



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0043125
(43) 공개일자 2025년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 6/54 (2020.01) A61K 6/17 (2020.01)

A61K 6/60 (2020.01) A61K 6/77 (2020.01)

(52) CPC특허분류

A61K 6/54 (2020.01)

A61K 6/17 (2020.01)

(21) 출원번호 10-2023-0126497

(22) 출원일자 2023년09월21일

심사청구일자 2023년09월21일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김현정

서울특별시 동대문구 경희대로 23 경희대학교 치과대학

(74) 대리인

특허법인정진

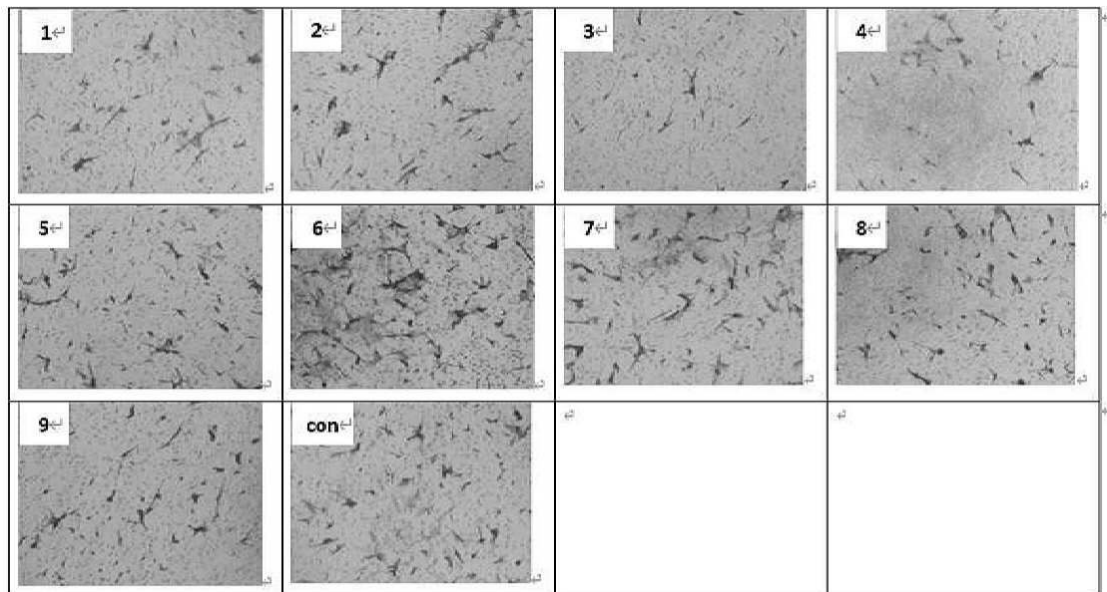
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 엘라스틴 유사 폴리펩타이드와 생활성 유리 나노입자를 포함하는 근관 충전재료

(57) 요약

본 발명은 생활성 물질인 MTA에 하이브리드 재료 (hybrid material)인 lastin like polypeptide (ELP) 와 bioactive glass nanoparticle (nBAG)을 첨가함으로써 보다 생체 적합성이 우수하고 성능이 뛰어난 충전재 조성물 및 충전재 조성물의 제조방법에 관한 것으로, 해당 충전재 조성물은 세포 독성이 감소하고 치근단 병소의 치유 효과를 보다 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 6/60 (2020.01)

A61K 6/77 (2020.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192206
과제번호	2021R1F1A1045987
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	Elastin-like Polypeptide?nano bioactive glass hybrid scaffold를 함유한 새로운
calcium silicate 계열 근관충전재료의 개발	
기여율	100/100
과제수행기관명	경희의료원
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

ELP (elastin like polypeptide), nBAG (bioactive glass nanoparticle) 및 MTA (Mineral Trioxide Aggregate)를 포함하는 골 재생 유도를 위한 치아 근관 충전재.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 MTA는 트리칼슘실리케이트(Tricalcium Silicate), 트리칼슘알루미네이트(Tricalcium Aluminate), 칼슘설페이트(Calcium Sulfate) 또는 비스무스 옥사이드(Bismuth oxide)인 것을 특징으로 하는 충전재.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 경조직 형성을 촉진하고 활성화하는 작용과 치주인대를 형성하는 세포의 이주를 촉진하며 증식을 활성화하는 효과를 나타내는 충전재.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 충전재는 MTA와 nBAG의 혼합 비율(wt%)이 98:2 ~97:3인 것을 특징으로 하는 골 충전재.

