



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0150485
(43) 공개일자 2016년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/12 (2006.01) A61L 27/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/12 (2013.01)
A61L 27/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0088551
(22) 출원일자 2015년06월22일
심사청구일자 2015년06월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송해룡
서울특별시 구로구 신도림로 87, 105동 102호 (신도림동, 신도림1차동아아파트)
김학준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 13 항

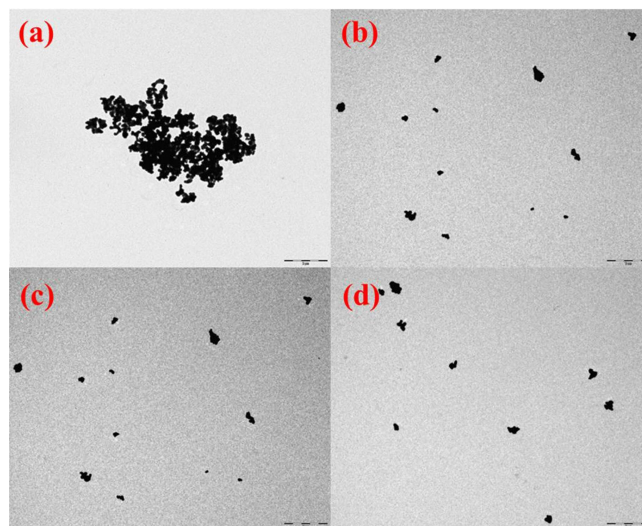
(54) 발명의 명칭 분산성이 향상된 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 분산성이 향상된 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 표면이 개질 되어 분산성이 향상된 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법은 알렌드로네이트와 같은 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재(예: BCP 나노입자)의 경우, 상기 골형성 촉진 물질이 인산칼슘계 골충진재로부터 갑작스럽게 유출되지 않고 천천히 방출되도록 하며, 분산성을 현저히 향상시킨 인산칼슘계 골충진재에 관한 발명이다. 이렇게 골형성 촉진 물질이 갑작스럽게 방출되지 않고 분산성이 현저히 향상되었기 때문에 골재생 또는 골형성이 전체적으로 고르게 이루어지게 된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 2430/02 (2013.01)

(72) 발명자

김성은

서울특별시 강서구 강서로12길 51-13, 401호 (화곡동, 주얼리맨션)

윤영필

서울특별시 광진구 천호대로132길 36-7, B102 (구의동)

심규식

서울특별시 구로구 새말로6길 25, 303호 (구로동)

명세서

청구범위

청구항 1

골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재로서,
상기 골충진재는 헤파린-도파민 복합체에 의해 표면이 개질 된 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 헤파린-도파민 복합체는 0.01-100 mg/ml로 상기 골충진재의 표면을 개질 하는 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 헤파린-도파민 복합체는 3-5:1(헤파린:도파민)의 함량비로 이루어진 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 인산칼슘계 골충진재는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 이중상 칼슘포스페이트(biphasic calcium phosphate, BCP), 테트라칼슘 포스페이트(tetracalcium phosphate), 칼슘파이로포스페이트(calcium pyrophosphate), 칼슘폴리포스페이트(calcium polyphosphate), 디칼슘포스페이트 디하이드레이트(dicalcium phosphate dihydrate), 디칼슘포스페이트 무수물(dicalcium phosphate anhydrous) 및 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트(monocalcium phosphate monohydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 골형성 촉진 물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 틸루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 및 락토페린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 골형성 촉진 물질은 0.01-100 mg/ml로 골충진재에 함유되는 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재.

청구항 7

1) 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진제의 표면을 헤파린-도파민 복합체로 개질 하는 단계;
를 포함하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 1)단계에서 상기 헤파린-도파민 복합체는 0.01-100 mg/ml로 상기 골충진제의 표면을 개질하는 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 헤파린-도파민 복합체는 3-5:1(헤파린:도파민)의 함량비로 이루어진 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 인산칼슘계 골충진제는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 이중상 칼슘포스페이트(biphasic calcium phosphate, BCP), 테트라칼슘 포스페이트(tetracalcium phosphate), 칼슘파이로포스페이트(calcium pyrophosphate), 칼슘폴리포스페이트(calcium polyphosphate), 디칼슘포스페이트 디하이드레이트(dicalcium phosphate dihydrate), 디칼슘포스페이트 무수물(dicalcium phosphate anhydrous) 및 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트(monocalcium phosphate monohydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 골형성 촉진 물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 틸루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 및 락토페린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 골형성 촉진 물질은 0.01-100 mg/ml로 골충진제에 함유되는 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진제의 제조방법.

청구항 13

제1항에 따른 인산칼슘계 골충진재를 이용한 골형성 또는 골재생 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분산성이 향상된 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 생체 내의 특정 부위에 골조직의 일부가 결손 되거나 보강을 필요로 하는 경우 그 부위에 골(骨)을 이식하게 된다. 이와 같이 생체 내에 골이 이식되면, 이식된 골은 이식 부위에 새로운 골의 생성을 유도하고 이식된 골 그 자체는 부분 또는 전체적으로 서서히 분해되는 과정을 거치게 됨으로써, 골 이식 후 일정 기간이 경과하면 이식 부위는 대부분 새로이 생성된 골에 의해 채워진 상태가 된다.

[0003] 여기서, 생체 내에 이식되는 골은, 생체 내의 골조직의 일부를 추출한 것과, 세라믹스(ceramics) 등의 재료로 인공적으로 만들어진 인공 골이 혼합되어 사용되는 것이 일반적이다. 이 때, 인공 골을 흔히 골충진재 또는 골 대체물이라고 한다.

