



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052572
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 6/00 (2006.01)
A61K 6/06 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61L 24/00 (2006.01) A61L 24/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5192 (2013.01)
A61K 6/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7004687
(22) 출원일자(국제) 2015년07월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년02월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/066651
(87) 국제공개번호 WO 2016/012452
국제공개일자 2016년01월28일
(30) 우선권주장
P-2014-31091 2014년07월21일 스페인(ES)

(71) 출원인
콘세호 수페리오르 데 인베스티가시오네스 시엔티
피카스 씨.에스.아이.씨.
스페인왕국28006마드리드세라노117
콘시글리오 나치오날레 델레 리체르체
이탈리아 로마 아이-00185 피아차레 알도 모로7
(72) 발명자
델가도, 로페즈, 호세, 마누엘
스페인, 아이-18100 아르밀리아 (그라나다), 4, 드
라스 팔메라스 아베니다, 인스티튜토 안달루시아
드 사이안시아스 드 라 티에리(아이에이씨티)
고메즈 모랄레스, 제이미
스페인, 아이-18100 아르밀리아 (그라나다), 4, 드
라스 팔메라스 아베니다, 인스티튜토 안달루시아
드 사이안시아스 드 라 티에리(아이에이씨티)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순용

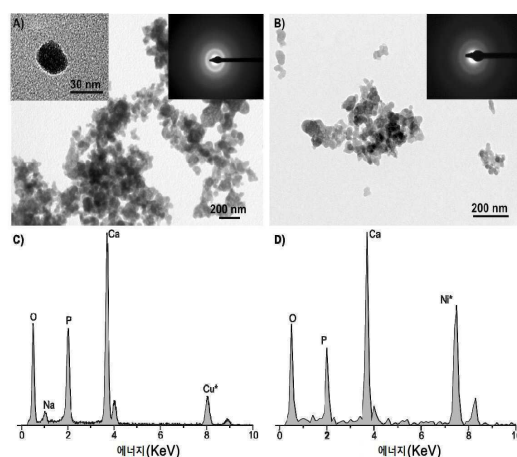
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 플로라이드(Flouride)로 도핑되고 구연산염으로 코팅된 비정질 인산칼슘 나노입자를 얻기 위한 공정

(57) 요약

플로라이드(Flouride)로 도핑되고 구연산염으로 코팅된 비정질 인산칼슘 나노입자를 얻기 위한 공정이 개시된다. 이 물질은 우수한 생물 분해성 및 생체 활성으로 인해 생물 의학에서 광범위한 응용을 가지며, 또한 세포 부착 및 골 형성을 증진시킨다. 치과에서는 상아질과 에나멜의 재광화제(remineralization agent)로서 치약, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish), 씹임 껌 및 젤로 사용될 수 있다. 이는 한편으로는 염화칼슘과 구연산나트륨에 의해, 다른 한편으로는 플로라이드 화합물과 함께 인산일수소나트륨과 탄산나트륨에 의해 형성되는 두 가지 용액을 기반으로 하며, 이들은 상온에서 혼합된다. 이 공정은 산성 잔류물을 남기지 않기 때문에 생태 효율적이고 환경 친화적이며, 단일 단계로 구성되고, 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑됨으로써 재광화 작용을 향상시키는 비정질 인산칼슘이 처음으로 얻어진다.

대표도 - 도1



도 1

(52) CPC특허분류

A61K 6/0017 (2013.01)

A61K 6/0038 (2013.01)

A61K 6/0643 (2013.01)

A61K 9/19 (2013.01)

A61K 9/5115 (2013.01)

A61K 9/5123 (2013.01)

A61L 24/0015 (2013.01)

A61L 24/02 (2013.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

(72) 발명자

페르난데스 페나스, 라켈

스페인, 이-18100 아르밀리아 (그라나다), 4, 드
라스 팔메라스 아베니다, 인스티튜토 안달루시아
드 사이안시아스 드 라 티에리(아이에이씨티)

이아피스코, 미셸

이탈리아, 64 아이-48018 파엔차, 비아
그라나올로, 인스티튜토 디 시엔차 예 테크놀로지
아 데이 마테리알리 세라미키 (아이에스티이씨)

탐피에리, 애나

이탈리아, 64 아이-48018 파엔차, 비아
그라나올로, 인스티튜토 디 시엔차 예 테크놀로지
아 데이 마테리알리 세라미키 (아이에스티이씨)

판세리, 실비아

이탈리아, 64 아이-48018 파엔차, 비아
그라나올로, 인스티튜토 디 시엔차 예 테크놀로지
아 데이 마테리알리 세라미키 (아이에스티이씨)

명세서

청구범위

청구항 1

플로라이드(Flouride)로 도핑되고 구연산염으로 코팅된 비정질 인산칼슘 나노입자를 얻기 위한 공정에 있어서, 상기 공정은,

- 0.08 M 내지 0.12 M 농도의 CaCl_2 및 0.35 M 내지 0.50 M 농도의 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 로 이루어진 용액을 제조하는 단계;
- 0.2 M의 Na_2CO_3 , 0.10 M 내지 0.15 M 농도의 Na_2HPO_4 , 및 플로라이드 화합물로 이루어진 제 2 용액을 제조하는 단계;
- 이전 단계에서 제조된 두 가지 용액을 1:1의 부피 비로 8.3 내지 8.7의 pH에서 2분 이하의 시간 동안 상온에서 교반하면서 혼합하는 단계;
- 원심 분리, 상층액의 제거 및 초순수를 이용하는 침전물 세척의 세 가지 연속적인 침전 사이클 단계; 및
- 습윤 침전물의 동결 건조 단계를 포함하는 공정.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

