(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0018148
(43) 공개일자 2021년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/765 (2006.01) *A61K 31/785* (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01) *A61K 9/14* (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/765 (2013.01)
A61K 31/785 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0098722
(22) 출원일자 2020년08월06일
심사청구일자 2020년08월06일
(30) 우선권주장
1020190096181 2019년08월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
류재준
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 삼풍아파트 16동 1409호
심지석
서울특별시 양천구 목동동로 270 목동3차월드메르디앙 301-1006
김원종
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 4동 403호(지곡동,교수아파트)
(74) 대리인
특허법인 다해

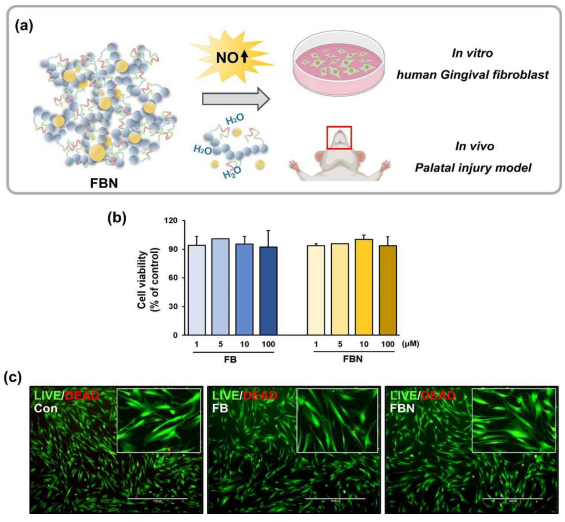
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물 및 구강 점막염 치료제**

(57) 요 약

본 발명에 따른 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물 및 구강 점막염 치료제에 관한 것으로, 상기 일산화질소 복합체는 HGF-1(human gingival fibroblast-1)를 활성화시킬 수 있어, 구강 점막염을 용이하게 치료할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 33/00 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
A61P 1/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345264522
과제번호	2017R1D1A1B03036033
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학 개인기초 연구
연구과제명	치주질환 치료제로서 일산화질소의 유용성에 대한 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

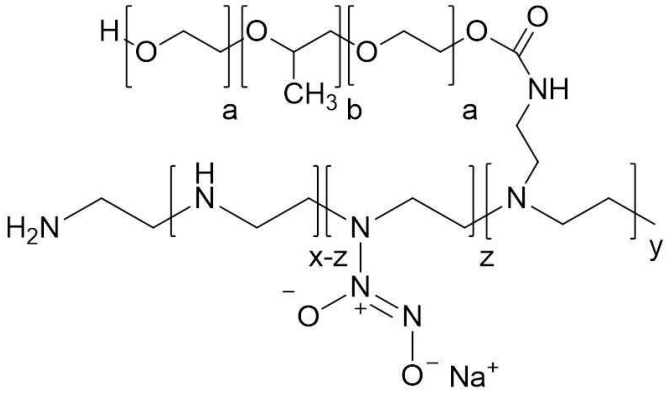
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에서,

a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 구강 점막염 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은, 세포의 이주 능력 및 세포 분열 능력 증진의 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 구강 점막염 치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 따른 구강 점막염 치료용 조성물을 포함하는 구강 점막염 치료제.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

구강 점막염 치료제는, 구강 점막염 치료용 조성물이 0.5 내지 100 μM 농도로 포함되는 것인 구강 점막염 치료제.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

구강 점막염 치료제는, 분말, 액체, 젤 또는 현탁액 형태인 구강 점막염 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물 및 구강 점막염 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 점막염은 가벼운 염증에서 깊게는 궤양에 걸치며, 그리고 입에서 항문까지에 있는 소화관 중 하나 또는 그 이상의 부위에 영향을 미치는 점막의 손상을 특징으로 하는 병적 상태이다. 점막염은 일반적으로 암과 같은 질병 치료의 부작용으로 발생한다. 화학요법에 대한 반작용으로 인한 세포 사멸의 결과로서, 구강이 얇아지는 것처럼 소화관의 점막 내층에 염증 및 궤양이 생길 수 있다. 머리와 목 또는 골반 또는 복부의 방사선 치료는 또한 구강 또는 위장 점막염을 야기할 수 있다. 구강 및 위장(GI) 점막염은 고용량의 화학요법 및 조혈 줄기세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)을 받는 많은 환자들에게서 발생한다. 구강 점막염은 전신 방사선 조사를 받은 HSCT 환자들 사이에서 특히 심각하고, 장기간 지속되었다.

[0004] 치료로 유발된 점막염은 암 치료에 의한 심신의 극도 쇠약 그리고 고질적 부작용 중의 하나이며, 환자 삶의 질에 영향을 미친다. 구강 점막염은 대개는 홍반 및/또는 점막의 궤양을 포함하는 것으로 설명된다. 심한 경우에는, 환자는 고형 식품을 먹을 수 없고, 그리고 또한 심지어 액체도 마실 수 없어서, 완전 비경구영양법(total parenteral nutrition, TPN)을 필요로 하는 결과를 야기한다.

