

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 1월 17일 (17.01.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/009057 A2

- (51) 국제특허분류:
A61F 2/28 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/005423
- (22) 국제출원일: 2012년 7월 9일 (09.07.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0068088 2011년 7월 8일 (08.07.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-050 서울특별시 관악구 신림 9동 산 56-1, Seoul (KR). 주식회사 나이백 (NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION CO, LTD.) [KR/KR]; 110-749 서울특별시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학, Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정종평 (CHUNG, Chong-Pyoung) [KR/KR]; 138-170 서울특별시 송파구 송파동 58-1 잠실대우레이크월드 아파트 2701호, Seoul (KR). 박윤정 (PARK, Yoon-Jeong) [KR/KR]; 152-770 서울특별시 구로구 구로 5동 롯데아파트 110

동 402호, Seoul (KR). 이주연 (LEE, Jue-Yeon) [KR/KR]; 427-736 경기도 과천시 부림동 주공아파트 914동 304호, Gyeonggi-do (KR). 이상훈 (PARK, Hyun Jung) [KR/KR]; 150-010 서울특별시 영등포구 여의도동 여의도 자이아파트 101-902, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

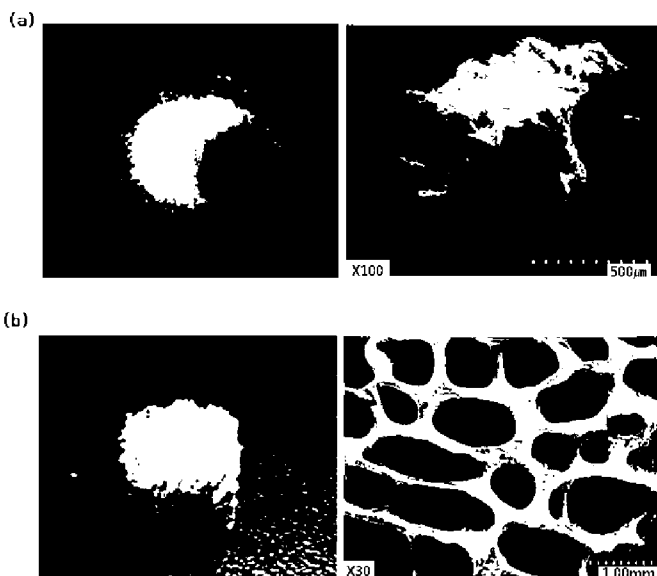
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: XENOGRAFT-DERIVED BONE GRAFTING SUBSTITUTE AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭: 이종골 유래 골이식재 및 그 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a bone grafting substitute and to a method for manufacturing same. The method for manufacturing the bone grafting substitute according to the present invention enables production of a bone grafting substitute which, compared with existing xenograft-derived bone grafting substitutes, has superior biocompatibility due to a lower protein content and which can fuse well in the tissues of a graft site without an inflammatory reaction, and furthermore, the method can provide increased osteoblast adhesion by treating surfaces of the bone grafting substitute with an acidic amino acid, and can provide improved conduction of newly-generated bone by introducing a bioactive factor.

(57) 요약서: 골이식재 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 골이식재 제조방법은 기존의 이종골 유래 골이식재에 비해 단백질의 함량이 낮아 생체적합성이 우수하여 이식 부위의 조직에서 염증반응 없이 잘 융합될 수 있는 골이식재를 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 산성 아미노산으로 표면을 처리함으로써 골세포의 부착능을 증가시킬 수 있고, 생리활성인자를 도입하여 신생골의 전도도 향상시킬 수 있다.

WO 2013/009057 A2



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 이종골 유래 골이식재 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 이종골을 사용하여 생체적합성, 세포부착능 및 골전도성이 우수한 골이식재 및 그 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 소뼈, 말뼈, 돼지뼈와 같은 이종골에서 단백질을 제거하고 산성 아미노산으로 표면처리하거나 생리활성물질을 첨가하여 생체적합성과 세포부착능 및 골전도성이 우수한 입자 또는 블록 형태의 골이식재를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 골이식재 (Bone grafting substitute, BGS)란 여러 가지 치과질환 또는 외상, 질병에 의한 퇴화 또는 기타 조직의 손실로 인하여 뼈 조직의 결손부가 생긴 경우, 이를 대체하여 뼈 조직 내의 공간을 충전시키고 신생골의 형성을 촉진시키기 위하여 사용하는 이식재를 말한다. 골이식재에는 생체유래 골이식재와 합성 골이식재가 있다. 생체유래 골이식재에는 자가골, 동종골 및 이종골이 있다. 자가골을 얻기 위해서는 수술을 해야하는 불편함이 있으며 너무 빨리 흡수되어 버리는 단점을 있다. 반면 동종골이식은 면역반응의 우려와 바이러스 및 질병의 감염 가능성이 있다. 인공적으로 제조된 합성골의 경우, 바이러스 및 질병의 감염 가능성은 없으나, 생체유래골에 비하여 골재생능이 떨어지고, 흡수가 너무 빠른 문제가 있다. 이러한 단점을 해결하고자 사람의 뼈와 비슷한 구조를 가진 동물의 뼈에서 유래된 이종골 이식재를 사용하고 있으며, 대표적인 상품으로 가이스트리히사 (Geistlich)의 바이오오스(BioOss)를 들 수 있다. 이종골 이식재로 개발되기 위한 요건으로는 이종단백질과 그 외의 불순물을 제거하여 순수한 아파타이트만 추출해야 한다. 면역반응을 일으킬 수 있는 이종 단백질을 제거하고, 인체의 골조직 성분과 유사한 화학조성을 지니도록 제조하는 것이 가장 중요하다. 상기 동물의 뼈를 이용하여 골이식재를 제조하는 방법은 소의 대퇴부의 골을 80°C 내지 120°C의 끓는점을 가지는 용매를 가하여 지방질을 제거한 후, 암모니아 또는 1차 아민을 가하여 단백질 및 유기질을 제거시켜 골 미네랄을 제조한 후, 이를 250~600°C의 고온에서 수 시간 동안 가열하여 건조시키는 단계로 구성되어 있다 (미국등록특허 제5,167,961호, 미국등록특허 제5,417,975호).
- [4] 한편, 기존의 블록 형태의 골이식재를 제조하는 방법은 다공성 폴리머에 세라믹을 코팅한 후, 열처리하여 폴리머를 태우고 남은 세라믹을 소결하는 방법을 사용하였다. 사용된 세라믹은 인공적으로 합성된 골이식재로 이종골에서 유래된 골이식재와 차이가 있다 (대한민국 특허출원 제10-2000-0046973호).

- [5] 동종 또는 이종의 골조직을 블록형태로 절단하여 과산화수소 처리, 염산으로 탈회, RSC 용액 처리를 한후 진공 동결 건조하여 제조하는 방법이 있으나, 잔류하는 단백질로 인해 문제를 유발할 가능성이 있다 (대한민국 특허출원 제10-2008-0138644호).
- [6] 이에, 본 발명자는 말뚝을 차아염소산나트륨으로 처리하고 가압처리 및 고온처리하여 지방질과 유기질을 효과적으로 제거시켜 병원성 물질의 감염위험이 없는 골이식재 제조방법에 대해 특허를 취득하였으나 (대한민국 등록특허공보 제 10-0842012호), 골 이식재의 세포부착능과 신생골 전도능을 더욱 개선시키기 위한 골이식재 제조방법이 요구되고 있는 실정이다.
- [7] 이에, 본 발명자들은 단백질과 지방이 제거된 순수한 하이드록시아파타이트로 구성되고, 생체적합성, 세포부착능 및 골전도성까지 우수한 이종골 유래 골이식재를 제작하고자 예의 노력한 결과, 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)로 처리하고 고온으로 가열하여 단백질을 완벽히 제거시키고, 이러한 골이식재 제조 공정에서 골이식재의 표면에 산성 아미노산을 사용하여 표면의 거칠기를 감소시킴으로써 세포의 부착을 현저히 증가시킬 수 있고, 세포외기질유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드와 같은 생리활성인자를 골이식재에 도입하여 신생골의 전도를 현저히 향상시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] 발명의 요약

[10] 본 발명의 목적은 단백질을 제거하여 순수한 하이드록시아파타이트로 구성되면서 생체적합성, 세포부착능 및 골전도성이 향상된 입자형태 또는 블록형태의 이종골 유래 골이식재 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[11] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 입자형태의 이종골 유래 골이식재 제조방법을 제공한다:

[12] (a) 뼈를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 뼈의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 뼈를 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 뼈에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 건조된 뼈를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 뼈의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 뼈 분말을 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 뼈 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 뼈 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 뼈분말을 각각 212 내지 1000 μm 및 1000 내지 2000 μm 의 크기의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 산성 아미노산으로 상기 뼈 분말의 표면을 처리하는 단계.

