(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0037413
(43) 공개일자 2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01) *A61K 38/40* (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0129752
(22) 출원일자 2014년09월29일
심사청구일자 없음

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

전체 청구항 수 : 총 8 항

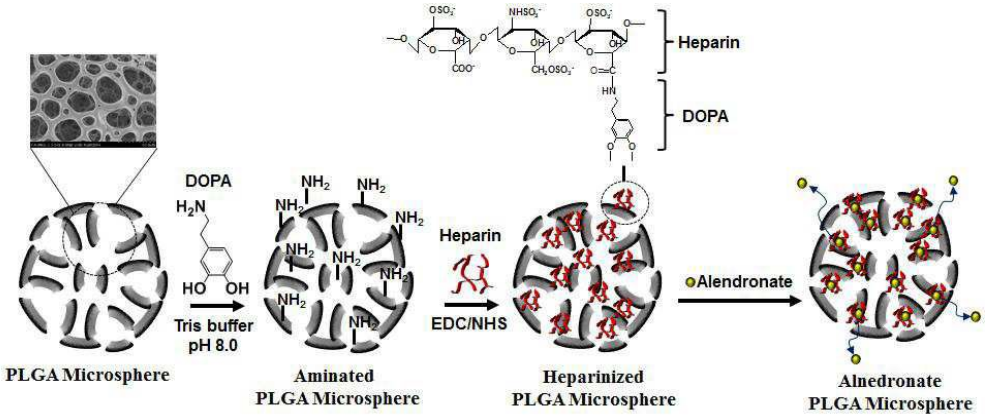
(54) 발명의 명칭 **골 형성 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 다공성 고분자 미립자와 상기 미립자의 표면에 고정된 골 형성 촉진물질을 포함하며, 상기 미립자는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면이 개질된 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 개복할 필요 없이 주사 등을 통해 직접적으로 골 부분에 주입됨으로써 거부반응을 최소화 시킬 수 있고 빠르게 치료효과를 볼 수 있다. 또한 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 약물이 지속적으로 방출되어 투여회수를 줄일 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김성은

서울특별시 강서구 강서로12길 51-13, 401호

최성욱

경기도 부천시 원미구 중동로 108, 112동 1102호

윤영필

서울특별시 광진구 천호대로132길 36-7, B102

이재용

서울특별시 양천구 화곡로3길 27-8, 103동 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI11C0388010014
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 [산학](4차년도)골절/골수염 부위 형태에 따른 환자 맞춤형 인공 지지체 개발
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 구로병원
연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI13C1501
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 근골격계 연부조직 재생을 위한 지지체의 전임상 및 임상시험 연구
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 구로병원
연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다공성 고분자 미립자 및 상기 미립자의 표면에 고정된 골 형성 촉진 물질을 포함하며,

상기 미립자는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면이 개질된 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미립자의 크기는 200 내지 1000 um이며, 10 내지 100um 크기의 구멍이 형성된 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 골 형성 촉진 물질은 골 형성 성장인자 또는 골 형성 화합물이며,

상기 골 형성 성장인자는 골 형성 단백질(BMP, bone morphogenic protein), 혈소판 유래 증식인자(PDGF, Platelet derived growth factor), 형질전환 성장인자-베타(TGF-beta, Transforming growth factor-beta), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF, basic fibroblast growth factor), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1, Insulin like growth factor 1), 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고,

상기 골 형성 화합물은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2(PGE2, Prostaglandin E2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 골 형성 성장 인자는 1pg/ml 내지 3 mg/ml 농도로 포함되며, 상기 골 형성 화합물은 1ng/ml 내지 500mg/ml 농도로 포함되는 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 헤파린(Heparin), 헤파란설페이트(Heparansulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산[Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산[Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산[Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen) 및 키토산(Chitosan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 카테콜 작용기를 함유하는 화합물은 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-

dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벨질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine), 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid) 및 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는 생체적합성 고분자의 아민그룹 또는 카르복시그룹의 작용기; 및

카테콜 작용기를 포함하는 화합물의 아민그룹, 카르복시그룹 또는 알데히드 작용기에서 선택된 작용기와의 결합에 의하여 형성되는 것인, 골 형성 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 생체 내에 여러 경로로 투여되는 약물은 여러 효소 및 대식세포에 의해 불안정하여, 과량의 투여량 및 빈번한 투여 횟수가 요구된다. 따라서, 생체 내 약물의 치료학적 농도를 유지하기 위한 약물전달시스템(DDS, Drug Delivery System)이 최근에 이슈화가 되고 있다. 이는 치료 부위에 약물을 안정적, 효과적으로 전달하여 장기간 동안 유효 혈중농도로 유지시켜 치료 효과를 극대화하고, 약물의 부작용을 극소화할 수 있다.

[0003] 이와 같이 생체 내로 투여된 약물의 유효성 및 안정성 문제를 해결하기 위해 여러 가지 약물 전달 시스템이 개발되고 있다. 예를 들어, 생체물질을 이용한 리포좀, 수화겔을 이용한 서방성 약물전달체, pH 또는 온도감응성 고분자를 이용한 자극성 약물 전달체, 미립자를 이용한 국부 투여용 약물 전달체, 나노 입자를 이용한 주사용 또는 흡입용 제제, 약물을 수용성 고분자에 결합시킨 프로드럭, 생분해성 고분자를 이용한 나노/마이크로스피어를 이용한 약물 전달체 제조가 시도되고 있다 (S. Freiberg, X.X. Zhu, Int. J. Pharm. 282, 1, 2004).

[0004] 한편, 고령화 사회에 따른 골절, 골다공증, 관절 류머티즘, 허리 통증 등의 골질환 환자가 증가하고 있다. 골조직에서는, 골 형성을 담당하는 골아세포(osteoblast)와, 골 흡수를 담당하는 파골세포(osteoclast)가 협조하여 활동하여, 골 형성과 골 흡수를 균형있게 유지하는 것에 의해, 골조직의 기능을 유지하고 있다. 이 골대사의 균형이, 노화나 난소 기능의 저하 등의 요인에 의해서 무너져 골 형성이 저하되면 골의 양(골밀도)이 감소하여 여러가지 골 질환이 생긴다. 이러한 골 질환으로서, 골절, 골결손, 골다공증, 골연화증, 허리 통증, 골페젯트병, 경직성 척수염, 관절 류머티즘, 변형성 관절증 등이 알려져 있다.

