(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0018157
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/58 (2006.01) *A61L 27/54* (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/58 (2013.01)
A61L 27/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0103183
(22) 출원일자 2016년08월12일
심사청구일자 2016년08월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송해룡
서울특별시 구로구 신도림로 87, 105동 102호 (신도림동, 신도림1차동아아파트)
이재용
서울특별시 양천구 오목로19길 1, 103동 202호 (신월동, 제일아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

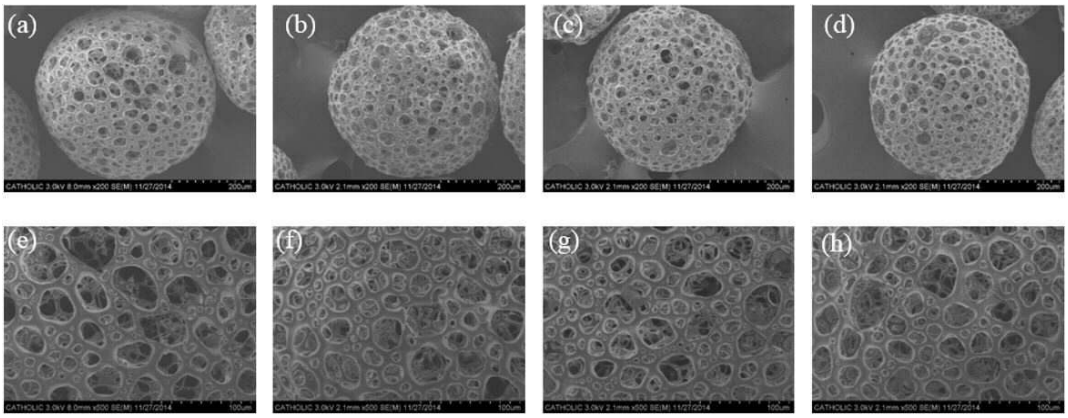
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 다공도(porosity)가 60 내지 90 %이며, 크기가 5 내지 100 ㎛인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 카르토게닌, 커큐민, 이부프로펜 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 약물;을 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 2300/252 (2013.01)
A61L 2300/412 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)
A61L 2430/06 (2013.01)
A61L 2430/10 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)
(72) 발명자
김성은
서울특별시 양천구 중앙로29길 61, 108동 501호 (신월동, 신정뉴타운롯데캐슬아파트)
김학준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
윤영필
서울특별시 양천구 신월로10길 23, 301호 (신월동, 삼동아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI13C1501
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 근골격계 연부조직 재생을 위한 지지체의 전임상 및 임상 시험 연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 구로병원
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C1665
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 바이오 메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 구로병원
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

크기가 5 내지 100 ㎛인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 연부조직 질환 치료용 약물;을 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 2

제1항에 있어서,

생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 약물이 2 내지 30 중량부로 함유된 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 3

제1항에 있어서,

다공도(porosity)가 10 내지 90 %이며, 입자의 크기가 200 내지 1000 ㎛인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 4

제1항에 있어서,

다공도(porosity)가 60 내지 90 %이고, 기공의 크기가 10 내지 40 ㎛이며, 입자의 크기가 200 내지 500 ㎛인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토트렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyxlosporine), 야누스 키나아제(JAK-3 inhibitor), 리툭시맙(Rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맙(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다림맙(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin) 및 카르토게닌(kartogenin), 이부프로펜(ibuprofen) 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 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 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블랜딩된 고분

자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 연부조직 질환은 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염 및 염증성 관절염 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 8

제1항에 있어서,

생체 내에 주입되어 약물을 방출하는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 연부조직 질환 치료용 약물은 카르토게닌, 이부프로펜, 커큐민 또는 이들 둘 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어.

청구항 10

1) 생체적합성 고분자; 및 연부조직 질환 치료용 약물;을 유기용매에 용해시켜 고분자용액을 제조하는 단계;

2) 상기 고분자용액 및 젤라틴(gelatin) 수용액을 첨가하고 균질화하여 에멀젼을 제조하는 단계;

3) 상기 에멀젼을 불연속상(discontinuous phase)으로 사용하고, 폴리비닐알콜 용액을 연속상(continuous phase)로 사용하여 유체 장치(fluidic device)에서 흘려주어 생체적합성 고분자, 약물 및 젤라틴을 포함하는 고분자 미소구체를 제조하는 단계; 및

4) 38 내지 50℃의 물에 상기 고분자 미소구체를 넣고 교반하여 고분자 미소구체로부터 젤라틴을 용출시키는 단계;를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 약물 2 내지 30 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 젤라틴 3 내지 15 중량부를 첨가하여 균질화하는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 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 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블랜딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 2) 단계는 에멀젼 안정화제 0.5 내지 3 중량부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

다공도(porosity)가 10 내지 90 %이며, 기공의 크기가 5 내지 100 ㎛이고, 입자의 크기가 200 내지 1000 ㎛인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

다공도(porosity)가 60 내지 90 %이며, 기공의 크기가 10 내지 40 ㎛이고, 입자의 크기가 100 내지 400 ㎛인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 연부조직 질환은 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염 및 염증성 관절염 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 2) 단계는 균질기로 8,000 내지 20,000 rpm으로 30초 내지 10분간 균질화하는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 19

제10항에 있어서,

생체적합성 고분자의 함량 대비 젤라틴, 약물 또는 이들 둘의 함량을 조절하여 약물의 배출량 및 배출속도가 조절되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 20

제10항에 있어서,

상기 젤라틴 수용액은 1 내지 10 중량% 젤라틴 수용액인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 21

제10항에 있어서,

상기 불연속상 및 연속상의 유속은 각각 0.2 내지 1 mL/min인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 22

제10항에 있어서,

상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 테트라하이드로퓨란 및 N,N-디메틸포름아미드 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상인 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어

의 제조방법.

청구항 23

제10항에 있어서,

상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토트렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyxlosporine), 야누스 키나아제(JAK-3 inhibitor), 리툭시맙(Rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맘(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다림맘(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin) 및 카르토게닌(kartogenin), 이부프로펜(ibuprofen) 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 연부조직은 뼈나 관절을 둘러싸 있는 연한 부위 또는 그 조직으로, 뼈를 싸고 있는 막, 힘줄, 건, 인대 및 연골을 아우르는 말이다. 이중 연골은 연골세포와 연골기질로 구성된 조직이다. 이러한 연골은 보통 움직임이 비교적 적은 뼈와 뼈 사이에서 연골 관절의 형태를 보이지만, 많은 운동이 필요한 곳이라면 연골면 사이에 윤활액을 두면서 윤활관절의 형태를 띠게 된다. 또한 연골은 탄력성이 높아 주어진 힘에 대해 완충작용을 하고 관절 연골의 마찰 계수는 매우 낮아 마찰이 거의 없는 상태에서 관절이 움직일 수 있도록 도움을 준다.

[0003] 연부조직의 손상은 외부의 충격이나 강한 비틀림, 당김, 압박, 과도한 운동, 장기간의 피로, 노화 또는 상처 등의 원인으로 발생된다. 이러한 연부조직의 손상은 외과적인 수술이나 기계적 장치를 사용하는 것에 의해 치료받을 수 있으나, 완치가 어렵고 보행 장애와 같은 생활에 심각한 불편함을 야기한다. 이러한 외과적 한계점을 극복하기 위해 자가세포나 천연연골의 이식을 통한 수술법이 개발되었으나, 이러한 방법들은 제한된 수의 세포분리, 분리 부위의 병적상태, 분리 세포의 제한된 증식과 같은 문제뿐만 아니라 이식절차를 진행하는 동안 세포의 돌연변이 문제가 발생하는 등의 문제가 있기 때문에 제한이 따르며, 높은 비용이 발생하기 때문에 접근이 용이하지 않는 문제가 있다.

[0004] 연부조직 재생을 위한 방법으로 약물의 경구투여나 환부에 약물을 직접주사하는 방법이 있으나, 약물을 경구투여하는 방법은 재생을 필요로 하는 환부에 전달되는 약물의 양이 극히 일부분에 불과하여 재생효과가 크지 못하며, 환부에 약물을 직접주사하는 방법은 많은 양의 약물이 한번에 주입되기 때문에 부작용의 문제가 있다.

[0005] 이러한 문제점을 개선하기 한 방법으로 생분해성 다공성 고분자 지지체를 이용하는 조직공학적 접근이 대안으로 대두되었다. 생분해성 다공성 고분자 지지체는 천연적인 세포외 매트릭스를 모방하며, 혈관, 힘줄, 연골, 건, 인대 및 골과 같은 조직들의 회복 및 재생에 매우 우호적인 것으로 알려져 있다. 이들은 세포접착성이 높은 장점을 가지지만 기계적 물성이 열악하며, 연골 재생속도가 느리다는 문제점이 있다. 이에 빠른 재생성을 나타내면서 부작용의 문제가 없는 새로운 치료약물의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1105285호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2014-0147880호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 연부조직 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약물이 탑재된 다공성 고분자 마이크로스피어를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 과제를 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 크기가 5 내지 100 ㎛인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 연부조직 질환 치료용 약물;을 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어를 제공한다.

[0010] 본 발명에 의하면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 약물이 2 내지 30 중량부로 함유된 것일 수 있다.

[0011] 본 발명에 의하면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 입자의 크기가 200 내지 1000 ㎛일 수 있다.

[0012] 본 발명에 의하면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 다공도가 10 내지 90%일 수 있다.

[0013] 본 발명에 의하면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 다공도(porosity)가 60 내지 90 %이고, 기공의 크기가 10 내지 40 ㎛이며, 입자의 크기가 200 내지 500 ㎛일 수 있다.

