



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0124126
(43) 공개일자 2011년11월16일

(51) Int. Cl.

A61K 33/14 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) A61L 27/40 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0017345

(22) 출원일자 2011년02월25일

심사청구일자 2011년02월25일

(30) 우선권주장

1020100043667 2010년05월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울 성북구 하월곡동 39-1

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

석현광

서울특별시 도봉구 방학1동 삼성래미안아파트1차
108동 101호

김유찬

경기도 고양시 덕양구 행신동 소만마을 부영아파
트 103동 1008호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

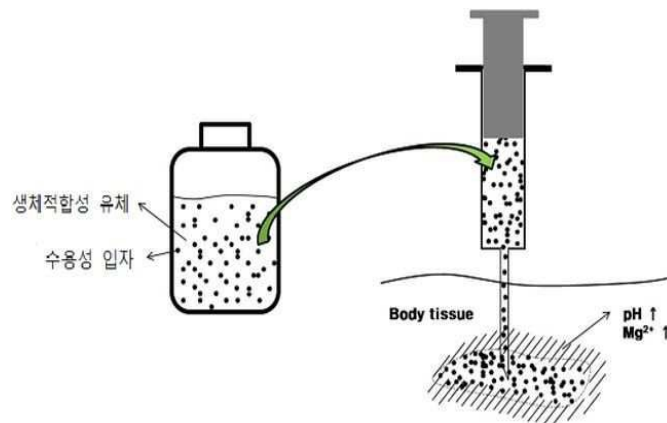
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 외과적 수술 없이 생체 내부에 주입되어, 국부적으로 체내의 pH 및/또는 2가 양이온의 농도를 변화시킴으로써 골다공증, 류마티스 관절염 등의 골질환과 기타 국부적 pH 및/또는 Mg 이온의 농도 조절과 관련된 질환의 예방 또는 치료가 가능한 주입용 약학 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

양석조

대전광역시 동구 삼성동 한밭자이아파트 104동 801호

한길수

경기도 용인시 수지구 상현동 두산위브아파트 808동 904호

장재석

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 112동 103호

이동호

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 32동 1105호

장은주

강원도 원주시 무실동 이편한세상아파트 206동 101호

이강식

서울특별시 양천구 목5동 신시가지아파트 5단지

특허청구의 범위

청구항 1

알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자와, 생체적합성 유체를 포함하고 pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수용성 입자는 상기 생체적합성 유체 전체 부피에 대하여 1 내지 50 %(v/v)로 포함되는 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알칼리 토금속은 Be(베릴륨), Mg(마그네슘), Ca(칼슘), Sr(스트론튬), Ba(바륨), 및 Ra(라듐)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 알칼리 토금속의 합금은 Be(베릴륨), Mg(마그네슘), Ca(칼슘), Sr(스트론튬), Ba(바륨), 및 Ra(라듐)으로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상이 융합된 것인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 알칼리 토금속의 화합물은 알칼리 토금속의 산화물, 수산화물, 황산화물, 및 염화물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 수용성 입자는 직경이 0.001 mm 내지 0.45 mm인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 유체는 증류수, 식염수, HBSS 용액(Hanks' balanced salt solution), 소듐 히아루로네이트(Sodium Hyaluronate, SH), 콜라겐(Collagen), 알긴산(Alginic acid), 플루로닉(pluronic), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리(N-이소프로필 아크릴아마이드)(Poly(N-isopropyl acrylamide)) 및 피브린으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 1000Pa.s 이하의 점성을 가지는 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

뼈의 손상, 골다공증, 류마티스 관절염, 파제트병, 골형성 부전증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골 질환, 대사성 골질환, 또는 pH 및 2가 이온 농도 변화에 의해 치료 및 예방이 가능한 질환에 사용되는 약학 조성물.

청구항 10

알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자를, 생체적합성 유체와 혼합하는 단계를 포함하는, pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 수용성 입자는 표면의 일부 또는 전부를 산화 또는 수산화시키거나, 수용성 보호막으로 코팅한 것인, 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 수용성 보호막은 PLLA(polylactic acid), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 및 PCD(Polycarbonatediol)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수용성 고분자로 형성된 것인, 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 외과적 수술 없이 생체 내부에 주입되어, 국부적으로 체내의 pH 및/또는 2가 양이온의 농도를 변화시킴으로써 뼈의 손상, 골다공증, 류마티스 관절염, 파제트병, 골형성 부전증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 등의 다양한 골질환을 비롯하여 그 외 국부적 pH 및/또는 Mg 이온의 농도 조절과 관련된 질환의 예방 또는 치료가 가능하고, 생체 주입 후에는 분해되어 생체 내에서 소멸되는 주입용 약학 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 메디컬 임플란트의 대표적 재료는 우수한 기계적 성질 및 가공성을 갖고 있는 금속재료이다. 그러나 금속의 우수한 성질에도 불구하고, 금속성 임플란트는 몇 가지 문제점을 갖는데, 응력차폐현상(stress shielding), 이미지 왜곡(image degradation), 임플란트 이동(implant migration) 등이 그것이다.

[0003] 이러한 금속성 임플란트의 단점을 극복하기 위하여, 생체분해성 임플란트의 연구개발이 제기되었다. 이러한 생체분해성 재료의 의학적 적용은 1960년대 중반부터 폴리유산(polylactic acids, PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid, PGA), 또는 이들의 공중합체(copolymer)인 PLGA 등의 고분자를 위주로 이미 연구되기 시

작하였다. 그러나, 전술한 생체분해성 고분자들은 낮은 기계적 강도, 분해시의 산 발생 문제, 생체분해속도 제어의 어려움 등으로 인해 그 응용이 제한되어 있었고, 특히 기계적 강도가 낮은 고분자 특성으로 인하여 강한 하중을 받는 정형외과 분야나 치과 분야 임플란트에의 적용은 힘들었다.

[0004] 상기와 같은 생체분해성 고분자의 단점을 극복하기 위하여 몇 가지 생체분해성 재료가 연구되었는데, 대표적인 것으로서는 트리-칼슘-포스페이트(tri-calcium phosphate, TCP)와 같은 세라믹이나, 생체분해성 고분자와 생체분해성 하이드록시apatite(hydroxyapatite, HA)의 복합재료 등이 있다. 하지만, 이러한 재료의 기계적 특성이 생체분해성 고분자에 비해 두드러지게 달라진 것이 없으며, 특히 세라믹 재료의 취약한 내충격성은 생체재료로서 치명적인 단점으로 제기되었다. 또한, 생체분해성의 제어 등 여전히 명확히 밝혀진 바가 없어, 실효성에 의문이 있다.

[0005] 한편, 2000년 이후 반응성이 높은 활성 금속을 이용하여 생체분해성 금속소재를 개발하고자 하는 연구가 한국을 비롯하여 독일, 미국, 일본 등 기술 선진국에서 진행되고 있다. 활성금속은 고분자 소재에 비해 강도 및 생체적합성이 우수하며 생체 분해 시 골형성 속도를 증가시키는 효과가 있어 정형외과용 임플란트, 심혈관용 스텐트, 골 충전제, 스캐폴드 등의 소재로 고려되고 있다.

[0006] 그러나 이러한 생체분해성 활성금속 중 하나인 마그네슘(Mg)은 골조직과 매우 유사한 영양을 가지기 때문에 정형외과용 임플란트 소재로 주목 받았으나, 인체 삽입 시 수소를 발생시키면서 분해되어 기계적 물성이 저하되므로 부하를 지탱해야 하는 정형외과용 소재로는 부적합하다는 문제가 있었다.

[0007] 또한, 종래에는 상기와 같은 생체분해성 소재를 생체 내에서 구현하기 위해 외과적 수술방법을 이용하여 인체 내에 이식하였는데, 치료의 대상이 되는 환자의 고통과 불편, 시술상의 불편 및 이에 수반되는 의료사고의 가능성 등의 문제가 있었다.

[0008] 한편, 종래의 경구투여용 골다공증 치료제는 체내 손실 부위를 물리적으로 충전할 수 없다는 문제가 있었으며, 필요한 부위만 국부적으로 제어하기에 곤란하여 인체 전체적인 환경 변화를 야기하는 문제가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자와, 생체적합성 유체를 포함하고 pH 및/또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자를, 생체적합성 유체와 혼합하는 단계를 포함하는, pH 및/또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들이 생체분해성 금속에 대한 연구를 수행하는 과정에서, 알칼리 토금속이 생체 내에서 분해되면서 2가 양이온 농도 및/또는 pH를 증가시키고, 이러한 이온 농도 증가 및/또는 pH 상승이 골 형성 속도를 증가시키거나, 파골세포와 같은 특정 세포의 활성도를 떨어뜨려 이들 세포와 관련된 질환의 치료에 적용될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 생체분해성 알칼리 토금속을 생체적합성 유체와 함께 생체 내에 주입함으로써 체내 손실 부위를 물리적으로 충전할 수 있으며 목적으로 하는 특정 부위만을 국부적으로 제어할 수 있음을 확인하였다.

[0012] 뿐만 아니라, 본 발명의 주입용 약학 조성물은 외과적 수술을 요하지 않으므로 외과적 수술방법에 따른 환자의 고통과 불편, 시술자의 시술상 불편 및 이에 수반되는 의료사고의 가능성 등의 문제를 해결할 수 있으며, 특히 마그네슘의 경우, 상술한 효과 뿐만 아니라, 종래의 수소 발생으로 인한 기계적 물성 저하 문제 또한 해결할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 본 발명은 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자와, 생체적합성 유체를 포함하고 pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물을 제공한다.

