

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0140190
(43) 공개일자 2019년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5153 (2013.01)
A61K 31/192 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0066672
(22) 출원일자 2018년06월11일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정재현
서울특별시 영등포구 도림로 462, 1동 1105호 (문래동3가, 국화아파트)
최성재
서울특별시 서초구 신반포로 9, 79동 403호 (반포동, 반포아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

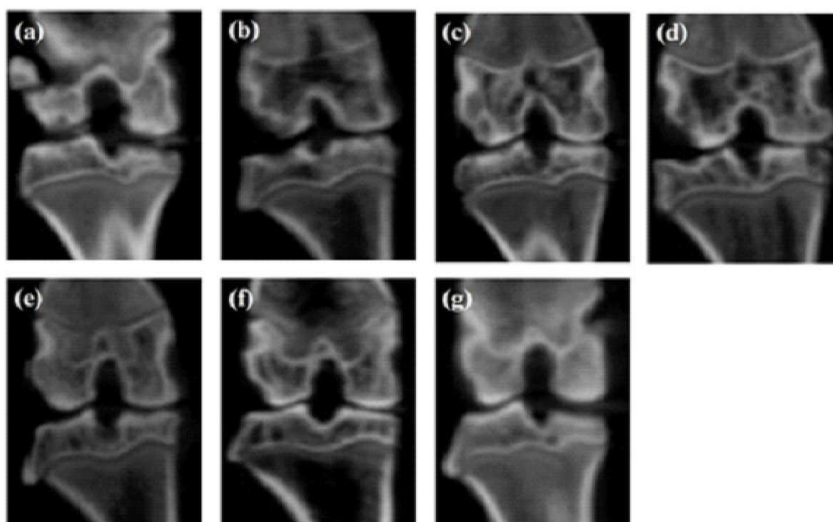
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 디아세린 나노입자를 포함하는 관절강 주사용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 디아세린(diacerein) 나노입자를 포함하는 관절강 주사용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 생체적합성 고분자 나노입자에 로딩한 디아세린의 관절강 내 직접 주사용 조성물 및 이의 관절질환 치료 또는 예방 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 디아세린 함유 나노입자는 관절강에 직접 주입되어 부작용 없이 증상을 치료할 뿐만 아니라, 나노입자에서 서방형으로 디아세린이 방출되어 약물 방출 지속시간이 향상되어 골관절 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 19/02 (2018.01)

(72) 발명자

송관규

서울특별시 강남구 남부순환로 2740, 2동 206호 (도곡동, 개포럭키아파트)

김정은

서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동, 대림아크로빌)

김학준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 305동 604호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

디아세린(diacerein) 함유 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 관절강 주사용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노입자의 크기는 250 내지 350nm인 것을 특징으로 하는 관절강 주사용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 디아세린은 함량이 조성물 총 중량을 기준으로 0.1 중량% 내지 10 중량%인 것을 특징으로 하는 관절강 주사용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 관절강 주사용 조성물은 척추 간판 탈출증, 오십견, 어깨관절 충돌 증후군, 손목터널 증후군, 변형성 관절증, 테니스/골프 엘보, 복합적인 부위별 동통 증후군, 기타 건염, 만성 관절류머티즘 및 골관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 증상에 투여되는 것을 특징으로 하는 관절강 주사용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 관절강 주사용 조성물은 환자 체중 kg 당 0.01 내지 0.1mg의 투여량으로 8주 1회 투여되는 것을 특징으로 하는 관절강 주사용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디아세린(diacerein) 나노입자를 포함하는 관절강 주사용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 생체적합성 고분자 나노입자에 로딩한 디아세린의 관절강 내 직접 주사용 조성물 및 이의 관절질환 치료 또는 예방 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 관절(articulation)은 뼈와 뼈가 연결되는 부위로, 관절을 구성하는 두 뼈가 마주하는 면에는 관절 연골이라고 불리는 유리 연골의 얇은 층이 있다. 관절 주위는 골막의 연속인 결합조직성 막으로 둘러싸여 있고 이것을 관절낭이라고 하며, 그 내강을 관절강(joint cavity)이라고 한다. 관절낭의 내면에는 활막이라는 얇은 막이 있으며 끊임없이 소량의 활액을 관절강 내에 분비하여 관절 운동을 부드럽게 한다.

[0004] 이러한 관절에 문제가 생기면 관절 질환이 나타나는데, 이 중 가장 유병률이 높은 질환이 골관절염이다. 골관절염이 주로 침범되는 부위는 손가락, 무릎, 고관절 및 요추이며 침범 관절에 따라 조금씩 다르지만 통증과 운동 제한이 공통적인 증상이다. 골관절염의 치료 목표는 통증을 완화시키며, 관절의 운동성을 유지하고 개선함으로

써 장애를 최소화하는 것이다(이충기, 대한류머티스학회, 2000, Vol. 7;4, pp.333-341.).

