



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월04일
(11) 등록번호 10-1314995
(24) 등록일자 2013년09월27일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/01* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 1/02* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7016671
- (22) 출원일자(국제) 2009년12월21일
심사청구일자 2011년09월21일
- (85) 번역문제출일자 2011년07월18일
- (65) 공개번호 10-2011-0111412
- (43) 공개일자 2011년10월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2009/071231
- (87) 국제공개번호 WO 2010/071217
국제공개일자 2010년06월24일
- (30) 우선권주장
JP-P-2008-324524 2008년12월19일 일본(JP)
JP-P-2009-208631 2009년09월09일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2001327591 A*
Infect. Immun. 67(9): 4917-4920 (1999. 9.)
J. Oral. Tissue Engin. 6(1): 24-32 (2008)
JP2005289852 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
후쿠시마 다다오
일본 후쿠오카케 후쿠오카시 조난구 히가시아부라
야마 4쵸메 7방 2고 1126고시츠
가부시키가이샤 마루하 니치로 쇼쿠히
일본국 도쿄도 코토구 토요스 3초메 2반 20고
- (72) 발명자
후쿠시마 다다오
일본 후쿠오카케 후쿠오카시 조난구 히가시아부라
야마 4쵸메 7방 2고 1126고시츠
하야카와 도루
일본 도쿄도 고토구 도요쵸 2쵸메 2방 10고 208
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 항치주병균제 및 그것을 사용한 의료용 또는 치과용 재료

(57) 요약

프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물 중 적어도 1 종을, 혹은 프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물 중 적어도 1 종과 아니온성 고분자의 복합체를 유효 성분으로서 의료용 또는 치과용 재료를 조제함으로써, 부작용의 걱정이 없고 안전성이 높은 항치주병균제, 그리고 치주병원균의 항균 활성을 나타내는 것에 더하여, 물에 불용이며 양호한 부형성을 갖는 의료용 또는 치과용 재료를 제공할 수 있다.

(72) 발명자

오카하타 요시오

일본 가나가와肯 가와사키시 아사오쿠 니지가오카
1쵸메 2방 11고

미타라이 마코토

일본 이바라키肯 츠쿠바시 와다이 16-2 가부시끼가
이샤 마루하 니치로 홀딩스 쥬오겐큐쇼 나이

이오하라 게이시

일본 이바라키肯 츠쿠바시 와다이 16-2 가부시끼가
이샤 마루하 니치로 홀딩스 쥬오겐큐쇼 나이

에나리 히로유키

일본 이바라키Ken 츠쿠바시 와다이 16-2 가부시끼가
이샤 마루하 니치로 홀딩스 쥬오겐큐쇼 나이

세키도 하루치카

일본 이바라키Ken 츠쿠바시 와다이 16-2 가부시끼가
이샤 마루하 니치로 홀딩스 쥬오겐큐쇼 나이

특허청구의 범위

청구항 1

프로타민, 프로타민의 약학적으로 허용되는 염 및 프로타민의 가수 분해물 중 적어도 1 종과 DNA 가 정전결합(靜電結合)된 복합체를 함유하고, 물에 불용이며 부형성을 갖고, 또한 골 형성 유도 또는 촉진 작용을 갖는 것을 특징으로 하는 골 형성용의 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 복합체가 인산칼슘과 혼합되는 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

골 형성 인자 또는 성장 인자를 담지시킨 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

골 형성 인자 또는 성장 인자를 담지시킨 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 복합체가 항균성을 갖는 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

골 결손부에 대한 충전을 가능하게 하는 부형성을 갖고, 골 형성의 유도 혹은 촉진을 목적으로 한 골보충재인 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

원하는 형상으로 고정시킬 수 있고, 치주 조직 재생 요법에 있어서의 조직 재생 유도막 혹은 골 형성 유도재료인 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 프로타민의 가수 분해물이 단백질 분해 효소에 의한 프로타민의 가수 분해물인 의료용 또는 치과용 재료.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

명세서

기 술 분 야

- [0001] 본 발명은 치주병원균에 대해 생육 저해 활성을 나타내는 프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물을 함유하는 항치주병균제, 그리고 이들과 아니온성 고분자로 형성된 복합체를 함유하는 항치주병균제 및 의료용 또는 치과용 재료에 관한 것이다.
- 배 경 기 술**
- [0002] 치주병은, 복수의 치주병원균의 관여에 더하여, 숙주의 요인이나 흡연 등의 생활 습관이 원인이 되어 발증하며, 일본 내의 성인의 약 80 % 가 병에 걸려있다고 한다. 치주병은 이의 지지 기능을 저하시켜, 이의 상실에 수반하는 저작 (詛嚼) 기능 장애에 의한 생활의 질 (QOL) 의 저하를 일으킬 뿐만 아니라, 심순환계 질환 (심내막 염, 관상동맥성 심질환)이나 폐렴, 조산·저체중아 출산 등의 전신 질환의 리스크 팩터가 된다는 것이 보고되어 있다. 따라서, 고령화가 진행되는 일본 등이 많은 나라의 국민의 QOL 의 향상뿐만 아니라, 그 밖에 임상 분야에 있어서도 치주병의 예방과 치료가 하는 역할은 매우 크다.
- [0003] 치주병의 직접적인 원인은 치주병원균 그 자체, 혹은 병원균이 산생되는 프로테아제로, 이들에 의해 치은염이 일어나고, 더욱 진행되면 치주 조직에까지 염증이 확산되어 치주염이 된다. 치주병원균은 그 대부분이 그램 음성 편성혐기성세균으로서, 대표적인 병원균으로는, 포르피로모나스 진지발리스나 트레포네마 텐티콜라, 타네 렐라 포시텐시스, 프리보텔라 인터미디어, 어그리케이티벡터 액티노미세텀코미탄스 등이 있다.
- [0004] 현재, 이들 치주병원균에 대한 항균제로서 β 락탐계, 매크로라이드계, 퀴놀론계 항균제가 사용되고 있지만 그 항균력에는 각각 특징이 있기 때문에, 병원균의 종류나 치주병의 진행 정도에 따라, 항균제를 선택 혹은 병용할 필요가 있고, 한편으로 투여량, 투여 횟수가 증가된 경우에는 부작용의 문제가 발생하는 경우가 있다. 이 때문에, 실제로 치주염 치료의 주체가 되고 있는 것은, 플라크나 치석, 치근 표면의 내독소 등의 기계적 제거나 외과적인 염증성 조직의 절제 등이며, 항균제의 투여는 치주염 급성 발작시를 제외하고 보조적인 치료로서 밖에 사용되고 있지 않다.
- [0005] 이러한 배경 하에서, 어류의 정소 (어백)로부터 얻어지는 염기성 단백질인 프로타민이, 진지발리스균이 산생되는 프로테아제인 아르진지페인의 저해 활성을 나타내는 것이 보고되어 있다 (Kotani M 외 5 명 「Inhibitory effects of protamines on proteolytic and adhesive activities of Porphyromonas gingivalis.」, Infection Immunity, 1999년, 제67권, 제9호, p.4917-4920 참조). 또한, 프로타민 또는 그 유도체와 트라넥삼산 및/또는 엡실론아미노카프로산을 함유시킴으로써, 치주병원균에 의한 치주염증을 효과적으로 억제할 수 있는 것이 개시되어 있다 (일본 공개특허공보 2007-169201호 참조). 이들 프로타민은 일반적으로 식품 보준료로서 사용되고 있고, 안전성이 높은 점에서 종래의 살균제, 항생제를 대신하는 약제로서 유망하다.
- [0006] 한편, 프로타민은 우측 원인균인 스트렙토코커스 뮤탄스에 대한 생육 억제 효과 (일본 공개특허공보 평11-228526호 참조)나, 구강 내 세균의 부착 억제 효과 (일본 공개특허공보 2001-89436호 참조)를 나타내는 것이 개시되어 있다. 또, 본 출원인들은 프로타민의 가수 분해물을 구강 칸디다증을 일으키는 칸디다속 등의 진균에 대해 항진균 활성을 나타내는 것을 알아냈다 (일본 공개특허공보 2008-133253호 참조).
- [0007] 이와 같이, 프로타민 또는 그 유도체는 항균 작용을 나타낼 뿐만 아니라, 치주병의 염증 억제 작용도 나타내는 것이 알려져 있지만, 지금까지 치주병원균 그 자체에 대한 생육 저해 작용은 알려져 있지 않다. 또, 프로타민은 수용성이기 때문에, 구강 내에서 치주병원균에 대한 생육 저해 작용을 장시간 유지하는 것은 곤란한 것으로 생각되고 있었다.
- [0008] 한편, 프로타민은 폴리카티온의 일종이기 때문에, 아니온성 고분자와 정전적으로 결합을 발생시켜, 물에 불용성인 복합체를 형성하는 것이 알려져 있다.
- [0009] 프로타민과 동일하게 어류의 정소로부터 얻어지는 DNA 는 DNA 분자 내에 아니온성의 결합 요소가 되는 인산기를 다수 갖고 있고, 카티온성 물질에 대해 정전적인 친화성을 나타내기 때문에, 이들 카티온성 물질과 정전적인 반응물을 형성시킬 수 있다. 본래, DNA 분자는 부형성이 부족하고, 수용성이기 때문에 생체 내에서의 대사 확산 속도의 조정에 난점이 있었지만, DNA 분자와 카티온성 인공 지질을 정전적으로 결합시킴으로써, 수불용성, 자기 지지성의 투명 필름을 조제할 수 있는 것이 개시되어 있다 (일본 공개특허공보 평8-239398호 참조).
- [0010] 또, 이 공보에 개시되어 있는 DNA/지질 복합체 필름은 생체 고분자인 DNA 분자가 규칙적인 이중 나선 구조를 유지하고 있어, 이중 나선 구조의 DNA 염기의 간극에 여러 가지의 저분자 화합물을 인터칼레이트시키는 것이나,

