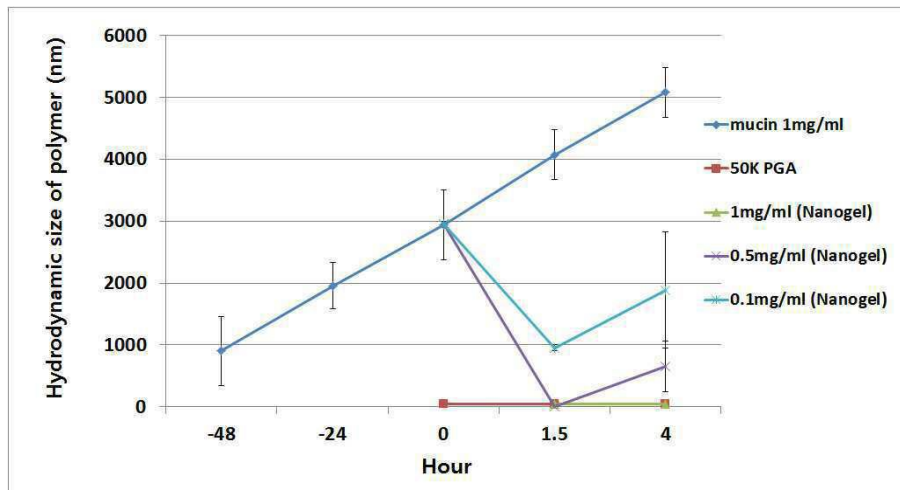
[0041] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시의 일예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

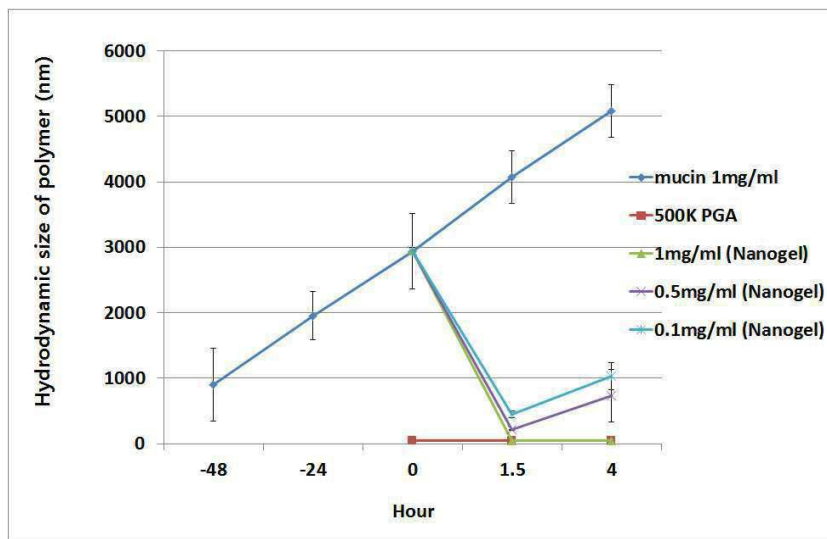
도면1



도면2



도면3



도면4