[13] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 블록형태의 이종골 유래 골이식재 제조방법을 제공한다:

- [14] (a) 벼를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 벼의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 벼에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 벼를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 벼의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 벼를 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 벼에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 벼를 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 벼를 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 산성 아미노산으로 상기 벼의 표면을 처리하는 단계.
- [15] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 입자형태의 이종골 유래 골이식제 제조방법을 제공한다:
- [16] (a) 벼를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 벼의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 벼를 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 벼에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 건조된 벼를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 벼의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 벼 분말을 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 벼 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 벼 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 벼분말을 각각 212 내지 1000 μm 및 1000 내지 2000 μm 의 크기의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 상기 벼 분말에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.
- [17] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 블록형태의 이종골 유래 골이식제 제조방법을 제공한다:
- [18] (a) 벼를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 벼의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 벼에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 벼를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 벼의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 벼를 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 벼에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 벼를 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 벼를 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 상기 벼에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된 입자형태 또는 블록형태의

이종골 유래 골이식재를 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21]

도 1은 실시예 1에서 제조된 입자형태 및 블록형태 골이식재의 외형 및 시차주사전자현미경으로 관찰한 사진이다.

[22]

도 2는 실시예 1에서 제조된 입자형태 및 블록형태 골이식재의 XRD 측정 결과를 나타낸 것이다.

[23]

도 3는 실시예 1에서 제조된 입자형태 및 블록형태 골이식재에 산성아미노산으로 처리하기 전과 후의 골이식재 표면에 대한 시차주사전자현미경 사진을 나타낸 것이다.

[24]

도 4는 실시예 1에서 제조된 입자형태 및 블록형태 골이식재에 산성아미노산으로 처리하기 전과 후, 세포의 부착력을 관찰한 결과이다.

[25]

도 5는 실시예 1에서 제조된 입자형태의 골이식재에 세포외기질을 첨가한 후, 토끼의 두개골에서의 골재생력을 관찰한 결과이다.

[26]

도 6은 실시예 1에서 제조된 입자 및 블록 형태의 골이식재에 산성아미노산으로 처리한 뒤 세포외기질을 첨가한 후, 세포의 부착력을 관찰한 결과이다.

[27]

도 7은 실시예 1에서 제조된 입자형태의 골이식재에 골재생 기능성 펩타이드를 처리한 후 골재생력을 관찰한 결과 및 표면을 산성아미노산으로 처리한 뒤 골재생 기능성 펩타이드까지 처리한 후 골재생력을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

[28]

[29]

발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

[30]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[31]

본 발명은 일 관점에서, 다음 단계를 포함하는 입자형태의 이종골 유래 골이식재 제조방법에 관한 것이다:

[32]

(a) 뼈를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 뼈의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 뼈를 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 뼈에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 뼈 분말을 유기용매에 침적시켜 진탕하여 뼈의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 뼈 분말을 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 뼈 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 뼈 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히

- 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 뻬분말을 각각 212 내지 1000 μm 및 1000 내지 2000 μm 의 크기의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 산성 아미노산으로 상기 뻬 분말의 표면을 처리하는 단계.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 혈액성분이 제거된 뻬를 분쇄하는 (c) 단계는 뻬에서 지방질과 단백질을 제거하기 이전에 시행함으로써, 뻬의 표면적을 높여 지방질과 단백질 제거를 더 용이하게 할 수 있다.
- [34] 본 발명에 있어서, 상기 뻬 분말을 유기용매에 침적시키는 (e) 단계는 뻬 분말에 존재하는 잔여 지방질을 제거하는 단계로서, 상기 유기용매는 클로로포름과 메탄올의 혼합용매인 것을 특징으로 할 수 있고, 사용하는 혼합용매의 클로로포름:메탄올 비율은 2~8:8~2일 수 있으며, 1:1인 것이 바람직하다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 (g) 단계의 차아염소산나트륨 용액으로 처리하는 단계는 뻬 분말의 잔여 단백질을 수용성 상태로 분해하여 제거시키고, 광우병을 유발하는 변성 프라이온 단백질을 불활성화 시키는 단계로서, 사용하는 차아염소산나트륨은 2~20%(w/v) 농도의 용액을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 4%(w/v) 농도의 차아염소산나트륨 용액을 사용하는 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 차아염소산나트륨을 처리하는 시간은 프라이온 및 잔여 단백질을 제거하기 위하여 72시간 이상 처리하는 것이 바람직하다.
- [36] 본 발명에 있어서, 상기 (i) 단계의 열처리 온도는 550°C~ 650°C일 수 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 산성 아미노산으로 뻬 분말 표면을 처리하는 (k) 단계는 골이식재의 표면 거칠기를 조정하여 세포 부착을 증가시킬 수 있다. 상기 산성아미노산으로는 글루탐산(Glutamic acid)과 아스파르트산(aspartic acid)을 사용할 수 있다. 산성아미노산의 처리농도는 1-20% (w/v)을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 5-10% (w/v)을 사용할 수 있다. 처리시간은 5-18시간으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 8-12시간으로 할 수 있다.
- [38] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 블록형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법을 제공한다:
- [39] (a) 뻬를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 뻬의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 뻬에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 뻬를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 뻬의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 뻬를 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 뻬에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 뻬를 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 뻬를 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 산성 아미노산으로 상기 뻬의 표면을 처리하는 단계.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 블록형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법은 입자형태의 골이식재 제조방법과 달리, 뻬를 분쇄하는 (c) 단계를 포함하고 있지

않으며, 뼈에서 지질과 단백질을 제거한 뒤 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계를 포함하고 있다.

- [41] 본 발명에 있어서, 상기 산성 아미노산으로 뼈의 표면을 처리하는 (j) 단계는 입자형태와 블록형태 골이식제 둘 모두에 이용될 수 있으며, 블록형태의 골이식제의 표면 거칠기를 조정하여 세포 부착을 증가시킬 수 있다. 상기 산성아미노산으로는 글루탐산(Glutamic acid)과 아스파르트산(aspartic acid)을 사용할 수 있다. 산성아미노산의 처리농도는 1-20% (w/v)을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 5-10% (w/v)을 사용할 수 있다. 처리시간은 5-18시간으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 8-12시간으로 할 수 있다.
- [42] 본 발명은 일 관점에서, 다음 단계를 포함하는 입자형태의 이중골 유래 골이식제 제조방법에 관한 것이다:
- [43] (a) 뼈를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 뼈의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 뼈를 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 뼈에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 건조된 뼈를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 뼈의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 뼈 분말을 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 뼈 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 뼈 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 뼈분말을 각각 212 내지 1000 μm 및 1000 내지 2000 μm 의 크기의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 상기 뼈 분말에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.
- [44] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 (j)와 (k) 단계 사이에 산성 아미노산으로 상기 뼈의 표면을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 산성 아미노산으로 뼈의 표면을 처리하고, 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하면, 세포부착이 증가함과 더불어 골재생능도 높아지는 효과를 얻을 수 있다.
- [45] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 블록형태의 이중골 유래 골이식제 제조방법을 제공한다:
- [46] (a) 뼈를 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 뼈의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 뼈에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 뼈를 유기용매에 침적시켜 진탕하여 뼈의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 뼈를 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 뼈에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 뼈를 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 뼈를 원하는 크기의

블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 상기 뼈에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.