[0005] 이러한 골 질환에 대해 정형외과 분야에서는 침습적 수술 방식으로 치료가 이루어져왔으나, 개복 수술의 경우 감염이나 거부반응 등을 일으키는 부작용을 보이며, 환자의 불쾌감과 높은 비용으로 인한 한계점을 보여왔다. 이에 최근에는 비 침습적 또는 최소 침습 수술에 대한 새로운 접근 방식과 절차가 대두되기 시작하였으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) S. Freiberg, X.X. Zhu, Int. J. Pharm. 282, 1, 2004

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 골 질환 환자의 거부반응을 최소화시키면서도 지속적으로 치료 효과를 보이는 골 형성 약물의 전달체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다공성 고분자 미립자와 상기 미립자의 표면에 고정된 골 형성 촉진물질을 포함하며, 상기 미립자는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면이 개질된 골 형성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0009] 일 구현예는 미립자의 크기가 200 내지 1000 um이며, 10 내지 100um 크기의 구멍이 형성된 것일 수 있다.

[0010] 다른 일 구현예는 고분자가 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있다.

[0011] 또 다른 일 구현예는 골 형성 촉진 물질은 골 형성 성장인자 또는 골 형성 화합물인 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 골 형성 성장인자는 골 형성 단백질(BMP, bone morphogenic protein), 혈소판 유래 증식인자(PDGF, Platelet derived growth factor), 형질전환 성장인자-베타(TGF-beta, Transforming growth factor-beta), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF, basic fibroblast growth factor), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1, Insulin like growth factor 1), 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고, 골 형성 화합물은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin), 프로스타글란틴 E2(PGE2, Prostaglandin E2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0012] 또 다른 일 구현예는 골 형성 성장 인자가 1pg/ml 내지 3 mg/ml 농도로 포함되며, 상기 골 형성 화합물은 1ng/ml 내지 500mg/ml 농도로 포함되는 것일 수 있다.

[0013] 또 다른 일 구현예는 생체적합성 고분자가 헤파린(Heparin), 헤파란설페이트(Heparansulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산[Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산[Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산[Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen) 및 키토산(Chitosan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0014] 또 다른 일 구현예는 카테콜 작용기를 함유하는 화합물이 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벨질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine), 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid) 및 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0015] 또 다른 일 구현예는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는 생체적합성 고분자의 아민그룹 또는 카르복시그룹의 작용기; 및 카테콜 작용기를 포함하는 화합물의 아민그룹, 카르복시그룹 또는 알데히드 작용기에서 선택된 작용기와의 결합에 의하여 형성되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 개복할 필요 없이 주사 등을 통해 직접적으로 골 부분에 주입됨으로써 거부반응을 최소화 시킬 수 있고 빠르게 치료효과를 볼 수 있다. 또한 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 약물이 지속적으로 방출되어 투여회수를 줄일 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 실시예 1에 따른 다공성 고분자 미립자에 알렌드로네이트를 코팅하는 과정의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 실험예 1에 따른 주사전자현미경의 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 X-선 광전자 분광기를 이용하여 표면 원소 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 X-선 광전자 분광기를 이용하여 표면 원소 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 시간에 따른 알렌드로네이트의 방출된 양을 나타낸 것이다.

도 6은 시간에 따른 BMP-2의 방출된 양을 나타낸 것이다.

도 7은 시간에 따른 미립자에서 배양한 조골세포의 세포증식 결과를 흡광도로 나타낸 것이다.

도 8은 시간에 따른 조골세포의 분화를 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도로 나타낸 것이다.

도 9는 시간에 따른 조골세포의 분화를 후기분화 마커인 알칼리성 칼슘 침착 정도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 미립자는 다공성 구조를 가짐으로써 실제 크기에 비해 공기 역학적 크기가 작아 약물 전달 측면에서 대식세포에 의한 식세포작용을 최소화하고 침적 효율을 극대화시킬 수 있으며, 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면을 개질함으로써 약물을 지속적으로 방출시킬 수 있는 효과를 갖는 것이 특징이다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 다공성 고분자 미립자와 상기 미립자의 표면에 고정된 골 형성 촉진물질을 포함하며, 상기 미립자는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면이 개질된 골 형성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 미립자의 크기는 마이크로미터(um)단위에서 적절히 조절될 수 있으나, 바람직하게는 200 내지 1000 um 일 수 있다. 상기 미립자의 크기가 200um 미만이면 구멍이 상대적으로 작아져 세포가 구멍으로 들어가는데 어려울 수 있으며, 1000um 초과하면 형태유지가 어려울 수 있다.

[0022] 상기 미립자는 다공성을 갖는 것이 특징이며, 다공성의 구조를 가짐으로써 실제 크기에 비해 공기 역학적 크기가 작아 약물 전달 측면에서 대식세포에 의한 식세포작용을 최소화하고 침적 효율을 극대화시킬 수 있다. 미립자의 구멍의 크기는 발명의 목적에 따라 적절히 조절될 수 있으나, 바람직하게는 10 내지 100um 일 수 있다. 구멍의 크기가 10um 미만이면 세포가 구멍 안으로 침투하는 것이 어려우며, 100um 초과하면 골 형성 촉진 물질을 주입하는 것에 무리가 있다.

[0023] 상기 다공성 고분자 미립자를 이루는 성분은 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 고분자일 수 있다. 상기 고분자의 평균중량분자량은 30,000 내지 60,000인 것이 바람직하나, 특별히 이에 한정되지 않는다.

[0024] 상기 골 형성 촉진 물질은 골 형성 성장인자 또는 골 형성 화합물일 수 있다.

[0025] 상기 골 형성 촉진 물질 중 골 형성 성장인자로는, 골 형성 단백질(bone morphogenic protein)인 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, BMP-10, BMP-15와 혈소판유래증식인자(PDGF, Platelet derived growth factor), 형질전환성장인자베타(TGF-beta, Transforming growth factor beta), 염기성섬유모세포생장인자(bFGF, basic fibroblast growth factor), 인슐린유사성장인자-1(IGF-1, Insulin like growth factor 1) 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있다.

