



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0062054
(43) 공개일자 2020년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/34 (2006.01) A61C 8/02 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01) A61F 2/30 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/34 (2013.01)
A61C 8/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0151734
(22) 출원일자 2019년11월22일
심사청구일자 2019년11월22일
(30) 우선권주장
1020180146741 2018년11월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이연
서울특별시 관악구 관악로30길 27 111동 1903호
(봉천동, 관악푸르지오1단지아파트)
강민지
서울특별시 관악구 남부순환로220길 35 1201호
(봉천동, 메카오피스텔)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

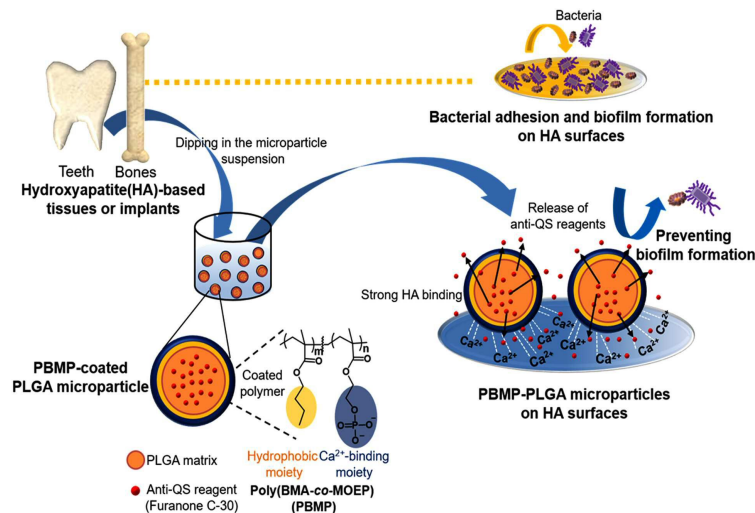
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **의료용 고분자 화합물, 의료용 복합체, 및 의료용 복합체 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 의료용 고분자 화합물, 의료용 복합체 및 복합체 제조방법에 관한 것으로, 하이드록시아파타이트와 같이 칼슘 기반의 생체 물질 표면의 칼슘이온과 상호작용할 수 있는 인산기; 및 서방형 입자와 안정적인 결합이 가능한 소수성 잔기;를 포함하는 고분자 및 고분자로 상기 기제를 코팅하여 입자를 형성한 복합체 및 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61F 2/2846 (2013.01)
A61F 2/30767 (2019.05)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61F 2002/2817 (2013.01)
A61F 2002/30677 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
A61L 2430/12 (2013.01)

(72) 발명자

김성환

서울특별시 관악구 성현로 80 관악드림타운 115동
 2202호

강선아

서울특별시 관악구 신림로3가길 46-18 203호 (신
 림동,비전하우스)

박성배

서울특별시 노원구 중계로 230 506동 1104호 (중
 계동,주공5단지아파트)

박지웅

서울특별시 용산구 한강대로 26 한강대우트럼프월
 드 102동 1103호

서지훈

서울특별시 성북구 인촌로 17가길 64, 110동 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9E9072938

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 의료기관 창업 캠퍼스 연계 원천기술 개발사업

연구과제명 생체막 고분자 기반 항피막구축 실리콘 보형물 표면 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2019.03.31

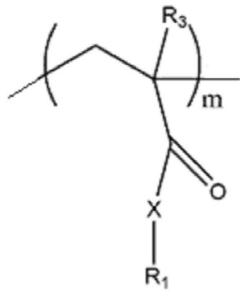
명세서

청구범위

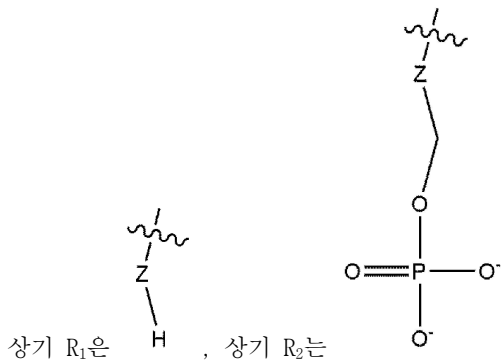
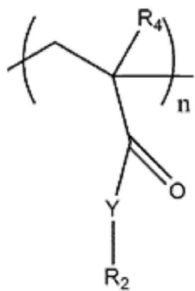
청구항 1

하기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 하기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는, 의료용 고분자 화합물:

[화학식 A]



[화학식 B]



상기 화학식 1에서, 상기 m 및 n 은 각각 독립적으로 자연수이고, 상기 X 및 Y 는 각각 독립적으로 O 또는 NH 일 수 있고, 상기 R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 H 또는 CH_3 일 수 있고, 상기 Z 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 12의 알킬기 또는 아릴기일 수 있고, 이때 하나 이상의 $-\text{CH}_2-$ 기는 각각 독립적으로 $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ 로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 것이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고분자 화합물의 분자량은 1,000 내지 500,000인, 고분자 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

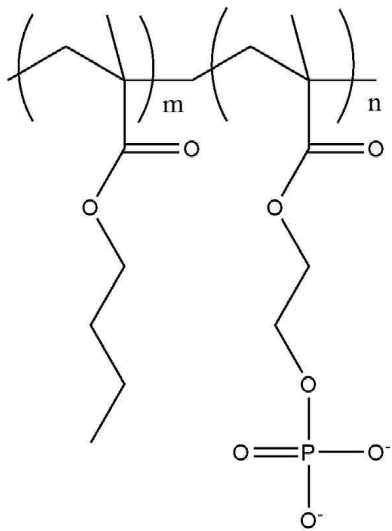
상기 화학식 A의 m 과 상기 화학식 B의 n 은 $m:n$ 1:20 내지 20:1인, 고분자 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 상기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함한 고분자 화합물은 하기 화학식 2의 고분자 화합물을 포함하는, 고분자 화합물:

[화학식 2]



청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화학식 A의 R_1 은 기재와 결합이 가능하고, 상기 화학식 B의 R_2 는 칼슘이온과 결합이 가능한 것인, 고분자 화합물.

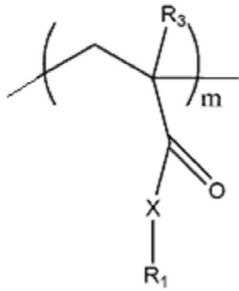
청구항 6

생리활성물질을 담지할 수 있는 기재; 및

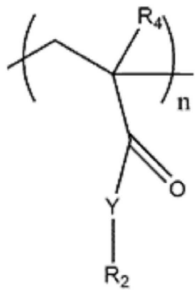
상기 기재 상에 제공되는 코팅층을 포함하고,

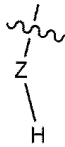
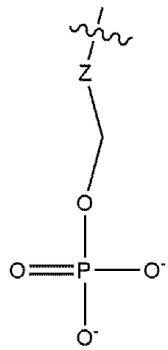
상기 코팅층은 하기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 하기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는 고분자 화합물인 것인, 의료용 복합체:

[화학식 A]



[화학식 B]



상기 R₁은 , 상기 R₂는 .

상기 화학식 1에서, 상기 m 및 n은 각각 독립적으로 자연수이고, 상기 X 및 Y는 각각 독립적으로 O 또는 NH일 수 있고, 상기 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 H 또는 CH₃일 수 있고, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 12의 알킬기 또는 아릴기일 수 있고, 이때 하나 이상의 -CH₂- 기는 각각 독립적으로 -C≡C-, -CH=CH-로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 것이다.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 복합체 크기는 50nm 내지 500 μm 인, 의료용 복합체.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 복합체는 약물전달 시스템 용도인 것인, 의료용 복합체.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 기재는 폴리락티드-코-글리콜리드(poly(lactide-co-glycolide), PLGA), 폴리글리코리드(poly(glycolide), PGA), 폴리락티드(poly(lactide), PLA), 또는 폴리엡실론카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone), P(ϵ -CL))를 포함하는 것인, 의료용 복합체.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 생리활성물질은 충치억제 물질, 항생 물질, 뼈 형성 촉진 물질, 염증억제 물질, 또는 면역억제 물질을 포함하는 것인, 의료용 복합체.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 생리활성물질은 푸라논 C-30(Furanone C-30), 반코마이신(vancomycin), 골형성단백질(bone morphogenetic protein), 덱사메타손(dexamethasone), 또는 사이클로스포린(cyclosporine)을 포함하는 것인, 의료용 복합체.

청구항 12

서방형입자 내에 생리활성물질을 담지하는 제1단계; 및

상기 서방형입자 상에 서방형입자 및 칼슘이온과 상호작용하는 작용기를 포함한 고분자를 코팅하는 제2단계;를 포함하는 것인, 복합체 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 서방형 입자 대비 생리활성물질을 0.01 내지 30중량% 첨가하여 담지하는 것인, 복합체 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 제1단계는 1시간 내지 12시간 동안 0 내지 60℃에서 담지하는 것인, 복합체 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 서방형 입자 대비 상기 고분자는 0.1 내지 10중량% 첨가하여 코팅하는 것인, 복합체 제조방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 제2단계는 0.25시간 내지 6시간 동안 교반하여 코팅하는 것인, 복합체 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의료용 고분자 화합물, 의료용 복합체, 및 의료용 복합체 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 기재와 상호작용 및 하이드록시아파타이트 등의 칼슘 기반 물질의 표면에 존재하는 칼슘이온과 상호작용할 수 있는 고분자 화합물, 복합체 및 복합체 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 다양한 질환이 생체 내의 칼슘 기반 생체 표면과 연관되어 있다. 구체적으로, 골절, 골 괴사, 골결손, 충치 및 치주질환 등과 같은 질환이 칼슘 기반 생체 표면과 관련되어 있다.

[0004] 예를 들어, 병원성 박테리아는 살아있는 치표면이나 인공 표면에 부착하여 생물막을 형성한다. 따라서, 치아 혹은 뼈의 표면에 부착된 병원성 박테리아의 생물막을 제거하는 것은 매우 중요하다. 많은 경우, 이러한 막을 제거하기 위해, 항생제를 사용하게 된다. 하지만 생물막에는 항생제의 효과가 크게 떨어지게 되어 고농도의 항생제가 필요하게 되는데, 항생제를 이러한 생물막 근처에서만 고농도로 유지할 수 있는 기술이 없으면, 전신에 걸쳐 고농도의 항생제를 처방할 수밖에 없다. 이러한 처방은 많은 부작용을 야기하게 된다. 이는 골절/골결손/괴사/ 치주질환 등과 같은 다양한 다른 질환과 관련된 약물에 대해서도 마찬가지이다.

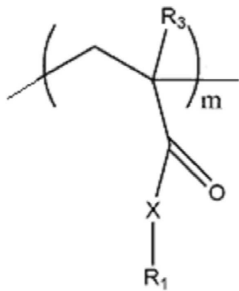
[0005] 이에 따라, 치아 또는 뼈와 같은 칼슘 기반 표면에 부착되어 지속적으로 생리활성효과를 제공할 수 있는 화합물 또는 복합체가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

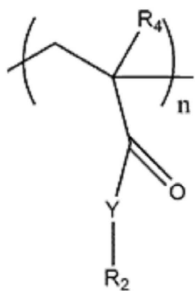
[0007] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 하기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는, 의료용 고분자 화합물을 제공한다.