DNA 가 갖는 2 개의 흄 (주흡, 부흡) 에 동일한 저분자 화합물을 그루브 바인딩시킬 수 있고, 여기에 약효 성분을 인터칼레이트 및/또는 그루브 바인딩시키는 것에 의한 의료용 재료의 제조 방법이 발명되어 있다 (일본 공개 특허공보 2001-327591호 참조).

[0011] 본 출원인들은 이미 의료용 및/또는 치과용 재료로서 이용되고 있는 키토산이 카티온성 물질인 것에 주목하여, DNA 분자와 키토산의 복합체가 DNA 특유의 이중 나선 구조를 유지하며, 또한 물에 불용성이고, 생체 친화성, 항균성, 및 양호한 부형성을 갖는 것을 발견하였다 (일본 공개특허공보 2005-289852호 참조). 또, DNA/키토산 복합체를 인산 완충액 중에 혼탁시킴으로써, 용이하게 실 형상, 볼 형상, 디스크 형상으로 성형 (成型) 하는 방법 (일본 공개특허공보 2007-97884호 참조), 가열하에서 가압 성형하는 것에 의한 필름의 제조 방법 (일본 공개 특허공보 2008-110952호 참조) 을 발견하였다. 이들 DNA/키토산 복합체와 그 성형물은 우수한 생체 적합성과 생체 안정성을 갖기 때문에, 의료용 및/또는 치과용 재료로서 유망하였다.

[0012] 그러나, DNA/키토산 복합체는 래트 피하에 매입한 결과, 매입 초기에 급성 염증 반응으로 보이는 호중구의 발생이 확인된 것, 살균제나 항생제로서의 효과가 충분하지 않은 것 등의 문제를 갖고 있었다. 이 때문에, 키토산보다 우수한 생체 적합성과 항균 작용을 나타내는 카티온성 물질과의 복합체가 요망되고 있었다. 특히, 치과 영역에서는 치주병균에 대한 항균 활성을 갖는 소재의 개발이 요망되고 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기 서술한 종래 기술을 감안하여 이루어진 것으로서, 본 발명의 제 1 목적은 부작용의 걱정이 없고 안전성이 높은 항치주병균제를 제공하는 것이고, 본 발명의 제 2 목적은 치주병원균의 항균 활성을 나타내는 것에 더하여, 물에 불용이고 양호한 부형성을 가지며, 또한 높은 생체 적합성을 갖는 치과용 재료 및/또는 의료용 재료를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에 있어서의 제 1 발명 (이하, 제 1 발명이라고 기재한다) 에서는, 본 발명자들이 예의 연구를 거듭한 결과, 프로타민 또는 그 유도체나 가수 분해물이 치주병균에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 알아냈다. 프로타민은 이미 식품 보존료로서 이용되고 있는 실적이 있으며, 인체에 대한 안전성이 높은 것이 알려져 있는 점에서, 종래의 살균제, 항생제를 대신하는 소재로서 치주병의 예방 및 치료에 유효하다는 것을 지견하였다.

[0015] 본 발명에 있어서의 제 2 발명 (이하, 제 2 발명이라고 기재한다) 에서는, 프로타민 또는 그 유도체나 가수 분해물과 아니온성 고분자의 복합체가 치주병균에 대해 항균 활성을 나타내는 것에 더하여, 물에 불용이며 부형성이 우수한 것을 알아내어, 이들 복합체가 구강 내에서 장기간에 걸친 효과적인 치주병의 예방 및 치료에 유효하다는 것을 지견하여 제 2 발명에 이르렀다.

[0016] 본 발명에 있어서의 제 3 발명 (이하, 제 3 발명이라고 기재한다) 에서는, 제 2 발명에 있어서의 아니온성 고분자로서 DNA 에 주목하여, 종래의 DNA 화합물에서는 이를 수 없었던 항균 작용과, 높은 생체 적합성을 나타내는 것을 알아내어, 치과용 재료 및/또는 의료용 재료로서 유망하다는 것을 지견하였다.

[0017] 즉, 본 발명의 제 1 발명인 항치주병균제는 프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물 중 적어도 1 종을 유효 성분으로서 함유하고, 치주병원균에 대해 생육 저해 작용을 나타내는 항치주병균제이다.

[0018] 본 발명의 제 2 발명인 항치주병균제는 프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물 중 적어도 1 종의 유효 성분과, 아니온성 고분자가 정전적으로 결합된 복합체를 함유하고, 물에 불용이며 또한 부형성을 갖고, 치주병원균에 대해 생육 저해 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 항치주병균제이다.

[0019] 본 발명의 제 3 발명인 의료용 또는 치과용 재료는 프로타민, 또는 그 유도체, 가수 분해물 중 적어도 1 종의 유효 성분과, 아니온성 고분자가 정전적으로 결합된 복합체를 함유하고, 물에 불용이며 또한 부형성을 갖고, 치주병원균에 대해 생육 저해 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 의료용 또는 치과용 재료이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 의하면, 구강 내의 치주병원균의 생육을 직접 저해하며, 또한 인체에 대한 안전성이 높은 점에서, 치주병의 예방, 치료제로서 유효한 항치주병균제를 제공할 수 있다. 또, 아니온성 고분자와의 화합물은 수불

용성이며 우수한 부형성을 갖는 점에서, 구강 내에서의 장기간에 걸쳐 치주병원균의 생육을 효과적으로 저해하는 것이다.