청구항 5

상기 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 충전재를 포함하는 골 또는 치아 근관 충전용 조성물.

청구항 6

상기 제5항의 조성물을 개체 내의 골 손상이 존재하는 치아의 치근 부위에 투여 및 적용하는 것을 포함하는 골 또는 치아 근관 충전 방법.

청구항 7

상기 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 충전재를 포함하는 골 질환 치료용 조성물

청구항 8

상기 제7항의 조성물을 개체 내 골 손상 부위에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 골 결손 치료 방법.

청구항 9

상기 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 충전재를 포함하는 치아 질환 치료용 조성물

청구항 10

상기 제9항의 조성물을 개체 내 치아 손상 부위에 투여하는 것을 특징으로 하는 치아 근관 치료 방법.

청구항 11

ELP(elastin like polypeptide), BAG(bioactive glass nanoparticle) 및, MTA ((Mineral Trioxide Aggregate)를 혼합하는 과정을 포함하는 충전재 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 혼합하는 과정은 MTA와 nBAG의 혼합비율(wt%)이 97:3 ~ 98:2가 되도록 혼합하는 것인 충전재 조성물의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 혼합하는 과정은, (1) 파우더 제형의 MTA 와 nBAG을 무게비(%)로, 97:3 ~ 98:2로 혼합하는 단계; (2) ELP 수용액과 탈이온수를 혼합하는 단계; (3) ELP 용액과 상기 (1) 단계의 파우더를 혼합하는 단계; 를 포함하는 공정으로 혼합되는 것인 충전재 조성물의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 (2)단계는 V125E8 수용액을 10 wt%의 비율로 탈이온수와 혼합하는 것인 충전재 조성물의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 (3)단계는 Liquid: powder ratio 0.3으로 혼합하는 것인 충전재 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은, 골 충전 또는 근관 충전용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 경조직 형성 촉진 및 활성화 작용과 치주인대를 형성하는 세포의 이주를 촉진하고 증식을 더욱 활성화시켜 결과적으로는 경조직과 연조직의 치유를 촉진하는 기능을 하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] ELP (Elastin like polypeptide)란 생체 내 elastin 단백질과 유사하도록 유전공학을 통해 합성된 폴리펩타이드로서, (Val-Pro-Glu-Xaa-Gly) 구조의 반복서열을 포함하며, Xaa는 proline을 제외한 아미노산 서열이 포함될 수 있다. ELP는 엘라스틴 단백질과 같이 탄성 및 회복력을 보이며, 생체적합 및 생체활성이 있는 물질로 알려져 있다. 의학분야에서는 주로 약 수송을 위한 scaffold로 이용된다.
- [0004] Bioactive glass nanoparticle (nBAG)은 1969년 Dr. Larry Hench에 의해 개발된 생활성 물질로, 인공타액 혹은 유사 생체용액에서 H^+ 과 Ca^{2+} 이온을 치환시키며, Ca^{2+} 이온을 용출하고, calcium phosphate의 침전 및 hydroxyapatite의 형성을 촉진한다고 알려져 있다. 의학분야에서는 골 결손부에 적용하여, osteo-inductive 와 osteo-conductive 기능을 한다고 알려져 있다. nBAG의 index of bioactivity는 대략 12.5로, 이 값이 8이상인 경우, 연조직과 경조직 모두에 결합할 수 있는 능력을 가진다고 알려져 있다.
- [0005] 의학분야에서, 골조직의 재생 혹은 결합부위의 수복 및 재생을 위해, 생체재료에 대한 연구가 진행되고 있다. 생체재료는 크게 3가지 범주가 존재하며, 금속, 세라믹, 폴리머계열로 구분한다. nBAG (세라믹 계열)와 ELP (폴리머 계열) 모두 bioactive한 재료로서, 각각 우수한 골조직 재생의 재료로 알려진다. 치의학분야에서, ELP는 calcium binding motif를 가진 polymer로 MTA(Mineral Trioxide Aggregate)의 adhesion에 도움을 준다고 본 발명자가 밝힌 바 있으며, BAG는 심하게 탈회가 일어난 열악한 환경에서도 치아 경조직의 재광화를 유도할 수 있다고 연구된 바 있다. nBAG는 calcium과 phosphate이온을 용출하는 저장고의 역할을 수행할 수 있다. 미네랄의 지속적인 공급을 통해 근관 내부의 상아세관 및 근단공의 폐쇄가 재광화에 의해 더욱 긴밀하게 일어날 것이다.
- [0006] ELP는 이미 알려진 많은 종류가 있고, 또한 유전자 재조합을 통해, calcium binding motif를 가지는 폴리펩타이드를 합성할 수 있다. ELP의 calcium binding affinity는 nBAG과 hybrid scaffold를 이루고, hybrid scaffold