[0008] [화학식 A]

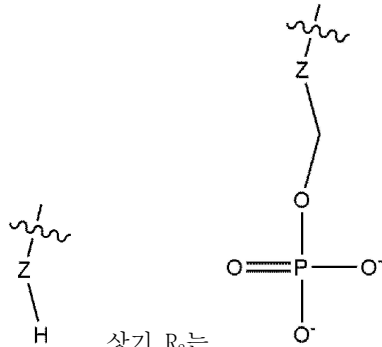


[0009]

[0010] [화학식 B]



[0011]



상기 R₁은 H, 상기 R₂는

상기 화학식 1에서, 상기 m 및 n은 각각 독립적으로 자연수이고, 상기 X 및 Y는 각각 독립적으로 O 또는 NH일 수 있고, 상기 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 H 또는 CH₃일 수 있고, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 12의 알킬기 또는 아릴기일 수 있고, 이때 하나 이상의 -CH₂- 기는 각각 독립적으로 -C≡C-, -CH=CH-로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 생리활성물질을 담지할 수 있는 기재; 및 상기 기재 상에 제공되는 코팅층을 포함하고, 상기 코팅층은 상기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는 고분자 화합물인 것인, 의료용 복합체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 복합체 제조방법 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

본 발명에서는 칼슘 기반(하이드록시아파타이트(HA))표면에 복합체를 결합시켜 생리활성물질을 지속적으로 용출할 수 있도록 하였다. 예를 들어, 하이드록시아파타이트는 뼈 및 치아 범랑질과 같은 단단한 조직의 주요 구성 요소이다. 또한, 하이드록시아파타이트는 기계적 강도와 인성, 높은 생체 적합성 및 생분해성으로 인해 인공 뼈 대체재, 임플란트 및 조직 스캐폴드에 널리 사용되는 플랫폼 재료이다. 그러나, 하이드록시아파타이트 표면은 박테리아 분비 단백질이 하이드록시아파타이트 표면에 쉽게 부착되어 펠리클을 형성하기 때문에 박테리아 부착 및 성장에 대한 견고한 지지를 제공할 수 있는데, 예를 들어, 박테리아가 부착된 후 공격적으로 증식하는 얇은 단백질 층으로 구강세균 박테리아인 스트렙토코커스 뮤탄스(streptococcus mutans)는 다른 미생물과 함께 생물막을 형성함으로써 치아 표면에 서식한다. 당뇨병 환자 또는 뼈 임플란트 수용자는 포도상 구균을 비롯한 다양한 박테리아에 의한 감염 후 골수염을 경험하는 경우가 많은데 심각한 유형의 골수염은 하이드록시아파타이트 기반 뼈 또는 임플란트 표면에서의 박테리아 생물막 형성과 밀접한 관련이 있으며, 이러한 경우에 통상적인 항생제-기반 치료제의 효능은 일반적으로 낮다.

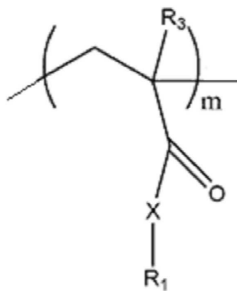
따라서, 인공 임플란트나 스캐폴드를 몸에 삽입하고 다양한 생체 기능성 물질을 담지하여 환자에게 치료한다. 그러나, 다수의 생체 기능성 물질은 표적화된 조직 이외의 조직에서 상당한 부작용을 나타내며, 또한 체내의 배설 또는 불 활성화에 의해 효능이 급격히 감소된다. 따라서, 대상 조직 주변에서 장기적으로 이러한 생체 기능성 물질을 방출하기 위한 기술이 필요하다. 하이드록시아파타이트와 같은 인산칼슘기반 표면에서 부착되는 물질에 지속적으로 생체 기능성 물질을 방출할 수 있다면, 뼈, 치아, 인산 칼슘 표면 주변에서 장기적으로 생체 기능성 물질의 효능을 유지할 수 있다.

이러한 배경하에, 본 발명자들은 하이드록시아파타이트와 같은 칼슘 기반 생체 물질에 부착되어 지속적으로 생체 기능성 물질을 방출하는 방법을 고안하였고, 종래의 문제를 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 칼슘계 표면에 강하게 결합된 분해성 입자 또는 스캐폴드로부터 생체기능성 물질을 서서히 방출하고 표면 주위에서 장기간 효능을 유지하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명의 고분자 화합물 및 복합체는 뼈 또는 치아에 부착하여 사용되는 의료용을 위한 것일 수 있다. 이때 의료용은 약물전달시스템 용도인 것일 수 있고, 치아 또는 뼈의 경우 하이드록시아파타이트와 같은 칼슘 기반 생체 물질로 구성되어 있어 하이드록시아파타이트와 같은 칼슘 기반 물질 표면에 안정적으로 부착되고 생리활성물질을 서방형으로 방출할 수 있는 약물전달시스템 제공을 위하여 착안된 것으로, 본 발명자들은 칼슘 기반 생체 물질 표면에 존재하는 칼슘이온과 상호작용하는 인산기 및 서방형 입자와 안정적으로 결합이 가능한 소수성 잔기를 포함한 고분자를 제조하고 서방형 입자 내에 생리활성물질을 담지하고, 서방형 입자 상에 고분자를 코팅하여 복합체를 제공함으로써, 치아 및 뼈를 포함하는 칼슘 기반 생체 물질 표면에 안정적으로 부착되고 장기간 유지 가능하여 다른 감염 없이 효능이 우수한 것을 확인하여 완성하였다.

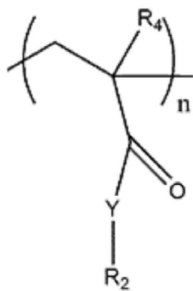
[0024] 본 발명의 제1양태는, 하기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 하기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는, 의료용 고분자 화합물을 제공한다.

[0025] [화학식 A]

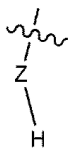
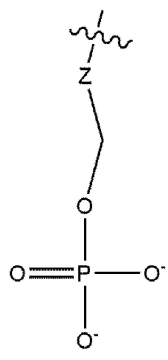


[0026]

[0027] [화학식 B]



[0028]

[0029] 상기 R₁은 , 상기 R₂는 

[0030] 상기 화학식 1에서, 상기 m 및 n은 각각 독립적으로 자연수이고, 상기 X 및 Y는 각각 독립적으로 O 또는 NH일 수 있고, 상기 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 H 또는 CH₃일 수 있고, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 12의 알킬기 또는 아릴기일 수 있고, 이때 하나 이상의 -CH₂- 기는 각각 독립적으로 -C≡C-, -CH=CH-로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 것이다.

[0031] 본 발명의 제2양태는 생리활성물질을 담지할 수 있는 기재; 및 상기 기재 상에 제공되는 코팅층을 포함하고, 전술한 제1 양태의 화학식 A로 표시되는 구조단위와 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는 고분자 화합물인

것인, 의료용 복합체를 제공한다.

- [0032] 본 발명의 제3양태는 서방형입자 내에 생리활성물질을 담지하는 제1단계; 및 상기 서방형입자 상에 서방형입자 및 칼슘이온과 상호작용하는 작용기를 포함한 고분자를 코팅하는 제2단계;를 포함하는 것인, 복합체 제조방법을 제공한다.
- [0034] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [0035] 본 발명의 제1 양태의 화학식 A 및 화학식 B는 선상으로 배열될 수 있다. 예를 들어, 화학식 A와 화학식 B의 구조단위는 랜덤 공중합체(Random Copolymer), 교대 공중합체(Alternate Copolymer), 트라이블록 공중합체, 그래프트 공중합체 등 다양한 형태로 제공될 수 있다.
- [0036] 다만, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 화학식 A와 화학식 B의 구조단위는 랜덤 공중합체, 그래프트 공중합체, 블록 공중합체 형태로 배열된 공중합체로 제공될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 제1양태의 화학식 A의 R_1 은 기재와 결합이 가능하고, 화학식 B의 R_2 는 칼슘이온과 결합이 가능한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 기재는 생체활성물질을 담지하는 서방형 입자일 수 있고, 상기 R_1 은 소수성 잔기를 포함하여 소수성인 기재와 상호작용으로 안정적인 결합이 가능할 수 있다.
- [0039] 상기 칼슘이온은 하이드록시아파타이트와 같은 치아 및 뼈를 포함하는 칼슘 기반인 생체 물질일 수 있고, 상기 R_2 는 인산기를 포함하여 칼슘이온과 상호작용으로 안정적인 결합이 가능할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 용어, "기재"는 체내에서 천천히 효과가 방출되는 입자로 담지한 생리활성물질이 일반 정제와 달리 좀 더 천천히 나오도록 특수하게 만들어진 서방형 입자를 의미한다. 구체적으로, 약물의 방출 또는 용출 기전을 조절해 복용 이후 체내에서 장기간 동안 약물을 방출하는 제제로, 약이 체내에서 천천히 흡수되도록 해 약효가 오래가도록 한 것이다. 서방형은 일반적인 입자보다 투여 횟수가 적고 반응이 균일해 부작용이 적다는 장점이 있다. 상기 서방형 입자는 생체 내에서 분해하는 분해성 입자 및 스캐폴드를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어, "분해성 입자"는 살아있는 유기체에 의해 분해될 수 있는 입자를 의미한다.
- [0043] 본 발명의 용어, "스캐폴드"는 일정한 골격을 갖는 고체 지지체를 의미한다. 바람직하게 상기 스캐폴드는 100nm 내지 500 μm 의 지름을 갖는 섬유로 만들어진 구조체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명의 용어, "하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite, HA)"는 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ 식을 갖지만, 결정 단위셀(crystal unit cell)이 두 개체(entities)로 이루어져 있다는 걸 표시하기 위해 대개 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 로 쓴다. 뼈나 치아를 이루는 무기성분, 즉 칼슘과 인으로 이루어진 무기성분의 화합물이다. 따라서 절단된 뼈를 대신하기 위한 필러나 인공임플란트 쪽으로 뼈의 내성장(ingrowth)를 촉진하기 위한 코팅제로 흔히 사용되는 것을 의미한다.
- [0047] 본 발명의 용어, "칼슘"은 화학 원소로 주기율표에서 기호는 Ca이고 원자 번호는 20, 원자량은 40.078이다. 생물체 내에 가장 많이 존재하는 금속 원소이다. 특히, 사람과 동물에게 필수적이며, 뼈 및 치아에 존재하고 하이드록시아파타이트 구성성분 중 하나이다.
- [0049] 본 발명의 용어, "인산기(phosphate group)"는 일반적으로 오르토인산유래의 관능기를 의미한다. 화학식은 모노에스테르는 $\text{HOPO}(\text{OH})\text{O}-$, 디에스테르는 $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}-$, 트리에스테르는 $-\text{OPO}(\text{O}-)_2$ 로 나타낸다. 인산에스테르는 천연에도 많이 존재하고, 인산기는 생체반응에서 중요한 역할을 담당하고, 하이드록시아파타이트 구성 성분 중 하나인 칼슘 이온과 강한결합이 가능한 것을 의미한다.

[0051] 본 발명의 용어, "소수성 잔기"는 물과의 친화성이 적고 기름과의 친화성이 큰 무극성 원자단을 의미한다. 사슬 모양 탄화수소기, 방향족탄화수소기, 할로젠화알킬기 또는 유기규소기 등이 대표적인 것이다. 탄화수소 사슬이 길어질수록 큰 소수성을 보인다.