- [0005] 골관절염은 만성질환으로, 기대수명의 증가와 함께 장기간의 치료를 필요로 한다. 치료의 선택은 크게 비약물적 보존적 치료, 약물요법 및 수술적 치료로 크게 나눌 수 있고, 치료 계획은 증상의 정도 및 기간, 방사선학적 소견, 환자의 나이 및 동반질환, 생활양식 및 사회경제적 수준, 발병 전 활동도 등에 따라 개별적으로 수립되어야 한다(Yoon JP, et al., Clin Orthop Surg. 2012 Vol. 4(4), pp. 278-83).
- [0006] 골관절염은 다른 관절 질환들과는 다르게 관절강 내 약물 투여가 가능한 질환이다. 히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 다당류로서 관절 활액의 중요한 구성성분 중 하나로 히알루론산의 존재는 활액의 점탄성에 기여하여 활액이 윤활제와 충격흡수제의 역할을 할 수 있도록 해준다. 이뿐만 아니라 고분자량의 히알루론산은 염증성 관절에 소염작용과 진통작용을 가지고 있다(Litwiniuk M et al., Wounds. 2016 Vol. 28(3) pp.78-88). 따라서 현재 골관절염 치료를 위해 히알루론산의 관절강 내 투여가 여러 나라에서 승인되어 사용되고 있다.
- [0007] 관절강 내 약물 투여는 적은 양으로도 적절한 약물 농도에 도달시킬 수 있고 전신적 부작용을 최소화 할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 활액에서 투여된 약물이 머무르는 시간이 매우 짧기 때문에 관절 내에서 지속적으로 약물을 방출할 수 있는 지속 방출 제형의 개발이 요구되고 있는 실정이다.
- [0008] 디아세린(diacerein)은 골관절염 치료를 위한 연골 보호제이다. 디아세린은 라인(rhein)의 프로드러그이다. 디아세린은 인터류킨-1(IL-1)의 합성을 선택적으로 저해하여 일산화질소(NO)의 생성을 방지함으로써 연골의 손상을 막는다(Jain A et al., Nanomedicine. 2014 Vol. 10(5) pp. 1031-40).
- [0009] 현재 FDA에서 허가 한 디아세린의 제형은 경구용밖에 없으나, 경구용의 경우, 소화관 내 흡수효율이 낮은 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 설사 및 소변색의 변화 등의 부작용을 일으키기 때문에, 새로운 제형의 개발이 필요한 실정이다.
- [0011] 이에 본 발명자들은 부작용을 없애고, 체내 약물 지속시간을 향상시키는 제형을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 생분해성 나노입자에 디아세린을 로딩한 후, 관절강에 직접 주사할 경우, 부작용 없이 약물치료 효과가 나타날 뿐만 아니라, 서방형으로 약물을 방출하여 약물치료 효과가 장기간 지속되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 디아세린 함유 나노입자를 유효성분으로 포함하는 관절강 주사용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 디아세린(diacerein) 함유 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 관절강 주사용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 디아세린 함유 나노입자는 관절강에 직접 주입되어 부작용 없이 증상을 치료할 뿐만 아니라, 나노입자에서 서방형으로 디아세린이 방출되어 약물 방출 지속시간이 향상되어 골 관절 질환의 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 관찰 사진으로, 나노입자(a, d), 1% 디아세린 함유 나노입자(b, e) 및 5% 디아세린 함유 나노입자(c, f)를 각각 관찰한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 크기와 분포를 동적 광산란으로 확인한 것으로, 나노입자(a), 1% 디아세린 함유 나노입자(b) 및 5% 디아세린 함유 나노입자(c)를 각각 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 방출거동을 63일동안 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 활막세포에서의 염증 사이토카인 및 유래 효소의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과로서, (a)는 IL-1, (b)는 IL-6, (c)는 TNF- α (d)는 MMP-3, (e)는 MMP-13, (f)는 COX-2 및 (g)는 ADAMTS-5의 발현수준을 측정한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 골관절염 유도 마우스에서의 염증 사이토카인 및 유래 효소의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과로서, (a)는 IL-1, (b)는 IL-6, (c)는 TNF- α (d)는 MMP-3, (e)는 MMP-13, (f)는 COX-2 및 (g)는 ADAMTS-5의 발현수준을 측정한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 디아세린 함유 나노입자의 골관절염 유도 마우스에서의 항염증 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과로서, (a)는 IL-4 및 (b)는 IL-10의 발현수준을 측정한 결과이다.

도 7은 modosodium iodoacetate(MIA)와 디아세린 함유 나노입자를 9주간 각각의 조건을 나누어 투여한 쥐의 골관절 육안적 형태를 측정한 것으로 (a)는 MIA만 투여하여 골관절염을 유도한 마우스, (b)는 MIA와 나노입자만 투여한 마우스, (c)는 MIA 와 디아세린 용액을 투여한 마우스, (d)는 MIA 와 1% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (e)는 MIA와 5% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (f) MIA와 경구용 디아세린을 투여한 마우스 및 (g)는 정상 마우스이다.

도 8은 modosodium iodoacetate(MIA)와 디아세린 함유 나노입자를 9주간 각각의 조건을 나누어 투여한 쥐의 골관절을 마이크로 CT로 촬영한 것으로 (a)는 MIA만 투여하여 골관절염을 유도한 마우스, (b)는 MIA와 나노입자만 투여한 마우스, (c)는 MIA 와 디아세린 용액을 투여한 마우스, (d)는 MIA 와 1% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (e)는 MIA와 5% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (f) MIA와 경구용 디아세린을 투여한 마우스 및 (g)는 정상 마우스이다.

도 9는 modosodium iodoacetate(MIA)와 디아세린 함유 나노입자를 9주간 각각의 조건을 나누어 투여한 쥐의 골관절의 조직학적 형태를 H&E 염색으로 확인한 것으로 (a)는 MIA만 투여하여 골관절염을 유도한 마우스, (b)는 MIA와 나노입자만 투여한 마우스, (c)는 MIA 와 디아세린 용액을 투여한 마우스, (d)는 MIA 와 1% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (e)는 MIA와 5% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (f) MIA와 경구용 디아세린을 투여한 마우스 및 (g)는 정상 마우스이다.

도 10은 modosodium iodoacetate(MIA)와 디아세린 함유 나노입자를 9주간 각각의 조건을 나누어 투여한 쥐의 골관절의 조직학적 형태를 Safranin-O-Fast-Green 염색으로 확인한 것으로 (a)는 MIA만 투여하여 골관절염을 유도한 마우스, (b)는 MIA와 나노입자만 투여한 마우스, (c)는 MIA 와 디아세린 용액을 투여한 마우스, (d)는 MIA 와 1% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (e)는 MIA와 5% 디아세린 함유 나노입자를 투여한 마우스, (f) MIA와 경구용 디아세린을 투여한 마우스 및 (g)는 정상 마우스이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 발명에서는 부작용 없이 오랜 시간 동안 체내에서 약효를 발효할 수 있는 디아세린의 제형을 개발하고자 하였다.

