(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0141792
(43) 공개일자 2020년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/765 (2006.01) *A61C 8/00* (2006.01)
A61C 8/02 (2006.01) *A61K 33/00* (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/765 (2013.01)
A61C 8/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0068775
(22) 출원일자 2019년06월11일
심사청구일자 2019년06월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
류재준
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 삼풍아파트 16동 1409호
심지석
서울특별시 양천구 목동동로 270 목동3차월드메르디앙 301-1006
김원종
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 4동 403호(지곡동,교수아파트)
(74) 대리인
특허법인 다해

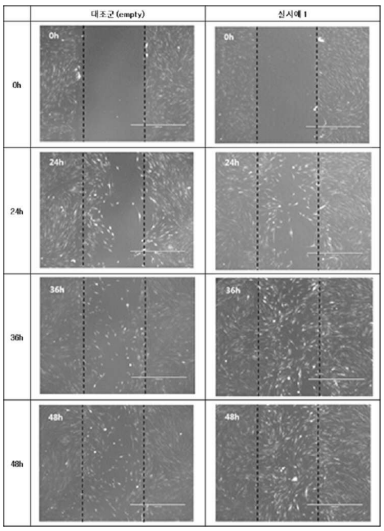
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물, 이를 포함하는 골형성 촉진제, 임플란트 또는 스캐폴드에 관한 것으로, 상기 일산화질소 복합체는 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 를 활성화 시킬 수 있어, 골형성을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61C 8/0013 (2013.01)
A61F 2/2846 (2013.01)
A61K 33/00 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61P 19/08 (2018.01)
A61F 2002/2817 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
A61L 2430/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1D1A1B03036033
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학 개인기초 연구
연구과제명	치주질환 치료제로서 일산화질소의 유용성에 대한 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

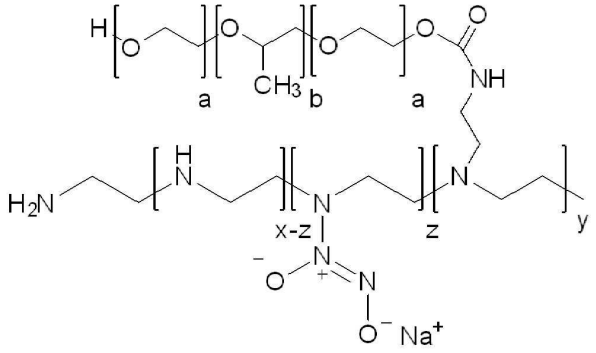
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에서,

a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 골형성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 따른 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 골형성 촉진제.

청구항 4

제3항에 있어서,

골형성 촉진제는, 골형성 촉진용 조성물이 5 내지 1000 ㎍/mL 농도로 포함되는 것인 골형성 촉진제.

청구항 5

제1항에 따른 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드.

청구항 6

제5항에 있어서,

골형성 촉진용 조성물이 5 내지 1000 ㎍/mL 농도 포함된 제제가 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 코팅된 것을 특징으로 하는 임플란트 또는 스캐폴드.

청구항 7

제5항에 있어서,

골형성 촉진용 조성물이 5 내지 1000 ㎍/mL 농도 포함된 제제가 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 내부에 담지되어 있는 것을 특징으로 하는 임플란트 또는 스캐폴드.

청구항 8

제5항에 있어서,

임플란트 또는 스캐폴드는, 콜라겐, 하루론산, 알지네이트, PLA(poly(lactic acid)), PLGA(poly(glycolic acid)), PGA(poly(glycolic acid)), PCL(polycaprolactone), PMMA(poly(methyl methacrylate)), 티타늄, 티타늄 합금 및 니켈-코발트 합금으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 것을 특징으로 하는 임플란트 또는 스캐폴드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 골조직은 끊임없이 골형성(Bone formation/Osteoblast differentiation)과 골흡수(Bone resorption/Osteoclast differentiation) 이 일어나는 동적인 조직이다. 파골 세포는 뼈를 흡수하는 반면, 조골세포는 뼈 기질을 합성하고 채우는 역할을 한다. 따라서 골량은 이러한 세포의 상대적인 기능에 의존하게 된다. 정상 성인에서 골흡수양과 골형성 양은 균형이 유지되고 있다.

