



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0088463
(43) 공개일자 2016년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 6/027 (2006.01) A61K 33/30 (2006.01)

A61K 6/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 6/0273 (2013.01)

A61K 33/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0007266

(22) 출원일자 2015년01월15일

심사청구일자 2015년01월15일

(71) 출원인

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김해원

충청남도 천안시 서북구 광장로 260 불당한화꿈에그린아파트 103동 802호

김은철

서울특별시 강남구 영동대로128길 15 1동 802호 (삼성동, 홍실아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

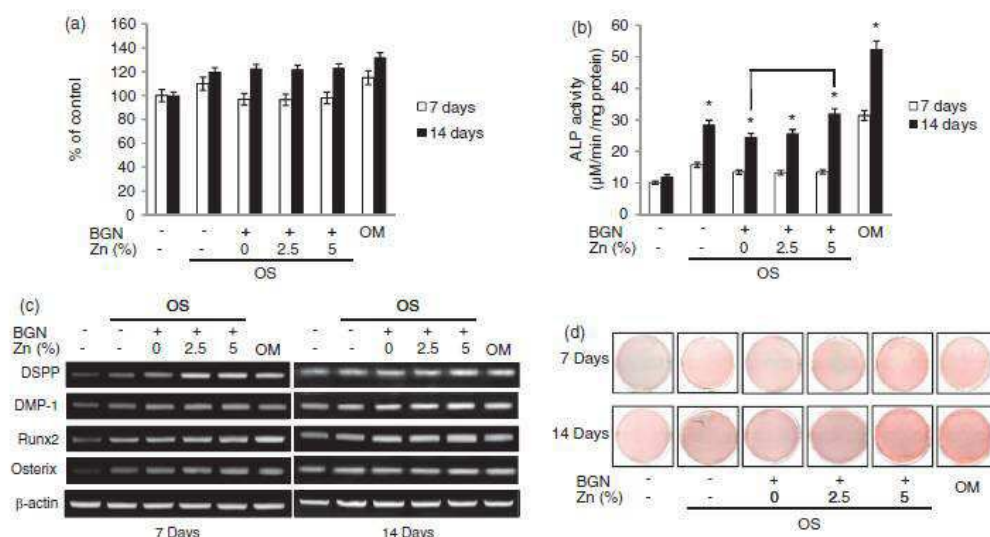
(54) 발명의 명칭 아연-생활성 유리 나노입자를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 및 이의 제조를 위한 키트

(57) 요약

본 발명은 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 및 이의 제조를 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명의 아연-생활성 유리 나노입자를 포함하는 인산칼슘 시멘트 조성물은 치수 세포의 치아형성 분화를 촉진하고 혈관신생을 촉진하므로 치수조직 재생용 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 6/0643 (2013.01)

(72) 발명자

엘피키, 아메드

충청남도 천안시 동남구 성불사길 60, 305호

장준

서울특별시 동대문구 경희대로3길 38, 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093829

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합 연구

기 여 율 2/3

주관기관 단국대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711001710

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원

연구과제명 치아와 치주조직 재생 연구센터

기 여 율 1/3

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

분말상과 액상으로 구성되는 인산칼슘 시멘트 조성물에 있어서, 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자는 생활성 유리의 칼슘의 일부가 아연으로 대체된 것인 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자는 생활성 유리의 칼슘의 일부가 아연으로 대체된 것인 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 생활성 유리 나노입자의 함량은 분말상 전체 중량 중 1 내지 20중량%인 것인 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 아연의 함량은 생활성 유리 나노입자의 전체 중량 중 0.1 내지 10중량%인 것인 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서 상기 생활성 유리 나노입자의 크기는 평균 입경 10 내지 100 nm인 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 아연 함유 생활성 유리 나노입자는 하기 단계를 포함하는 제조 방법으로 제조된 것인 조성물:

- 1) PEG 또는 CTAB를 용해시켜 템플레이트 용액을 제조하고, pH를 9 내지 13으로 조절하는 단계;
- 2) 상기 템플레이트 용액에 산화칼슘 전구체 및 산화아연 전구체를 첨가하여 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액을 제조하는 단계;
- 3) 상기 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액에 실리카 전구체 용액을 첨가하면서 초음파 처리하고 교반하여 반응 생성물을 제조하는 단계; 및
- 4) 상기 반응 생성물을 원심분리한 후 세척하고 건조 및 소성하여 메조다공성 생활성 유리 나노입자를 제조하는 단계.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 분말상은 비정형 인산칼슘(Amorphous calcium phosphate), 제2인산칼슘(Dicalcium phosphate anhydrous, DCPA), 제4인산칼슘(Tetracalcium phosphate, TTCP), α 형 제3인산칼슘(α -Tricalcium phosphate, α -TCP) 및 β 형 제3인산칼슘(β -Tricalcium phosphate, β -TCP)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 인산칼슘 화합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 액상은 이온화된 칼슘 및 인산 이온들의 침전반응을 촉진하여 하이드록시아파타이트 생성을 촉진하는 경화촉진제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 경화촉진제는 Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Na_2SO_4 , 구연산, 말레익산 및 프로피온산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 조성물의 액상은 분말상 100 중량부에 대하여 30 내지 45 중량부로 포함되는 조성물.

청구항 12

각각 개별 용기에 포장된, 인산칼슘 화합물 함유 분말상, 경화촉진제 함유 액상 및 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자로 구성되는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 제조용 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 생활성 유리 나노입자를 분말상의 전체 중량을 기준으로 0.1 내지 10 중량%의 양으로 사용하도록 제시하는 설명서를 구비하거나 상기 생활성 유리 나노입자가 분말상의 전체 중량을 기준으로 0.1 내지 10 중량%의 양으로 정량되어 개별 용기에 포장된 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아연 함유 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 및 이의 제조를 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 재생 치내 요법(regenerative endodontics)은 인간 치수세포(hDPC)의 재생 능력을 활용하는 현대 치의학의 새로운 연구분야이다. hDPC는 일반적으로 스캐폴드 및 반응 분자와 관련하여 연구되었는데, 시험관 내에서 자가재생 및 분화능력을 가지는 것으로 알려져있다. 스캐폴드는 hDPC가 부착, 증식, 분화할 수 있고 바이오미네랄화(biomineralization) 할 수 있는 적절한 환경을 제공한다. 중합체 및 무기물을 포함하는 다양한 물질들이 치수 재생을 위한 기질로 제공되기 위해 스캐폴드의 3D 기질로 사용되어왔다. 결함이 있는 치수 지역을 채우고 회복시킬 수 있는 스캐폴드 형태 중에서, 주사가 가능한 형태의 스캐폴드는 침습 수술을 최소화시킬 수 있다.