[0022] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 1% 디아세린 또는 5% 디아세린을 포함하는 PLGA 나노입자를 제작한 다음, 상기 나노입자 함유 용액을 골관절염 유도 마우스의 관절에 직접 주사할 경우, 부작용 없이 약 9주간에 걸쳐 골관절염을 치료할 수 있다는 것을 확인하였다(도 7 내지 10).

[0023] 본 발명자들은 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이트, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 나노입자에 디아세린을 로딩하여 성능을 시험한 결과, PLGA 나노입자에

서의 약물 방출 성능 및 그 효과가 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

- [0025] 따라서, 본 발명은 일관점에서, 디아세린(diacerein) 함유 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 관절강 주사용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자의 크기는 250 내지 350nm인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 디아세린은 함량이 조성물 총 중량을 기준으로 0.1 중량% 내지 10 중량%인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 관절강 주사용 조성물은 척추 간판 탈출증, 오십견, 어깨관절 충돌 증후군, 손목터널 증후군, 변형성 관절증, 테니스/골프 엘보, 복합적인 부위별 동통 증후군, 기타 건염, 만성 관절류머티즘 및 골관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 증상에 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 조성물은 치료 유효량의 디아세린 함유 나노입자 및 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. "제약상 (약학적으로) 허용되는 담체"는 제제를 제제화하거나 또는 안정화시키는 것을 돕기 위해서 활성 성분에 추가될 수 있는 물질이고, 환자에게 유의한 해로운 독성 효과를 야기하지 않는다.
- [0031] 상기 담체는 환자를 자극하지 않고 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0032] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사 가능한 용액제 또는 분산액제를 즉각 투여용 (extemporaneous)으로 제조하기 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 조성물은 바람직하게는 주사용으로 제제화된다. 조성물은 용액제, 마이크로에멀전제, 리포솜제, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 주문된 구조물로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이것들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 에컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함시킬 수 있다. 멸균 주사 가능한 용액제는 필요한 양의 활성 화합물을 필요에 따라 상기 기재된 성분들 중 1종 또는 이것들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼합시킨 후에 멸균 마이크로 여과를 수행하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액제는 활성 화합물을 기본적인 분산 매질 및 상기 기재된 것들로부터의 기타 필요한 성분을 함유하는 멸균비히클로 혼합시켜 제조된다. 멸균 주사 가능한 용액제를 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 일부 제조 방법은 활성 성분 및 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 이것의 미리 멸균-여과시킨 용액으로부터 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.
- [0033] 구체적으로, 상기 조성물은, 조성물의 pH, 오스몰 농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡착, 또는 투과를 변형하거나, 유지하거나 또는 보존하기 위한 제제화 물질을 함유할 수 있다. 적합한 제제화 물질은 아미노산(예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신), 향미생물제, 향산화제(예컨대 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨), 완충제(예컨대 보레이트, 비카르보네이트, 트리스-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 다른 유기산), 벌킹제(예컨대 만니톨 또는 글리신), 킬레이트화제(예컨대 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)), 착화제(예컨대 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린), 충전제, 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물(예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린), 단백질(예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린), 착색제, 향미제 및 희석제, 유화제, 친수성 중합체(예컨대 폴리비닐피롤리돈), 저분자량 폴리펩타이드, 염-형성 반대이온(예컨대 나트륨), 보존제(예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소), 용매(예컨대 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜), 당 알콜(예컨대 만니톨 또는 소르비톨), 현탁화제, 계면활성제 또는 습윤제(예컨대 플루로닉스; PEG; 소르비탄 에스테르; 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80; 트리톤; 트로메타민; 레시틴; 콜레스테롤 또는 킬록사팔), 안정성 증진제(예컨대 수크로스 또는 소르비톨), 장성

증진제(예컨대 알칼리 금속 할라이드; 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨; 또는 만니톨 소르비톨), 전달 비히클, 희석제, 부형제 및/또는 제약 아주반트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 조성물의 투여 빈도는 사용되는 제제 내의 디아세린 함유 나노입자의 약동학적 파라미터에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 임상적 목적 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 투여할 수 있다. 따라서, 단일 용량으로서, 시간 간격을 둔 2회 이상의 용량 (동일한 양의 디아세린 함유 나노입자를 포함하거나 포함하지 않을 수 있음)으로서, 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가의 정밀화는 당업자에 의해 일상적으로 이루어지고, 그들에 의해 일상적으로 수행되는 업무 영역 내에 해당한다.

[0036] 단위 투여량은 인간에 있어서 0.01 $\mu\text{g}/\text{체중kg}$ 내지 100 $\text{mg}/\text{체중kg}$ 이며, 구체적으로, 1 $\mu\text{g}/\text{체중kg}$ 내지 30 $\text{mg}/\text{체중kg}$ 이다. 상기 함량이 최적량인긴 하나, 치료대상 질환 및 부작용의 유무에 따라 달라질 수 있으며, 최적의 투여량은 통상적인 실험을 이용하여 결정될 수 있다. 투여 빈도는 상태의 중증도에 따라 달라진다. 빈도는 1주 당 3회 내지 매 1주 또는 2주 마다 1회의 범위일 수 있다.