[0004] 최근 10-20년동안, 인간의 수명 연장과 삶의 질 향상에 따라, 국내외의 임플란트 시장은 크게 성장하였고, 대중화되었다. 임플란트는 인공 치아 또는 제3의 치아로서, 치아의 결손/부식이 있는 부위나 치아를 뽑은 자리의 턱뼈에 골 이식, 골 신장술 등의 부가적인 수술을 통하여, 충분히 감쌀 수 있도록 부피를 늘린 턱뼈에 생체 적합적인 임플란트 본체를 심어서 자연치의 기능을 회복시켜주는 치과 치료 술이다. 정상적인 기능이 유지되고 있는 턱뼈와 식립이 된 임플란트 본체 표면과의 형태적, 생리적, 직접적 결합인 골유착(osteo-integration)이 이루어진 후 임플란트 주위 턱뼈의 골 개조의 과정을 거치게 된다. 이 골유착은 임플란트의 성공을 결정짓는 가장 중요한 지표라고 할 수 있다. 은 기간 내에 골유착이 되지 않을 경우에는, 초기 골유착의 실패로 인하여 임플란트의 시술 성공률이 떨어지게 된다. 따라서, 임플란트 식립의 성공을 위해서는, 골유착 및 골형성 능력을 증진시키는 것이 필요하다.

[0005] 임플란트의 성공율은 임플란트 식립 소재와 골세포간의 초기 골융합이 잘 되는 것에 좌우된다. 조골세포의 증식과 분화를 촉진시키는 TGF-ß family에 속하는 단백질인 BMP(Bone matrix protein)과 같은 생리활성물질을 임플란트 식립 시 임플란트 표면에 직접 도포하거나 수술부위 주변에 유포시키는 방법이 사용되고 있다. BMP 계열의 단백질이 골 형성 및 골분화, 치조골의 형성에 중요한 기능을 하는 것이 보고된 이후, 많은 실험이 진행되었으며, 동물 뿐만 아니라, 인간에서도 BMP 계열의 단백질이 골형성과 분화에 관여하여, 뼈를 재생시키고, 강화해 준다는 결과가 발표된 바 있다. 그러나, BMP 는 가격이 비쌀 뿐만 아니라, 체내에 존재하는 효소 등에 의하여 빠르게 분해되어 사라지므로, 효과적인 적용이 어려운 실정이다. 아울러, 상기 BMP 는 시술비용이 상승하며, 효과적으로 잔류하지 못하므로 적용이 어렵고, 반감기가 짧고, 표준화가 이루어지지 않은 실정이다.

[0006] 한편, 모든 신생 조직형성을 위해서는 기본적으로 주변조직으로부터 혈관 생성이 이루어져야 한다. 구체적으로, 신생골이 형성되기 위해서는 주변 골들과 골이식부위가 혈관으로 연결되어야 한다. 반면, 상술한

BMP와 같은 골형성 단백질은 혈관생성에 대한 고려가 전혀 없었기 때문에, 골결손부가 큰 경우에는 한계를 보여왔다.

[0007] 따라서, 혈관생성에 효과가 있으며, 골결손부가 큰 경우에도 골형성 세포를 촉진시킬 수 있는 골형성 촉진용 복합체 또는 제제 등이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 일본 공개특허 제2003-506142호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 혈관생성에 효과가 있으며, 골결손부가 큰 경우에도 골형성 세포를 촉진시킬 수 있는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공하고자 한다.

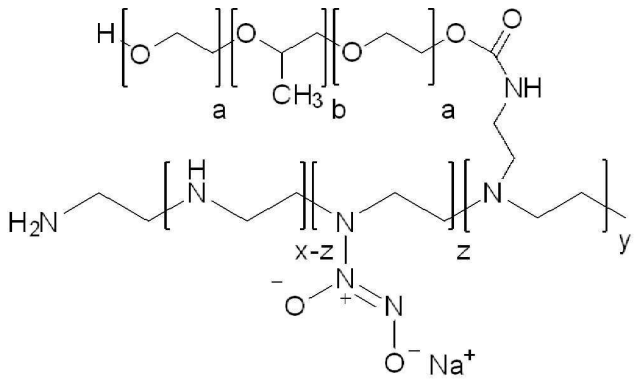
과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0013] 본 발명은 일 실시예에서,

[0014] 하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공한다:

[0015] [화학식 1]

[0016] 

[0017] 화학식 1에서,

[0018] a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

[0019] x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이다.