[0053] 상기 고분자 화합물의 분자량은 1,000 내지 500,000일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

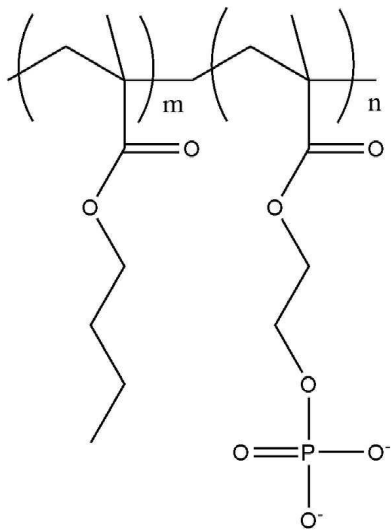
[0054] 분자량이 1,000 미만일 경우, 기재 및 칼슘이온과 충분히 결합하지 못할 수 있고, 500,000 초과할 경우 체내에서 대사되더라도 사구체를 통하여 배출되지 않을 수 있다.

[0055] 바람직하게는, 상기 고분자 화합물의 분자량은 사구체를 통과하는 40,000 내지 60,000일 수 있다.

[0057] 상기 화학식 1의 m 및 n은 m:n 1:20 내지 20:1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 상기 화학식 A로 표시되는 구조단위와 상기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함한 고분자 화합물은 하기 화학식 2의 고분자 화합물을 포함할 수 있다.

[0060] [화학식 2]

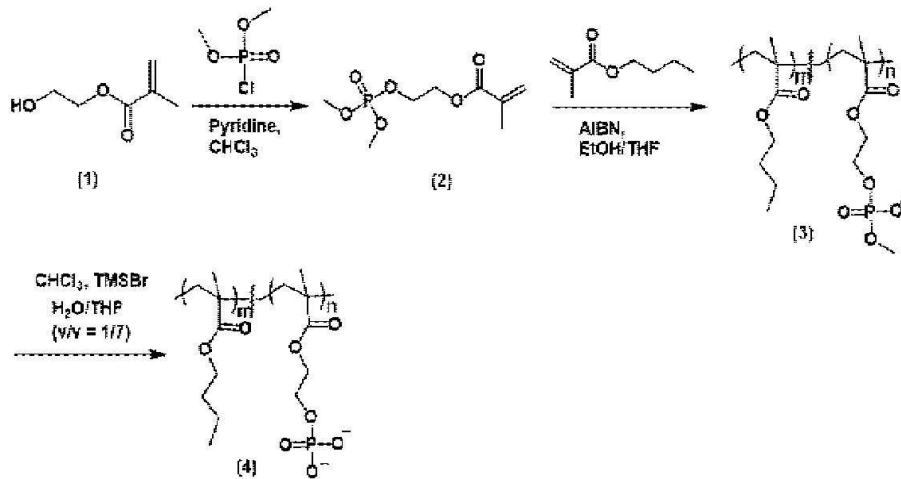


[0061]

[0063] 상기 고분자는 칼슘이온과 상호작용하는 인산기 및 서방형 입자와 결합이 가능한 소수성잔기를 포함하고 생체 독성이 없는 물질이라면, 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 고분자로는, 예를 들어, 폴리(부틸메타크릴레이트-코-2-메타크릴로일옥시에틸포스페이트)(poly(BMA-co-MOEP), PBMP)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0065] 상기 PBMP는 하기 반응식 1과 같이 제조할 수 있다.

[0066] [반응식 1]



[0067]

[0068] 상기 반응식 1에서 제조한 바와 같이, PBMP는 인산기를 갖는 DMOEP(2)단량체를 사용하였고, 개시제로 AIBN을 사용하여 자유 라디칼 중합에 의해 소수성 잔기를 포함한 BMA 와 합성하여 제조하였다.

[0069] 상기 PBMP(4)는 BMA단량체의 부틸기가 소수성 상호작용을 하여 서방형 입자와 상호작용을 통해 결합할 수 있고, 포스포모노에스테르기(인산기)는 정전기 상호작용을 통해 HA와 같이 치아 및 뼈를 포함하는 칼슘 기반인 생체 물질 표면상의 칼슘이온과 상호작용하여 안정적으로 결합할 수 있다.

[0071] 전술한 본 발명의 제2양태에 따라, 의료용 복합체는 생리활성물질을 담지할 수 있는 기재; 및 상기 기재 상에 제공되는 코팅층을 포함하고, 상기 코팅층은 전술한 제1양태의 화학식 A로 표시되는 구조단위와 하기 화학식 B로 표시되는 구조단위를 포함하는 고분자 화합물인 것일 수 있다.

[0073] 예를 들어, 상기 기재는 폴리락티드-코-글리콜리드(poly(lactide-co-glycolide), PLGA), 폴리글리콜리드(poly(glycolide), PGA), 폴리락티드(poly(lactide), PLA), 또는 폴리엡실론카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone), P(ϵ -CL))를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명의 용어 "폴리락티드-코-글리콜리드(poly(lactide-co-glycolide), PLGA)"는 미국 식약청에서 의료용으로 승인된 고분자 재료로서 독성의 문제가 없어 다른 고분자에 비하여 약물전달체 또는 생체 재료와 같은 의료용으로서 직접적 응용이 보다 수월한 장점이 있다. 또한 공중합 시 글리콜리드(glycolide)와 락티드(lactide)의 분율 또는 분자량의 조절에 따른 고분자의 분해속도를 변화시켜 약물의 방출 거동을 조절할 수 있는 특징이 있는 것으로, 분해성 고분자로 생체에 적합한 서방형 제제를 의미한다.

[0076] 예를 들어, 상기 기재는 PLGA일 수 있고, 상기 고분자 화합물은 PBMP일 수 있다. 상기 PLGA 상에 상기 고분자 PBMP가 코팅되어 PLGA/PBMP 입자를 형성하여 복합체로 제공할 수 있다.

[0078] 본 발명의 용어 "생리활성물질"은 바이오필름 억제, 항생 효과, 항암효과, 뼈 형성 촉진, 염증 억제 등 생리활성에 작용할 수 있는 물질을 의미한다.

[0079] 예를 들어, 상기 생리활성물질은 충치 억제 물질 푸라는 C-30(Furanone C-30), 항생 물질 반코마이신(vancomycin), 뼈 형성 촉진 물질 골형성단백질(bone morphogenetic protein), 염증억제 물질 덱사메타손(dexamethasone), 또는 면역억제 물질 사이클로스포린(cyclosporine)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 상기 푸라는 C-30은 치아 표면에 존재하는 바이오 필름(충치균 S.뮤탄스(*Streptococcus mutans*))을 치아 표면 부착 억제 및 성장을 저해하는 충치억제물질을 의미한다.

- [0082] 상기 복합체 크기는 50nm 내지 500 μ m 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 상기 복합체의 크기가 50nm 미만일 경우 그 안정성이 크게 떨어질 수 있고, 500 μ m를 초과할 경우 칼슘을 기반으로 하는 생체 물질 상에 부착 효율이 떨어질 수 있다.
- [0084] 복합체에 포함된 서방형 입자가 분해성 입자인 경우, 복합체의 크기는 약 50 nm 내지 100 μ m 일 수 있다. 또한, 복합체에 포함된 서방형 입자가 스캐폴드인 경우, 복합체의 크기는 약 100 nm내지는 500 μ m 일 수 있다.
- [0086] 상기 복합체는 약물전달 시스템 용도인 것일 수 있다.
- [0087] 상기 복합체는 HA를 포함하는 칼슘 기반 생체 물질 표면에 안정적으로 부착 및 기재와 안정적으로 결합하고, 생체독성 문제가 없어 생체내 적용이 안전할 수 있다. 따라서, 기재내에 담지된 생리활성물질을 체내에서 부작용 없이 장기간 동안 방출하는 약물전달 시스템인 것 일 수 있다.
- [0089] 전술한 본 발명의 제3양태에 따라, 복합체의 제조방법은 서방형입자 내에 생리활성물질을 담지하는 제1단계; 및 상기 서방형입자 상에 서방형입자 및 칼슘이온과 상호작용하는 작용기를 포함한 고분자를 코팅하는 제2단계;를 포함할 수 있다.
- [0091] 구체적으로, 상기 제1단계에서 상기 서방형 입자 대비 생리활성물질을 0.01 내지 30중량% 첨가하여 담지하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 상기 생리활성물질이 0.01 중량% 미만 담지할 경우 약물 방출하는 기간이 짧아 생리활성 작용이 미미 할 수 있고, 30중량%를 초과하여 담지할 경우 지속되는 시간이 길어 부작용을 야기할 수 있다.
- [0094] 상기 담지하는 제1단계는 1시간 내지 12시간 동안 0 내지 60℃에서 담지하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0095] 바람직하게는 5시간 내지 7시간 동안 30 내지 50℃에서 담지하는 것일 수 있다.
- [0096] 1시간 미만일 경우 서방형 입자 내에 균일하게 담지 되지 않고, 생리활성물질이 충분히 담지 되지 않을 수 있고, 12시간 초과할 경우 이미 생리활성물질이 유실될 수 있고, 서방형 입자의 균일성이 떨어질 수 있다.
- [0098] 상기 제2단계에서 상기 서방형 입자 대비 상기 고분자는 0.1 내지 10중량% 첨가하여 코팅하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 상기 고분자가 0.1중량% 미만일 경우 상기 서방형 입자를 완전히 감싸지 못할 수 있고, 10중량% 초과할 경우 상기 서방형 입자를 약화시켜 생리활성물질이 유실되고, 입자의 균일성 및 수율이 낮아질 수 있다.
- [0101] 상기 제2단계는 0.25시간 내지 6시간 동안 교반하여 코팅하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] 교반 시간이 0.25시간 미만일 경우 고분자의 코팅 효율이 낮아질 수 있고 6시간 초과할 경우 생리활성물질이 유실되어 수율이 낮아 질 수 있다.
- [0103] 본 발명의 제조방법에서 각 단계는 이들 방법에 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 반응을 그대로 또는 적절히 변경하여 수행할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 제1양태에 따른 고분자 및 제2양태에 따른 복합체를 약물전달 시스템으로 구성하여 생체독성이 없고, HA같은 치아 및 뼈를 포함하는 칼슘 기반인 생체 물질 표면에 안정적으로 결

합하여 장기간 생리활성 물질을 방출해 박테리아 병리 및 예방에 적용할 수 있는 것을 확인 하였다.

발명의 효과

[0106]

본 발명의 입자는 하이드록시아파타이트와 같은 치아 및 뼈를 포함하는 칼슘기반 생체 물질 표면에 안정적으로 부착하고, 칼슘기반 생체 물질 주위에 작용하는 생리활성물질을 담지하여 장기간 유지하며 방출하므로 오랜기간에 걸쳐 질병을 치료할 수 있다. 또한, 치아 및 뼈와 같은 칼슘 기반 관련 조직 주변의 박테리아 병리 예방 및 다양한 질병 예방에 광범위하게 적용할 수 있는 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0108]

도 1은 본 발명의 입자의 제조방법 및 이의 작용을 나타낸 모식도 이다.

도 2의 (A)는 PLGA 입자 (B)는 PLGA/PBMP입자를 100 μ m 바와 크기를 비교하여 나타낸 SEM 사진이다.