제 1 용액에 사용되는 반응 시약의 농도는 CaCl_2 의 경우 0.1 M이고 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 의 경우 0.4 M인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 3

제 1 항 및 제 2 항 중 어느 하나의 항에 있어서,

제 2 용액에 사용되는 반응 시약의 농도는 Na_2HPO_4 의 경우 0.12 M이고 Na_2CO_3 의 경우 0.2 M인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

플로라이드 화합물은 CaF_2 , NaF 및 KF 중에서 선택되고, 0.01 M 내지 0.1 M 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

플로라이드 화합물은 CaF_2 이고, 0.05 M의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항의 공정에 의해 얻어지는 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑된 비정질 인산칼슘 나

노입자에 있어서, 이들 나노입자는 구형 및 30 nm 내지 80 nm 의 크기를 갖고, Na, Ca, P, 구연산염, 탄산염, 플로라이드 및 물을 다음과 같은 함량으로 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자:

- 3.1 wt% 내지 3.5 wt%의 Na
- 27.0 wt% 내지 27.4 wt%의 Ca
- 37.0 wt% 내지 37.8 wt%의 P
- 3.5 wt% 내지 5.0 wt%의 구연산염
- 5.4 wt% 내지 7.0 wt%의 탄산염
- 6 wt% 내지 10 wt%의 물
- 2 wt% 내지 5 wt%의 플로라이드.

청구항 7

생체 분자, 약물 또는 이 둘 모두를 위한 전달체(vehicle)로서의, 제 6 항에 기재된 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자의 용도.

청구항 8

정형외과 응용에서 생체 재료로서의, 제 6 항에 기재된 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자의 용도.

청구항 9

치과용으로서의, 제 6 항에 기재된 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자의 용도.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

근관(root canal) 및 치과 보철물의 충전, 밀봉 또는 이 둘 모두를 위한 시멘트를 제조하기 위한 재료로서의 용도.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

칼슘, 인산염 및 플로라이드 이온의 점진적인 방출을 통해 에나멜의 재광화(remineralization)를 촉진하기 위한 치약, 츄잉 껌, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish) 및 젤의 성분으로서의 용도.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 생물 의학(즉, 약물 전달 나노전달체(nanocarrier) 및 골 재생) 및 치과에 관련된 생체 재료에 관한 것이다.

[0001]

[0002] 본 발명의 목적은 구연산염(뼈의 유기상의 일부를 형성하는 분자)으로 코팅되고 플로라이드(Fluoride)로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자를 얻기 위한 공정을 제공하는 것이다. 이 물질은 우수한 생물 분해성 및 생체 활성으로 인해 생물 의학(즉, 약물 전달 나노전달체 및 골 재생) 분야에서 광범위하게 적용되며, 세포 부착 및 골 형성의 증진시킨다. 마찬가지로, 치과에서는 상아질과 에나멜의 재광화제(remineralization agent)로서 치약, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish), 씹임 껌 및 젤로 사용될 수 있는 다양한 용도가 있다.

[0003] 상기 공정은 염화칼슘과 구연산나트륨에 의해 그리고 플로라이드 화합물, 인산일수소나트륨과 탄산나트륨에 의해 형성되는 두 가지 용액을 기반으로 하며, 이들은 상온에서 혼합된다. 종래 기술과 관련하여, 공정은 산성 잔류물을 남기지 않기 때문에(합성에서 강산이 사용되지 않음) 생체 효율적이고 환경 친화적이며, 단일 단계로 합성되고(합성에서 반응 시약으로서 구연산나트륨을 사용함), 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑됨으로써 일반 비정질 인산칼슘보다 강력한 재광화 작용을 갖는 비정질 인산칼슘이 처음으로 얻어지는 장점을 갖는다.

배경 기술

[0004] 생물체 내 무기질 인산칼슘(CaP)의 형태에서 비정질상(Amorphous phase)는 흔하지 않다. 비정질 인산칼슘(ACP)은 진핵 세포 및 원핵 세포의 미토콘드리아에서 발견되었으며, 나노결정질 탄산염-인회석인 뼈의 광물상의 형성 과정에서 전구체 단계로 여겨진다. 이러한 뼈 인회석의 표면은 최근에 구연산염으로 코팅되는 것으로 밝혀졌다. ACP는 또한 다양한 방법을 사용하는 다양한 CaP의 형성에서 중간상으로 작용한다. 이 물질은 우수한 생체 활성과 같은 흥미로운 특성으로 인해 생물 의학 분야에서 광범위하게 적용되고, 세포 부착을 용이하게 하며 또한 골 전도 및 골 재생을 촉진한다. 마찬가지로, 치과에서는 상아질과 에나멜의 재광화제로서 치약, 구강 청결제, 씹임 껌, 젤 및 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish)로 사용될 수 있는 다양한 용도가 있다.