[0005] 현재까지, 점막염의 치료는 주로 지지적이다. 구강 위생은 치료의 중심축이다. 현재, 모든 임상 현장에서 점막염을 지속적으로 예방하는 승인된 예방제 또는 치료제는 없다. 팔리퍼민(Palifermin) 또는 재조합 인간 각질세포 생장인자(human recombinant keratinocyte growth factor, KGF)는 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받는 환자에 서 구강 점막염의 이환수(incidence), 기간 및 심각성을 상당히 저하시키고, 그리고 자가 또는 동종의 조혈모 세포이식을 하며, 전신 방사선 치료를 수반하거나 수반하지 않는 고용량의 화학요법을 받는 혈액암 환자들에게 사용되는데 승인되어 왔다. 저출력 레이저 요법(Low-level laser therapy, LLLT)은 구강 점막염의 심각성을 줄일 수 있는 다른 치료법이다. 그것은 저에너지 레이저를 감염된 조직에 집속하는 것을 수반한다. LLLT는 회복 과정을 가속화하는데 도움이 되는 어떤 세포를 자극함으로써, 작용하는 것으로 생각된다. 게다가, 겔클레어(Gelclair®) 및 질락틴(Zilactin®)의 두 치료제들은 점막을 코팅하고, 노출된 신경 종말들을 위해 보호막을 형성함으로써, 동작하는 점막 보호제들이다. 임상 시험에서, 이러한 치료제들은 통증 조절 및 먹고 말하는 능력을 향상시켰다. 방사선에 의해 야기되는 점막 손상에 대항하는 몇 가지 보호를 제공하는 약인 아미포스틴(Amifostine, Ethyol®)은 머리와 목의 암에 대한 방사선 치료를 받는 환자들에 대해서 FDA에 의해 승인되었다. 연구들에 의하면 아미포스틴이 구강 건조증을 줄일 수 있고, 점막염의 정도를 예방하거나 줄일 수 있다고 입증되었다. 그러나 점막염을 예방 또는 치료하기 위한 방법은 불충분하고 그리고 통증, 감염, 출혈 및 영양의 조절이 제한되었다. 점막염, 특히 암환자들의 점막염을 예방하거나 치료하기 위한 연구개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0761051호

발명의 내용

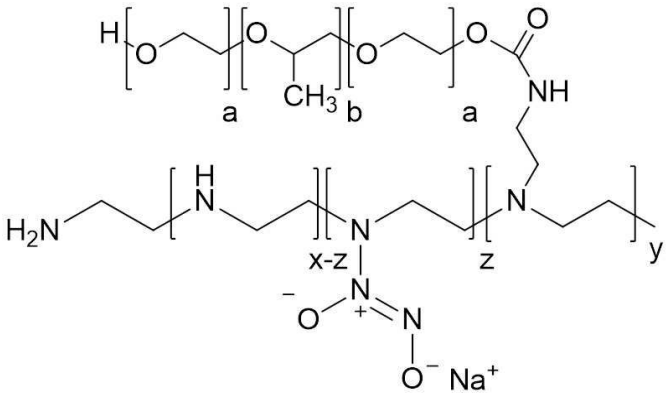
해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 구강 점막의 연속적인 단절되는 상태의 치유를 촉진하기 위한 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 구강 점막염 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 구강 점막염 치료용 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함한다:

[0011] [화학식 1]

[0012] 

[0013] 화학식 1에서,

[0014] a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

[0015] x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 의 활성을 증가시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 세포의 이주 능력 및 세포 분열 능력 증진의 효과를 갖는다.

[0019] 아울러, 본 발명은 앞서 설명한 구강 점막염 치료용 조성물을 포함하는 구강 점막염 치료제를 제공한다.

[0020] 상기 구강 점막염 치료제는, 구강 점막염 치료제는, 구강 점막염 치료용 조성물이 0.5 내지 100 μM 농도로 포함될 수 있으며, 상기 구강 점막염 치료제는, 분말, 액체, 젤 또는 현탁액 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물 및 구강 점막염 치료제는 창상치유, 혈관확장, 혈관생성, 면역능력 등의 상처치유에 도움을 줄 수 있는 효과가 있다. 특히, 세포 실험에서 치은을 구성하는 세포인 human gingival fibroblast-1(HGF-1)가 일산화질소 복합체에 의해 활성화될 수 있다.

[0023] 이에 따라, 본 발명에 따른 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물은 구강 점막염 치료에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1(a)는 실험예 1에서 HGF-1의 세포 독성 테스트를 위한 실험 설계의 개략도이며, 도 1(b)는 상기 HGF-1의 세포 독성 테스트에서 24 시간 동안 상이한 농도의 FB 및 FBN 으로 처리된 HGF-1 의 세포 생존력을 보여주는 그래

프이고, 도 1(c)는 24 시간 동안 5uM FB 및 FBN 배지에서 배양 된 HGF에서 LIVE (녹색) 및 DEAD (적색) 염색의 형광 이미지를 보여주는 사진이다.

도 2(a)는 실험예 2에서 HGF-1을 웰 플레이트에 분주하고, 배양된 세포에 FB 및 FBN 을 각각 처리한 후, 시간에 따른 세포들의 이동양상(cell migration assay)를 보여주는 도면이며, 도 2(b) 는 스크래치난 영역에서 이도한 세포의 수를 보여주는 그래프이다.

도 3(a)는 실험예 3에서 생체 내 물질 처리에 따른 실험 설계를 보여주는 도면이며, 도 3(b)는 실험예 3에서 동물 모델의 실험 과정을 개략적으로 보여주는 도면이다.

도 4(a)는 실험예 3에서 rat 의 구강 궤양 영역을 보여주는 이미지이며, 도 4(b)는 상기 rat 의 구강 궤양 영역의 상처 치유율을 보여주는 그래프이며, 도 4(c)는 rat 의 구강 궤양 후 14일째의 HE 염색 이미지를 보여주는 사진이다.

도 5은 rat 의 구강 궤양 후 14일에 (a) CK-14, (b) Ki-67 및 (c) a-SMA 항체에 의해 검출 된 면역 조직 화학 이미지를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.