[0014] 본 발명에 의하면, 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토트렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyxlosporine), 야누스키나아제(JAK-3 inhibitor), 리툭시맙(Rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맘(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다림맘(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin) 및 카르토게닌(kartogenin), 이부프로펜 (ibuprofen) 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명에 의하면, 상기 생체적합성 고분자는 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 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블랜딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명에 의하면, 상기 연부조직 질환은 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염 및 염증성 관절염 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 의하면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 생체 내에 주입되어 상기 연부조직 질환 치료용 약물을 방출하는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은, 1) 생체적합성 고분자; 및 연부조직 질환 치료용 약물;을 유기용매에 용해시켜 고분자용액을 제조하는 단계;

[0019] 2) 상기 고분자용액 및 젤라틴(gelatin) 수용액을 첨가하고 균질화하여 에멀젼을 제조하는 단계;

[0020] 3) 상기 에멀젼을 불연속상(discontinuous phase)으로 사용하고, 폴리비닐알콜 용액을 연속상(continuous phase)로 사용하여 유체 장치(fluidic device)에서 흘려주어 생체적합성 고분자, 약물 및 젤라틴을 포함하는 고분자 미소구체를 제조하는 단계; 및

[0021] 4) 38 내지 50℃의 물에 상기 고분자 미소구체를 넣고 교반하여 고분자 미소구체로부터 젤라틴을 용출시키는 단계;를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 다공성 고분자 마이크로스피어는 손상된 연부조직의 재생에 효과적인 약물을 치료가 요구되는 환부에 직접 주사가 가능하다. 또한, 약물이 천천히 배출되기 때문에 장시간에 걸쳐 원하는 양의 약물을 환부에 전달할 수 있으면서도 우수한 재생효과를 연부조직에서 직접 발현시킬 수 있고, 생분해성 재료로 구성되기 때문에 부작용이 없다. 또한, 본 발명에 따른 다공성 고분자 마이크로스피어는 환부의 상태에 따라 다공도의 조절 및 담지된 약물의 농도조절을 통해 약물이 배출되는 속도 및 배출되는 양을 조절할 수 있으므로 맞춤형 진료를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 실시예 1의 다공성 고분자 마이크로스피어의 주사전자현미경 이미지이다.

도 2는 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어의 주사전자현미경 이미지이다.

도 3은 실시예 3의 다공성 고분자 마이크로스피어의 주사전자현미경 이미지이다.

도 4는 약물의 농도에 따른 다공성 고분자 마이크로스피어의 기공크기 변화를 주사전자현미경으로 확인한 결과이다.

도 5는 실시예 3의 다공성 고분자 마이크로스피어의 공초점 레이저 현미경이미지이다.

도 6은 실시예 1의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 약물 방출 거동 테스트 결과이다.

도 7은 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(IBU/PMS)의 약물 방출 거동 테스트 결과이다.

도 8은 실시예 3의 다공성 고분자 마이크로스피어(Cur/PMS)의 약물 방출 거동 테스트 결과이다.

도 9는 실시예 1의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 인 비트로 상에서 MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양을 측정한 결과이다.

도 10은 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 인 비트로 상에서 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α의 발현양을 측정한 결과이다.

도 11은 실시예 3의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 인 비트로 상에서 MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양을 측정한 결과이다.

도 12는 실시예 1의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 연골 분화 발현을 확인하기 위하여 Aggrecan, COL1A1, COL2A1 및 COL10A1의 발현양을 측정한 결과이다.

도 13은 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 처리에 따른 연골 생성 정도를 X-선 촬영으로 확인한 결과이다.

도 14는 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 처리에 따른 연골 생성 정도를 마이크로-CT 촬영으로 확인한 결과이다.

도 15는 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 처리에 따른 연골 생성 정도를 확인하기 위하여 무릎을 적출하여 사진촬영하여 나타낸 결과이다.

도 16는 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 처리에 따른 연골 생성 정도를 확인하기 위하여 무릎 절편을 헤마톡실린&에오신(Hematoxylin & eosin, H&E) 염색법으로 염색하여 확인한 결과이다.

도 17은 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 처리에 따른 연골 생성 정도를 확인하기 위하여

무릎 절편을 사프라닌 O(Safranin O) 염색법으로 염색하여 확인한 결과이다.

도 18은 실시예 2의 다공성 고분자 마이크로스피어(KGN/PMS)의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 랫트의 혈액으로부터 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α의 발현양을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명은 크기가 5 내지 100 ㎛인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 연부조직 질환 치료용 약물;을 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어를 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 다공성 고분자 마이크로스피어는 생체 내에 주입되어 상기 연부조직 질환 치료용 약물을 방출하는 것일 수 있다. 상기 약물의 방출은 다공성 고분자 마이크로스피어의 기공을 통해 방출되거나 또는 생분해성 고분자 지지체(이하, 고분자 지지체)가 생체 내에서 분해되면서 배출되는 것일 수 있다.

[0027] 상기 약물의 방출은 상기 고분자 지지체를 형성하는 고분자의 종류, 그물구조의 밀도, 다공도 및 기공의 크기에 따라 약물의 방출량 및 방출속도가 조절될 수 있다. 따라서 치료하고자 하는 환부의 중증도에 따라 다공성 고분자 마이크로스피어의 다공도, 기공크기 및 포섭된 약물의 농도를 적절히 조절하여 환자에게 적용할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 약물이 2 내지 30 중량부로 함유될 수 있다. 상기 약물의 함량이 상기범위 미만이면 약물의 양이 너무 적고, 상기 범위를 초과하면 단시간에 방출되는 약물의 양이 너무 많아 바람직하지 않다.

[0029] 본 발명에 따른 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 다공도(porosity)가 10 내지 90 %이며, 입자의 크기가 200 내지 1000 ㎛일 수 있다. 입자의 크기가 상기 범위 미만이면 담지될 수 있는 약물의 양이 너무 적어 생체 내에서 지속적으로 배출되기 어려워, 약물을 자주 투여해야하는 불편함이 있고, 입자의 크기가 상기 범위를 초과하면 마이크로스피어의 제조가 용이하지 않다.

[0030] 본 발명에 따른 바람직한 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 다공도(porosity)가 60 내지 90 %이고, 기공의 크기가 10 내지 40 ㎛이며, 입자의 크기가 200 내지 500 ㎛일 수 있다. 상기 범위인 것이 생체 내에서 약물의 배출이 용이하게 이루어질 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 다공성 고분마 마이크로스피어는 기공의 크기가 5 내지 100 ㎛일 수 있다. 기공의 크기가 상기 범위 미만이면 기공의 크기가 너무 작아 약물의 방출이 용이하지 않으며, 기공의 크기가 상기 범위를 초과하면 약물이 한꺼번에 방출되는 문제가 있다. 특히 바람직한 기공의 크기는 10 내지 80 ㎛일 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토트렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyxlosporine), 야누스키나아제(JAK-3 inhibitor), 리툭시맙(Rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맘(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다림맘(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin) 및 카르토게닌(kartogenin), 이부프로펜 (ibuprofen) 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0033] 구체적으로, 상기 형질전환성장인자(Transforming growth factor, TGF)는 TGF-alpha, TGF-beta, TGF-beta 1, TGF-beta 2 또는 TGF-beta 3일 수 있으며, 혈소판유래성장인자(Platelet derived growth factor, PDGF)는 PDGFA, PDGFB, PDGFC 또는 PDGFD일 수 있고, 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)는 FGF2 또는 FGF-beta일 수 있고, 혈관표시성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C 또는 VEGF-D일 수 있으며, 인슐린 유사 성장인자(Insulin like growth factor, IGF)는

IGF-1 또는 IGF-2일 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 다공성 고분자 마이크로스피어의 상기 생체적합성 고분자는 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 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블랜딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 특히, 바람직한 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 카르토게닌, 이부프로펜, 커큐민 또는 이들 둘 이상의 혼합물일 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환은 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염 및 염증성 관절염 중에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 연부조직 질환의 예방 또는 치료란 연골 등의 연부조직의 재생을 촉진하거나, 염증을 억제하는 것일 수 있다.

[0038] 한편, 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 다공성 고분자 마이크로스피어는 1) 생체적합성 고분자; 및 연부조직 질환 치료용 약물;을 유기용매에 용해시켜 고분자용액을 제조하는 단계; 2) 상기 고분자용액 및 젤라틴(gelatin) 수용액을 첨가하고 균질화하여 에멀젼을 제조하는 단계; 3) 상기 에멀젼을 불연속상(discontinuous phase)으로 사용하고, 폴리비닐알콜 용액을 연속상(continuous phase)로 사용하여 유체 장치(fluidic device)에서 흘려주어 생체적합성 고분자, 약물 및 젤라틴을 포함하는 고분자 미소구체를 제조하는 단계; 및 4) 38 내지 50℃의 물에 상기 고분자 미소구체를 넣고 교반하여 고분자 미소구체로부터 젤라틴을 용출시키는 단계;를 포함하여 수행하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[0039] 먼저, 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 상기 약물을 2 내지 30 중량부로 혼합하여 유기용매에 용해시킴으로써 고분자용액을 제조한다.

[0040] 상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 테트라하이드로퓨란 및 N,N-디메틸포름아미드 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상일 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.

[0041] 다음으로 제조된 고분자용액과 젤라틴 수용액을 첨가하고 균질화하여 에멀젼을 제조한다.

[0042] 상기 젤라틴 수용액은 1 내지 10 중량% 젤라틴 수용액일 수 있다. 젤라틴의 함량이 상기 범위 미만이면 젤라틴의 함량이 너무 낮아 마이크로스피어의 기공발달이 용이하지 않고, 상기범위를 초과하면 마이크로스피어의 제조가 용이하지 않다.

[0043] 본 발명에 의하면, 상기 균질화에서 에멀젼 안정화제를 더 포함할 수 있다. 상기 에멀젼 안정화제는 통상적으로 사용되는 에멀젼 안정화일 수 있으며, 바람직하게는 폴리비닐알콜일 수 있다.

[0044] 본 발명에 의하면, 상기 2) 단계의 균질화는 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 젤라틴 3 내지 15 중량부를 첨가하는 것일 수 있다. 생체적합성 고분자에 대하여 젤라틴의 함량이 상기 범위 미만이면, 기공의 발달이 용이하지 않고, 목적하는 다공도를 달성하기 어렵다. 상기 범위를 초과하면 기공이 너무 커서 약물의 담지가 용이하지 않다.

[0045] 본 발명에 의하면, 상기 생체적합성 고분자 10 중량부에 대하여 에멀젼 안정화제 0.5 내지 3 중량부를 첨가하는 것일 수 있다. 에멀젼 안정화제의 함량이 상기범위를 벗어나는 경우에는 본 발명에서 목적하고자 하는 크기의 마이크로스피어 형성이 용이하지 않다.

