



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년04월25일
(11) 등록번호 10-1138317
(24) 등록일자 2012년04월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 31/165* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-0079278(분할)
- (22) 출원일자 2011년08월09일
심사청구일자 2011년08월09일
- (65) 공개번호 10-2011-0094265
- (43) 공개일자 2011년08월23일
- (62) 원출원 특허 10-2009-0072793
원출원일자 2009년08월07일
심사청구일자 2009년08월07일
- (56) 선행기술조사문헌
US20050019436 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
- (72) 발명자
이상현
서울특별시 강남구 언주로30길 56, - F동 406호
(도곡동, 타워팰리스)
- 설동근
서울특별시 중구 동호로10길 30, 111동 106호 (신
당동, 약수하이츠)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 2 항

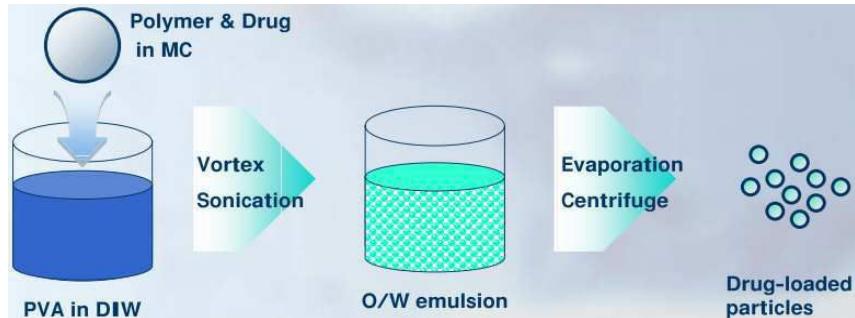
심사관 : 정세준

(54) 발명의 명칭 추간판 질환용 서방성 치료제 및 이의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 질환용 서방성 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

태기용

광주광역시 북구 첨단과기로 123, 교수아파트 A동
104호 (오룡동, 광주과학기술원)

황선옥

서울특별시 서초구 동광로3길 18, 402동 1006호 (방배동, 방배 아이파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0120070002049302008

부처명 한국과학재단

연구사업명 특정기초연구

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

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2009.08.31

더비, 리차드

미합중국 캘리포니아 94015 탈리씨티 슈트 310 캠
페스 드라이브 901 스피널 다이그노스틱스 앤드 트
리트먼트 센터

강석

서울특별시 송파구 잠실로 62, 304동 1002호 (잠실
동, 트리지움)

특허청구의 범위

청구항 1

- (A) 폴리락틱산, 캡사이신 및 유기용매를 포함하는 제 1 용액과, PVA(polyvinyl alcohol) 및 수용성 용매를 포함하는 제 2 용액을 혼합하는 단계;
- (B) 상기 혼합된 제 1 및 제 2 용액을 초음파 처리하여 수중유형 에멀젼(oil in water emulsion)을 형성하는 단계;
- (C) 상기 수중유형 에멀젼에서 유기용매를 제거하여 캡사이신이 포집된 폴리락틱산 나노입자를 형성하는 단계로 제조된,
- 캡사이신이 포집된 폴리락틴산 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 질환용 서방성 치료제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

피브린을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 질환용 서방성 치료제.

청구항 3

삭제

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 추간판 질환용 서방성 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 캡사이신이 포집된 나노운반체를 포함하는 추간판 질환용 서방성 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