[0027] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0028] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0029] 본 발명에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0031] 본 발명은 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물 및 구강 점막염 치료제에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따른 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물은 박테리아뿐만 아니라 진균에 대한 탁월한 항균효과를 지니고 있다. 또한, 창상치유, 혈관확장, 혈관생성, 면역능력 등의 상처치유에 도움을 줄 수 있는 효과가 있다. 특히, 세포 실험에서 치은을 구성하는 세포인 human gingival fibroblast-1(HGF-1)가 일산화질소 복합체에 의해 활성화될 수 있다.

[0033] 이에 따라, 본 발명에 일 실시예에 따른 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물은 구강 점막염 치료에 우수한 효과가 있다.

[0035] 설명에 앞서, 본 발명에서 사용하는 용어, "구강"은 입술, 잇몸(치은), 경질 및 연질 입천장, 목젖, 구개편도, 치아, 볼 내측, 혀 및 혀유두를 포함하는 입 구멍 전체를 의미하는 것으로 의도된다.

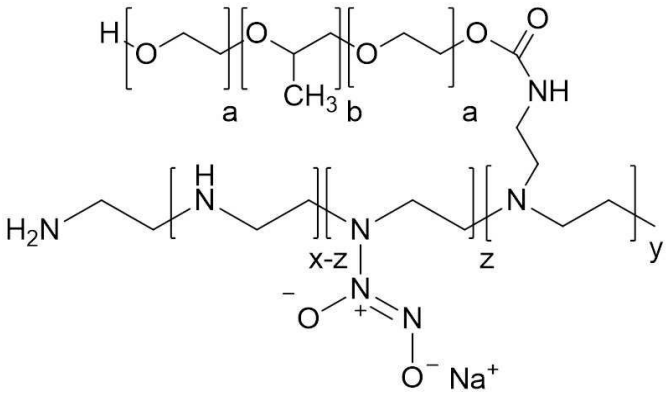
[0036] 본 발명에서 사용하는 용어, "구강 점막염" (oral mucositis)은 고통스러운 징후 복합체 및 감염과 출혈의 가능한 발생과 연관된, 감소된 상피 두께, 강렬한 홍반 및 궤양의 존재로 특징 지워지는 구강에서의 임상 상태를 의미하는 것으로 이해되고, 경우에 따라 구내염 및 구강 점막 궤양을 포함한다

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "구강 내 점막 궤양"은 구내염(stomatitis)이라고도 하며, 이에 한정되는 것은 아니지만 구강 내 세균, 바이러스, 곰팡이 등에 의한 감염으로 인해 구강 내 점막(혀, 잇몸, 입술, 볼 안쪽 등)에 염증이 생기는 질환을 포함하며, 상기 세균은 스트렙토코커스(Streptococcus) 속, 포피로모나스(Porphyromonas) 속 등의 세균일 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료"란 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이 든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 치료는 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리키며, 치료할 필요가 있는 것들은 이 미 질환을 가지고 있는 상태뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 또한 본 발명의 구강 점막염 치료용 조성물을 개체에 투여하여 구강 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0040] 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표시되는 일산화질소 복합체를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물을 제공한다:

[0042] [화학식 1]



[0043]

[0044] 화학식 1에서,

[0045] a 및 b 는 반복단위를 나타내고, a 는 2 내지 130 이며, b 는 15 내지 70 이며,

[0046] x, y 및 z 는 반복단위를 나타내고, x+z 는 100 이며, x는 50 내지 99, y는 1 내지 10 이다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따르면, a는 78 일 수 있으며, b 는 30 일 수 있다. 아울러, y는 1일 수 있다. 이때, x 및 z 가 반복단위의 몰% 를 나타낼 때, x+z 는 100 이며, x 는 50 내지 99 일 수 있다. 이는, 최대 50 mol% 의 z 가 NONOates 형성에 참여할 수 있다는 것을 바탕으로 산정할 수 있다.

[0048] 나아가, 본 발명에 따른 일산화질소 복합체를 형성하기 위해 사용되는 유기분자는 2차 아민기를 포함하는 물질이면 제한없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 2차 아민기를 가지고 있는 피롤리딘(pyrrolidine), 디에틸트리아민(diethyltriamine), 디에틸아민(diethylamine) 등이 사용될 수 있다. 또한 고분자 물질의 경우 고분자의 주쇄 또는 측쇄 내에 2차 아민기를 함유하고 있는 고분자의 형태를 가지고 있으며, 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine) 또는 폴리에틸렌이민을 포함하고 있는 고분자, 그 외에 2차 아민기를 가질 수 있도록 개량된 고분자 등일 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면 구강 점막염 치료용 조성물에 포함되는 일산화질소 복합체는 HGF-1(human gingival fibroblast-1) 를 활성화 시킬 수 있어, 구강점막염 치유를 촉진시킬 수 있는 효과가 있다. 구체적인 일 실시예에서, HGF-1 세포를 포함하는 배지에 본 발명에 따른 일산화탄소 복합체를 첨가하여 배양한 후, 세포의 생존능을 평가하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 일산화탄소 복합체를 처리한 배지에서 세포의 생존능을 확인할 수 있었다.

[0050] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 구강 점막염 치료용 조성물은 세포의 이주 능력 및 세포 분열 능력 증진의 효과를 갖는다. 구체적인 일 실시예에서, HGF-1 세포를 포함하는 배지에 본 발명에 따른 일산화탄소 복합체를 첨가하여 배양한 후, 세포의 형태학적 변화를 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 일산화탄소 복합체를 처리한 배지에서 상기 세포는 형태학적 차이가 발견되지 않아, 본 발명의 조성물은 세포독성 없이 세포의 이주

능력과 세포 분열 능력을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0051] 아울러, 구강 점막염이 발생된 동물모델을 이용하여 조직학적 염증의 회복, 세포사멸 회복효과 등의 유의한 변화를 확인할 수 있었다.