[0026] 상기 골 형성 화합물은 비스포스포네이트 약물계열인 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate); 스태틴 약물 계열인 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin); 프로스타글란틴 E2(Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이

트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있다.

[0027] 상기 골 형성 인자가 미립자의 표면에 고정화될 수 있는 용량은 1pg/ml 내지 3 mg/ml의 농도범위인 것이 바람직하며, 상기 골 형성 성장인자의 농도가 1pg/ml 미만일 경우에는 골형성 효능이 나타나지 않으며, 3mg/ml를 초과할 경우에는 뼈를 녹이게 하는 부작용 발생이 가능하다.

[0028] 골 융합 및 골 형성을 촉진할 수 있는 골 형성 화합물이 표면에 고정화될 수 있는 용량은 1 ng/ml 내지 500 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하다. 상기 골 형성 성장인자의 농도가 1ng/ml 미만일 경우에는 골 형성 효능이 나타나지 않으며, 500 mg/ml를 초과할 경우에는 뼈를 녹이게 하는 부작용 발생할 수 있다.

[0029] 상기 미립자의 표면 개질에 사용될 수 있는 생체적합성 고분자로, 헤파린(Heparin), 헤파란설페이트(Heparansulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산[Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산 [Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산[Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen) 및 키토산(Chitosan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다. 상기 생체적합성 고분자의 중량평균분자량은 1,800 내지 300,000인 것이 바람직하나, 특별히 이에 한정되지 않는다. 또한 상기 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는 상기 생체적합성 고분자 1몰에 대하여 상기 카테콜 작용기를 함유하는 화합물 3 내지 25몰로 결합되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 상기 생체적합성 고분자가 미립자의 표면에 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명에서는 실질적으로 모든 종류의 무기 및 유기 기판에 접착할 수 있는 부착유기물을 갖는 홍합(Mussel)의 접착 특성을 이용하였다. 홍합의 강력한 접착 특성은 플라크-기판 접면 근처에서 발견되는 3,4-다이하이드록시-L-페닐알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, DOPA) 및 라이신 아미노산이 풍부한 단백질의 아미노산에서 기인하는 것으로 보여진다. 상기 DOPA는 접착물질의 고화를 초래하는 반응에 관여할 뿐만 아니라, 기판과 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성한다. 특히, DOPA 구조식 중에 카테콜(catechol)이라 불리는 오르소-다이하이드록시페닐(ortho-dihydroxyphenyl)의 작용기가 기판과 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 본 발명에서는 상기 생체적합성 고분자를 미립자 표면에 결합을 하기 위해서, 카테콜 작용기를 함유하는 화합물을 이용하였다. 상기 카테콜 작용기를 함유하는 화합물은 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벨질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine), 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid) 및 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0031] 상기 생체적합성 고분자를 카테콜 작용기를 함유하는 화합물을 이용하여 미립자의 표면에 결합시켜, 미립자의 표면을 활성화 또는 기능화시키는 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는, 생체적합성 고분자와 카테콜 작용기를 함유하는 화합물에 가교제(crosslinker)를 사용함으로서 제조할 수 있다.

[0032] 상기 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물의 복합체는 상기 고분자의 아민그룹 또는 카르복시그룹의 작용기; 및 카테콜 작용기를 포함하는 화합물의 아민그룹, 카르복시그룹 또는 알데히드 작용기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 작용기와의 화학적으로 결합할 수 있는 조합에 의하여 형성되는 것이 바람직하며, 이에 따라 제조된 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물의 복합체를 이용하여 미립자의 표면을 개질할 수 있다.

[0033] 상기 생체적합성 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물의 복합체는 다음과 같은 조합에 의하여 제조되는 것이 보다 바람직하다. 예를 들면, 카르복시 그룹의 작용기를 가지고 있는 고분자인 헤파린 (Heparin), 헤파란설페이트 (Heparansulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산 [Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산 [Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산 [Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen)은 아민그룹의 작용기를 갖는 카테콜을 함유하는 화합물인 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벤질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine)과 다양한 조합을 통하여 생체적합성 고분자-카테콜을 함유하는 화합물 복합체를 제조할 수 있다. 또한, 아민 그룹의 작용기를 갖는 고분자인 젤라틴 (Gelatin), 콜라젠(Collagen), 키토산(Chitosan) 및 그의 유도체, 글라이콜키토산(Glycol chitosan), 폴리-L-라이신 (Poly-L-lysine), 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine), 덴드리머(Dendrimer)는 카르복시 작용기 또는 알데히드 작용기를 갖는 카테콜 함유 화합물인 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4-

dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid), 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)와 다양한 조합을 통하여 생체적합성 고분자-카테콜을 함유하는 화합물 복합체를 제조할 수 있다. 하기 표 1은, 생체적합성 고분자와 카테콜 함유하는 화합물의 다양한 조합을 통하여 얻어질 수 있는 생체적합성 고분자-카테콜을 함유하는 복합체의 예를 제공하고 있다.

[0034]

표 1

생체적합성 고분자	결합 가능한 카테콜 작용기 함유 화합물	제조 가능한 생체적합성 고분자-카테콜 작용기 함유 화합물 복합체
Heparin (Hep)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- Hep-DOPA - Hep-DOPAm - Hep-DHBA - Hep-NENP
Heparin sulfate (HS)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- HS-DOPA - HS-DOPAm - HS-DHBA - HS-NENP
Hyaluronic acid (HA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- HA-DOPA - HA-DOPAm - HA-DHBA - HA-NENP
Alginate (AG)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- AG-DOPA - AG-DOPAm - AG-DHBA - AG-NENP
Polyaspartic acid (PAA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PAA-DOPA - PAA-DOPAm - PAA-DHBA - PAA-NENP
Polyacrylic acid (PAcA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PAcA-DOPA - PAcA-DOPAm - PAcA-DHBA - PAcA-NENP
Polyglutamic acid (PGA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PGA-DOPA - PGA-DOPAm - PGA-DHBA - PGA-NENP
Carboxymethyl cellulose (CMC)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- CMC-DOPA - CMC-DOPAm - CMC-DHBA - CMC-NENP
Gelatin (Gel)	- 3,4dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP) - 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAI) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxypenylacetic acid (DHPA)	- Gel-DOPA - Gel-DOPAm - Gel-DHBA - Gel-NENP - Gel-DHBAI - Gel-DHBAc - Gel-CFA - Gel-DHPA