[0021] 또한, 본 발명은 일 실시예에서,

[0022] 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 골형성 촉진제를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 일 실시예에서,

[0025] 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드를 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따른 골형성 촉진용 조성물에 포함되는 일산화질소 복합체는 조골세포(osteoblast)와 유사한 특성을 지닌 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 를 활성화 시킬 수 있어, 골형성을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다.

[0028] 상기 조성물은, 액체 형태의 첨가제로도 사용될 수 있으며, 분말 형태 또는 골이식제 등에 코팅되어 임플란트 또는 스캐폴드에 적용될 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 실시예에서, 골형성 촉진제를 적용한 실험동물의 두개골 결손부를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시예에서, 그룹 1 내지 4의 이식재를 이식하고, 1 개월 후의 미세전단 단층촬영 이미지를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 실시예에서, HGF-1 를 웰 플레이트에 분주하고, 배양된 세포에 실시예 1을 처리한 후, 시간에 따른 세포들의 이동양상(cell migration assay)을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.

[0032] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0033] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0034] 본 발명에서, “포함한다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 본 발명은 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 기술적 특징은, 혈관생성에 효과가 있으면서, 골 결손부가 큰 경우에도 골형성 세포를 촉진시킬 수 있는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물, 이를 포함하는 혼합물, 임플란트 또는 스케폴드를 제공하는 것이다. 보다 상세하게는 골형성 촉진용 조성물에 포함되는 일산화질소 복합체는 조골세포(osteoblast)와 유사한 특성을 지닌 HGF-1((human gingival fibroblast-1)를 활성화시킬 수 있어, 골형성을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다.

[0038] 한편, 모든 신생 조직형성을 위해서는 기본적으로 주변조직으로부터 혈관생성을 이루어져야 한다. 구체적으로, 신생골이 형성되기 위해서는 주변 골들과 골이식 부위가 혈관으로 연결되어야 한다. 반면에, 종래의 골형성을 위하여 사용되었던 BMP 와 같은 골형성 단백질은 혈관생성에 대한 고려가 전혀 없었기 때문에, 골결손부가 큰 경우에는 골형성에 한계를 보여왔다.

[0039] 따라서, 본 발명에서는 혈관생성에 효과가 있으면서, 골 결손부가 큰 경우에도 골형성 세포를 촉진시킬 수 있는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물, 이를 포함하는 혼합제, 임플란트 또는 스케폴드를 제공한

다.

[0041] 설명에 앞서, 본 발명에서 사용하는 용어들 중 "골형성" 이란, 조골세포의 분화 및 활성의 촉진으로 인해 소실된 골조직의 치유로 골형성 촉진을 포함하는 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명에서는 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 의 활성을 증가시켜 소실된 골조직의 치유로 골형성을 촉진시키는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에서 촉진이란 이로 제한하는 것이 아니라 골조직, 골세포 또는 골매트리스 등의 양을 증가시키거나 또는 양이 증가되는 시간을 단축시키는 것으로, 골절의 치료 효과 등으로 확인할 수 있다.

[0042] 이러한 측면에서 골재생 또는 골형성은 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