는 MTA 경화과정의 안정적인 matrix를 제공할 수 있다. ELP-nBAG hybrid material은 높은 pH의 환경을 유지함으로써 향균 작용의 극대화 및 MTA충전재의 강도의 최대화하여 생체액의 출입이 자유롭지 않은 근관 내부의 환경에서 안정적인 미네랄 이온의 공급을 담당할 수 있을 것으로 예상된다.

[0007] MTA (mineral trioxide aggregate)는 대표적인 calcium silicate cement 계열로 치아 구조가 파괴된 경우, 경조직의 수복재로 사용되고 있으며, 우수한 생체적합성과 밀폐 효과를 갖는다.

[0008] MTA는 불연속 치아 구조를 수복하는 재료로 이용될 뿐 아니라, 근관충전재료로 이용되기 시작하였는데 코어 재료가 없이 MTA로만 근관을 충전하는 것은 부피 증가를 동반하여 치아의 치근 파절을 야기할 수 있고, 충전재의 제거가 어려워 재근관 치료가 어려워진다는 한계가 존재한다.

[0009] 이러한 점 외에도 MTA가 갖는 한계가 몇 가지 존재한다. 첫째로는, 근관 치료의 마지막 단계에서 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)에 의한 smear layer의 제거를 통해 실러의 상아세관으로의 침투를 높이는 과정이 필요한데 MTA 50~75wt%를 이루고 있는 calcium oxide를 EDTA가 chelation하면서, 최종 산물인 calcium silicate hydrates가 형성될 수 없게 된다는 문제가 야기된다. 둘째는, pH가 낮은 염증 상황에 MTA가 노출되게 되면 수산화칼슘 형성이 감소하는데 이는 MTA의 향균 작용을 현저히 저하시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 기존의 calcium silicate cement인 MTA에 hybrid material인 EPL과 BAG complex를 혼합하여 근관 충전 및 골 충전시 사용이 용이하며, 생체 적합성이 우수한 충전용 조성물 및 상기 근관 충전용 조성물의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 연구자들은 생체 적합성이 우수하고 신규 골 형성 및 연조직의 치유 효과가 뛰어난 치아 근관용 충전재를 개발하여 충전재 조성물과 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 종전의 발명에 비하여 우수한 생물학적 특성을 갖는다. 구체적으로는, 기존에 생체 적합성이 우수하고 세포 독성이 비교적 적다고 알려진 생활성 물질인 MTA에 하이브리드 재료 (hybrid material)를 첨가함으로써 세포독성이 더욱 감소하는 효과가 있다. 또한 ARS 염색 (alizarin red S staining) 결과, 인간 조골세포 (human osteoblast) 이동의 가속화 및 증식의 활발, 즉 경조직 재생이 향상되는 효과를 확인하였으며, 치근단 병소의 치유를 위한 연조직 재생을 일으키는 인간 치주 인대 섬유아세포 (human periodontal ligament fibroblasts, (hPDLFs))의 증식 및 이동의 활성화를 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 칼슘 실리케이트 시멘트 계열의 근관충전재료는 상용화된 치과 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도1은 세포 독성 평가 실험 결과를 나타내는 도이다 (좌: hFOB19 cell, 우: hPDLF (humal periodontal ligament fibroblast)). Group 5,6,7 (BAG incorporation 1~3% 그룹)에서 hFOB 세포와 hPDLF 세포 모두 생존율이 증가하고 시간이 갈수록 더욱 증가하는 경향을 보인다.

도2는 경조직 형성능 평가 실험 결과(alizarin red S staining)를 나타내는 도이다. 그 결과 Group 6,7에서 칼슘 침착이 많이 일어나 골조직의 재생에 훨씬 유리할 수 있음이 증명된다.

도3은 cell의 상처 회복 분석 (wound healing assay) 실험 결과를 나타낸 도이다. Group 6,7에서 같은 시간동안 많은 세포들이 상처내로 이주하여 증식하는 것이 관찰된다.