[0005] W098/40406은 우유에 존재하는 인단백질(phosphoprotein)인 카제인(casein)으로 안정화된 비정질 인산칼슘으로 구성된 생성물을 개시하고 있다. 이 생성물은 현재 치약, 씹임 껌 및 치아 미백 후처리에서 연마재(abrasive material)로 사용된다. 그러나 충치를 예방하고 손상된 바니쉬를 재광화하는 것에 대한 효율성은 아직 입증되지 않았다. ACP는 또한 치과 용품의 제조시 충전 재료인 복합 고분자 재료에 사용된다. 특히 치아 구조물 상에 수산화인회석(hydroxyapatite)의 형태로 침착되어 에나멜(주로 결정성 수산화인회석으로 이루어짐)을 재생하는 세균성 플라크에 의해 생성된 산성 pH에 반응하여 Ca 및 인산 이온이 방출된다는 사실 때문에 ACP는 치아 수리를 촉진한다. 표 1은 생체 재료로서의 ACP의 주요 응용을 요약하고 있다.

표 1

[0006] 생체 재료로 사용되는 비정질 인산칼슘

재료의 유형	응용 분야	효과
시멘트	골 치환술 치과	경화제 높은 표면 반응성으로 흡수 가능 Ca^{2+} 및 PO_4^{3-} 이온 소스
코팅	금속 보철물	생물 분해성 및 생물학적 활성을 증가시킴
광물/유기 화합물	치아 재광화 골 치환술	기계적 특성을 증가시킴 Ca^{2+} 및 PO_4^{3-} 이온을 방출하여 생물 분해성 및 생물학적 활성을 증가시킴
수성 현탁액	유전자 방출	흡수 가능하고 생체 적합함 pH 의존성 안정성

[0007] 이러한 응용 중 일부는 J. Zhao 등의 문헌(비정질 인산칼슘 및 치과에서의 이의 응용(*Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry*); Chemistry Central Journal (2011), 5:40 (doi:10.1186/1752-153X-5-40))에 설명되어 있다.

[0008] ACP의 제조와 관련하여, 일반적으로 전구체의 양이온이 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, H_3PO_4 , 인산염 또는 인산수소암모늄과 같은 최종 생성물의 조성에 개입할 수 있는 다른 종을 유발하지 않는 가용성 전구체를 사용하여, 침전을 위한 적절한 pH에서 가용성 Ca^{2+} 및 PO_4^{3-} 전구체로부터 몇 가지 방식으로 수득되는 것으로 알려져 있다. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 주로 사용된다.

- [0009] 예를 들어, 주석산과 같은 다른 폴리카르복실산뿐만 아니라, 약학적 관점에서 또한 허용 가능한 Ca^{2+} 양이온 복합체로서의 구연산의 기능이 또한 알려져 있다. 이런 이유로, 이들 산은 또한 ACP의 비정질 조성을 안정화시키는데 사용된다. 이는 공보 W003059304의 청구항에 개시되어 있고, 여기서 Ca^{2+} 양이온을 갖는 다른 킬레이트 형성제 중에서도, 인산펩타이드와 결합된 ACP를 함유하는 제제에서 구연산이 0.1 wt% 내지 5 wt%의 비율로 제안되어 있다.
- [0010] JP2001169121은 인산 및 수산화칼슘의 침전에 의해 형성되고 이후 상기한 구연산의 존재 하에 분해를 거친 ACP의 안정화제로서 구연산의 용도를 제시하고 있다.
- [0011] 따라서, 이들 공보 중 그 어느 것도, 구연산염이 침전 이후의 단계에서(2 단계 공정) 안정화제로서가 아니라 ACP 침전(단일 단계 공정에서)을 위한 반응 시약으로서 첨가되는, 본 발명의 공정 목적과 같은 제제를 언급하지 않는다.
- [0012] Dorozhkin S. V. [나노크기의 나노결정질 오르토인산칼슘(*Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates*), Acta Biomaterialia (2010), No. 6 (3), 715-734]; Combes C. 및 Rey C. [비정질 인산칼슘: 합성, 속성 및 생체 재료에서의 용도(*Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials*), Acta Biomaterialia (2010), No.6 (9), 3362-3378]에 의해 수행된 연구 및 Dorozhkin S. V. [비정질 인산칼슘(*Amorphous calcium phosphate*, Acta Biomaterialia (2010), No.6 (12), 4457-4475]에 의한 또 다른 연구에는 여러 습식 공정이 개시되어 있으나, 본 발명의 공정 목적과 동일한 조건, 공정 단계 및 반응 시약이 적용되지는 않는다. 실제로, 구연산은 종종 이들 제제에서의 분산제로 그리고 때로는 유사한 기능을 갖는 탄산염 음이온으로 고려된다.
- [0013] J. M. Delgado-Lopez 등의 간행물(맞춤형 탄산염 함량을 갖는 생체 모방 구연산염-기능화 나노인회석의 결정화(*Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content*) Acta Biomaterialia (2012) No. 8, 3491 페이지)은 인회석과 구연산염으로 코팅된 나노결정질 탄산염-인회석 침전 공정을 규명하고 있다. 본 발명의 공정 목적과 본 문헌 간의 기술적 수준의 실질적인 차이점은 다음과 같다.
- [0014] (1) 침전 온도.
- [0015] (2) 구연산염으로 코팅되고 플루라이드(Fluoride)로 도핑된 ACP 나노입자의 안정한 상태의 침전.
- [0016] (3) 침전물의 속성 과정이 없다.
- [0017] (4) 인회석 또는 인산칼슘의 다른 결정상이 침전물에서 형성되지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 제 1 목적은 플루라이드(Fluoride)로 도핑되고 구연산염으로 코팅된 비정질 인산칼슘(FACP)을 얻기 위한 공정을 제공하는 것으로서, 상기 공정은,
- [0019] - 0.08 M 내지 0.12 M 농도의 CaCl_2 및 0.35 M 내지 0.50 M 농도의 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (구연산나트륨)로 이루어진 용액을 제조하는 단계;
- [0020] - 0.2 M의 Na_2CO_3 , 0.10 M 내지 0.15 M 농도의 Na_2HPO_4 및 플루라이드 화합물로 이루어진 제 2 용액을 제조하는 단계;
- [0021] - 이전 단계에서 제조된 두 가지 용액을 8.3 내지 8.7의 pH(예를 들어, HCl로 조정됨) 및 2 분 이하의 시간 동안 상온에서 교반하면서 혼합하는 단계;
- [0022] - 원심 분리, 상층액의 제거 및 초순수를 이용하는 침전물 세척의 세 가지 연속적인 침전 사이클 단계; 및
- [0023] - 습윤 침전물의 동결 건조 단계를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 제 1 용액에서 사용되는 반응 시약의 농도는 CaCl_2 의 경우 0.1 M 및 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 의 경우 0.4 M이고, 제 2 용액에서 사용되는 반응 시약의 농도는 Na_2HPO_4 의 경우 0.12 M 및 Na_2CO_3 의 경우 0.2 M