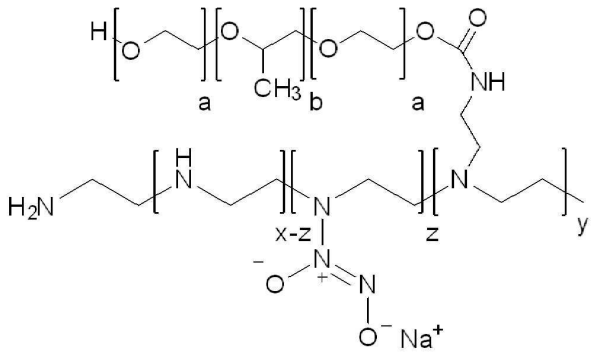
[0043] 본 발명에서, "뼈" 또는 "골"은 장골(긴뼈), 단골(잔뼈), 편평골(납짝뼈), 치조골 등을 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 골형성 촉진 조성물에 의해 치료될 수 있는 구체적인 증상으로는, 이로 제한하는 것은 아니나, 골의 성장 또는 발생이 비정상적인 이형성증 (dysplasia), 및 골감소증, 골다공증 및 골 손실의 각종 원인이 포함된다. 이러한 증상의 대표적인 예로는 연골 무형성증, 쇄골 두개골 이골증, 불완전골생성증, 체중 감소-유발 골 손실, 남성 골다공증, 폐경후 골 손실, 골 관절염, 신성 골이영양증, 침윤성 골 장애, 경구 골 손실, 턱의 골괴사, 유선상 과골증, 대사성 골 질환, 장기 이식-관련 골 손실, 신장 이식-관련 골 손실, 허혈성 골 질환 (예, 레그-칼베-페르테스(Legg-Calve-Perthes) 질 환, 국부 이동성 골다공증), 글루코코르티코이드-유발 골 손실, 헤파린-유발 골 손실, 특발성 골감소증 또는 골 다공증, 선천성 골감소증 또는 골다공증, 국부 골다공증, 골연화증, 인공 관절과 관련된 골 손실, HIV-관련 골 손실, 성장 호르몬의 손실과 관련된 골 손실, 낭성 섬유증과 관련된 골 손실, 화학요법-관련 골 손실, 종양-유 발 골손실, 암-관련 골 손실, 호르몬 절제 골 손실, 다발성 골수종, 약물-유발 골 손실, 신경성 거식증, 질환관련 안면골 손실, 질환-관련 악골 손실, 질환-관련 두개골(skull bone)손실이 포함된다. 추가적인 증상으로는 노화와 관련된 골 손실, 예를 들어 노화와 관련된 안면골 손실, 노화와 관련된 머리뼈 손실, 노화와 관련된 악 골 손실, 및 노화와 관련된 두개골 손실이 포함된다.

[0045] 또한, 본 발명의 조성물은 정형외과 시술, 이식 수술, 관절 대체, 골 이식, 골 미용 수술 및 골 복구, 예를 들어 골절 치유, 불유합 치유, 지연 유합 치유 및 안면 재건술의 결과를 개선하는 데 유용할 수 있다.

[0047] 따라서, 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공한다:

[0048] [화학식 1]

[0049] 

[0050] 화학식 1에서,

[0051] a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

[0052] x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이고, z는 1 내지 50 이다.

[0053] 본 발명의 일 실시예에 따르면, a는 78 일 수 있으며, b 는 30 일 수 있다. 아울러, y는 1일 수 있다. 이때, x 및 z 가 반복단위의 몰% 를 나타낼 때, x+z 는 100 이며, x 는 50 내지 99 일 수 있다. 이는, 최대 50 mol% 의 z 가 NONOates 형성에 참여할 수 있다는 것을 바탕으로 산정할 수 있다.

[0054] 나아가, 본 발명에 따른 일산화질소 복합체를 형성하기 위해 사용되는 유기분자는 2차 아민기를 포함하는 물질

이면 제한없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 2차 아민기를 가지고 있는 피롤리딘 (pyrrolidine), 디에틸트리아민 (diethyltriamine), 디에틸아민 (diethylamine) 등이 사용될 수 있다. 또한 고분자 물질의 경우 고분자의 주쇄 또는 측쇄 내에 2차 아민기를 함유하고 있는 고분자의 형태를 가지고 있으며, 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine) 또는 폴리에틸렌이민을 포함하고 있는 고분자, 그 외에 2차 아민기를 가질 수 있도록 개량된 고분자 등일 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 일 실시예에 따르면 골형성 촉진용 조성물에 포함되는 일산화질소 복합체는 조골세포(osteoblast)와 유사한 특성을 지닌 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 를 활성화 시킬 수 있어, 골형성을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다. 구체적인 일 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물이 골형성과 관련된 HGF-1 의 활성을 나타낸다는 점과 신생골을 형성하는 점을 확인하였다.

[0057] 본 발명은 일 실시예에서,

[0058] 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 골형성 촉진제를 제공한다.

[0059] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 골형성 촉진용 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 골형성 또는 골재생의 촉진시킬 수 있는 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 있다. 바람직하게는 골형성 촉진제의 제제으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다.