도4는 cell의 트랜스웰 분석 (trans-well assay) 실험 결과를 나타낸 도이다. Group 6(5,7)에서 hPDLF의 이주가 활발한 것이 관찰된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 달리 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 갖는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0019] 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, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0020] 또한, 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0021] 치과용 근관 충전재는 흐름도, 피막도, 방사선 불투과성 및 용해도가 우수하고 경화시간이 짧아 사용이 편리하며 생체 적합성이 좋아야 하고, 치근 주위에 유해하지 않아야 하는 생물학적 요구조건도 만족시켜야 한다. 그러나, MTA는 근관치료의 마지막 단계에서 EDTA에 노출되면 최종 산물인 calcium silicate hydrates를 형성할 수 없으며, pH가 낮은 염증 상황에 노출되는 경우 항균작용이 현저히 저하되는 문제점이 발생한다.
- [0022] 본 발명은 상기와 같은 MTA의 단점을 극복하면서 이상적인 충전재의 특성들을 모두 만족시킬 수 있는 MTA 근관 충전재 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0024] 본 발명은 종래의 물질을 일정한 비율로 혼합하여 제작한 새로운 근관 충전재료에 관한 발명이다. 구체적으로, 본 발명자는 이러한 근관 충전재료가 종래의 물질이 단독으로 사용되는 경우에 비해 우수한 생물학적 특성이 나타나는 효과를 발견하였고 이를 바탕으로 치과보존학, 근관 치료학 등의 치료골 경조직과 치주인대 연조직의 치유가 필요한 병소에 상용화가 가능한 새로운 조성물을 제공할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 ELP(elastin like polypeptide); nBAG(bioactive glass nanoparticle); 및, MTA ((Mineral Trioxide Aggregate); 를 포함하는 골 재생 유도를 위한 치아 근관 충전재를 제공한다.
- [0026] 상기 MTA는, 트리칼슘실리케이트(Tricalcium Silicate); 트리칼슘알루미네이트(Tricalcium Aluminate); 칼슘설페이트(Calcium Sulfate); 및, 비스무스 옥사이드(Bismuth oxide)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 충전재는 ELP 수용액과 MTA를 95 내지 100 미만의 중량%, nBAG를 0 초과 내지 5중량% 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 파우더 로서의 MTA과 nBAG의 무게비율(wt%)이 MTA: BAG=98:2 ~ 97:3인 경우일 수 있다.
- [0028] 상기 충전재는, 경조직 형성을 촉진하고 활성화하는 작용과 치주인대를 형성하는 세포의 이주를 촉진하며 증식을 활성화하는 효과를 갖는다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 골 충전재를 포함하는 골 또는 치아 근관 충전용 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 골 또는 치아 근관 충전용 조성물을 골 손상이 존재하는 치아의 치근 부위에 투여 및 적용하는 것을 포함하는 골 또는 치아 근관 충전 방법을 제공한다.
- [0031] 상기 근관 충전재 조성물은 추가로, 칼슘 화합물을 함유할 수 있다.
- [0032] 칼슘 화합물로는, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 황산칼슘, 염화칼슘, 아세트산칼슘, 산화칼슘, 인산삼칼슘, 인산일수소칼슘, 인산이수소칼슘, 피로인산이수소칼슘 등을 들 수 있다. 그 중에서도, 수산화칼슘, 탄산칼슘이 바람직하고, 수산화칼슘이 보다 바람직하다.
- [0033] 상기 칼슘 화합물은, 1 종을 단독으로, 또는 2 종 이상을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0034] 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘)을 함유하는 경우의 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘)의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 2 중량% 이상이 바람직하고, 5 중량% 이상이 보다 바람직하고, 10 중량% 이상이 보다 더 바람직

하고, 20 중량% 이상이 보다 더 바람직하다. 이 범위이면, 약효, 특히 수산화칼슘의 약효가 충분히 얻어진다. 또, 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘)의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 70 중량% 이하가 바람직하고, 50 중량% 이하가 보다 바람직하고, 40 중량% 이하가 보다 더 바람직하다.

[0035] 또한, 상기 충전재 조성물은, 추가로 물을 함유할 수 있다.

[0036] 또, 물의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 0.001 중량% 이상이 바람직하고, 0.005 중량% 이상이 보다 바람직하고, 0.01 중량% 이상이 보다 더 바람직하고, 0.1 중량% 이상이 보다 더 바람직하고, 1 중량% 이상이 보다 더 바람직하다. 또, 70 중량% 이하가 바람직하고, 50 중량% 이하가 보다 바람직하고, 40 중량% 이하가 바람직하고, 30 중량% 이하가 보다 바람직하고, 25 중량% 이하가 보다 더 바람직하다.