이다.

- [0025] 플로라이드 화합물은 CaF_2 , NaF 또는 KF 중에서 선택되고 0.01 M 내지 0.1 M의 농도로 첨가된다. 바람직한 실시형태에서, 플로라이드 화합물은 CaF_2 이고 0.05 M의 농도로 첨가된다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 목적은 구형 및 30 nm 내지 80 nm의 크기를 갖고, Na, Ca, P, 구연산염, 탄산염, 플로라이드 및 구조수(structural water)를 다음과 같은 함량으로 포함하는, 이전 공정에 의해 수득된 플로라이드로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자를 제공하는 것이다:
- [0027] - 3.1 wt% 내지 3.5 wt%의 Na
- [0028] - 27.0 wt% 내지 27.4 wt%의 Ca
- [0029] - 37.0 wt% 내지 37.8 wt%의 P
- [0030] - 3.5 wt% 내지 5.0 wt%의 구연산염
- [0031] - 5.4 wt% 내지 7.0 wt%의 탄산염
- [0032] - 6 wt% 내지 10 wt%의 물
- [0033] - 2 wt% 내지 5 wt%의 플로라이드
- [0034] 용어 "물"은 발명의 본 양태에서 흡착수 및 구조수 모두에 관련된다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 세 번째 목적은 다음과 같은 응용에서의 나노입자의 용도를 제공하는 것이다:
- [0036] - 생체 분자 및/또는 약물의 수송
- [0037] - 정형외과 응용에서 생체 재료
- [0038] - 치과에서, 바람직하게는 근관(root canal) 및 치과 보철물의 충전 및/또는 밀봉용 시멘트를 제조하기 위한 재료, 또는 칼슘, 인산염 및 플로라이드 이온의 점진적인 방출을 통해 에나멜의 재광화를 촉진하는 치약, 치잉껌, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish) 및 젤의 성분으로서의 용도.

과제의 해결 수단

- [0039] 본 발명의 제 1 목적은 플로라이드(Flouride)로 도핑되고 구연산염으로 코팅된 비정질 인산칼슘(FACP)을 얻기 위한 공정을 제공하는 것으로서, 상기 공정은,
- [0040] - 0.08 M 내지 0.12 M 농도의 CaCl_2 및 0.35 M 내지 0.50 M 농도의 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (구연산나트륨)로 이루어진 용액을 제조하는 단계;
- [0041] - 0.2 M의 Na_2CO_3 , 0.10 M 내지 0.15 M 농도의 Na_2HPO_4 및 플로라이드 화합물로 이루어진 제 2 용액을 제조하는 단계;
- [0042] - 이전 단계에서 제조된 두 가지 용액을 8.3 내지 8.7의 pH(예를 들어, HCl로 조정됨) 및 2 분 이하의 시간 동안 상온에서 교반하면서 혼합하는 단계;
- [0043] - 원심 분리, 상층액의 제거 및 초순수를 이용하는 침전물 세척의 세 가지 연속적인 침전 사이클 단계; 및
- [0044] - 습윤 침전물의 동결 건조 단계를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 제 1 용액에서 사용되는 반응 시약의 농도는 CaCl_2 의 경우 0.1 M 및 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 의 경우 0.4 M이고, 제 2 용액에서 사용되는 반응 시약의 농도는 Na_2HPO_4 의 경우 0.12 M 및 Na_2CO_3 의 경우 0.2 M이다.
- [0046] 플로라이드 화합물은 CaF_2 , NaF 또는 KF 중에서 선택되고 0.01 M 내지 0.1 M의 농도로 첨가된다. 바람직한 실시형태에서, 플로라이드 화합물은 CaF_2 이고 0.05 M의 농도로 첨가된다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 목적은 구형 및 30 nm 내지 80 nm의 크기를 갖고, Na, Ca, P, 구연산염, 탄산염, 플로라이드 및 구조수(structural water)를 다음과 같은 함량으로 포함하는, 이전 공정에 의해 수득된 플로라이드로 도핑