[0037] 경우에 따라서, 상기 디아세린 함유 나노입자는 다른 생물학적 활성 분자와 함께 대상 수용체에 투여될 수 있다. 그러나 디아세린 함유 나노입자 및 다른 분자의 최적의 조합, 투여 형태, 정량은 당업계에서 잘 알려진 통상적인 실험을 통하여 결정될 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 디아세린 함유 나노입자를 유효성분으로 포함하는 관절강 주사용 조성물은 환자 체중 kg 당 0.01 mg 내지 0.1 mg , 바람직하게는 0.02 mg 내지 0.08 mg , 가장 바람직하게는 0.08 mg 을 8주 1회 투여하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 "치료 유효량"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 본 발명에 따른 디아세린 함유 나노입자의 양을 의미한다. 정확한 양은 치료 조성물의 성분 및 물리적 특징, 의도된 환자 집단, 개개의 환자의 고려사항 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 인자에 따라 달라질 것이고 당업자가 쉽게 결정할 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때, 부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0043] 실시예

[0044] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[0046] 실시예 1. 디아세린 함유 PLGA 나노입자 제조

[0047] Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA, 50:50, molecular weight: 30,000-60,000, Polysciences, USA) 200 mg 을 디클로로메탄(dichloromethane)과 DMSO (dimethyl sulfoxide)이 9:1로 혼합된 용액 10 mL 에 용해시킨 다음, 디아세린(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 2 mg/mL 혹은 10 mg/mL 를 PLGA가 녹아있는 혼합 용액에 넣고 섞어서 제조한 용액에 21,500 rpm 에서 30분동안 균질화시킨 후 26 Gauge가진 주사기를 이용하여 0.1% poly(vinyl alcohol) (PVA, molecular weight: 13,000-23,000, 98% hydrolyzed) 용액에 떨어뜨려 제조하였다.

[0048] 이 용액을 증류수로 3회 세척하고 3일 동안 동결건조 시켜 디아세린 탑재 PLGA 나노입자를 제조하였으며, 디아세린 각각 2 mg/mL 와 10 mg/mL 가 포함된 나노입자를 DIA(1%)/NP 및 DIA(5%)/NP로 명명하였다.

[0050] 실시예 2. 디아세린 함유 PLGA 나노입자의 특성 및 방출거동 확인

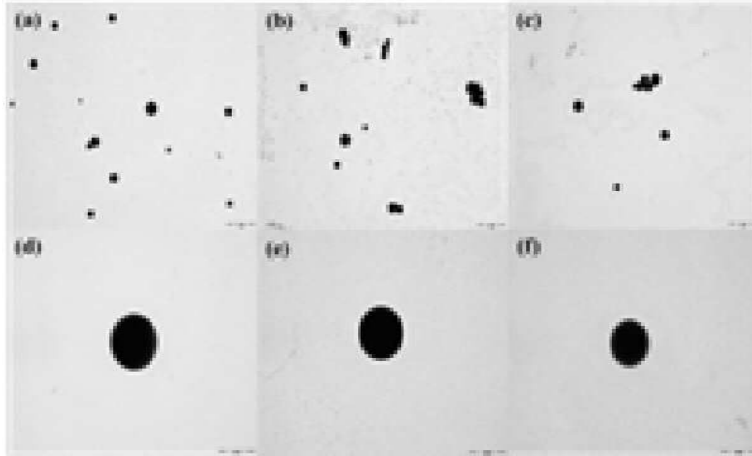
- [0051] 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 NP, DIA(1%)/NP 및 DIA(5%)/NP의 형태를 분석한 결과, NP, DIA(1%)/NP과 DIA(5%)/NP는 구형의 형태를 나타내는 것을 확인하였다(도 1).
- [0052] 또한, NP, DIA(1%)/NP 및 DIA(5%)/NP의 입자 크기와 분포를 동적 광산란으로 확인한 결과, NP, DIA(1%)/NP 및 DIA(5%)/NP의 입자크기와 분포는 각각 328.24 ± 39.8 nm, 278.64 ± 43.5 nm, 311.18 ± 35.6 nm로 나노크기를 유지하는 것을 확인하였다(도 2).
- [0053] DIA(1%)/NP와 DIA(5%)/NP에서 방출되는 디아세린의 양을 측정하기 위해 DIA/NP가 함유된 투석막을 PBS(phosphate-buffered saline)를 포함한 원뿔 튜브에서 연속교반 시키면서 침지시켰다. 방출된 디아세린의 양은 258 nm에서 Flash Multimode Reader를 이용하여 PBS에 수집된 디아세린의 양을 측정하였다.
- [0054] 그 결과, DIA(1%)/NP와 DIA(5%)/NP에서 63일동안 디아세린의 시험관 내 방출을 확인하였고, 디아세린의 방출량과 백분율은 각각 752.85 ± 35.61 μ g ($83.08 \pm 2.92\%$)과 2635.73 ± 83.57 μ g ($56.06 \pm 3.93\%$)이며, 9주 이상동안 DIA(1%)/NP와 DIA(5%)/NP 모두에서 디아세린이 지속적으로 방출되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0056] **실시예 3. 디아세린 함유 PLGA 나노입자의 *in vitro* 항염증 효과 확인**
- [0057] DIA/NP의 항염증효과를 평가하기 위해 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 자극된 쥐에서 직접 분리한 활막세포에서 염증 사이토카인과 유래 효소들의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 염증 사이토카인에는 interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 포함하였으며, 유래 효소에는 matrix metalloproteinases-3 (MMP-3), MMP-13, COX-2, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5)를 포함하였다. 염증이 발생한 활막세포에 DIA/NP 투여 1일과 3일째 염증 사이토카인과 유래 효소의 mRNA 발현 수준을 real-time PCR을 사용하여 측정하였다.
- [0058] 그 결과, 1일째에 비해 3일째에 모든 염증 사이토카인과 유래 효소들이 감소하는 것을 확인하였다(도 4).
- [0060] **실시예 4. 디아세린 함유 PLGA 나노입자의 *in vivo* 항염증 효과 확인**
- [0061] Monosodium iodoacetate (MIA)을 쥐(rat, Sprague-Dawley, DooYeol Biotech)의 오른쪽 무릎 관절에 주입하여 골관절염을 유도하였다. MIA 주입 1주 후 NP, DIA(1%)/NP, DIA(5%)/NP, DIA용액을 골관절염이 유도된 쥐의 관절강 내에 각각 주입하고, 골관절염이 유도된 다른 쥐에는 디아세린 50 mg/kg를 8주간 매일 복용시켰다. 쥐는 다음과 같이 7가지 군으로 분류하였다:
- [0062] (I) MIA 주사, (II) MIA + NPs 주사, (III) MIA + DIA (5 %) 용액 주사, (IV) MIA + DIA(1%)/NP 주사, (V) MIA + DIA(5%)/NP 주사, (VI) MIA + 경구 DIA 및 (VII) 대조군.
- [0063] MIA 주사 0주, 1주, 5주, 9주에 각 군의 쥐의 혈액을 꼬리에서 채취해 염증 사이토카인 및 유래 효소와 항염증 사이토카인의 mRNA 발현을 측정하였으며, 이때, 염증 사이토카인 및 유래효소는 *in vitro*에서 실험한 것과 동일한 것을 포함하고, 항염증 사이토카인은 IL-4와 IL-10을 포함하였다.
- [0064] 측정 결과, I, II 군의 염증 사이토카인과 유래 효소의 mRNA 발현은 점차 증가하여 MIA로 인한 염증이 심화되는 것을 확인하였다. I 군과 II군 사이에 포함된 염증 사이토카인과 효소의 mRNA 발현 수준에는 유의한 차이가 없었으므로 NP 자체가 골관절염의 염증 반응에 영향을 미치지 않았음을 간접적으로 확인한 것이다(도 5).
- [0065] III군에서는 I군과 II군에 비해 5 주에서 9 주까지의 염증 사이토카인과 효소의 mRNA 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. III군의 mRNA 발현 수준은 5주에서 V군과 비슷하게 감소하였으나 9주째 다시 증가하였고, DIA 용액이 처음에는 DIA(5%)/NP와 비슷한 정도로 염증을 억제하지만 효과는 점차적으로 몇 주 내에 감소하므로, 반복적인 관절 내 주사가 필요하다는 것을 나타내는 것을 확인하였다(도 5).
- [0066] IV군은 5주 및 9주에 염증 사이토카인 및 효소의 mRNA 발현이 점진적인 감소하였으나 IV군의 mRNA 발현 수준은 I군에 비해 유의하게 낮은 반면, V군과 VI군에 비해 유의하게 높은 것을 확인하였다(도 5).
- [0067] V군에서는 DIA(5%)/NP 주사 후 점차적으로 염증 사이토카인과 효소의 mRNA 발현이 감소하였고 I-IV군과 비교해서도 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 4). IL-6 이외의 염증 사이토카인과 유래 효소의 mRNA 발현 수준은 경구 투여 시 가장 감소하였으나, V군과 VI군에서 IL-1, COX-2 및 ADAMTS-5에서는 통계적으로 유의한 차이는 없는 것을 확인하였다.