[0053] 본 발명은 일 실시예에서, 구강 점막염 치료용 조성물을 포함하는 구강 점막염 치료제를 제공한다.

[0054] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 구강 점막염 치료용 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 구강 점막염 치유를 촉진시킬 수 있는 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 있다. 바람직하게는 구강 점막염 치료제로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다.

[0055] 구강 점막염 치료제로 사용하는 경우, 상기 구강 점막염 치료용 조성물은 구강 점막염 치료제 내에 0.5 내지 100㎛M 농도로 포함될 수 있다. 상기 구강 점막염 치료용 조성물은 구강 점막염 치료제 내에 1 내지 100㎛M, 1 내지 50㎛M, 1 내지 25㎛M, 1 내지 10㎛M 범위 또는 5㎛M 일 수 있다. 다만, 치료 조건에 따라 농도를 다르게 결정해야 한다. 아울러, 용매로는 생리식염수, PBS (phosphate buffer saline)를 사용할 수 있으며, 예를 들어, DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)를 사용할 수 있다. 만일, 상기 조성물이 혼합제제 내에서 0.5 ㎛M 농도 미만인 경우에, 세포활성도를 증진할 수 없으며, 100㎛M 농도를 초과하는 경우에는 세포독성의 문제가 발생할 수 있다.

[0056] 상기 구강 점막염 치료제는, 분말, 액체, 젤 또는 현탁액 형태일 수 있으며, 상기 구강 점막염 치료제는 분말형태인 경우, 저온 보관을 통해 장기간 보관을 할 수 있다. 특정 양태로서, 일정양의 용액과 분말을 각각 용기에 보관할 수 있으며, 혼합 후 면봉 등을 통해 구강 내에 적용할 수 있다.

[0058] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명에 대해 설명하고자 한다. 다만, 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 하기 실시예로 한정하는 것은 아니다.

[0060] **<실시예>**

[0061] **실시예 1. F68-BPEI-NO(FBN) 합성**

[0062] 먼저, 40 mL 의 DCM(dichloromethane)에 용해된 1.79g 의 pNPC(4-nitrophenyl chloroformate)를 10g의 Pluronic F68(pNPC-F68)을 함유하는 DCM 50 mL에 적가하여 상기 Pluronic F68을 활성화하였다. 밤새도록 교반한 후, pNPC 를 23.2 mL 의 DCM에 용해시켜 BPEI(branched polyethyleneimine) 를 생성시켰다. 그 후, 1.76g 의 BPEI 1.8k 를 6mL 의 TEA가 함유된 40 mL 의 DCM에 용해시키고, 혼합물을 0 ℃에서 15분 동안 교반하였다. 교반 후, F68-pNPC 용액을 BPEI 함유 용액에 적가하였다. 생성된 용액을 밤새 교반한 후, 실온으로 온도를 상승시켰다. 반응 후, 생성물을 차가운 디에틸에테르(diethyl ether)로 침전시켜 정제하였다. 나머지 BPEI 는 제거한 후 최종 생성물을 동결 건조하여 저장하였다.

[0063] 그리고, 2차 아민 부분에 NONOates 를 첨가하여 각 전구체(pyrrolidine, diethylenetriamine 및 F68-BPEI)로부터 py-NO, DETA-NO 및 F68-BPEI-NO (FBN) 를 합성하였다.

[0064] 구체적으로, 1.64 mL의 피롤리딘을 5 mL의 아세토 니트릴, 5 mL 의 에테르 및 3.9 mL 의 30% NaOMe 과 혼합하였다. 그리고, 0.52 mL 의 디에틸렌 트리 아민을 15 mL 의 아세토 니트릴 및 0.9mL 의 NaOMe 용액과 혼합하였다.

[0065] 그리고, 20 mL의 메탄올에 용해된 F68-BPEI를 3mL 의 테트라 하이드로푸란 및 0.2 mL 의 30% NaOMe 용액과 혼합하였다.

[0066] 각각의 전구체 함유용액을 아르곤 퍼징을 갖는 고압의 NO 반응기에 넣었다. 그리고 반응기를 즉시 90 psi 의 NO 가스로 채우고 이 압력에서 3일동안 유지하여 디아제늄디올레이트(diazeniumdiolates)를 기능화시켰다. Py-NO 및 DETA-NO 를 여과에 의해 수집하고, 디에틸 에테르로 침전시켜 최종 F68-BPEI-NO 를 얻었다.

[0068] **<비교예>**

[0069] **비교예 1. F68-BPEI(FB) 합성**

[0070] 2차 아민 부분에 NONOates 를 첨가한 것을 제외하곤, 실시예 1에 개시된 동일한 방법으로 F68-BPEI 를 합성하였다.

[0072] **<실험예>**

[0073] **실험예 1. HGF-1 의 세포 독성 분석**

[0074] 도 1(a)는 실험예 1에서 HGF-1의 세포 독성 테스트를 위한 실험 설계의 개략도이다. 도 1(a)에 나타낸 바와 같이, 실험예 1에서는 실시예 1의 FBN이 구강 상처 치유의 생물학적 효과를 평가하기 위하여, 인간치은섬유아세포(HGF-1, human gingival fibroblast)와 생쥐의 구개 부상 모델을 사용하여 체외 및 생체 실험을 설계하였다.