[0060] 골형성 촉진제로 사용하는 경우, 상기 골형성 촉진용 조성물은 골형성 촉진제 내에 5 내지 1000 ㎍/mL 농도로 포함될 수 있으며, 또는 10 내지 500 ㎍/mL, 100 내지 400 ㎍/mL, 150 내지 300 ㎍/mL 범위 일 수 있다. 다만, 이식되는 부위의 조건에 따라 농도를 다르게 결정해야 한다. 예를 들면, 염증 발생의 가능성 여부, 개방성 또는 폐쇄성 상처, 피질골과 해면골의 비율 또는 주변혈관의 발달정도 등에 따라 농도를 다르게 결정할 수 있다. 아울러, 용매로는 생리식염수, PBS (phosphate buffer saline)를 사용할 수 있다. 만일, 상기 조성물이 혼합제제 내에서 5 ㎍/mL 농도 미만인 경우에, 세포활성도를 증진할 수 없으며, 1000 ㎍/mL 농도를 초과하는 경우에는 세포독성의 문제가 발생할 수 있다.

[0061] 상기 촉진제는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 담체, 예를 들면, 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정제 등을 국소 투여용 제제의 경우에는 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에서, 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 임플란트(implant) 또는 스캐폴드(scaffold)를 제공한다.

[0064] 구체적으로, 상기 조성물은 상술한 바와 같이, 액체 형태의 주사제로도 사용될 수 있으며, 분말 형태 또는 골이식제 등에 코팅되어 임플란트 또는 스캐폴드에 적용될 수 있는 이점이 있다. 여기서, 임플란트 또는 스캐폴드는 생체 내에 매식되는 생체 매식용 의료기기에 관한 것으로, 당해분야에서 사용하는 모든 종류 및 형태의 임플란트 및 스캐폴드일 수 있다.

[0065] 상기 임플란트 또는 스캐폴드는 콜라겐, 하루론산, 알지네이트 및 키토산으로 구성된 천연고분자, PLA(poly(lactic acid)), PLGA(poly(glycolic acid)), PGA(poly(glycolic acid)), PCL(polycaprolactone) 및 PMMA(poly(methyl methacrylate))로 구성된 합성고분자, 및 티타늄, 티타늄 합금 및 니켈-코발트 합금으로 구성된 합성고분자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는 콜라겐의 성분을 포함할 수 있다.

[0066] 나아가, 본 발명에 따른 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드는 상기 조성물이 5 내지 1000 ㎍/mL 농도로 포함될 수 있다. 구체적으로, 조성물이 5 내지 1000 ㎍/mL 농도 포함된 제제가 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 코팅된 것을 특징으로 한다. 예를 들면, 상기 조성물은 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등에 혼합되어 사용될 수 있다. 바람직하게는 _5 ㎍/mL 농도의 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 제제가 콜라겐 성분을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드에 코팅될 수 있다.

[0068] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명에 대해 설명하고자 한다. 다만, 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 하기 실시예로 한정하는 것은 아니다.

[0070] <실시예>

[0071] **실시예 1. F68-BPEI-NO 합성**

[0072] 먼저, 40 mL 의 DCM(dichloromethane)에 용해된 1.79g 의 pNPC(4-nitrophenyl chloroformate)를 10g의 Pluronic F68(pNPC-F68)을 함유하는 DCM 50 mL에 적가하여 상기 Pluronic F68 을 활성화하였다. 밤새도록 교반한 후, pNPC 를 23.2 mL 의 DCM에 용해시켜 BPEI(branched polyethyleneimine) 를 생성시켰다. 그 후, 1.76g 의 BPEI 1.8k 를 6mL 의 TEA가 함유된 40 mL 의 DCM에 용해시키고, 혼합물을 0 ℃에서 15분 동안 교반하였다. 교반 후, F68-pNPC 용액을 BPEI 함유 용액에 적가하였다. 생성된 용액을 밤새 교반한 후, 실온으로 온도를 상승시켰다. 반응 후, 생성물을 차가운 디에틸에테르(diethyl ether)로 침전시켜 정제하였다. 나머지 BPEI 는 제거한 후 최종 생성물을 동결 건조하여 저장하였다.

[0073] 그리고, 2차 아민 부분에 NONOates 를 첨가하여 각 전구체(pyrrolidine, diethylenetriamine 및 F68-BPEI)로부터 py-NO, DETA-NO 및 F68-BPEI-NO 를 합성하였다.

[0074] 구체적으로, 1.64 mL의 피롤리딘을 5 mL의 아세토 니트릴, 5 mL 의 에테르 및 3.9 mL 의 30% NaOMe 과 혼합하였다. 그리고, 0.52 mL 의 디에틸렌 트리 아민을 15 mL 의 아세토 니트릴 및 0.9mL 의 NaOMe 용액과 혼합하였다.