[0003] 인산칼슘 시멘트(CPC)는 골 및 상아질과 같은 단단한 조직의 회복 및 재생을 위한 좋은 재료가 될 수 있는 것으로 알려져있다. 골과 골을 둘러싸고 있는 조직에 대한 인산칼슘 시멘트의 우수한 생적합성(biocompatibility)은 근본적으로 천연 미네랄 성분인 수산화인회석(HA)과 유사한 화학적 구성 때문이다. 다양한 시험관 내 및 생체

내 실험에서는 이미 골/치아 발생 및 치수/골 형성을 포함한 CPC의 긍정적인 효과들이 증명되었다. 이에 따라 CPC와 관련된 최근 연구들은 CPC를 중합체상 상(polymeric phase), 나노입자 또는 다른 생분자를 포함한 추가 성분과 혼합시킴으로써 CPC의 기계적, 생물학적 특성을 향상시키는데 중점을 두고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 하나의 목적은 분말상과 액상으로 구성되는 인산칼슘 시멘트 조성물에 있어서, 아연 함유 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 하나의 목적은 각각 개별 용기에 포장된, 인산칼슘 화합물 함유 분말상, 경화촉진제 함유 액상 및 아연 함유 생활성 유리 나노입자로 구성되는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 제조용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 분말상과 액상으로 구성되는 인산칼슘 시멘트 조성물에 있어서, 아연을 함유한 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물을 제공한다.

[0007] 이하 본 발명의 구성을 상세히 설명한다.

[0008] 본 발명에서는, CPC에 생활성 유리(BG), 특히 BG의 나노입자형인 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle, BGN)를 첨가하여, 새로운 생활성 나노복합체를 제조하였다. BG는 살아있는 조직과 접촉하였을 때 표면에 탄산 HA(hydroxyapatite)의 형성을 유도할 수 있는 우수한 골 생활성 물질이다. 이러한 HA 층은 천연 골 기질과 유사하며, 세포의 정착, 골 분화 및 세포의 기질 분해를 위한 효과적인 인터페이스를 제공하고, 천연 골과의 직접적인 결합을 이룰 수 있다.

[0009] 생활성 유리 나노입자(BGN)는 나노필러(nanofiller)로서 나노복합체를 제조할 수 있으며 생분자를 전달할 수 있는 등 많은 장점을 가지고 있다. 또한, 줄기세포의 골분화 촉진, 약물의 로딩과 전달 및 치아의 재미네랄화(dentin remineralization)와 같은 우수한 생물학적 특성을 나타낼 수 있다. 더 나아가, BGN은 줄-겔 제조과정에서 이의 구조 내부에 특정 이온을 결합시킬 수 있다. 본 발명에서는 골에서 필수 미량 원소로 알려져있는 아연 이온을 생활성 유리 구조 내부에 결합하여 사용하였다. 본 발명에서, 아연은 HA 및 제3인산칼슘(tricalcium phosphate)과 같은 인산칼슘 화합물과 함께 사용되어 골 세포 기능을 촉진하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

[0010] 특히, 본 발명에서는 치수 재생용 물질로서 CPC 내에 아연-BGN의 나노입자를 혼합하여 사용함으로써, hDPC의 치아 형성 및 혈관 신생에 있어서 CPC/BGN 기질의 효과 및 이와 관련된 신호 전달 경로를 확인하였으며, 결론적으로 상기 조성물이 치수 조직 재생용으로 사용될 수 있음을 발견하였다.

[0011] 다시 말해, 본 발명에 따른 인산칼슘 시멘트 조성물은 치아형성 분화 및 혈관신생을 촉진시키는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 인산칼슘 시멘트 조성물은 아연 함유 생활성 유리 나노입자를 함유함에 따라, 치아형성 분화의 생리활성이 더욱 향상되며 생체 독성이 없고 우수한 생체 적합성을 나타내므로 생체 내에 원하는 부위에 안전하고 효과적으로 치수조직을 재생시킬 수 있어 치수조직 재생용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 용어 "시멘트"란, 분말형 고체상 및 액상의 혼합으로 얻은 치수 조직의 대체체로서 사용 가능한 페이스트의 경화체를 의미한다. 상기 시멘트의 경화는 실온 혹은 체온에서 인위적인 처리 없이 행해진 페이스트의 자발적 경화를 의미하며, 이때의 페이스트는 고체상과 액상을 혼합한 결과로 얻어진 것이다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 용어 "인산칼슘 시멘트"는 분말형 고체상이 인산칼슘화합물 혹은 칼슘 및/또는 인산염 화합물의 혼합물로 구성되는 시멘트를 의미한다.

- [0014] 상기 인산칼슘 시멘트는 인산칼슘 입자들이 주성분인 분말과 인산염과 같은 경화를 촉진하는 물질을 함유한 수용액으로 구성되는 소재로, 시술 시 두 성분을 혼합하여 고점도의 액상 상태로 적용시키면 적용 부위에서 두 성분들의 화학 반응에 의해 인산칼슘 화합물이 침전되어 경화됨으로써, 손상된 치수조직을 재생시켜 주는 치수 대체물질의 한 형태이다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "생활성 유리"는 Hench에 의해 발견되었으며, Bioglass[®]로 명명되었고, 이는 1980년 중반부터 Perioglas[®] 및 Novabone[®] 상품명으로 분말 구조의 재생 골로서 임상적으로 사용되었다. 생활성 유리는 체액과 접촉시 표면에서 HCA(hydroxycarbonated apatite)층이 형성되기 때문에 골에 결합된다. HCA는 조성이 골 미네랄과 유사하며, 골과 강한 결합을 형성한다. 생활성 유리는 인체 내에서 안전하게 용해되고, 유전자 수준에서 골 세포를 자극하는 역할을 하는 임계적 농도의 실리콘 및 칼슘 이온을 방출하며, 심지어 매우 적은 활성 세포가 존재할 때 새로운 골 재생을 일으킨다.
- [0016] 생활성 유리가 재생 물질로서의 이용에 적합한 반면, Bioglass[®] 합성물은 다공성의 지지체의 생산에 적합하지 않다. 이는 소결 공정(sintering process)을 사용해야만 하기 때문이며, 이는 국소적인 흐름을 일으키기 위해 유리를 유리 전이온도 이상으로 가열하는 것을 요구한다. Bioglass[®] 합성물은 유리 전이 온도 이상에서 즉시 결정화되며, 한번 결정화된 Bioglass[®]는 생활성을 잃는다. 생활성 유리는 용해로 유래된 것 및 졸-겔로 유래된 것의 두 가지 종류가 있다. 본 발명에서는, 실리카를 기초로 한 졸-겔로 유래된 생활성 유리를 사용할 수 있다.
- [0017] 일반적으로 생활성 유리는 SiO_2 및 CaO 를 주성분으로 하고, Na_2O , P_2O_5 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서는 이러한 생활성 유리에 아연(Zn)을 함유시켜 사용하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 아연 함유 생활성 유리는 칼슘의 일부가 아연으로 대체된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 아연 함유 생활성 유리 나노입자의 함량은 바람직하게는 분말상 전체 중량 중 1 내지 20중량%일 수 있으며, 상기 아연 함유 생활성 유리 나노입자의 크기는 바람직하게는 평균 입경 10 내지 100nm일 수 있다. 또한, 상기 아연의 함량은 바람직하게는 생활성 유리 나노입자의 전체 중량 중 0.1 내지 10중량%일 수 있으며, 상기 아연은 바람직하게는 생활성 유리 나노입자의 칼슘을 대체하여 함유된 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 인산칼슘 시멘트는 아연 함유 생활성 유리 나노입자를 함유하여 치수 조직 표면에 탄산 HA 형성을 유도함으로써, 세포의 정착 및 치아형성 분화를 촉진시키고 천연 치수조직과 직접적인 결합을 증가시킬 수 있으며, 아연을 함유함으로써 치수세포의 기능을 촉진시킬 수 있어 치수조직 재생용 조성물로 우수한 효과를 가진다.
- [0020] 본 발명의 아연 함유 생활성 유리 나노입자는 바람직하게는 1) PEG 또는 CTAB를 용해시켜 템플레이트 용액을 제조하고, pH를 9 내지 13으로 조절하는 단계; 2) 상기 템플레이트 용액에 산화칼슘 전구체 및 산화아연 전구체를 첨가하여 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액을 제조하는 단계; 및 3) 상기 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액에 실리카 전구체 용액을 첨가하면서 초음파 처리하고 교반하여 반응 생성물을 제조하는 단계; 4) 상기 반응 생성물을 원심분리한 후 세척하고 건조 및 소성하여 메조다공성 생활성 유리 나노입자를 제조하는 단계를 포함하는 제조 방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0021] 상기 아연 함유 메조다공성 생활성유리 나노입자는 실리카(SiO_2) : 산화칼슘(CaO) 및 산화아연(ZnO)의 몰 비율이 60:40 내지 95:5인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 85:15일 수 있다.
- [0022] 상기 단계 1은, 메조기공을 갖는 나노입자를 제조하기 위하여 자기조립화 고분자 템플레이트 용액을 제조하고, pH를 9 내지 13으로 조절하여 염기성 분위기를 형성하는 단계이다. 본 발명의 자기조립화 고분자 템플레이트는 PEG 또는 CTAB가 바람직하며, 상기 템플레이트 용액은 무수 메탄올 용액에 상기 고분자 템플레이트를 용해시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기 pH는 NH_4OH , NaOH , KOH 또는 Tris로 조절하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 단계 2는, 템플레이트 물질에 산화칼슘 및 산화아연을 형성시키기 위하여, 상기 템플레이트 용액에 산화칼슘 전구체와 산화아연 전구체를 첨가하고 교반하여 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액을 제조하는 단계이