- [47] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 (i)와 (j) 단계 사이에 산성 아미노산으로 상기 뼈의 표면을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 산성 아미노산으로 뼈의 표면을 처리하고, 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하면, 세포부착이 증가함과 더불어 골재생능도 높아지는 효과를 얻을 수 있다.
- [48] 본 발명에 있어서, 상기 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계에 의해 신생골 전도가 촉진될 수 있다.
- [49] 상기 세포외기질 유래 성분은 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 히알루론산(hyaluronic acid) 및 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycans)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 세포외기질 유래성분은 물리적인 흡착과 수소결합 등을 통해 골이식재와 결합하며, 화학적인 가교제를 사용하여 결합력을 더 강하게 할 수 있다.
- [50] 상기 골재생 기능성 펩타이드는 (i) 골재생능을 가지는 펩타이드와 (ii) 아파타이트 결합능을 가지는 펩타이드가 결합된 펩타이드인 것을 특징으로 할 수 있다. (i) 골재생능을 가지는 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 35의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, (ii) 아파타이트 결합능을 가지는 펩타이드는 서열번호 36 내지 서열번호 39의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [51] 구체적으로, (i) 상기 골조직재생능을가지는펩타이드는 (a)골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)-2, 4 및 6의 아미노산 서열 중 각각 2-18위치의 아미노산 서열 [BMP-2의 경우 (서열번호1), BMP-4의 경우(서열번호 2) 및 BMP-6의 경우 (서열번호 3)], BMP-2의 16-34위치의 아미노산 서열 (서열번호 4), 47-71위치의 아미노산 서열 (서열번호 5), 73-92위치의 아미노산 서열 (서열번호 6), 88-105위치의 아미노산 서열 (서열번호 7), 83-302위치의 아미노산 서열 (서열번호 8), 335-353위치의 아미노산 서열 (서열번호 9) 및 370-396위치의 아미노산 서열 (서열번호 10); BMP-4의 74-93위치의 아미노산 서열 (서열번호 11), 293-313위치의 아미노산 서열 (서열번호 12), 360-379위치의 아미노산서열 (서열번호 13) 및 382-402위치의 아미노산서열 (서열번호 14) BMP-6의 91-110위치의 아미노산서열 (서열번호 15), 407-418위치의 아미노산서열 (서열번호 16), 472-490위치의 아미노산서열 (서열번호 17) 및 487-510위치의 아미노산서열 (서열번호 18) 및 BMP-7의 98-117위치의 아미노산서열 (서열번호 19), 320-340위치의 아미노산 서열 (서열번호 20), 400-409위치의 아미노산 서열 (서열번호 21) 및 405-423위치의 아미노산 서열 (서열번호 22);
- [52] (b)bone sialoprotein II(BSP II)의 62-69위치의 아미노산 서열 (서열번호 23),

- 140-148위치의 아미노산 서열 (서열번호 24), 259-277위치의 아미노산 서열 (서열번호 25), 199-204위치의 아미노산 서열 (서열번호 26), 151-158위치의 아미노산 서열 (서열번호 27), 275-291위치의 아미노산 서열 (서열번호 28), 20-28위치의 아미노산 (서열번호 29), 65-90위치의 아미노산 서열 (서열번호 30), 150-170위치의 아미노산 (서열번호 31) 및 280-290위치의 아미노산 서열 (서열번호 32);
- [53] (c) bone sialoprotein I(BSP I, osteopontin)의 149-169 위치의 아미노산 서열 YGLRSKS (서열번호 33), KKFRRPDIQYPDAT (서열번호 34) 및 YGLRSKSKKFRRPDIQYPDAT (서열번호 35) 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 이상의 펩타이드인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [54] (ii) 아파타이트무기질에 결합하는 펩타이드는 서열번호 36 STLPIPEFSRE), 서열번호 37 (VTKHLNQISQSY), 서열번호 38 (SVSVGMKPSRP) 및 서열번호 39 (NRVFEVLRVFD)로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 골조직 재생능을 가지는 펩타이드의 N-말단에 화학적으로 부가되어, 뼈의 구성성분인 아파타이트에 대한 결합능을 증가시켜 골이식재 또는 아파타이트가 코팅된 임플란트 표면 등에 안정하게 결합할 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드는 (i) 골재생능을 가지는 펩타이드와 (ii) 아파타이트 결합능을 가지는 펩타이드가 결합된 펩타이드로서, 아파타이트 표면에 결합하여 안정한 상태로 존재가 가능하여 치과용 또는 정형외과용 골대체제 및 아파타이트가 코팅된 금속, 천연고분자, 합성고분자에 적용될 수 있으며, 골조직 재생에 관련된 세포의 이행, 증식 및 분화를 촉진하여 최종적으로 골조직재생력을 극대화시킬 수 있고, 생체 내에 이식하였을 때 펩타이드 활성을 유지한 채로 안정하게 존재할 수 있어 이를 이용한 골조직 재생 치료기술의 발전에 유용하다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드는 아파타이트 표면에 안정적으로 고정됨으로써, 펩타이드의 안정성이 증가하고 장기간 동안 활성을 유지할 수 있다. 따라서, 체내에 이식하였을 때 이식된 국소에서 안정하게 유지됨으로써, 펩타이드에 의한 골재생 효과가 지속될 수 있으며 이는 골조직 및 치주조직 재생 치료에 적합한 특징을 갖는다.
- [57] 본 발명에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드는 생물유래 수산화인회석 골미네랄, 합성 수산화아파타이트, 탄산아파타이트, 트리칼슘인산 및 모노칼슘인산으로 구성된 군에서 선택되는 아파타이트에 결합할 수 있다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드의 용량은 골이식재의 단위무게당(1g) 1-100mg이 함유되도록 하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 골이식재의 단위무게당 20-80mg을 함유할 수 있다.
- [59] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 36의 아파타이트 결합능을 가지는 펩타이드와 서열번호 35의 골조직 재생능을 가지는 펩타이드를 결합시켜 서열번호 40의 골재생 기능성 펩타이드를 제작하고, 제작된 펩타이드가

골이식체에 안정적으로 결합하는지를 확인하였으며, 아파타이트 표면에 상기 펩타이드가 안정적으로 고정된 골이식체를 골결손부에 이식하여 골재생력을 확인하였다.

- [60] 본 발명에 있어서, 상기 이종골은 소뼈, 말뼈 및 돼지뼈로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [61] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 이종골 유래 골이식체 제조방법에 의해 제조된 입자형태 또는 블록형태의 골이식체에 관한 것이다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 "골이식체(bone graft substitute)"는 골조직 내의 공간을 충전하기 위한 물질이며, 골이식체는 압착, 압축, 가압접촉, 패킹, 압박, 균힘 등의 방법을 사용하여, 퍼티, 페이스트, 주형가능한 스트립, 블록, 칩 등의 형태로 성형하여 사용할 수 있고, 화학적 첨가물을 이용하여 젤, 과립, 페이스트, 정제, 펠렛 등의 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 분말 형태 그대로 사용하는 것도 가능하다.
- [63] 상기와 같이 골이식체를 제형화하여 사용할 경우에는 골 성장을 촉진하는 성장인자, 피브린, 골 형태 형성인자, 골성장제, 화학요법제, 항생제, 진통제, 비스포스포네이트, 스트론튬염, 불소염, 마그네슘염 및 나트륨 염 등을 사용할 수 있다. 상기 성장인자로는 BMP(bone morphogenic protein), PDGF(Platelet-derived growth factor), TGF-beta(Transgenic growth factor), IGF-I(Insulin-like growth factor), IGF-II, FGF(Fibroblast growth factor) 및 BGDF-II(beta-2-microglobulin) 등을 사용할 수 있다. 상기 골 형태 형성인자로는 오스테오칼신(osteocalcin), 본사이알로프로테인(bonesialo protein), 오스테오게닌(osteogenin), BMP 등을 사용할 수 있다. 상기 골 성장제는 인체에 무해하고 골 성장을 촉진하는 물질이라면 제한 없이 사용이 가능하며, 골 형성을 증진시키는 펩타이드나 핵산, 골형성을 억제하는 물질의 길항제 등을 사용할 수 있다.
- [64] 본 발명에서 골이식체를 제형화하는데 사용되는 화학적 첨가물은 히알루론산(hyaluronic acid), 콜라겐, 수산화인회석, 탄산칼슘, 인산칼슘, 황산칼슘, 세라믹 등이 있으며, 상기 첨가물의 종류에 따라 젤, 스트립, 과립, 칩, 펠렛, 정제, 페이스트 등의 형태로 제형이 가능하다.
- [65] 본 발명의 골이식체의 사용의 편리성을 증가시키기 위한 젤 또는 페이스트 형태의 약제학적 조성물로 제조하기 위해 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 알지네이트, 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜, 폴록사머, 폴리락트산, 폴리락틱글리콜산, 폴리카프로락톤 등을 포함하는 생체적합성 고분자를 사용할 수 있다.
- [66] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[67]

[68] 실시예 1 : 골이식재의 제조

[69]

[70] 실시예 1-1 : 입자형태 골이식재의 제조방법

[71] [전처리 및 분쇄공정]

[72] 소의 대퇴부 부위에서 취득한 뼈를 골절단기를 이용하여 약 2cm³ 크기로 절단하였다. 상기 절단된 뼈 조각을 탈이온수에서 24시간 동안 침적하여 뼈에 존재하는 혈액 성분을 제거하였다. 혈액성분이 제거된 뼈를 분쇄기를 이용하여 0.7mm 이하의 크기가 되도록 분쇄하였다. 상기 뼈 분말을 12시간마다 탈이온수를 교환하며 72시간 동안 끓여, 뼈에 존재하는 지방질과 단백질을 1차적으로 제거하였다. 상기 1차적으로 지방질과 단백질이 제거된 뼈 조각을 60°C의 오븐에서 24시간 동안 완전히 건조시켰다.