캡사이신은 일차감각신경, 특히 통증과 관련된 신경을 무력화시키는 것으로 알려져 있고, 이런 기전을 이용해서 말초신경병성 통증의 치료에 많이 사용된다. 캡사이신은 TRPV1(Transient Receptor Potential Vanilloid type 1) 채널에 선택적으로 작용한다. 이 TRPV1은 무수감각신경 섬유(C-섬유), 특히 다형성 유해 수용기에 많이 분포한다. TRPV1은 통각신경섬유 말단에 존재하는 이온 채널로서 열자극, 산성자극, 각종 염증매개물질 자극 등의 다양한 통각을 유발하는 자극을 감지하여 통각신경섬유를 전기적으로 흥분하도록 매개한다. TRPV1을 캡사이신 등의 효능제로 과도하게 자극하면 통각신경섬유에 칼슘이온이 축적되어 이를 통해 통각신경섬유의 사멸이 일어나고, 따라서 통각을 감지할 수 없게 된다. 즉 상기와 같이 통증을 일으키는 신경을 사멸시키는 기능을 하는 캡사이신을 추간판성 통증을 매개하는 후근신경절(dorsal root ganglion)에 적용하면, 진통효과를 나타낼 수 있다.

[0003]

한편, 추간판은 수핵과 이를 둘러싸고 있는 섬유륜으로 구성되어 있다.

[0004]

추간판의 퇴행성 변화는 추간판 내부에 통증을 일으키는 생리, 화학적 변성을 수반할수 있다. 정상적으로 추간판 내부에는 신경이나 혈관조직이 없으나, 추간판이 퇴행되며 균열이 생기면 섬유륜의 바깥쪽에 분포해있던 동척추신경(sinusvertebral nerve)과 혈관이 안쪽으로 자라들어와 통증을 유발하는 퇴행성 변화를 촉진하며, 또한 추간판내부에 Substance P와 같은 염증성 물질들의 분비가 활발히 일어나, 추간판 내부에 통증의 병인이 생성되는 추간판 내장증(intradiscal disruption)성 통증이 발생하게 된다.

[0005]

이런 추간판성 통증의 치료로는 척추 응합술이나 인공 추간판 대치술과 같은 수술적 치료들이 있으나, 수술 성공률은 70% 정도이며 수술한 환자의 약 10%는 수술 후 실패증후군이 발생하여 평생 고통을 받게 되며, 장기적으로는 수술한 층위의 위아래 추간판의 퇴행이 가속화되어 2차적 수술을 받을 확률이 정상인에 비해 25배 높아지게 된다.

[0006]

상술한 바와 같이, 말초신경병성 통증의 치료에 많이 사용된 캡사이신을 추간판성 통증을 치료하기 위하여 척추

에 적용한다면, 추간판성 통증을 매개하는 후근신경절의 신경세포의 소멸을 유도하여 통증을 감소시킬 수 있을 것이라 예상된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 조직 내에서 안정적이고 국소적으로 효과를 발휘하는 추간판 질환용 서방성 치료제를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 통증을 야기하는 신경세포를 보다 효과적이고 선택적으로 파괴할 수 있는 서방성 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 질환용 서방성 치료제를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 (A) 생분해성 고분자, 캡사이신 및 유기용매를 포함하는 제 1 용액과, PVA(polyvinyl alcohol) 및 수용성 용매를 포함하는 제 2 용액을 혼합하는 단계; (B) 상기 혼합된 제 1 및 제 2 용액을 초음파 처리하여 수중유형 에멀젼(oil in water emulsion)을 형성하는 단계; 및 (C) 상기 수중유형 에멀젼에서 유기용매를 제거하여 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 질환용 서방성 치료제의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 후근신경절 주변에 안정적으로 머물며 후근신경절의 통증신경을 선택적으로 제거할 수 있다. 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 인체 내에서 방출속도를 1주일에서 한달까지 조절할 수 있어, 보다 안정적으로 캡사이신을 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 실시예 1의 제조방법을 설명한 도면이다.
- 도 2는 실시예 1의 추간판 질환용 치료제를 주입하기 위하여, 흰쥐를 복와위로 눕힌 다음 요천추 부위 척추를 따라 정중면으로 절개하고 주위 근육을 젖혀 요추 5/6번의 우측 추간공을 노출시킨 사진이다.
- 도 3은 1번 쥐의 우측 5/6번 요추간 후근신경절에서는 신경세포와 함께 섬유세포와 섬유조직들이 함께 관찰된 사진(400배 확대)이다.
- 도 4는 3번 쥐의 우측 5/6번 요추간 후근신경절에서는 신경세포와 함께 섬유세포와 섬유조직들이 함께 관찰된 사진(400배 확대)이다.
- 도 5는 3번 쥐에서 핵이 없고 세포질이 공포화 되는 등의 퇴행성 변화가 일어난 신경세포들을 관찰한 사진(800배 확대)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0014] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 포함한다.
- [0015] 상기 생분해성 고분자는 폴리락틱산(PLLA), 폴리락틱-글리콜릭 공중합체(PLGA), 폴리카프로락탄(PCL), 폴리글리콜릭산(PGA), 폴리락틱-카프로락탄 공중합체(PLCL) 및 폴리글리콜릭-카프로락탄 공중합체(PGCL)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상인 것이 바람직하다.
- [0016] 상기 캡사이신은 TRPV1(Transient Receptor Potential Vanilloid type 1)의 효능제이다. TRPV1은 통각신경섬유 말단에 존재하는 이온 채널로서 열자극, 산성자극, 각종 염증매개물질 자극 등의 다양한 통각을 유발하는 자극을 감지하여 통각신경섬유를 전기적으로 흥분하도록 매개한다. TRPV1을 캡사이신 등의 효능제로 과도하게 자극하면 통각신경섬유에 칼슘이온이 축적되어 이를 통해 통각신경섬유의 사멸이 일어나고, 따라서 통각을 감지할