[0021] 본 발명에 관련된 복합체 중에서, 프로타민/DNA 복합체는 생체 적합성 및 생체 내에서의 안정성이 우수한 데다가 특히 부형성이 우수하기 때문에, 치주 조직 재생 유도 (GTR) 막으로서, 골 재생 유도 (GBR) 법으로서, 항균 성 의치 도포제로서, 그 밖에 구강내용 항균제, 지혈제, 각종 위생 용품 등으로서의 이용이 가능하다. 나아가서는, 프로타민/DNA 복합체가 저분자 화합물을 인터칼레이션 혹은 그루브 바인딩할 수 있기 때문에, 성장 인자 (b-FGF, BMP 등) 나 항생 물질 등의 약물을 유지하며, 환부 등 필요한 지점에 송달하여 공급할 수 있는 송달 시스템 (DDS) 용 멤브레인, 필름, 라인닝재 또는 코팅재로서 이용할 수 있다. 또, 치과용 재료에 그치지 않고, 재생 의료용 임시가설재 (스캐폴드재)로서, 창상 피복 재료로서, 감염 방지막으로서, 유착 방지막으로서, 이식 재료로서 등 의료용 재료로서 다방면에 이용할 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1 은 프로타민/DNA 복합체가 황색 포도구균 (스타필로코커스 아우레우스) 에 대해 저지원을 형성한 도면이다.

도 2 는 프로타민/DNA 복합체가 대장균 (에세리키아 콜리) 에 대해 저지원을 형성한 도면이다.

도 3 은 프로타민/DNA 복합체가 치주병균 (포르피로모나스 진지발리스) 에 대해 저지원을 형성한 도면이다.

도 4 는 프로타민/DNA 복합체가 치주병균 (프리보텔라 인터미디어) 에 대해 저지원을 형성한 도면이다.

도 5 는 프로타민/DNA 복합체를 래트 피하에 매입한 3 일 후의 조직 절편의 도면이다.

도 6 은 프로타민/DNA 복합체를 래트 피하에 매입한 10 일 후의 조직 절편의 도면이다.

도 7 은 프로타민/DNA/탄산애�파티아트 복합체 표면에 부착시킨 골아세포를 염색한 도면이다.

도 8 은 프로타민/DNA/탄산애�파티아트 복합체를 매입한 1 개월 후의 래트 두개골 결손부의 X 선 CT 화상의 도면으로서, (A) 는 래트 두개골 결손부의 시상 (矢狀) 방향의 X 선 CT 화상의 도면이고, (B) 는 래트 두개골 결손부의 관상 (冠狀) 방향의 X 선 CT 화상의 도면이다.

도 9 는 프로타민/DNA/탄산애�파티아트 복합체를 매입한 1.5 개월 후의 래트 두개골 결손부의 X 선 CT 화상의 도면으로서, (A) 는 래트 두개골 결손부의 시상 방향의 X 선 CT 화상의 도면이고, (B) 는 래트 두개골 결손부의 관상 방향의 X 선 CT 화상의 도면이다.

도 10 은 프로타민/DNA/탄산애�파티아트 복합체를 매입한 2 개월 후의 래트 두개골 결손부의 X 선 CT 화상의 도면으로서, (A) 는 래트 두개골 결손부의 시상 방향의 X 선 CT 화상의 도면이고, (B) 는 래트 두개골 결손부의 관상 방향의 X 선 CT 화상의 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 다음으로, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

[0024] 프로타민 또는 그 유도체, 가수 분해물은 포르피로모나스 진지발리스나 프리보텔라 인터미디어로 대표되는 적어도 1 종의 치주병원균에 대해 항균 활성을 나타내는 것이며, 구강 내에서 항치주병원균제로서 사용함으로써 치주의 예방, 완화, 혹은 치료 등의 효과를 얻을 수 있다.

[0025] 프로타민은 연어, 청어, 송어 등 어류의 정자핵 중에 DNA 와 결합한 뉴클레오프로타민으로서 존재하는 강염기성 단백질로서, 원료의 차이에 따라, 예를 들어 살민 (연어), 클루페인 (청어) 등이라고 하며, 각각 약간 구조도 상이하지만, 어느 프로타민이나 사용할 수 있다.

[0026] 프로타민 유도체는 프로타민과 무기산, 혹은 유기산과의 염이나 무기염기, 혹은 유기염기와의 염을 가리킨다. 산이나 염기로는, 염의 용도에 따라 선택할 수 있지만, 식품, 화장품, 의약품 등에 대한 용도를 고려하면, 이하에 예로 드는 약학적으로 허용되는 염이 바람직하다. 산부가염으로는, 예를 들어, 염산염, 질산염, 황산염, 메탄솔폰산염, p-톨루엔솔폰산염, 나아가서는 옥살산, 말론산, 숙신산, 말레산, 또는 푸마르산 등의 디카르복실산과의 염, 또한, 아세트산, 프로피온산, 또는 부티르산 등의 모노카르복실산과의 염 등을 들 수 있다.

또, 본 발명에서 얻어지는 펩티드 화합물의 염의 형성에 적합한 무기염기는, 예를 들어, 암모니아, 나트륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄 등의 수산화물, 탄산염 및 중탄산염 등이다. 유기염기와의 염으로는, 예를

들어, 메틸아민, 디메틸아민, 트리에틸아민과 같은 모노-, 디- 및 트리-알킬아민염, 모노-, 디- 및 트리-하이드록시알킬아민염, 구아니딘염, N-메틸글루코사민염 등을 들 수 있다.

[0027] 프로타민의 가수 분해물은 프로타민을 산, 알칼리, 단백질 분해 효소, 또는 그들의 조합에 의해 가수 분해한 것인데, 단백질 분해 효소를 사용하여 가수 분해하는 것이 바람직하다. 가수 분해의 방법은 보다 상세하게는 다음과 같다. 프로타민에 탈이온수를 첨가하고, 수산화나트륨 또는 염산을 첨가하여 pH를 효소의 지적(至適) pH로 조정한다. 효소의 지적 온도로 가온한 후, 효소를 첨가하여 교반하면서 효소 반응을 실시한다. 반응 종료 후, 반응액을 80 ~ 100 °C로 가온하여 5 ~ 60 분간 가열 실활시키고 pH를 중성영역이 되도록 조정 후, 반응액을 동결 건조시켜, 프로타민 분해물을 얻을 수 있다.

[0028] 상기 서술한 방법에 의해 조제한 프로타민 분해물에서는, 프로타민을 완전하게 분해한 것은 항균성을 거의 나타내지 않기 때문에, 분자량이 500 ~ 4,000의 범위에 분포하도록 부분 분해하는 것이 바람직하다.

[0029] 프로타민의 가수 분해에 사용할 수 있는 단백질 분해 효소로는, 예를 들어 바실루스 속(예를 들어 바실루스 셉틸리스, 바실루스 서모프로테올리티쿠스, 바실루스 리체니포르미스 등) 이 산생하는 효소, 아스페르길루스 속(예를 들어 아스페르길루스 오리제, 아스페르길루스 니거, 아스페르길루스 멜렌스 등) 이 산생하는 효소, 리조푸스 속(예를 들어 리조푸스 니베우스, 리조푸스 멜레마 등) 이 산생하는 효소, 펩신, 판크레아틴, 파파인 등을 들 수 있다. 이를 효소는 단독, 또는 2종 이상을 조합하여도 된다. 또, 단백질 분해 효소는 단백질의 내부 배열을 특이적으로 인식하여 절단하는 엔도펩티다아제와, 말단으로부터 1 ~ 2 아미노산 잔기씩 절단하는 액소펩티다아제로 분류된다. 따라서, 필요에 따라 엔도펩티다아제와 액소펩티다아제의 조합에 의해 여러 가지 펩티드 사슬을 생성시킬 수 있다. 효소에 의해 가수 분해하는 경우에는, 기질에 대해 효소 0.001 ~ 10 %를 첨가하여 용액이 사용되는 효소의 지적 pH로서 가수 분해한다.