[0037] 또한, 상기 충전재 조성물은, 추가로 다가 알코올을 함유할 수 있다.

[0038] 다가 알코올은, 칼슘 화합물을 페이스트상으로 조제하기 위해서 배합한다. 다가 알코올로는, 프로필렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜과 같은 2 가 알코올, 글리세린과 같은 3 가 알코올 등을 들 수 있다. 그 중에서도, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 및 글리세린이 바람직하다

[0039] 폴리프로필렌글리콜은, 중합도가 100 ~ 1000 인 것이 바람직하고, 200 ~ 600 인 것이 보다 바람직하고, 300 ~ 400 인 것이 보다 더 바람직하다.

[0040] 또, 폴리에틸렌글리콜은, 중합도가 100 ~ 1000 인 것이 바람직하고, 200 ~ 600 인 것이 보다 바람직하고, 300 ~ 400 인 것이 보다 더 바람직하다.

[0041] 다가 알코올은, 1 종을 단독으로, 또는 2 종 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 「2 종 이상」은, 화합물의 종류가 상이한 2 종 이상의 다가 알코올을 함유하는 경우 이외에, 예를 들어, 중합도가 상이한 2 종 이상의 폴리프로필렌글리콜이나, 중합도가 상이한 2 종 이상의 폴리에틸렌글리콜을 함유하는 경우도 포함한다.

[0042] 다가 알코올을 함유하는 경우의 다가 알코올의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 1 중량% 이상이 바람직하고, 5 중량% 이상이 보다 바람직하고, 10 중량% 이상이 보다 더 바람직하고, 20 중량% 이상이 보다 더 바람직하고, 30 중량% 이상이 보다 더 바람직하다. 또, 다가 알코올의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 90 중량% 이하가 바람직하고, 70 중량% 이하가 보다 바람직하고, 60 중량% 이하가 보다 더 바람직하고, 50 중량% 이하가 보다 더 바람직하다. 이 범위이면, 조성물을 취급하기 쉬운 점조 (粘稠) 한 페이스트상으로 조제할 수 있다.

[0043] 또한, 상기 충전재 조성물은, 추가로 입자경 1 nm ~ 1 μ m의 산화알루미늄 초미립자, 및/또는 산화티탄 초미립자를 함유할 수 있다.

[0044] 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘)을 함유하는 근관 충전재 조성물은, 보관 중에 용기 내에서, 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘) 과 액체 성분이 분리되기 쉬워, 시린지 용기 등으로부터 압출되기 어려워지는 경향이 있지만, 본 발명의 조성물이 상기한 산화알루미늄 초미립자, 및/또는 산화티탄 초미립자를 함유하는 경우에는, 조성물의 보관에 의한 고액 분리가 억제된다.

[0045] 이 초미립자의 입자경은, 1 nm 이상이고, 또, 5 nm 이상, 또는 10 nm 이상으로 할 수도 있다. 또, 이 초미립자의 입자경은, 1 μ m 이하이고, 또, 500 nm 이하, 300 nm 이하, 50 nm 이하, 또는 20 nm 이하로 할 수도 있다. 이 범위이면, 칼슘 화합물 (특히, 수산화칼슘) 과 액체 성분의 분리가 충분히 억제된다.

[0046] 본 발명에 있어서, 초미립자의 입자경은, 1 차 입자의 평균 입자경으로, 투과형 전자 현미경으로 관찰하여 구한 값이다.

[0047] 산화알루미늄 초미립자, 및/또는 산화티탄 초미립자를 함유하는 경우의 이 초미립자의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 총량으로, 예를 들어 0.1 중량% 이상으로 할 수 있고, 0.5 중량% 이상이 바람직하고, 1 중량% 이상이 보다 바람직하고, 2 중량% 이상이 보다 더 바람직하다. 이 범위이면, 충분한 증점 효과가 얻어지고, 고액 분리가 억제된다. 또, 이 초미립자의 농도는, 조성물의 전체량에 대해, 예를 들어 20 중량% 이하로 할 수 있고, 10 중량% 이하가 바람직하고, 5 중량% 이하가 보다 바람직하고, 4 중량% 이하가 보다 더 바람직하다. 이 범위이면, 조성물이 지나치게 딱딱해지지 않아, 시린지 용기로부터 토출시키기 쉽다.