- [0014] 또한 본 발명은 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자를, 생체적합성 유체와 혼합하는 단계를 포함하는, pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 이하 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0016] 본 발명은 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자와, 생체적합성 유체를 포함하고 pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 인체의 pH는 위치에 따라 다르게 유지된다. 동맥혈은 7.4, 정맥혈은 7.36 내외, 피부 주변은 7.1 내외, 그리고 세포내액은 6.8-7.3 정도로 유지되고 있다. 골조직에서의 정확한 pH 값은 보고되지 않고 있으나 pH가 낮으면 파골세포가 활성화되고 조골세포는 비활성화되어 각종 골질환이 유발될 수 있다.
- [0018] 따라서, 상기 약학 조성물은 골조직 내부 또는 골조직 주변에서의 pH를 바람직하게는 7.4 이상으로, 더욱 바람직하게는 7.4 내지 8.0으로 상승시킴으로써 조골세포의 활동도를 증가시킬 수 있다. 한편, 지나치게 pH가 높아지면 세포독성이 나타나므로 이는 피하는 것이 바람직하다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물의 구성 및 효과에 대한 내용을 도 1에 개략적으로 나타내었다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물은 바람직하게는 상기 생체적합성 유체 전체 부피에 대하여 상기 수용성 입자를 1 내지 50 %(v/v), 더욱 바람직하게는 주입에 적절한 점도를 갖도록 1 내지 20 %(v/v) 로 포함할 수 있다. 상기 범위에 미달하면 pH 또는 2가 양이온 농도 조절 활성이 효과적으로 발휘되지 못하며, 상기 범위를 초과하면 약학 조성물의 점도가 지나치게 증가하여 주사기를 통한 주입이 곤란하므로 바람직하지 않다.
- [0021] 상기 수용성 입자는 생체 내에서 분해 및 흡수되어 국부적으로 pH 및/또는 2가 양이온 농도를 변화시킬 수 있고, 예컨대 골 형성 또는 관절염 치료 등과 같은 본 발명의 목적을 달성한 후에는 소멸되는 물질이다. 다만 상기 수용성 입자의 분해는 반드시 생체 내에서 이루어질 필요는 없으며, 본 발명의 약학 조성물을 제조하는 과정에서 일부 또는 전부 분해될 수도 있다.
- [0022] 상기 수용성 입자는 단일 물질 또는 혼합물로 이루어질 수 있으며, 상세하게는 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다.
- [0023] 상기 알칼리 토금속은 주기율표 상에서 2족에 속하는 원소들로서 Be(베릴륨), Mg(마그네슘), Ca(칼슘), Sr(스트론튬), Ba(바륨) 또는 Ra(라듐)이고, 바람직하게는 Mg, Ca 또는 Sr이나 이에 제한되지는 않는다.
- [0024] 상기 알칼리 토금속의 합금은 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 Be(베릴륨), Mg(마그네슘), Ca(칼슘), Sr(스트론튬), Ba(바륨) 및 Ra(라듐)으로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상을 서로 융합시켜 제조한 것일 수 있다.
- [0025] 상기 알칼리 토금속의 화합물은 알칼리 토금속을 포함하여 이루어지는 다양한 화합물로서, pH 및/또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타낼 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하며, 예컨대 알칼리 토금속의 산화물, 수산화물, 황산화물 또는 염화물이 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 수용성 입자가 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 및 알칼리 토금속의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 혼합물인 경우, 알칼리 토금속, 알칼리 토금속의 합금 또는 알칼리 토금속의 화합물 내의 알칼리 토금속은 동일하거나 상이할 수 있다. 예컨대, 상기 수용성 입자는 Mg 및 MgO로 이루어진 혼합물이거나, Mg 및 CaO로 이루어진 혼합물이 될 수 있다.
- [0027] 상기 수용성 입자는 수용액에서 분해될 때 pH 및 2가 양이온 농도를 모두 상승시키거나(화학식 1 내지 3), 또는 pH 상승 없이 2가 양이온의 농도만을 상승시킬 수(화학식 4 및 5)도 있다. 또한 용해도 이상의 수용성 입자를 첨가하는 경우, 생체 내에서의 혈액과 생체액의 순환에 의해 pH 및 2가 양이온 농도가 정상 수치로 감소하게 되므로 과량 첨가된 수용성 입자가 지속적으로 용해되면서 국부적으로 pH 및/또는 2가 양이온 농도 상승 기간을 연장할 수 있다. 이에 대한 예시를 하기 화학식 1 내지 5에 나타냈다. 다만 하기 화학식에 나타난 수용성 입자들은 예시에 불과하고 예컨대, 알칼리 토금속을 포함하는 다양한 수화물에서도 이와 동일한 효과를 기대할 수 있다.
- [0028] <화학식 1>

- [0029] $\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + \text{H}_2(\text{g}) + 2\text{OH}^-$
- [0030] <화학식 2>
- [0031] $\text{MgO} + \text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2\text{O}$
- [0032] <화학식 3>
- [0033] $\text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2\text{O}$
- [0034] <화학식 4>
- [0035] $\text{MgCl}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + 2\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$
- [0036] <화학식 5>
- [0037] $\text{MgSO}_4 + \text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$
- [0038] 상기 수용성 입자를 구성하는 물질 중 동일한 화학식으로 표현되는 물질도 서로 다른 생체분해 특성을 가질 수 있다. 일례로, MgO로 표현되는 마그네슘 화합물(산화물)의 경우 물에서 쉽게 분해되는 light MgO와 물에서 쉽게 녹지 않는 hard MgO가 있으며, 바람직하게는 분해 속도가 빠르며 쉽게 물에서 분해되는 Light MgO를 사용할 수 있다.
- [0039] 수용성 입자의 형상은 구형, 타원형, 불규칙형 등 어떠한 것이라도 무방하며 수용성 입자의 크기는 이에 제한되지 않으나, 일반적으로 사용하는 26호 주사기의 내부 직경(0.45mm)을 고려하여 바람직하게는 직경 1 μm (0.001 mm) 내지 450 μm (0.45 mm), 더욱 바람직하게는 10 μm (0.01 mm) 내지 300 μm (0.3 mm)가 될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 상기 수용성 입자를 생체 내로 이송하기 위한 운반체로서 생체적합성 유체를 포함한다. 상기 생체적합성 유체는 생체분해성 또는 생체흡수성과 같은 생체적합성이 있는 유동성 소재면 어떠한 것이든 무방하며, 단일 물질이거나 혼합물로 이루어질 수 있다.
- [0041] 이에 따라 상기 생체적합성 유체를 사용하여 상기 수용성 입자를 생체 내로 이송할 수 있으므로, 외과적 수술이 필요한 기존의 고체형 생체분해성 소재 의료기기/기구의 생체 이식 과정을 생략할 수 있고 간단한 시술에 의한 pH 및/또는 2가 양이온 농도 제어를 통해 각종 관련 질환을 치료할 수 있다는 이점이 있다.
- [0042] 바람직하게는 상기 생체적합성 유체는 증류수, 생체적합성 수용액, 생체적합성 하이드로젤, 온도 또는 pH 감응성 고분자, 및 경화형 고분자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 될 수 있다.
- [0043] 상기 생체적합성 유체로서 증류수 또는 생체적합성 수용액과, 생체적합성 하이드로젤, 온도 또는 pH 감응성 고분자, 및 경화형 고분자 중 어느 1종 이상을 함께 포함하는 경우에, 상기 생체적합성 하이드로젤, 온도 또는 pH 감응성 고분자, 및 경화형 고분자 중 어느 1종 이상은 상기 생체적합성 유체 전체 중량에 대하여 0.00001 내지 30 중량% 이하로 포함될 수 있다. 상기 범위를 초과하면 약학 조성물의 점도가 증가하여 주사기를 통한 주입이 곤란하므로 바람직하지 않다.
- [0044] 상기 생체적합성 수용액으로는 예컨대, 식염수, HBSS 용액(Hanks' balanced salt solution, 한크의 평형 염 용액)을 사용할 수 있으며, 생체적합성 하이드로젤은 인조 및 천연 하이드로젤을 모두 포함하며 예컨대, 소듐 히알루로네이트(Sodium Hyaluronate, SH), 콜라겐(Collagen), 알긴산(Alginate acid) 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 상기 온도 또는 pH 감응성 고분자는 특정 pH 또는 온도에 반응하여 물리적 또는 화학적 특성의 변화가 진행되는 특성을 가진 고분자를 의미하며 예컨대, 고분자의 소수성도 또는 친수성도가 외부 자극에 반응하여 변화할 수 있고, 이에 따라 고분자의 용해도 변화를 초래한다. 특정 고분자는 단일한 자극 또는 2 이상의 자극에 반응할 수 있고, 다른 자극에 대해 다른 반응을 나타내거나, 물리적 또는 화학적 특성이 변할 수 있다. 이러한 온도 또는 pH 감응성 고분자로는 예컨대, 플루로닉(pluronic, PEO(Polyethylene oxide)-PPO(Polypropylene oxide)-PEO(Polyethylene oxide) 블록공중합체; 예컨대, pluronic F-127((PEO)20-(PPO)70-(PEO)20 block-copolymer)), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 또는 폴리(N-이소프로필 아크릴아마이드)(Poly(N-

isopropyl acrylamide))를 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0046] 상기 경화형 고분자는 구성물질가의 화학적 또는 물리적 결합에 의해 점도가 상승하는 물질로서 예컨대, 트롬빈, 피브리노겐 등으로 이루어진 피브린을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0047] 이 밖에도 본 발명의 생체적합성 유체는 특별히 제한되지 않으며, 당업계의 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0048] 상기 생체적합성 유체는 상술한 수용성 입자의 생체 내 이송뿐만 아니라, 수용성 입자가 생체 내 주입된 후 원하는 위치에서 원하는 시간 동안 기능을 발휘하도록 하기 위해 특수한 조합 형태의 혼합물로 이루어질 수 있다.
- [0049] 구체적으로, 생체적합성 유체의 점성이 낮으면 주사기를 통해 생체 내부는 주입하기는 쉽지만, 생체 내 혈류에 의해 쉽게 흡수될 수 있어 상대적으로 짧은 시간 동안 pH 및/또는 2가 양이온 농도 상승효과가 있게 된다. 또한, 생체 흡수 정도가 너무 빠른 유체를 선정할 경우 원하는 시간 동안, 원하는 pH 및 2가 양이온 농도를 유지할 수 없게 된다. 따라서 목적에 맞게 생체적합성 유체의 조합을 구성할 수 있다.
- [0050] 예컨대, 생체 내에서 분해 및 흡수 기간을 연장하고자 할 경우 SH보다는 분해속도가 느린 피브린 유체가 바람직하고, 생체 내에서의 강도 및 형상 유지가 중요할 경우 바람직하게는 F-127과 같은 온도 감응성 고분자가 포함된 하이드로젤을 사용함으로써 주입 과정에서는 점성을 낮게 하여 시술을 편하게 하고, 생체 내에 주입된 후에는 승온에 따른 젤화 반응에 의해 점성이 증가하도록 할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학 조성물은 주사기를 통한 주입시 시술이 용이하도록 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 1000Pa.s 이하의 점성을 가질 수 있다.
- [0052] 또한 바람직하게는 생체 내로 주입시에는 작은 직경의 주사 바늘을 통해서 쉽게 주입이 이루어지도록 50Pa.s 이하의 점성을 가지는 것이 바람직하고, 실온 내지 체온 사이의 온도에서는 점도가 증가하여 생체 내로 주입된 이후(예컨대, 32 내지 40℃)에는 일정기간 동안 정해진 위치에서 약물기능을 발휘할 수 있도록 100 내지 10000Pa.s의 높은 점성을 가지는 것이 바람직하다. 이와 같이 생체 외에서의 점도와 생체 주입후의 점도를 다르게 제어하기 위해서는 온도 또는 pH 감응성 고분자, 및 경화형 고분자 중 어느 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학 조성물은 pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내므로 일반적인 뼈의 손상 뿐만 아니라, 골다공증, 류마티스 관절염, 파제트병, 골형성 부전증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환과 같이 파골세포가 활성화되어 나타나는 골질환에 효과가 있으며, 이 외에도 pH 또는 2가 양이온 농도의 조절에 의해 증상이 개선될 수 있는 다양한 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0054] 본 명세서에서 “치료”라 함은 관련 질환의 완전한 치료뿐만 아니라 증세의 경감, 완화 또는 개선 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [0055] 정상적인 상태의 인체 내부에서는 pH가 평균 7.2 정도로 일정하게 유지되고 있으며, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 각 위치별로 pH 6.8~7.4 범위에서 조금씩 다르게 유지되고 있다.