도 3은 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자의 XPS 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 4의 (A)는 PLGA 및 PLGA/PBMP가 하이드록시아파타이트 표면에 부착하는 입자수를 나타낸 그래프이고, (B) 내지 (E)는 물에서 진탕시킨 후 하이드록시아파타이트 표면에 남은 입자를 나타낸 사진이다(30분 진탕 후 PLGA입자를 나타낸(B) 및 PLGA/PBMP입자를 나타낸(C) 60시간 진탕 후 PLGA입자를 나타낸(D) 및 PLGA/PBMP입자를 나타낸(E)).

도 5는 약물을 담지한 PLGA 입자 FE-SEM사진을 나타낸 (A), 약물을 담지한 PLGA/PBMP입자 FE-SEM 사진을 나타낸 (B), PLGA 및 PLGA/PBMP가 담지한 약물을 서방형으로 방출하는 것을 나타낸 그래프(C)이다.

도 6은 박테리아 성장 실험을 계획한 모식도(A) 및 PLGA 또는 PLGA/PBMP로 코팅된 후 박테리아 성장곡선을 나타낸 그래프이다.

도 7은 박테리아 현탁액의 광학밀도(O.D)를 나타낸 그래프(A) 및 박테리아 표면 밀도를 나타낸 그래프(B) 이다.

도 8은 본 발명의 입자가 코팅되지 않은 하이드록시아파타이트 표면(A), furanone C-30 (500 μ M) 및 하이드록시아파타이트 표면(B), furanone C-30을 캡슐화한 PLGA로 코팅된 하이드록시아파타이트 표면(C) 및 furanone C-30을 캡슐화하는 PLGA/PBMP입자로 코팅된 하이드록시아파타이트 표면을 나타낸 CLSM사진이다.

도 9는 입자가 코팅된 하이드록시아파타이트의 박테리아 현탁액의 광학밀도(O.D.), 입자가 코팅된 하이드록시아파타이트 표면에 부착된 박테리아 표면 밀도를 나타낸 그래프(A) 내지 (B), PLGA미립자 코팅된 하이드록시아파타이트 및 PLGA/PBMP코팅된 하이드록시아파타이트를 나타낸 사진 (C) 내지 (D).

도 10은 반응식 1의 (2) 내지 (4)를 NMR분석한 그래프이다.

도 11은 PLGA 및 PLGA/PBMP를 DSC 분석한 그래프 및 표이다.

도 12는 하이드록시아파타이트 표면의 박테리아는 녹색 죽은 것은 적색으로 염색된 CLSM사진이다.

도 13은 PLGA 및 PLGA/PBMP입자와 24시간 인큐베이션 후 전골모세포(MC3T3-E1)의 생존력을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0110]

<시약 및 재료>

[0111]

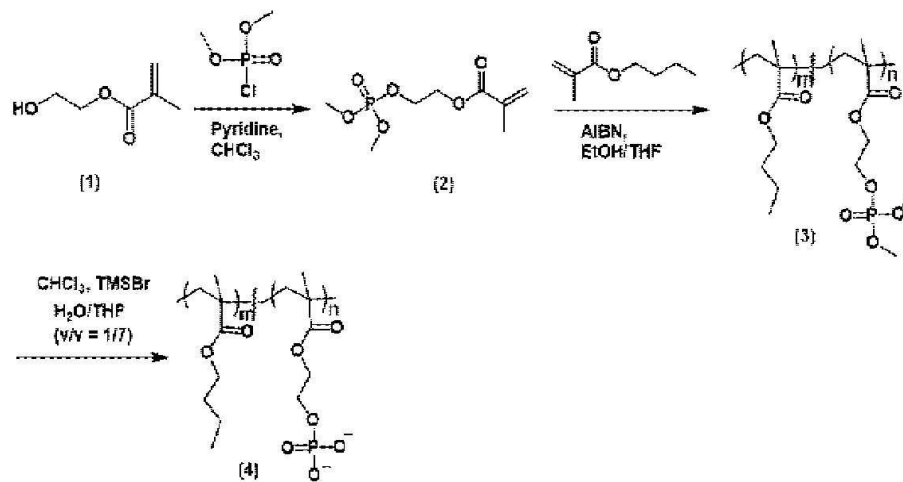
PLGA(poly(lactide-co-glycolide)) 75:25 (평균 Mw 48000 ~ 76000, 카탈로그 번호 769797), 폴리 비닐 알코올(PVA: polyvinyl alcohol) (평균 Mw 13000 ~ 23000, 카탈로그 번호 348406), 2-하이드록시에틸메타크릴레이트(HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate), 피리딘(pyridine), 부틸메타크릴레이트(BMA: butyl methacrylate), 크로로포름(chloroform), 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴)(AIBN: 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile)), 에탄올(ethanol(EtOH)), 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite(HA)), 테트라하이드로푸란(tetrahydrofuran(THF)), 크리스탈바이올렛(crystal violet (CV))은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich (St. Louis, USA))에서 구입하였다. 디메틸크로로포스페이트(Dimethyl chlorophosphate(DCP))는 아크로스-오가닉

(Acros-organics (Geel, Belgium))사에서 구입하였다. 푸라논 C-30(Furanone C-30)은 아디포젠(Adipogen(San Diego, USA))에서 구입하였다. 브로모트리메틸실란(Bromotrimethylsilane(TMSBr))은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 디클로로메탄(Dichloromethane(DCM)), 메탄올(methanol(MeOH)), 아세토니트릴(acetonitrile(ACN))은 삼전(Samchun(Seoul, Korea))에서 구입하였다. 최소필수영양배지(Minimum essential medium MEM))는 Gibco(Waltham, USA)사에서 구입하였다. 돌베코의 인산 완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS))와 소태아혈청(fetal bovine serum (FBS)은 WEIGENE (Gyeongsan, Korea)사에서 구입하였다. 세포카운팅키트-8(Cell counting kit-8 (CCK-8))은 Dojindo (Tokyo, Japan)사에서 구입하였다. 뇌심근침출배지(Brain heart infusion (BHI))는 KisanBio (Seoul, Korea)사에서 구입하였다. S. mutans(ATCC 25175)는 KCTC (Daejeon, Korea)사에서 구입하였다. 박테리아생존력키트(LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit)는 Molecular Probes (ThermoFisher Scientific, MA, USA)사에서 구입하였다. 인서트웰(Insert well)은 SPL Life Sciences (Pocheon, Korea)사에서 구입하였다.

[0113] 제조예 1: PBMP(poly(BMA-co-MOEP))합성

[0114] 하기 반응식 1과 같이 PBMP를 합성하였다.

[0115] [반응식 1]



[0118] 구체적으로, MOEP(methacryloyloxyethyl phosphate)는 이전에 보고된 절차를 사용하였다. DCP(7.0mmol)는 피리딘(7.0mmol)과 혼합하여 얼음상에서 1.7mmol의 HEMA(1)을 함유하는 10ml의 클로로포름에 천천히 첨가하여 제1혼합물을 제조하였다. 제1혼합물을 2시간동안 교반하고 0.01M HCl로 5회 세척하였다. 유기층을 모아 증발시킨 후 디메틸메타크릴로일옥시에틸포스페이트(dimethyl methacryloyloxyethyl phosphate (DMOEP))(2)를 담황색 오일로서 수득하였다.

[0119] 수득한 DMOEP(2.0mmol)(2) 및 BMA(2.0mmol)를 에탄올 및 THF(부피비 8:2)4ml에 용해시키고 AIBN(0.040mmol)을 첨가하여 중합을 개시하였다. 60℃에서 12시간 반응시킨 후 혼합물을 증발시켜 투명한 점착성 오일로서 폴리(BMA-co-DMOEP)(poly(BMA-co-DMOEP)(3)를 수득하였다.

[0120] 폴리(BMA-co-DMOEP)(poly(BMA-co-DMOEP)(3)를 무수클로로포름(40ml)에 용해시킨 후, 용액에 빙냉(ice-cold) TMSBr(8.0mmol)을 천천히 첨가하고 얼음에서 1시간 동안 교반한 다음 주위온도(ambient temperature)에서 추가로 2시간동안 교반하였다.

[0121] 클로로포름을 증발시켜 제거하고, 물과 THF의 혼합물(부피비=1:7) 100ml를 첨가하고, 상온에서 12시간 교반한 후, 혼합물을 증발시키고 탈 이온수에 대한 투석(막 membrane M.W.C.O. = 3,000 g/mol; Spectrum labs, USA)사용)에 의해 정제하였다.

[0122] 정제한 물질을 동결건조한 후, 백색 분말로서 PBMP(poly(BMA-co-MOEP)(4)를 얻었다(수율60% 초과).

- [0124] **제조예 2: furanone C-30을 담지한 PLGA/PBMP입자 제조**
- [0125] PLGA 마이크로입자 5.0%(w/v)의 농도로 DCM에 용해시켰다. 이어서 furanone C-30을 0.50%(w/v)의 농도로 용액에 첨가하여 제3혼합물을 제조하였다. DCM을 증발시키기 위해 제3혼합물을 40℃로 점차 가열하면서 6시간동안 교반하여 furanone C-30을 담지한 PLGA를 형성하고 PLGA/PBMP입자 제조를 위해 PBMP수용액(농도2.0%(w/v))을 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 현탁액을 15분 동안 15,000rpm으로 원심분리(supra 21K, HANIL, KOREA)하였다. 침전된 입자를 탈 이온수 및 초음파 처리(Powersonic 405, Hwashin Tech Co., Korea)하여 15분동안 3회 세척하고 최종적으로 2일 동안 동결건조하여 제조하였다.
- [0127] **제조예 3: 하이드록시아파타이트(HA) 디스크 제조**
- [0128] 하이드록시아파타이트(HA) 분말 (1.0 g)을 흑연 몰드에 넣고 스파크 플라즈마소결시스템(EL Tek, Korea)을 사용하여 진공 하에서 1100℃ 및 560kgf/cm²(55MPa)에서 10분 동안 소결시켰다. 디스크를 주위 온도로 냉각시키고 아세톤으로 세척 하였다. 직경 12mm, 두께 2mm의 HA 디스크를 제작하였다.
- [0130] **제조예 4: HA디스크 상에 입자 코팅**
- [0131] PLGA/PBMP입자를 50mg/mL의 농도로 탈 이온수에 분산시켰다. 상기 제조예 3으로 제조한 HA 디스크를 상온(주위 온도)에서 15분 동안 현탁액에 침지시켰다. 디스크를 탈 이온수로 수회 세척하고 진공하에 12시간 건조시켰다.
- [0133] **실시예 1: PBMP GCP(Gel permeation chromatography) 분석**
- [0134] PBMP의 분자량 분포는 GPC (Superdex200 10/300 GL 컬럼, GE Healthcare, UK)를 사용하여 평가되었다. 인산염 완충 식염수 (PBS; 50 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl)를 이동상으로 사용 하였다. 유속을 0.5 mL / 분으로 설정하고, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 표준으로 사용 하였다.
- [0136] GPC(겔크로마토그래피)분석 결과, PBMP에 대해 Mn이 9,860g/mol이고 Mw가 23,300g/mol이다. 2.36의 다 분산도(PD=Mw/Mn) 값을 자유 라디칼 중합에 대한 전형적인 분자량 분포 범위에 있었다.
- [0138] **실시예 2: PBMP NMR 분석**
- [0139] PLGA 입자와 결합하고 HA 표면에 안정적으로 결합 할 수 있는 폴리머로 PBMP를 설계하고 상기 반응식 1로 제조 하였다. 상기 반응식 1의 (2)MOEP 단량체, (3)폴리(BMA-co-DMOEP) 및 (4)PBMP를 1H-NMR분석 하여 도 10에 나타내었다.
- [0141] 도 10에서 나타난 바와 같이, MOEP 단량체, 폴리(BMA-co-DMOEP) 및 PBMP의 1H-NMR 스펙트럼을 보여준다. 구체적으로, 본 발명자들은 BMA 단량체의 부틸기가 소수성 상호 작용을 통해 PLGA 중합체와 상호 작용할 수 있고 MOEP 단량체의 포스포모노에스테르기는 정전기 상호작용을 통해 HA 표면상의 Ca²⁺ 이온과 상호작용할 수 있는 것을 확인하였다. 합성 체계는 상기 반응식 1 및 도 1에 묘사되어있다. DMOEP가 MOEP보다 더 통제 된 방식으로 중합되는 것을 확인하여 노출 된 포스포모노에스테르 그룹을 갖는 MOEP 대신 단량체로서 DMOEP를 사용하였다. 개시제로서 AIBN을 사용하여 자유 라디칼 중합에 의해 BMA 및 (2)DMOEP단량체를 합성하는 것을 확인하였다.
- [0143] **실시예 3: 전자현미경(FE-SEM) 분석**
- [0144] 상기 제조예 2로 제조한 물질을 미세 입자 형태를 분석하기 위해 전자현미경 촬영하였다.
- [0146] 도 2 에서 나타난 바와 같이, PLGA 입자, PLGA/PBMP 입자 및 furanone C-30을 담지한 PLGA는 구형태의 입자를

나타냄을 확인하였다.