[0046] 또한, 상기 생체적합성 고분자의 함량 대비 상기 젤라틴, 상기 약물 또는 이들 둘의 함량을 조절하여 약물의 배출량 및 배출속도를 적절히 조절할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 균질화는 균질기를 사용하여 8,000 내지 20,000 rpm으로 30초 내지 10분간 균질화하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 및 연부조직 질환 치료용 약물은 앞에서 제시한 바와 같다.

[0049] 다음으로, 상기 에멀젼을 불연속상으로 사용하고, 폴리비닐알콜을 연속상으로 사용하여 유체장치에서 흘려줌으로써 목적하는 고분자 미소구체를 제조할 수 있다. 상기 제조된 미소구체는 38 내지 50℃의 물에 넣고 교반하게

되면, 미소구체 내의 젤라틴 성분들이 미소구체로부터 빠져나오게 되면서 젤라틴이 있던 곳에 기공이 형성되므로 다공성 고분자 마이크로스피어가 형성되게 된다.

[0050] 이때, 상기 불연속상 및 연속상의 유속은 각각 0.2 내지 1 mL/min일 수 있으며, 바람직하게는 0.5 mL/min일 수 있다. 상기 유속인 것이 다공도의 분산도가 우수하며, 목적하는 크기 및 다공도를 가지는 마이크로스피어의 제조가 가능하다.

[0051] 이러한 방법으로 제조된 마이크로스피어는 다공도(porosity)가 10 내지 90%이며, 기공의 크기가 5 내지 100 ㎛이고, 입자의 크기가 200 내지 1000 ㎛일 수 있으며, 바람직하게는 다공도가 60 내지 90 %이며, 형성된 기공의 크기가 10 내지 40 ㎛이고, 입자의 크기가 100 내지 400 ㎛인 마이크로스피어일 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 상기 다공성 고분자 마이크로스피어를 유효량 투여하여 연부조직 질환의 예방 또는 치료할 수 있다.

[0053] 여기에서 사용된 용어 "유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 수 있다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 예방, 치료 또는 개선 방법에 있어서, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001 g/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명에 따른 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 비타민, 책색제, 중진제, 퀙트산, 전해질제, 알긴산, 유기산, 탄산화제, 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0055] 상기 다공성 고분자 마이크로스피어는 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0056] 상기 다공성 고분자 마이크로스피어의 제제형태는 통상의 약제학적 조성물의 제제형태이면 특별히 제한은 없으나 바람직하게는 주사 가능한 액제(액상 용액)일 수 있으며, 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 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.

[0057] 본 발명에 따르면, 상기 다공성 고분자 마이크로스피어에 함유된 약물의 바람직한 농도는 1 ng/ml 내지 500 mg/ml 일 수 있으며, 함유된 약물의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 약물의 종류가 연골 또는 골의 재생을 위한 것이라면 바람직한 약물의 농도는 1 pg/ml 내지 3 mg/ml 일 수 있으며, 상기 약물의 종류가 염증 억제를 위한 것이라면 바람직한 약물의 농도는 1 ㎍/ml 내지 3 mg/ml 일 수 있으나, 환부의 경중에 따라 용이하게 달라질 수 있음은 자명한 사실이다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허 청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0059] 실시예 1. 다공성 고분자 마이크로스피어의 제조(카르토게닌 함유)

[0060] 디클로로메탄 7g에 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA) 140 mg을 용해시켜 2 중량% PLGA solution을 제조하였다. 750 mg의 젤라틴을 증류수 10 g에 용해시켜 7.5 중량% 젤라틴 수용액을 제조하였다. PLGA:젤라틴을 고형분을 기준으로 7:3 중량비로 혼합하고, 카르토게닌의 함량이 각각 10, 50 및 100㎛M(각각, 0.05, 0.1 및 0.5 중량%)이 함유되도록 디메틸설폭사이드에 용해시킨 카르토게닌을 첨가하여 균질기(homogenizer, Ultra-Turrax T-25 Basic, IKA)를 사용하여 13,500 rpm으로 1분간 균질화하여 에멀젼을 제조하였다.

[0061] 유체 장치에서 불연속상으로 상기 에멀젼을 이용하고, 연속상으로 0.5 중량% 폴리비닐알콜을 사용하여 0.5

mL/min의 유속으로 흘려주어 미소구체를 제조하였다. 제조된 미소구체에 증류수를 첨가하고 40 ℃의 증류수에서 교반하여 미소구체 내의 젤라틴을 용출시킴으로써 카르코게닌이 함유된 다공성 고분자 마이크로스피어를 제조하였다.

[0062] 실시예 2. 다공성 고분자 마이크로스피어 2의 제조(이부프로펜 함유)

[0063] 2 중량% PLGA, 3 중량% 젤라틴 수용액 및 이부프로펜 1, 3 및 5 중량%(in 디클로로메탄)을 사용하였으며, 에멀젼 안정화제로 0.5 중량%의 폴리비닐알콜을 더 첨가하고, 균질기(homogenizer, Ultra-Turrax T-25 Basic, IKA)를 사용하여 13,500 rpm으로 1분간 균질화하여 에멀젼을 제조하였다.

[0064] 유체 장치에서 불연속상으로 상기 에멀젼을 이용하고, 연속상으로 0.5 중량% 폴리비닐알콜을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 흘려주어 미소구체를 제조하였다. 제조된 미소구체에 증류수를 첨가하고 45 ℃의 증류수에서 교반하여 미소구체 내의 젤라틴을 용출시킴으로써 이부프로펜이 함유된 다공성 고분자 마이크로스피어를 제조하였다.

[0065] 실시예 3. 다공성 고분자 마이크로스피어 3의 제조(커큐민 함유)

[0066] 실시예 1과 동일한 방법으로 다공성 고분자 마이크로스피어를 제조하되, 에멀젼을 제조과정에서 커큐민 0.5, 2 및 5 중량%를 사용하였다.

[0067] 시험예 1. 형태분석

[0068] 시험예 1.1. 주사전자현미경 관측

[0069] 실시예 1 내지 3의 방법으로 제조된 다공성 고분자 마이크로스피어의 형태를 확인하기 위하여 주사전자현미경으로 관측하였으며, 이를 하기 도 1 내지 3에 나타내었다.

[0070] 도 1은 실시예 1에 따른 카르토게닌 함유 다공성 고분자 마이크로스피어(이하, '마이크로스피어'라 한다)의 이미지이며, 도 2는 실시예 2에 따른 이부프로펜 함유 마이크로스피어이고, 도 3은 실시예 3에 따른 커큐민 함유 마이크로스피어의 이미지이다. 각 농도별 마이크로스피어의 표면 및 기공의 크기들은 유사한 형태를 나타내었으며, 약물의 농도에 따라서 유의적인 수준의 차이를 나타내었다.

[0071] 한편, 약물의 농도에 따른 기공크기 변화를 확인하기 위하여 이부프로펜의 농도를 5에서 18 %까지 단계적으로 증가시키면서 마이크로스피어를 제조하였으며, 주사전자현미경으로 측정하여 하기 도 4 및 표 1에 나타내었고, 커큐민의 농도에 따른 기공변화를 확인하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

[0072]

구분	이부프로펜 농도(중량%)					
	5	7.5	10	13	15	18
기공너비(㎛)	15.42	14.76	22.36	22.50	28.10	23.97
기공높이(㎛)	14.30	15.23	23.30	23.11	30.74	27.30

표 2

[0073]

구분	커큐민 농도(중량%)			
	0	0.5	2	5
기공너비(㎛)	25.08	24.52	25.52	24.72
기공높이(㎛)	24.6	24.64	25.44	24.76

[0074] 표 1을 참고로 하면, 약물의 농도에 따라 기공의 크기가 증가되는 것을 확인하였으며, 7.5 중량% 이내의 농도에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편, 표 1 및 2를 참고로 하면, 마이크로스피어 제조 시, 에멀젼 안정화제의 유무 및 젤라틴의 농도가 마이크로스피어의 기공크기 형성에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0075] 시험예 1.2. 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope) 관측

[0076] 실시예 3의 마이크로스피어를 공초점 레이저 현미경으로 확인하였으며, 이를 하기 도 5에 나타내었다. 0.5 중량%의 커큐민이 함유된 마이크로스피어에 비해 5 중량%의 커큐민이 함유된 마이크로스피어에서 꽉 찬 내부를 관찰

할 수 있었다.

[0077] 시험예 1.3. 입자크기 및 기공도 확인

[0078] 실시예 3의 마이크로스피어의 입자크기 및 기공도를 확인하였으며, 이를 하기 표 3에 나타내었다. 입자의 크기는 200 내지 300 ㎛였으며, 기공도는 평균 81%를 나타내었다.

표 3

[0079]

구분	커큐민 농도 (중량%)			
	0	0.5	2	5
입자크기 (㎛)	210.63	215.63	217.51	216.72
기공도 (%)	81.27	81.20	80.82	81.06

[0080] 시험예 2. 약물 방출 거동 테스트

[0081] 시험예 2.1. 카르토게닌 방출 거동

[0082] 실시예 1에서 제조한 마이크로스피어의 약물방출 거동을 확인하였다. 구체적으로, 각각의 마이크로스피어를 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고, 37 ℃에서 100 rpm으로 교반하면서 시간(1시간, 3시간, 6시간, 10시간, 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일 및 28일)에 따른 약물 방출량을 확인하였으며, 측정 후에는 새로운 버퍼로 교환하였다. 방출된 약물은 459 nm에서 흡광도를 측정하여 방출량을 분석하였으며, 이를 하기 도 6에 나타내었다.

[0083] 도 6을 참고로 하면, 카르토게닌의 농도에 의존적으로 약물의 방출량이 증가하였다.

[0084] 시험예 2.2. 이부프로펜 방출 거동

[0085] 실시예 2에서 제조한 마이크로스피어의 약물 방출 거동을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 확인하되, 65일차까지 약물 방출 거동을 살펴보았다. 방출된 약물은 359 nm에서 흡광도를 측정하여 방출량을 분석하였으며, 이를 하기 도 7에 나타내었다.