다. 상기 산화칼슘 전구체는 질산칼슘, 염화칼슘, 아세트산칼슘 또는 칼슘 메톡시에톡사이드인 것이 바람직하며, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 산화아연 전구체로는 수산화아연, 아세트산아연, 아세트산아연 수화물, 디에틸아연, 질산 아연, 질산아연수화물, 탄산아연, 아연아세틸아세토네이트 및 아연아세틸아세토네이트수화물 등을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 단계 3은, 템플레이트 물질에 목적하는 무기물을 형성시키기 위하여, 상기 산화칼슘-산화아연-템플레이트 혼합용액에 실리카 전구체 용액을 첨가하면서 초음파 처리하고 교반하여 반응 생성물을 제조하는 단계이다. 상기 실리카 전구체 용액은 실리카 전구체를 무수 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 이소프로판올의 알코올 용액에 용해시킨 것이 바람직하고, 상기 실리카 전구체는 TEOS(tetraethyl orthosilicate), TMOS(trimethoxy orthosilicate), GPTMS((3-glycidoxypopyl)methyl diethoxysilane), MPS(3-mercaptopropyl trimethoxysilane), GOTMS(γ -glycidylxypropyl trimethoxysilane) 또는 APTMOS(aminophenyl trimethoxysilane)인 것이 바람직하며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 초음파 처리는 출력 전력 200W 내지 240W, 10s on/ 10s off 사이클로 15분 내지 25분 동안 수행하는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 단계 4는, 반응 생성물에서 템플레이트를 제거하여 메조다공성 생활성유리 나노입자를 수득하기 위하여, 상기 반응 생성물을 4500rpm 내지 5500rpm으로 원심분리한 후 세척하고 건조 및 소성하는 단계이다. 상기 세척 후에 탈이온수로 수 회 그리고 무수 에탄올로 수 회 재분산시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 건조는 65℃ 내지 75℃ 온도범위에서 10시간 내지 14시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 소성은 대기하에서 550℃ 내지 650℃ 온도범위로 5시간 내지 7시간 동안 수행하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는, 생활성 유리 나노입자를 α -제3인산칼슘(α -TCP)에 대해 10중량%로 α -TCP와 혼합하고, 칼슘의 일부를 아연으로 대체하는 방식으로 하여 2.5% 내지 5.0% 함량으로 하여 인산칼슘 시멘트를 제조하였으며, 이의 특성을 확인하였다. 그 결과 아연 함량 증가에 따라 시멘트의 응고시간이 감소하며, 아연 함유 생활성 유리 나노입자를 포함하는 인산칼슘 시멘트는 형태학적으로 생체 모방의 HA와 매우 유사하다는 것을 확인하였다(도 1).

[0027] 본 발명에 따른 인산칼슘 시멘트의 분말상은 비정형 인산칼슘(Amorphous calcium phosphate), 제2인산칼슘(Dicalcium phosphate anhydrous, DCPA), 제4인산칼슘(Tetracalcium phosphate, TTCP), α 형 제3인산칼슘(α -Tricalcium phosphate, α -TCP) 및 β 형 제3인산칼슘(β -Tricalcium phosphate, β -TCP)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 인산칼슘 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 α -TCP를 사용하였다.

[0028] 본 발명에 따른 인산칼슘 시멘트의 액상은 이온화된 칼슘 및 인산 이온들의 침전반응을 촉진하여 HA 생성을 촉진하는 경화촉진제를 포함하는 것이 바람직하며, 상기 경화촉진제는 Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Na_2SO_4 , 구연산, 말레익산 및 프로피온산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서, 상기 시멘트 조성물의 액상은 분말상 100 중량부에 대하여 30 내지 45 중량부로 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기과 같은 조건으로 제조된 아연 함유 생활성 유리 나노입자(bioglass nanoparticle)를 포함하는 인산칼슘 시멘트 조성물의 치수조직 재생과 관련된 효과를 확인하였다. 그 결과 상기 시멘트는 세포독성을 보이지 않았으며, 인간 치수세포의 미네랄화된 결정 형성을 향상시키고 치아형성 분화 마커 유전자의 발현을 증가시켰다(도 2). 또한 상기 시멘트에서 배양한 인간 치수세포는 VEGF의 발현이 증가되었으며, 상기 세포를 배양한 배양액은 HUVEC의 혈관신생을 향상시켰다(도 3). 따라서 본 발명의 인산칼슘 시멘트는 치수조직 재생용 조성물로서 우수한 효과를 보일 수 있다는 것을 확인하였다.

[0031] 또한, 본 발명은 각각 개별 용기에 포장된, 인산칼슘 화합물 함유 분말상, 경화촉진제 함유 액상 및 아연 함유 생활성 유리 나노입자로 구성되는 치수조직 재생용 인산칼슘 시멘트 조성물 제조용 키트를 제공한다.