Collagen (Col)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP) - 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Col-DOPA - Col-DOPAm - Col-DHBA - Col-NENP - Col-DHBAl - Col-DHBAc - Col-CFA - Col-DHPA
Chitosan (Chi)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Chi-DHBAl - Chi-DHBAc - Chi-CFA - Chi-DHPA
Glycol chitosan (GC)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- GC-DHBAl - GC-DHBAc - GC-CFA - GC-DHPA
Poly-L-Lysine (PLL)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- PLL-DHBAl - PLL-DHBAc - PLL-CFA - PLL-DHPA
Polyethyleneimine (PEI)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- PEI-DHBAl - PEI-DHBAc - PEI-CFA - PEI-DHPA
Dendrimer (Den)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Den-DHBAl - Den-DHBAc - Den-CFA - Den-DHPA

[0035] 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 등에 사용될 수 있으며, 구체적으로 골절, 골결손, 골다공증, 골연화증, 허리 통증, 골페젯트병, 경직성 척수염, 관절 류머티즘, 변형성 괄절증 들에 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물은 사람을 포함하는 포유동물에 비경구 투여를 포함한 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적으로, 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예를 이용하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 다양하게 수정 및 변경될 수 있다.

[0039] **실시예 1. 알렌드로네이트가 고정된 다공성 고분자 미립자의 제조**

[0040] **1.1. 재료**

[0041] 실험에 사용된 물질 및 입수처는 다음과 같다:

[0042] PLGA(D, L-lactic-co-glycolic acid, 50:50, 분자량: 30,000~60,000) (Sigma-Aldrich), 폴리(비닐알코올) (분자량: 13,000~23,000, 98% hydrolyzed) (Sigma-Aldrich), DCM (dichloromethane) (JUNSEI), 겔라틴(gelatin) (Sigma-Aldrich), 알렌드로네이트 (Alendronate), 도파민(Dopamine), 헤파린(Heparin), 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide), N-하이드로숙시니미드(NHS: N-hydrosuccinimide).

[0043] 세포 배양에 대한 연구는 rSVF(Primary culture)을 대상으로 실시하였다. 사용된 용액은 DMEM(Dulbecco`s modified Eagle`s medium)에 FBS(fetal bovine serum) (10% v/v)과 PS(페니실린/스트렙토마이신) (1% v/v)를 첨가하여 제조하였다. 세포 분화를 위해서 100킅의 덱사메타손(dexamethasone), 1M의 베타 글리세로포스페이트(β-glycerophosphate), 및 50mM의 아스코브르브산(ascorbic acid)를 첨가하였다.

[0044] **1.2 다공성 고분자 미립자의 제조**

[0045] W/O/W 에멀젼 방식을 이용하여 다공성 PLGA 미립자를 제조하였다. 구체적으로는, DCM에 용해된 PLGA와 증류수에 용해된 겔라틴을 7:3 (PLGA:gelatin) 비율로 하여 균질기(homogenizer)를 사용하여 13,500 rpm, 1분 조건에서 균질화하여 상분리를 하였으며, 플루이딕 디바이스(fluidic device)를 이용하여 PVA 용액을 첨가한 후, 증류수를 첨가하고 온도를 높여(40℃ 조건) 안에 있던 겔라틴을 빼냄으로써 다공성 고분자 미립자를 제조하였다.

[0046] **1.3 다공성 고분자 미립자에 알렌드로네이트 코팅**

[0047] 상기 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자를 2mg/ml의 농도로 도파민이 용해되어 있는 10 mM Tris 버퍼(pH 8.0)에 넣고, 빛을 차단한 후 24시간 동안 교반하였으며, 증류수로 3~4회 세척한 후 건조시켜 도파민으로 표면이 개질된 다공성 PLGA 미립자를 제조하였다.

[0048] 이후, 상기 도파민으로 표면이 개질된 다공성 PLGA 미립자를 2mg/ml의 헤파린(heparin), 0.59 mg/ml의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 (EDC; 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide), 및 0.18 mg/ml의 N-하이드로숙시니미드 (NHS; N-hydrosuccinimide)을 0.1 M MES buffer (pH 4.5)에 녹여 30분간 반응시킨 용액에 넣은 후 24시간동안 교반하였으며, 증류수로 3~4회 세척한 후 건조시켜 헤파린으로 표면이 개질된 다공성 PLGA 미립자를 제조하였다.

[0049] 이후, 상기 헤파린으로 표면이 개질된 다공성 PLGA 미립자를 각각 알렌드로네이트 1mg이 용해된 0.1 M MES buffer(pH 5.6)와 알렌드로네이트 5mg이 용해된 0.1 M MES buffer(pH 5.6)에 넣고 24시간동안 교반하였으며, 증류수로 3~4회 세척한 후 건조시켜 1mg 및 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 제조하였다(도 1).

[0050] **실시예 2. BMP-2가 고정된 다공성 고분자 미립자의 제조**

[0051] 비스포네이트 약물계열인 알렌드로네이트 대신에 골 형성 단백질인 BMP-2(bone morphogenic protein-2) 500ng을 고정한 것 이외에는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하여 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 제조하였다.

[0052] **실험예 1. 다공성 고분자 미립자의 표면 관찰**

[0053] **1.1 주사전자현미경의 관찰**

[0054] 상기 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자와 상기 실시예 1.3에서 제조된 1mg 및 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 주사전자현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0055] 도 2는 주사전자현미경 관찰 결과를 나타낸 것으로, 왼쪽은 다공성 PLFA 미립자를, 중앙은 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를, 오른쪽은 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자이다.

[0056] 도 2에 나타난 바와 같이, 다공성 PLGA 미립자와 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 모두 비슷한 표면 형상을 보였다.