수 없게 된다. 즉 상기와 같이 통증을 일으키는 신경을 사멸시키는 기능을 하는 캡사이신을 추간판성 통증을 막개하는 후근신경절에 적용하면, 진통효과를 나타낼 수 있다.

[0017] 상기 캡사이신의 함량은 추간판 질환용 서방성 치료제 총 중량에 대하여, 0.1 내지 10 중량%인 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 겔 형태로 제조하기 위하여, 피브린을 더 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 5 내지 9일에 걸쳐 캡사이신이 서서히 방출되므로, 후근신경절 (dorsal root ganglion)주변에 장기간 머물면서 안정적이며 국소적으로 후근신경절의 통증신경을 선택적으로 제거할 수 있다.

[0020] 이하 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제의 제조방법을 설명한다.

[0021] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제의 제조방법은 (A) 생분해성 고분자, 캡사이신 및 유기용매를 포함하는 제 1 용액과, PVA(polyvinyl alcohol) 및 수용성 용매를 포함하는 제 2 용액을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0022] 여기서, 상기 제 1 용액과 제 2 용액의 혼합비는 1:1 내지 1:20인 것이 바람직하고, 1:2 내지 1:10인 것이 가장 바람직하다. 상술한 범위를 만족하면, 입자를 안정한 상태로 유지하면서 방출속도를 1주일에서 한달까지 조절할 수 있는 이점이 있다.

[0023] 또한, 상기 제 1 용액은, 상기 제 1 용액 총 중량에 대하여, 상기 캡사이신 0.1 내지 3 중량%; 상기 생분해성 고분자 1 내지 10 중량%; 및 상기 유기용매 잔량을 포함하는 것이 바람직하다. 상술한 범위를 만족하면, 입자가 안정한 이점이 있다.

[0024] 상기 유기용매는 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종인 것이 바람직하다.

[0025] 또한, 상기 제 2 용액은, 상기 제 2 용액 총 중량에 대하여, 상기 PVA는 0.1 내지 2중량%; 및 상기 수용성 용매 잔량을 포함하는 것이 바람직하다. 상술한 범위를 만족하면, 수중유형 에멀젼 형성 시 오일(oil)과 물이 안정하게 유지될 수 있도록 계면활성제 역할을 하는 이점이 있다. 상술한 범위보다 작게 포함되면, 수중유형 에멀젼이 형성이 안되고, 상술한 범위보다 많이 포함되면 엉김이 발생한다.