[0004] 이러한 골충진재는, 흔히 세라믹스 재료인 인산칼슘계 화합물을 원료로 하여 제조되는데, 이는 인산칼슘계 화합물의 성분이 인(P)과 칼슘(Ca)을 주 원소로 하여 구성되어 생체 내의 골의 성분과 유사하고, 이를 통해 인산칼슘계 화합물이 생체 내에 이식되더라도 생리적, 면역적 거부 반응을 일으키지 않고 새로운 골의 생성을 유도할 수 있기 때문이다.

[0005] 이러한 인산칼슘 골충진재의 예로는 BCP(Biphasic calcium phosphate, 이중상 칼슘포스페이트) 나노입자 등이 있으며, 이러한 BCP 나노입자는 치과 및 정형외과 분야에서 사용되는 것으로서 100-400 nm 크기를 갖는 대표적인 인산칼슘계 골충진재이다. 또한 상기 BCP 나노입자는 hydroxyapatite(HAp)와 tricalcium phosphate(TCP)로 구성되어 있으며, 뼈의 미네랄 부분과 흡사하여 골충진재로서 크게 각광을 받고 있다. 그러므로 BCP 나노입자는 뼈 조직의 재생에 있어 최고로 적합한 골충진재로 인정받고 있다. 이러한 BCP 나노입자에 보다 뛰어난 골재생 또는 골형성 효과를 보기 위해 상기 BCP 나노입자에 알렌드로네이트를 함유하게 되었다. bisphosphonate의 일종인 알렌드로네이트는 골손실 억제제이면서 골형성을 촉진하는 물질로 알려져 있다. 그러나 BCP에 알렌드로네이트를 곧바로 탑재할 경우, 탑재 초기에 알렌드로네이트의 방출을 조절하기 어려워 갑작스럽게 약물이 방출되는 문제점이 있었다. 또한 이러한 문제점 이외에도 BCP 나노입자는 전체적인 분산성이 현저히 떨어진다는 문제점이 있었다. 이렇게 BCP 나노입자의 전체적인 분산성이 떨어지는 경우에는 약물이 고정화되는 것도 일정하지 않게 되고, 또한 지지체에도 일정하게 고정되지 않는 문제점이 추가로 발생하게 된다. 한편, 이러한 문제는 BCP 나노입자를 제외한 나머지 인산칼슘계 골충진재에 알렌드로네이트와 같은 골형성 촉진물질을 함유하는 경우에도 유사하게 발생하였다.

[0006] 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로서 대한민국 공개특허 제10-2015-0007273호(특허문헌 1)가 개시되어 있으며, 이러한 특허문헌 1에는 해파린-도파민 복합체를 이용하여 표면을 개질한 스캐폴드에 관한 발명이 개시되어 있을 뿐, 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘 골충진재의 분산성 향상에 관한 기술에 대하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허 제10-2015-0007273호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 알렌드로네이트와 같은 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재의 경우 초기 골형성 촉진 물질의 갑작스런 방출 문제를 해결함과 동시에, 인산칼슘계 골충진재의 문제점인 분산성이 현저히 저하되는 것을 해결하는 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법을 제공하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0009] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 인산칼슘계 골충진재는 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재로서,

[0010] 상기 골충진재는 헤파린-도파민 복합체에 의해 표면이 개질 된 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 인산칼슘계 골충진재의 제조방법은

[0012] 1) 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재의 표면을 헤파린-도파민 복합체로 개질 하는 단계;

[0013] 를 포함하는 인산칼슘계 골충진재의 제조방법이다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 표면이 개질 되어 분산성이 향상된 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법은 알렌드로네이트와 같은 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재(예: BCP 나노입자)의 경우, 상기 골형성 촉진 물질이 인산칼슘계 골충진재로부터 갑작스럽게 유출되지 않고 천천히 방출되도록 하며, 분산성을 현저히 향상시킨 인산칼슘계 골충진재에 관한 발명이다. 이렇게 골형성 촉진 물질이 갑작스럽게 방출되지 않으면서 분산성이 현저히 향상되었기 때문에 골재생 또는 골형성이 전체적으로 고르게 이루어지게 된다. 또한 분산성이 향상되기 때문에 약물이 일정하게 고정화(immobilization)되면서, 지지체에도 일정하게 고정된다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 BCP 나노입자의 투과전자현미경 사진으로, 각각 (a) BCP, (b) Hep-BCP, (c) Aln(0.5 mg)/Hep-BCP, (d) Aln(1 mg)/Hep-BCP의 표면에 대한 투과전자현미경 사진이다.

도 2는 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자 Aln(0.1, 0.5 mg)/Hep-BCP의 X-선광전자 분광기를 이용한 표면의 화학적 원소분석 결과이다.

도 3은 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 BCP, BCP에 헤파린-도파민을 고정시킨 것과 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자 Aln(0.1, 0.5 mg)/Hep-BCP를 증류수로 분산 시킨 뒤 안정화 시험을 한 결과이다.

도 4는 본 발명의 개질 된 BCP 나노입자로부터 알렌드로네이트의 약물 방출을 보여주는 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재 된 Aln(0.5 mg)/Hep-BCP 나노입자, Aln(1 mg)/Hep-BCP 나노입자들의 MG63세포에 대한 세포독성 결과를 24, 48 시간으로 측정한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재 된 Aln(0.5 mg)/Hep-BCP 나노입자, Aln(1 mg)/Hep-BCP 나노입자들에 MG63세포를 1 일, 3 일, 7 일 배양 후의 세포증식에 대한 결과이다.

도 7은 본 발명에 따른 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재 된 Aln(0.5 mg)/Hep-BCP 나노입자, Aln(1 mg)/Hep-BCP 나노입자들에 조골세포를 3 일, 7 일, 10 일 골분화 및 배양 후의 알칼리성 포스포타제 활성도에 대한 결과이다.