- [0068] IL-6의 mRNA 발현은 V군에서 가장 감소한 것을 확인하였다. IL-6의 생산은 주로 연골 세포와 연관되어 있으며, 관절의 방사선학적 소견과 혈청 내 IL-6의 농도는 양의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으므로, 전신성 관절염보다는 국소적 관절염의 특성을 가지는 골관절염에서 DIA(5%)/NP 주사 시 경구 투여보다 IL-6의 감소가 더 크다는 것은 의미있다.
- [0069] I군과 II군에서 항염증 사이토카인의 mRNA 발현 수준에는 거의 변화가 없으며, III군에서는 IL-4와 IL-10이 5주에 급격히 증가하였으나 9 주에서는 IL-4가 감소하였고 IL-10은 약간 증가하는 것을 확인하였다(도 6).
- [0070] IV군에서는 항염증 사이토카인 수치의 점진적인 증가를 나타내었고, 9주에 III군보다 높았으며 지속적인 항염증 효과를 나타내었으나 V군 및 VI군과 비교하여, 항염증 사이토카인의 mRNA 발현 수준은 낮은 것을 확인할 수 있었다(도 6).
- [0071] V군과 VI군에서 항염증 사이토카인 수준의 점진적인 증가가 관찰되어 지속적인 항염증 효과를 입증하였다. IL-4 및 IL-10의 mRNA 발현의 상승은 디아세린의 경구투여 보다 나노입자를 통해 관절 내 주입 된 경우 더욱 두드러지게 나타나는 것을 확인하였으며, 이 결과는 골관절염 관련 관절의 표적 치료가 전신 치료보다 효과적일 수 있음을 의미한다.
- [0073] **실시예 5. 골관절염 유도 관절의 육안적, 방사선학적 및 조직학적 변화 확인**
- [0074] **실시예 5-1. 육안적 확인**
- [0075] MIA 주사 9주 쯤 골관절염 유도 관절의 육안적, 방사선학적, 조직학적 변화를 확인하기 위해 쥐를 사상하였다.
- [0076] 마우스 관절을 분리하여 육안으로 관찰한 결과, I군과 II군은 연골 표면 전체가 미란되어 있는 것을 확인하였으며, 미란의 수는 V군에서 가장 낮았고, VI군과 IV군 순서로 증가하였다. 연골 표면의 손상도 같은 결과를 나타내었다. 관절 강에 주사한 디아세린의 투여량은 DIA(1%)/NP의 경우 90.61 μ g, DIA(5%)/NP의 경우 470.20 μ g, DIA(5%) 용액의 경우 500 μ g이었고, 경구 투여량은 17.4 mg으로 DIA(5%)/NP는 디아세린 주입량이 경구 투여량의 약 1/37 이었음에도 불구하고 관절 조직 손상이 적다는 것을 확인하였다(도 7).
- [0078] **실시예 5-2. 방사선학적 확인**
- [0079] 방사선학적 변화를 관찰하기 위해 micro-computed tomography (CT)를 시행하였다.
- [0080] 그 결과, I군과 II군은 관절 간격이 좁고 표면이 불규칙하고 관절 연골이 손상되었으며 연골하골 경화증이 심하고 대퇴골 과대가 심하게 나타나는 반면, III군과 IV군은 좀 더 경미한 연골의 미란과 대퇴골 손상을 나타내었으며, V군과 VI군에서 관절 표면의 불규칙성과 관절 연골의 미란이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다(도 8).
- [0082] **실시예 5-3. 조직학적 확인**
- [0083] 각 군의 골관절염 유도 쥐 무릎 관절의 조직학적인 변화를 확인하기 위해 hematoxylin and eosin (H&E)과 Safranin-O-Fast-Green 염색을 각각 시행하였다.
- [0084] 그 결과, 도 9 및 10에 개시된 바와 같이 대조군과 비교하여, H&E 염색 소견에서 연골 및 관절 조직 파괴는 V, VI, IV 및 III군의 순서로 적었음. Safranin-O-Fast-Green 염색에서는 I군과 II군은 연골 심층부의 proteoglycan의 손실과 미란을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0085] I군과 II군에 비해 III군과 IV군은 연골의 표층에 proteoglycan의 손실이 나타났으며, 연골의 손상이 적은 것을 확인하였다. V군은 연골의 proteoglycan의 손실과 연골의 미란이 가장 적은 것을 확인하였다. 이에 비해, VI군은 연골 표층의 proteoglycan의 손실을 나타내었다. V군에서는 다른 군에 비해서 연골 하골 변형이 가장 적었고, 골관절염의 주된 치료가 연골하골 remodeling의 억제임을 고려할 때 의미있는 결과이다.
- [0087] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