[0032] 본 발명에서 상기 키트는, 생활성 유리 나노입자를 분말상의 전체 중량을 기준으로 0.1 내지 10 중량%의 양으로

사용하도록 제시하는 설명서를 구비하거나 상기 생활성 유리 나노입자가 분말상의 전체 중량을 기준으로 0.1 내지 10 중량%의 양으로 정량되어 개별 용기에 포장된 것일 수 있다.

- [0033] 본 발명의 인산칼슘 시멘트 조성물 제조용 키트에서, 상기 분말상, 액상 및 생활성 유리 나노입자의 성분, 혼합비 등은 상기 인산칼슘 시멘트 조성물에서 설명한 바와 동일하다.
- [0034] 상기 키트는 사용 직전에 액상에 생활성 유리 나노입자를 분산시킨 후 분말상을 혼합하여 페이스트 형태로 인산칼슘 시멘트 조성물을 제조한 후 원하는 시술 부위에 상기 페이스트를 주입하여 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 시술 시 주사기를 사용할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 키트는 생물학적 단백질, 약물 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 생물학적 단백질은 소혈청 알부민, 라이소자임, 성장인자 등이고 약물을 항생제, 염증제 등을 예로 들 수 있다.
- [0037] 본 발명의 인산칼슘 시멘트 조성물은 빠른 시간 내에 경화 가능하며 치아형성 분화 및 혈관신생을 촉진하여 시술 후 빠른 치수조직 재생을 유도할 수 있는 특징을 갖는다.
- [0038] 본 발명의 키트는 조직공학에서 치수 조직의 수리 및 재생을 위한 나노 복합 주사 시스템에 응용되어 치수조직 결함의 치료와 관련되어 치과 치료 등에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명의 아연-생활성 유리 나노입자를 포함하는 인산칼슘 시멘트 조성물은 치수세포의 치아형성 분화를 촉진하고 혈관신생을 촉진하므로 치수조직 재생용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 (a) CPC 시멘트 복합체 제조에 사용된 Zn-BGN의 TEM 사진 및 Zn-BGN 시멘트의 EDS(삽입), (b) BGN에 다양한 Zn 함량을 가진 CPC/BGN 시멘트 복합체에서 측정된 응고 시간, (c) 고형화되고 SBF-시험을 거친 후 CPC/BGN 시멘트의 저배율 및 고배율 SEM 사진이다.

도 2는 인간 치수세포에서 치아형성 분화에 대한 아연 첨가 BG 스캐폴드의 효과에 대한 분석 결과이다. 세포는 7일 및 14일 동안 50mg/mL 아스코빅산 및 10mM β -글리세로포스페이트(β -glycerophosphate)를 함유한 골형성 보충 배지(OS)에서 배양하였다(A-D). OS 및 10^{-7} M 텍사메타손을 포함하는 OM을 양성 대조군으로 사용하였다. 세포 독성 및 ALP 활성은 MTS(a, n=4) 및 ALP 활성 분석(b, n=4)을 통해 측정하였다. 치아형성 분화 유전자의 mRNA는 RT-PCR을 통해 조사하였다(c). 미네랄화된 결절 형성은 알리자린 레드 염색을 통해 조사하였다(d). *통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이다.

도 3은 혈관신생에 대한 아연이 첨가된 BG의 효과에 대한 분석 결과이다. 50mg/ml 아스코빅산 및 10mM β -글리세로포스페이트를 포함하는 골형성 배지(OS)에서 치수세포를 배양하였다. 치아형성 분화에 대한 양성 대조군으로 OM을 사용하였다. 혈관신생 사이토카인의 mRNA 발현은 3일간 치수세포를 배양하여 평가하였다(a). 치수세포를 무혈청 배지에서 ZnBG와 함께 24시간 배양하여 CM을 얻었다. HUVEC 세포에서 CM의 혈관신생 활성을 튜브(tube) 형성 분석을 통해 조사하였다. HUVEC 세포를 CM에서 18시간 동안 배양하고(b) 튜브 수를 세어 정량화하였다(c). *통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이다..

도 4는 인테그린(a, b) 및 인테그린 하위 신호(downstream signaling)(c)에 대한 아연이 첨가된 BG 스캐폴드의 효과에 대한 분석 결과이다. 치수세포는 50mg/mL 아스코빅산 및 10mM β -글리세로포스페이트를 포함하는 골형성 보충 배지(OS)에서 배양하였다. OS 및 10^{-7} M 텍사메타손을 포함하는 OM을 7 및 14일(a), 45분(c) 동안 양성 대조군으로서 사용하였다. 인테그린의 mRNA는 RT-PCR을 통해 조사하였다(a). 상기 그래프는 농도계에 의한 mRNA 발현의 정량화를 보여주며, 대조군과 비교하여 몇 배 증가하였는지를 나타낸다(b). *통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이다. 단백질 발현은 웨스턴블롯 분석으로 조사하였다(c).

도 5는 캐노니칼(a) 및 비-캐노니칼(b) Wnt 경로에 대한 아연을 첨가한 BG의 효과에 대한 분석 결과이다. 치수세포는 50mg/mL 아스코빅산 및 10mM β -글리세로포스페이트를 포함하는 골형성 보충 배지(OS)에서 24시간 동안

배양하였다. OS 및 10^{-7} M 텍사메타손을 포함하는 OM은 양성 대조군으로 사용되었다. 신호 경로는 웨스턴블랏으로 조사하였다.

도 6은 MAPK의 인산화 및 NF- κ B 경로의 활성화에 대한 아연이 첨가된 BG의 효과에 대한 분석 결과이다. 치수세포는 50mg/mL 아스코빅산 및 10mM β -글리세로포스페이트를 함유한 골형성 보충 배지(OS)에서 배양하였고, OS 및 10^{-7} M 텍사메타손을 포함하는 OM을 45분 동안 처리하여 양성 대조군으로 사용하였다(a, b). 신호 경로는 웨스턴블랏(a) 및 면역형광 염색(b)을 통해 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0042] 실시예 1: CPC/BGN 복합체의 제조 및 특성 분석

[0043] CPC/BGN 복합체 제조

먼저 졸-겔법을 이용하여 BGN을 제조하였다. 아연 이온 첨가는 부분적인 칼슘 이온 대체를 통해 수행하였다. 상기 BGN은 85% SiO_2 -15% CaO (0% Zn), 85% SiO_2 -12.5% CaO -2.5% ZnO (2.5% Zn) 및 85% SiO_2 -10% CaO -5% ZnO (5% Zn)의 세 가지 조성으로 제조하였다. 구체적으로, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 계면활성제를 pH 12.5에서 무수 메탄올에 용해시킨 후 Ca/Zn 용액을 제조하기 위해 칼슘 나이트레이트 테트라하이드레이트(calcium nitrate tetrahydrate) 및 징크 나이트레이트 헥사하이드레이트(zinc nitrate hexahydrate)(Aldrich)를 첨가하였다. 그 다음 TEOS(tetraethyl orthosilicate, Aldrich)를 무수 메탄올에 희석시키고 Ca/Zn 용액에 드롭방식으로 첨가하였다. 혼합하는 동안, 20분간 고출력 초음파처리를 하였다. 24시간 동안 혼합물을 저어준 후, 백색의 침전체를 가라앉도록 두고, 그 후에 물/에탄올로 완전히 세척하고 밤새 건조시켰다. 다음으로 600°C에서 5시간 동안 열처리를 하였다.