[73]

[74] [탈지처리 공정]

[75] 건조된 뼈 분말 1g당 20ml의 클로로포름과 메탄올이 1:1 부피비로 혼합된 용매를 첨가하고 120rpm의 회전 속도로 24시간 동안 진탕하여 탈지처리를 수행하였다. 탈지처리가 완료된 뼈 분말 중 잔존하는 용매를 제거하기 위하여 뼈 분말 1g 당 50g의 비율로 탈이온수를 첨가한 후 120rpm으로 12시간 동안 진탕하여 분말에 잔존하는 용매를 제거하였다. 이때, 매 2시간 마다 새로운 탈이온수로 교환하여 수세효율을 높였다. 수세가 완료된 뼈 분말은 60°C의 오븐에서 완전히 건조시켰다.

[76]

[77] [탈단백 처리공정]

[78] 탈지 처리가 완료된 건조 뼈 분말 1g당 25ml의 4%(w/v) 농도의 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite) 용액을 첨가하고 120rpm의 회전속도로 24시간 동안 진탕하여 뼈 분말 중에 존재하는 단백질을 제거하였다. 탈단백 처리가 완료된 뼈 분말에 잔존하는 용매를 제거하기 위하여 뼈 분말 1g 당 50g의 탈이온수를 첨가하고 120rpm에서 72시간동안 진탕하여 잔존하는 차아염소산 나트륨을 제거하였다. 이때, 처음 12시간 동안은 매 2시간 마다 새로운 탈이온수로 교환하여 주었으며, 그 후에는 매 12시간 마다 새로운 탈이온수로 교환하였다. 수세가 완료된 뼈 분말은 60°C의 오븐에서 완전히 건조시켰다.

[79]

[80] [열처리 공정]

[81] 탈지와 탈단백 처리가 완료된 건조 뼈 분말은 고온 열처리하여 잔존하는 지질과 단백질을 제거하였다. 열처리에 사용되는 전기로는 분당 2도로 승온시켰으며, 뼈 분말은 600°C에서 3시간 동안 열처리시킨 후 노냉시켰다.

[82]

[83] [분별 공정]

- [84] 열처리가 완료된 뻬 분말은 212~1000 μ m, 1000~2000 μ m 크기의 체를 사용하여 거르고, 걸러진 뻬 분말을 탈이온수로 수차례 수세하여 표면에 잔존하는 미세 분진들을 제거한 후 60°C 오븐에서 24시간 건조하고 수득하여 골이식재로 사용하였다.
- [85]
- [86] 실시예 1-2: 블록형태골이식재의제조방법
- [87] [전처리공정]
- [88] 말의 대퇴부 부위에서 취득한 뼈를 골절단기를 이용하여 8cm³ 크기로 절단하였다. 상기 절단된 뼈 조각을 정제수에서 6~15시간 동안 침지 후 정제수를 갈아주고 6~15시간 동안 다시 침지하는 방법으로 뼈 조각에 존재하는 혈액 성분을 제거하였다. 상기 정제수로 혈액이 제거된 뼈 조각을 1일 3시간이상 가열, 최대 6시간으로 제한하였다. 이 방법은 최소 72시간에서 최대 80시간동안 반복하여 뼈 조각에 존재하는 지방질과 단백질을 1차적으로 제거하였다. 상기 1차적으로 지방질과 단백질이 제거된 뼈 조각을 120°C 12시간 건조하였다. 건조된 뼈 조각에서 해면골과 치밀골로 각각 분류하였다.
- [89]
- [90] [탈지처리 공정]
- [91] 건조된 뼈 조각의 1g당 6ml의 클로로포름과 메탄올이 1:1부피비로 혼합된 용매를 첨가하고 24시간동안 침지시켜 탈지처리를 수행한 후 메탄올을 버렸다. 탈지처리가 완료된 뼈 조각 중 잔존하는 용매를 제거하기 위하여 뼈 1g당 6ml의 메탄올로 12시간동안 침지시킨 후 메탄올을 버렸다. 뼈 조각 중 잔존하는 메탄올을 제거하기 위해 뼈 조각 1g 당 10ml의 정제수로 6회 수세한 후 가압가열의 방법으로 1회 1시간씩 6회 반복하여 세척하였다. 세척이 완료된 뼈 조각은 120°C의 오븐에서 12시간 동안 완전히 건조시켰다.
- [92]
- [93] [탈단백처리 공정]
- [94] 탈지 처리가 완료된 건조 뼈 조각의 1g당 8ml의 4%(w/v) 농도의 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액을 첨가하여 약 6시간 침지 후 거품이 잦아들고 차아염소산나트륨이 무색으로 변화 시 차아염소산나트륨을 교체하였다. 이 방법을 3회 ~5회 반복하여 실시하였다. 탈단백 처리가 완료된 뼈 조각에 잔존하는 용매를 제거하기 위하여 뼈 조각을 정제수로 12시간동안 10회 세척한 후, 정제수로 1시간에 한 번씩 총 10회 Lab Stirrer로 세척하였다. 10회 세척이 끝난 후 다시 정제수 10L를 채운 후 30분간 가열 후 버리는 방법을 2회 반복하였다. 세척이 끝난 뼈 조각을 120°C 12시간 동안 완전히 건조하였다.
- [95]
- [96] [열처리 공정]
- [97] 탈지와 탈단백 처리가 완료된 건조 뼈 조각은 고온 열처리하여 잔존하는 지질과 단백질을 제거하였다. 열처리에 사용되는 전기로는 분당 2도로

승온시켰으며, 뼈 조각은 600°C에서 3시간 동안 열처리 시킨 후 노냉시켰다. 열처리가 완료된 뼈 조각을 정제수를 넣어 1시간동안 가열한다. 가열세척을 수차례 반복하여 미세 분진들을 제거한 후 120°C 12시간 오븐에서 건조하고 수득하여 골이식재로 사용하였다.

[98]

[99] [블럭으로 절단하는 공정]

[100] 건조된 골이식재를 원하는 크기의 블럭으로 절단하였다.

[101]

[102] 실시예 1-3 : 상기골이식재의외형및결정도관찰

[103] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 제조된 입자형태 및 블럭형태 골이식재의 외형과 내부를 관찰하였다. 내부는 시차주사전자현미경을 이용하였다. 더불어, 상기와 같이 제조된 골이식재가 아파타이트 결정으로 이루어졌는지 확인하기 위해 XRD를 측정하여 결정화도를 분석하였다. 도 1a는 입자형태의 골이식재의 외형 사진 및 시차주사전자현미경 사진이고, 도 1b는 블럭형태의 골이식재의 외형 사진 및 시차주사전자현미경 사진이다. 도 2는 XRD 그래프로서, 도 2a는 입자형태 골이식재의 XRD 그래프이고, 도 2b는 블럭형태 골이식재의 XRD 그래프를 나타낸 것이다. 모두 순수한 아파타이트 결정으로 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

[104]

[105] 실시예 2 : 산성아미노산으로의 처리

[106]

[107] 실시예 2-1: 표면처리된골이식재의제조방법

[108] 실시예 1에서 제조한 골이식재 10g 각각을 5%(w/v) 아스파르트산 용액 50mL에 넣어 침지한 후, 6시간 동안 방치하였다. 아스파르트산 용액을 제거하기 위해 pH 7.0 ± 0.5 이 될 때까지 정제수로 세척하고, 오븐에서 건조하였다.

[109]

[110] 실시예 2-2 : 표면처리후거칠기관찰

[111] 실시예 2-1에서 제조된 골이식재를 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액으로 고정하였다. 고정된 골이식재를 1%의 오스뮴 테트록사이드(osmium tetroxide) 용액으로 처리한 후 세척하고, 탈수 및 건조하였다. 상기와 같이 제조된 골이식재의 표면을 시차주사전자현미경으로 관찰하였다.

[112] 상기 관찰 결과를 도 3에서 골이식재의 시차주사전자현미경 사진으로 나타내었다. 도 3a는 표면처리 전과 후의 입자형태의 골이식재의 표면사진이며, 도 3b는 표면처리 전후 블럭형태의 골이식재의 표면을 나타낸 것이다.

[113] 블럭형태의 골이식재는 내부까지 기공이 연결된 것으로 보이며, 조직공학용지지체로 사용하기에 적합한 구조를 가지고 있다. 또한 산성아미노산으로 표면처리 후에 거칠기가 감소한 것을 알 수 있다.