[0030] 본 발명에 관련된 항치주병균제는 프로타민 또는 프로타민 유도체, 혹은 프로타민의 가수 분해물의 적어도 1종을 유효 성분으로서 사용하고, 필요에 따라 담체, 희석제, 각종 첨가제 등의 부차적 성분에서 선택된 성분과 함께 조성물로서 제공할 수도 있다. 치주병원균에 대한 항균제에 함유되는 담체 또는 부차적 성분(전형적으로는 용도에 따라 약학적으로 허용될 수 있는 것)으로는 용도나 형태에 따라 적절히 상이할 수 있지만, 물, 여러 가지의 유기 용매, 여러 가지의 완충액, 그 밖에 충전제, 증량제, 결합제, 부습(付濕)제, 표면 활성제, 부형제, 색소, 향료 등을 들 수 있다.

[0031] 다음으로, 본 발명에 관련된 항치주병균제는 유효 성분인 프로타민, 프로타민 유도체 및 프로타민의 가수 분해물의 적어도 1종과, 아니온성 고분자와의 정전적 반응물로서 얻어지는 복합체로서의 형태로 할 수 있다. 당해 복합체는 치주병균에 대한 항균 활성을 갖고, 또한 물에 불용이며, 또한 부형성을 갖는다. 이 복합체를 사용하여 의료용 또는 치과용 재료를 얻을 수 있다.

[0032] 상기 서술한 복합체의 원료가 되는 아니온성 고분자로는 알긴산, 알긴산염류 혹은 알긴산 유도체, DNA, RNA, 펩틴, 카리기난, 젤란검, 또는 폴리카르복실산으로는 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸아밀로오스, 폴리글루탐산 등의 아니온성 폴리아미노산, 카르복시메틸스타치, 히알루론산, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산 등이, 폴리황산으로는 텍스트란황산, 헤파린, 헤파란황산, 콘드로이틴황산, 케라탄황산, 데르마탄황산, 폴리비닐황산칼륨 등 중에서 선택할 수 있고, 이들 중 1개 내지는 복수의 화합물을 선택할 수 있다. 알긴산염류 혹은 알긴산 유도체로는 알긴산나트륨, 알긴산프로필렌글리콜에스테르, 알긴산올리고 등을 예시할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 이들 중에서 아니온으로서 DNA를 사용한 복합체는 복합체를 형성하는 DNA의 적어도 일부에 DNA 특유의 이중나선 구조가 유지되고 있고, 또한 당해 복합체가 물에 대한 용해성을 실질적으로 갖지 않으며, 또한 생체 적합성을 갖고 있어 의료용 또는 치과용 재료로서 특히 바람직한 재료이다.

[0034] DNA로는 천연 유래 DNA 및 합성 DNA를 이용할 수 있다. 천연 유래 DNA로는 세균 바이러스의 λ 퍼지 DNA, 대장균 염색체 DNA, 송아지 흉선 DNA, 연어, 청어, 송어 등 어류 정자 DNA를 들 수 있다. 또, 합성 DNA는 폴리(dA), 폴리(dT), 폴리(dG), 폴리(dC), 폴리(dA-dT), 폴리(dG-dC) 등을 사용하여 합성 장치에 의해 합성할 수 있는, 염기 배열이 상이한 여러 가지의 합성 DNA; 폴리(A), 폴리(T), 폴리(G), 폴리(U), 폴리(A-T), 폴리(G-U) 등을 사용하여 합성 장치에 의해 합성할 수 있는, 염기 배열이 상이한 여러 가지의 합성 RNA; 폴리(dG), 폴리(U), 폴리(G), 폴리(dC), 폴리(dA-dT), 폴리(A-T) 등의 DNA/RNA 하이브리드를 사용하여 합성 장치에 의해 합성할 수 있는, 상보적 염기쌍을 갖는 DNA/RNA 하이브리드를 들 수 있다. 이들은 필요에 따라 단독으로 혹은 조합하여 사용할 수 있다.

- [0035] DNA의 분자량은 특별히 제한되지 않고, 어느 정도의 이중 나선 구조를 유지하고 있으면 된다. DNA의 분자량으로는, 10 bp ~ 30,000 bp의 DNA를 사용할 수 있지만, 분자량이 지나치게 크면 수용액의 조제가 곤란해지고, 반대로 분자량이 지나치게 작으면 복합체의 회수율이 낮아지기 때문에, 바람직하게는 300 bp ~ 7,000 bp로 분자량 분포의 중심을 갖는 DNA를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 이와 같은 DNA는 이중 나선을 형성하고 있는 4 종류의 염기 [사이토신 (C), 구아닌 (G), 아데닌 (A), 티민 (T)]에 여러 가지의 기 (예를 들어 인산 함유기를 말단에 갖는 기) 등이 결합된 구조를 갖고 있고, 이 DNA 전체적으로는, 예를 들어 상기의 말단에 결합된 인산기 등에서 기인하여 아니온성을 나타낸다.
- [0037] 이와 같은 DNA 자체는 이중 나선 구조를 갖는 끈 형상물이며, 또, 이 DNA는 물에 용해되는 점에서, 이 DNA 자체에 성형성은 없다. DNA가 아니온성을 갖고 있는 것을 이용하여, 아니온성 DNA와, 카티온성 폴리카티온화합물을 정전적으로 반응시킴으로써 DNA/폴리카티온 복합체를 얻을 수 있다. 이와 같이 하여 복합체가 됨으로써, DNA는 실질적으로 물에 용해되지 않게 된다. 또, 유기 용제에 대한 용해성도 낮아진다.
- [0038] DNA를 아니온으로서 사용한 복합체는 DNA와 프로타민, 프로타민 유도체 및 프로타민 가수 분해물의 적어도 1종을 수성 매체 중에서 반응시킴으로써 조제할 수 있다. 예를 들어, DNA의 수용액을 교반하고 있는 프로타민 수용액에 첨가하여 혼합함으로써 이들을 반응시킬 수 있다.
- [0039] DNA와 프로타민, 프로타민 유도체 및 프로타민 가수 분해물의 적어도 1종의 배합비는 이 복합체의 용도에 따라 선택할 수 있다. 예를 들어, 1/9 내지 9/1, 바람직하게는 1/1 내지 1/1.5(중량비)의 범위에서 선택할 수 있다.
- [0040] DNA와 프로타민, 프로타민 유도체 및 프로타민 가수 분해물의 적어도 1종을 수성 매체 중에서 반응시킴으로써 복합체의 침전을 발생시킨다. 이 침전을 물 혹은 각종의 완충액으로 세정하고, 필요에 따라 추가로 수세하고, 여분의 수분을 원심 분리 등으로 제거하고 나서 건조시킴으로써 복합체의 건조물을 얻을 수 있다. 건조는 상온 건조법, 가열 건조법, 동결 건조법, 감압 건조법 등 목적에 따른 건조 방법을 적절히 선택하여 실시할 수 있다.
- [0041] 침전의 세정용 완충액으로는, 트리스 완충액, 봉산 완충액, HEPES 완충액, 아세트산 완충액, 시트르산 완충액, 글리신 완충액, 바르비투르산 완충액, 프탈산 완충액, 카코딜산 완충액, 탄산 완충액, Bis-트리스 완충액, Bis-트리스-프로판 완충액, MES 완충액, ADA 완충액, PIPES 완충액, ACES 완충액, 콜라민클로라이드 완충액, BES 완충액, MOPS 완충액, TES 완충액, HEPPS 완충액, Tricine 완충액, 글리신아미드 완충액, Bicine 완충액, TAPS 완충액, CHES 완충액, CAPS 완충액, 인산 완충액 등의 중에서 선택할 수 있다. 완충액의 농도나 pH도 목적으로 하는 DNA/프로타민 복합체의 성상이나 물성이 얻어지도록 자유롭게 선택할 수 있다.
- [0042] 이와 같이 하여 얻어진 복합체 건조물을 필요에 따라 분쇄하고, 목적에 따라 페이스트 형상, 겔 형상, 풀 형상, 끈 형상, 막대 형상, 구 형상, 디스크 형상, 필름 형상 등 여러 가지 형태로 성형하여 이용할 수 있다. 이 복합체에서는 DNA의 이중 나선 구조가 파괴되지 않고 거의 완전하게 남아 있으므로, 이 복합체를 사용함으로써 DNA의 기능을 안정적이고 효율적으로 이용할 수 있게 된다.
- [0043] DNA를 아니온으로서 사용한 복합체는, 이것에 예를 들어 적량의 물을 첨가하여 막자 사발로 반죽함으로써, 그 반죽시키는 시간에 따라 페이스트 형상, 겔 형상, 또한 점착성을 나타내는 풀 형상 등이 용이하게 성형할 수 있는 상태로 할 수 있다.
- [0044] 또한, DNA를 아니온으로서 사용한 복합체의 페이스트 형상물을, 시린지를 사용하여 인산 완충액 중으로 밀어냄으로써 끈 형상의 성형물이 얻어진다. 또, 목적에 따른 몰드에 충전함으로써 용이하게 막대 형상 혹은 구 형상, 디스크 형상 등의 각종 형상의 성형물을 얻을 수 있다.
- [0045] DNA를 아니온으로서 사용한 복합체의 필름 형상 성형물은 이 복합체의 건조 분말, 혹은 페이스트 형상, 막대 형상, 구 형상, 디스크 형상 성형물을 가열 성형기를 사용하여 가압함으로써 얻을 수 있다. 나아가서는, 상기 프로타민/DNA 복합체 성형물을 막자 사발로 얇게 늘려주는 것에 의해서도 용이하게 투명 필름을 성형할 수 있다.
- [0046] 상기의 가열 성형기를 사용한 필름의 제조시의 온도는 필름 성형용 재료에 따라 여러 가지 설정할 수 있지만, 바람직하게는 실온 (예를 들어, 15 °C ~ 25 °C) ~ 120 °C의 범위에서 선택할 수 있다. 또, 필름 성형시의 프레스압은 2 ~ 20 MPa의 범위에서 선택할 수 있다. 가압 시간은 원하는 물성의 필름이 얻어지는 정도 이면 되고, 상기의 온도 및 프레스압이면, 예를 들어 1 ~ 10 분간으로 필름화를 완료할 수 있다. 바람직하