CPC 분말의 제조 방법은 다음과 같다. α -제3인산칼슘(α -TCP) 분말을 아연과 함께 또는 아연이 없이 제조한 상기 세 가지 조성의 BGN 분말과 각각 혼합하였다(α -TCP에 대해 10중량% BGN). 시멘트화는 플라스틱 주형에서 분말과 용액 비율이 1.5가 되도록 물과 혼합시켜 수행하였다.

[0046] CPC/BGN의 물리화학적 특성 분석

시험관 내 세포 시험을 위해, 직경 15mm, 두께 2mm의 원판형의 시멘트화된 표본을 습도 100% 조건에서 밤새 보관하고, 에탄올로 세 번 살균하고, 건조시켰다. 시멘트의 응고 시간은 길모어 바늘 방법(Gilmore needle method)을 통해 측정하였다. 표본의 형태는 필드 방사 주사 전자 현미경(FE-SEM; Tescan, Mira II LMH, Czech Republic)을 통해 확인하였고, 표본의 나노구조는 고해상도 투과 전자현미경(HR-TEM; JEM-3010, JEOL, Japan)을 이용하여 300kV에서 확인하였다. 표본의 화학 결합 구조는 GladiATR 다이아몬드 결정 액세서리(PIKE Technologies, USA)가 장착된 ATR-FTIR(attenuated total reflectance-Fourier transform infrared; Varian 640-IR, Australia) 분광기를 이용하여 분석하였다. 골-미네랄-유사 HA의 형성을 조사하기 위해 상기 시멘트 표본을 증류수에 담겼다. 물에 담그는 시험 후, 표본을 SEM 및 X-레이 회절(XRD; Rigaku)을 통해 확인하였다. 시험관 내 세포 실험을 위해, 각 표본을 에틸렌 옥사이드 가스로 살균한 후 24-웰 플레이트의 각 웰에 두었다.

[0048] 세포 배양

인간 텔로머라아제(telomerase)로 형질전환시켜 불멸화시킨 hDPC를 타카시 타카타 교수(Hiroshima University, Japan)로부터 제공받았다. 상기 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 100U/ml 페니실린 및 100mg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 α -MEM에 흡윤, 5% CO_2 , 37°C 조건에서 배양하였다. 치아형성 분화를 유도하기 위해, 세포를 골분화 보충 배지(OS; α -MEM, 10% FBS, 50mg/mL 아스코빅산, 10mM 글리세로포스페이트)에서 배양하였다. 상기

배지는 배양기간 동안 이틀에 한번씩 교체하였다.

[0050] 세포 증식

[0051] hDPC를 6-웰 플레이트의 웰 당 3×10^5 밀도로 표본에 접종하고, 세포 증식 분석 키트(Cell Titer 96 Aqueous One Solution; Promega, Madison, WI)를 이용하여 마이크로플레이트 흡수 리더기로 490nm의 파장에서 세포 증식을 측정하였다.

[0052] 알카라인 포스파타아제 활성

[0053] 배양한 hDPC를 PBS로 세척한 후 초음파를 처리하여 세포를 파괴하였다. ALP 활성은 0.7M 2-아미노메틸-1-프로판올(pH 10.3) 및 6.7mM $MgCl_2$ 용액에 기질로서 p-나이트로페닐 포스페이트(최종 농도 3mM)를 사용하여 측정하였다. 효소-연결면역흡수측정검사(enzymelinked immunosorbent assay) 리더(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0054] 알리자린 레드 S 염색

[0055] 차가운 70% 에탄올로 1시간 동안 세포를 고정하고 증류수로 세척하였다. 그 후 상기 세포를 40mM의 알리자린 레드 S(pH 4.2)로 10분간 조심스럽게 교반시키면서 염색하였다. 알리자린 레드 S 염색 수준은 광학 현미경을 통해 관찰하였다.

[0056] RNA 분리 및 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

[0057] RNA는 제조사의 지침에 따라 Trizol 시약(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 세포로부터 추출하였다. 그 후 상기 RNA 1mg을 올리고(dT) 프라이머(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 AccuPower RT PreMix(Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea)로 역전사(reverse transcription)시켰다. 그 다음, 60ng의 cDNA를 1mM의 프라이머로 증폭시켰다. 프라이머 서열 및 PCR 조건은 하기 표 1에 나타내었다. ETBR(ethidium bromide)로 염색한 1.5% 아가로스 겔에서 상기 PCR 산물을 전기영동하였다. 베타-액틴 mRNA로 표준화하고 각 밴드의 강도는 겔 사진에서 농도계(densitometer)(Quantity One; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량화하였다.

표 1

[0058]

유전자	프라이머 서열(5'-3')	Annealing Temp(°C)	Cycle Number	Product Size(bp)
DSPP	F: 5'-GCAAAAGTCCAGGACAGTGGGCC-3'(서열번호 1) R: 5'-GTCAAATTCCACCTCAGTTGGCCA-3'(서열번호 2)	61	35	342
DMP-1	F: 5'-AGAGAGAGATGGGAGAGCTGCGC-3'(서열번호 3) R: 5'-TGACCTTCCATCTGCCTCTGTTC-3'(서열번호 4)	61	35	202
Runx2	F: 5'-AGACCAACAGAGTCAGTGAGTGCT-3'(서열번호 5) R: 5'-TGGTGTCAGTGTGCTGAAGAGGC-3'(서열번호 6)	62	32	317
Osterix	F: 5'-CTCTGCGGGACTCAACAACCTCTG-3'(서열번호 7) R: 5'-GAGCCATAGGGGTGTGTCATGTC-3'(서열번호 8)	62	32	316
Integrin α1	F: 5'-TGCTGCTGGCTCCTCACTGTTGT-3'(서열번호 9) R: 5'-TAGTCTGGCGGCCACCTCTCTG-3'(서열번호 10)	61	35	703
Integrin α2	F: 5'-TTTCCCTGCTCTACCGGGC-3'(서열번호 11) R: 5'-ACCGGGGACCGTAGTTGCG-3'(서열번호 12)	61	35	132
Integrin α3	F: 5'-CCCATCCCTGATGCCCGCT-3'(서열번호 13) R: 5'-TGCCCCCTCAGTAGTCGTCG-3'(서열번호 14)	61	35	415