도 8은 본 발명에 따른 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자, Aln(0.5 mg, 1 mg)/Hep-BCP에 MG63세포

를 21 일 동안 골분화 및 배양 후의 칼슘 침착에 대한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자, Aln(0.5 mg, 1 mg)/Hep-BCP, 에 MG63세포를 21 일 동안 골분화 및 배양 후의 분화 마커인 유전자들의 발현률 분석에 대한 결과이다.

도 10은 BCP 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자, Aln(0.5 mg, 1 mg)/Hep-BCP를 주입형 타입으로 만들어서 7 mm로 잘려나간 쥐의 경골에 고정화시킨 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이에 본 발명자들은 골형성 촉진 물질이 골충진재로부터 빠르게 유출되는 것을 방지하면서 분산성도 현저히 향상된 인산칼슘계 골충진재를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 인산칼슘계 골충진재 및 이의 제조방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 구체적으로 본 발명에 따른 인산칼슘계 골충진재는
- [0018] 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재로서,
- [0019] 상기 골충진재는 헤파린-도파민 복합체에 의해 표면이 개질된 것을 특징으로 하는 인산칼슘계 골충진재이다.
- [0020] 이렇게 본 발명에 따른 인산칼슘계 골충진재는 상기 헤파린-도파민 복합체에 의해 표면이 개질 됨으로써, 골형성 촉진 물질의 급격한 유출 문제를 해결함과 동시에, 분산성의 저하 문제도 해결한 것이다. 이는 상기 헤파린-도파민 복합체가 보유한 음전하가 상기 인산칼슘계 골충진재의 표면에 도입되기 때문에 가능한 것으로서, 골형성 촉진 물질의 급격한 유출을 방지하면서 전기적인 척력으로 인해 입자가 서로 뭉치는 현상을 방지하게 된다.
- [0021] 상기 헤파린-도파민 복합체는 인산칼슘계 골충진재의 표면에 음전하를 충분히 도입할 수 있는 양인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.01-100 mg/ml로 골충진재의 표면을 개질 하는 것이 바람직하다. 상기 헤파린-도파민 복합체가 0.01 mg/ml 미만인 경우에는 골충진재 표면에 음전하를 충분히 도입하기 어려워 분산성 향상을 달성하기 어려우면서, 골형성 촉진 물질이 유출되는 것을 방지하기 어려워 바람직하지 않다. 또한 상기 헤파린-도파민 복합체가 100 mg/ml를 초과하는 경우에는 골형성 촉진 물질의 유출을 지나치게 막아 골형성을 저해함과 동시에 과도한 음이온에 의한 높은 척력으로 분산성이 오히려 떨어지게 되어 바람직하지 않다.
- [0022] 또한 상기 헤파린-도파민 복합체는 3-5:1(헤파린:도파민)의 함량비로 이루어진 것이 분산성을 보다 우수하게 향상시키면서, 골형성 촉진 물질의 급격한 초기 유출을 차단하는데 보다 유용하다.
- [0023] 또한 상기 인산칼슘계 골충진재는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 이중상 칼슘포스페이트(biphasic calcium phosphate, BCP), 테트라칼슘 포스페이트(tetracalcium phosphate), 칼슘파이로포스페이트(calcium pyrophosphate), 칼슘폴리포스페이트(calcium polyphosphate), 디칼슘포스페이트 디하이드레이트(dicalcium phosphate dihydrate), 디칼슘포스페이트 무수물(dicalcium phosphate anhydrous) 및 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트(monocalcium phosphate monohydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0024] 또한 상기 골형성 촉진 물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 티루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 및 락토페린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0025] 한편, 상기 골형성 촉진 물질은 0.01-100 mg/ml로 상기 골충진재에 함유되는 것이 바람직한데, 상기 골형성 촉진 물질이 0.01 mg/ml 미만으로 함유되는 경우에는 골형성이 원활하게 촉진되기 어려워 바람직하지 않으며, 상기 골형성 촉진 물질이 100 mg/ml를 초과하게 되면 골형성 촉진 물질의 유출이 지나치게 많아짐과 동시에 분산성을 떨어뜨리게 되므로 바람직하지 않다.
- [0026] 또한 본 발명에 따라 분산성을 향상시키는 경우에는 약물이 일정하게 고정화(immobilization)되면서, 지지체에도 일정하게 고정화되는 효과가 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 인산칼슘계 골충진재의 제조방법은

- [0028] 1) 골형성 촉진 물질이 함유된 인산칼슘계 골충진재의 표면을 헤파린-도파민 복합체로 개질 하는 단계;
- [0029] 를 포함하는 인산칼슘계 골충진재의 제조방법이다.
- [0030] 이러한 본 발명에 따른 인산칼슘계 골충진재의 제조방법에 의할 경우, 골형성 촉진 물질의 급격한 유출을 방지 하면서 전기적인 척력으로 인해 입자가 서로 뭉치는 현상을 방지하고, 골충진재의 전체적인 분산성을 향상시켜 전체적으로 고르게 골재생 및 골형성을 유도한다.
- [0031] 상기 1)단계에서 상기 헤파린-도파민 복합체는 0.01-100 mg/ml로 상기 골충진재의 표면을 개질 하는 것이 분산 성을 향상시키면서 골형성 촉진 물질의 유출을 효과적으로 방지할 수 있어 바람직하다.
- [0032] 또한 상기 헤파린-도파민 복합체는 3-5:1(헤파린:도파민)의 함량비로 이루어진 것이 분산성을 보다 우수하게 향 상시키면서, 골형성 촉진 물질의 급격한 초기 유출을 차단하는데 보다 유용하다.
- [0033] 또한 상기 인산칼슘계 골충진재는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 이중상 칼슘포스페이트(biphasic calcium phosphate, BCP), 테트라칼슘 포스페이트(tetracalcium phosphate), 칼슘파이로포스페이트(calcium pyrophosphate), 칼슘폴리포스페이트(calcium polyphosphate), 디칼슘포스페이트 디하이드레이트(dicalcium phosphate dihydrate), 디칼슘포스페이트 무수물(dicalcium phosphate anhydrous) 및 모노칼슘포스페이트 모노 하이드레이트(monocalcium phosphate monohydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0034] 또한 상기 골형성 촉진 물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 티루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단 백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자 (IGF) 및 락토페린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0035] 또한 상기 골형성 촉진 물질은 0.01-100 mg/ml로 상기 골충진재에 함유되는 것이 바람직하다.