[0075] 먼저, HGF-1 세포는 ATCC (CRL-2014)에서 구입하여 사용하였으며 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 세포 배양배지에 10% fetal bovine serum와 1% 의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 배지에서 37℃ 5% CO_2 세포 배양기에서 배양하였다. 그리고, 1×10^4 cells/well 의 밀도의 96-well 플레이트의 배지에 상기 세포를 분주하고, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0076] 그리고, DPBS 에 용해된 FB 및 FNB 를 각각의 세포 배지에 첨가하고, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0077] 이어서, 배지 중의 10% 세포 계수 키트-8(CCK-8, Dojindo, Japan) 용액을 각 웰에 첨가하고, 37 ℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 각각의 웰로부터, 100㎕의 배지를 마이크로 플레이트 리더(BioTek, USA)를 사용하여 450nm의 파장에서 측정 하였다. 이때, 대조군은 배지에서 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline) 만 처리한 세포의 생존능으로 설정하였다. 구체적으로, FB 및 FBN 에서 HGF-1 의 세포 독성을 평가하기 위하여, 24 시간 동안 FB 및 FBN 으로 배양된 세포로부터 세포의 생존능을 측정하였다. 그리고, 그 결과를 도 1(b)에 나타내었다.

[0078] 도 1(b)는 상기 HGF-1의 세포 독성 테스트에서 24 시간 동안 상이한 농도의 FB 및 FBN 으로 처리된 HGF-1 의 세포 생존능을 보여주는 그래프이다. 이때, FB 및 FBN 의 최종 농도는 각각 1 내지 100 μM 이였다. 도 1(b)를 참조하면, FN과 FBN 에서 세포의 생존능은 대조군과 유사했다. 즉, FB 및 FNB 를 용해시키기 위해 사용된 동일한 양의 DPBS에 세포 처리된 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 한편, 다양한 실험을 위하여, FN 과 FBN 을 DPBS에 혼합하여 5μM의 농도로 제조하였다.

[0079] 도 1(c)는 24 시간 동안 5uM FB 및 FBN 를 포함하는 배지에서 배양 된 HGF에서 LIVE (녹색) 및 DEAD (적색) 염색의 형광 이미지를 보여주는 사진이다. 즉, 도 1(c)는 살아 있는 세포(녹색)과 죽은 세포(적색)의 형광 이미지를 보여준다. 도 1(c) 를 참조하면, 모든 그룹에 대한 이미지에서 차이가 없었다. 또한, 확대된 이미지에서도 세포에 대한 형태학적 차이가 발견되지 않았다.

[0080] 결론적으로, 본 발명에 따른 일산화탄소 복합체는 HGF-1 의 배양 조건에서 독성이 발견되지 않았다.

[0082] **실험예 2. 세포 이동 분석(cell migration assay)**

[0083] ATCC 에서 분양받은 인체치은섬유아세포(Human gingival fibroblasts; HGFs) 1×10^4 cells/well을 6-웰 플레이트에 분주한 후, 일정 간격의 갭(gap)을 형성하기 위하여 멸균된 마이크로피펫 팁을 이용하여 웰의 가운데 부분을 스크래칭하였다. 상기 세포를 DMEM 에서 24시간동안 배양하였다.

[0084] 배양된 세포에 실시예 1(FBN)과 비교예 1(FN)을 처리한 후, 시간에 따른 세포들의 이동양상을 24 시간 후, 48 시간 후에 확인하였다. 그리고, 아무것도 처리하지 않은 세포(대조군)와 비교하였다. 한편, 상기 세포는 PBS로 1회 헹구고 메탄올에 10분동안 용해된 0.3 % 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였으며, 염료를 제거한 후 PBS 로 4회 세척하였다.

[0085] 그리고, 상기 세포 이동은 EVOS 현미경에 의해 가시화 되었으며, 스크래치 영역에서 이동된 세포의 수는 Image J 프로그램을 사용하여 계산되었다.

[0086] 세포들의 이동양상을 촬영한 사진과 이동된 세포의 수에 대한 그래프를 도 2에 개시하였다.

[0087] 도 2(a)는 실험예 2에서 HGF-1을 웰 플레이트에 분주하고, 배양된 세포에 FB 및 FBN 을 각각 처리한 후, 시간에 따른 세포들의 이동양상(cell migration assay)를 보여주는 도면이며, 도2(b) 는 스크래치가 형성된 영역에서 이동한 세포의 수를 보여주는 그래프이다.

[0088] 도 2(a)를 참조하면, HGF-1 활성이 대조군이나 FB 처리군에 비하여, FBN 처리군에서 높게 나타난 것을 보여준다. 이는, FBN 처리군은 대조군이나 FB 처리군 대비 상처 부위가 빠르게 폐쇄되는 것을 의미한다.

[0089] 도 2(b)를 참조하면, FBN 처리군에서 이동된 세포의 수는 24 시간 후에는 152.2 였으며, 48 시간 후에는 250.8 이었다. FBN 처리군은 대조군과 FB 처리군 대비 현저하게 증가한 것을 보여준다.

[0091] **실험예 3. 구강 점막염 치유의 평가**

[0092] 실험동물 및 실험재료

[0093] 본 실험에서는 생후 12주된 rat(BALB/C mice)을 30마리 준비하였으며, 실험동물 선정 및 관리 외과적 처치 등을 비롯한 모든 실험절차는 고려대학교 의료원 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 시행하였다.

[0095] 실험군 및 대조군의 설정

[0096] 실험동물의 구강 궤양은 하기와 같이 3 개의 그룹으로 나누어 처리하였다.

[0097] 그룹 1: 대조군, DPBS를 적용한 군

[0098] 그룹 2: 비교예(F68-BPEI, 5μM 농도) 의 치료제를 적용한 군

[0099] 그룹 3: 실시예(F68-BPEI-NO, 5μM 농도)의 치료제를 적용한 군

[0101] 실험 동물의 외과적 처치 및 실험 결과

[0102] 도 3(a)는 실험예 3에서 생체 내 물질 처리에 따른 실험 설계를 보여주는 도면이며, 도 3(b)는 실험예 3에서 동물 모델의 실험 과정을 개략적으로 보여주는 도면이다.