[0026] 상기 수용성 용매는 물인 것이 바람직하고, 탈이온수 또는 중류수인 것이 보다 바람직하다.

[0027] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 (B) 상기 혼합된 제 1 및 제 2 용액을 초음파 처리하여 수중유형 에멀젼(oil in water emulsion)을 형성하는 단계를 포함한다.

[0028] 상기 수중유형 에멀젼은 나노방울(nanodroplet)의 수중유형 에멀젼인 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 상기 (B) 단계 이후에 (b-1) 상기 수중유형 에멀젼에 탈이온수를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다.

[0030] 상기 (b-1) 단계는 상기 수중유형 에멀젼의 PVA의 농도가 0.1 내지 0.3중량%가 되도록 탈이온수를 첨가하는 단계인 것이 바람직하다. 상기 PVA의 농도가 상술한 범위를 만족하면, 수중유형 에멀젼 형성 시 오일(oil)과 물이 안정하게 유지될 수 있도록 계면활성제 역할을 하는 이점이 있다.

[0031] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 (C) 상기 탈이온수를 첨가한 수중유형 에멀젼에서 유기용매를 제거하여 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

[0032] 상기 (C) 단계는 상기 유기용매를 진공 하에서 증발시켜 제거하는 단계인 것이 바람직하다. 상기 증발온도는 유기용매의 증발온도에 따라 다양하므로, 특별히 한정하지 않는다. 또한, 상기 (C) 단계에서 형성된 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자는 고속 원심분리기를 이용하여 채집될 수 있다.

[0033] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제의 제조방법은, (D) 상기 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자에 탈이온수를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 상기 (D) 단계는 상기 캡사이신이 포집된 생분해

성 고분자 나노입자를 재분산하여 다른 곳으로 이동을 보다 용이하게 할 수 있다. 또한, 상기 (D) 단계를 수행한 이후, 탈이온수가 첨가되고 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자를 동결건조하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 동결건조하는 단계를 더 포함함으로써, 사용 전 캡사이신의 방출을 저해하여 보관을 보다 용이하게 할 수 있다.

[0034] 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제의 제조방법은, (E) 상기 캡사이신이 포집된 생분해성 고분자 나노입자와 피브린(fibrin)을 혼합하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 추간판 질환용 서방성 치료제는 상기 (E) 단계를 더 포함함으로써 젤 형태가 되어 선택된 신경근 주변에 좀 더 장시간 머무르면서 국소의 농도가 높게 유지되고 다른 신경근 주변에 확산되지 않을 수 있다.

[0035] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 이하의 제조예, 실시예 및 시험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

0036] 실험동물의 제공

[0037] 중량 200-250g의 성숙한 스프래그 다우리(Sprague-Dawley) 수컷 흰쥐3마리를 대상으로 하였다. 흰쥐는 12시간 간격의 명/암 주기를 맞춘, 22~25°C의 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 고려대학교 동물실험 위원회로부터 실험 계획에 대한 승인을 얻은 후 규정에 따라 모든 실험을 진행하였다.

0038] 실시예 1: 추간판 질환용 치료제의 제조

0039] <실시예 1>

[0040] 폴리라티산(PLLA, 125K) 50mg, 캡사이신(>95%, CAPSICUM SP) 0.859mg을 메틸렌 클로라이드인 유기 용매 1ml에 용해시킨 제 1 용액을 제조하였다. 한편, PVA 1중량%를 탈이온수 잔량에 용해시킨 제 2 용액 4ml을 제조하였다. 상기 제 1 용액 및 제 2 용액을 혼합하고, 그 혼합물을 초음파 처리하여 나노방울의 수중유형 에멀젼을 만들었다.