[114]

- [115] 실시예2-3 : 표면처리에 의한 골이식재의 세포 부착능 관찰
- [116] 실시예 1에서 제조된 입자형태, 블록형태 골이식재를 4-well chamber slide에 넣고, 세포를 접종한 후 각각 4시간 동안 배양하였다. 세포(human osteosarcoma cell, 한국세포주은행에서 구입)가 배양된 골이식재를 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액으로 고정하였다. 고정된 골이식재를 1%의 오스뮴 테트라옥사이드(osmium tetroxide) 용액으로 처리한 후 세척하고, 탈수 및 건조하였다. 시차주사전자현미경으로 세포가 배양된 골이식재의 표면을 관찰하였다(도 4). 상기 결과를 실시예 2-1에서와 같이 산성 아미노산으로 표면처리한 뒤의 세포 부착능에 대한 관찰 결과와 비교하였다.
- [117] 그 결과, 도 4에서와 같이, 입자형태 골이식재와 (도 4a), 블록형태 골이식재(도 4b) 모두, 표면처리하기 전의 골이식재의 세포부착에 비해, 표면처리 후 골이식재의 세포부착이 현저히 증가된 것을 알 수 있다. 블록형태의 골이식재의 경우 기공안으로 세포가 잘 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 산성 아미노산 처리에 의해 골이식재 표면의 미분말이 제거되면서, 골이식재의 표면이 세포가 부착되기에 적합하게 되었기 때문이다.
- [118]
- [119] 실시예3-1: 세포외기질 유래 성분 함유한 골이식재의 제조
- [120] 2% (w/v) 콜라겐 용액에 50ml에 100mg의 리보오스 (D-ribose)를 넣고 용해하였다. 실시예 1에서 제조된 입자형태 또는 블록형태의 골이식재 10g을 넣은 후, 데시케이터 안에 넣고 진공상태로 1시간 유지하여 골이식재 내부까지 콜라겐 용액이 스며들게 하였다. 냉장 (4°C)에서 5일간 방치하고, 골이식재만 수거하여 동결건조 하였다. 140°C 진공하에서 48시간동안 방치하여 건조하였다.
- [121]
- [122] 실시예 3-2 : 세포외기질 유래 성분 추가에 의한 골이식재의 골 재생능 관찰
- [123] 상기 실시예 3-1에서 제조한 골이식재를 토끼의 두개골 원형골 결손부에서 이식하여 골 재생능을 확인하였다. 마취시킨 토끼 (Newzealand White rabbit, 종명: cuniculus)의 두개골부위에 직경 8mm의 원형 골결손부를 형성시키고, 상기 골결손부에 콜라겐 차폐막을 덮고, 골막과 피부를 이중봉합하였다. 이식 4주 후에 동물을 희생시키고, 채취한 표본은 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 후, 조직을 포매하여(embedding) 두께 20 μ m의 시편으로 제작하였다. 제작된 시편은 염기성 푹신과 툴루이딘 블루로 염색하여 비탈회 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 광학현미경으로 관찰하여 사진 촬영을 실시하였다.
- [124] 왼쪽의 열은 40 배율의 사진이며, 오른쪽 열은 왼쪽 열의 사각형 부분을 100 배율로 확대한 사진이다. GB는 골이식재, NB는 신생골을 뜻한다. 세포외기질 유래 성분을 처리하지 않은 골이식재 (도 5a) 보다 세포외기질 유래 성분을 처리한 골이식재 (도 5b)의 경우 골재생능이 증가된 것을 확인하였다(도 5). 이는 세포외기질 유래 성분을 골이식재에 도입함으로써 신생골이 재생되기에 더 적합한 환경을 조성해 주었기 때문이다.

[125]

[126] 실시예 3-3 : 산성아미노산 처리 + 세포외기질유래 성분 추가에 의한
골이식재의 세포 부착능 관찰

[127] 상기 실시예 2-1과 같이 산성아미노산으로 골이식재의 표면을 처리한 뒤, 상기
세포외기질 유래 성분을 추가할 경우, 세포 부착능이 더욱 증가하는지
관찰해보았다. 그 결과, 도 6에서 보이는 바와 같이, 산성 아미노산만을 처리한
경우(도 4)보다 세포 부착능이 더욱 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는, 산성
아미노산으로 거칠기가 감소됨과 동시에 세포외기질 유래성분의 도입으로
생체내와 유사한 환경을 조성하여 세포부착에 더 적합하게 되었기 때문이다.

[128]

[129] 실시예 4 : 골재생 기능성 펩타이드 첨가

[130]

[131] 실시예 4-1 : 골재생 기능성 펩타이드를 함유한 골이식재의 제조방법

[132] N 말단으로부터 순서대로 Osteopontin에서 유래된 골재생 효과가 있는
서열로서 YGLRSKSKKFRRPDIQYPDAT (서열번호 35), 아파타이트 결합능이
있는 펩타이드로서 STLPIPEFSRE (서열번호 36)를 함유하도록 펩타이드
합성장치를 이용하여 F-moc 고상 화학합성 방법으로 합성하였다. 즉, 블로킹
그룹(Blocking group)으로 Fmoc-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)이 결합된 Rink resin
(0.075mmol/g, 100 ~ 200 mesh, 1% DVB crosslinking)을 사용하여 합성하였으며,
합성기에 50mg의 Rink resin을 넣은 뒤 DMF로 resin을 스웰링(swelling) 시킨 후
Fmoc-group의 제거를 위해 20% piperidine/DMF 용액을 사용하였다. C말단부터
서열대로 0.5M amino acid 용액(용매: DMF), 1.0M DIPEA(용매: DMF&NMP),
0.5M HBTU(용매: DMF)를 각각 5, 10, 5 당량씩 넣어 질소 기류하에서 1~2시간
동안 반응시켰다. 상기 디프로텍션(deprotection)과 커플링(coupling) 단계가 끝날
때마다 DMF와 NMP로 두 번씩 세척하는 과정을 거쳤다. 마지막 아미노산을
커플링(coupling) 시킨 후에도 디프로텍션(deprotection)을 해주어 Fmoc-group을
제거하였다.

[133] 합성의 확인은 닌하이드린 테스트(ninhydrin test) 방법을 이용하였고, 테스트를
거치고 합성이 완료된 resin은 THF나 DCM으로 건조시킨 후 TFA cleavage
cocktail을 resin 1g당 20ml의 비율로 넣어 3시간 shaking 시킨 후 필터링을 통해
resin 과 펩타이드가 녹아 있는 cocktail을 분리하였다. 필터로 걸러진 용액을
진공증발농축기(rotary evaporator)를 이용하여 제거한 후 콜드 에테르(cold
ether)를 넣어주거나 펩타이드가 녹아있는 TFA cocktail용액에 직접 콜드
에테르를 과량 넣어주어 펩타이드를 고체상으로 결정화시키고 이를
원심분리하여 분리해내었다. 이때 에테르로 여러 번 세척과 원심분리 과정을
거쳐 TFA cocktail을 완전히 제거하였다. 이렇게 해서 얻어진 펩타이드는
중류수에 녹여 동결건조하였다.

[134] NH₂-STLPIPEFSRE-YGLRSKSKKFRRPDIQYPDAT-COONH₂(서열번호 40)

- [135] 합성된 펩타이드 서열은 레진으로부터 절단시켜 세척과정을 거쳐 동결건조 후 액체크로마토그래피에 의해 분리, 정제되었다. 정제된 펩타이드는 MALDI분석을 이용하여 분자량을 확인하였다.
- [136] 체내에서 안정성을 시험하기 위해 서열번호 40의 제조시 N 말단에 10당량의 FITC(Fluorescein isothiocyanate) 를 triethylamine (resin 1g당 1ml) 을 이용하여 결합시켰으며 이를 MALDI-TOF를 이용하여 분자량을 측정함으로써 그 합성을 확인하였다.
- [137] 이렇게 제조된 펩타이드 1200 mg을 3차 증류수 1 mL에 용해한 후, 실시예 1에서 제조된 골이식재 4 g에 가하고 24시간 동안 침적시킨 후, 동결건조하였다.
- [138]
- [139] 실시예 4-2: 골재생 기능성 펩타이드 첨가에 의한 골재생능 관찰
- [140] 실시예 4-1와 같이 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 40 펩타이드를 각각 골이식재에 결합시킨 후, 토끼의 두개골 원형골결손부에서 이식하여 골재생력을 확인하였다. 마취시킨 토끼(Newzealand White rabbit, 종명: cuniculus)의 두개골부위에 직경 8mm의 원형골결손부를 형성시키고, 상기 골결손부에 골이식재 및 펩타이드가 포함된 골이식재를 결손부당 50 mg씩 이식하고, 골막과 피부를 이중봉합하였다. 이식 2주 후에 동물을 희생시키고, 채취한 표본은 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 후 조직을 포매하여 두께 20 μ m의 시편으로 제작하였다. 제작된 시편은 염기성 푼신과 툴루이딘 블루로 염색하여 비탈회 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 광학현미경으로 관찰하여 사진 촬영을 실시하였다.
- [141] 이와 더불어, 실시예 2에서 제조된 산성아미노산으로 표면처리된 입자형태 또는 블록형태의 골이식재에도 상기와 동일한 방법으로 골재생 기능성 펩타이드를 처리하여 골재생효과를 관찰하였다.
- [142] 도 7은 골재생 기능성 펩타이드가 추가된 골이식재에 의한 골재생효과를 나타낸 것으로, 도 7a는 처리하기 전 입자형태의 골이식재에 의한 골재생 효과, 도 7b는 골재생 기능성 펩타이드를 처리한 후의 입자형태의 골이식재에 의한 골재생 효과, 도 7c는 산성 아미노산으로 표면처리 한 후 골재생 기능성 펩타이드도 추가한 입자형 골이식재에 의한 골재생 효과이다. 왼쪽의 열은 40배율의 사진이며, 오른쪽 열은 왼쪽 열의 사각형 부분을 100배율로 확대한 사진이다. GB는 골이식재, NB는 신생골을 뜻한다.
- [143] 그 결과, 골재생기능성 펩타이드를 처리한 경우 골 재생효과가 증가된 것을 알 수 있으며, 산성 아미노산과 + 골재생 기능성 펩타이드를 모두 처리한 경우 효과가 더욱 증대됨을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 산성아미노산 처리 및 골재생 기능성 펩타이드를 아파타이트로 된 골이식재 또는 아파타이트가 코팅된 임플란트에 사용할 경우, 골조직 재생 효과가 클 것으로 기대된다.
- [144]