게는 5 ~ 10 분간 프레스함으로써 튼튼하여 잘 깨지지 않는 필름을 제작할 수 있다. 필름의 두께는 프레스 시의 온도, 압력, 가압 시간에 의해 조절할 수 있고, 본 방법에 의하면 1 ~ 100 μm 정도의 막두께를 갖는 투명한 복합체 필름을 얻을 수도 있다.

[0047] 본 발명에 관련된 치과용 재료는, 상실된 치주 조직의 재생을 도모하는 조직 재생 유도 (GTR) 법에 있어서, GTR 막으로서 이용할 수 있다. 그 중에서도 DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체를 함유하는 치과용 재료는 생체 친화성 (적합성) 이 우수하여, GTR 막의 구성 성분으로서 특히 바람직하다. GTR 막은 결손 부위에 있어서 선행 증식을 하는 상피 조직으로부터 차폐하여, 치조골, 치근막, 시멘트질 등의 재생을 도모하기 위한 환경 형성 재료이다. 이 멤브레인은 일정 기간 생체 중에 유지되므로, 생체 친화성이 높은 소재로 형성되어 있는 것이 바람직하고, 나아가서는 치주병균 등에 대한 항균성을 갖고 있는 것이 더욱 바람직하다. 이러한 멤브레인으로는 콜라겐 혹은 폴리락트산을 기재로 한 흡수성 멤브레인과 불소 수지를 사용한 비흡수성 멤브레인이 사용되고 있다. 본 발명에 관련된 DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체의 필름 형상, 혹은 겔 형상, 풀 형상 부형물로 이루어지는 GTR 막은 생체 친화성이 높아, 종래의 멤브레인보다 장기간에 걸쳐서 안정적으로 사용할 수 있다. 또, 본 발명의 치과용 재료를 사용하여 제조된 GTR 멤브레인을 사용하면, 재생 기간을 종래의 흡수성 멤브레인을 사용한 경우보다 길게 설정할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명에 관련된 치과용 재료는, 예를 들어 페이스트 형상 혹은 겔 형상, 풀 형상의 부형물을 형성함으로써, 의치 등에 대한 항균성 도포제 혹은 세정제로서 이용할 수 있다. 그 중에서도 DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체는 생체 내에서의 안정성이 우수하기 때문에, 종래의 의치제 도포보다 장기간에 걸쳐서 치주병균 등에 대한 항균 효과를 발휘할 수 있다.

[0049] DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체에서는, DNA 가 갖는 아니온성기인 인산기의 일부와, 프로타민이 갖는 카티온성기가 정전적으로 결합하여 원하는 부형성을 발현시키고 있지만, DNA 분자 중에는 프로타민에 결합되지 않은 다수의 인산기가 잔존되어 있다. 이 DNA 중의 인산기를 활용하여 골 형성 인자 또는 성장 인자와 정전적으로 결합시켜, 이들 사이토카인이나 항생 물질 등의 캐리어로서 사용할 수도 있다. 또, DNA 의 이중 나선 구조에 의한 인터칼레이션이나 그루브 바인딩을 이용하여 약제의 캐리어로 할 수도 있다.

[0050] 골 형성 인자 및 성장 인자로는, DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체에 담지시킬 수 있으면 특별히 제한 없이 이용할 수 있다. 예를 들어, 골 형성 인자로는 골 형성 단백질 (BMP), 재조합 인간 골 형성 단백질 (rhBMP) 을, 성장 인자로는 선유아 세포 증식 인자 (FGF), 형질 전환 증식 인자 베타 (TGF- β), 상피 증식 인자 (EGF), 인슐린양 (樣) 증식 인자 (IGF), 혈소판 유래 증식 인자 (PDGF), 혈관 내피 세포 증식 인자 (VEGF), 신경 영양 인자 (NGF) 등을 들 수 있고, 이들의 적어도 1 종을 사용할 수 있다.