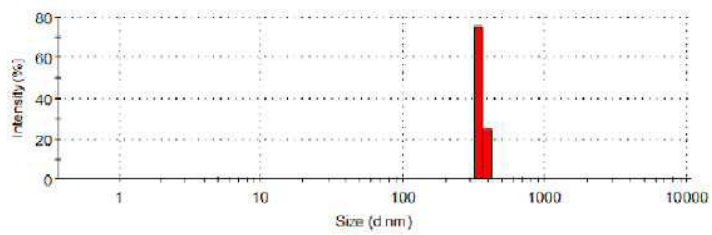
도면

도면1

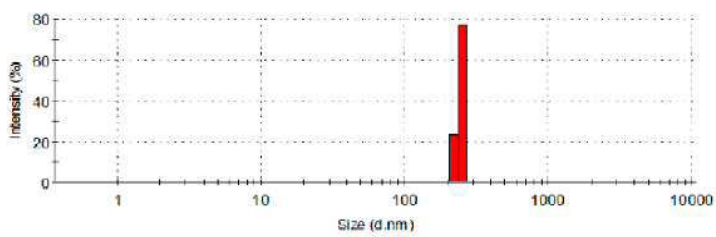


도면2

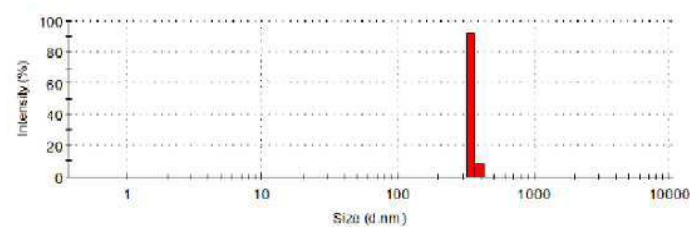
(a)



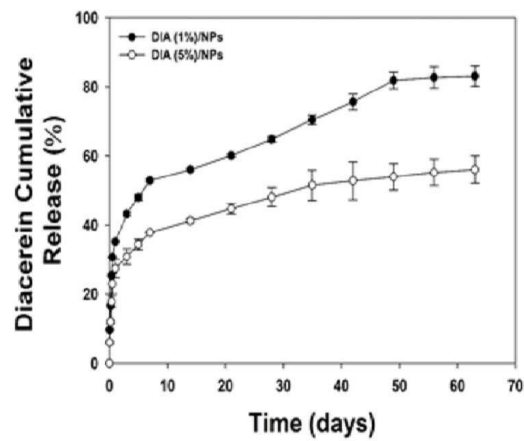
(b)



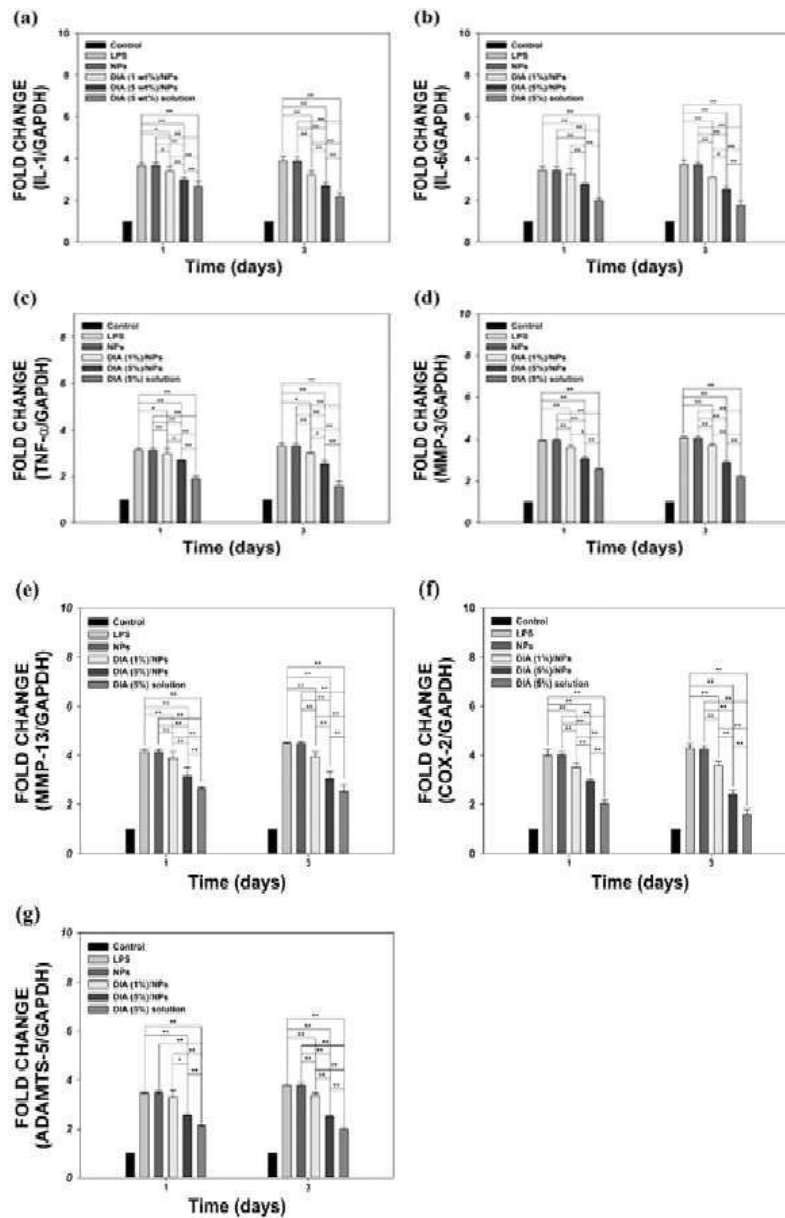
(c)