산업상 이용가능성

[145] 본 발명에 따른 골이식재 제조방법은 소뼈, 말뼈, 돼지뼈와 같은 이중골에서 단백질과 지방을 완벽히 제거하여 순수한 하이드록시아파타이트로 구성된 입자 또는 블록 형태의 골이식재를 제공하여 기존의 이중골 유래 골이식재에 비해 단백질의 함량이 낮아 생체적합성이 우수하여 이식부위의 조직에서 염증반응 없이 잘 융합될 수 있는 골이식재를 제조할 수 있으며, 산성 아미노산으로 표면을 처리하여 골세포의 부착능을 증가시킬 수 있으며, 생리활성인자를 도입하여 신생골의 전도를 향상시킬 수 있다. 본 발명에 따른 골이식재는 치과, 정형외과, 성형외과등에서 골 손상부를 채워주어 신생골의 재생을 전도하는데 이용될 수 있고, 또한 세포를 배양할 수 있는 조직공학용 지지체로도 사용될 수 있다.

[146]

서열목록 Free Text

[147] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1]

다음 단계를 포함하는 입자형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법:

(a) 이중골을 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 이중골의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 이중골을 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 이중골에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 건조된 이중골을 유기용매에 침적시켜 진탕하여 이중골의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 이중골 분말을 약 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 이중골 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 이중골 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 이중골 분말을 212 내지 1000 μm 의 체공을 가지는 체로 분별한 다음, 1000 내지 2000 μm 의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 산성 아미노산으로 상기 이중골 분말의 표면을 처리하는 단계.

[청구항 2]

다음 단계를 포함하는 블록형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법:

(a) 이중골을 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 이중골의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 이중골에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 이중골을 유기용매에 침적시켜 진탕하여 이중골의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 이중골을 약 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 이중골에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 이중골을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 이중골을 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 산성 아미노산으로 상기 이중골의 표면을 처리하는 단계.

[청구항 3]

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 산성 아미노산은 글루탐산(Glutamic acid) 또는 아스파르트산(aspartic acid)인 것을 특징으로 하는 이중골 유래 골이식재 제조방법.

[청구항 4]

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 산성 아미노산은 1-20% (w/v)의 농도로 6 내지 18시간 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 이중골

유래 골이식재 제조방법.

[청구항 5]

다음 단계를 포함하는 입자형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법:

(a) 이중골을 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 이중골의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액성분이 제거된 이중골을 분쇄하는 단계; (d) 상기 분쇄된 이중골에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (e) 상기 건조된 이중골을 유기용매에 침적시켜 진탕하여 이중골의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (f) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (g) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 이중골 분말을 약 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (h) 상기 이중골 분말에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (i) 상기 건조된 이중골 분말을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (j) 상기 열처리된 이중골 분말을 212 내지 1000 μm 의 체공을 가지는 체로 분별한 다음, 1000 내지 2000 μm 의 체공을 가지는 체로 분별하는 단계; 및 (k) 상기 이중골 분말에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.

[청구항 6]

제 5항에 있어서, 상기 (j)와 (k) 단계 사이에, 산성 아미노산으로 상기 이중골 분말 표면을 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 이중골 유래 골이식재 제조방법.

[청구항 7]

다음 단계를 포함하는 블록형태의 이중골 유래 골이식재 제조방법:

(a) 이중골을 절단하는 단계; (b) 상기 절단된 이중골의 혈액성분을 제거하는 단계; (c) 상기 혈액 성분이 제거된 이중골에서 지방질과 단백질을 1차 제거하고 건조하는 단계; (d) 상기 건조된 이중골을 유기용매에 침적시켜 진탕하여 이중골의 지방질과 단백질을 2차 제거하는 단계; (e) 상기 유기용매를 제거하고 건조시키는 단계; (f) 프라이온 및 기타 단백질을 불활성화시키기 위하여 상기 용매가 제거된 이중골을 약 4% 농도의 차아염소산나트륨용액으로 처리하는 단계; (g) 상기 이중골에서 차아염소산나트륨용액을 제거하고 건조시키는 단계; (h) 상기 건조된 이중골을 열처리하여 지질과 단백질을 완전히 제거하는 단계; (i) 상기 이중골을 원하는 크기의 블록으로 절단하는 단계; 및 (j) 상기 이중골에 세포외기질 유래 성분과 골재생 기능성 펩타이드로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 생리활성물질을 첨가하는 단계.

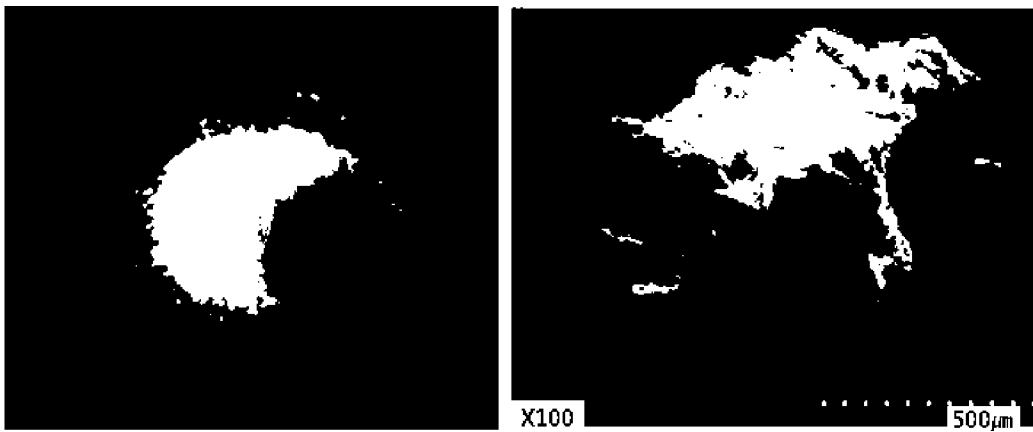
[청구항 8]