[0103] 도 3을 참조하면, 12주령 수컷 rat에 궤양이 발생하기 7일 및 2일 전에 60mg/kg 의 5-플루오로 우라실(FU)을 주사하였다. 그리고, 이소플루란(isoflurane)으로 상기 rat을 마취한 후 rat의 입천장에 인두를 이용하여 구강 궤양을 유도하였다.

[0104] 그리고, 상기 rat을 반듯이 누운 자세로 위치시키고, 2mm 직경의 전극을 사용하여 전반 구개에서 점막을 벗겨냈다. 한편, rat 의 통증을 완화하기 위하여 리도카인 연고를 상기 궤양이 유도된 부위에 적용하였다.

[0105] 상기 rat에 구강 궤양을 유도하고 1일 후, DPBS(대조군), FB(비교예) 및 FBN(실시예) 처리군(FB 및 FBN은 DPBS에 5μM 농도로 용해됨)을 각각 10 마리에 rat에 매일 500 ㎕ 용량을 분무하였다. 이후, 그룹당 절반의 rat은 상처낸 7 일 후, 나머지 절반은 14일 후에 희생시키고 결과를 확인하였다.

[0107] 도 4(a)는 실험예 3에서 rat 의 구강 궤양 영역을 보여주는 이미지로, rat에 구강 궤양을 유도 후 7일 및 14일에 상기 구강 궤양 영역을 보여주는 이미지이다. 도 4(a)를 참조하면, FBN 처리군에서 궤양이 유도된 영역이 많이 없어진 것을 확인할 수 있었다.

[0108] HE 염색 이미지로부터 정상 이미지와 비교하여 치유된 상처 면적을 측정하였다. 그리고, 그 결과를 도 4(b)에 나타내었다. 도 4(b)는 상기 rat 의 구강 궤양 영역의 상처 치유율을 보여주는 그래프이다.

[0109] 도 4(b)를 참조하면, 그룹 1, 2 및 3의 상처 치유율은 각각 5.1%, 18.17% 및 60.4% 였다. FBN 을 처리한 그룹 3의 경우, 그룹 1 및 2 보다 상처 치유율이 약 3배 이상 높았다. 한편, 그룹 1과 2의 상처 치유율은 크게 차이가 없다.

[0110] 도 4(c)는 rat 의 구강 궤양 후 14일째의 HE 염색 이미지를 보여주는 사진이다. 도 4(c)를 참조하면, rat 의

구강 궤양 후 14 일에 그룹 1(대조군)과 그룹 2(FB 처리군)는 상처 부위에 염증 세포가 여전히 침투되어 있는 것을 보여준다. 반면, 그룹 3(FBN 처리군)은 그룹 1(대조군)과 그룹 2(FB 처리군) 대비 더 두꺼운 상피층뿐만 아니라 염증성 세포의 침윤이 적은 것으로 나타났다.

[0111] 구체적으로, 상처의 가장자리로부터 상피화가 진행되었고, 구개 상처의 가장자리로부터 상피 세포, 섬유 아세포 및 각질 세포의 수축 및 이동에 의해 상처 부위이 폐쇄가 진행되었다.

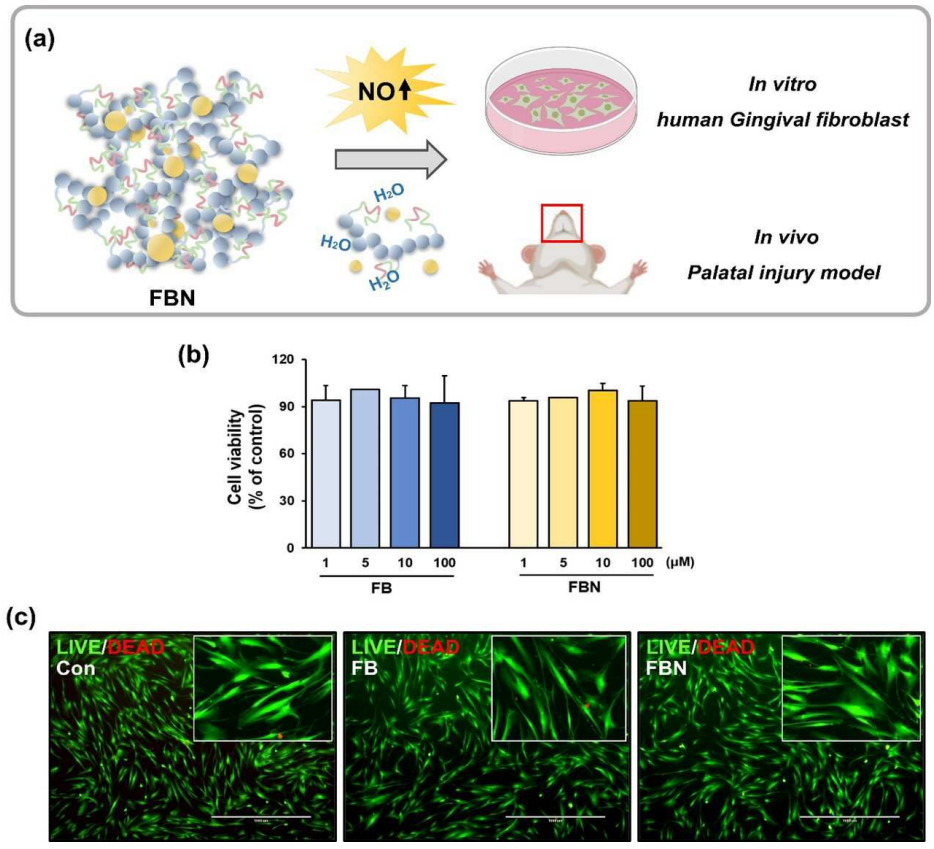
[0113] 아울러, 각질형성세포(keratinocyte)에 의해 생성된 상피층에서의 상처 치유는 IHC를 사용하여 검출하였다. 그리고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 rat 의 구강 궤양 후 14일에 (a) CK-14, (b) Ki-67 및 (c) a-SMA 항체에 의해 검출 된 면역 조직 화학 이미지를 보여주는 도면이다.