[0075] 그리고, 20 mL의 메탄올에 용해된 F68-BPEI를 3mL 의 테트라 하이드로푸란 및 0.2 mL 의 30% NaOMe 용액과 혼합하였다.

[0076] 각각의 전구체 함유용액을 아르곤 퍼징을 갖는 고압의 NO 반응기에 넣었다. 그리고 반응기를 즉시 90 psi 의 NO 가스로 채우고 이 압력에서 3일동안 유지하여 디아제늄디올레이트(diazeniumdiolates)를 기능화시켰다. Py-NO 및 DETA-NO 를 여과에 의해 수집하고, 디에틸 에테르로 침전시켜 최종 F68-BPEI-NO 를 얻었다.

[0077] 마지막으로, 제조한 0.22mg의 F68-BPEI-NO을 1 mL의 식염수에 혼합하여, 1/50 mM 의 농도(220 ㎍/ mL)로 제조하였다.

[0079] **실시예 2. F68-BPEI-NO 합성**

[0080] 실시예 1과 동일한 방법으로 F68-BPEI-NO 을 합성하였으며, 상기 0.11mg의 F68-BPEI-NO을 1 mL의 식염수에 혼합하여, 1/100 mM 의 농도(110 ㎍/mL)로 제조하였다.

[0082] <비교예>

[0083] **비교예 1. F68-BPEI 합성**

[0084] 2차 아민 부분에 NONOates 를 첨가한 것을 제외하곤, 실시예 1에 개시된 동일한 방법으로 F68-BPEI 를 합성하였다.

[0086] <실험예>

[0087] **실험예 1. 신생골의 형성율 관찰**

[0088] 실험동물 및 실험재료

[0089] 본 실험에서는 생후 30일 이상된 무게 300-500 g 의 20마리의 rat을 사용하였으며, 실험동물 선정 및 관리 외과적 처치 등을 비롯한 모든 실험절차는 고려대학교 의료원 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 시행하였다.

[0090] 실험재료로는 2%(w/v) 리도카인 및 1:100,000 (v/v)의 에피네프린, 피브리노겐, 아프로티닌, 콜라겐 막 및 bone powder 을 각각 구입하여 하기의 실험에 사용하였다.

[0092] 실험 동물의 외과적 처치

[0093] 먼저, 각각의 rat에 케타민(Ketamine-HCl, 35 mg/kg; Yuhan, Seoul, Korea)과 자일라진(Xylazine, 5mg/kg; Bayer Korea)을 근육주사하여 전신마취를 유도한 다음, 두개골 부위의 털을 제거하고, 두개부 수술부위를 포비돈(povidone iodine)으로 소독하였다. 다음으로는 2% 리도카인(Lidocaine)으로 수술부위를 국소 침윤마취한 후, 전두골의 전방에서 후방부에 이르기까지 중앙부를 따라 약 5 cm 의 두피를 절개하고 골막(periosteum)을 박리하여 전두골과 두정골을 노출시켰다. 노출된 두개골을 6mm 트레핀 버(trephine bur)를 이용하여 뇌경막에 손상을 주지 않도록 역회전 드릴모터를 사용하여 4개의 원형 골 결손부를 형성하여 각각의 두개골 결손부에 이식재를 매식하였다. 매식을 완료한 후, 골막과 피하조직과 두피는 흡수성 봉합사로 봉합하였다. 수술 후 일주일간 항생제(gentamicin, 0.1mg/kg) 를 근육 내로 주사하여 외부 미생물 감염으로 인한 영향을 최소화하였다(도 1 참조).

[0095] 실험군 및 대조군의 설정

[0096] 실험동물의 두개골 결손부는 하기와 같이 4 개의 그룹으로 나누어 처리하였다.

[0097] 그룹 1: 대조군, 이식재를 넣지 않은 군

[0098] 그룹 2: 비교예 1(F68-BPEI)의 이식재를 넣은 군

[0099] 그룹 3: 실시예 1(F68-BPEI-NO, 농도 1/50mM)의 이식재를 넣은 군

[0100] 그룹 4: 실시예 2(F68-BPEI-NO, 농도 1/100mM)의 이식재를 넣은 군

[0102] 한편 그룹 2, 3, 4의 이식재는 각각 비교예 1, 실시예 1, 2의 조성물을 포함하는 것으로, 각각의 조성물은 collagen sponge와 bone powder 에 적신 것을 의미한다.