[0086] 마이크로스피어에서 이부프로펜은 초기에는 빠른속도로 방출되다가 시간의 흐름에 따라 방출속도가 느려졌다. 방출속도는 43일 차까지는 농도에 영향을 크게 받지는 않는 경향을 보였다. 한편, 낮은 농도(이부프로펜 1중량% 농도)의 약물이 포함된 마이크로스피어에서는 65일 차에 내부의 약물이 대부분 방출되었으나, 높은 농도의 약물이 포함된 마이크로스피어에서는 65일차에 약 35%의 약물이 잔류하는 것을 확인하였다.

[0087] 시험예 2.3. 커큐민 방출 거동

[0088] 실시예 3에서 제조한 마이크로스피어의 약물 방출 거동을 확인하였다. 구체적으로, 각각의 마이크로스피어를 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고, 37 ℃에서 80 rpm으로 교반하면서 기간에 따른 약물 방출량을 1시간 후부터 65일 차까지 살펴보았다. 방출된 약물은 420 nm에서 흡광도를 측정하여 방출량을 분석하였으며, 이를 하기 도 8에 나타내었다.

[0089] 커큐민은 다른 약물과 마찬가지로 농도의존적으로 방출량이 증가하였으나, 총량대비 방출속도는 농도에 따른 차이는 보였지만 모두 초기(1일차)에 빠른 방출속도를 보이다가 서서히 방출하는 경향을 나타내었다.

[0090] 시험예 3. 염증 억제 효과 검증

[0091] 염증이 유도된 세포에 실시예 1 내지 3에 따른 마이크로스피어를 처리하고, 염증마커의 발현량을 측정하여 염증 억제 효과를 검증하였다.

[0092] 시험예 3.1 카르토게닌 함유 마이크로스피어

[0093] 실시예 1의 마이크로스피어에 1×10^5개의 줄기세포를 분주한 후, 염증 유도를 위해 IL-1β를 첨가하고 1일 및 3일 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세척하여 마이크로스피어로부터 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 1 분간 13,500 rpm으로 원심분리한 후, 트리졸 시약과 클로로포름을 세포에 주입한 뒤, 5분 동안 반응시켰다. 반응 후, 10분간 13,500 rpm으로 원심분리하였으며, 이중 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액과 이소프로판올을 1:1 부피비로 혼합한 뒤, 5분 동안 반응시켰으며, 반응 종료 후 10분간 13,500 rpm으로 원심분리하였다. 생성된 흰색 물질을 에탄올로 세척한 뒤, 상온에서 건조하고, 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 water를 이용하여 NanoDrop으로 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. RNA를 분리한

뒤, 분리된 RNA는 AccuPower® RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였으며, 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양을 측정하였다.

[0094] 도 9를 참조로 하면, MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양은 카르토게닌의 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0095] 시험예 3.2. 이부프로펜 함유 마이크로스피어

[0096] 상기 시험예 3.1과 동일한 방법을 사용하여 실시예 2의 마이크로스피어에 줄기세포를 분주한 후, IL-1β를 첨가하여 염증을 유도한 뒤 배양하고, 이의 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 AccuPower® RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였으며, 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α의 발현양을 측정하였다.

[0097] 도 10을 참조로 하면, 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α는 이부프로펜의 농도에 의존적으로 감소하였다.

[0098] 시험예 3.3. 커큐민 함유 마이크로스피어

[0099] 상기 시험예 3.1과 동일한 방법을 사용하여 실시예 3의 마이크로스피어에 1×10^5개의 힘줄세포(tenocyte)를 분주한 후, IL-1β를 첨가하여 염증을 유도한 뒤 배양하고, 이의 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 AccuPower® RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였으며, 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양을 측정하였다.

[0100] 도 11을 참조로 하면, 연부조직인 힘줄세포에서 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2 및 ADAMTS-5의 발현양은 커큐민의 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0101] 시험예 4. 연골 분화 촉진 실험

[0102] 실시예 1의 마이크로스피어에 1×10^5개의 줄기세포를 분주한 후, 연골분화 버퍼를 첨가하여 21일 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세척하여 마이크로스피어로부터 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 1 분간 13,500 rpm으로 원심분리한 후, 트리졸 시약과 클로로포름을 세포에 주입한 뒤, 5분 동안 반응시켰다. 반응 후, 10분간 13,500 rpm으로 원심분리하였으며, 이중 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액과 이소프로판올을 1:1 부피비로 혼합한 뒤, 5분 동안 반응시켰으며, 반응 종료 후 10분간 13,500 rpm으로 원심분리하였다. 생성된 흰색 물질을 에탄올로 세척한 뒤, 상온에서 건조하고, 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 water를 이용하여 NanoDrop으로 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. RNA를 분리한 뒤, 분리된 RNA는 AccuPower® RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였으며, 연골 분화 마커인 Aggrecan, COL1A1, COL2A1 및 COL10A1의 발현양을 측정하였다.

[0103] 도 12에 나타낸 바와 같이, 연골 분화 마커인 Aggrecan, COL1A1, COL2A1 및 COL10A1의 발현양은 카르토게닌의 농도에 의존적으로 증가하였다.

[0104] 시험예 5. in-vivo 테스트

[0105] MIA(monosodium iodoacetate) 50 ㎕를 주입하여 무릎 연골이 손상된 동물모델을 이용하여 실시예 2의 처리에 따른 연골 재생에 대한 효능을 검증하였다.

[0106] 190-210g 무게의 SPF(Specific Pathogene Free)급 6 주령 랫트 30 마리를 구입하여 1주간 적응기간을 두고 22±2℃, 55±10% 상대습도 및 12 시간 명암주기에서 고형사료와 수돗물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 무작위로 6개 그룹으로 나누었다. 무릎손상 1주일 후부터 8주간 약물을 처리하였다.

[0107] 정상군(Normal): 무처리군

[0108] 대조군(Control): 무릎손상 후, 증류수 투여군

[0109] 약물투여군: 무릎손상 후, 이부프로펜함유 마이크로스피어 200 μL 투여군(이부프로펜 농도 각 0, 1, 3 및 5% 함유)

[0110] 시험예 5.1. X-선 및 마이크로 CT 촬영

[0111] 실험 동물의 무릎을 X-선 및 마이크로 CT로 촬영하여 각각 하기 도 13 및 도 14에 나타내었으며, 무릎을 적출

하여 사진 촬영을 하여 도 14에 나타내었다.

[0112] a: 정상군, b: 대조군, c-f: 약물투여군(0, 1, 3, 5 중량%)

[0113] 도 13 내지 15를 참조로 하면, 대조군(b) 및 마이크로스피어 내 이부프로펜이 함유되지 않은 실험군(c)는 연골의 손상정도가 심각하였으나, 마이크로스피어 내 이부프로펜이 함유된 약물투여군(d-f)는 이부프로펜의 농도에 의존적으로 연골이 생성된 것을 확인할 수 있다.

[0114] 시험예 5.2. 조직학적 검사

[0115] 동물을 치사시킨 후 무릎을 적출하여 10% 포르말린으로 2주 동안 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 절편(5㎛)을 준비한 뒤, 헤마톡실린&에오신(Hematoxylin & eosin, H&E) 염색법과 사프라닌 O(Safranin O)염색법으로 염색하여 각각 하기 도 16 및 도 17에 나타내었다.

[0116] a: 정상군, b: 대조군, c-f: 약물투여군(0, 1, 3, 5 중량%)

[0117] 도 16 및 17을 참조로 하면, 대조군(b) 및 마이크로스피어 내 이부프로펜이 함유되지 않은 실험군(c)는 MIA 처리에 의해 연골이 소실되어 산처럼 솟은 것을 확인할 수 있다. 반면, 약물투여군군(d-f)에서는 이부프로펜의 농도에 의존적으로 연골이 생성된 것을 확인할 수 있다.

[0118] 연골의 손상정도가 심각하였으나, 마이크로스피어 내 이부프로펜이 함유된 약물 투여군(d-f)는 이부프로펜의 농도에 의존적으로 연골이 생성된 것을 확인할 수 있다.

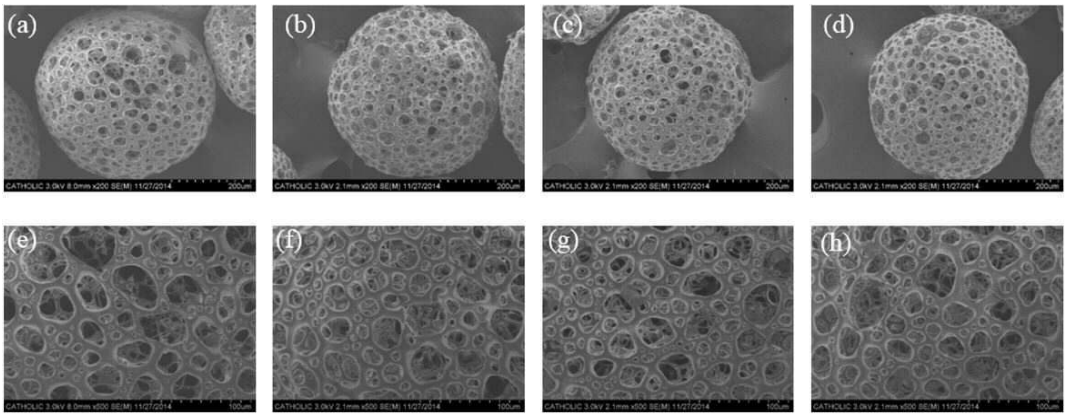
[0119] 시험예 5.3 혈액 내 염증 마커 발현 농도 검사

[0120] 실험동물의 복대동맥으로부터 획득한 혈액을 이용하여 염증성 사이토카인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α의 발현양을 측정하였으며, 이를 하기 도 18에 나타내었다.