Integrin β 1	F: 5'-GACGCCGCGCGGAAAAGATG-3' (서열번호 15) R: 5'-ACCACCCACAATTTGGCCCTGC-3' (서열번호 16)	61	35	159
Integrin β 3	F: 5'-CCGGCCAGATGATCGAAGA-3' (서열번호 17) R: 5'-GGGTACACCTGGTCAGTTAGC-3' (서열번호 18)	61	35	329
FGF-2	F: 5'-GGCTTCTTCCTGCGCATCA-3' (서열번호 19) R: 5'-GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA-3' (서열번호 20)	61	35	354
Ang-1	F: 5'-GCAGGCTCCATGCTGAACGGT-3' (서열번호 21) R: 5'-ACTCCTTCCGTGCCTCTCGCA-3' (서열번호 22)	60	30	282
VEGF	F: 5'-CACCGCTCGGCTTGTCACAT-3' (서열번호 23) R: 5'-CTGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3' (서열번호 24)	60	35	404
β -actin	F: 5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3' (서열번호 25) R: 5'-ACATGATCTGGGTCATCTCTCG-3' (서열번호 26)	55	34	371

[0059] 웨스턴블롯 분석

[0060] 세포 추출물은 단백질을 용해 완충액(5mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 50mM TrisHCl (pH 7.5), 0.5 % Triton X-100, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 및 1mM N-ethylmaleimide)으로 얼음에서 30분간 세포를 용해시켜 제조하였다. 50 μ g의 단백질을 10% 또는 15% SDS(sodium dodecyl sulfate) 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동으로 분리하고 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 전기이동(electrotransfer)시켰다. 상기 막을 블로킹 용액으로 1시간 동안 처리하고 1:1000으로 희석한 p-FAK(phospho-focal adhesion kinase; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-팩실린(paxillin)(Santa Cruz Biotechnology), RhoA(Ras homolog gene family member A, Santa Cruz Biotechnology), 베타-액틴(Santa Cruz Biotechnology), p-Akt (Santa Cruz Biotechnology), p-ERK(p-extracellular signal-regulated kinase; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p-JNK(N-terminal kinase; Cell Signaling Technology), p-p38 (Cell Signaling Technology), 및 NF-kB (Cell Signaling Technology) 일차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 그 다음 홍당무과산화소(horseradish peroxidase)가 결합된 적절한 이차 항체로 1시간 동안 배양시켰다. 그 후 단백질을 향상된 화학발광(chemiluminescence) 시스템(Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 시각화하였다.

[0061] 내피 튜브 형성 분석

[0062] ATCC(University Blvd. Manassas, VA, USA)로부터 구입한 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells)은 내피세포 배지(ECM, ScienCell, Carlsbad, California)에서 습윤, 37°C, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. ECM 겔 용액(Cell Biolabs, San Diego, USA) 50ml를 96-웰 배양 플레이트에 붓고 고형화(37°C, 1시간)되도록 하였다. 3일 동안 ZnBG를 hDPC에 처리한 뒤 CM(condition medium)을 얻었다. HUVEC(12×10^4 세포/웰)을 ECM 겔에 접종하고 37°C, 5% CO_2 조건에서 18시간 동안 상기 CM으로 배양하였다. 그 후, 염색약(DMSO 용액에 1mM Calcein)(Cell Biolabs, San Diego, USA)으로 염색하였다. 튜브 형성은 형광현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 찍은 고출력 사진(high power photograph)으로부터 정량화하였다. 각 웰의 무작위적인 영역에서 최소 세 개의 사진을 찍었다. 튜브는 두 개의 세포가 만나는 직선형 세포 연결선 또는 분기점으로 정의된다. 상기 사진으로부터 튜브의 수를 세었다.

[0063] 면역 세포 화학

[0064] 세포를 4% 파라포름알데히드로 30분간 고정시키고 0.1% Triton X-100으로 투과화(permeabilization)시켰다. PBS 완충액으로 세척한 후, 슬라이드를 1% 표준 염소 혈청으로 1시간 동안 블로킹한 다음 1:100으로 희석시킨 마우스 단일클론 항-인간 p65 항체(Santa Cuz Biotechnology)와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 슬라이드를 PBS로 세척하고, 1:100으로 희석시킨 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 염소 항-마우스 IgG(Invitrogen life technology, Grand Island, NY)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 핵은 10mg/mL의 PI(propidium iodide)로 카운터염색하였다. 상기 슬라이드를 콘포칼 현미경(Cell Voyager, Yokogawa, Japan)으로 200배 확대하여 사진을 찍었다.

[0065] 실시예 2: CPC/BGN의 물리화학적 특성 분석

[0066] CPC에 혼합된 나노복합체인 Zn-BGN을 TEM으로 확인하였다(도 1a). 나노구 입자가 ~80nm의 균일한 크기로 잘 들어진 것을 확인할 수 있었다. 상기 나노입자는 높은 메조다공성을 가지는 것으로 나타났고, 나노입자의 EDS 맵핑(mapping)에서는 2.5% 및 5% Zn-BGN의 아연 함량이 각각 2.48% 및 5.06%로 나타났다. 5% Zn-BGN 시멘트의 대표적인 EDS 스펙트럼은 삽입된 사진에서 보여준다.

[0067] 그 다음으로 BGN을 CPC와 혼합한 뒤에 응고 시간을 측정하였다(도 1b). 모든 표본은 40분 내에 굳었는데, BGN 내에 혼합된 아연의 함량이 증가할수록 시멘트의 응고시간을 감소시켰다; Zn-BGN에서 Zn 함량 0%는 37분, 2.5%는 29분, 5%는 25분이었다. 상기와 같이 Zn의 함량 증가에 따라 응고 반응이 향상되는 것은 Zn 첨가가 BGN의 표면 반응성(주로 미네랄 침전)을 증가시키기 때문인 것으로 생각된다.

[0068] 골-미네랄-유사 HA 형성을 관찰하기 위하여 상기 시멘트 표본을 증류수에 담겼다. 굳은 CPC/BGN(5% Zn을 대표 표본으로 보여줌)의 SEM 사진에서 CPC 분말의 미립자와 상기 미립자를 둘러싸고있는 다수의 나노입자(BGN)를 확인할 수 있다(도 1c). 물에 담그는 시험 후에, 상기 표본은 생체 모방의 HA에서 전형적으로 나타나는 혈소판 결정(platelet crystalline) 형태가 발달한 모양을 보여주며, 이는 시험 전과는 완전히 다른 모양이다(도 1d).

[0069] 종합하면 Zn 함량 증가에 따라 시멘트의 응고시간이 감소하며, Zn-BGN/CPC는 형태학적으로 생체 모방의 HA와 매우 유사하다는 것을 확인하였다.

[0070] 실시예 3: 세포독성 및 치아형성 분화에 있어서 CPC/BGN의 효과

[0071] 시멘트 표본의 세포독성 효과를 평가하기 위해, MTS 분석을 수행하였다. 도 2a에서 보여주는 바와 같이, 모든 시멘트 표본은 대조군과 비교하여 hDPC에서 특별한 세포독성을 보이지 않았다.