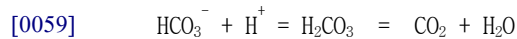
표 1

[0056]	위치	pH
	동맥혈(Arterial blood)	7.4에 근접
	정맥혈(Venous blood)	~7.36
	피부(Skin), 간질(interstitial)	~7.1
	골(Bone)	보고되지 않음
	세포내(Intracellular)	6.8~7.3 (조직 및 조직의 대사율에 따라)

- [0057] 인체 내부에서의 평균 pH는 매우 좁은 범위에서 유지되어야 하며 허용 범위를 벗어날 경우 신체 활동은 정지하게 되어 매우 위험한 상황이 된다. 그러나 국부적으로 pH가 변하는 것은 꽤 넓은 범위에서 허용되고 있으며, 대략 pH 6 내지 8.5 전후까지는 세포가 생존하는 데 큰 지장은 없다. 생체 내에서의 국부적인 pH 변화는 다양한 생리 현상의 변화를 초래하게 된다. 생체 내에서의 pH의 균형은 기본적으로 세포에서의 에너지원(ATP) 형성과 같은 세포활동에 의한 CO₂ 농도 증가와 이에 따른 H⁺이온 농도 증가(pH 감소), 폐에서의 호흡 활동에 의한 CO₂ 농도 감소에 따른 H⁺이온 농도 감소(pH 증가)로 설명될 수 있다. 이러한 생체 내 pH 균형은 하기 화학식 6에 나

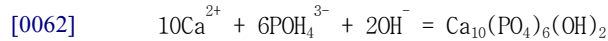
타넨 바와 같으며, 그 결과 생체 내에서의 pH는 평균 7.2-7.4를 유지하게 된다.

[0058] <화학식 6>



[0060] 한편, 생체를 구성하는 뼈조직은 Ca와 P를 주 원소로 하여 이루어지는데, 이와 관련하여 하기 화학식 7에 나타났다.

[0061] <화학식 7>



[0063] 상기 화학식 7에서 알 수 있듯이 생체 내의 pH가 높으면(OH⁻이온 농도가 높으면) 뼈 조직이 형성되어 pH를 낮추고, pH가 낮으면 뼈 조직을 분해함으로써 생체 내의 pH를 일정하게 유지할 수 있음을 알 수 있다. 실제로 뼈 조직의 분해를 담당하는 파골세포(Osteoclast)의 활동도는 pH가 낮아질수록 증가하고, 뼈 조직을 형성하는 조골세포(Osteoblast)의 활동도는 pH가 높아질수록 증가하는 것을 도 2의 기존 연구자의 실험 결과[1. Timothy R. Arnett, Extracellular pH regulates bone cell function, The journal of nutrition, 2. A. Brandao-Burch, Calcif Tissue Int (2005) 77: 167-174]로부터 확인할 수 있다. 또한 관절염이 있는 환자의 경우 관절염 발생 부위에서의 pH가 정상 수치보다 낮고, 파골세포의 활동도가 높다는 동 분야의 상식에 근거해 볼 때, 본 발명의 약학 조성물을 골질환 부위에 주입함으로써 골밀도를 증가시키고, 관절염을 치유 및 완화시킬 수 있다. 또한 골질환이 없는 정상인의 경우에도 치과용 임플란트 시술을 위해 추가적인 골형성이 필요하거나, 빠른 골밀도 증가가 필요할 경우에도 본 발명의 약학 조성물을 사용할 수 있다.

[0064] 2가 양이온 농도의 조절을 통해서도 골형성 촉진이 가능하다. 생체분해성 소재와 조골세포 간의 세포상호작용은 주로 세포막 연관 부착 수용체(membrane-associated adhesion receptor)를 통해 이루어진다고 생각되며, 부착 수용체는 인테그린 슈퍼패밀리(integrin superfamily)에 속한다. 기능적인 인테그린은 비공유적으로 연관된 알파-서브유닛과 베타-서브유닛으로 구성된 트랜스멤브레인 이형이합체(transmembrane heterodimer)이다. 알파-서브유닛의 세포외 도메인(extracellular domain)은 2가의 양이온과 결합하는 모티프(Motif)를 구성하며, 이러한 2가 양이온들의 세포외 변화가 각각의 리간드(ligand)에 인테그린 친화도(affinity)를 변화시킨다. 인테그린은 세포외 환경에서부터 세포내로 시그널을 변환(transduce)하거나 세포외-내 신호전달(outside-in signaling) 또는 그 반대로 세포내-외 신호전달(inside-out signaling)을 통해 유전자 발현을 조절하여 조골세포를 포함한 다양한 세포 형태에서 세포 이동, 세포 증식, 세포 분화와 세포자멸을 조절한다. 마그네슘이 조골세포에 미치는 영향에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 2가의 양이온이 관련되어 있을 것으로 여겨진다. 본 발명의 약학 조성물은 수용성 입자가 분해되면서 생체 내 2가 양이온의 농도가 높아지므로 후술할 실시예 2 및 실시예 3에서 나타난 바와 같이 골형성을 촉진하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0065] 상술한 본 발명의 약학 조성물의 작용 및 효과는, 발명자의 선행 연구 결과 및 관련 업계 종사자에게 알려진 지식에 기초하여 예상되는 질병 치료 효과를 예시한 것에 불과하며, 이외에도 다양한 질환 치료 또는 예방 효과가 있을 수 있다. 본 발명의 목적에 반하지 않는 범위에서 새로운 병리학적 현상의 발견과 이에 따른 본 발명의 새로운 응용 분야를 제시하는 것에 의해 본 발명의 권리가 제한되지 않는다.

[0066] 본 발명은 또한 알칼리 토금속, 이의 합금 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 수용성 입자를 가공 또는 가공하지 않고, 생체적합성 유체와 혼합하는 것을 포함하는, pH 또는 2가 양이온 농도의 조절 활성을 나타내는 주입용 약학 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0067] 또한, 바람직하게는 본 발명의 약학 조성물의 각 구성 물질을 모두 혼합해두거나, 또는 각 구성 물질의 일부를 독립적으로 준비한 후에 시술 전에 혼합하여 사용할 수 있다.

[0068] 본 발명의 약학 조성물은 외과적 수술 없이 생체 내부에 주입될 수 있으므로, 치료 대상이 되는 환자의 고통과 불편, 시술상의 불편 및 이에 수반되는 의료사고의 가능성 등을 최소화할 수 있음은 물론이고, 특히 마그네슘을 외과적 수술을 통해 생체 삽입시 마그네슘이 수소를 발생시키면서 분해되어 기계적 물성이 저하되므로 정형외과용 소재로 부적합했던 문제를 극복할 수 있다.

[0069] 기존의 생체분해성 Mg 소재는 골 이식(bone graft), 스텐트, 정형외과용 스크류 등과 같은 의료기기/기구로 제조된 후 외과적 시술에 의해 생체 내 삽입되며, 생체 삽입 후 수용액과 만나 화학반응에 의해 국부적으로 Mg 이

온 농도 및 pH 변화를 유도하게 된다. 이 때 필연적으로 수소가스가 발생하는데, 분해 속도가 빠를 경우에는 도 3과 같이 생체 조직이 부푸는 현상이 발생할 수 있다.

[0070] 본 발명의 수용성 입자 중 Mg 또는 Mg 합금을 제외한 대부분의 입자성 물질들은 화합물 형태를 띠고 있어 수용액에 용해될 때 수소 발생 문제가 없으나(화학식 2-5), Mg 또는 Mg 합금을 구성 물질로 사용할 경우 도 3과 같이 수소 발생에 의한 부풀 현상이 나타날 우려가 있다.

[0071] 그러나 이송용 생체적합성 유체와 혼합하는 과정에서 수소가 발생함으로써 생체 주입 전에 제거 가능하다. 또한 Mg 및 합금은 매우 산화성이 강하여 제조과정 중에 모두 또는 상당부분 MgO 형태로 변하게 되므로 상당량의 수소 발생 감소효과가 있다. 다만 Mg 또는 Mg 합금은 대기 중에서 급작스러운 산화에 의한 폭발의 위험이 있으므로 바람직하게는 상기 입자의 표면을 부분적으로 또는 완전히 산화시키거나 수산화화합물로 수산화 반응을 유도하여 반응성을 낮추거나, 또는 수용성 보호막으로 코팅하여 안정화시켜 사용할 수 있다.

[0072] 따라서 상기 가공은 이에 제한되지 않지만, 바람직하게는 상기 수용성 입자의 표면의 일부 또는 전부를 산화 또는 수산화시키거나, 수용성 보호막으로 코팅하는 것이 될 수 있으며, 상기 산화 또는 수산화 방법이나 보호막 코팅 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 기술을 적용할 수 있다.

[0073] 상기 수용성 보호막은 예컨대, PLLA(poly(lactic acid)), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PCD(Polycarbonatediol) 등과 같은 수용성 고분자를 사용하여 형성할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0074] 또한 바람직하게는 상기 가공은, 수용성 입자의 분해 속도를 제어하기 위하여, 예컨대, 상기 수용성 입자 표면에 1차로 금속 산화물이나 수화물 막을 형성하고 그 위에 2차로 수용성 고분자 코팅을 하는 등 원래의 소재와 확연히 구별되게 형성하거나 또는 점진적으로 물질의 종류를 다르게 하여 1차로 형성된 막에 더하여 제2의 막을 추가로 형성한 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0075] 본 발명에 따른 약학 조성물은 생체 내 주입되어 2가 양이온 농도 및/또는 pH를 제어하는 효과가 있다. 또한 외과적 수술 없이 생체내부에 최소침습에 의해 주입 가능하므로 환자의 고통 감소, 시술자의 편의성 증대 효과 및 의료사고 발생가능성 감소를 기대할 수 있다. 또한 종래기술의 큰 단점 중 하나인 수소발생 문제를 해결하는 부차적 효과를 기대할 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 약학 조성물은 또한 전술한 바와 같은 2가 양이온 농도 및/또는 pH 제어 효과를 가지기 때문에 일반적인 뼈의 손상을 비롯하여, 골다공증, 류마티스 관절염, 파제트병, 골형성 부전증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 등의 골질환을 비롯한 다양한 관련 질환의 경감, 개선, 완화, 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 구체적으로, 골다공증이 발현하였거나 또는 발병이 예상되는 부위에 주입하여 골형성을 유발하여 골밀도를 증가시키거나, 관절염 부위에 주입하여 국부적인 제어를 통한 효과적인 치료효과를 기대할 수 있으며, 치과용 임플란트 기술을 위한 골형성용 조성물 등으로 사용 가능하다. 이 외에도 생체 내부의 국부적 pH 조절 및/또는 2가 양이온 농도 조절을 목적으로 다양하게 활용될 수 있다. 또한 이와 같은 본 발명의 목적을 달성한 후에는 생체 내에서 분해되어 소멸될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 본 발명에 따른 약학 조성물의 구성과 이를 체내에 주입하는 과정, 및 주입된 약학 조성물의 생체 흡수 과정에서 주변의 pH 및 Mg 이온 농도가 변하는 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

도 2a 및 도 2b는 pH에 따른 파골세포 및 조골세포의 활동도 실험 결과이다.