된 비정질 인산칼슘 나노입자를 제공하는 것이다:

[0048] - 3.1 wt% 내지 3.5 wt%의 Na

[0049] - 27.0 wt% 내지 27.4 wt%의 Ca

[0050] - 37.0 wt% 내지 37.8 wt%의 P

[0051] - 3.5 wt% 내지 5.0 wt%의 구연산염

[0052] - 5.4 wt% 내지 7.0 wt%의 탄산염

[0053] - 6 wt% 내지 10 wt%의 물

[0054] - 2 wt% 내지 5 wt%의 플로라이드

[0055] 용어 "물"은 발명의 본 양태에서 흡착수 및 구조수 모두에 관련된다.

[0056] 본 발명의 또 다른 세 번째 목적은 다음과 같은 응용에서의 나노입자의 용도를 제공하는 것이다:

[0057] - 생체 분자 및/또는 약물의 수송

[0058] - 정형외과 응용에서 생체 재료

[0059] - 치과에서, 바람직하게는 근관(root canal) 및 치과 보철물의 충전 및/또는 밀봉용 시멘트를 제조하기 위한 재료, 또는 칼슘, 인산염 및 플로라이드 이온의 점진적인 방출을 통해 에나멜의 재광화를 촉진하는 치약, 치잉 껌, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish) 및 젤의 성분으로서의 용도.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 목적은 구연산염(뼈의 유기상의 일부를 형성하는 분자)으로 코팅되고 플로라이드(Flouride)로 도핑된 비정질 인산칼슘 나노입자를 얻기 위한 공정을 제공하는 것이다. 이 물질은 우수한 생물 분해성 및 생체 활성으로 인해 생물 의학(즉, 약물 전달 나노전달체 및 골 재생) 분야에서 광범위하게 적용되며, 세포 부착 및 골 형성의 증진시킨다. 마찬가지로, 치과에서는 상아질과 에나멜의 재광화제(remineralization agent)로서 치약, 구강 청결제, 플로라이드 바니쉬(fluoride varnish), 치잉 껌 및 젤로 사용될 수 있는 다양한 용도가 있다.

[0061] 상기 공정은 염화칼슘과 구연산나트륨에 의해 그리고 플로라이드 화합물, 인산일수소나트륨과 탄산나트륨에 의해 형성되는 두 가지 용액을 기반으로 하며, 이들은 상온에서 혼합된다. 종래 기술과 관련하여, 공정은 산성 잔류물을 남기지 않기 때문에(합성에서 강산이 사용되지 않음) 생태 효율적이고 환경 친화적이며, 단일 단계로 합성되고(합성에서 반응 시약으로서 구연산나트륨을 사용함), 구연산염으로 코팅되고 플로라이드로 도핑됨으로써 일반 비정질 인산칼슘보다 강력한 재광화 작용을 갖는 비정질 인산칼슘이 처음으로 얻어지는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 구연산염으로 코팅된 ACP(패널 A) 및 FACP(패널 B) 나노입자의 투과 전자 현미경(TEM) 이미지를 도시한다. 각각의 나노입자에 대해 얻어진 제한 시야 전자 회절(selected area electron diffraction, SAED) 패턴이 또한 삽화로 도시되어 있다. A의 왼쪽 삽화는 단일 나노입자의 TEM 이미지를 도시한다. 패널 C 및 D는 각각 ACP 및 FACP X-선 에너지 분산 분광법(EDS)의 스펙트럼을 나타낸다.

도 2는 나노입자 X-선 회절도(A) 및 라만 스펙트럼(B)을 도시한다.

도 3은 ACP 나노입자(100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 1 일, 3 일 및 7 일 동안 배양한 인간 골아 세포에서 수행한 MTT 세포 증식 분석을 도시한다. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; $n = 3$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] ACP 나노입자는 다음을 포함하는 두 가지 용액을 총 200 ml의 양으로 1:1 v/v의 비율로 혼합하고,

[0064] (1) 0.1 M의 CaCl_2 + 0.4 M의 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 및

[0065] (2) 0.12 M의 Na_2HPO_4 + 0.2 M의 Na_2CO_3

[0066] 주위 온도에서 HCl로 pH를 8.5로 조정하여 침전 공정에 의해 수득하였다.