[0072] hDPC에서 상아질모세포 분화에 대한 시멘트의 효과를 조사하기 위해, 7일 및 14일째에 ALP 활성, 알리자린 레드 염색 및 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 수행하였다. Zn-BGN을 포함하는 시멘트는 Zn이 없는 것과 비교하여 ALP 활성을 증가시켰고 시간 및 용량에 비례하여 미네랄화된 결절(nodule) 형성을 향상시켰다(도 2b 및 도 2d). 또한, Zn-BGN은 Zn이 없는 BGN과 비교하여 농도 의존적으로 DSPP, DMP-1, Runx2 및 오스테릭스(osterix)와 같은 치아형성 분화 마커 유전자의 mRNA 발현을 상향조절시켰다(도 2c).

[0073] 종합하면, 본 발명의 인산칼슘 시멘트 조성물은 세포독성이 없으며, hDPC의 상아질모세포로의 분화를 촉진시키므로 치수조직 재생용 조성물로 우수한 효과가 있음을 확인하였다.

[0074] 실시예 4: 혈관신생에 대한 CPC/BGN의 효과

[0075] 치수조직이 성공적으로 재생되기 위해서는 충분한 영양 및 산소의 공급이 필요한 바, 효과적인 혈관 네트워크가 형성되어야 하므로, 시험관 내에서 시멘트 표본이 혈관신생에 영향을 주는지 시험하기 위해, HUVEC의 튜브 구조 및 hDPC에서 혈관신생 인자의 mRNA 발현을 조사하였다(도 3). Zn-BGN을 포함하는 시멘트는 Zn이 없을 때와 유사한 FGF-2 및 Ang-1의 mRNA 발현을 보였으나, 배양 3일 째에 5% Zn-BGN 조건에서는 hDPC의 VEGF 발현이 일부 증가하였다(도 3a). 도 3b에서 보여주는 바와 같이 3일 동안 CPC/5% Zn-BGN을 처리한 hDPC로부터 얻은 CM(18 시간)을 처리하였을 때 HUVEC의 혈관신생이 자극되는 것을 확인할 수 있었다. 상기 5% Zn-BGN 조건은 HUVEC에서 모세혈관 유사 네트워크 형성을 이끄는 구조적 재조합과 함께 내피세포 모양의 눈에 띄는 변화를 유도하였다(도 3b). 5% Zn-BGN을 포함하는 표본에서 웰당 튜브 구조의 수는 HUVEC에 OS 또는 BG만 처리한 것과 비교하여 상당히 증가하였다(도 3c).

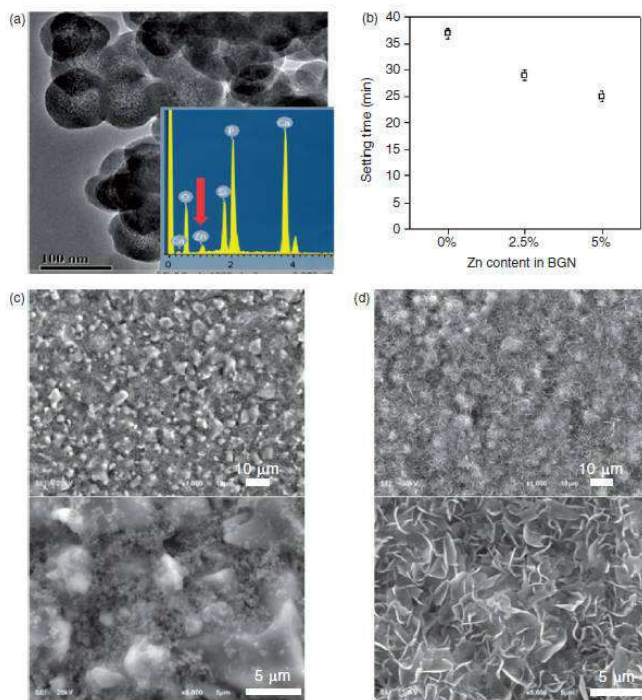
[0076] 이러한 결과로부터 CPC/5% Zn-BGN은 hDPC의 VEGF의 발현을 증가시켜, hDPC를 배양한 배양액이 HUVEC의 혈관신생을 자극함으로써, 치수조직 재생 용도로 본 발명의 조성물을 사용하였을 때 혈관신생을 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 실시예 5: 신호 전달 경로에서 CPC/BGN의 효과

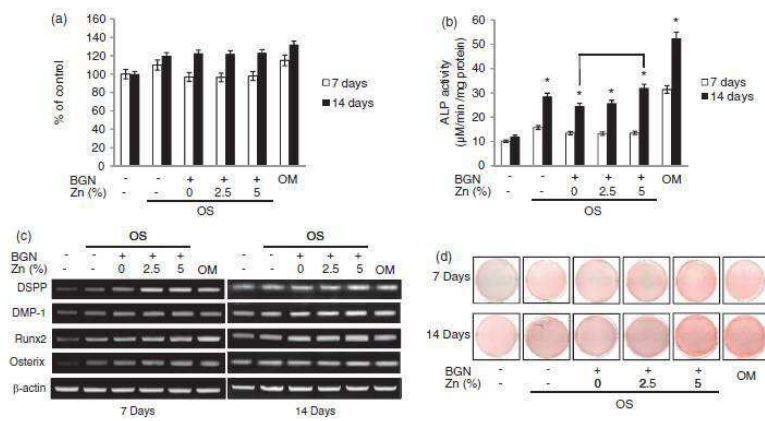
- [0078] 치아형성 분화는 골 분화와 밀접한 관련이 있는데, 골 분화에서는 인테그린(integrin)을 통한 세포-기질 상호작용이 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서 인테그린 및 그 하위 신호 경로에 대한 시멘트 표본의 효과를 조사하기 위해, 인테그린 및 그 하위 경로의 인산화의 mRNA 발현을 RT-PCR 및 웨스턴블랏 분석을 통해 분석하였다(도 4). a1, a2, b1 및 b3과 같은 인테그린 유전자의 mRNA 발현은 Zn-BGN을 함유한 시멘트의 경우 Zn이 없는 것과 비교하여 시간 및 용량에 비례하여 상향조절되었다(도 4a). 그러나, a3는 시멘트에 의해 영향을 받지 않았다. 또한, FAK, AKT, 팩실린(paxillin) 및 RohA를 포함하는 인테그린 하위 신호는 Zn-BGN에 의해 눈에 띄게 인산화되었다(도 4b).
- [0079] Wnt 신호 경로는 치아형성 분화 및 혈관신생에서 중요한 것으로 알려져 있으며, 상기 Zn-BGN에 의해 조절되는 것으로 확인한 인테그린 하위 신호 중에서 FAK 활성이 Wnt의 하위 신호 경로를 유발하기 때문에, 캐노니칼(canonical) 또는 비-캐노니칼(non-canonical) 경로를 포함하는 Wnt 신호에 대한 Zn-BGN의 효과를 조사하였다(도 5). Wnt1, Wnt3a, p-GSK-3 β 및 β -카테닌과 같은 Wnt 캐노니칼 신호는 용량에 비례하여 CPC/Zn-BGN을 처리한 hDPC에서 증가하였다(도 5a). 이와 유사하게 Wnt5a, CaMkII 및 NLk와 같은 비-캐노니칼 신호 또한 Zn-BGN에 의해 상향조절되었다(도 5b).
- [0080] 또한, MAPK 및 NF- κ B는 골 분화에서 중요한 신호 전달 경로로 알려져 있는데, 인테그린 하위 신호 경로가 MAPK 및 NF- κ B의 활성화에 관련되기 때문에, MAPK의 인산화 및 NF- κ B의 활성을 웨스턴블랏 분석 및 면역형광을 통해 조사하였다(도 6). ERK 및 p38의 인산화는 BG만 혼합한 CPC에서 배양한 것보다 5% Zn-BGN을 혼합한 CPC에서 배양한 hDPC에서 더 높았으나, JNK의 인산화는 그렇지 않았다(도 6a). 유사하게, 웨스턴블랏 및 콘포칼 사진은 핵에서 NF- κ B p65가 Zn이 없는 것과 비교하여 5% Zn-BGN이 혼합된 CPC에서 상당히 증가하였다는 것을 보여준다(도 6a 및 b).
- [0081] 결과적으로 본 발명의 Zn-BGN을 혼합한 CPC는 치아형성 분화와 관련된 인테그린 및 인테그린 하위 신호 경로를 활성화시켜 치아형성 분화를 촉진하므로, 치수조직 재생용 조성물로 우수한 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