[0051] 또, DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체를 분말 형상 또는 과립 형상의 인산칼슘과 혼련 등의 방법에 의해 혼합함으로써, 부형성을 갖는 혼화물을 얻을 수 있다. 이 혼화물의 형성에 있어서는, 필요에 따라 적량의 수분 또는 인산 완충액을 추가하여 부형성이 있는 페이스트 형상으로 할 수 있다. 이 혼화물의 형성에 의해 인산칼슘의 과립이나 분말에 부형성을 갖게 할 수 있다. 즉, DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체와 인산칼슘 과립 그리고 분말의 반죽물을, 몰드에 충전함으로써 자유로운 형태로 성형할 수 있으며, 또 시린지에 충전하여 압출함으로써, 복잡한 형상의 골 결손부에도 충전할 수 있다. 또, 페이스트 형상의 혼화물을 원하는 형상으로 한 후에 건조 처리를 하여, 혼화물의 원하는 형상을 고정시킬 수도 있다. 이 혼화물은 치주 조직 재생 요법에 있어서의 치주 조직 (구체적으로는 치조골, 치근막, 시멘트질) 의 재생 유도제 혹은 재생 촉진제, 혹은 골 결손부에 있어서의 골 형성의 유도 혹은 촉진을 목적으로 한 골 보충재로서의 응용이 가능하지만, 이들의 용도에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 인산칼슘으로는 하이드록시애�티아이트 (HA), 인산3칼슘 (α -TCP, β -TCP), 인산수소칼슘2수화물 (DCPD), 인산8칼슘 (OCP), 인산4칼슘 (TeCP), 탄산애�티아이트 (CAP) 등을 들 수 있고, 이들의 적어도 1 종을 사용할 수 있다.

[0053] 또, DNA 를 아니온으로서 사용한 복합체는, 상기의 치과용 재료로서뿐만 아니라, 필름, 라이닝재, 코팅재로 형성하여, 이것을 재생 의료용 임시가설재 (스캐폴드재), 창상 피복 재료, 혹은 감염 방지막이나 유착 방지막으로서 사용함으로써, 이식했을 때의 생체 친화성을 향상시키거나 혹은 생체의 이물질에 대한 생체 반응을 억제하도록 한 것을 특징으로 하는 의료용 재료로서의 이용도 가능하다.

실시예

[0055] 다음으로 실시예를 나타내어 본 발명을 실시하기 위한 최선의 형태에 대하여 상세하게 기재하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다. 또한, 이하의 실시예에서 사용한 미생물 및 세포는 공적으로 입수

할 수 있다. 예를 들어, 프리보텔라 인터미디어 (ATCC25611), 포르피로모나스 진지발리스 (ATCC33277, 마우스 유래 섬유아세포 L-929 (실시예 3), MC3T3-E1 세포 (마우스 유래 골아 세포양 (樣) 세포) (실시예 5)로서 스미쇼 (住商) 과며 인터내셔널 (주) 의 세포주 · 미생물주 · 유전자 뱅크로부터도 공적으로 입수할 수 있다.

[0056] [실시예 1]

[0057] (프로타민 염산염, 및 그 가수 분해물의 치주병균에 대한 항균 활성)

[0058] (a) 시료

[0059] 연어 (온코린кус 케타) 의 어백 유래의 프로타민 염산염 (프로자브 ; (주) 마루하니치로 식품 제조), 상기 프로타민 염산염의 브로멜라인 ((주) 아마노 엔자임 제조) 에 의한 가수 분해물 (HAP100 ; (주) 마루하니치로 식품 제조), 동일하게 프로타민 염산염의 사모아제 ((주) 아마노 엔자임 제조) 에 의한 가수 분해물 (사모아제 분해물) 을 시료로서 사용하였다. 또한, 사모아제 분해물은 상기 프로자브 ((주) 마루하니치로 식품 제조) 50 g 에 탈이온수 80 mL 를 첨가하고, 수산화나트륨을 첨가하여 pH 8.0 로 조제한 후, 65 °C 로 가온하여 사모아제 ((주) 아마노 엔자임 제조) 0.4 g 을 첨가하여 2 시간 교반하면서 효소 반응을 실시하고, 반응 종료 후에 반응액을 95 °C 로 가온하여 30 분간 가열 실활시켜 pH 8.5 로 조정한 후, 반응액을 동결 건조시켜 조제하였다. 이 때, 사모아제 분해물의 중량 평균 분자량 (Mw) 은 3,587 Da 였다.

[0060] (b) 항균 활성의 판정 방법

[0061] 정제수를 사용하여 시료의 2 배 (w/v) 희석 계열 용액을 조제하고, 다음으로 멸균 · 용해 후 50±1 °C 로 유지한 PEA 첨가 브루셀라 HK 한천 배지 (교쿠토 제약 공업 (주) 제조) 에 각 희석 계열 용액을 각각 1/9 량 첨가하여 충분히 혼합 후, 살레에 나누어 주입하고, 고화시켜 감수성 측정용 평판으로 하였다. 다음으로, 포르피로모나스 진지발리스 JCM8525 를 증균용 배지에서 37±1 °C, 5 ~ 7 일간 혐기 배양 후, GAM 부이온 배지 (닛스이 제약 (주) 제조) 을 사용하여, 균수가 약 10^6 cfu (colony forming unit)/mL 가 되도록 조정하여, 접종용 균액으로 하였다.

[0062] 상기의 감수성 측정용 평판에 접종용 균액을 수지제 루프 (내경 약 1 mm) 를 사용하여 2 cm 정도 획선 도말 (塗抹) 하여, 37±1 °C, 5 ~ 7 일간 혐기 배양하였다. 소정 시간 배양 후, 균의 발육이 저지된 최저 농도를 가지고 최소 발육 저지 농도 (MIC) 로 하였다.

[0063] (c) 시험 결과

[0064] MIC 의 결과를 표 1 에 나타낸다. 그 결과, 프로타민의 가수 분해물 (브로멜라인 분해물 및 사모아제 분해물) 의 MIC 는 1,250 ppm, 프로타민 (프로자브) 은 625 ppm 이고, 프로자브는 분해물보다 높은 효과를 나타냈다.

표 1

표 1 시험균에 대한 최소 발육 저지 농도 (MIC)		
시험균	대상	MIC (ppm)
포르피로모나스 진지발리스	프로자브	625
	HAP 100 (브로멜라인 분해물)	1,250
	사모아제 분해물	1,250

[0066] [실시예 2] (프로타민/DNA 복합체의 항균성)

[0067] (a) 시료

[0068] 연어의 어백 유래의 프로타민 황산염 (프로자브 ; (주) 마루하니치로 식품 제조) 의 57 % (w/v) 수용액과, 동일하게 연어의 어백 유래의 DNA (분자량 분포의 중심이 300 bp, (주) 마루하니치로 식품 제조) 의 0.5 % (w/v) 수용액을 사용하였다. 각각 프로타민 황산염과 DNA 의 중량이 1 : 1 이 되도록, 프로타민 황산염 수용액 0.875 g 을 100 mL 의 멸균 증류수로 희석하고, DNA 용액 100 mL 와 혼합하여 1 시간 교반하였다. 원심 분리에 의해 침전물을 회수한 후, 수세하고 다시 원심 분리하여 얻어진 침전물을 프로타민/DNA 복합체 (미건조품) 로서 회수하였다. 이 프로타민/DNA 복합체 (미건조품) 를 다시 동결 건조시켜, 프로타민/DNA 복합체 0.61 g 을 얻었다. 또한, 프로타민/DNA 복합체의 회수율은 중량% 로 61 % (w/w) 였다. 시료를 분쇄하고, 물을 적

량 첨가한 후에 몰드에 전입(填入)하였다. 이형 후에 다시 동결 건조시켜, 직경 약 5 mm, 두께 약 1 mm의 원반 형상의 시료를 제조하였다.

[0069] (b) 항균성의 평가 방법

[0070] 항균 시험은 시험 균액을 균일하게 도말한 한천 등의 배지에 시료를 가만히 정지시키고, 세균의 발육 저지의 유무를 보는 발육 저지 띠 형성 시험으로 정성 적으로 실시하였다. 항균성을 평가한 균은 황색 포도구균(스타필로코커스아우레우스), 대장균(에세리키아 콜리), 치주병균(포르피로모나스 진지밸리스, 및 프리보렐라 인터미디어)이다. 이들은 모두 공적으로 입수할 수 있다.