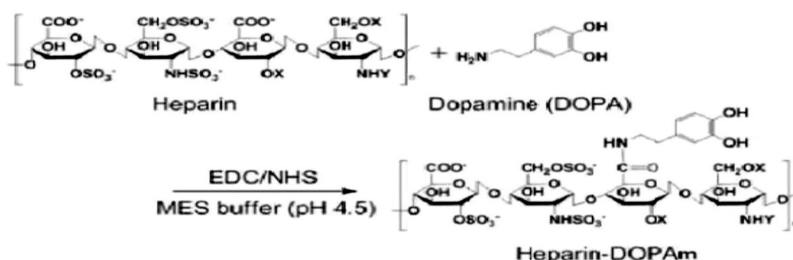
[0036] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이 하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에 서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예

[0038] <제조예: 헤파린-도파민 복합체 제조>

[0039] 헤파린(heparin) 400 mg, 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide; EDC) 190.6 mg, N-하이드로숙시니미드(N-hydrosuccinimide; NHS) 115 mg을 10 ml의 MES buffer(pH 4.5)에 녹여 10분간 반응시킨 후, 102.2 mg의 도파민을 넣어 25 ℃에서 약 24 시간 동안 반응시킨다. 반응 후, 증류수에서 투석하여 미 반응 물질을 제거한 후, 동결건조 하여 헤파린-도파민 복합체(Hep-DOPA)를 제 조하였다. 상기의 반응은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같다.

[0040] [반응식 1]



[0041]

[0042] 실시예 1: BCP(Biphasic calcium phosphate; Ossgen, Korea) 나노입자에헤파린-도파민 복합체에 의한 표면 개 질 후, 알렌드로네이트(Alendronate)의 탑재

[0043] 인산칼슘(Biphasic calcium phosphate; BCP, Ossgen, Korea) 나노입자는 치과 및 정형외과 분야에서 사용되는 100-400 nm 크기를 갖는 골충진제이다. 이는 hydroxyapatite(HAp)와 tricalcium phosphate(TCP)로 구성되어 있으며 자연적인 뼈의 미네랄 부분과 흡사하다. 또한 뼈 조직의 재생에 있어 최고로 적합한 지지체이다. BCP 나노입자에 골 손실 억제제인 bisphosphonate의 일종이고 골 형성을 돕는 알렌드로네이트(alendronate; Aln)를 탑재하여 보다 뛰어난 골재생 효과를 보기 위해 BCP에 알렌드로네이트를 탑재시키게 되었다. 그러나 BCP에 알렌드로네이트를 바로 탑재할 경우 단기간 내에 빠른 약물방출과 초기 갑작스런 방출의 문제점을 해결하기 위해, 음전하를 띠는 선형 다당류인 헤파린-도파민 복합체를 화학적으로 BCP표면에 결합함으로써, 알렌드로네이트가 천천히 방출될 수 있도록 약물방출속도를 제어할 수 있었다. 먼저 2 mg/ml의 헤파린-도파민 복합체를 0.1 M MES 버퍼(pH 5.6)에 BCP 나노입자를 넣고 하루 동안 교반 하여 BCP에 헤파린-도파민 복합체를 붙여준다. 그 뒤 증류수로 3-4 회 세척 후, 동결 건조를 해준다. 동결 건조가 끝나면 0.1 M MES 버퍼(pH 5.6)에 알렌드로네이트를 0.5 mg/ml 농도로 녹여주고 BCP 나노입자를 넣고, 하루 동안 교반한 후, 3-4 회 증류수로 세척한 후, 동결 건조하여, 헤파린-도파민 복합체로 표면 개질 되었으며, 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 얻었다. 그리하여 이를 ‘Aln(0.5 mg)/Hep-BCP’ 라 명명하였다.

[0044] 실시예 2

[0045] 상기 실시예 1에서 알렌드로네이트를 1 mg/ml 농도로 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하여 헤파린-도파민 복합체로 표면 개질되었으며 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 얻었다. 그리하여 이를 ‘Aln(1 mg)/Hep-BCP’ 라 명명하였다.

[0046] 비교예

[0047] 비교예 1

[0048] BCP(Ossgen, Korea)를 구입하여 그대로 사용하였고, 이를 ‘BCP’ 라 명명하였다.

[0049] 비교예 2

[0050] 상기 제조예로부터 얻어진 헤파린-도파민 복합체로 BCP 나노입자를 표면처리 하여 사용하였고, 이를 ‘Hep-BCP’ 라 명명하였다.

[0051] 실험예

[0052] <실험예 1: BCP 나노입자 표면관찰>

[0053] 비교예 1(도 1의 a), 비교예 2(도 1의 b), 실시예 1(도 1의 c) 및 실시예 2(도 1의 d)를 투과전자현미경으로 관찰하였으며, 이의 결과를 하기 도 1에 나타내었다. 하기 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이 BCP에 헤파린-도파민 복합체와 알렌드로네이트가 잘 탑재 되었다는 것을 분산 정도에서 나타나 있다. 즉, 비교예 1에 따른 BCP 나노입자는 서로 뭉쳐 있는 반면에 헤파린-도파민 복합체와 알렌드로네이트가 탑재된 나노입자는 서로 뭉쳐 있지 않는 것을 확인하였다.