[0114] 도 5를 참조하면, 그룹 1(FBN 처리군)에서 각질 세포 마커로서 CK-14에서 발현된 영역은 다른 영역보다 더 어둡고 두꺼웠다(a). 아울러, 상처 부위의 상피 증식은 증식 마커로서 Ki-67로 검출되었다. 증식 세포는 그룹 1(FBN 처리군) 이미지에서 우세하게 나타났다(b). 아울러, 근섬유 아세포 식별을 위한 마커인 α-SMA는 그룹 1(FBN 처리군)에서 어둡게 나타났다.

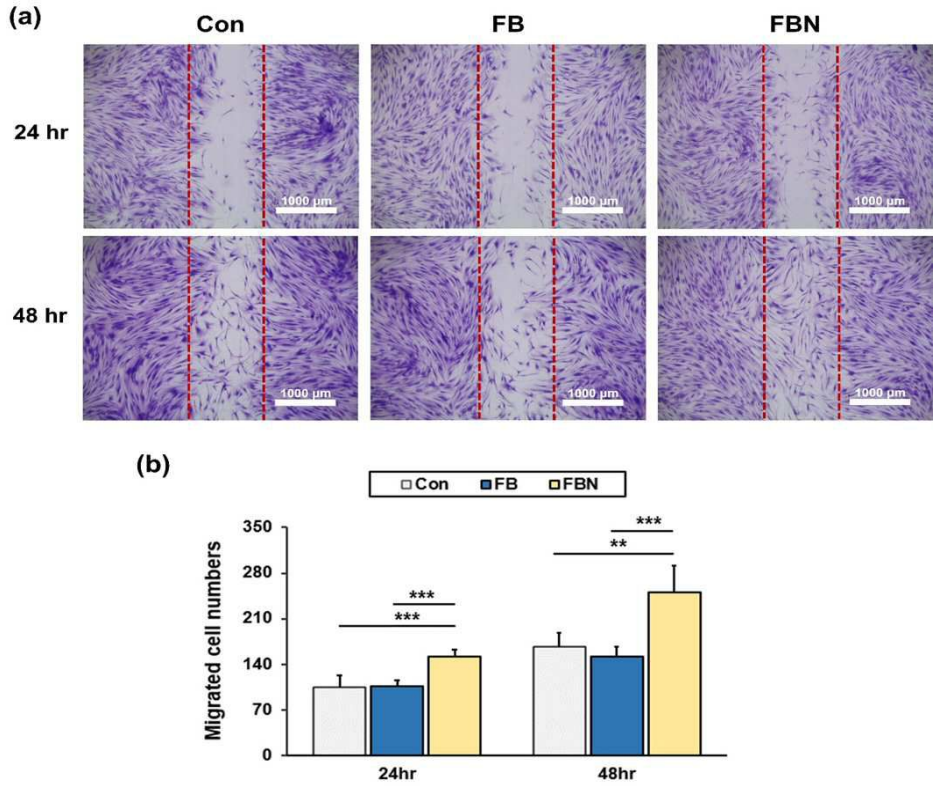
[0116] 결론적으로, 본 발명에 따른 일산화질소 복합체는 구개 상처 치유를 촉진하고, 구강 내 누공의 발생을 감소시키기 위한 치료제로 사용될 수 있는 것으로 판단된다. 특히, in vitro 시험 결과는 상기 일산화질소 복합체(FBN)가 세포 독성 작용 없이 섬유 모세포의 이동을 촉진한다는 것을 보여준다.