[0148] 실시예 4: X 선 광전자 분광법 (X-ray photoelectron spectroscopy (XPS))분석

[0149] 본 발명의 PLGA 및 PLGA/PBMP입자의 표면 원자 조성은 마이크로-초점화 된 단색 Al X-선 공급원이 장착 된 XPS 기기 (SIGMA PROBE, ThermoFisher Scientific, UK)를 사용하여 분석 하였다. PBMP 코팅의 존재를 확인하기 위해 C_{1s}, O_{1s} 및 P_{2p} 영역을 조사 하였다.

[0151] 도 3에서 나타난 바와 같이, XPS에 의해 PLGA 입자 표면에 PBMP 중합체의 존재를 확인 하였다. PLGA 및 PLGA/PBMP 입자는 각각 286 및 532 eV에서 C_{1s} 및 O_{1s} 피크를 나타냈다. 그러나, 인산기의 특징인 133 eV에서의 P_{2p} 피크는 PLGA/PBMP 입자에서만 관찰되었으며, 이는 PLGA 입자의 최 외층에 PBMP의 존재하여 PLGA 상에 PBMP가 코팅된 것임을 나타낸다.

[0153] 비교예 1: PLGA 입자 및 PLGA/ PBMP 입자 비교

[0154] PLGA입자 및 PLGA/PBMP 입자의 크기, 제타 전위, 약물 담지율 및 캡슐화를 비교하여 PLGA입자 상에 PBMP를 코팅하여 나타내는 효과를 확인하였고, 비교하여 하기 표 1 및 도 2 내지 3에 나타내었다.

[0156] [표 1]

Microparticles	Size [μm] ^a	Zeta potential [mV]	Drug content [%] ^b	Encapsulation efficiency [%] ^b
PLGA	49.4 ± 27.6 (85.7 ± 25.1) ^b	-11.2 ± 2.6 (-14.2 ± 1.5) ^b	3.22 ± 0.11	32.2 ± 1.11
PLGA/PBMP	43.9 ± 28.2 (89.0 ± 33.4) ^b	-26.41 ± 1.11 (-28.2 ± 3.1) ^b	3.07 ± 0.28	30.7 ± 2.77

^aThe values are calculated from more than 250 particles in FE-SEM images.

^bThe values are obtained from microparticles encapsulating furanone C-30.

[0159] 상기 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, PLGA입자는 말단의 카르복실레이트로 인해 약간의 표면 음전하를 나타내지 만, HA 표면에 대한 높은 결합 친화도를 갖지 않는다. 따라서, PLGA 미세 입자 형성 후, PBMP를 첨가하여 PLGA 서방형 입자를 코팅 하였다. 도 2에 코팅되지 않은 PLGA 및 PBMP가 코팅된(PLGA/PBMP)입자 모두 생성되었다. (Size약 40-50 μm; 표 1).

[0160] 코팅되지 않은 PLGA 입자의 제타 전위는 약 -11mV 인 반면, PBMP 코팅된 PLGA/PBMP 입자의 제타 전위는 약 -26mV였다. PLGA/PBMP 입자가 PLGA대비 음의 제타 전위를 띠고, PLGA 입자의 표면상에 PBMP의 성공적인 코팅을 지지 하였다.

[0161] 상기 실시예 4 및 비교예 1은 종합적으로, PBMP가 PLGA의 구형을 변경하지 않고 PLGA 입자의 표면 상에 코팅되어 부착된 것을 나타낸다.

[0163] 실시예 5: HA에 PLGA, PLGA/PBMP입자 접착력 시험

[0164] HA에 PLGA 입자와 PLGA/PBMP입자가 안정적으로 부착되는지를 알아보기 위해 물에 진탕 후 관찰하는 방법으로 접착력을 시험하였다.

[0165] 구체적으로, 15분 동안 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자의 현탁액에 간단한 침지 후 HA디스크상에 입자의 정량화에 의해 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자의 HA 표면에 대한 접착 특성을 평가 한 후, 물에서 진탕하여 세척 하였다.

[0167] 도 4에서 나타난 바와 같이, PLGA/PBMP 입자는 30분의 진탕 후 PSMP가 코팅되지 않은 PLGA 입자(350 ± 43 입자/ mm^2)와 비교하여 HA 표면에서 2배 이상의 입자 밀도(740 ± 56 입자/ mm^2)를 나타냈다(도 4A내지C). 또한, 장기간(60시간) 진탕 후, 491 ± 52 입자/ mm^2 의 밀도에서 PLGA/PBMP 입자와 120 ± 25 입자/ mm^2 에서 PLGA입자의 차이는 훨씬 더 큰 것을 확인했다(그림 4A, D내지E). 도 4는 PLGA입자가 HA 표면에 대한 접착력이 PBMP의 코팅에 의해 명확하게 향상됨을 나타낸다. PBMP에 포함된 인산기는 HA에 포함된 Ca^{2+} 사이의 상호 작용을 강화시키는 데 중요한 역할을 한다. 또한, 입자의 구형은 30분 동안 진탕시킨 후에 유지되었지만, 60시간 후에 약간 팽창하여 붕괴되었다(도 5D내지E). 형태학적 변화는 일반적으로 PLGA 입자의 분해에서도 관찰되므로, 이러한 관찰은 HA에 부착하는 입자인 PLGA 중합체가 수성 환경에서 인큐베이션 동안 PBMP 코팅의 존재 여부에 관계없이 연속적으로 분해됨을 나타내는 것을 확인하였다.

[0169] 실시예 6: PLGA/PBMP입자에 담지된 furanone C-30(푸라논 C-30)양 측정

[0170] 푸라논 C-30이 담지 된 PLGA/PBMP 입자를 1.0mg/mL의 농도로 DMSO에 완전히 용해시켰다. 용액을 0.2 μm 시린지(syringe)필터를 통해 여과하고 C18 컬럼(Eclipse XDB-C18, Agilent, USA; 기공 크기 5 μm , $4.6 \times 250\text{mm}$)이 장착 된 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 시스템에 주입하였다. 유속을 1.0 mL/분으로 설정하고, ACN을 이동상으로 사용하였다. 칼럼 온도는 30℃ 이고, UV-Vis 검출기 (SPD-20A, Shimadzu, Japan)에 의해 285nm에서 흡수를 측정 하였다. 캡슐화 효율 및 약물 함량은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Mass of drug loaded in particles}}{\text{Mass of drug in the preparation solution}} \times 100$$

$$\text{Drug content (\%)} = \frac{\text{Mass of drug loaded in particles}}{\text{Mass of particles}} \times 100$$

[0171]

[0173] 표 1 및 도 5에서 나타난 바와 같이, 대표적인 브롬화 합성 푸라논 화합물인 푸라논 C-30은 N-아실호모세린락톤 또는 luxS 신호를 방해함으로써 박테리아 QS를 효과적으로 억제할 수 있으며, 이는 감염 및 바이오 필름 형성 동안 박테리아 집단 거동을 조정하는데 사용된다. 다른 소수성 약물과 유사하게, 푸라논은 락타이드폴리머계 마이크로 입자 또는 나노 입자로 캡슐화 될 수 있다. 상기 제조에 2와 같이 푸라논 C-30을 캡슐화하는 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자를 준비했다. 도 5의 A 및 B는 각각 푸라논 C-30을 함유하는 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자의 형태를 보여준다. 푸라논 C-30을 포함하지 않은 것 대비($40\text{--}50 \mu\text{m}$; 표 1) 푸라논 C-30의 캡슐화에 의해 입자 크기가 상당히 증가하였다, 푸라논 C-30을 함유하는 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자는 평균 직경이 $85\text{--}90 \mu\text{m}$ 이며, 푸라논 C-30을 포함하지 않은 형태보다 약 2배 더 커진 것을 확인하였다. 그러나, 제타전위는 푸라논 C-30의 캡슐화에 의해 비교적 영향을 받지 않았으나, 약물 함량 및 캡슐화 효율은 표 1에 나타난 바와 같이, PBMP 코팅에 의해 약간의 영향을 받았다. 약간의 차이는 PBMP 코팅이 소수성 약물이 PLGA입자로 내에 캡슐화될 경우 영향을 받을 수 있음을 나타낸다.

[0175] 실시예 7: PLGA/PBMP입자로부터 fruranone C-30의 시험관내 방출 측정

[0176] PLGA/PBMP 입자로부터 푸라논 C-30의 방출을 투석 방법으로 평가 하였다. 푸라논 C-30 1.5mg을 함유하는 입자를 20mL의 PBS에 현탁시켰다. 현탁액을 투석 백 (M.W.C.O= 1,000 g/mol)으로 옮기고 37 ℃에서 1 %의 Triton X-100을 함유하는 80mL의 PBS에서 부드럽게 진탕시켰다. 투석액의 분취량 (1.0mL)을 시간 마다 샘플링하고 1% Triton X-100을 함유하는 새로운 PBS로 교체 하였다. 분취량 중 푸라논 C-30 농도를 HPLC로 측정하고 방출 된 누적량을 결정하는데 사용 하였다.

[0178] 도 5에 나타난 바와 같이, PLGA 입자의 팽윤 및 PLGA 중합체의 분해는 입자로부터 캡슐화 된 약물의 방출을 유도한다. 도 5의 C는 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자로부터의 시험 관내 푸라는 C-30방출의 동역학적 프로파일을 비교한 그래프이다. PBMP 코팅은 약물 방출에 영향을 거의 미치지 않는 것을 확인하였다. 두 입자 샘플 모두 4 시간 내에 캡슐화 된 푸라는 C-30이 11% 내지 13%를 방출 하였다. 푸라는 C-30의 누적방출은 19시간 후에 점차적으로 30%까지 증가 하였다. 이 초기 방출 단계 후, 푸라는 C-30은 14일 동안 지속적으로 느린 속도로 조금씩 방출 하였다. 7일이 되어서 약 90%까지 방출하였다. 이러한 결과는 PLGA/PBMP 입자가 이들이 부착된 HA 표면 주위에서 장기간 동안 고농도의 푸라는 C-30을 유지할 수 있는 효과를 제공하는 것을 나타낸다.