제 7항에 있어서, 상기 (i)와 (j) 단계 사이에, 산성 아미노산으로

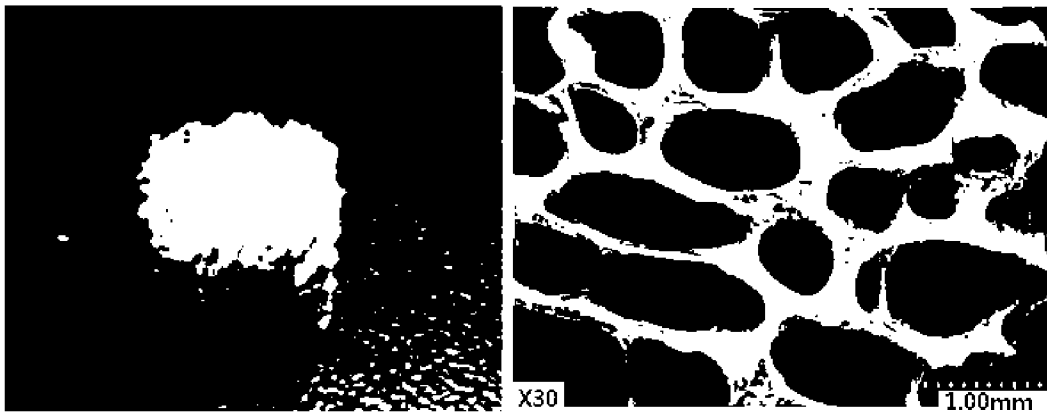
- 상기 이공골 표면을 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 이종골 유래 골이식재 제조방법.
- [청구항 9] 제 5항 또는 제 7항에 있어서, 상기 세포외기질 유래 성분은 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 히알루론산(hyaluronic acid) 및 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycans)으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 이종골 유래 골이식재 제조방법.
- [청구항 10] 제 5항 또는 제 7항에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 35의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 펩타이드와 서열번호 36 내지 서열번호 39의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택된 하나의 펩타이드가 결합된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 이종골 유래 골이식재 제조방법.
- [청구항 11] 제 5항 또는 제 7항에 있어서, 상기 골재생 기능성 펩타이드는 서열번호 40의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 이종골 유래 골이식재 제조방법.
- [청구항 12] 제 1항, 제 2항, 제 5항 또는 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종골은 소뼈, 말뼈 및 돼지뼈로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 이종골 유래 골이식재 제조방법.
- [청구항 13] 제 1항, 제 2항, 제 5항 또는 제 7항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 골이식재와 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 알지네이트, 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜, 폴록사머, 폴리락트산, 폴리락틱글리콜산 및 폴리카프로락톤으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 고분자를 포함하는 젤 또는 페이스트 형태의 골 이식용 조성물.

[Fig. 1]

(a)

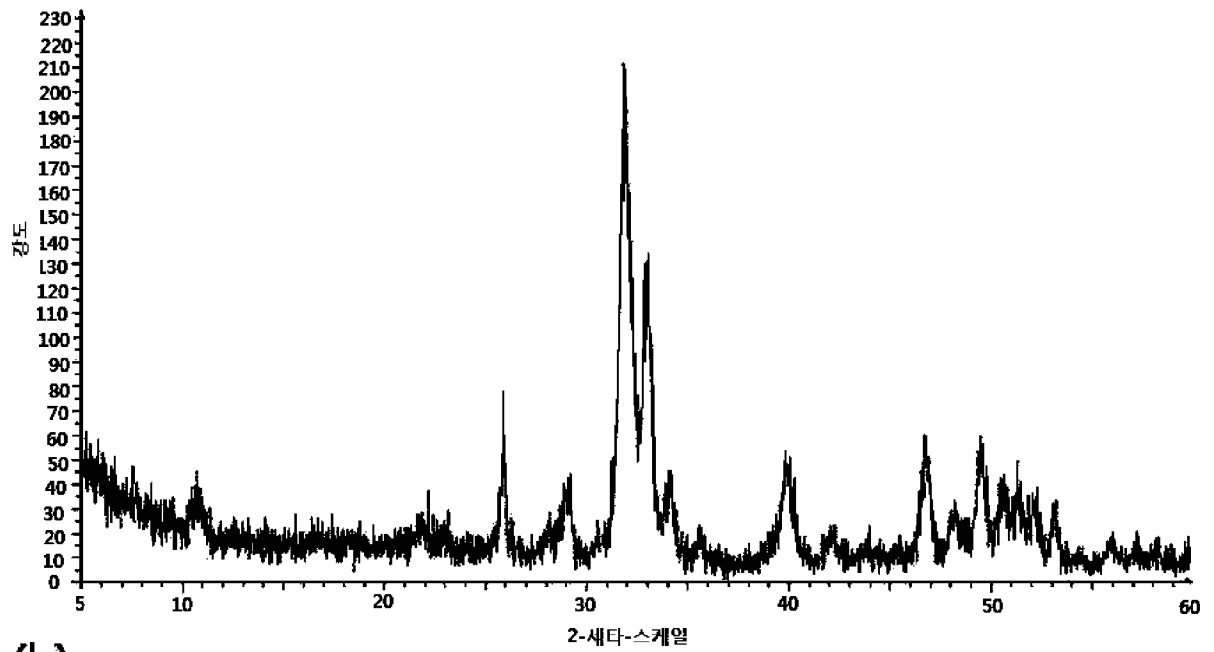


(b)

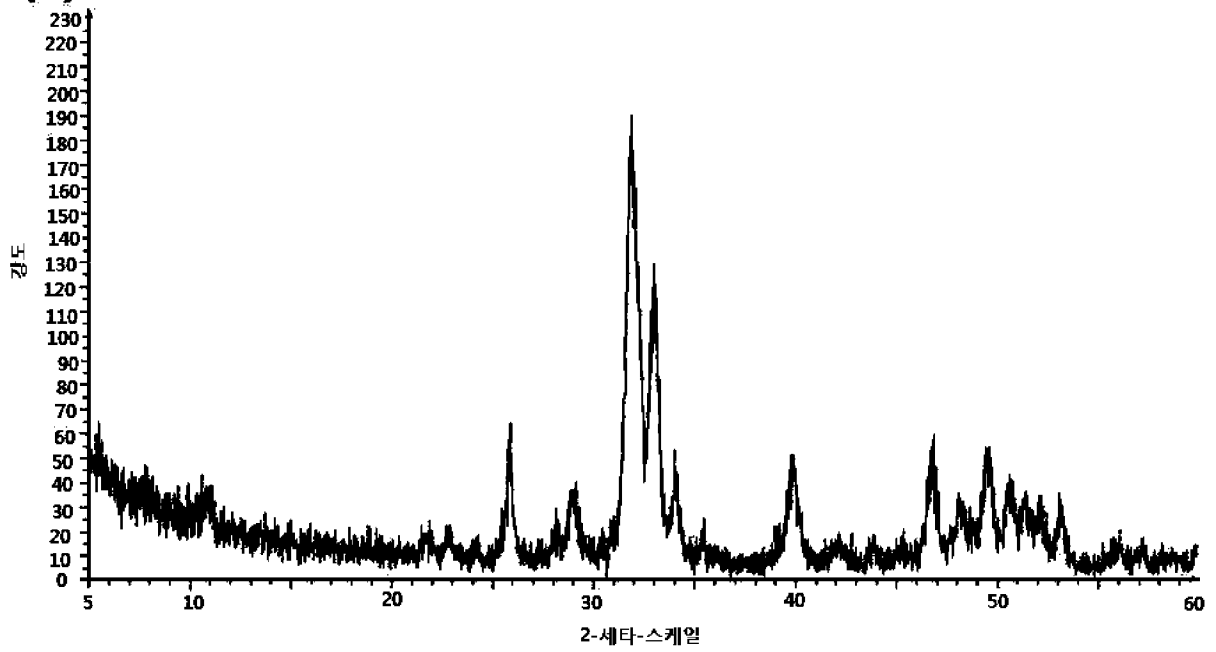


[Fig. 2]

(a)

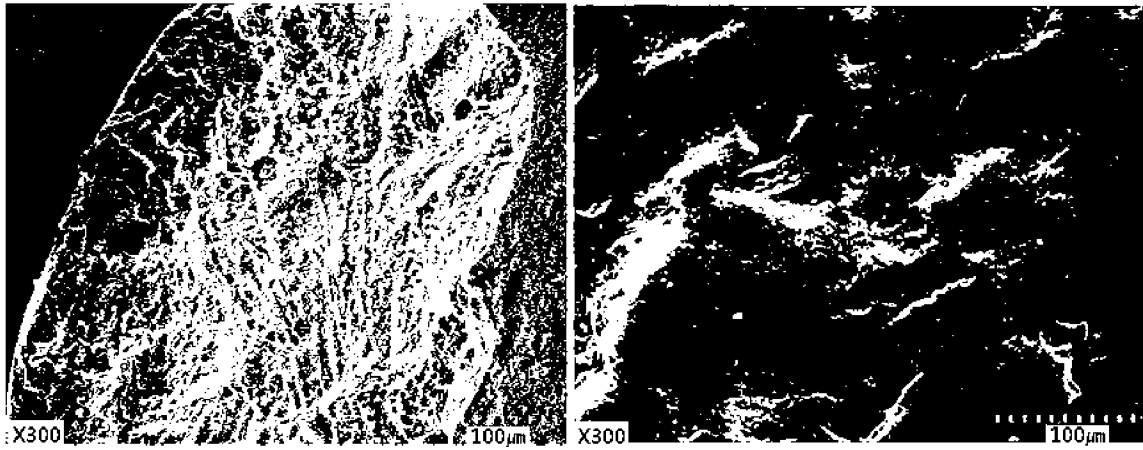


(b)