도면

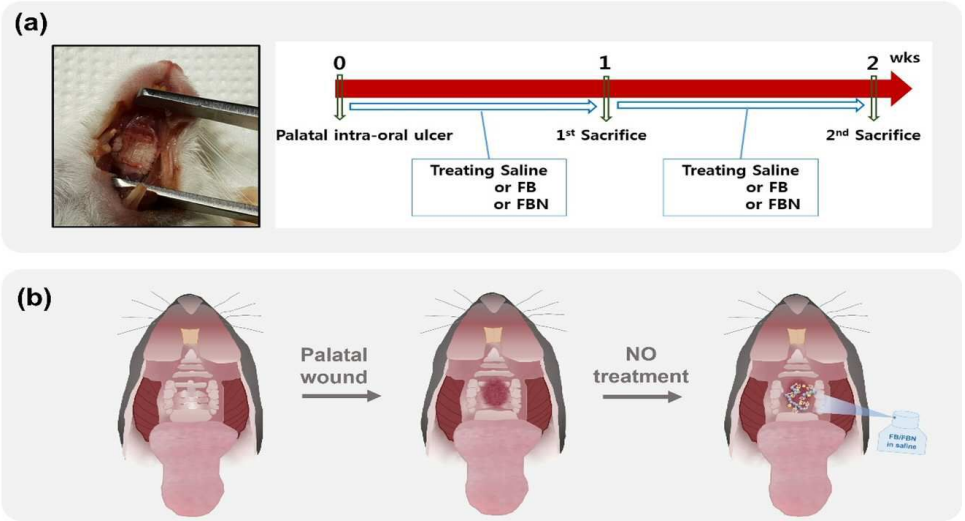
도면1



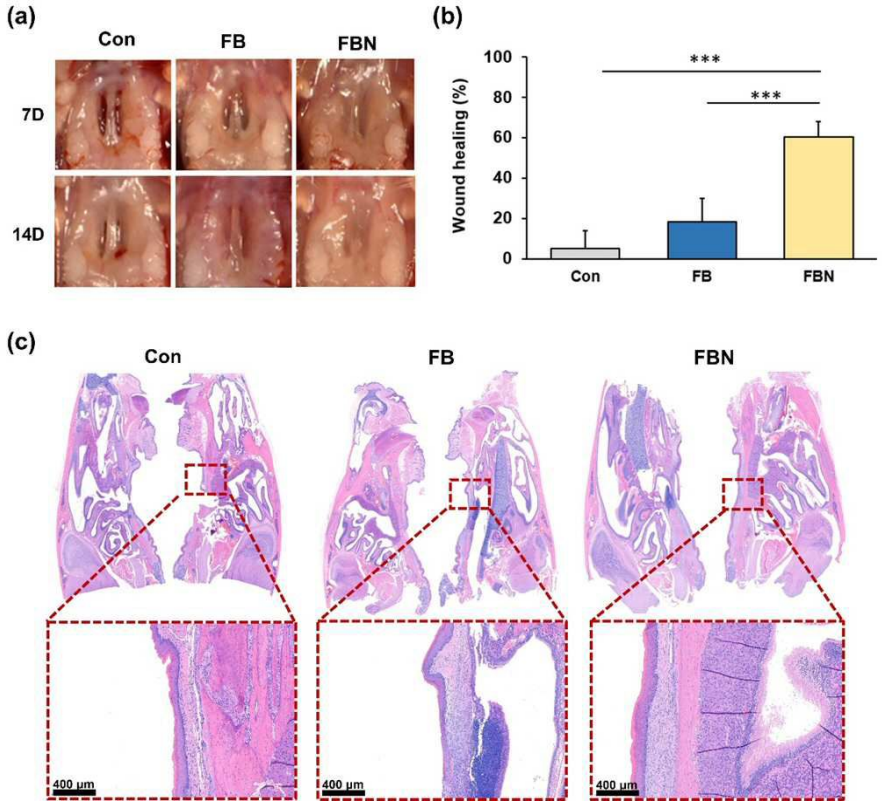
도면2


(a)
Con
FB
FBN
24 hr
48 hr
1000 μm
(b)
Con
FB
FBN
Migrated cell numbers
350
280
210
140
70
0
***
***
**
***
24hr
48hr

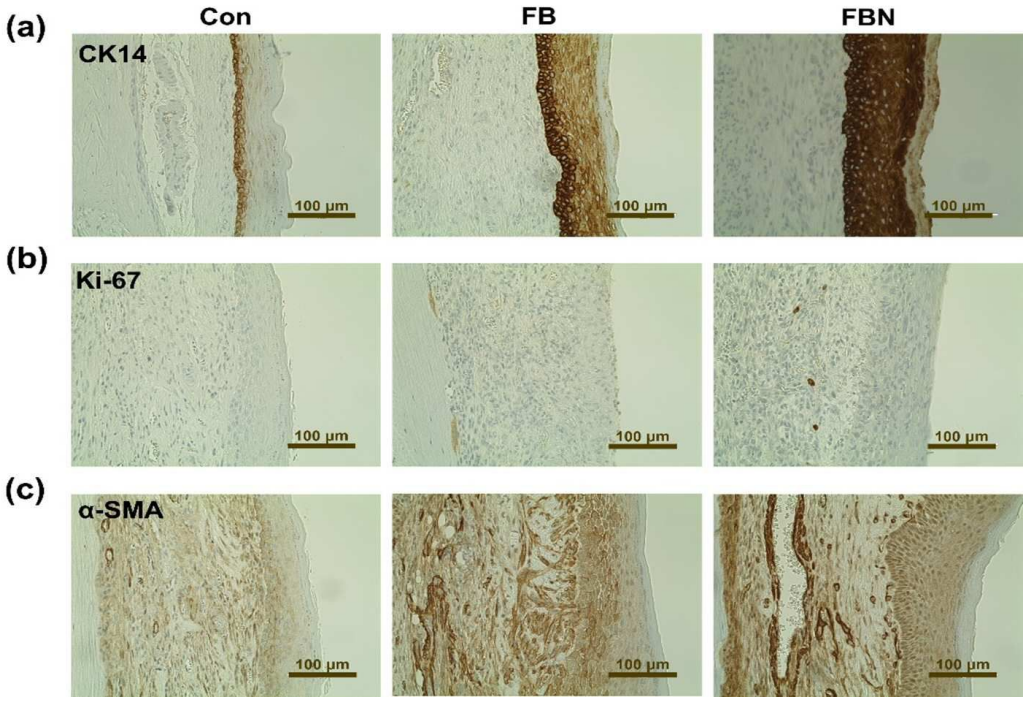
도면3


(a)
0
1
2
wks
Palatal intra-oral ulcer
1st Sacrifice
2nd Sacrifice
Treating Saline
or FB
or FBN
Treating Saline
or FB
or FBN
(b)
Palatal
wound
NO
treatment
FB/FBN
in saline

도면4


(a)
Con
FB
FBN
7D
14D
(b)
Wound healing (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
Con
FB
FBN
(c)
Con
FB
FBN
400 μm
400 μm
400 μm

도면5


(a)
Con
FB
FBN
CK14
100 μm
100 μm
100 μm
(b)
Ki-67
100 μm
100 μm
100 μm
(c)
α-SMA
100 μm
100 μm
100 μm