[0179] 즉, PLGA/PBMP입자에 담지된 약물은 서방형으로 방출하는 것을 확인하였다 시간별로 약물을 지속적으로 일정하게 방출하므로 오랜기간 걸쳐 지속적으로 치료할 수 있는 효과를 확인하였다.

[0181] 실시예 8: DSC(Differential Scanning Calorimeter)분석

[0182] PLGA/PBMP입자의 열 특성은 DSC(Discovery DSC, TA Instruments, USA)에 의해 조사되었다. PLGA 파우더, PLGA 및 PLGA/PBMP입자 각 샘플 5.0mg을 10℃/분의 가열 속도로 0℃에서 100℃로 가열 하였다.

[0184] 도 11에 나타난 바와 같이, PLGA 파우더, PLGA 및 PLGA/PBMP입자의 열특성이 모두 49℃로 유사한 유리전이온도를 가지는 것으로 보아 PBMP는 PLGA입자의 구형을 변경하지 않고 코팅될 수 있으며, 이후 약물 방출 프로파일에 어떠한 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[0186] 실시예 9: 박테리아성장 억제 확인 시험

[0187] 치아에 생길 수 있는 충치균 스트렙토코커스 뮤탄스(streptococcus mutans: S.뮤탄스)를 배양하여 치아와 유사한 HA디스크에 부착시키고 충치억제물질 furanone C-30을 담지한 PLGA/PBMP입자를 코팅하여 충치균 성장 억제를 분석하였다.

[0188] 구체적으로, S.뮤탄스를 1% 슈크로스(sucrose)가 보충 된 BHI 배지에서 배양 하였다. PLGA/PBMP입자로 코팅되지 않은 HA 디스크 샘플을 박테리아 배양 전에 30분 동안 24-웰플레이트에서 BHI 배지(1.0 mL)에 침지시켰다. 600 nm에서 광학밀도(OD)가 0.05인 S.뮤탄스를 함유하는 1.0mL의 BHI 배지와 배지를 교환 하였다. HA 디스크를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 S.뮤탄스의 표면에 1차 부착을 촉진시켰다. 이어서, S.뮤탄스 함유한 HA 디스크를 3.0mL의 새로운 BHI 배지로 채워진 새로운 6-웰(삽입 판의 하부 웰)의 바닥으로 옮겼다. 각각의 PLGA/PBMP입자로 코팅된 HA 디스크를 함유하는 인서트 웰을 S.뮤탄스-부착된 디스크를 함유하는 하부 웰 위에 장착 하였다. 상부 삽입물은 3.0mL의 새로운 BHI 배지로 채워졌다. 인큐베이션하는 동안, 하부 웰의 S.뮤탄스는 상부 인서트 웰의 PLGA/PBMP입자로부터 방출 된 푸라논 C-30과 접촉 하였다.

[0189] 각 웰의 OD를 측정하여 박테리아 성장을 추정 하였다. 최종 OD 측정 후, 배지를 제거하고 코팅되지 않은 디스크를 탈 이온수로 2회 세척 하였다. 부착된 박테리아(S.뮤탄스)를 건조오븐에서 60℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 디스크 표면에 고정시키고, 디스크를 탈 이온수 중의 CV 용액(1.0mg/mL)으로 20분 동안 염색 하였다. 염색된 디스크를 탈 이온수로 3회 세척하고, 남은 CV를 물에 33% 아세트산 용액에 용해시키고, 마이크로플레이트리더(Versamax, Molecular devices, USA)를 사용하여 600nm에서 흡광도를 측정 하였다.

[0191] 도 6 에서 나타난 바와 같이, PLGA/PBMP 입자가 코팅된 HA 디스크를 함유하는 상부 웰 플레이트와 아무것도 코팅되지 않은 HA 디스크상의 S.뮤탄스를 함유하는 하부 웰 사이에 막을 사용하여 S.뮤탄스로부터 입자를 분리 하였다 (도 6A). 상부 웰 플레이트는 HA 디스크상에 입자가 코팅되어 있고 이로부터 방출된 푸라는 C-30은 막을 통해 하부 웰로 확산될 수 있으며, 하부 웰의 HA디스크는 상에는 S.뮤탄스의 성장, 접촉 및 생물막 형성에 대한 억제 효과를 생성할 수 있다. 코팅되지 않은 HA 디스크에서 S.뮤탄스의 성장은 6시간의 배양 후 거의 포화되었다(도 6B). 푸라는 C-30은 최대 18시간 동안 현탁액에서 박테리아 성장을 거의 완전히 억제했지만, 이후 증식이 폭발하여 20 시간에 포화에 도달 하였다. 이는 푸라는 C-30의 불안정한 불포화 락톤 구조 및 박테리아 배양에서 효과가 미달한 수준으로 분해되기 때문일 수 있다. 대조적으로, PLGA 및 PLGA/PBMP 입자에 캡슐화된 푸라는 C-

30으로 처리된 박테리아는 푸라는 C-30의 느린 방출로 인해 푸라는 C-30처리된 그룹보다 약간 더 빠르지만 12시간까지 천천히 성장 하였다. 입자로부터 푸라는 C-30과 달리, PLGA 및 PLGA/PBMP 입자는 18시간 후에도 S.뮤탄스의 성장에 현저한 억제 효과를 나타냈다. PLGA 및 PLGA/PBMP 입자의 경우 각각 48시간 및 84시간 동안 효과를 유지 하였다. 코팅되지 않은 PLGA 입자에 비해 PLGA/PBMP 입자의 높은 접착도는 푸라는 C-30의 농도를 유효 농도 이상으로 장기간 유지하는 것을 확인하였다.

[0192] 도 7에 나타난 바와 같이, 어느 입자라도 코팅되지 않은 HA디스크(Uncoated) 및 free 푸라는 C-30이 코팅된 HA디스크는 바이오필름 형성 억제에 어떠한 영향을 미치지 않는다는 것을 CV 염색을 이용하여 O.D값(A) 및 HA디스크 표면에 존재하는 박테리아 수 (B)를 표기하였다.

[0193] 반면, PLGA로 코팅된 HA디스크 및 PLGA/PBMP로 코팅된 HA디스크는 18시간 일 때 모두 바이오필름 형성 억제를 보여 디스크 모두 바이오 필름 형성 억제 정도가 비슷하다는 것을 확인하였다.

[0194] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, 60시간에 PLGA 대비 PLGA/PBMP가 PBMP로 코팅되어 HA디스크에 더 잘 부착되어 있고, 지속적인 약물 방출에 따른 바이오 필름 형성을 지속적으로 억제함으로써 충치균 S.뮤탄스의 성장을 더욱 저해하는 것을 확인하였다.

[0195] 즉, PLGA/PBMP입자는 충치억제물질 furanone C-30를 지속적으로 방출하여 충치균 S.뮤탄스를 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 입자는 치아 및 뼈와 같은 하이드록시아파타이트 관련조직 주변에 생리활성억제물질을 담지한 입자를 안정적으로 부착시키고 생리활성억제물질을 지속적으로 방출하여 부작용 없이 효과적으로 생리활성을 억제하는 효과를 확인하였다.

[0197] 실시예 10: 박테리아 생존 시험

[0198] 상기 실시예 9에서와 같이, HA 디스크 샘플을 S.뮤탄스를 함유하는 BHI 배지에서 인큐베이션 한 것을 사용하여 박테리아(S.뮤탄스) 생존력을 확인하였다.

[0199] 구체적으로, LIVE/DEAD 박테리아 생존력 키트를 사용하여 디스크를 수집하고 염색 하였다. 박테리아 필름을 공초점 레이저스캐닝현미경(CLSM; SP8 X, Leica, Germany)으로 검사 하였다. 형광 이미지는 440nm의 파장 및 561nm의 파장을 방출하여 얻어졌으며, 이는 살아있는 박테리아는 녹색 형광으로, 죽은 박테리아의 적색 형광으로 나타낸다. 생물막 형성 또한 FE-SEM에 의해 조사되었다. 이 경우, 디스크를 상온에서 2시간 동안 Karnovsky고정 용액으로 고정시키고, 탈 이온수로 세척하고, 에탄올(30% 내지 100%)로 탈수시켰다. 건조 된 디스크를 백금으로 스퍼터 코팅(sputter-coated) 하였다.

[0201] 도 8, 도 9 및 도 12 에 나타난 바와 같이, 도 8의 A 및 B는 아무처리 하지 않은 HA디스크와 푸라는 C-30(500 μM)만 처리된 HA디스크 표면에서 18시간동안 인큐베이션 된 S.뮤탄스 바이오필름을 측정한 형광 이미지를 나타내고 C 및 D는 푸라는 C-30이 담지된 PLGA와 PLGA/PBMP 입자를 처리한 HA디스크 표면을 동일한 상태에서 측정한 형광이미지를 나타낸다. 초기 6시간일 경우 푸라는 C-30만 처리된 HA디스크에서는 효과적으로 바이오 필름 형성이 억제된 것을 도 12에서 확인할 수 있었으나, 18시간일 경우 S.뮤탄스가 매우 많이 존재함을 알 수 있다. 이에 반해 PLGA와 PLGA/PBMP가 처리된HA 디스크는 18시간이 지났어도 바이오필름 형성을 강하게 억제하고 있음을 확인하였다. 특히 도 9에서는 60시간 까지 HA디스크 표면에 존재하는 S.뮤탄스의 바이오 필름이 지속적으로 억제하고 있음을 알 수 있다.

[0202] 따라서, PLGA/PBMP입자는 충치억제물질 furanone C-30를 지속적으로 방출하여 충치균 S.뮤탄스를 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 입자는 치아 및 뼈와 같은 하이드록시아파타이트 관련조직 주변에 생리활성억제물질을 담지한 입자를 안정적으로 부착시키고 생리활성억제물질을 지속적으로 방출하여 부작용 없이 효과적으로 생리활성을 억제하는 효과를 확인하였다.