- [0067] 혼합물이 유백색 외관을 취할 때(혼합 후 대략 30 초), 입자는 원심 분리, 상층액의 제거 및 초순수(Milliq[®], Millipore)를 이용한 침전물 세척의 세 가지 연속적인 침전 사이클을 거친다. 이어서, 습윤 침전물을 동결 건조시키고, 이후 입자를 특성화한다.
- [0068] 이러한 플로라이드로 도핑된 입자를 수득하기 위해, 용액(ii)에 0.05 M의 CaF₂를 첨가한다.
- [0069] **특성화 기술**
- [0070] 나노입자는 80 kV에서 작동하는 주사 투과 전자 현미경(STEM Philips CM 20)을 사용하여 분석하였다. 이 장비는 또한 제한 시야 전자 회절(SAED) 패턴 및 X-선 에너지 분산 분광법(EDS)의 스펙트럼을 획득할 수 있게 하였다. 이러한 분석을 위해, 동결 건조 샘플을 초순수에 분산시킨 다음 이 현탁액의 몇 방울을 종래의 구리 격자에 도포하였다.
- [0071] Ca 및 P의 양은 Liberty 200(Varian, Australia) 분광계를 이용하는 광 방출 분광법(ICP-OES)을 사용하여 정량화하였다. 이를 위해, 동결 건조된 시료를 진한 초순수 질산(1% v/v)에 용해시켰다.
- [0072] 열 중량 분석(thermogravimetric analysis, TGA)은 일정한 유량의 질소(100 mL.min⁻¹)에서 SDT Q 600 시스템(TA Instruments, New Castle, DE, 미국)을 사용하고 10 °C.min⁻¹의 간격으로 1,200 °C까지 증가시키면서 수행하였다.
- [0073] X-선 회절 패턴은 45 KV 및 40 mA에서 작동하는 PIXcel 검출기가 장착된 X-Pert PRO(PANalytical) 회절계를 사용하여 Cu K α 입사 방사선(λ = 1.5418 Å)에서 수집하였다. 10 mm의 복사 길이를 갖는 가변 스펙트럼 대역폭(산란 방지)이 사용되었다. 2 θ 범위는 5° 에서 70° 까지 다양했으며 2 θ 는 0.039씩 증가하였다.
- [0074] 라만 스펙트럼은 LabRAMHR 분광계(Jobin-Yvon, Horiba, 일본)를 사용하여 얻었다. 이 장치에는 여기 광원(λ =532 nm)으로 다이오드 레이저 및 펄티어 냉각 CCD 검출기(1026 x 256 픽셀)가 장착되어 있다. 스펙트럼은 3 cm⁻¹의 스펙트럼 분해능으로 얻어졌다.
- [0075] 시료 내의 플로라이드의 양은 PHILIPS Magix Pro(PW-2440) 분광계를 사용하여 X-선 형광 분광법(X-ray fluorescence spectroscopy, XRF)으로 정량화하였다. 또한, 플로라이드(Flouride) 함량은 염화지르코닐 및 에리오크롬 시아닌 R(eriochrome cyanine R)과 착화된 분광 광도계로 측정하고 570 nm에서 복합체의 흡광도를 측정하였다.
- [0076] **시험관내 세포 배양 분석**
- [0077] 나노입자의 생물학적 반응은 인간 골아 세포주(MG-63, Lonza, 이태리)를 사용하여 평가하였다. 세포를 37 °C 및 CO₂ 대기(5%)에서 10%의 소태아혈청(FBS) 및 스트렙토마이신-페니실린(100 U/mL-100 µg/mL)을 함유하는 DMEM/F12 배지(PAA, 오스트리아)에서 배양하였다. 이어서, 세포를 트립신 처리에 의해 배지로부터 분리한 후, 원심 분리하고 재현탁시켰다. 트립판 블루 배제 테스트(trypsin blue exclusion test)를 사용하여 살아있는 세포를 계수하였다(세포 생존력 테스트). 세포를 웰 당 3.0x10³ 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하였다. 24 시간 후, 25 kGy Y 방사선에 의해 미리 멸균된 세포 배양액(100 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL)에 세 가지 다른 농도의 구연산염으로 코팅된 ACP 나노입자를 첨가하였다. 세포를 표준 조건(37 °C, 5% CO₂) 하에서 1, 3 및 7 일 동안 배양하였다. 배양 배지는 3 일마다 교체되었다. 이러한 모든 분석은 층류 캐비닛에서 수행되었다.
- [0078] **MTT 세포 독성 및 세포 생존력**
- [0079] MTT 방법 [3-(4.5-디메틸티아졸-2-일)-2.5-디페닐테트라졸륨 브로마이드]를 사용하여 나노입자의 가능한 독성 효과를 측정하였다. 이 분석은 농도가 비색계로 측정될 수 있는 청색 화합물(포르마잔) 내의 미토콘드리아 효소 숙신산 탈수소효소에 의한 3-(4.5-디메틸티아졸-2-일)-2.5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT)의 대사 감소를 기반으로 하며, 처리된 세포의 미토콘드리아 기능을 측정할 수 있다.
- [0080] 1, 3, 7 일 동안 나노입자와 접촉시킨 후, 세포를 37 °C에서 2 시간 동안 1:10의 비율로 PBS(5 mg/mL⁻¹)에 용해시킨 MTT에서 배양하였다. 이어서, 세포를 200 µl의 디메틸 설폭사이드(Sigma)로 15 분 동안 배양하여 포르마잔 결정을 용해시켰다. Multiskan FC 마이크로플레이트(Thermo Scientific) 분광계를 사용하여 570 nm에서 대사 활성 세포의 수에 정비례하는 흡광도를 측정하였다. 3 개의 샘플을 연구된 시간 간격(1, 3 및 7 일)마다 분

석하였다.