[0057] **1.2 X-선 광전자 분광기 분석**

[0058] 상기 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, 상기 실시예 1.3에 기재된 도파민으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자, 상기 실시예 1.3에 기재된 헤파린으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자, 및 상기 실시예 1.3에서 제조된 1mg 및 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 X-선 광전자 분광기를 이용하여 표면 원소 분석을 하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0059] 도 3은 X-선 광전자 분광기를 이용하여 표면 원소 분석한 결과를 나타낸 것으로, a는 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, b는 상기 실시예 1.3에 기재된 도파민으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자, c는 상기 실시예 1.3에 기재된 헤파린으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자, d는 상기 실시예 1.3에서 제조된 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, e는 상기 실시예 1.3에서 제도된 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 나타내며, Binding energy는 원소가 나올 때의 에너지를 의미하고, Intensity는 빛의 강도를 의미한다. 또한, 도 3에 기재된 C1s, N1s, O1s, S2p는 각각의 원소를 의미한다.

[0060] 도 3에 나타난 바와 같이, 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 다공성 PLGA 미립자에 비해 질소성분이 1.9%증가하였고, 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 다공성 PLGA 미립자에 비해 질소성분이 1.1% 증가한 것을 확인하였다. 이는 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자가 성공적으로 표면이 개질되었음을 보여준다.

[0061] 또한, 상기와 동일한 방법으로 상기 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, 헤파린으로 표면 개질하지 않고 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자, 실시예 1.3에 기재된 헤파린으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자, 및 상기 실시예 2에서 제조된 500ng의 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자의 표면 원소 분석을 하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0062] 도 4는 X-선 광전자 분광기를 이용하여 표면 원소 분석한 결과를 나타낸 것으로, 각각의 다공성 PLGA 미립자의 a는 다공성 PLGA 미립자(PLGA microsphere(PMS)), b는 헤파린으로 표면 개질하지 않고 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자(Heparin-PMS), c는 헤파린으로 표면 개질된 다공성 PLGA 미립자(BMP-2(500ng)-PMS), d는 500ng의 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자(BMP-2(500ng)/Hep-PMS)를 나타낸다.

[0063] 도 4에 나타난 바와 같이, 500ng의 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 다공성 PLGA 미립자와 비교하여 2.3%의 질소 성분이 증가한 것과 2.2%의 황 성분의 증가한 것을 확인하였다. 이는 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자가 성공적으로 표면이 개질되었음을 보여준다.

[0064] **실험예 2. 약물 방출 실험**

[0065] **2.1 알렌드로네이트의 방출 실험**

[0066] 상기 실시예 1.3에서 제조된 1mg 및 5mg의 알렌드로네이트 고정된 다공성 PLGA 미립자를 1 ml의 PBS 버퍼 (pH 7.4)에 넣고 37℃에서 100 rpm으로 교반을 하였다. 이 후 1시간, 3시간, 6시간, 10시간, 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일 및 28일 간격으로 방출된 알렌드로네이트의 양을 측정하였으며, 알렌드로네이트의 양은 Freric chloride solution(염화제2철을 가지고 만든 용액)을 사용하여 593nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0067] 도 5는 시간(Time(Day))에 따른 알렌드로네이트의 방출된 양(Alendronate Cumulative Release)을 나타낸 것이다.

[0068] 도 5에 나타난 바와 같이, 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 4주 동안 지속적으로 방출되는 것을

확인하였다.

[0069] **2.2 BMP-2의 방출 실험**

[0070] 상기 실시예 2에서 제조된 200ng의 BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자와 헤파린으로 표면개질하지 않고 200ng BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 1 ml의 PBS 버퍼 (pH 7.4)에 넣고 37℃에서 100 rpm으로 교반을 하였다. 이 후 1시간, 3시간, 6시간, 10시간, 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일 및 28일 간격으로 방출된 BMP-2의 양을 측정하였으며, BMP-2의 양은 ELISA 키트 (Human BMP-2 Mini ELISA Development Kit (900-M255), Peprotech, 미국)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0071] 도 6은 시간(Time(Day))에 따른 BMP-2의 방출된 양(BMP-2 Cumulative Release)을 나타낸 것이다.

[0072] 도 6에 나타난 바와 같이, BMP-2가 고정된 다공성 PLGA 미립자는 4주 동안 지속적으로 방출되는 것을 확인하였다.

[0073] **실험예 3. 세포 증식**

[0074] 1×10^5 개의 조골세포(rSVF)를 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, 3mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자에 조심스럽게 넣고, 1일, 3일, 7일을 배양한 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하였다. 세척 후, CCK-8 증식 키트 시약(Tetrazolium salt 시약, Cell Counting kit-8, Dojindo, 미국)을 넣고 1시간 배양한 후에, 배양액을 96 웰 플레이트에 조심스럽게 옮긴 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0075] 도 7은 시간(Time)에 따른 미립자에서 배양한 조골세포의 세포증식 결과를 흡광도(Absorbance)로 나타낸 것으로, PMS는 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, Aln(1mg)/PMS는 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, Aln(5mg)/PMS는 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 각각 나타낸다.

[0076] 도 7에 나타난 바와 같이, 시간이 경과함에 따라 조골세포가 활발하게 증식되는 것을 확인하였으며, 특히 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자에서의 조골세포가 활발하게 증식되는 것을 확인하였다.

[0077] **실험예 4. 알칼리성 포스파타제 활성도**

[0078] 1×10^5 개의 조골세포(rSVF)를 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, 3mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자에 조심스럽게 넣고 3일, 7일, 10일을 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, 1×RIPA 버퍼를 세포에 넣어 0℃에서 110와트로 1분 동안 초음파를 가하였고, 용해된 세포를 4℃에서 3분 동안 13,500 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상층액을 p-니트로페닐포스파테이트 용액과 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 500 ㎕의 1 N NaOH로 반응을 종결시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 알칼리성 포스파타제 활성도를 분석하였고(standard 데이터를 근거로 결과 값을 얻은 후 프로테인 값에서 알칼리성 포스파타제 정량 값을 나누어 알칼리성 포스파타제 값을 구하였다), 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0079] 도 8은 시간(Time)에 따른 조골세포의 분화를 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도(ALP Activity)로 나타낸 것으로, PMS는 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, Aln(1mg)/PMS는 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, Aln(5mg)/PMS는 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 각각 나타낸다.