[0071] (c) 시험 결과

[0072] 시험 결과를 도 1 ~ 4에 나타낸다. 황색 포도구균에 대해, 프로타민/DNA 복합체 시료 주변에 균의 생육 저지원이 관찰되었다. 또, 대장균에 대해서도 시료 주변에 저지원이 관찰되었다. 또한, 2종류의 치주 병균에 대해 시료 주변에 저지원이 관찰되었다.

[0073] [실시예 3] (프로타민/DNA 복합체의 세포 독성 시험)

[0074] (a) 시료

[0075] 실시예 2(a)와 동일한 방법으로 조제한 프로타민/DNA 복합체를 사용하였다. 분쇄한 분말을 체로 쳐 45 ~ 100 μm의 분말을 회수하여 시료로 하였다. 또한, 시료는 방사선 멸균(1.9 sec, 20 KGy, Dynamitron, IBA)하여 사용하였다.

[0076] (b) 세포 독성의 평가 방법

[0077] 세포는 공적으로 입수할 수 있는 마우스 유래 섬유아세포 L-929를 사용하였다. 10% 소 태아 혈청(인트로겐(주) 제조)을 함유하는 α-MEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 1×10^4 cell/ml의 세포 부유액을 제조하여, 6 웰 멀티 플레이트의 각 웰에 2 ml씩 나누어 주입하였다. 37°C에서 24시간 배양 후, 배양액을 시료 1, 2, 4 mg을 함유하는 α-MEM 배지 2 ml와 교환하고, 추가로 5일간 배양하였다. 5일간 배양 후, 배양액을 0.4 ml의 CellTiter 96(R) Aqueous MTS(프로메가(주))를 함유하는 배지 2 ml와 교환하고, 37°C에서 2시간 배양한 후, 492 nm의 흡광도를 측정하여 세포 생존률(시료 미첨가 대조군에 대한 비율)을 구하였다. 또한, 시험은 n = 5로 실시하여, 평균을 취하였다.

[0078] (c) 시험 결과

[0079] 세포 독성 시험의 결과를 표 2에 나타낸다. 0.5 ~ 2.0 mg/ml의 농도에 있어서 세포 생존률은 매우 높아, 프로타민/DNA 복합체는 세포 독성을 나타내지 않는 것이 확인되었다.

표 2

표 2 세포 독성 시험의 결과		
시료	시료 농도 (mg/ml)	세포 생존률 (%)
프로타민/DNA 복합체	0.5	107.3±5.3
	1.0	106.0±3.7
	2.0	98.5±2.8

[0081] [실시예 4] (프로타민/DNA 복합체의 생체 친화성의 평가)

[0082] (a) 시료

[0083] 실시예 2(a)와 동일한 방법으로 조제한 프로타민/DNA 복합체를 사용하였다. 프로타민/DNA 복합체를 내경 5 mm, 두께 0.5 mm의 테플론 몰드에 넣고, 양면을 테플론판을 사이에 두고 동결 건조시켜, 직경 약 5 mm, 두께 약 1 mm의 원반 형상의 시료를 제조하였다. 시료는 방사선 멸균(1.9 sec, 20 KGy, Dynamitron, IBA)하여 사용하였다.

[0084] (b) 생체 적합성의 평가 방법

[0085] SPF 래트(specific pathogen free rat, 수컷, 6주령)의 등 부분 피하를 절개하여 시료를 매입하였다.

일정 기간 (3, 10 일) 후, 조직을 채취하여 HE 염색하였다 (헤마톡실린 에오진 염색).

[0086] (c) 시험 결과

[0087] 결과의 조직도를 도 5, 6 에 나타낸다. 매입 3 일 후, 시료는 주위가 육아 조직에 둘러싸인 상태에서 피하 조직에 존재하였으며, 주위의 정상 조직과는 완전히 분획되어 있었다. 매입한 시료는 단편화되어 소편 (덩어리)으로서 존재하고, 소편 주위에는 약간 호중구 침윤이 확인되었지만, 이를 소견은 시료 매입에 의한 극히 경도의 생체의 급성 염증 반응인 것으로 생각되었다. 또, 시료 매입에 수반하는 감염 등의 야기는 확인되지 않았다. 매입 10 일 후, 피하의 매입부는 모두 육아 조직으로 치환되었다. 다행 거세포의 탐식 반응에 의한 매입 시료의 단편화가 진행되어, 조직학적으로는 전형적인 이물질 육아종의 이미지를 나타내고 있었다. 육아 조직은 섬유화가 진행되고 있어, 장래적으로는 매입 재료가 소실되어 완전한 기질화 (섬유성 결합 조직으로의 치환)에 의해 반응이 종료될 것으로 추측되었다. 매입 3, 10 일 후의 조직학적 관찰에 있어서, 사용한 프로타민/DNA 복합체의 생체에 대한 친화성은 매우 양호하다는 것이 시사되었다.

[0088] [실시예 5] (프로타민/DNA/탄산애페타이트 복합체의 골아세포 증식 임시가설재로서의 평가)

[0089] (a) 시료

[0090] 실시예 2(a) 와 동일한 방법으로 조제한 프로타민/DNA 복합체 (미건조품)에 대해, 중량 베이스로 60 %의 탄산 애페타이트와 적량의 물을 첨가하여 혼화하고, 테플론 몰드를 사용하여 내경 5 mm, 두께 1 mm의 원반 형상의 시료를 제조하였다.

[0091] (b) 평가 방법

[0092] 시료를 α-MEM 배지에 침지시키고, MC3T3-E1 세포를 파종하였다. 6 시간 배양한 후, 시료를 취출하여 PBS 버퍼로 시료 표면을 세정하였다. 그 후, 시료에 접착시킨 세포를 액틴 염색하였다.

[0093] (c) 시험 결과

[0094] 형광 염색한 세포의 화상을 도 7 에 나타낸다. 세포가 프로타민/DNA/탄산애페타이트 복합체 표면에 접착되어 있는 모습이 관찰되고, 당해 복합체가 골아세포 증식의 발판이 되는 것이 확인되었다.

[0095] [실시예 6] (프로타민/DNA/탄산애페타이트 복합체의 래트 두개골 결손부에 대한 매입 시험)

[0096] (a) 시료

[0097] 실시예 2(a) 와 동일한 방법으로 조제한 프로타민/DNA 복합체 (미건조품)에 대해, 중량 베이스로 60 %의 탄산 애페타이트를 첨가하고, 적량의 물과 함께 혼화한 후, 테플론 몰드를 사용하여 내경 5 mm, 두께 1 mm의 원반 형상의 시료를 제조하였다.

[0098] (b) 평가 방법

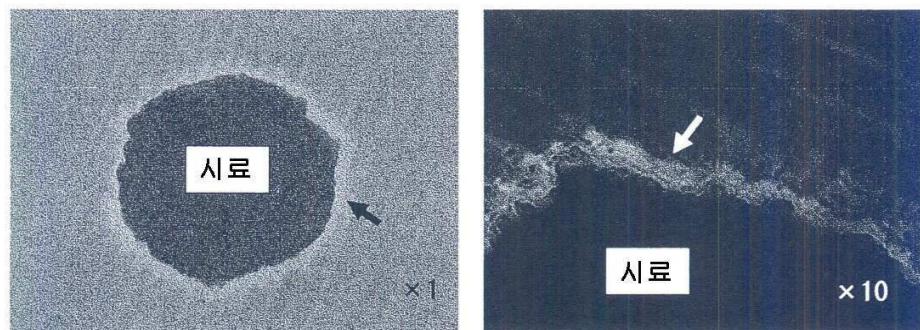
[0099] SP 래트 (specific pathogen free rat, 수컷, 6 주령)의 두개골에 트레핀 바 (직경 5 mm)로 골 결손을 형성하였다. 시료를 매입하고, 매입 1 개월 후, 1.5 개월 후 및 2 개월 후에 래트를 도살하여, 각각 X 선 CT 장치 (Scan Xmate-RB090SS150, 컴스캔 테크노사 제조)를 사용하여 두개골 결손부의 단층 화상을 촬영하여 골 형성 과정의 진행의 유무를 확인하였다.