도 3는 비교예 1에 따른 시술 동물의 부풀현상을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 1-1에 따라, Mg 원소를 포함하는 다양한 수용성 화합물이 수용액과 혼합되었을 때 pH 및/또는 이온 농도 상승 효과를 측정한 결과이다.

도 5은 본 발명의 실시예 1-2에 따라, 수용성 MgO의 첨가량에 따른 pH 및 Mg 이온 농도의 상관 관계를 측정한 결과이다.

도 6은 본 발명의 실시예 2-2에 따라, Mg 이온 농도 변화에 따른 골형성 전사인자인 Runx2의 발현 정도를 측정한 결과이다.

도 7는 본 발명의 실시예 2-2에 따라, Mg 이온 농도 변화에 따른 ALP 발현 정도를 측정한 결과이다.

도 8은 본 발명의 실시예 2-2에 따라, Mg 이온 농도 변화에 따른 OCN 발현 정도를 측정한 결과이다.

도 9은 본 발명의 실시예 2-2에 따라, Mg 이온 농도 변화에 따른 OPG 및 RANKL 발현 정도를 측정한 결과이다.

도 10a 내지 도 10d는 본 발명의 실시예 3에 따른 실험결과를 나타낸 것이다.

도 11a 및 도 11b는 본 발명의 실시예 4에 따라, F-127과 SH의 혼합비에 따른 생체적합성 유체의 점성 변화를 측정한 결과이다.

도 12은 본 발명의 실시예 4에 따라, Mg 원소를 포함하는 수용성 입자와 생체적합성 유체를 혼합한 약학 조성물을 주사기를 이용하여 생체 모사액에 주입하는 과정과 주입된 약학 조성물의 용해 과정을 보여주는 그림이다.

도 13는 본 발명의 실시예 4에 따라, MgO 입자를 포함 또는 포함하지 않고 제조된 약학 조성물을 HBSS 용액에 주입한 후 pH 변화를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 실시예 1 : pH 및/또는 이온농도 상승 효과 시험

[0080] 실시예 1-1: 수용성 Mg 화합물의 pH 및/또는 이온농도 상승 효과

[0081] 수용성 Mg 화합물의 pH 및/또는 이온농도 상승 효과 시험을 위하여, Mg 화합물 $MgCl_2$, MgO , $Mg(OH)_2$, $MgSO_4$ 분말을 각각 0.5g씩 덜어서 실온(25℃)의 생체모사액의 한 종류인 HBSS 용액(Hanks' balanced salt solution, 한크의 평형 염 용액) 50ml 에 섞은 후 pH 변화를 측정하고 그 결과를 도 4에 나타내었다. 사용한 HBSS용액의 조성은 아래 표 2에 나타낸 것과 같다.

표 2

[0082]

단위	g/L
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.06
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.06
NaCl	8
KCl	0.4
$NaHCO_3$	0.35
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
Glucose($C_6H_{12}O_6$)	1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.185

[0083] $MgCl_2$, $MgSO_4$ 분말은 수용액에 넣자마자 모두 녹았으며, MgO , $Mg(OH)_2$ 는 일부가 녹았으나 일부는 여전히 입자 상태로 수용액에 존재하였다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, pH를 측정한 결과 MgO , $Mg(OH)_2$ 를 넣은 수용액은 pH가 급속히 증가하여 10.5 내외에서 유지되었으며, $MgCl_2$, $MgSO_4$ 를 혼합한 수용액의 pH는 거의 변하지 않았다. 이로부터 Mg를 포함하는 물질의 종류를 적당히 선정함에 의해 pH와 Mg 이온 농도를 독립적으로 제어할 수 있음을 예측할 수 있었다. 이상의 실험 결과로부터 Mg 이온 농도만을 변화시키고자 할 경우 $MgCl_2$ 또는 $MgSO_4$ 분말을 사용하고, pH와 Mg이온 농도를 동시에 변화시키고자 할 경우에는 MgO 또는 $Mg(OH)_2$ 분말을 사용할 수 있음을 확인하였다. 필요할 경우 언급된 분말 중 두 가지 이상을 선택하여 동시에 사용할 수 있다. 물론 앞서 언급한 바와 같이 수용성 화합물은 위에서 언급된 종류에 한정되지 않는다.

[0084] **실시예 1-2: MgO의 첨가량에 따른 pH 및/또는 이온농도 상승 효과**

[0085] HBSS 용액 50ml 에 MgO의 양을 0.5g까지 증가시키면서 녹인 후 수용액의 pH와 Mg 이온 농도 변화를 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, MgO 첨가량이 증가하면 pH도 증가하며 Mg의 이온농도 또한 증가함을 알 수 있었다. 그러나 MgO의 용해도는 0.086g/L(=0.0043g/50ml)에 불과하므로 그 이상의 MgO 첨가에 의한 추가적인 pH상승 및 Mg이온 농도 상승을 기대하기는 어렵다. 다만, 용해도 이상으로 MgO를 첨가하게 되면, 생체 내에서의 혈액과 생체액의 순환에 의해 pH 및 Mg이온 농도가 정상 수치로 감소하게 되므로 과량 첨가된 MgO가 지속적으로 용해되면서 국부적으로 상당시간 동안 높은 pH 및 Mg 이온 농도가 유지될 수 있다. 이처럼 용해도 이상의 수용성 입자를 첨가함으로써 pH 및 Mg 이온 농도 상승 기간을 연장할 수 있음을 알 수 있다. 물론 앞서 언급한 바와 같이 이와 같은 효과를 나타내는 수용성 화합물은 MgO에 한정되지 않는다.

[0086] **실시예 2: 골형성 속도 향상 효과 시험**

[0087] Mg이온이 골형성 속도에 미치는 영향을 다음과 같이 골수기질세포를 이용하여 골형성에 관여하는 조골세포로의 분화에 미치는 영향을 고찰하는 실험을 통해 확인하였다.

[0088] **실시예 2-1 : 골수기질세포의 준비**

[0089] 본 연구에 사용한 골수기질세포는 인공관절 치환술 시 대퇴 삽입물을 넣기 위하여 대퇴골수강을 처리할 때 채취한 골수로부터 얻어진 초대배양세포를 이용하였다. 초대배양법은 인공고관절 치환술 시 대퇴삽입물을 넣기 위하여 대퇴골수강을 처리할 때 헤파린을 묻힌 50ml 주사기로 대퇴골수액을 10-20ml 채취하였다. 채취한 골수액을 50ml 코니칼 튜브(conical tube)에 담아 바로 세포배양실로 옮겨 무균 조작하에 MEM(최소필수영양배지) 배양액(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)으로 희석하고 피콜 하이페크(Ficoll Hypaque)용액(Fresenius Kabi Norge AS, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)위에 1:3으로 살며시 올려놓았다. 400g에서 30분간 2000rpm의 속도로 원심분리하여 중간층의 단핵세포들을 모아 HBSS 용액(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)으로 2회 세척한 후 10% FBS(fetal bovine serum, 우태아혈청)(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)가 포함된 MEM 배양액(Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 10ml로 잘 풀어 100mm 디쉬에 분주하고 37℃, 5% CO₂/air gas 배양기(NUAIR, MN, USA)에서 배양하였다. 세포들이 균일하게 단층으로 자라 배양용기를 채우면 계대배양을 2회 실시하여 실험에 이용하였다.

[0090] **실시예 2-2: Runx2, Alkaline phosphatase(ALP), osteocalcin(OCN), OPG(osteoprotegerin) 및 RANKL(Receptor Activator of NF-κB Ligand)의 mRNA의 발현 관찰**

[0091] 우선, 골형성 연관 유전자인 RUNX2, Alkaline phosphatase(ALP) 및 osteocalcin(OCN)의 mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 아래와 같이 관찰하였다.

[0092] 구체적으로 초대 배양한 골수기질세포를 60mm dish 배양용기에 5x10⁵의 농도로 분주하고 1일 후 Mg용액을 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM씩 처리하였다. 1, 4, 10, 24 시간 후 TRIzol용액 1ml을 넣고 세포를 용해시켰다. 여기에 0.2ml의 클로로포름을 첨가하고 상 분리후 0.5ml 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 넣고 혼합하여 이를 12,000g에서 10분간 원심 분리하여 RNA침전물을 얻었다.

[0093] RNA에 대한 상보적인 cDNA는 SuperScript II First Strand Synthesis Kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. 먼저, 멸균한 0.5ml 튜브에 3g의 total RNA와 300 ng의 랜덤 헥사머(random hexamer)를 넣은 후 70℃에서 10분간 가열하고 얼음에 1분간 꽂아두어 변성시켰다. 여기에 5 x first Strand Buffer, DTT, dNTP를 각각 4 μl, 2 μl, 1 μl씩 넣고 25℃에서 5분간 반응하여 하기 표 3의 프라이머를 어닐링(annealing)한 후 200units의 SuperScript II reverse transcriptase를 넣고 42℃에서 50분간 반응하여 상보적인 DNA의 합성을 유도하였다. 70℃에서 15분간 가열하여 반응을 멈춘 후 RNase inhibitor(Promega biotec)를 넣고 37℃에서 20분간 반응하여 RNA를 제거하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 주형으로 하여 Runx2, ALP, OCN에 대한 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하고 유전자 발현을 관찰하였다.

[0094] 또한 위와 같은 방법으로 OPG(osteoprotegerin)와 RANKL(Receptor Activator of NF-κB Ligand)의 mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 파골세포발생 관련 유전자 발현(Osteoclastogenesis related gene expression)을 관찰하였다. 실험의 대조군 유전자는 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, (주)바이오니아)를 사용하였

다. PCR에 사용된 각 유전자에 대한 프라이머의 염기서열은 하기 표 3에 나타난 바와 같으며 (주)바이오니아에 의뢰 제작하였다.