[0080] 도 8에 나타난 바와 같이, 다공성 PLGA 미립자에 비해 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자가 현저하게 알칼리성 포스파타제 활성도가 높은 것을 확인하였다.

[0081] **실험예 5. 칼슘 침착 분석**

[0082] 1×10^5 개의 조골세포(rSVF)를 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, 3mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자에 조심스럽게 넣고 21일 동안 배양하였

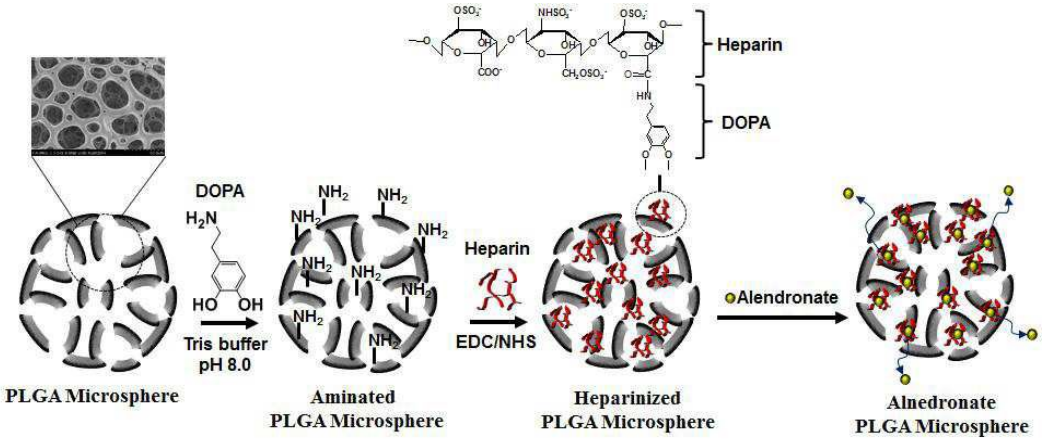
다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 각각의 PCL 파이퍼로부터 세포를 조심스럽게 떼어내었다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, 0.1% 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣었다. 세포의 막을 분쇄시키기 위해 0℃에서 약 1분 동안 초음파를 가한 후, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 QuantiChrom TM Calcium Assay 키트를 이용하여 612nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0083] 도 9는 시간(Time)에 따른 조골세포의 분화를 후기분화 마커인 알칼리성 칼슘 침착 정도(Calcium content)로 나타낸 것으로, PMS는 실시예 1.2에서 제조된 다공성 PLGA 미립자, Aln(1mg)/PMS는 1mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자, Aln(5mg)/PMS는 5mg의 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자를 각각 나타낸다.

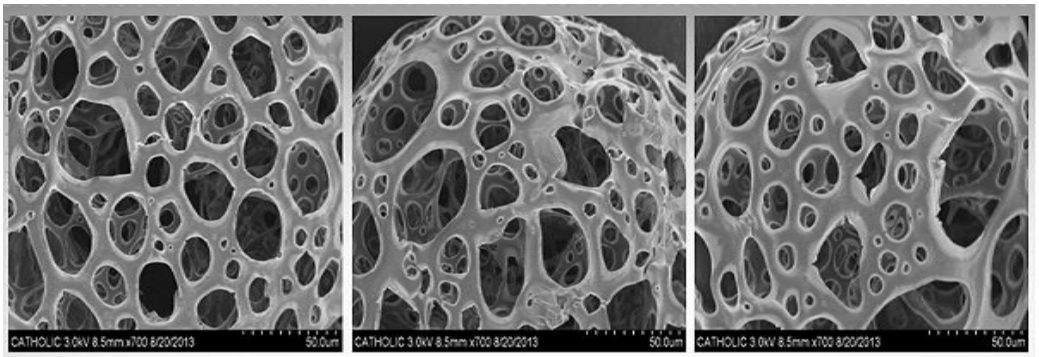
[0084] 도 9에 나타난 바와 같이, 다공성 PLGA 미립자에 비해 알렌드로네이트가 고정된 다공성 PLGA 미립자가 현저하게 칼슘 침착 정도가 높은 것을 확인하였다.