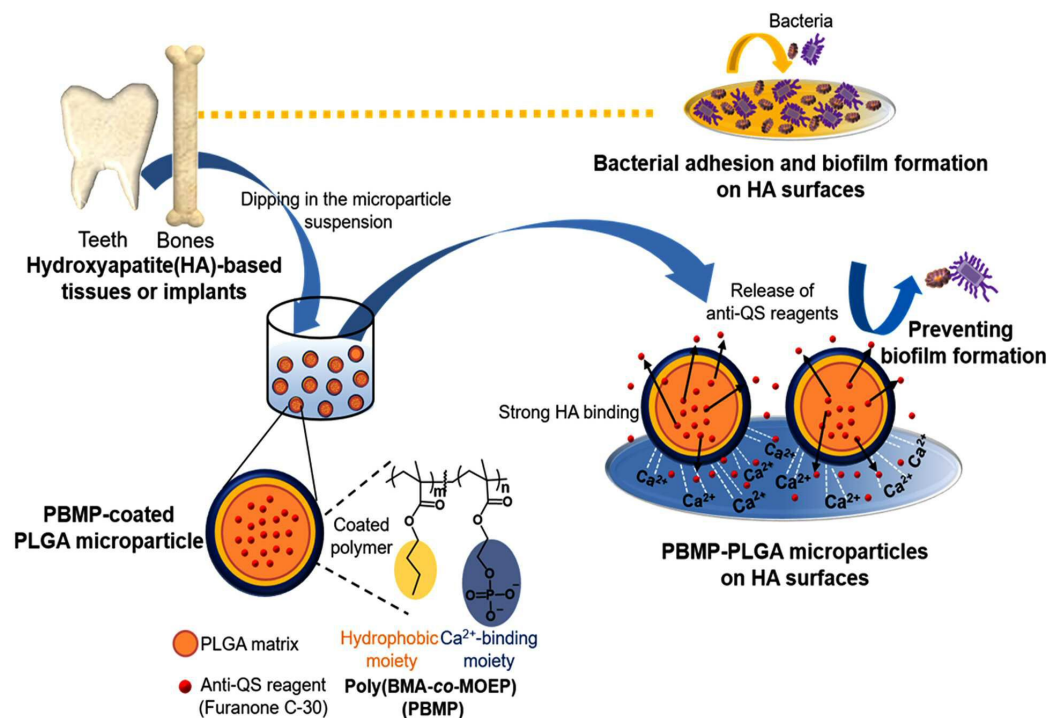
[0204] 실시예 11: PLGA/PBMP 입자에 대한 골아세포대한 독성 확인

[0205] PLGA 입자는 높은 생체 적합성으로 널리 받아 들여지지만, PLGA/PBMP 입자의 골아세포(MC3T3-E1세포)에 대한 세포독성의 가능성을 조사 하였다.

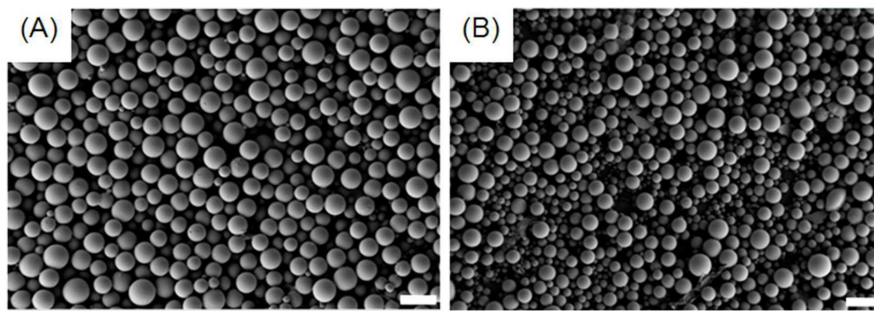
- [0206] 구체적으로, 골아세포주 Preosteoblast(MC3T3-E1)세포를 37℃에서 10% FBS가 보충 된 MEM 및 CO₂(5% 농도)대기에서 배양 하였다. 세포를 1×10⁵ 세포/웰의 밀도로 24-웰 플레이트에서 PLGA 및 PLGA/PBMP입자가 코팅된 각 HA 디스크 샘플 상에 시딩 하였다. 24시간 인큐베이션 후, 배지를 제거하고, 디스크를 DPBS로 2회 세척 하였다. CCK-8 (Cell Counting Kit-8)용액을 각 디스크에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양 하였다. 450nm에서 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 용액의 흡광도를 측정 하였다.
- [0208] 도 13에 나타난 바와 같이, HA디스크 흡광도 측정 결과 PLGA 및 PLGA/PBMP 입자 모두 1,000 μg/mL의 농도까지 유의 하여 세포 독성을 관찰되지 않았다. 이 결과는 PLGA/PBMP 입자의 뼈 관련 조직 및 임플란트에 대해 생의학 적 응용 가능한 것을 뒷받침 하였다.
- [0210] 본 발명의 제조예, 실시예 및 비교예를 종합하면, 서방형으로 물질을 방출하는 PLGA입자를 PBMP로 코팅한 복합체가 뼈 관련 조직에서 세포독성 없이 안정하게 부착되며 지속적인 약물 방출로 박테리아억제 및 생리활성에 용이한 약물전달시스템을 제공하는 것을 확인할 수 있다.
- [0212] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

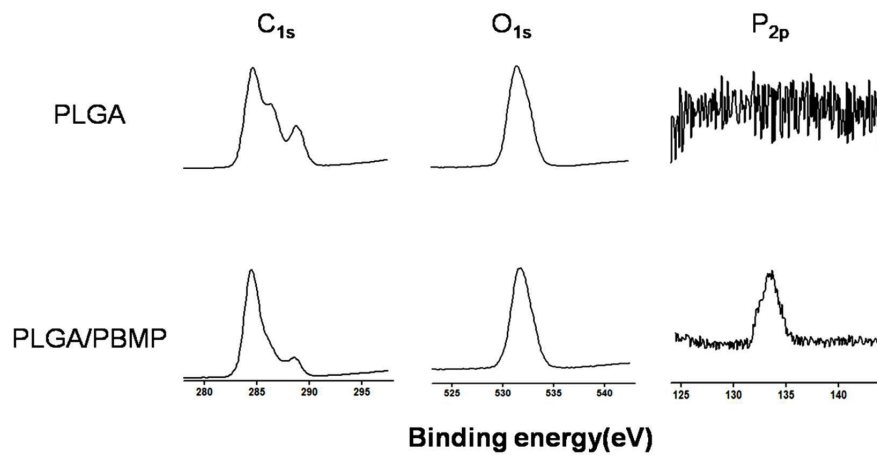
도면1



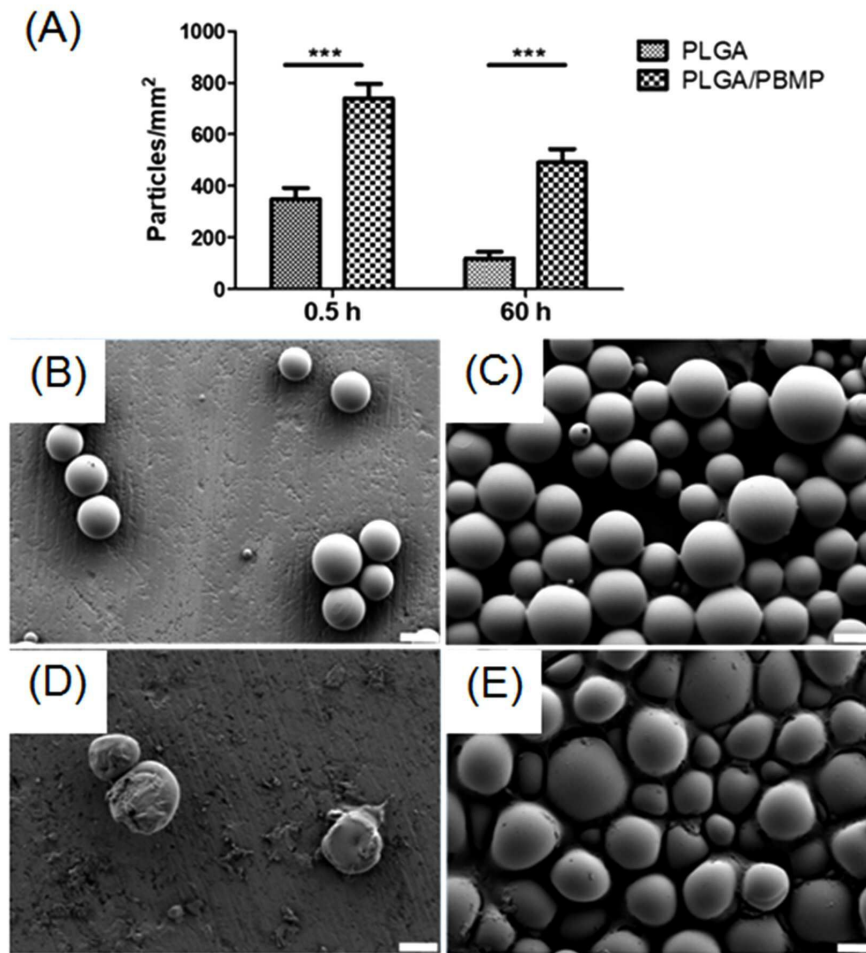
도면2



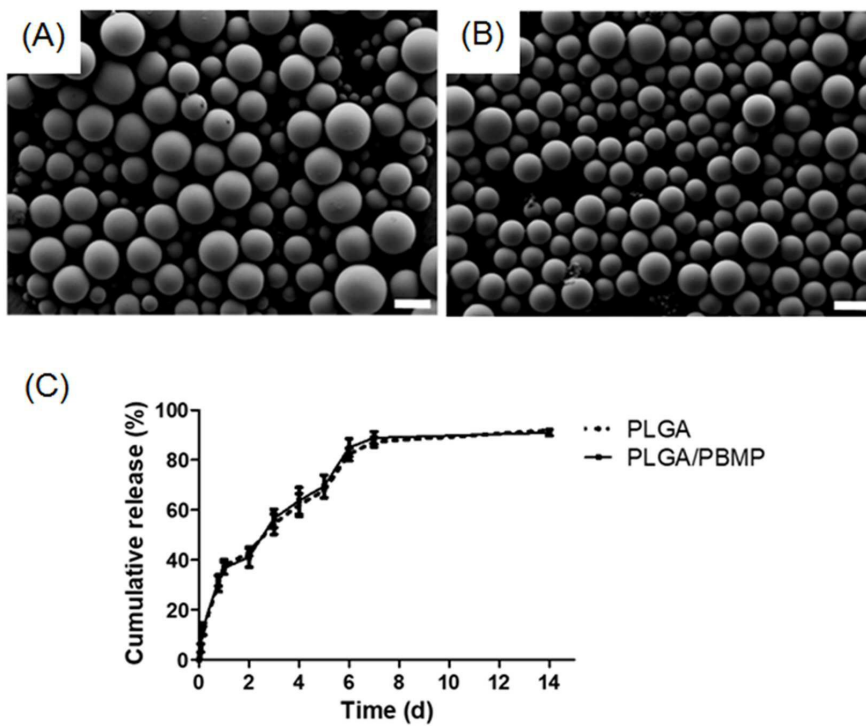
도면3



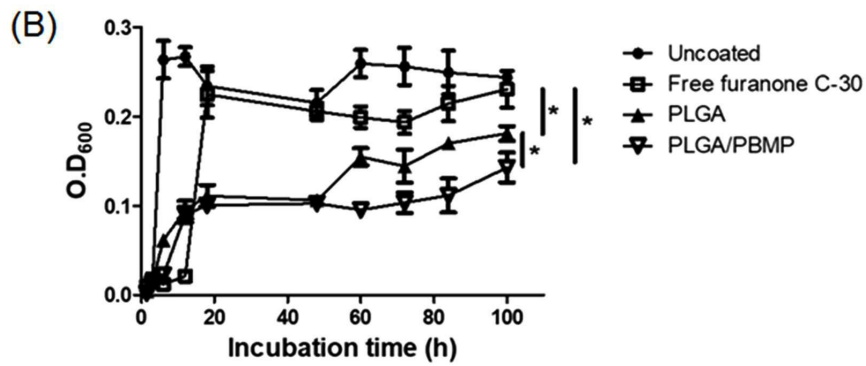
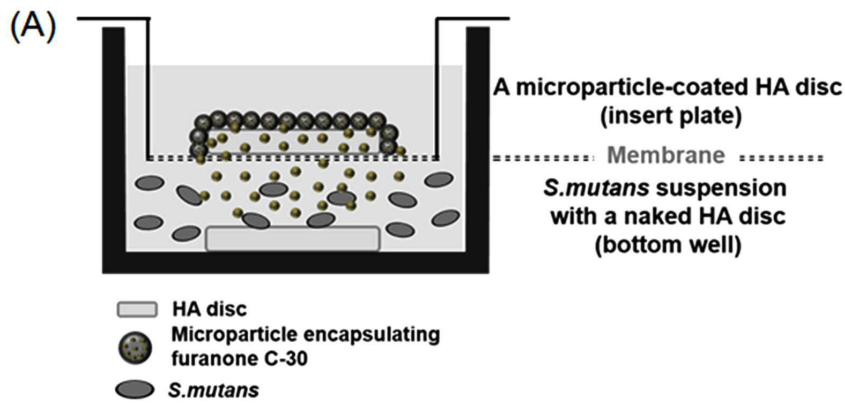
도면4