표 3

유전자	염기서열
GAPDH	CACCATCTTCCAGGAGCGAG (GAPDH-F : 서열번호 1) GGATTCTAATACGACTCACTATAGGCTCACGCCACAGTTTCCCGGA (GAPDH-R: 서열번호 2)
Runx2	CTCACTACCACCTACCTG (Runx2-F : 서열번호 3) TCAATATGGTCGCCAAACAGATTC (Runx2-R : 서열번호 4)
ALP	AAGAGCTTCAAACCGAGATACAAG (ALP-F: 서열번호 5) CCGAGGTTGGCCCCGAT (ALP-R: 서열번호 6)
OCN	CCCTCACACTCCTCGCCCTAT (OCN-F: 서열번호 7) TCAGCCAACCTCGTCACAGTCC (OCN-R: 서열번호 8)
OPG	GAACCCAGAGCGAAATACA (OPG-F: 서열번호 9) CGCTGTTTTACAGAGGTCA (OPG-R: 서열번호 10)
RANKL	AAGGAGCTGTGCAAAGGAA (RANKL-F: 서열번호 11) ACTTGGGATTTTGATGCTGG (RANKL-R: 서열번호 12)

골형성 정도는 골수기질세포에서 조골세포로 분화하는 동안 발현되는 특정 단백질인 골형성 지표의 발현 정도를 관찰함으로써 알 수 있다. 이 때 각 골형성 지표들은 조골세포의 분화 정도에 따라 발현되는 시기는 다르지만, 발현시기가 빠를수록, 발현되는 양이 많을수록 골형성 정도가 크다는 것을 나타낸다.

조골세포의 분화에 관련된 골형성 지표 중 알칼리 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP)는 비교적 초기 분화 시기에 증가하였다가 감소하는 경향을 보이며, 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)은 중기 분화시기에 발현이 증가하여 성숙한 조골세포에서 관찰된다.

Runx2발현은 마그네슘 처리군에서 1시간, 4시간, 10시간 처리하였을 때 도 6에 나타난 바와 같이, 증가하는 경향을 보였다.

또한, 위와 동일하게 골수기질세포를 사용하여 마그네슘을 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM의 농도로 1시간, 4시간, 10시간, 24시간, 3일, 7일 처리하였을 때 골형성 지표인 알칼리 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP)의 발현 정도는 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 마그네슘을 1시간, 24시간, 3일, 7일 처리하였을 때 ALP 발현에 영향을 보이지 않았으나, 마그네슘을 4시간, 10시간 처리하였을 때 ALP발현을 증가시키는 경향을 보였다.

반면 또다른 골형성 지표인 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)의 발현 양상은 도 8에 나타난 바와 같이, 24시간, 3일 처리했을 때 각각 증가하는 경향을 나타내었다.

한편, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG) 및 랭클(Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL)도 조골세포의 분화가 진행되면서 역시 증가하는 단백질로서 골형성 지표로 사용되고 있다. 그러나, 파골세포의 분화나 활성을 조절하는 기능을 갖고 있다는 점에서 다른 골형성 지표와 차이를 보인다. 조골세포가 분화하면서 랭클(Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL)의 발현이 증가하게 되어 파골세포의 활성을 증가시키는 반면, 완전히 성숙한 조골세포에서는 오히려 감소하면서 대신 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG)을 발현시켜 파골세포의 활성을 억제하는 작용을 담당하기 때문에, 두 가지 단백질의 발현 비율이 정상적인 골재형성 과정의 균형을 유지하는 데 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서, 랭클(Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL)의 발현이 증가하였다가 감소하고, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG)의 발현을 증가시키는 경향을 보이면 골형성이 촉진된 것으로 판단할 수 있다.

파골세포의 분화 및 활성화를 증가시키는 랭클(Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL)과 파골세포의 분화를 방해하는 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG)의 발현 분석을 위하여, 골수기질세포를 사용하여 마그네슘을 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM의 농도로 1시간, 4시간 처리하였을 때 RANKL 및 OPG의 발현 정도를 측정하여 도 9에 나타내었다(RANKL:우측, 자주색 막대; OPG: 좌측, 보라색 막대). 도 9에 나타난 바와 같이, RANKL의 경우 1시간에서는 발현을 증가시키는 경향이 있었으나, 4시간 처리군에서는 발현이 감소하는 경향을 보였으며, OPG의 경우 마그네슘 1시간, 4시간 처리군에서 모두 발현을 증가시키는 경향을 보였다. 이는 마그네슘이 성숙한 조골세포로의 분화를 촉진시키고 있음을 의미한다.

[0103] 이상의 실험 결과를 통해 Mg이온이 조골세포의 활성화 및 파골세포의 비활성화에 기여하여 결론적으로 골형성 속도를 증가시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0104] **실시예 3: 자가골의 골형성 속도와 비교**

[0105] 본 발명의 생체분해성 Mg 소재가 골형성에 미치는 효과를 자가골(도 10a)과 비교하여 도 10b 내지 도 10d에 나타냈다. Mg(도 10b), 10.5%의 Mg(도 10c), Mg 합금인 AZ91(도 10d)을 각각 지름 2mm, 길이 6mm로 가공한 후 귀의 정강이 뼈에 이식한 후 2, 4, 8, 12주 후에 희생하여, 이식 부위의 조직을 채취하고 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase chain reaction) 분석을 하였다.

[0106]

[0107] 구체적으로 상기 채취한 이식 부위의 조직에 TRIzol용액 1ml을 넣고 세포를 용해시켰다. 여기에 0.2ml의 클로로포름을 첨가하고 상 분리후 0.5ml 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 넣고 혼합하여 이를 12,000g에서 10분간 원심 분리하여 RNA침전물을 얻었다. RNA에 대한 상보적인cDNA는 SuperScript II First Strand Synthesis Kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. 먼저, 멸균한 0.5ml 튜브에 3g의 total RNA와 300 ng의 랜덤 헥사머(random hexamer)를 넣은 후 70℃에서 10분간 가열하고 얼음에 1분간 꽂아두어 변성시켰다. 여기에 5 x first Strand Buffer, DTT, dNTP를 각각 4 μ l, 2 μ l, 1 μ l씩 넣고 25℃에서 5분간 반응하여 프라이머를 어닐링(annealing)한 후 200units의 SuperScript II reverse transcriptase를 넣고 42℃에서 50분간 반응하여 상보적인 DNA의 합성을 유도하였다. 70℃에서 15분간 가열하여 반응을 멈춘 후 RNase inhibitor(Promega biotec)를 넣고 37℃에서 20분간 반응하여 RNA를 제거하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 주형으로 하여 ALP 및 오스테오칼신에 대한 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하고 유전자 발현을 관찰하였다.

[0108] ALP 유전자에 대한 프라이머로는 서열번호 13(ALP-F2: 5' -GAGCAGGAACAGAAGTTTGC -3') 및 서열번호 14(ALP-R2: 5' -GTTGCAGGGTCTGGAGAGTA -3')의 프라이머, 오스테오칼신에 대한 프라이머로는 서열번호 15(Osteocalcin-F: 5' - AGCTCAACCCCAATTGTGAC-3') 및 서열번호 16(Osteocalcin-R: 5' - AGCTGTGCCGTCCATACTTT-3')의 프라이머를 (주)바이오니아에 의뢰 제작하여 사용하였다.

[0109] 실험 결과에서 알 수 있듯이, 골형성과 관련된 초기 분화 마커인 ALP(좌측, 보라색 막대)는 보다 증가하였다가 감소하면서 중기 분화 마커인 오스테오칼신(우측, 자주색 막대)이 자가골 이식 조직보다 전반적으로 높게 발현되는 것으로 보아 본 발명의 약학 조성물을 사용할 때 골형성 속도가 증가할 것임을 유추할 수 있다.

[0110] **실시예 4: Mg 화합물이 포함된 주입용 약학 조성물의 제조에**

[0111] 생체적합성 유체의 한 예로서, 분자량이 1.63 $\times 10^6$ Da인 온도 감응성 고분자인 플루로닉 F-127(씨그마알드리치(Sigma-aldrich))과, 분자량이 1.26 $\times 10^3$ Da 이고 생체적합성이 매우 우수한 하이드로젤인 소듐 히아루로네이트(Sodium Hyaluronate, SH)(씨그마알드리치(Sigma-aldrich))를 혼합비를 달리하여 각각 제조한 후 점성도를 측정하여 그 결과를 도 11a 및 11b에 나타내었다. F-127의 경우 온도가 높아지면 급격히 점성도가 증가하므로 4℃의 낮은 온도에서 증류수에 녹인 후 SH를 혼합하였다.

[0112] 도 11a 및 11b에 나타난 바와 같이, F-127 양이 20%w/v 이상일 때 25℃이상에서 점도가 급격히 증가하여 젤화 현상이 나타났다. 반면 F-127이 15%w/v 일 경우 특정온도에서의 젤화 현상이 재현성 있게 나타났다. 한편, F-127양이 20%w/v 이상일 경우 SH 양을 증가시키기에 의해 점성이 전체적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

[0113] F-127를 20%w/v, SH를 1%w/v 섞어서 2ml의 유체 물질을 만들고, 여기에 MgO분말을 각각 0.05g, 0.1g씩 섞어서 Mg 화합물이 혼합된 하이브리드 물질을 제조한 후 37℃의 HBSS 용액에 담긴 유리병에 주입하는 실험 과정을 도 12에 나타내었다. 이 때 모든 혼합과정은 10℃이하의 저온에서 실시하였다. 실험결과에서 보는 바와 같이 Mg 화합물이 혼합된 약학 조성물은 주사기를 이용하여 원하는 위치로 주입할 수 있었으며, 수용액에서 일정시간 동안 형상을 유지하고 있었으며, 시간이 경과함에 따라 녹아 없어지는 것을 확인할 수 있다.

[0114] MgO를 혼합하지 않고, F-127 20%w/v과 SH 1%w/v를 혼합하여 제조된 생체적합성 유체만으로 이루어진 물질과, 상기 생체적합성 유체에 MgO를 각각 1%, 5%씩 혼합하여 제조한 약학 조성물을 HBSS 용액에 주입한 후 수용액의 pH 변

화를 측정하여, 그 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, MgO를 혼합하여 제조한 약학 조성물이 생체적합성 유체만으로 이루어진 물질에 비해 pH가 높게 유지됨을 확인할 수 있다.