[0100] (c) 시험 결과

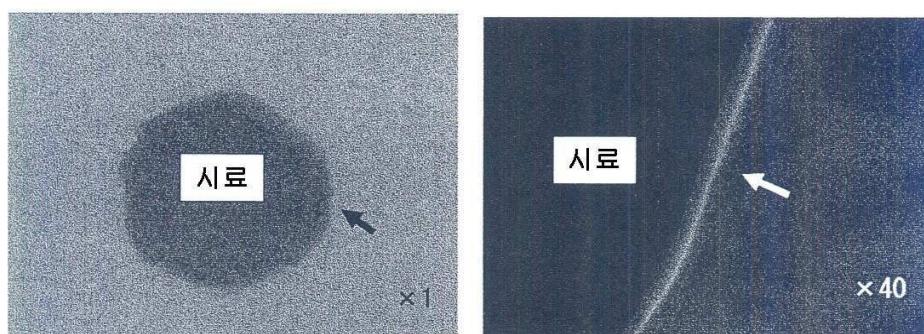
[0101] 시료 매입 1 개월 후, 시상 방향 및 관상 방향의 CT 스캔 화상으로 불투화상이 관찰되어, 골양 (骨樣) 조직이 형성되어 있었다 (도 8(A) 및 (B)). 시료 매입 1.5 개월 후, 시상 방향의 화상에서는 1 개월 후와 차이는 관찰되지 않았지만 (도 9(A)), 관상 방향의 화상으로부터는 1 개월 후보다 골양 조직의 형성이 진행되어 있는 모습이 관찰되었다 (도 9(B)). 시료 매입 2 개월 후, 시상 방향의 화상에서 시료 매입 주변부에서 중심부를 향하여 골양 조직의 형성이 관찰되었고 (도 10(A)), 관상 방향의 화상에서도 1.5 개월 후보다 더욱 골양 조직이 형성되어 있는 모습이 관찰되었다 (도 10(B)).

도면

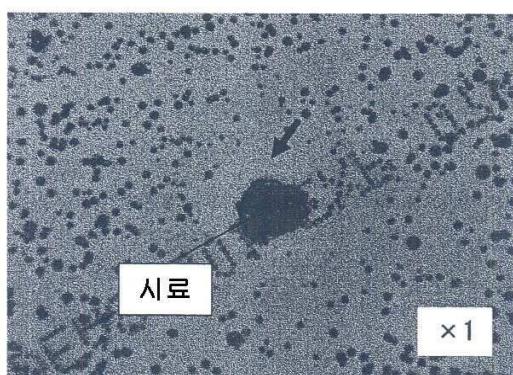
도면1



도면2



도면3



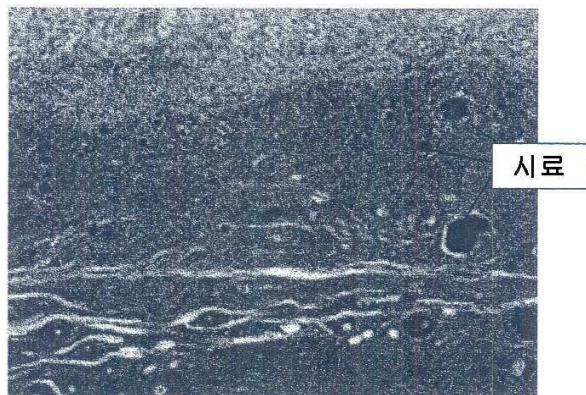
도면4



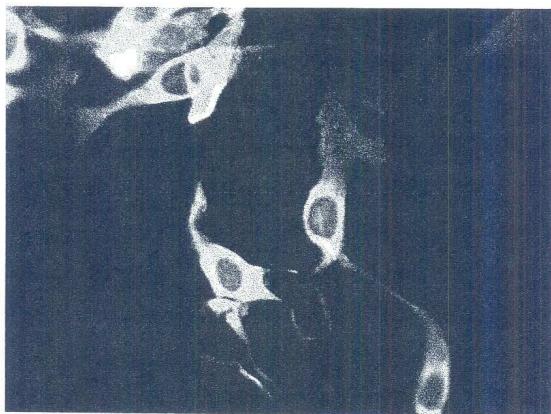
도면5



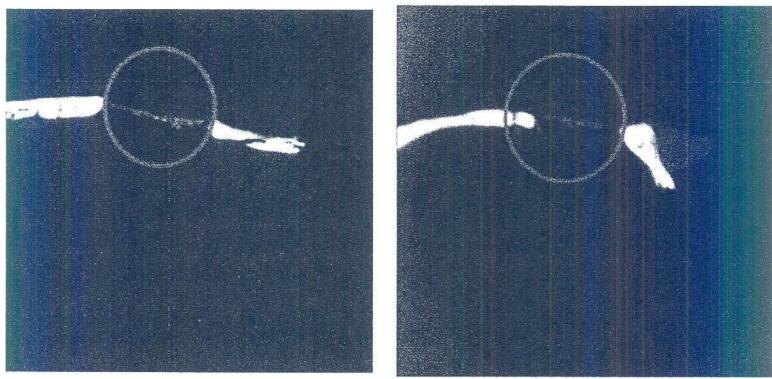
도면6



도면7



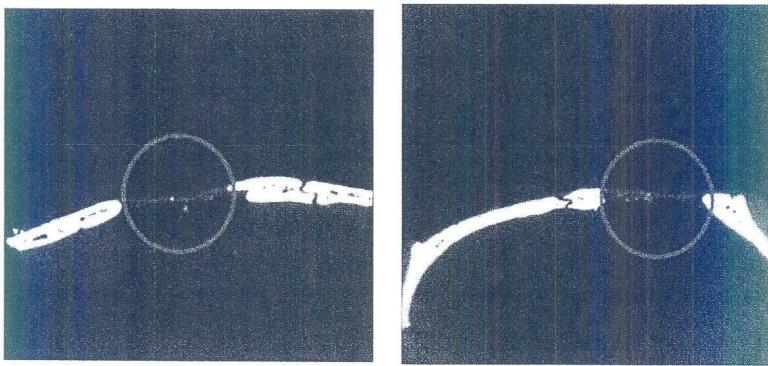
도면8



(A)

(B)

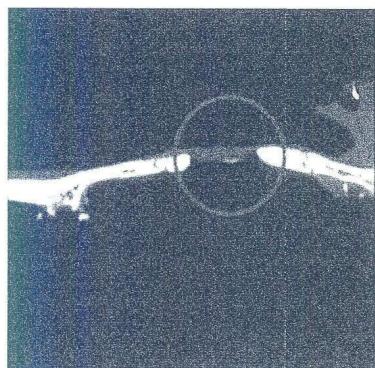
도면9



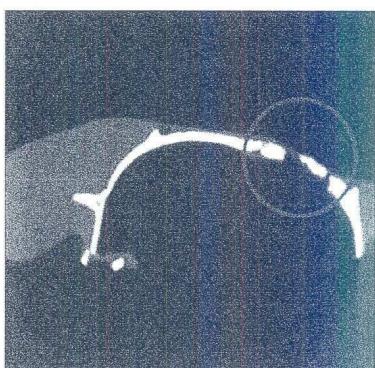
(A)

(B)

도면10



(A)



(B)