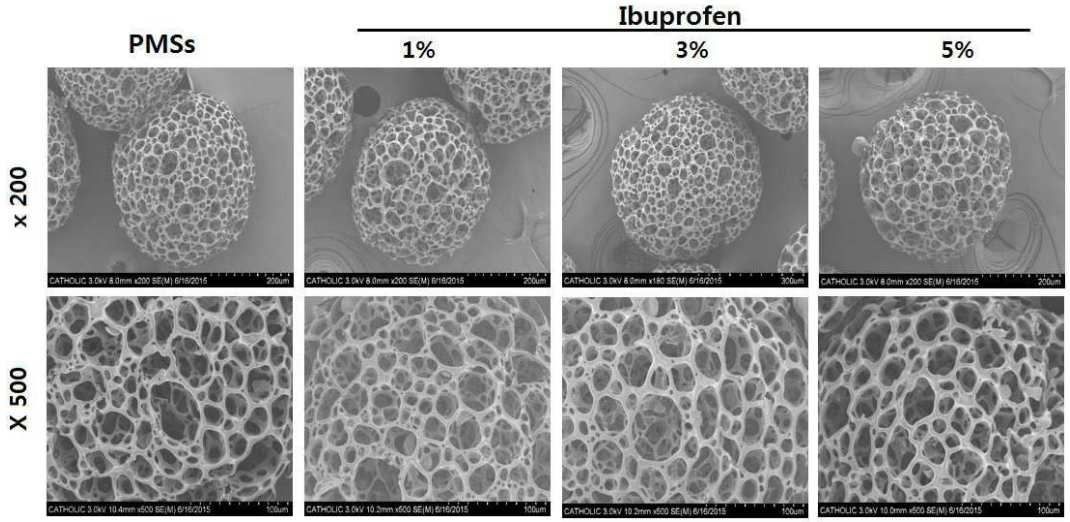
[0121] 인비트로 상에서와 마찬가지로 염증 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF-α는 이부프로펜의 농도에 의존적으로 감소하였다.

도면

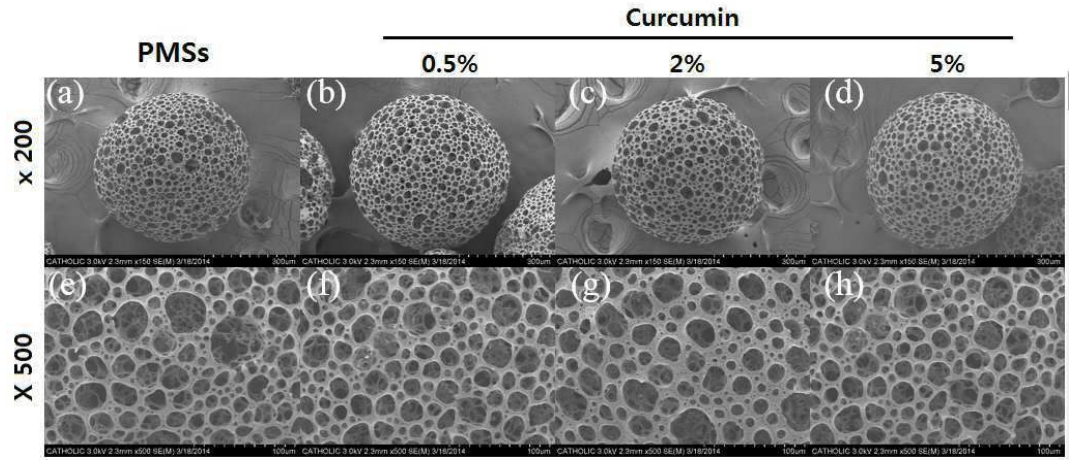
도면1



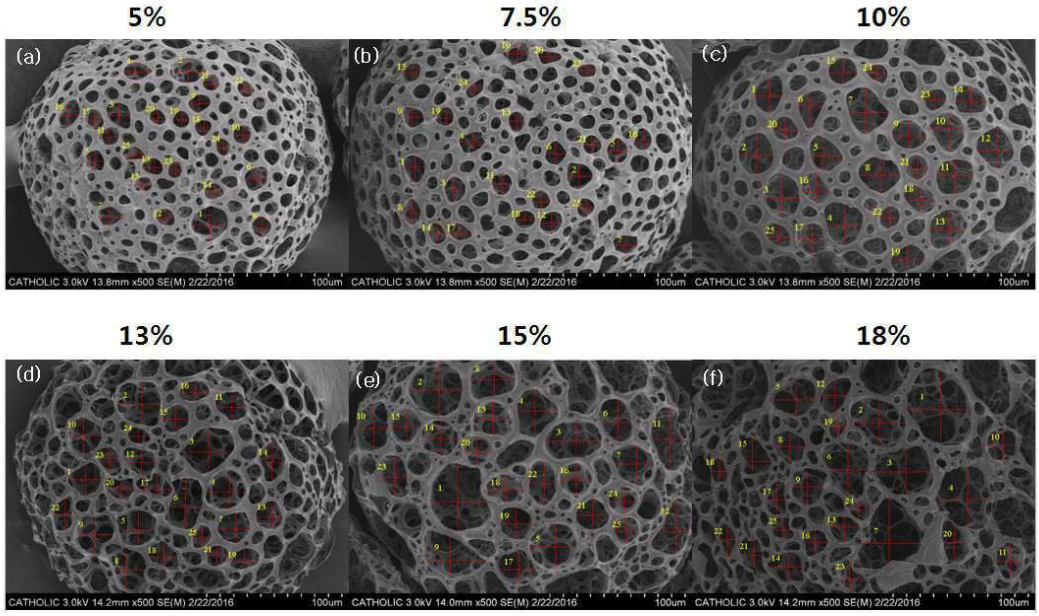
도면2


PMSs
Ibuprofen
1%
3%
5%
x 200
X 500

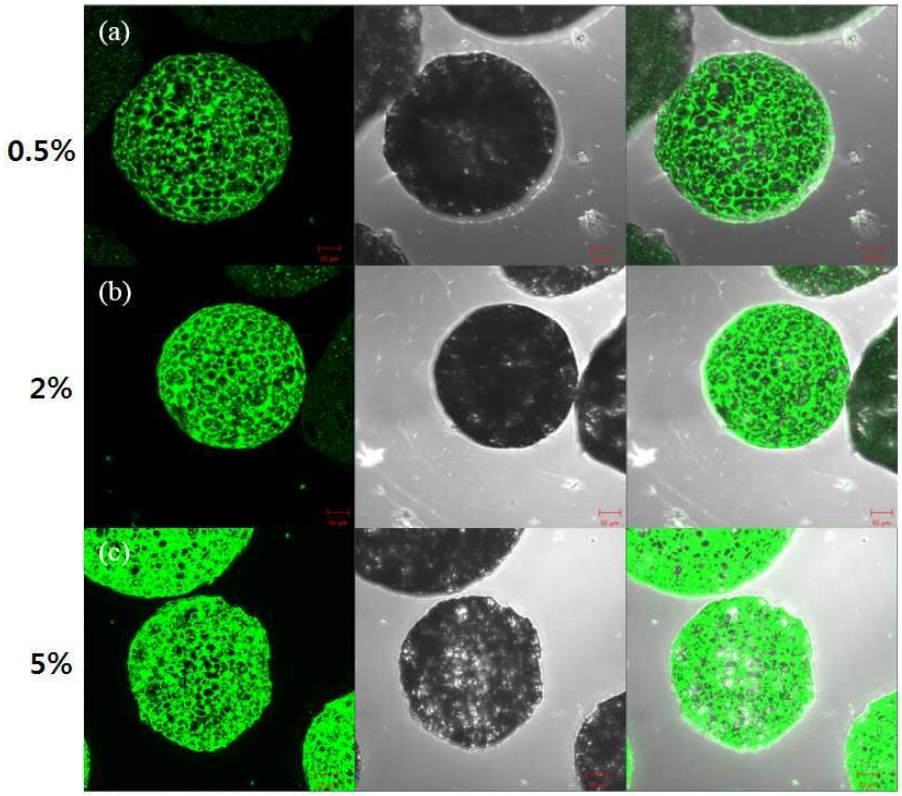
도면3


PMSs
Curcumin
0.5%
2%
5%
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
x 200
X 500