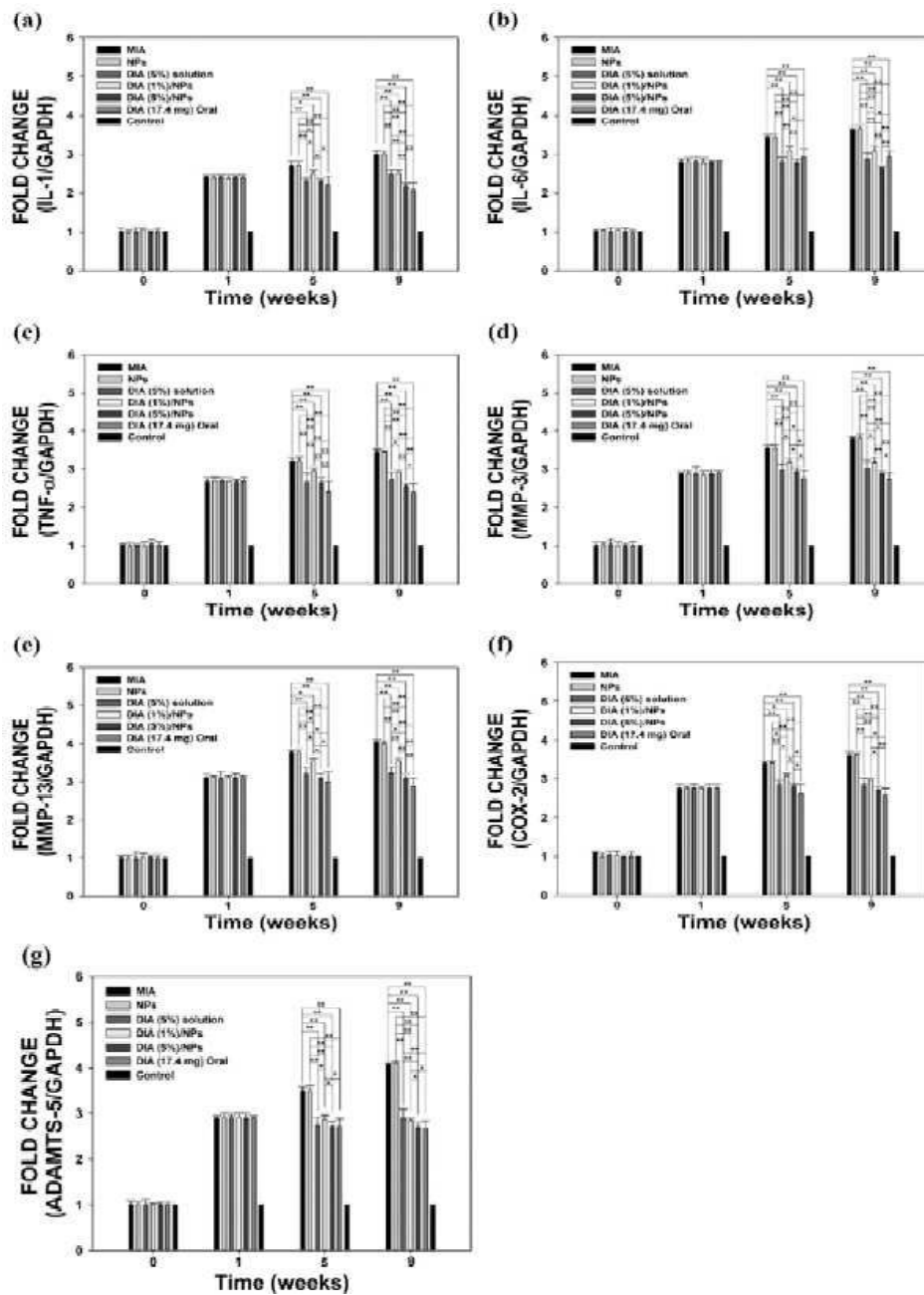
도면3



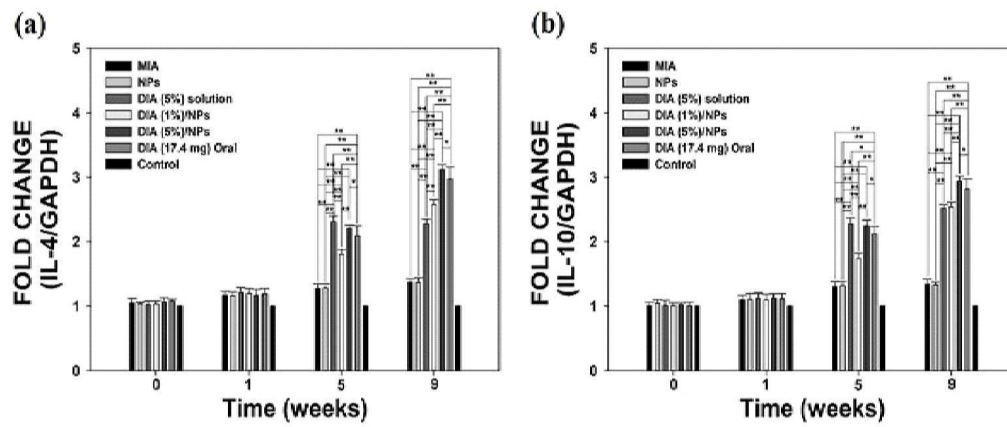
도면4



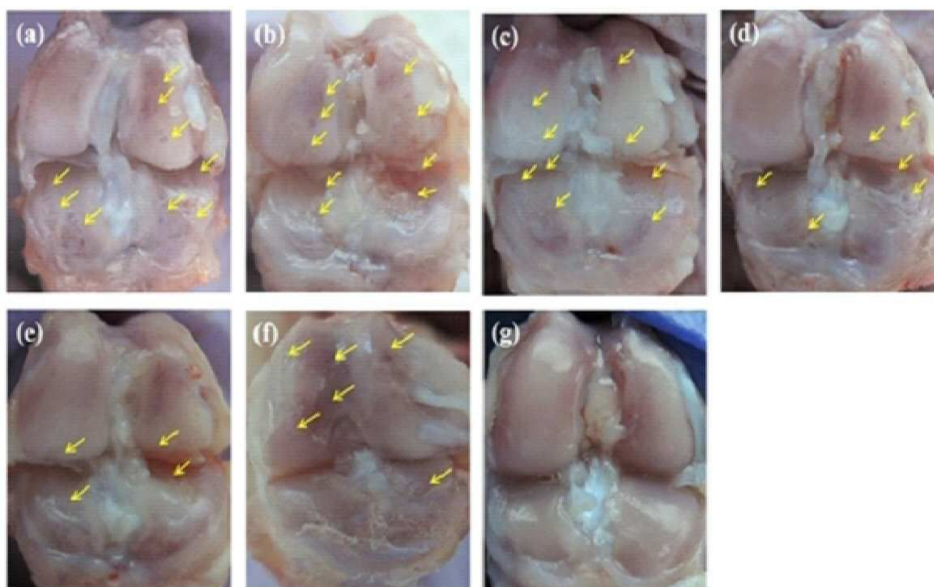