[0054] <실험예 2: X-선 광전자를 이용한 BCP 나노입자의 원소 검사>

[0055] 상기 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1 및 실시예 2를 X-선 광전자 분광기(X-Ray Photoelectron Spectroscopy; XPS)를 이용해 표면 원소 분석하였으며, 이의 결과를 도 2 및 표 1로 나타내었다. 하기 도 2 및 표 1에서 보여 주듯이, 개질 되지 않은 BCP 나노입자(비교예 1)와 비교하여 0.5, 1 mg/ml 의 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자(실시예 1)에서 각각 0.6 %, 1.5 %의 질소 성분, 0.6 %, 3.3 %의 인 성분의 증가를 확인함으로써 BCP 나노입자 표면에 성공적으로 알렌드로네이트가 탑재된 것을 확인할 수 있었다.

표 1

Sample \ Element	C1s%	O1s %	N1s %	Ca2p %	P2p %
BCP	29.37	45.46		14.48	10.68
Hep-BCP	25.29	46.16	2.305	15.17	11.07
Aln(0.5 mg)/Hep-BCP	25.20	48.49	3.56	13.10	9.64
Aln(1 mg)/Hep-BCP	30.01	44.97	3.70	11.65	9.66

[0056]

[0057] <실험예 3: UV/Vis 분광광도계를 이용한 콜로이드 안정성 평가>

[0058]

BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자들의 분산이 되었는지를 보기 위해 시간이 경과함에 따라 가라앉는 정도를 측정하였다. BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자들을 하기 도 3에 나타내었다. 하기 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 BCP 나노입자는 초반에 가라앉는 것을 볼 수 있고 헤파린-도파민 복합체와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자는 24 시간이 지난 뒤에도 유지하는 것을 보여준다.

[0059] <실험예 4: BCP 나노입자에서 알렌드로네이트의 약물 방출 거동>

[0060]

알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자(실시에 1 및 실시에 2)로부터 알렌드로네이트의 방출 거동을 분석하기 위해, 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고 37 °C에서 100 rpm으로 교반하였다. 각 정해진 시간인 1, 3, 5, 10 시간과 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28일 간격으로 새로운 버퍼를 교환 해주며 측정하였다. 방출된 알렌드로네이트는 Flash Multimode Reader (Varioskan™, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 293 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보여주듯이, 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자는 초반 1 일 동안에 약간 빠르게 방출되기는 하였으나, 그 이후로 알렌드로네이트는 4 주 동안 지속적으로 방출이 되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 실시에 1 및 실시에 2를 비교하면, 하기 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이 알렌드로네이트가 탑재된 양에 따라 초기 방출양에서 차이가 있는 것을 확인할 수 있으나, 기울기는 유사한 양상으로 변하는 것을 확인할 수 있다.

[0061] <실험예 5: BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 세포독성 평가>

[0062]

BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해, 각각의 나노입자를 세포배양액에 넣고 37 °C에서 24 시간 배양하여 추출배양액을 얻었다. 한편, 조골세포인 MG63세포(세포주은행 21427) 1×10^4 개를 96-well 플레이트에 넣고 37 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양된 MG63세포의 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 세척한 후, 추출배양액을 첨가한 후 조골세포를 24 시간, 48 시간 배양한 후, 추출배양액을 제거하였다. 세포독성은 CCK-8 증식 키트 시약을 첨가하여 37 °C에서 1시간을 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 하기 도 5에 나타난 바와 같이, BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자들 모두 48 시간 배양 후에도 90 %이상의 세포생존율을 보여주었으며, 이 결과는 BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자 모두 조골세포인 MG63세포에 대한 세포독성이 없음을 의미한다.

[0063] <실험예 6: BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 세포증식>

[0064]

BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 MG63세포에 대한 세포증식을 평가하기 위해, 먼저 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 Sonicator로 10 시간 동안 분산 시켜준 뒤 왓만 실린지(Whatman syringe)를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 그리고 1×10^5 의 MG63세포를 24-well plate분주 한 후 MG63세포가 분주된 곳에 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 넣고 1 일, 3 일, 및 7 일 동안 세포를 배양한 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하였다. 세척 후, CCK-8 증식 키트 시약(Tetrazolium salt 시약, Cell Counting kit-8, Dojindo, Japan)을 넣고 1 시간 배양한 후에, 배양액을 96 well 플레이트에 옮긴 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자에서 배양된 MG63세포는 1 일, 3 일, 및

7 일 후에 점차적으로 세포가 활발하게 증식이 되었으며 (도 6), 각 그룹간의 세포증식에 대한 차이는 7 일에 알렌드로네이트 1 mg/ml의 농도로 탑재된 BCP 나노입자가 유효성 있게 증가하는 것을 확인하였다.

<실험예 7: BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 알칼리성 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP) 활성도>

조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도를 측정 분석함으로서 BCP 나노입자(비교예 1 및 비교예 2)와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자(실시에 1 및 실시예 2)들의 골 융합 효능을 평가하였다. 먼저 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 Sonicator로 10 시간 동안 분산 시켜준 뒤 와트만 실린지를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 그리고 1×10^5 의 MG63 세포를 24-well plate분주 한 후 MG63세포가 분주된 곳에 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산 된 세포배양액을 넣고 3 일, 7 일, 및 10 일 동안 분화 및 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, $1 \times \text{RIPA}$ 버퍼를 세포에 넣어 0 °C에서 110 와트로 1 분 동안 초음파를 가한다. 용해된 세포를 4 °C에서 3 분 동안 13,500 rpm으로 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 p-니트로페닐포스파테이트 용액과 37 °C에서 30 분 동안 배양한 후, 500 mL의 1 N NaOH로 반응을 종결시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 보듯이, 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자에서 조골세포로 분화한 MG63세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도가 BCP 나노입자와 비교하여 유효성 있게 증가하였다.