도면

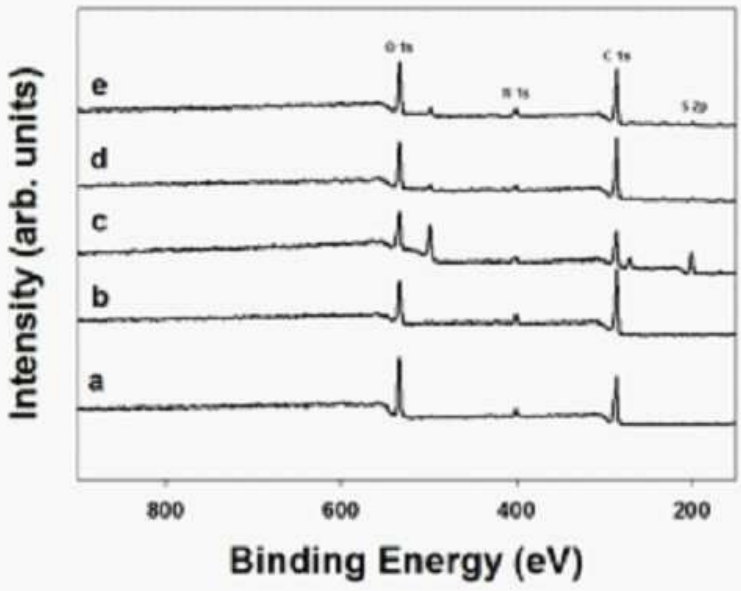
도면1



도면2

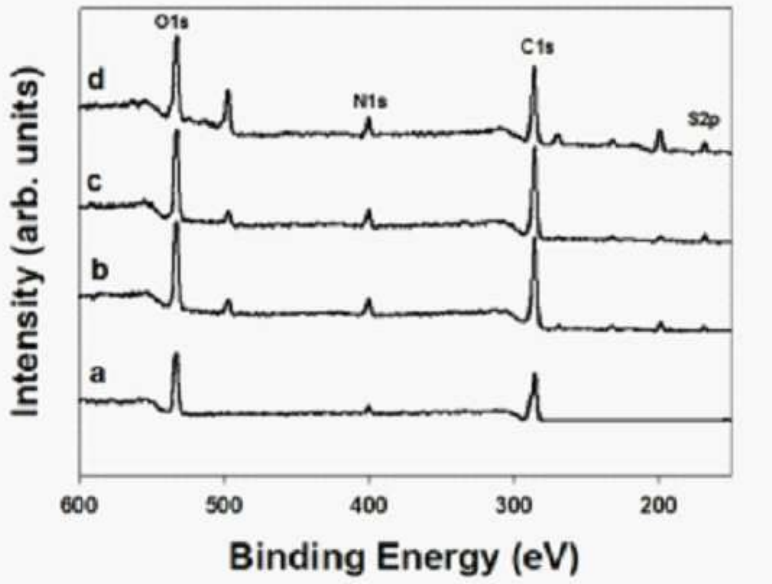


도면3



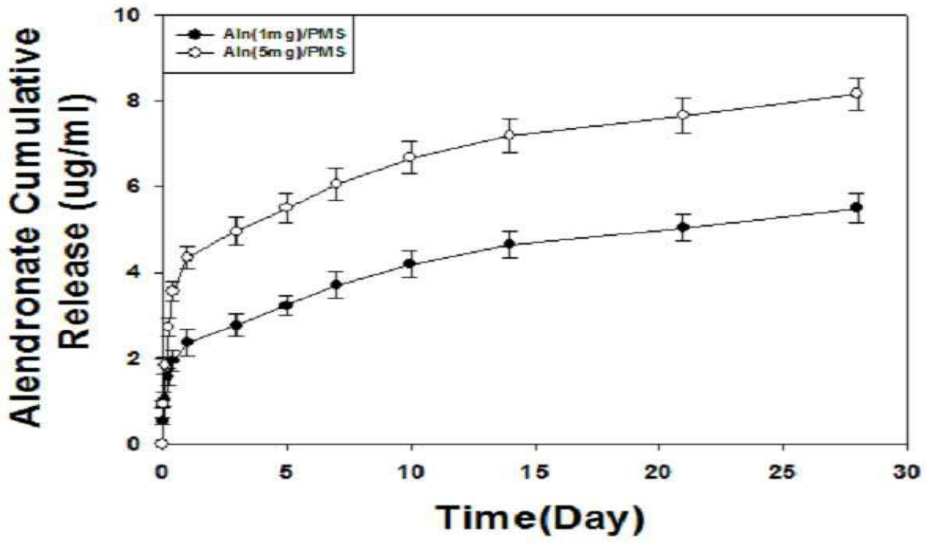
	C1s (%)	N1s (%)	O1s (%)	S2p (%)
PLGA microsphere(PMS)	66.8	3.8	29.3	-
Dopamine-PMS	73.9	6.3	19.8	-
Heparin-PMS	66.4	5.0	25.7	3.0
Aln(1mg)/Hep-PMS	70.8	5.7	21.8	1.7
Aln(5mg)/Hep-PMS	69.1	4.9	24.0	2.1

도면4

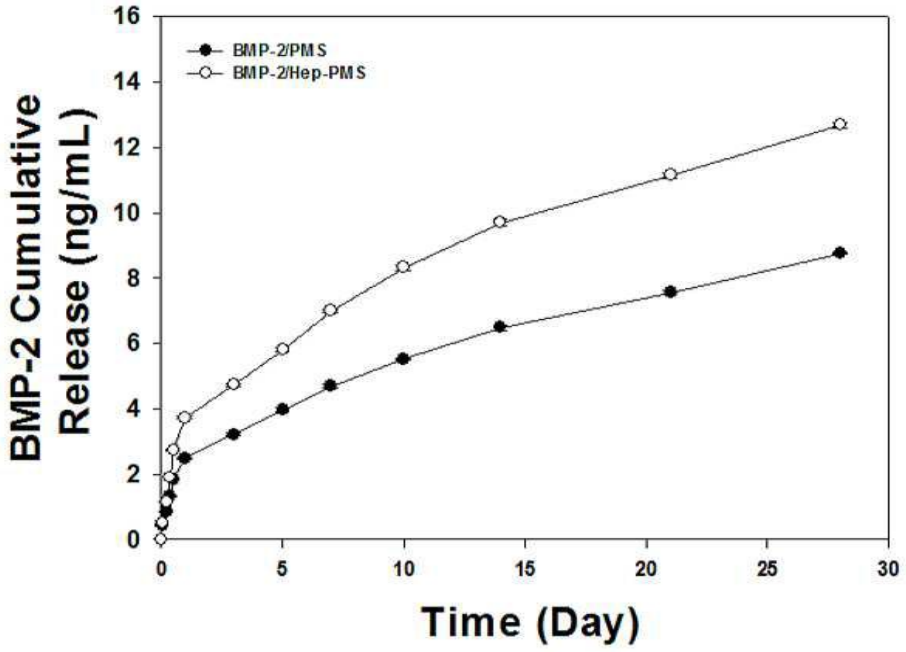


	C1s (%)	N1s (%)	O1s (%)	S2p (%)
PLGA microsphere(PMS)	66.8	3.8	29.3	-
Heparin-PMS	67.7	7.2	22.8	2.3
BMP-2(500ng)-PMS	66.5	6.6	24.1	2.7
BMP-2(500ng)/Hep-PMS	68.4	6.1	23.3	2.2