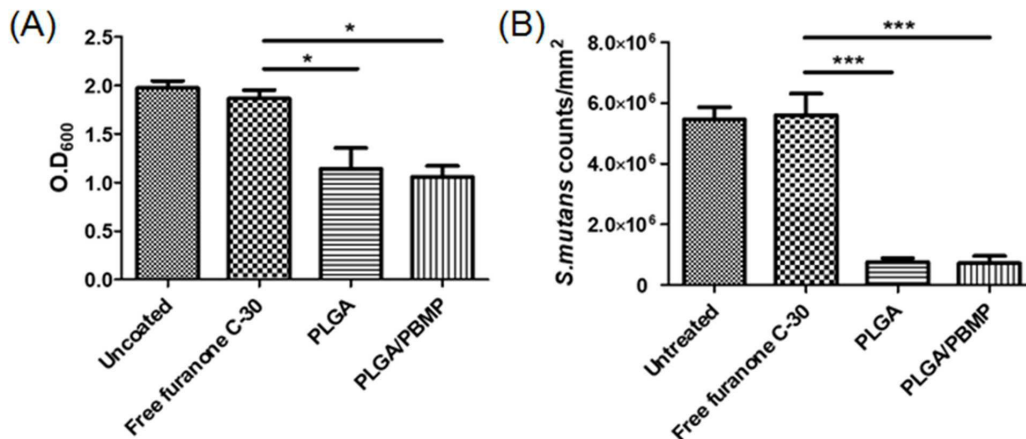
도면5



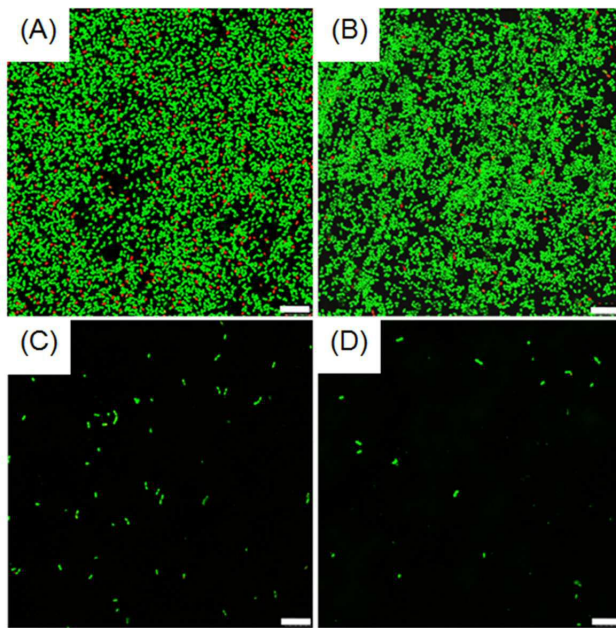
도면6



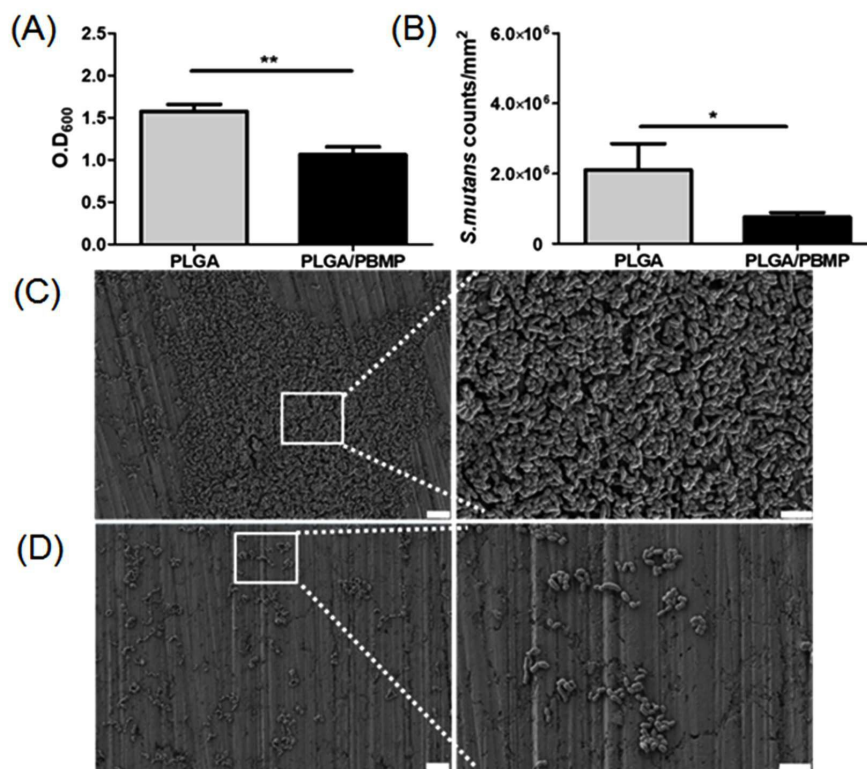
도면7



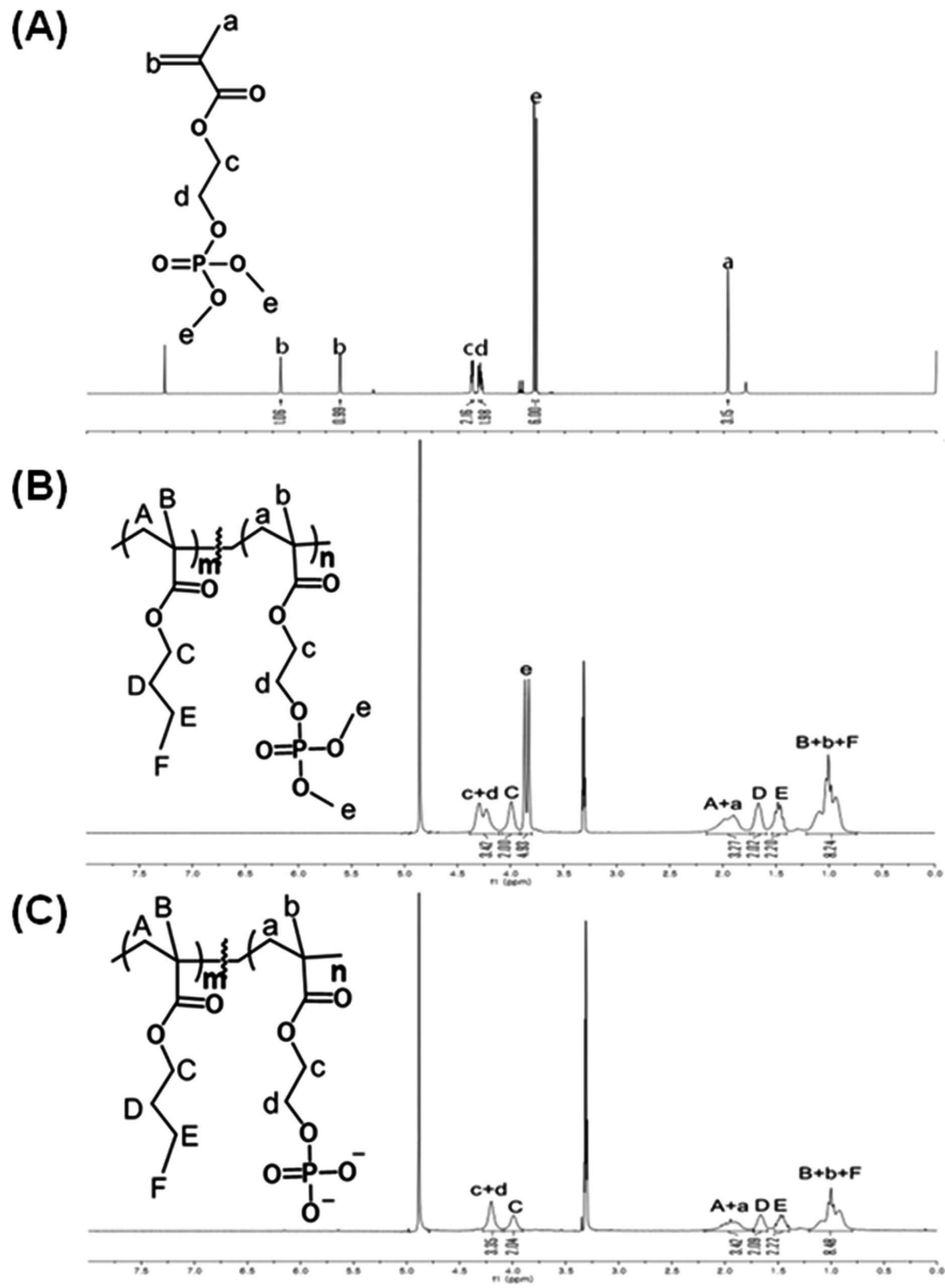
도면8



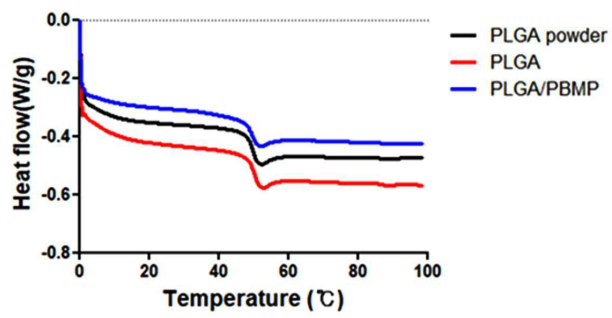
도면9



도면10

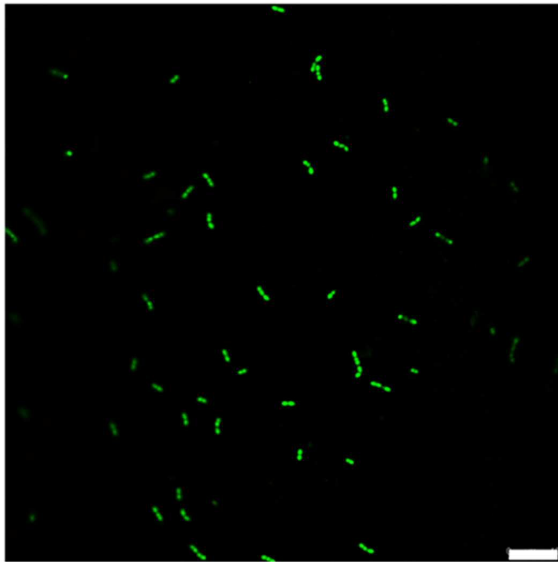


도면11



Samples	$T_g(^{\circ}\text{C})$
PLGA powder	49.396
PLGA	49.775
PLGA/PBMP	49.307

도면12



도면13