<실험예 8: BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자의 칼슘 침착>

조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘침착을 측정하여 BCP 나노입자(비교예 1 및 비교예 2) 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자(실시에 1 및 실시예 2)의 골 융합 효능을 평가하였다. 먼저 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 Sonicator로 10 시간 동안 분산 시켜준 뒤 와트만 실린지를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 그리고 1×10^5 의 MG63세포를 24-well plate분주 한 후 MG63세포가 분주된 곳에 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 넣고 21 일 동안 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 각각의 BCP 나노입자로부터 세포를 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1 분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, 0.1 % 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣었다. 세포의 막을 분쇄시키기 위해 4 °C에서 약 1 분 동안 초음파를 가한 후, 원심분리를 한다. 상층액을 분리하여 QuantiChrom™ Calcium Assay 키트를 이용하여 612 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였다.

<실험예 9: BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자로부터 세포의 유전자 발현 분석>

골아 세포의 후기 분화 마커인 유전자를 측정 분석함으로서 BCP 나노입자(비교예 1 및 비교예 2) 및 알렌드로네이트로 탑재된 BCP 나노입자(실시에 1 및 실시예 2)의 골 융합 효능을 평가하였다. 먼저 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 Sonicator로 10 시간 동안 분산 시켜준 뒤 와트만 실린지를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 그리고 1×10^5 의 MG63세포를 24-well plate분주 한 후 MG63세포가 분주된 곳에 BCP 나노입자 및 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산 된 세포배양액을 넣고 21 일 동안 분화 및 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 각각의 BCP 나노입자로부터 세포를 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1 분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 4 °C에서 약 1 분 동안 초음파를 가한 후, 원심분리를 한다. 상층액을 분리하여 RNeasy® Mini kit(RNeasy mini kit; Qiagen, Doncaster, VIC, Australia)를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 AccuPower® RT-PCR PreMix(Bioneer, Korea)이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였다. 하기도 7 및 도 8 에서 보여주듯이, 상기의 ALP 활성도와 칼슘 침착 농도의 변화 경향과 유사하게 BCP 나노입자, 알렌드로네이트 농도가 높아 갈수록 골분화 관련 초기 및 후기 유전자들의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다.

또한, 후기 분화 마커(OCN : Osteoncalcin, OPN : Osteopontin)유전자들은 BCP 나노입자, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml

의 알렌드로네이트가 탑재된 BCP 나노입자에서 모두 유효성이 있는 것으로 관찰되었다. (* $P < 0.001$)

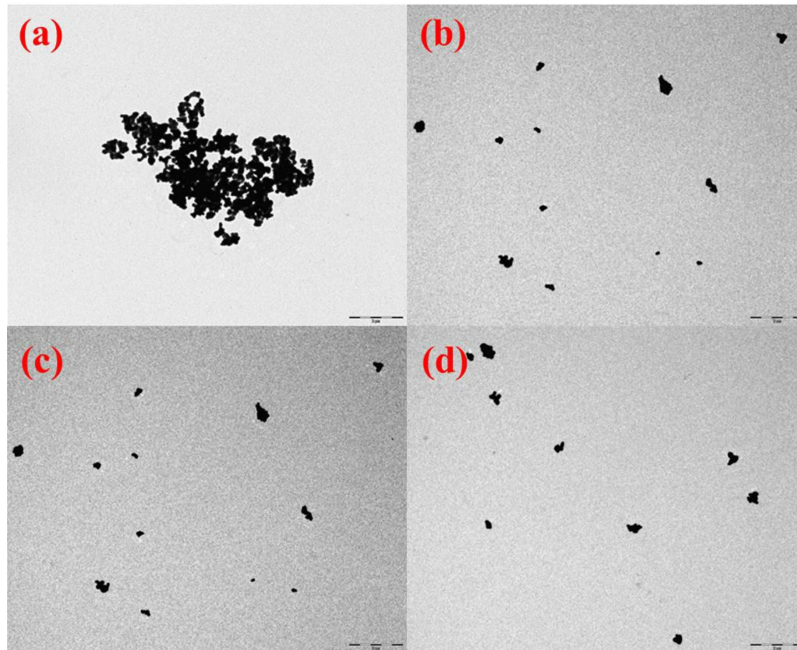
[0072] <실험예 10: 주입형 BCP 나노입자 제작>

[0073] 한편, 쥐 경골(tibia)에 8 mm 골 결손(bone defect) 부분에 BCP 나노입자와 알렌드로네이트가 탑재 된 BCP 나노입자를 주입형 타입으로 제작하여 이식 하였다. BCP 나노입자 800 mg과 BCP 나노입자의 25 %인 200 mg의 Sodium Carboxymethyl Cellulose(CMC)를 1 ml의 증류수에 섞어서 주입형 타입의 BCP와 알렌드로네이트가 탑재 된 BCP를 제작하였다.

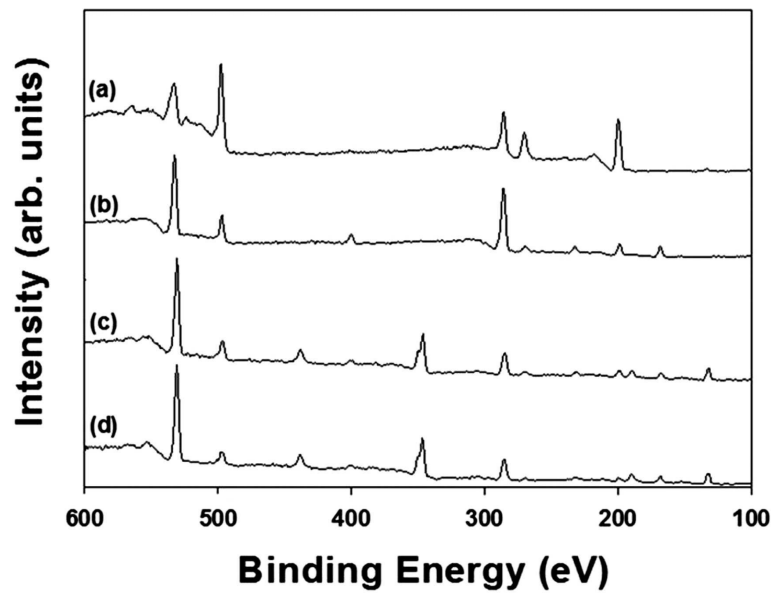
[0074] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