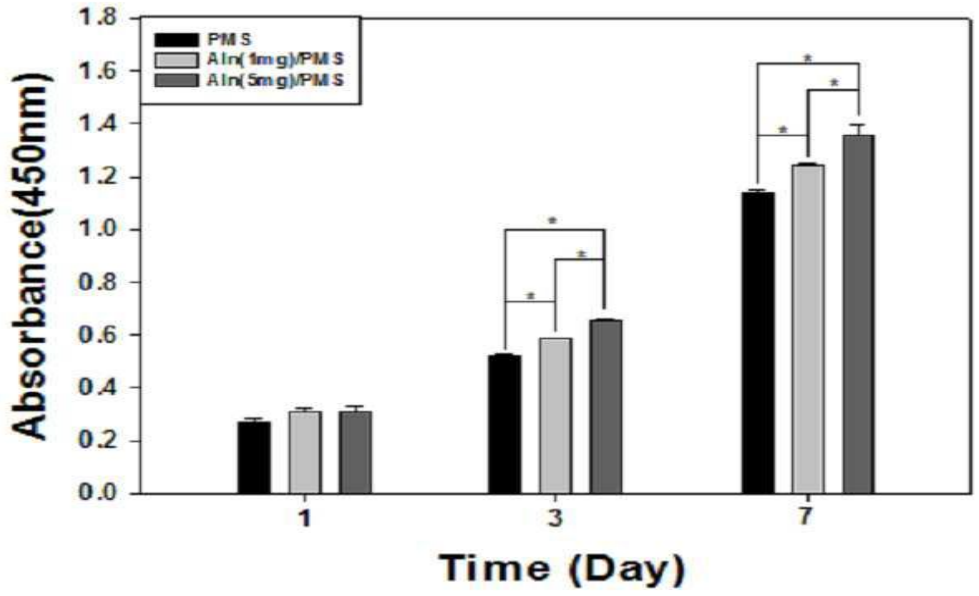
도면5



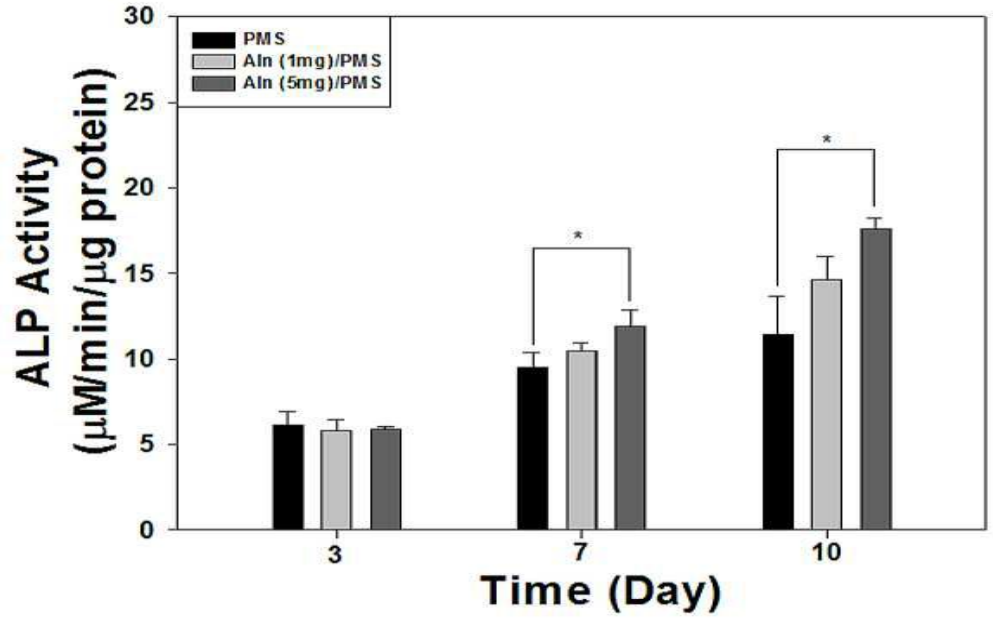
도면6


BMP-2/PMS
BMP-2/Hep-PMS
BMP-2 Cumulative Release (ng/mL)
Time (Day)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
5
10
15
20
25
30

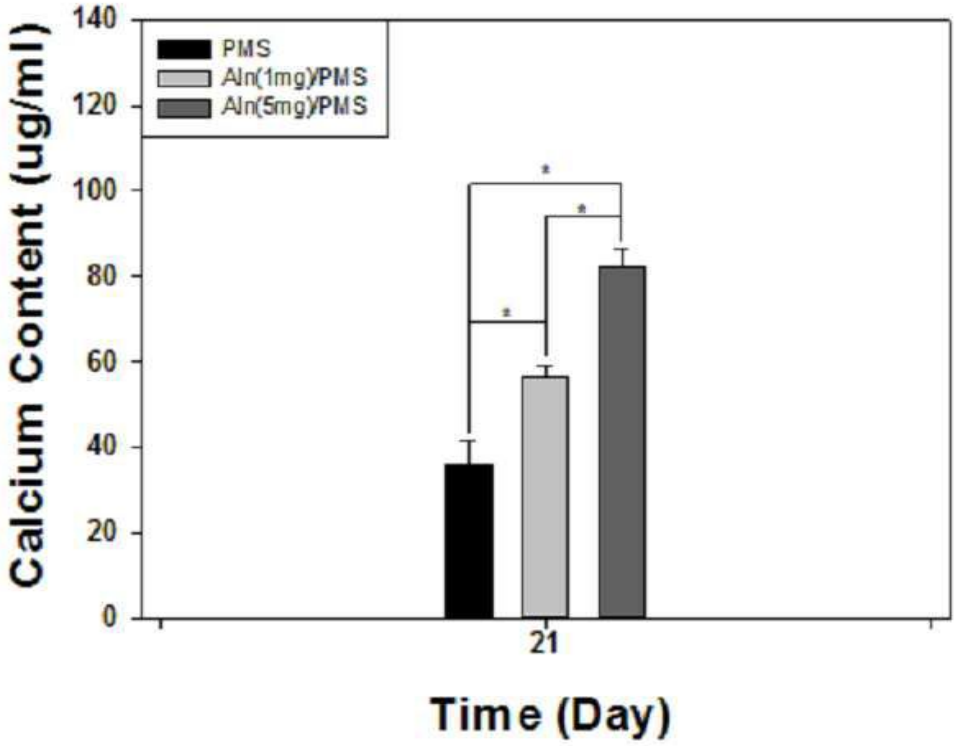
도면7


PMS
Aln(1mg)/PMS
Aln(5mg)/PMS
Absorbance(450nm)
Time (Day)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
1
3
7
*

도면8


PMS
AIn (1mg)/PMS
AIn (5mg)/PMS
ALP Activity
(μM/min/μg protein)
30
25
20
15
10
5
0
3
7
10
Time (Day)
*
*

도면9


PMS
AIn(1mg)/PMS
AIn(5mg)/PMS
Calcium Content (ug/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
21
Time (Day)
*
*
*