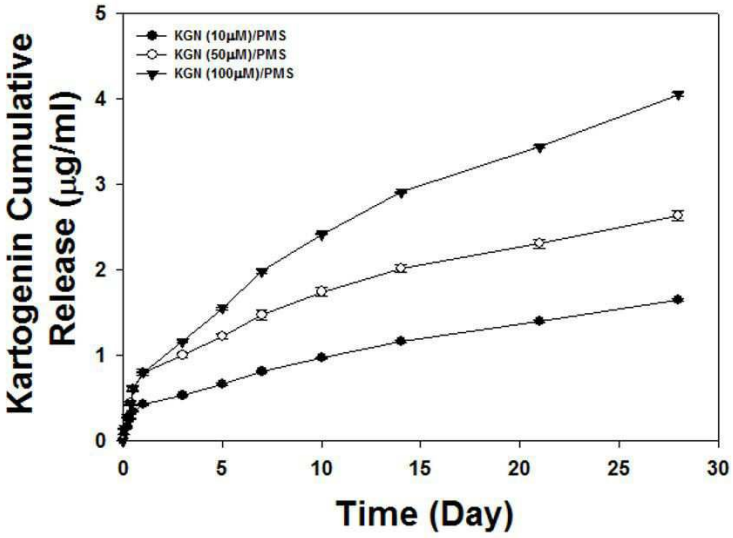
도면4



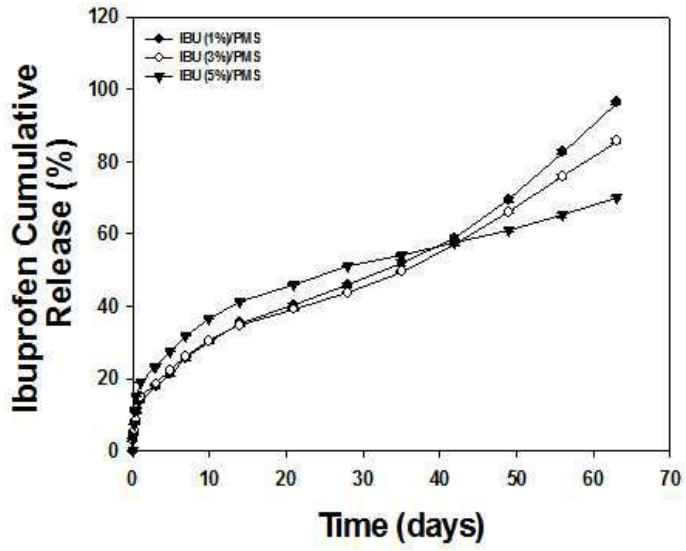
도면5



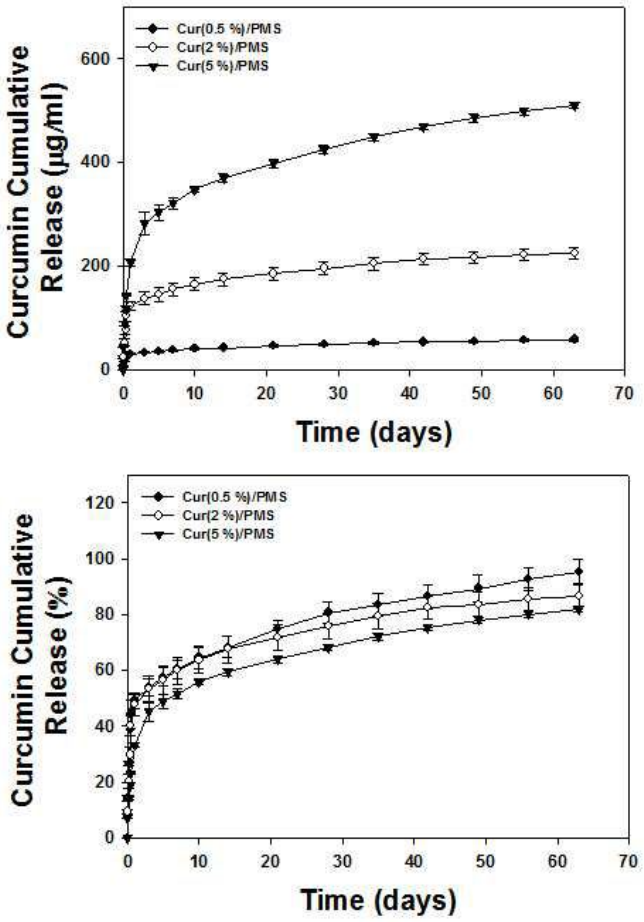
도면6


KGN (10μM)/PMS
KGN (50μM)/PMS
KGN (100μM)/PMS
Kartogenin Cumulative Release (μg/ml)
Time (Day)
0
1
2
3
4
5
0
5
10
15
20
25
30

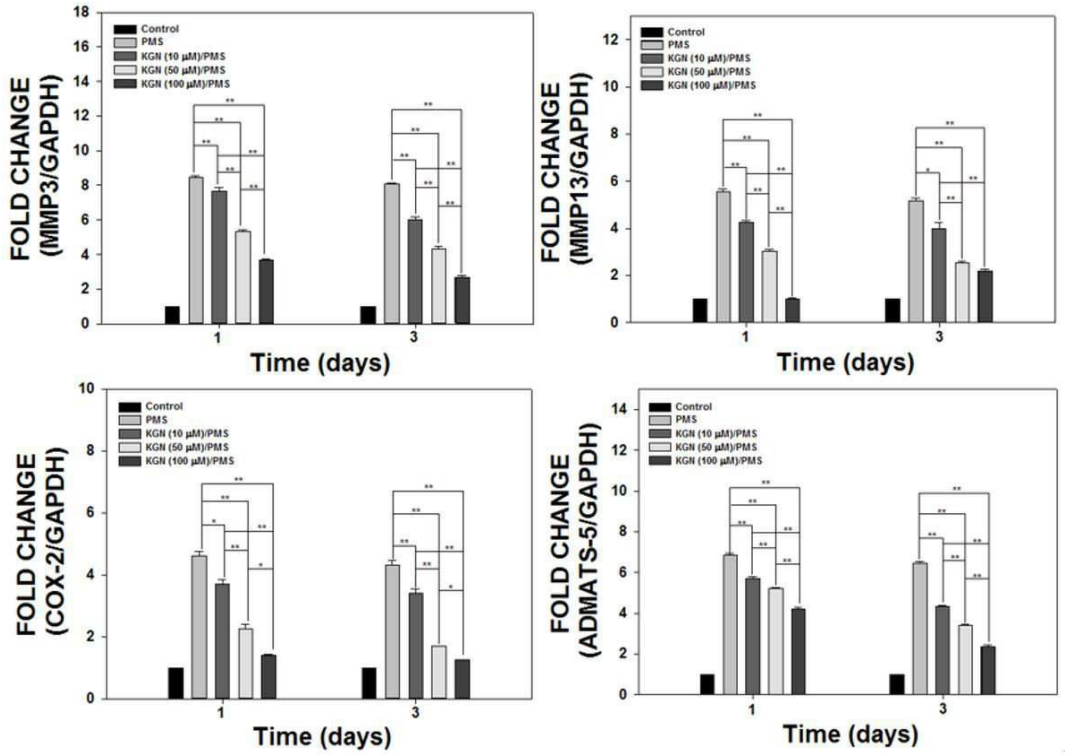
도면7


IBU (1%)/PMS
IBU (3%)/PMS
IBU (5%)/PMS
Ibuprofen Cumulative Release (%)
Time (days)
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
40
50
60
70

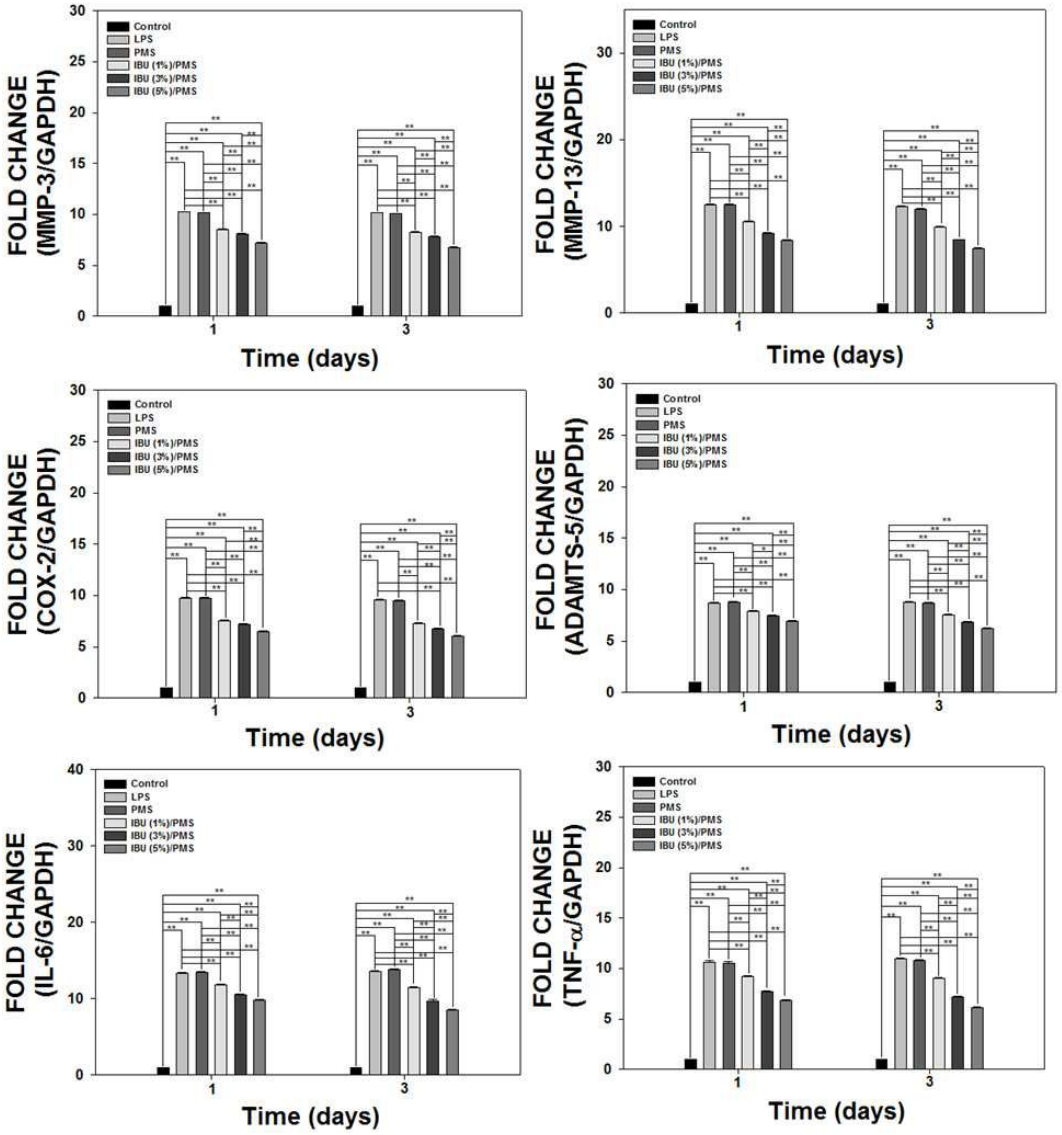
도면8


Cur(0.5 %)/PMS
Cur(2 %)/PMS
Cur(5 %)/PMS
Curcumin Cumulative Release (μg/ml)
Time (days)
Cur(0.5 %)/PMS
Cur(2 %)/PMS
Cur(5 %)/PMS
Curcumin Cumulative Release (%)
Time (days)