[0048] 또한 상기 충전재 조성물은 페이스트 조도의 조정을 위해서, 추가로 유동 파라핀, 바셀린, 유분 (올리브유, 낙화생유와 같은 식물유 등), 납, 수지, 시럽과 같은 연고 기재, 셀룰로오스류, 에스테르 검과 같은 증점제를 배합할 수 있다. 단, 연고 기제를 배합할 때에는 계면 활성제를 병용하는 것이 바람직하다.

- [0049] 또, 본 발명의 근관 충전재 조성물은, 제1 양태에 있어서, 황산바륨, 산화지르코늄, 차질산비스무트, 삼산화비스무트, 탄산비스무트, 산화아연, 요오드포름과 같은 윈트젠 조영제 또는 불투과제를 배합할 수 있다. 근관 충전재 조성물에 요구되는 X 선 조영성은, JIS-T6522 [치과용 근관 충전 실러]에 의해 "알루미늄 두께 판 3 mm 이상"으로 요구되어 있고, 사용하는 X 선 조영제 혹은 불투과제의 종류에 따라 상이한데, 예를 들어 황산바륨이면, 조성물의 전체량에 대해 10 중량% 이상의 배합량으로 하면 된다.
- [0050] 이 외에, 항균제 등의 근관 충전재에 사용될 수 있는 성분을, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에서 포함할 수 있다.
- [0051] 그 밖의 성분 (리튬염, 칼슘 화합물, 물, 다가 알코올, 산화알루미늄 초미립자, 산화티탄의 초미립자 이외의 성분) 은, 1 종, 또는 2 종 이상을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 상기 충전재를 포함하는 골 질환 치료용 조성물을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 치료용 조성물을 개체 내 골 손상 부위에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 골 결손 치료 방법을 제공한다.
- [0054] 또한, 본 발명은 상기 충전재를 포함하는 치아 질환 치료용 조성물을 제공한다.
- [0055] 또한, 본 발명은 상기 치아 질환 치료용 조성물을 개체 내 치아 손상 부위에 투여하는 것을 특징으로 하는 치아 근관 치료 방법을 제공한다.
- [0056] 또한, 본 발명은 ELP(elastin like polypeptide), BAG(bioactive glass nanoparticle) 및, MTA ((Mineral Trioxide Aggregate)를 혼합하는 과정이 포함되는 충전재의 제조방법을 제공한다.
- [0057] 바람직하게는, 상기 MTA와 nBAG의 혼합비율(wt%)이 97:3 ~ 98:2가 되도록 하는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 혼합하는 단계는, (1) 파우더 제형의 MTA 와 nBAG을 무게비(%)로, 97:3 ~ 98:2로 혼합하는 단계; (2) ELP 수용액과 탈이온수를 혼합하는 단계; (3) ELP 용액과 상기 (1) 단계의 파우더를 혼합하는 단계; 를 포함하는 공정으로 혼합되는 것을 특징으로 한다.
- [0059] 본 발명에서, 상기 (2)단계의 ELP 수용액은 바람직하게는 V125E8 수용액일 수 있고, 보다 바람직하게는 V125E8 수용액을 10wt%의 비율로 탈이온수와 혼합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에서, 상기 (3)단계의 혼합비율은 바람직하게는 용액: 파우더의 비율이 0.3인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 이하 본 발명에 따르는 실시예 등을 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0063] **[실험 준비]**
- [0064] **1. 세포의 준비**
- [0065] 실험에 사용된 세포는 hPDLF세포 (인간 치주인대 세포)와 hFOB1.19세포 (인간 태아 조골 세포)이다. hPDLF 세포는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구입하였고, FOB 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 사용하였다. hPDLF 세포는 첨부된 지침서에 따라, bullet kit(CC-3205; hFGF-B, insulin, hFGF-B, GA-1000, 5% FBS, Lonza, Basel, Switzerland)가 보충된 SCBM 배지(Stromal cell basal medium, Lonza, Basel, Switzerland)에서 성장시켰고, FOB 세포는 2.5mM L-글루타민, 0.3mg/ml G418 및 10% FBS가 보충된 DMEM과 Ham's F12 배지의 1:1 혼합물에서 배양시켰다. 세포들은 5%의 CO₂를 함유한 가습된 분위기에서 각각 37℃(hPDLF) 및 33℃(hFOB)의 조건으로 단층으로 유지되었다.
- [0067] **2. 혼합 비율 별 실험군 준비**
- [0068] 구체적인 비교 실험을 수행하기 위하여, MTA, nBAG, 증류수 및 ELP의 비율에 따라 총 9개의 그룹을 준비하였다. 각 그룹의 성분은 하기 표 1과 같다.