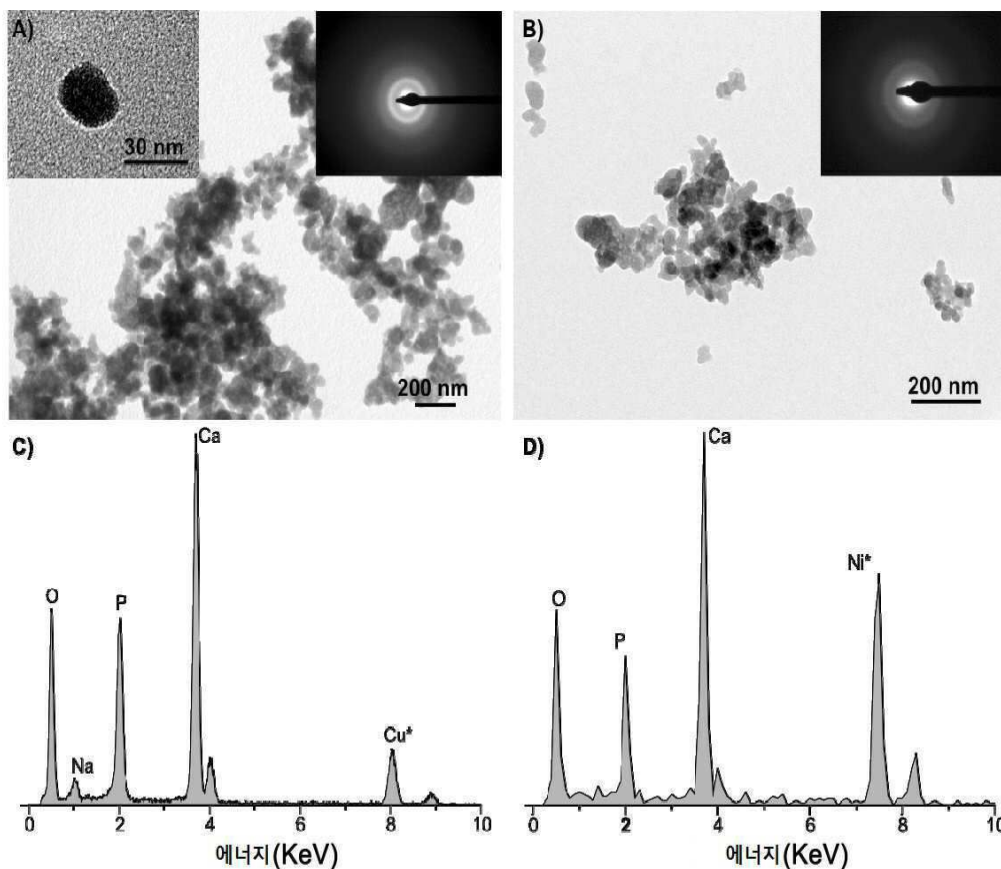
[0081] **결과**

[0082] TEM 이미지(도 1)는 도핑되지 않은 샘플 ACP(A) 및 도핑된 샘플 FCAP(B) 모두가 30 nm내지 80 nm로 이루어진 크기를 갖는 구형 나노입자임을 나타낸다. 또한, SAED 패턴 내의 회절점의 부재는 이들의 비정질 성질을 증명한다. 차례로, EDS 스펙트럼은 Ca와 P만으로 구성되어 있음을 입증한다. 0.68 KeV 부근에서 나타나야 하는 도핑된 입자의 스펙트럼의 F 피크는, 훨씬 더 강렬한 산소 피크(0.2 KeV)에 의해 겹쳐지기 때문에 관찰되지 않는다. X-선 회절 패턴에 피크 내의 피크의 부재는 이들 물질의 비정질 성질을 입증한다(도 2A). 라만 스펙트럼은 비정질 인산칼슘의 전형적인 형태인데, 주 피크가 수산화인회석 피크(961 cm^{-1})에 비해 약간 편이된 952 cm^{-1} 에서 나타나기 때문이다. TGA, ICP 및 형광 X-선으로 얻은 ACP 및 FACP 재료의 화학적 조성은 이미 이전에 설명한 바 있다.

[0083] 조골 세포(MG-63)를 사용하여 나노입자의 생물학적 반응을 연구하였다. 세 가지 다른 농도의 나노입자(100, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$)를 배양 배지에 첨가하고, 일정한 배양 기간(1, 3 또는 7 일) 이후, 대사 활성 세포의 수를 MTT 분석으로 정량화하였다(도 3). 배양 1 내지 7 일 이후 모든 경우(심지어 가장 높은 농도에서도)에서 세포 증식의 증가가 관찰되었다. 또한, 연구된 가장 낮은 농도의 경우, 세포 성장은 나노입자가 없는 세포(대조군)에 의해 관찰된 것과 비슷하다. 그러나 농도를 증가시키면, 세포 성장은 아마도 나노입자 농도가 지나치게 높기 때문인지 대조군에 비해 훨씬 적게 나타난다. 그럼에도 불구하고, 세포 생존력 및 형태학적 분석(미도시)은 연구된 모든 농도에 대해 매우 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과는 나노입자가 이러한 인간 골아 세포 세포주와 접촉하는데 있어서 완전히 생체 적합하다는 것을 명백하게 나타낸다.