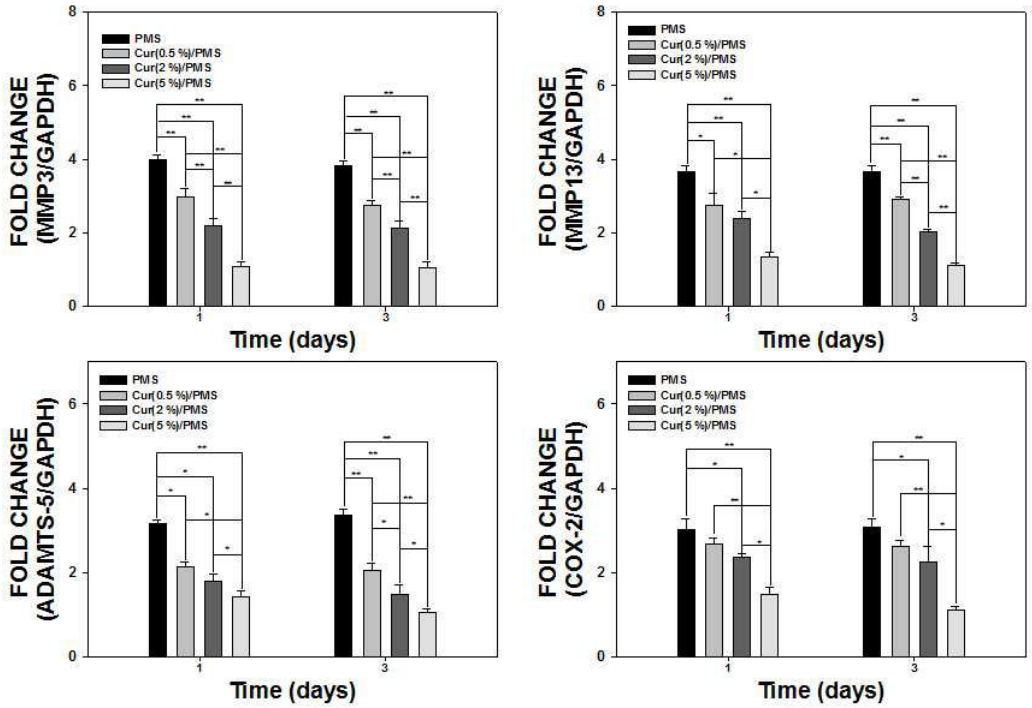
도면9


FOLD CHANGE (MMP3/GAPDH)
FOLD CHANGE (MMP13/GAPDH)
FOLD CHANGE (COX-2/GAPDH)
FOLD CHANGE (ADMATS-5/GAPDH)
Control
PMS
KGN (10 μM)/PMS
KGN (50 μM)/PMS
KGN (100 μM)/PMS
Time (days)

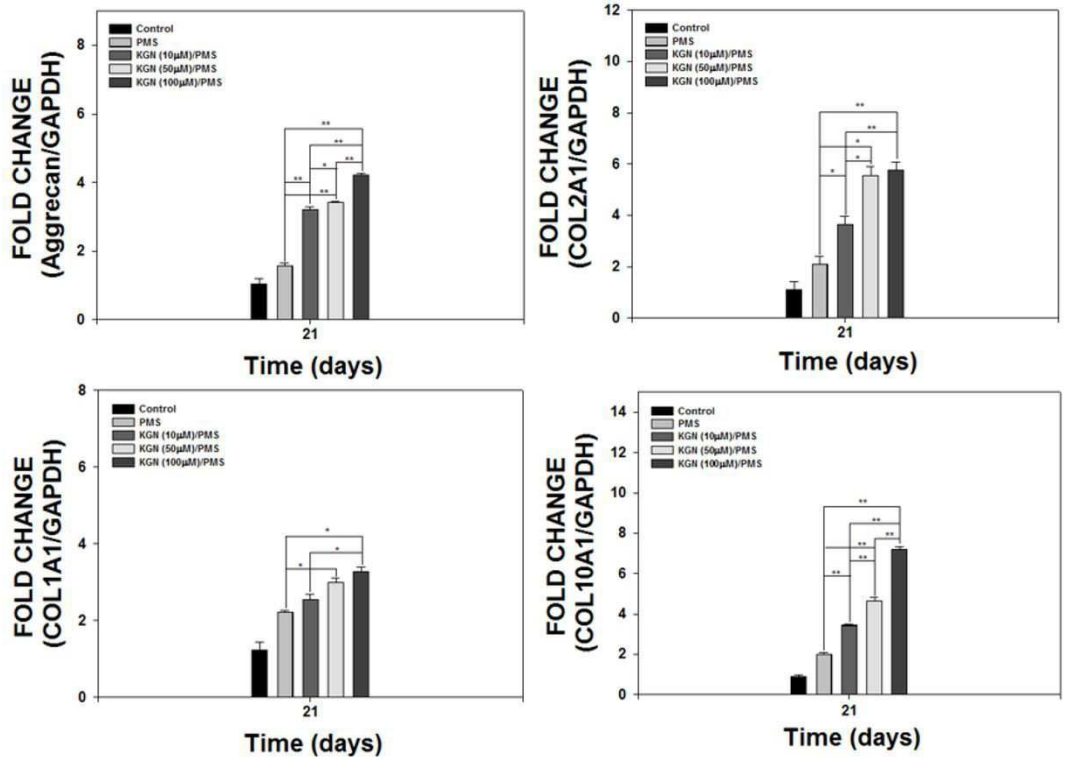
도면10


FOLD CHANGE (MMP-3/GAPDH)
FOLD CHANGE (MMP-13/GAPDH)
FOLD CHANGE (COX-2/GAPDH)
FOLD CHANGE (ADAMTS-5/GAPDH)
FOLD CHANGE (IL-6/GAPDH)
FOLD CHANGE (TNF-α/GAPDH)
Control
LPS
PMS
IBU (1%)/PMS
IBU (3%)/PMS
IBU (5%)/PMS
Time (days)

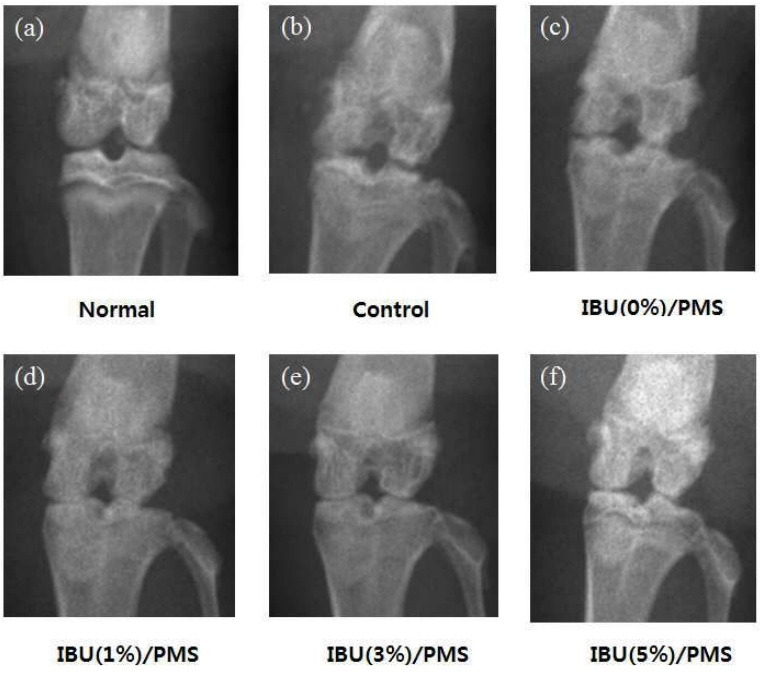
도면11


PMS
Cur(0.5 %)/PMS
Cur(2 %)/PMS
Cur(5 %)/PMS
FOLD CHANGE (MMP3/GAPDH)
FOLD CHANGE (MMP13/GAPDH)
FOLD CHANGE (ADAMTS-5/GAPDH)
FOLD CHANGE (COX-2/GAPDH)
Time (days)

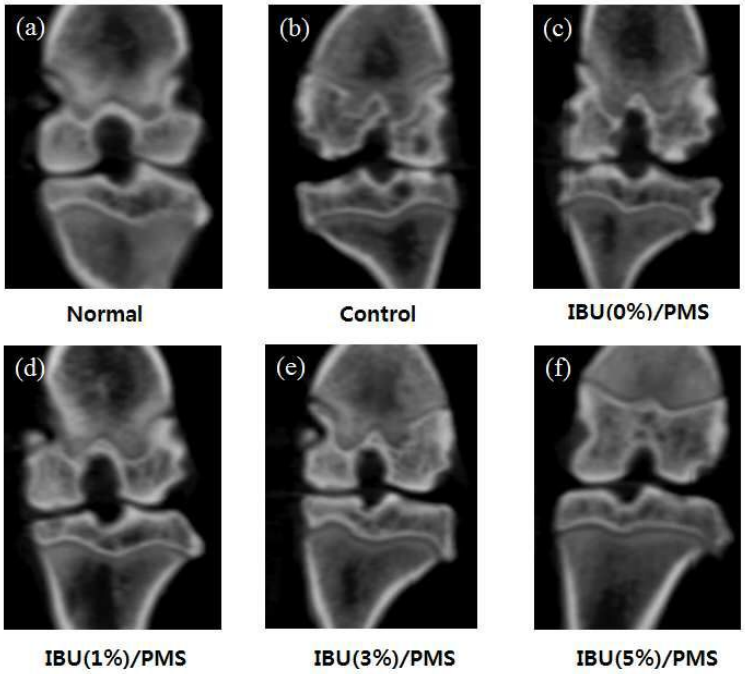
도면12


Control
PMS
KGN (10μM)/PMS
KGN (50μM)/PMS
KGN (100μM)/PMS
FOLD CHANGE (Aggrecan/GAPDH)
FOLD CHANGE (COL2A1/GAPDH)
FOLD CHANGE (COL1A1/GAPDH)
FOLD CHANGE (COL10A1/GAPDH)
Time (days)

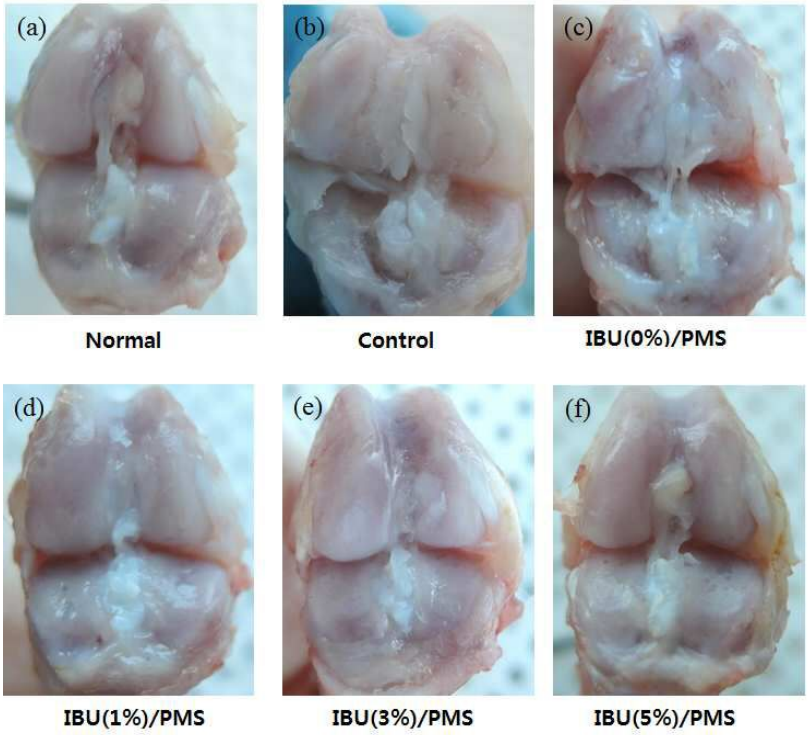
도면13


(a)
(b)
(c)
Normal
Control
IBU(0%)/PMS
(d)
(e)
(f)
IBU(1%)/PMS
IBU(3%)/PMS
IBU(5%)/PMS