[0104] 각 그룹은 수술 한달 후 펜토바비탈(phentobarbital, 100 mg/kg)을 정맥 내 주사하고, 관찰 하였으며, 각각의 동물로부터 희생 후 결손부를 포함한 두개골 절편을 획득하였다. 모든 조직 절편은 분석 시행전 4% 파라포름알데히드 인산완충용액(paraformaldehyde BPS, pH 7.2)으로 일주일 동안 고정하였다.

[0106] 미세전단단층 촬영 및 분석

[0107] 먼저, 고정된 두개골 시편들을 고해상도 미세전단 단층촬영 시스템(Three-dimensional micro focus computed tomography; micro-CT, Sky-Scan 1172TM)을 이용하여 스캔 후, 이로부터 영상이미지를 생성하였다.

[0108] 그리고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0110] 도 2를 참조하면, collagen sponge 를 매개체로 사용하였을 때, 일산화질소 복합체를 포함하는 그룹 3, 4(실시예 1, 2)에서 높은 신생골 생성을 나타내었다.

[0111] 아울러, Bone powder를 매개체로 사용하였을 때, 일산화질소 복합체를 포함하는 그룹 3, 4 (실시예 1, 2)에서 powder 의 모양이 잘 유지되는 양상을 보였다. 나아가, 일산화질소의 농도가 1/50 mM일 때에 비하여 1/100 mM 에서 보다 높은 신생골 형성을 보였다(220㎍/mL >110㎍/mL).

[0112] 한편, 신생골의 양은 bone powder 보다는 collagen sponge를 media로 사용하였을 때 많이 형성되는 것을 보였는데, 이는 액체형태의 일산화질소 복합체를 보다 잘 보관하는 구조를 가졌기 때문인 것으로 보인다.

[0114] **실험예 2. 세포 이동 분석(cell migration assay)**

[0115] ATCC (American Type CultureCollection)에서 분양받은 인체치은섬유아세포(Human gingival fibroblasts;

HGFs) 1 X 10^4 cells/well을 6-웰 플레이트에 분주한 후, 일정 간격의 갭(gap)을 형성하기 위하여 멸균된 마이크로피펫 팁을 이용하여 웰의 가운데 부분을 스크래칭하였다. 상기 세포를 DMEM 에서 24시간동안 배양하였다.

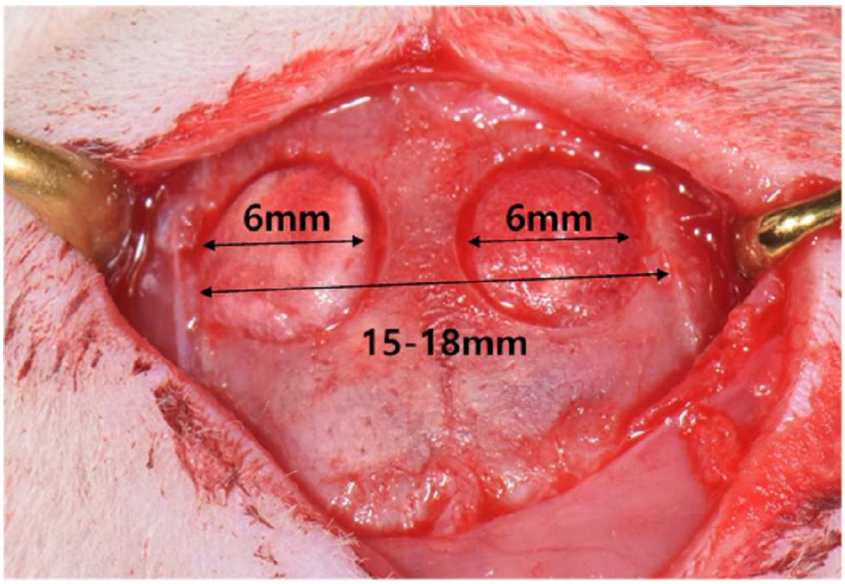
[0116] 배양된 세포에 실시예 1을 처리한 후, 시간에 따른 세포들의 이동양상을 24, 36, 48 시간 후에 확인하였다. 그리고, 아무것도 처리하지 않은 세포(대조군)와 비교하였다.