표 1

(wt %)	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	Group 9
MTA	100%	98%	95%	100%	99%	98%	97%	96%	95%
nBAG	0%	2%	5%	0%	1%	2%	3%	4%	5%
DW	0	0	0	X	X	X	X	X	X
ELP	X	X	X	0	0	0	0	0	0

* MTA (Mineral Trioxide Aggregate), nBAG (Bioactive glass nanoparticle), ELP (Elastin like polypeptide), DW (distilled water)

[실시예]

실시예 1. 세포 증식 시험 MTT assay

3-(4,5-디메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드(MTT) Confluency가 80% 이상인 배양세포를 사용하였으며, 본 실험에서는 노란색 MTT가 보라색 포마잔 (formazan)으로 환원되었다. Dulbecco의 인산염 완충 식염수를 사용하여 5 mg/mL MTT 염료의 원액을 제조하였고, 새로 준비된 MTT 염료 20 μ L를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 4시간 동안 배양했다. 상층액을 제거한 후, 100 μ L 디메틸 설펝사이드(DMSO)를 모든 웰에 첨가하여 형성된 포마잔(formazan) 결정을 용해시키고 플레이트를 15분 동안 추가로 배양한 후에 마이크로플레이트 리더기 (spark 10M, Tecan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실시예2. ARS 염색 (Alizarin S stain)

전체적인 염색 프로토콜은 Gregory, Gunn, Peister 및 Prockop(2004)에서 약간 수정하였다. 고정된 세포를 40mM Alizarin Red(pH 4.1-4.3, 1mL/well)(Sigma-Aldrich)로 염색 후 실온에서 20분 동안 배양하였고, Alizarin Red S는 Ca 이온과 복합체를 형성하는 것을 확인하였다. 행해진 용액이 투명해질 때까지 샘플을 증류수(dH2O)로 4회 세척하여 과잉 염료를 제거하였다. 세포층 내의 Ca 침전물은 반점으로 나타났으며 붉은색-주황색으로 염색되었다.

실험 결과 Group 6(MTA 98; BAG 2; ELP),7(MTA 97; BAG 3; ELP)에서 칼슘 침착이 많이 일어나 골조직의 재생에 훨씬 유리할 수 있음이 증명된다.

실시예 3. 세포 이동 (Cell migration) 관찰

3.1. 상처 치유 효과

세포를 SCBM 및 10% FBS가 보충된 DMEM/F12에 웰 당 1 x 10⁵의 밀도로 6웰 플레이트에 시딩 하였다. 파종 후 12시간 동안 세포를 각 그룹별 시편의 추출물로 48시간 동안 처리하였고 세포 단층에 스크래치를 만들어 24시간과 48시간에 상처 봉합 속도를 관찰하고 Image J 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

실험 결과, Group 6(MTA 98; BAG 2; ELP),7(MTA 97; BAG 3; ELP)에서 같은 시간동안 많은 세포들이 wound 내로 이주하여 증식한 것을 관찰할 수 있다.

3.2. 트랜스 웰 분석 (Trans well assay, (AP48 48-Well Micro Chemotaxis Chamber))

세포의 이동 및 침입 능력은 트랜스 웰 분석을 사용하여 측정했다. Matrigel은 테스트 전 37°C 에서 5시간 동안 배양하였고, 2×10⁴개의 형질 감염된 세포를 무혈청 배지에 재현탁시키고 각각 침입 및 이동 분석을 위해 Matrigel(BD Biosciences)이 있거나 없는 상부 챔버에 시딩 하였다. 이어서, 함유된 배지를 하부 챔버에 첨가하였다. 24시간 배양 후, 위쪽 구획의 세포를 면봉으로 긁어내고, 막 아래쪽 표면으로 이동하거나 침입한 세포를 미리 냉각된 메탄올로 실온에서 20분간 고정한 후 0.1% 크리스탈 바이올렛 염색제로 실온에서 20분간 염색하였

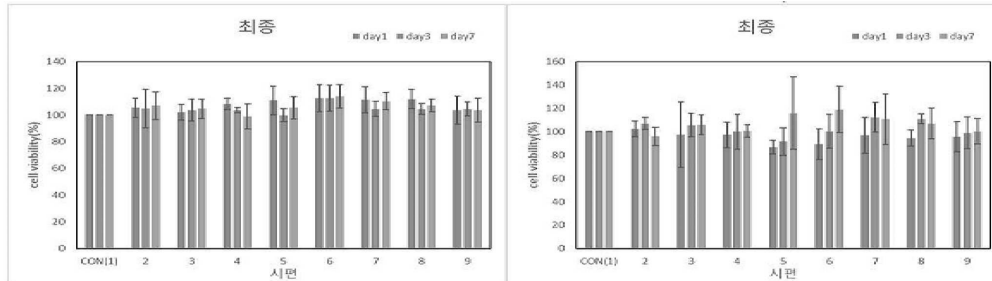
다.