도면

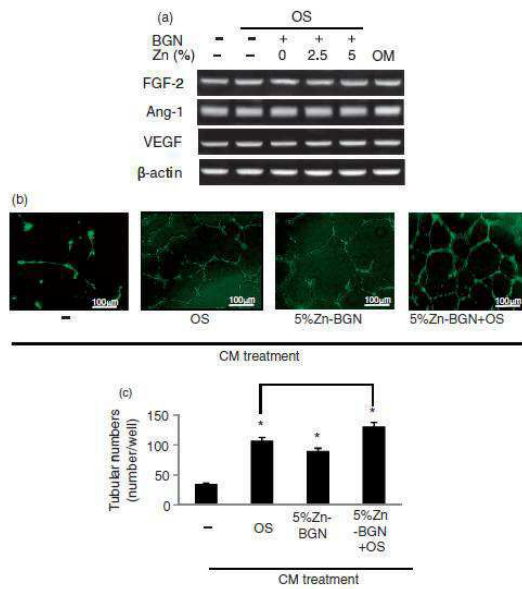
도면1



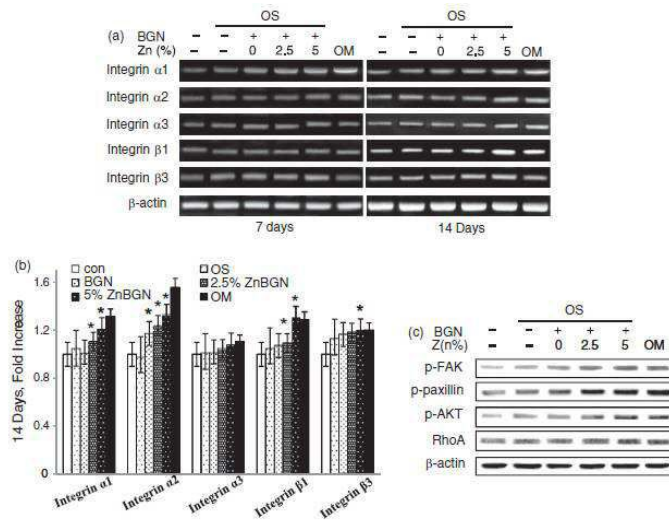
도면2



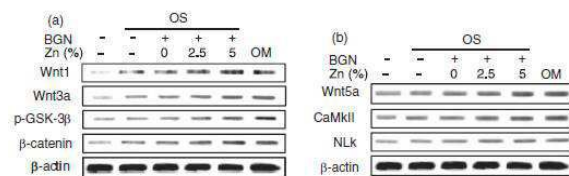
도면3



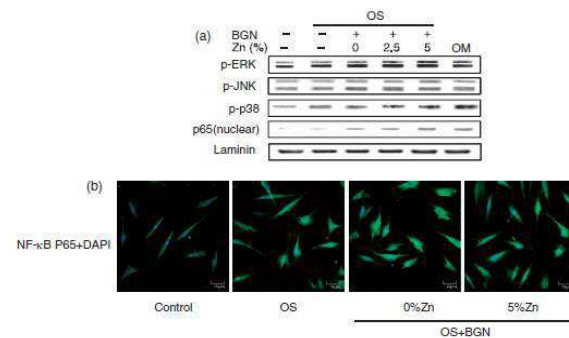
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Dankook University Cheonan Campus Industry Academic Cooperation Foundation
University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Calcium phosphate cement composition comprising zinc-bioglass
nanoparticles and a kit for preparing the same
- <130> KPA141063-KR
- <160> 26
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DSPP-F primer
 <400> 1
 gcaaaagtcc aggacagtgg gcc 23

<210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DSPP-R primer
 <400> 2
 gtcaaatttc cacctcagtt ggcca 25

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DMP-1-F primer
 <400> 3
 agagagagat gggagagctg cgc 23

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DMP-1-R primer
 <400> 4
 tgaccttcca tctgcctcct gttc 24

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Runx2-F primer
 <400> 5
 agaccaacag agtcagttag tgct 24

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Runx2-R primer
 <400> 6
 tgggtgtcact gtgctgaaga ggc 23
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Osterix-F primer
 <400> 7
 ctctgcggga ctcaacaact ctg 23

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Osterix-R primer
 <400> 8
 gagccatagg ggtgtgtcat gtc 23
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Integrin alpha1-F primer
 <400> 9
 tgctgtgtggc tcctcactgt tgt 23
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Integrin alpha1-R primer

<400>	10	
tagtctggcg gccacctctc tg		22
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Integrin alpha2-F primer	
<400>	11	
tttccctgct ctcaccgggc		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Integrin alpha2-R primer	
<400>	12	
accgggggac cgtagttgcg		20
<210>		
>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Integrin alpha3-F primer	
<400>	13	
cccatccctg atgccccgt		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Integrin alpha3-R primer	
<400>	14	
tgccccctca gtagtcgtcg		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Integrin beta1-F primer

<400> 15

gacgccgcgc ggaaaagatg 20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Integrin beta1-R primer

<400> 16

accacccaca atttggccct gc 22

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Integrin beta3-F primer

<400> 17

ccggccagat gattcgaaga 20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Integrin beta3-R primer

<400> 18

gggtcacacc tggtcagtta gc 22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF-2-F primer

<400> 19

ggctttttcc tgcgcatcca 20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FGF-2-R primer
 <400> 20
 gctcttagca gacattggaa ga 22

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ang-1-F primer
 <400> 21
 gcaggtcca tgctgaacgg t 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ang-1-R primer
 <400> 22
 actccttcg tgcctctgc a 21

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF-F primer
 <400> 23
 caccgcctcg gcttgcaca t 21

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF-R primer
 <400> 24
 ctgctgtctt ggggtcattg g 21

<210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta actin-F primer
 <400> 25
 catggatgat gatatcgccg cg 22
 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta actin-R primer
 <400> 26
 acatgatctg ggatcatcttc tcg 23