[0117] 세포들의 이동양상을 촬영한 사진을 도 3에 개시하였다.

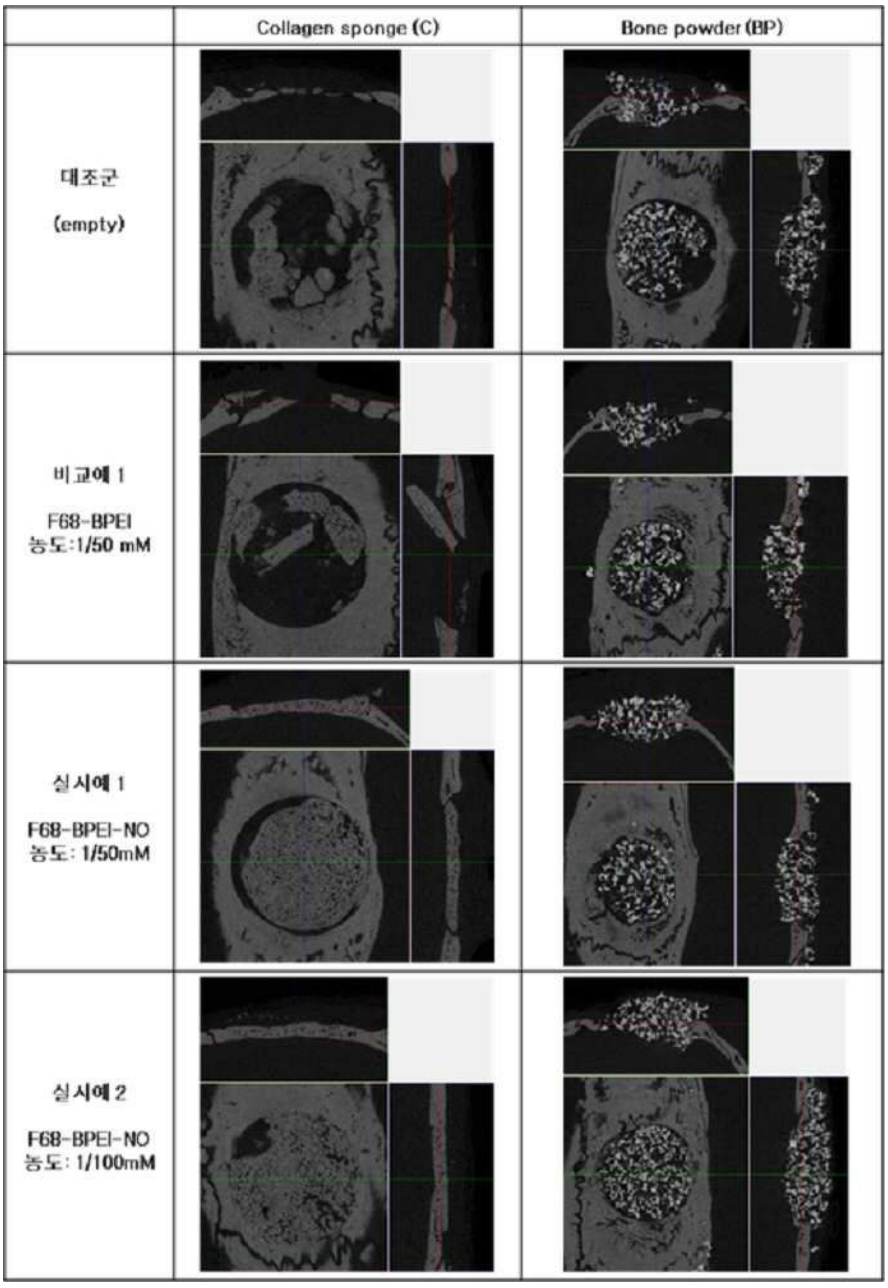
[0118] 도 3을 참조하면, HGF-1 활성이 대조군(좌측)에 비하여 일산화질소 처리군(우측)에서 높게 나타난 것을 보여준다.

도면

도면1



도면2


Collagen sponge (C)
Bone powder (BP)
대조군
(empty)
비교예 1
F68-BPEI
농도:1/50 mM
실시예 1
F68-BPEI-NO
농도: 1/50mM
실시예 2
F68-BPEI-NO
농도: 1/100mM

도면3