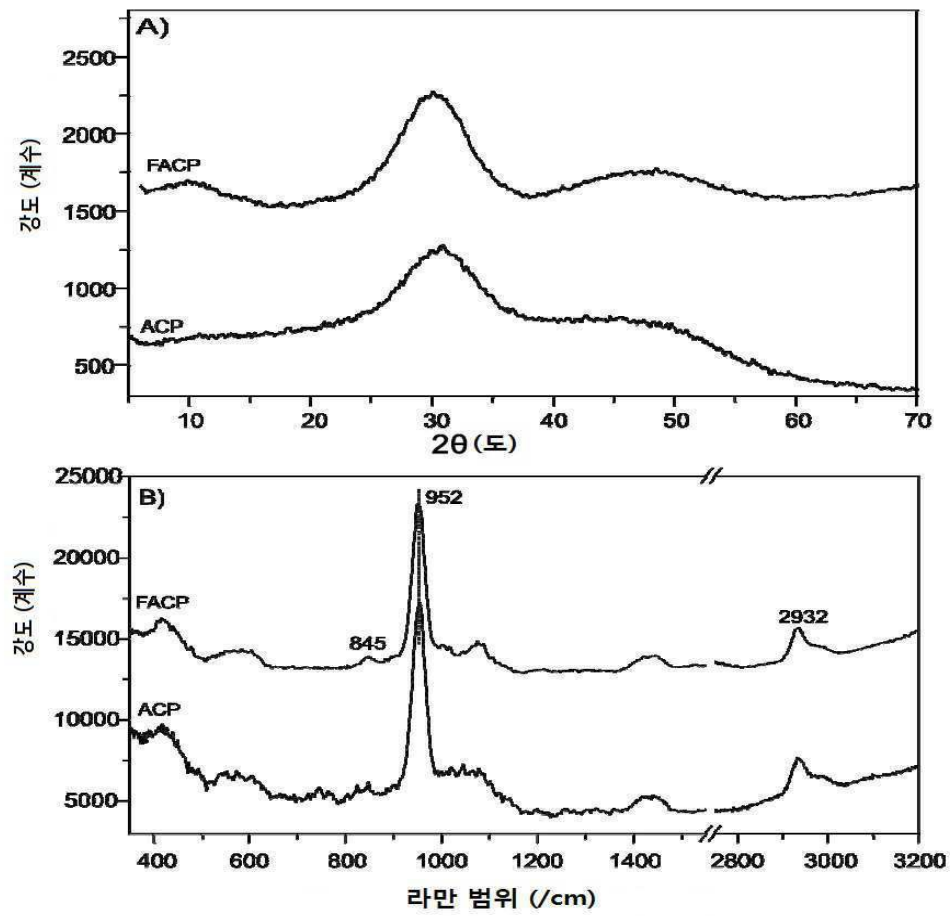
도면

도면1



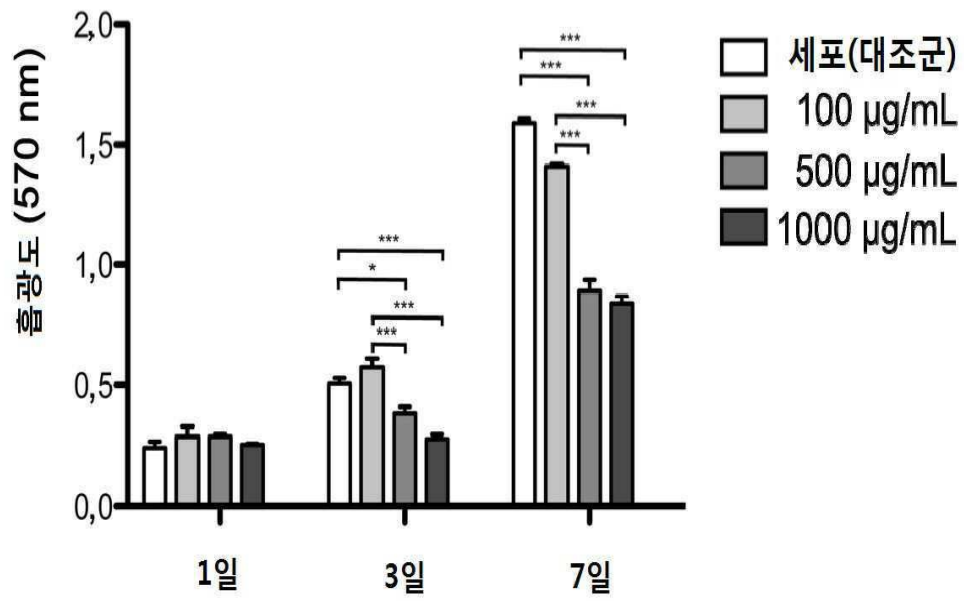
도 1

도면2



도 2

도면3



도 3