[0115] **비교예 1: 외과 수술시 수소 발생 관측**

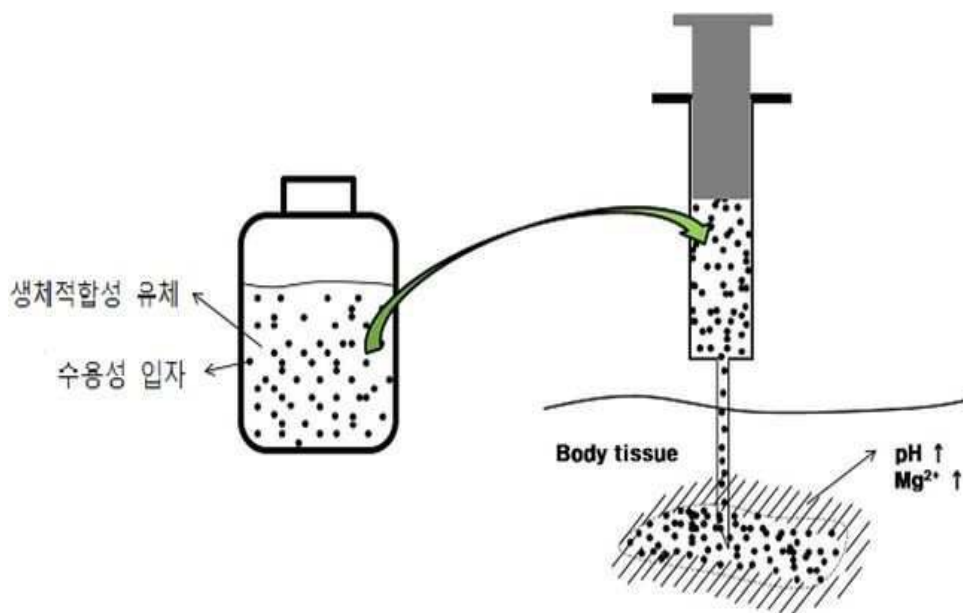
[0116] Mg-5%Ca합금을 직경 2mm, 길이 5mm로 가공한 후 토끼의 등쪽을 절개하여 척추 추간체 사이에 이식한 후 2주 후에 관찰하여 그 결과를 도 3에 나타냈다. 도 3에 나타난 바와 같이 Mg-5%Ca합금이 외과 수술을 통해 이식된 토끼의 생체 조직이 부푸는 현상이 나타나 외과 수술을 통한 생체 이식 시에 수소가 발생하였음을 알 수 있었다.

[0117] 이상의 실시예 및 비교예에 나타난 바와 같이, 수용성 입자를 생체적합성 유체와 혼합한 본 발명의 약학 조성물을 주사기를 통해 생체 내로 이송이 가능하고, 생체 내로 이식된 약학 조성물은 생체 내에서 국부적으로 pH 및/또는 2가 양이온 농도를 상승시키는 기능을 수행하며, 이러한 pH 및/또는 Mg 이온 농도의 상승은 골다공증, 관절염 등의 골질환을 비롯한 각종 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있음을 확인하였다.

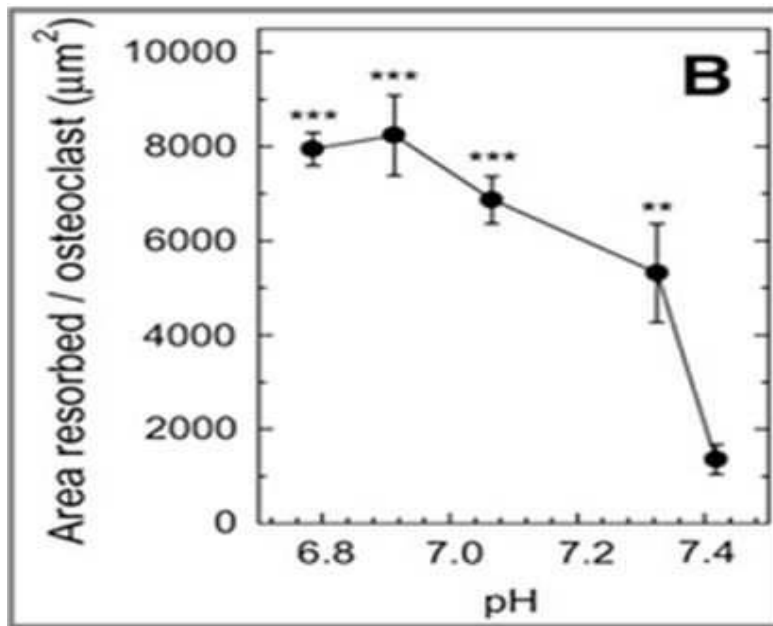
[0118] 상술한 실시예에서는 알칼리 토금속 중 Mg만을 사용하였으나, 이외에도 이온화되었을 때 2가 양이온을 형성하는 다양한 알칼리 토금속을 사용할 수 있음은 물론이다. 예컨대, Ca 또는 Sr 원소를 포함하는 수용성 입자와 생체적합성 유체를 혼합한 약학 조성물을 사용하여도 위에서 언급된 골형성 촉진 등의 효과를 얻을 수 있다. 아울러, 생체 주입된 후 Mg, Ca, Sr 중 1종 이상의 양이온 농도가 동시에 높아지도록 약학 조성물을 구성함으로써 상기 언급한 것과 동일한 효과인 생체 내에서의 국부적 pH 및/또는 2가 양이온 농도 제어효과를 기대할 수 있음은 자명하다.

도면

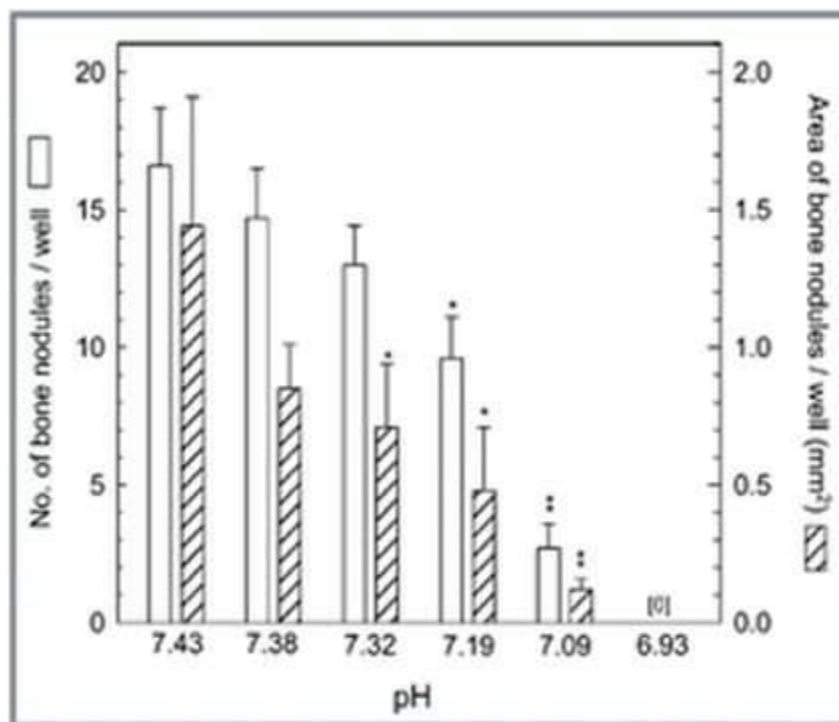
도면1



도면2a



도면2b

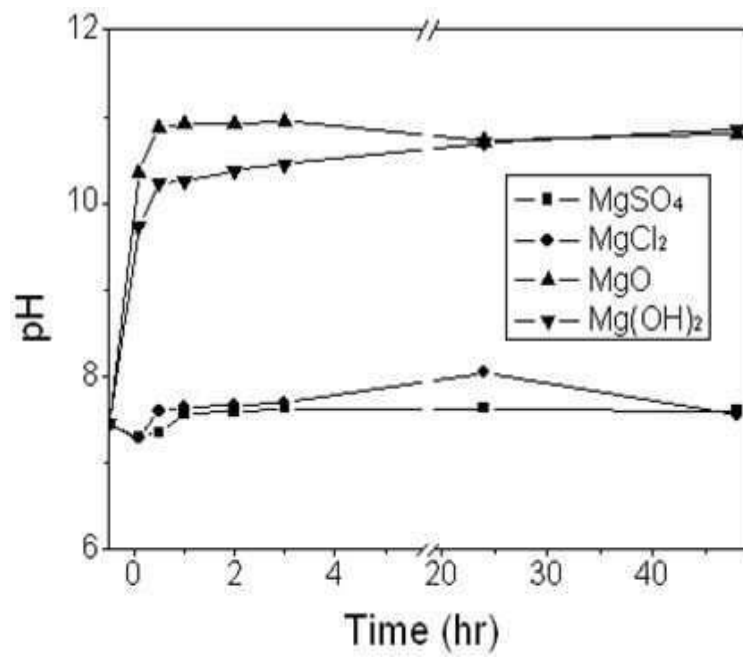


도면3

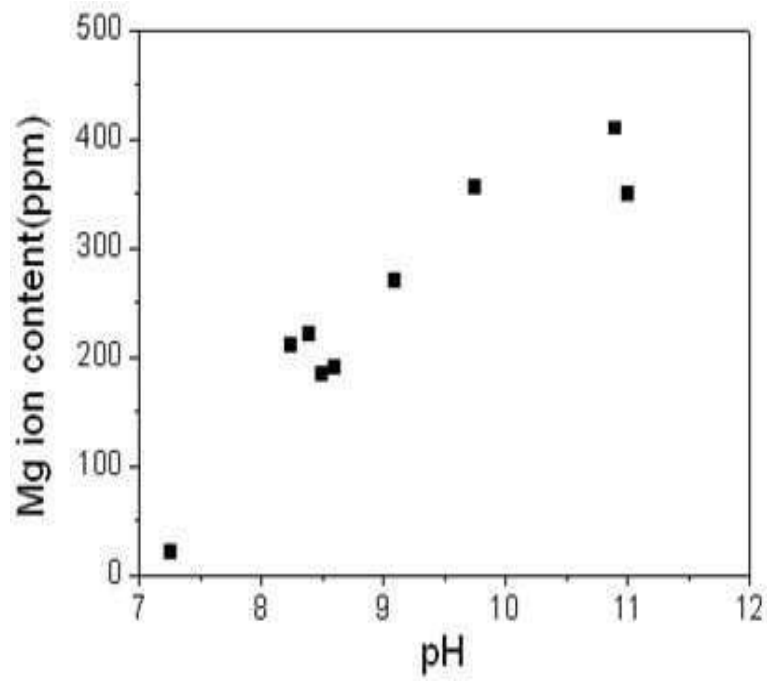
Swelling of skin after implantation into rabbit