[0087]

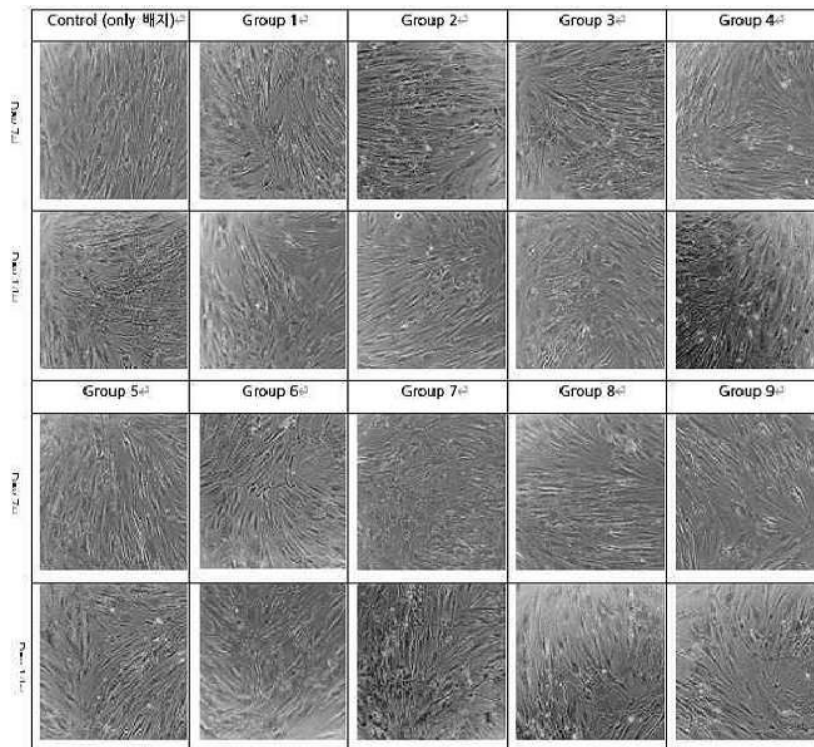
실험 결과, 트랜스 웰 분석 (trans-well assay)을 통해 group 6(MTA 98; BAG 2; ELP) (5(MTA 99; BAG 1; ELP), 7(MTA 97; BAG 3; ELP))에서 hPDLF의 이주가 활발한 것을 확인할 수 있었다.

도면

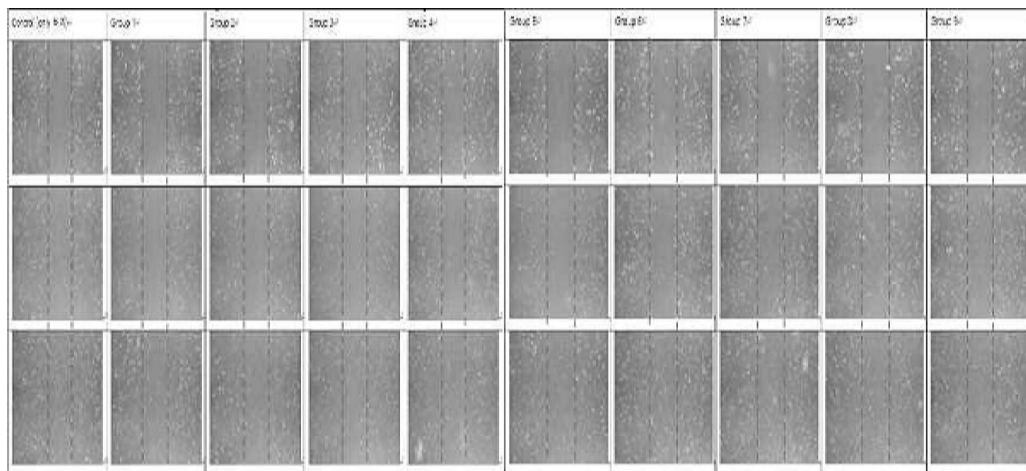
도면1



도면2



도면3



도면4