도면5



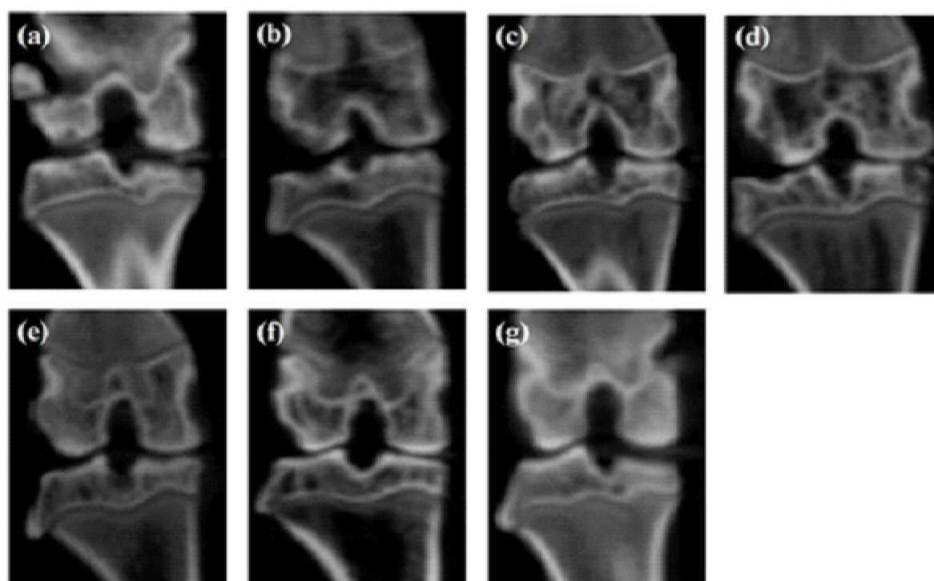
도면6



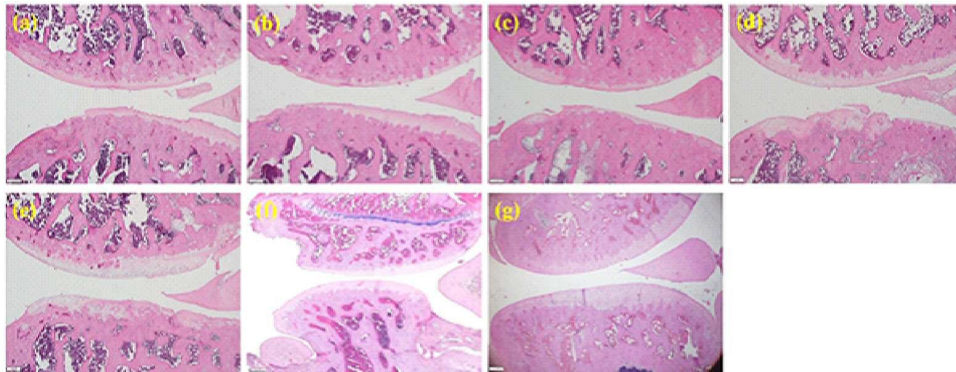
도면7



도면8



도면9



도면10