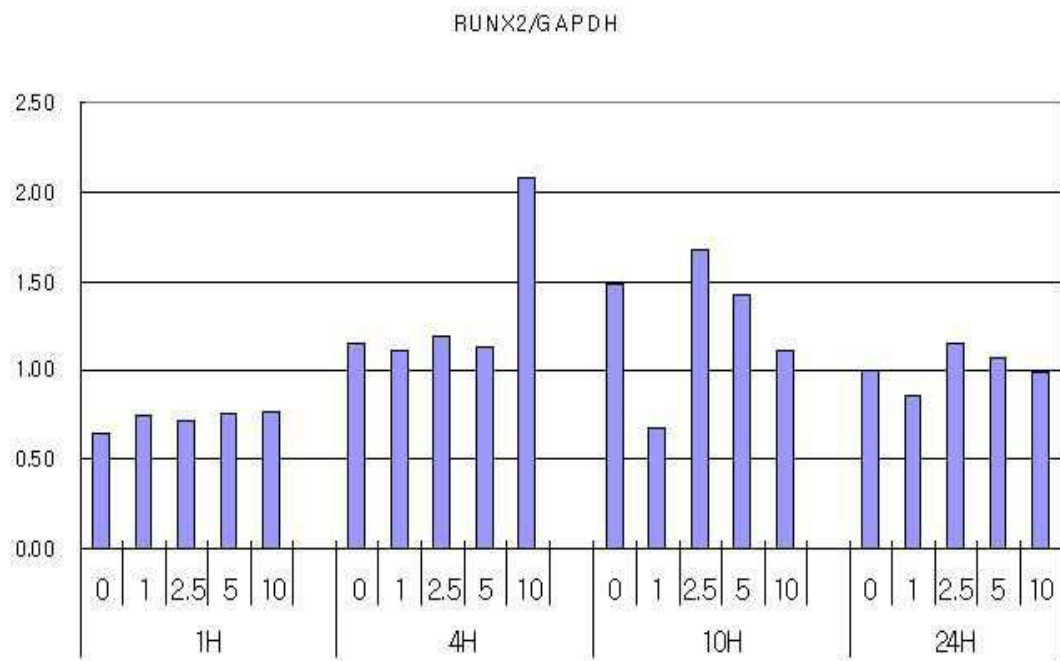
도면4



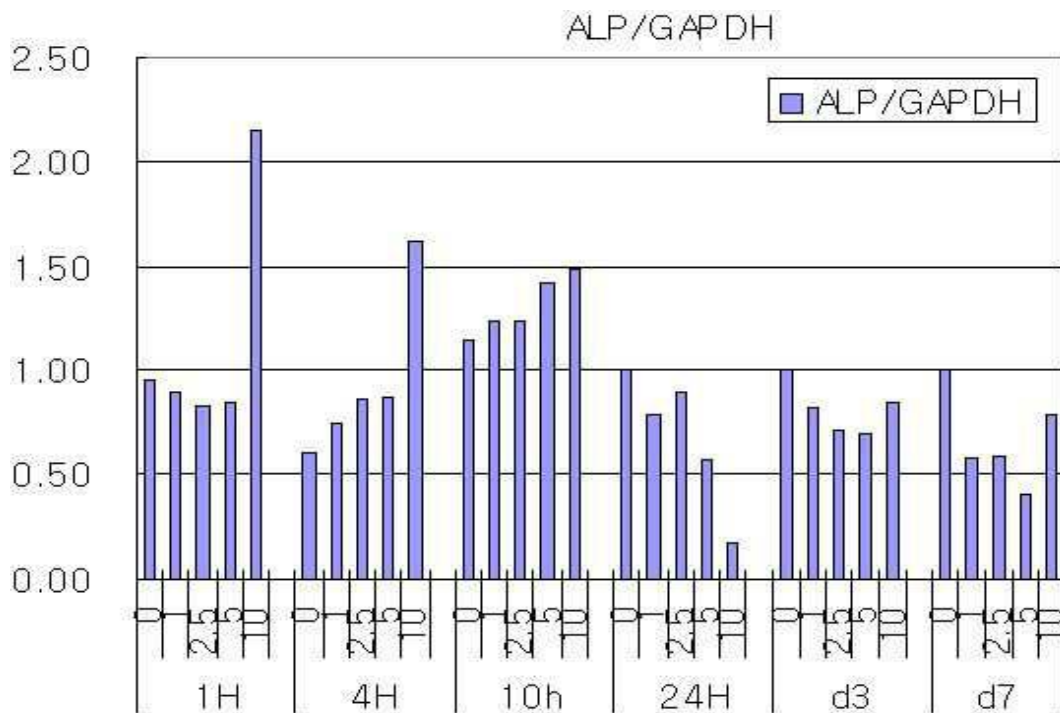
도면5



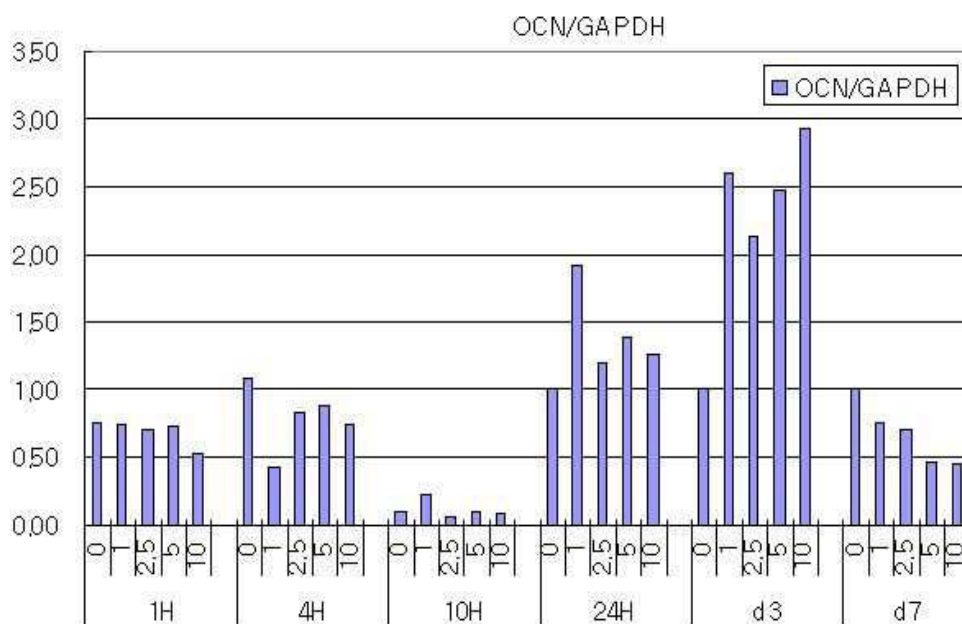
도면6



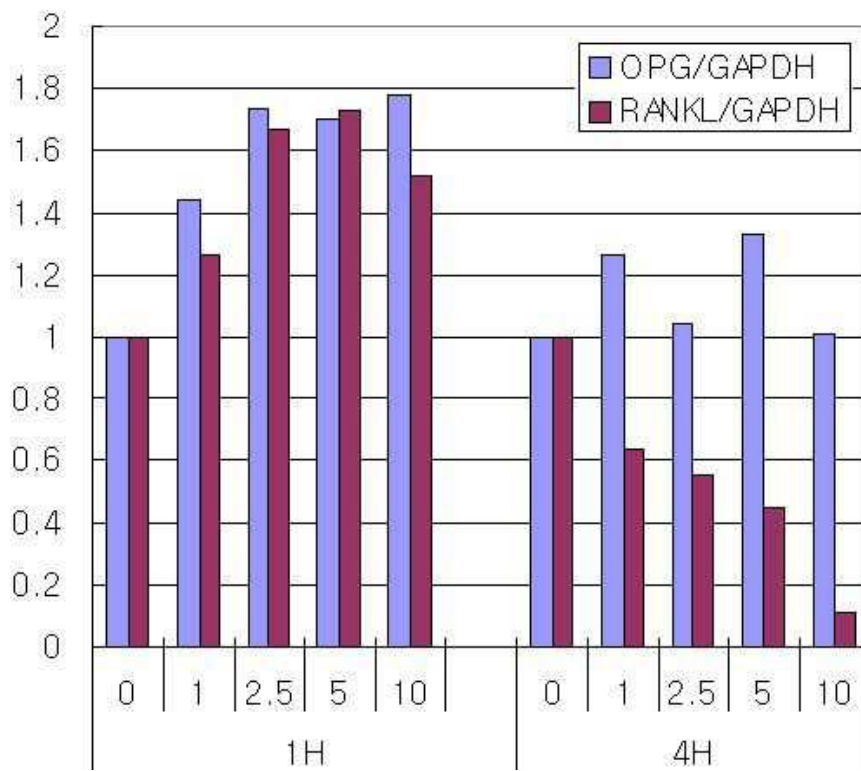
도면7



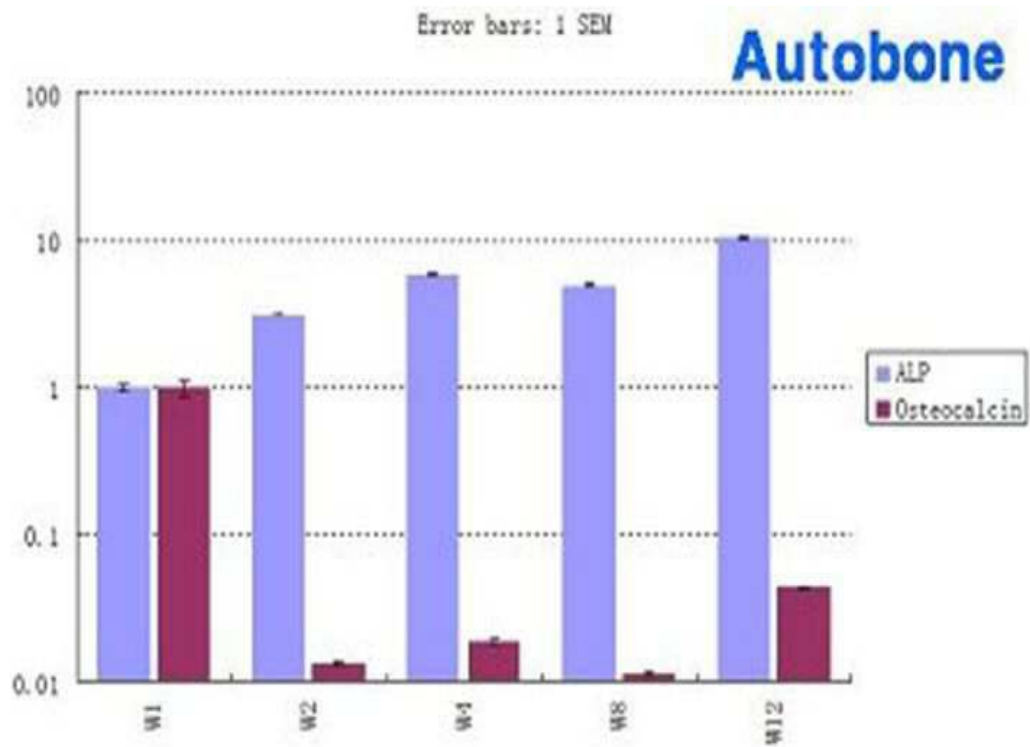
도면8



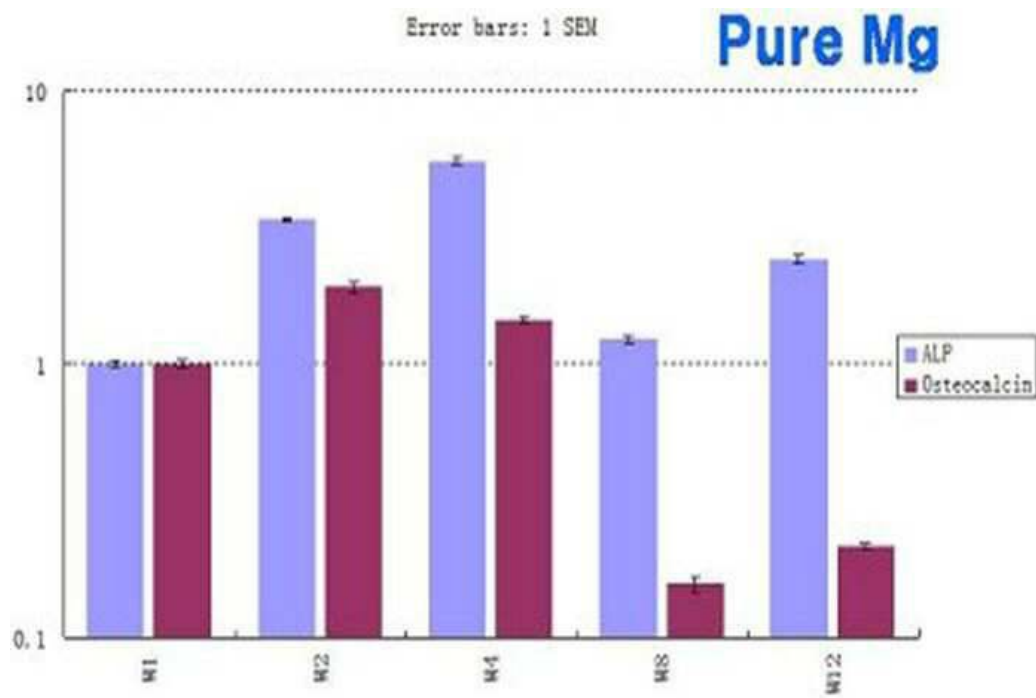
도면9



도면10a



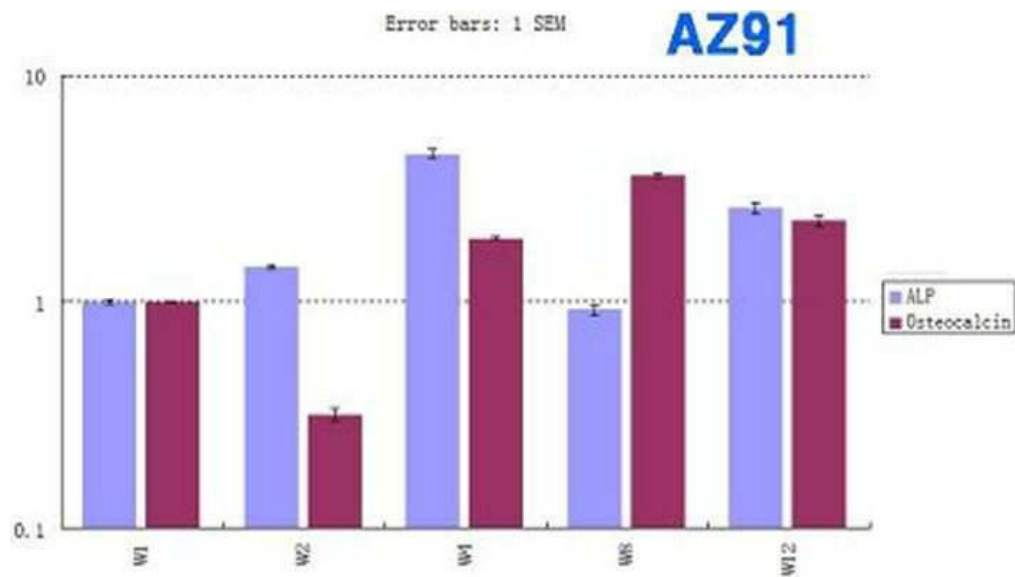
도면10b



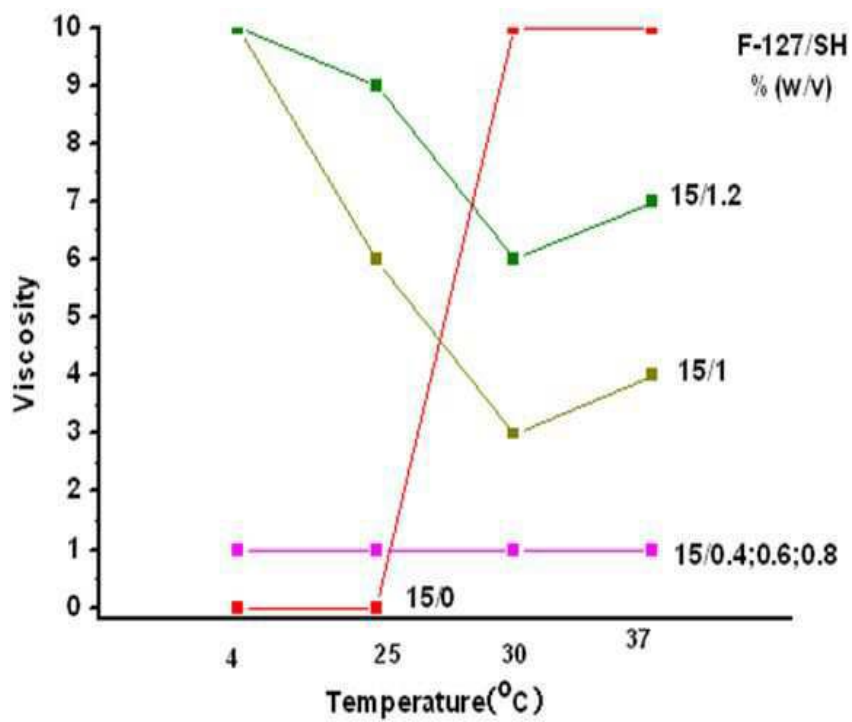
도면10c



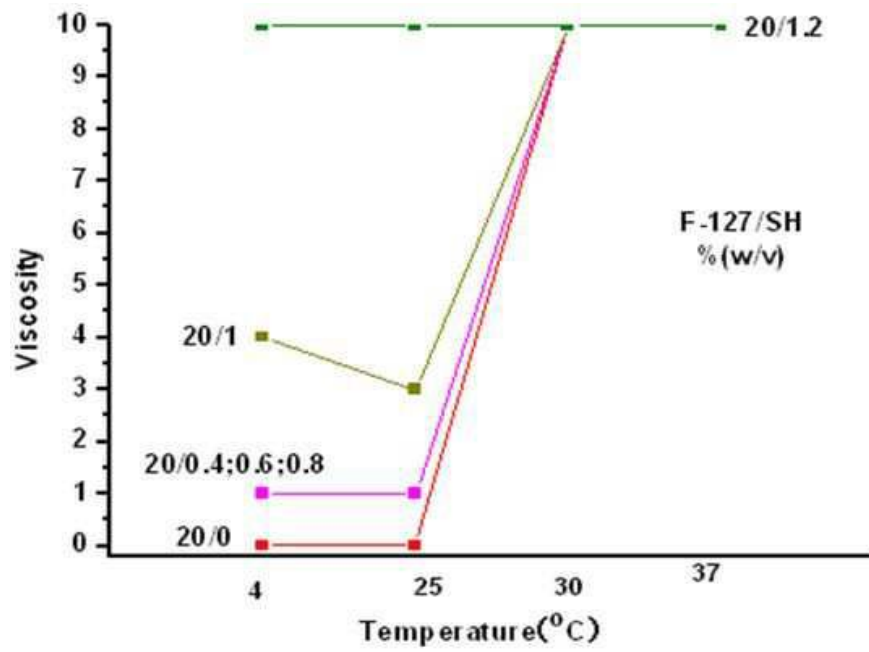
도면10d



도면11a



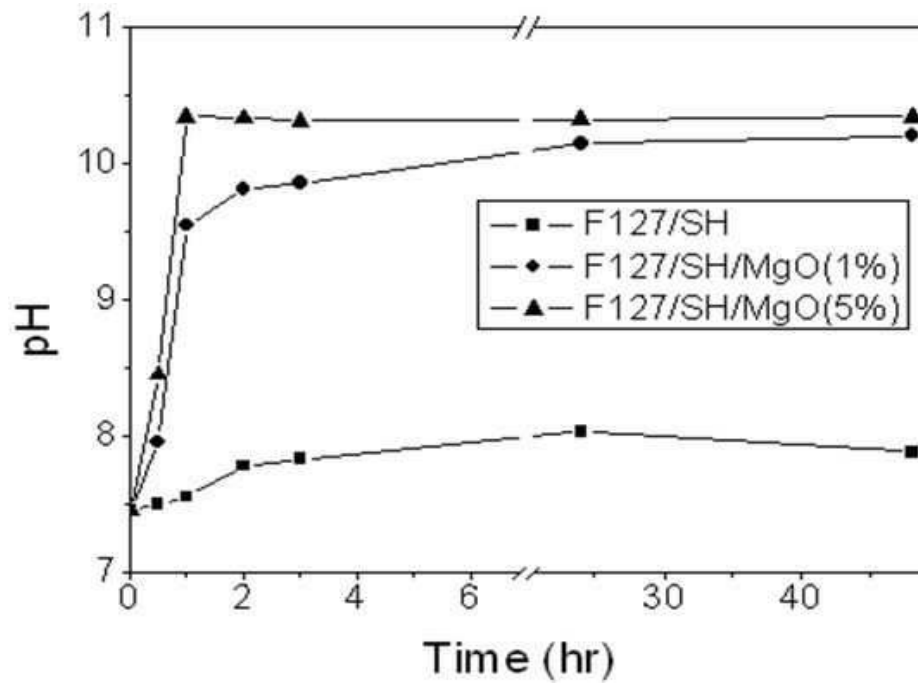
도면11b



도면12



도면13



서열목록

- <110> Korea Institute of Science and Technology
- The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> INJECTABLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION HAVING CONTROLLING ACTIVITY
- OF pH AND DIVALENT CATION, AND METHOD OF MANUFACTURING THE SAME
- <130> dpp20102635kr
- <150> KR10-2010-0043667
- <151> 2010-05-10
- <160> 16
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH-F
- <400> 1

caccatcttc caggagcgag

20

<210> 2

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH-R

<400> 2

ggattctaatac gactcact ataggctcac gccacagttt cccgga 46

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Runx2-F

<400> 3

ctcactacca cacctacctg 20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Runx2-R

<400> 4

tcaatatggc cgccaacag attc 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALP-F

<400> 5

aagagcttca aaccgagata caag 24

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALP-R

<400> 6

ccgaggttgg ccccgat 17

<210> 7

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCN-F	
<400>	7	
ccctcacact cctcgcccta t		21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCN-R	
<400>	8	
tcagccaact cgtcacagtc c		21
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OPG-F	
<400>	9	
gaaccccaga gcgaaataca		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OPG-R	
<400>	10	
cgctgttttc acagaggtca		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RANKL-F	
<400>	11	

aaggagctgt gcaaaaggaa	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RANKL-R	
<400> 12	
acttgggatt ttgatgctgg	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ALP-F2	
<400> 13	
gagcaggaac agaagtttgc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ALP-R2	
<400> 14	
gttgcagggt ctggagagta	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Osteocalcin-F	
<400> 15	
agctcaaccc caattgtgac	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Osteocalcin-R

<400> 16

agctgtgccg tccatacttt

20