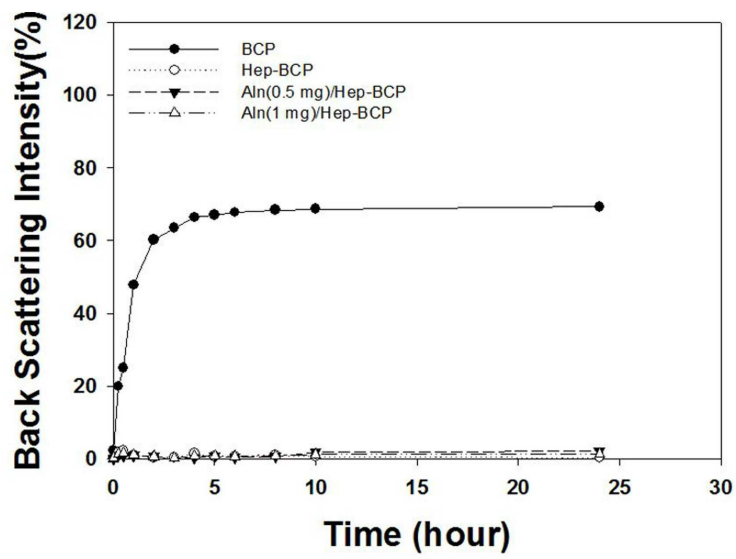
도면1



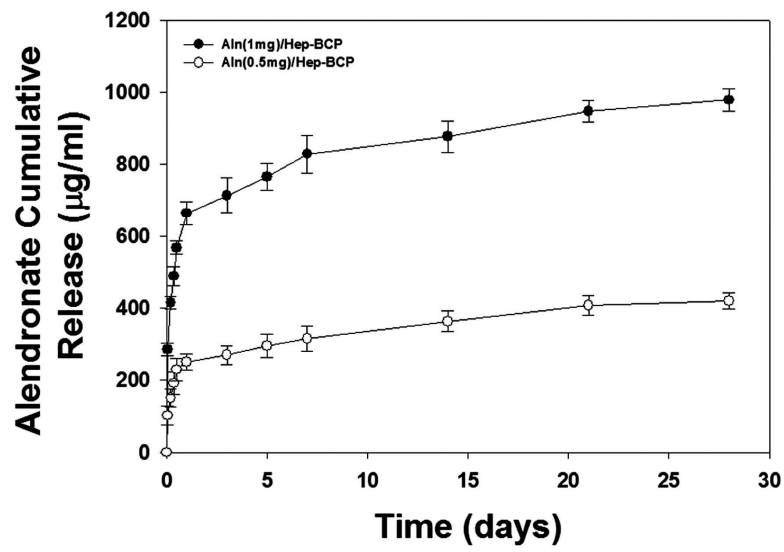
도면2



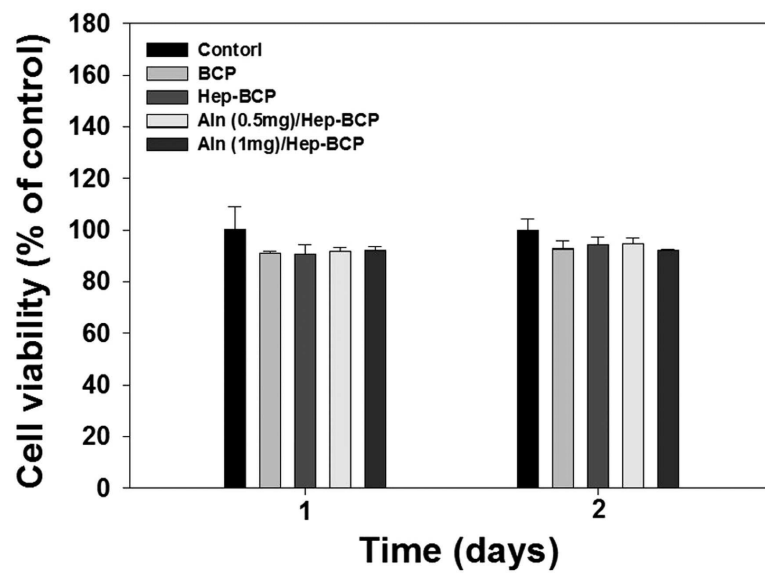
도면3



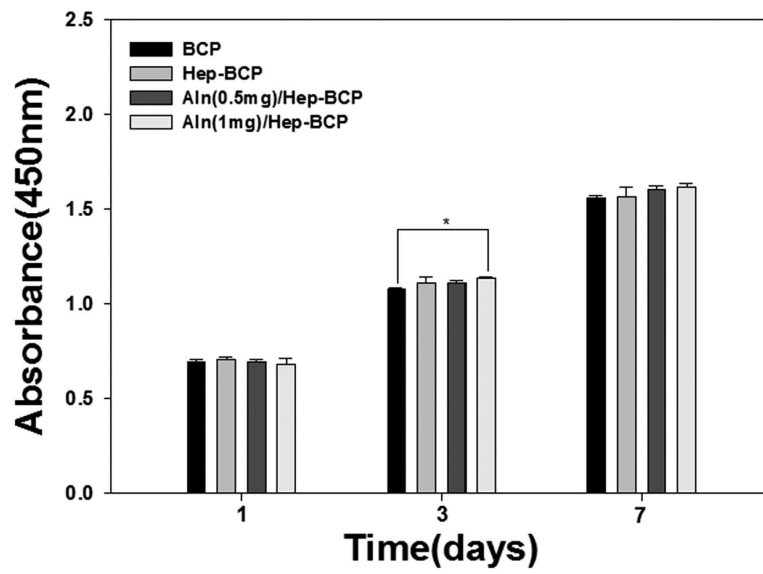
도면4