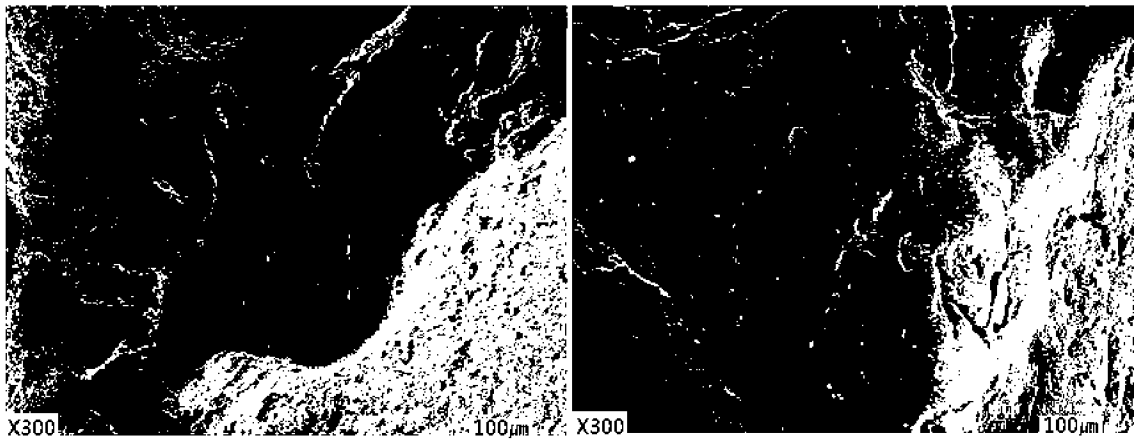


[Fig. 3]

(a)

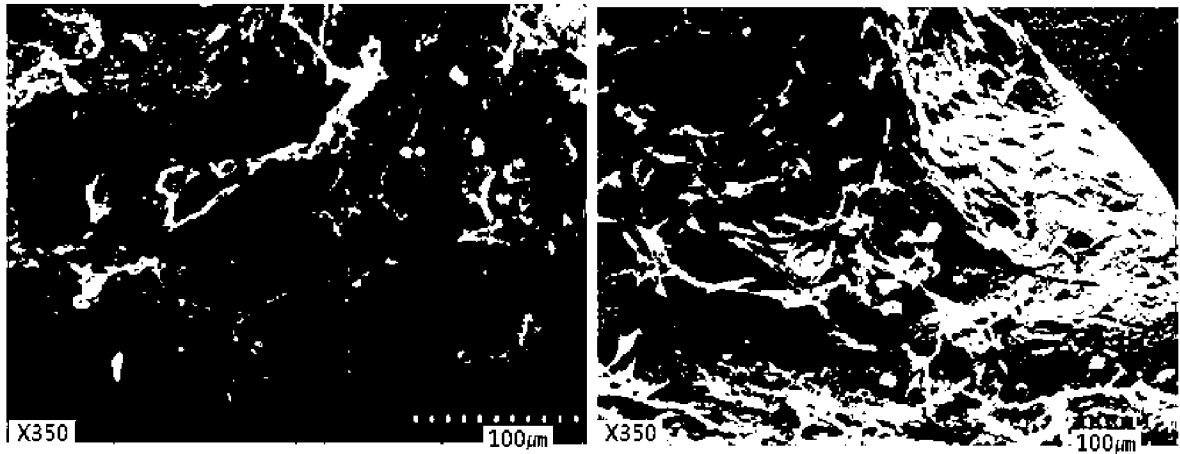


(b)

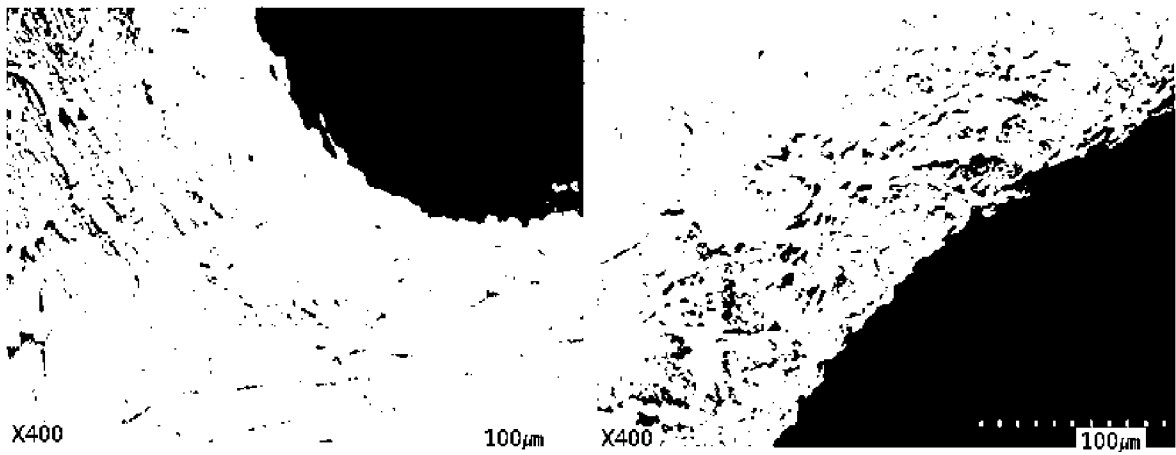


[Fig. 4]

(a)



(b)

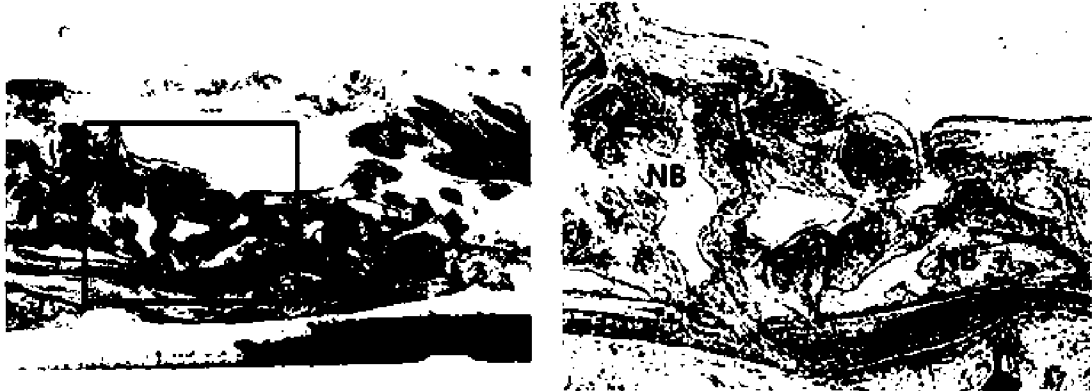


[Fig. 5]

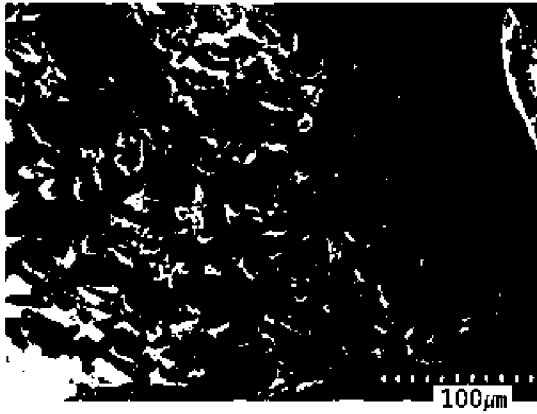
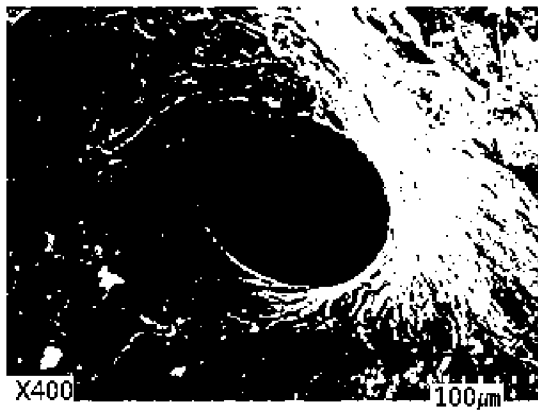
(a)



(b)

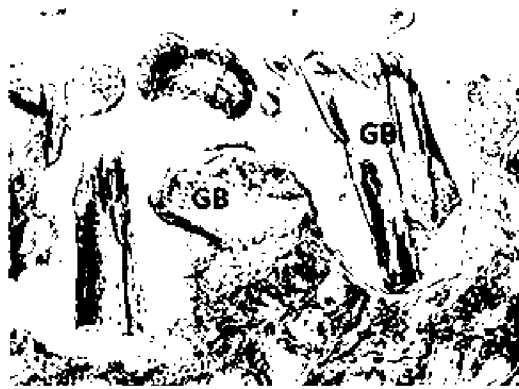


[Fig. 6]

(a)**(b)**

[Fig. 7]

(a)



(b)



(c)