[0041] 이어서, 상기 나노방울의 수중유형 에멀젼의 PVA 농도가 0.2wt%가 되도록 탈이온수를 첨가하였다. 그리고 30분 동안 회전식 증발기(RE200, Yamato Scientific America Inc., USA)를 이용해서 유기용매를 제거하여 나노입자를 제조하였다. 상기 나노입자를 고속 원심분리기(Hanil Science Industrial Co., Korea, 6000 rpm, 20분)를 이용해 채집하여 탈이온수에 혼합하였다. 도 1은 실시예 1의 제조방법을 설명한 도면이다.

[0042] 이어서, 상기 나노입자와 탈이온수가 혼합된 약물을 피브린(그린 플라스트, 녹십자)과 혼합하여 젤 형태로 제조하였다.

0043] 시험예: 추간판 질환용 치료제의 특성 평가

0044] <약물의 주입>

[0045] 3 마리의 흰쥐를 실시예 1의 추간판 질환용 치료제를 적용하여 실험하였다.

[0046] 엔플루란(enflurane, 0.5-2%)과 산소의 혼합가스로 마취시킨 후, 도 2와 같이 흰쥐를 복와위로 눕힌 다음 요천 추 부위 척추를 따라 정중면으로 절개하고 주위 근육을 젖혀 요추 제 5/6번의 우측 추간공을 노출시켰다.

[0047] 실시예 1의 추간판 질환용 치료제 100 μ l를 쥐들의 제 5/6번 우측 추간공에 주입하였다.

0048] <조직학적 변화 관찰>

[0049] 실시예 1의 추간판용 치료제를 주입 1주일 후, 흰쥐의 우측 제 5/6번 요추간의 후근신경절과 좌측 제5/6번 요추간의 후근신경절 및 흉추부의 후근신경절을 절제하였다. 절제된 후근신경절들은 10% 포르말린 용액에서 고정을 하였다. 알코올과 톨루엔을 이용하여 탈수시킨 다음, 파라핀에 함몰시켰다. 모든 조직들은 박절기를 이용하여 일정한 간격으로 5개의 절편으로 절단하였다. 광학현미경을 이용하여 각 절편에서 핵을 가지고 있는 신경세포의

수와 조직학적 변화를 비교, 관찰하였다.

[0050] <흉추부 후근신경절 신경 세포 수 비교>

[0051] 주입한 캡사이신이 전신적으로 작용하면 원위부 후근신경절의 신경세포가 파괴될 수도 있다. 따라서 각 쥐의 흉추부 후근신경절의 신경 세포 수를 비교하였다.

[0052] <요추부 후근신경절 신경 세포 수 비교>

[0053] 캡사이신이 선택적이고 국소적으로 신경 세포를 파괴할 수 있는지 알아보기 위해서 양측 5/6번 요추간 후근신경절의 신경 세포 수를 비교하였다.

[0054] <우측 5/6번 요추간 후근신경절의 조직학적 관찰>

[0055] 모든 쥐의 우측 5/6번 요추간 후근신경절에서 관찰되는 세포와 조직을 관찰하여 후근신경절이 적절하게 절제되었는지 확인하고, 나노입자에 의해 염증반응과 같은 부작용이 발생하였는지 여부를 알아보았다. 그리고 퇴행성 변화가 일어난 신경 세포의 분포를 관찰하여 각 군에서의 신경 세포 파괴 정도를 비교하였다.

[0056] 각 쥐들의 후근신경절의 신경세포 수는 표 1에 정리하였다.