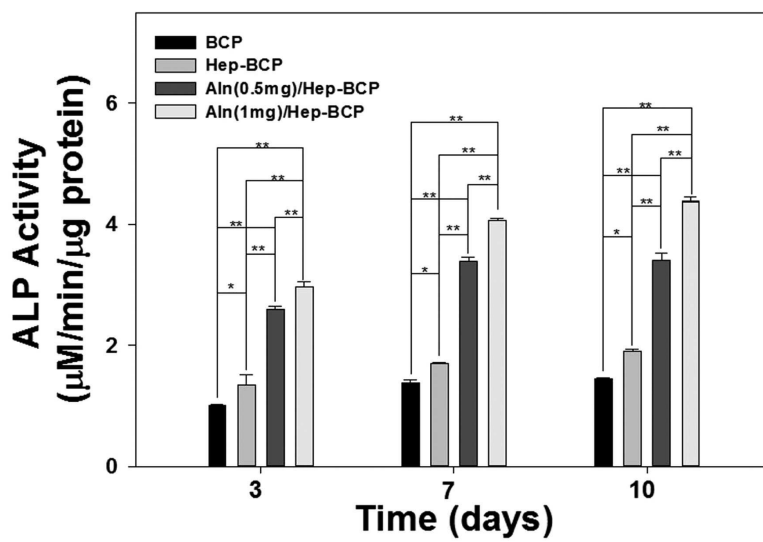
도면5



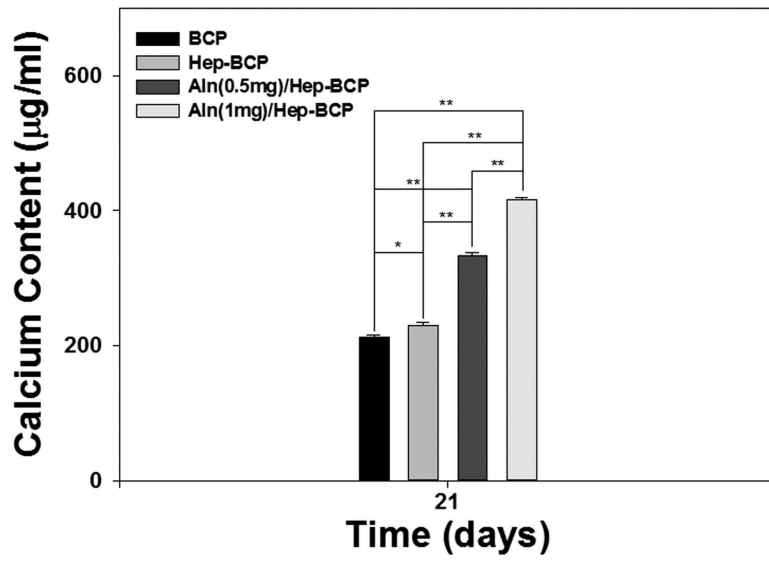
도면6



도면7

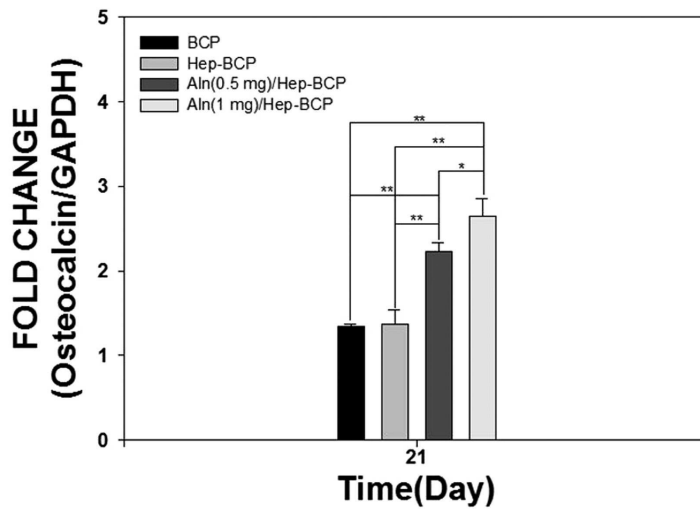


도면8

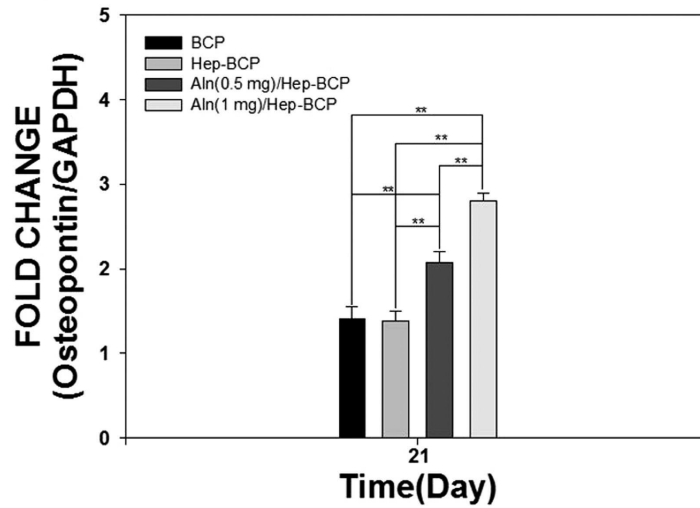


도면9

(A)



(B)



도면10