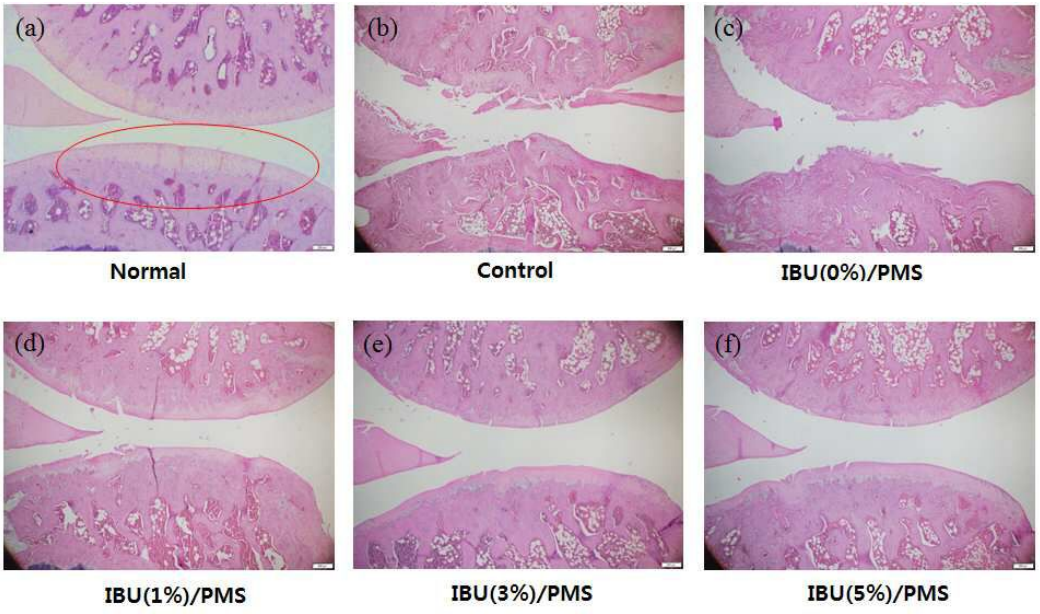
도면14


(a)
(b)
(c)
Normal
Control
IBU(0%)/PMS
(d)
(e)
(f)
IBU(1%)/PMS
IBU(3%)/PMS
IBU(5%)/PMS

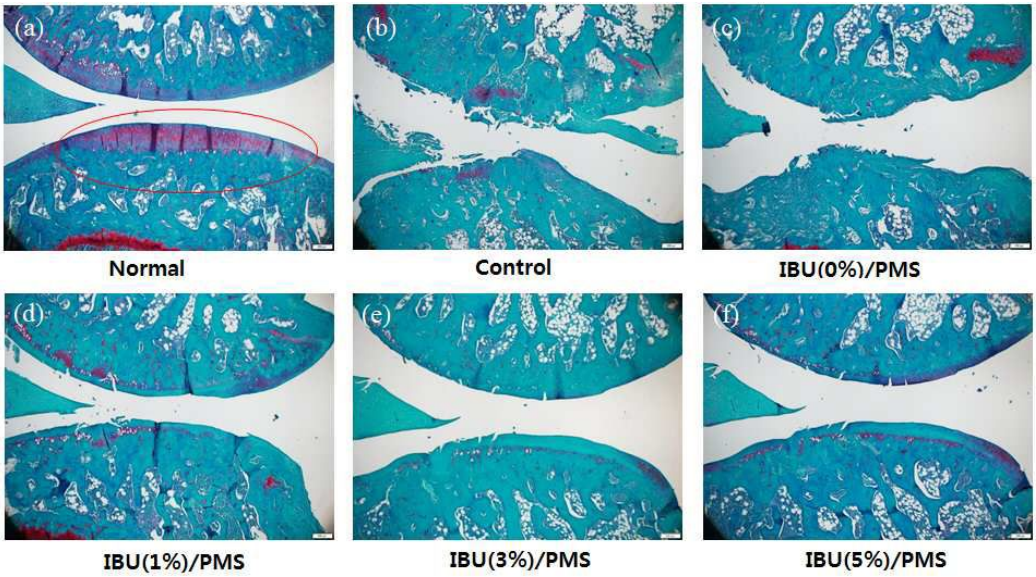
도면15


(a)
(b)
(c)
Normal
Control
IBU(0%)/PMS
(d)
(e)
(f)
IBU(1%)/PMS
IBU(3%)/PMS
IBU(5%)/PMS

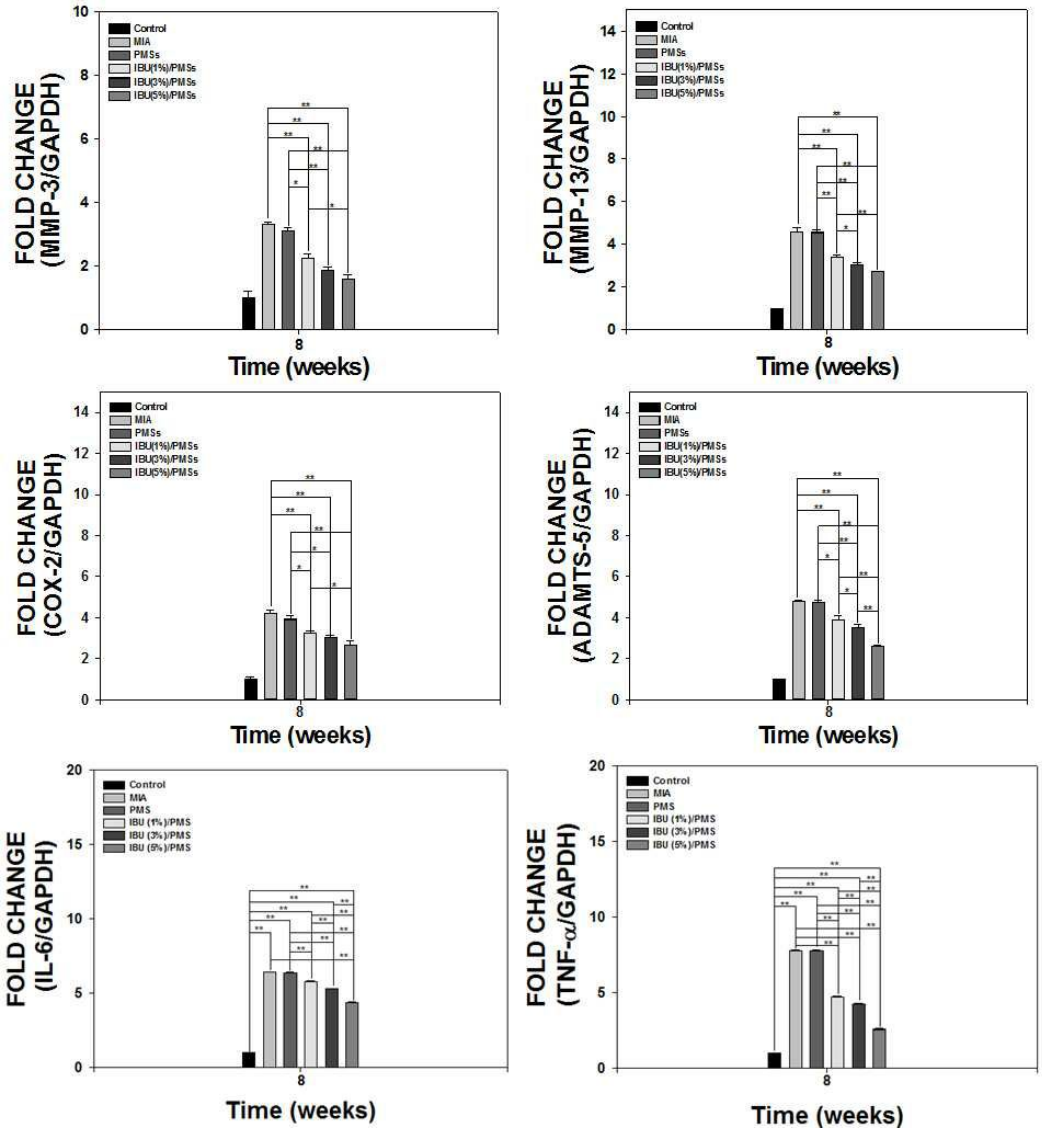
도면16


(a)
(b)
(c)
Normal
Control
IBU(0%)/PMS
(d)
(e)
(f)
IBU(1%)/PMS
IBU(3%)/PMS
IBU(5%)/PMS

도면17


(a)
(b)
(c)
Normal
Control
IBU(0%)/PMS
(d)
(e)
(f)
IBU(1%)/PMS
IBU(3%)/PMS
IBU(5%)/PMS

도면18


FOLD CHANGE (MMP-3/GAPDH)
FOLD CHANGE (MMP-13/GAPDH)
FOLD CHANGE (COX-2/GAPDH)
FOLD CHANGE (ADAMTS-5/GAPDH)
FOLD CHANGE (IL-6/GAPDH)
FOLD CHANGE (TNF-α/GAPDH)
Control
MIA
PMSs
IBU(1%)/PMSs
IBU(3%)/PMSs
IBU(5%)/PMSs
Time (weeks)