표 1

흰쥐번호	투입약물	신경세포의 수		
		흉추부 후근신경절	좌측 5/6번 요추간 후근신경절	우측 5/6번 요추간 후근신경절
1	실시예 1	929	865	905
2	실시예 1	826	1035	93*
3	실시예 1	1012	1150	998

[0058] *: DRG(diagnosis related group)가 정확히 절제되지 않음

[0059] 표 1을 참조하면, 1번 내지 3번 쥐의 흉추부 후근신경절의 신경 세포 수는 922.3 ± 93.2 개이었다. ($p > 0.05$)

[0060] 표 2는 우측 5/6번 요추간 후근신경절의 조직학적 관찰을 나타낸 것이다. 또한 도 3과 도 4는 1번, 3번 쥐들의 우측 5/6번 요추간 후근신경절에서는 신경세포와 함께 섬유세포와 섬유조직들이 함께 관찰된 사진(400배 확대)들이다.

표 2

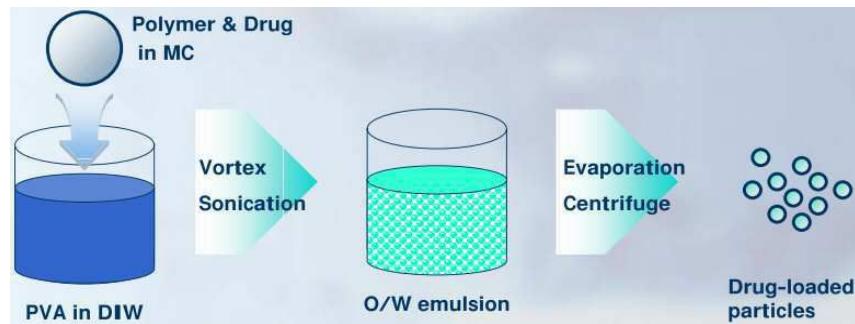
흰쥐번호	정상 신경 (Normal neuron)	퇴행성 신경 (Degenerative neuron)	섬유아세포 (Fibroblast)	염증 (Inflammation)
1	++	+/-	++	-
2	+/-	-	+++	-
3	++	+/-	++	-

[0062] 표 2 및 도 3 및 도 4를 참조하면, 우측 5/6번 요추간 후근신경절에서는 신경세포와 함께 섬유세포와 섬유조직들이 함께 관찰되었다. 신경세포 주변부에서 대식세포와 같은 염증세포들은 관찰되지 않았다. 관찰된 신경세포는 대부분 핵을 가지고 있는 정상적인 형태였다. 하지만 3번 쥐에서 핵이 없고 세포질이 공포화되는 등의 퇴행성 변화가 일어난 신경세포들도 관찰되었다(도 4 참조).

[0063] 따라서, 본 발명을 따른 실시예 1의 추간판 질환용 서방성 치료제는 선택적이고 국소적으로 적용되는 것을 알 수 있다.

도면

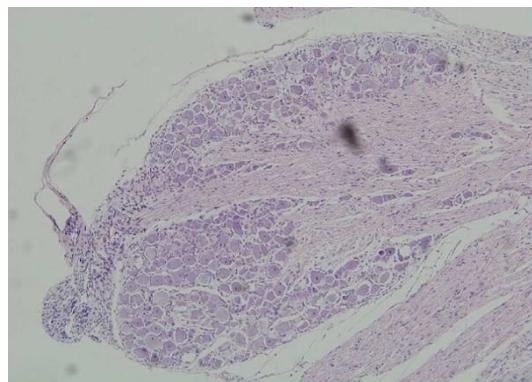
도면1



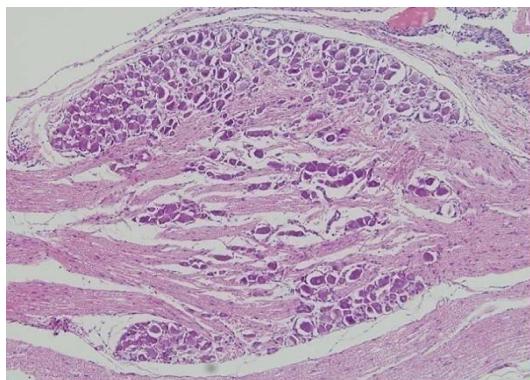
도면2



도면3



도면4



도면5

