(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0067269
(43) 공개일자 2016년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01) *A61L 27/54* (2006.01)
A61Q 19/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0172116
(22) 출원일자 2014년12월03일
심사청구일자 2014년12월03일

(71) 출원인
한국기계연구원
대전광역시 유성구 가정북로 156 (장동)
(72) 발명자
윤희숙
경남 창원시 진해구 경화로21번길 37, 701 (경화동)
가리마 트리파시
경상남도 창원시 창원대로 797 기숙사
(74) 대리인
이원희

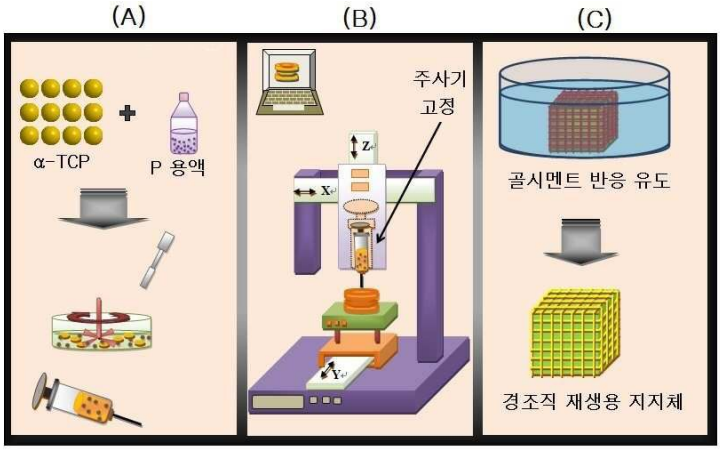
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **골다공증 치료용 유효성분을 함유하는 경조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 골다공증 치료용 유효성분을 함유하는 경조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체는 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 대신 폴리페놀계 천연유래 물질을 사용하여 부작용에 대한 염려가 적으며, 조골세포 거동을 촉진시키고 동시에 파골세포 거동을 억제하여 지지체의 골재생 효능 향상이 기대되는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 상온에서 지지체에 균일하게 도입하여 골형성 유효성분이 서방형으로 장시간 방출되는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



P 용액 : 30% 에탄올에 용해된 1% 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 및 쿼세틴 혼합물 용액
α-TCP : α-트리칼슘 포스페이트 (α-Tricalcium phosphate)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PNK3710
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 산업기술연구회
연구사업명 주요사업
연구과제명 퇴행성 골질환 대응 융복합 소재기술 개발
기 여 율 70/100
주관기관 한국기계연구원 부설 재료연구소
연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0017572
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 생체세라믹소재 기술기반 경조직 재생용 3차원 지지체 개발
기 여 율 30/100
주관기관 한국기계연구원 부설 재료연구소
연구기간 2013.05.01 ~ 2015.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 포함하는 경조직 재생용 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 골다공증 치료용 유효성분은 폴리페놀계 천연유래 물질 또는 비스포스포네이트계 약물인 것을 특징으로 하는 경조직 재생용 지지체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폴리페놀계 천연유래 물질은 퀘세틴(Quercetein), 제네스테인(Genistein), 커큐민(Curcumin), 사우로락탐(Saurolactam), 사우치논(Sauchinone), 바이카린(Baicalin), 다이드제인(Daidzein), 루틴(Rutin), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 피세틴(Fisetin), 이카린(Icariin), 캠퍼롤(Kaempferol), 코리아눔 나케이(E. Koreanum Nakei) 및 이쿠올(Equol)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 경조직 재생용 지지체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 비스포스포네이트계 약물은 알렌드로네이트(alendronate), 리세드로네이트(risedronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 네리드로네이트(neridronate), 이반드로네이트(ibandronate), 졸레드로네이트(zoledronate) 및 올파드로네이트(olpadronate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 경조직 재생용 지지체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인산칼슘계 세라믹은 α-TCP(α-Tricalcium phosphate), β-TCP(β-Tricalcium phosphate), 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite), DCPD(Dicalcium phosphate dihydrate), MCPM(Monocalcium phosphate monohydrate), DCPA(Dicalcium phosphate anhydrous) 및 ACP(Amorphous calcium phosphate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 경조직 재생용 지지체.

청구항 6

용매, 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 볼 밀(ball mill) 장치를 사용하여 분쇄 및 혼합한 후, 건조하여 분말 혼합물을 준비하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 준비한 분말 혼합물을 용매와 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 제1항의 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단계 1 및 상기 단계 2의 용매는 독립적으로 탈이온수, PBS(phosphate buffered saline), 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 에틸에테르, 1,2-디메톡시에탄, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄 및 디클로로에탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 단계 2의 용매는 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose), 젤라틴, 콜라겐 및 알지네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 점증제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 단계 3의 3차원 지지체는 첨삭가공공정법(additive manufacturing method)으로 성형되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 단계 4의 경화액은 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate), H_2O, PBS(Phosphate buffer saline), DAHP(Diammonium hydrogen phosphate), $NH_4H_2PO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4 및 NaH_2PO_4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

인산칼슘계 세라믹을 분쇄하여 인산칼슘계 세라믹 분말을 준비하는 단계(단계 1);

골다공증 치료용 유효성분 및 상기 단계 1에서 준비한 인산칼슘계 세라믹 분말을 용매 내에서 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 제1항의 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 단계 2의 용매는 탈이온수, PBS(phosphate buffered saline), 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 에틸에테르, 1,2-디메톡시에탄, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄 및 디클로로에탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 단계 2의 용매는 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose), 젤라틴, 콜라겐 및 알지네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 점증제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 단계 3의 3차원 지지체는 첨삭가공공정법(additive manufacturing method)으로 성형되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 단계 4의 경화액은 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate), H_2O, PBS(Phosphate buffer saline), DAHP(Diammonium hydrogen phosphate), $NH_4H_2PO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4 및 NaH_2PO_4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골다공증 치료용 유효성분을 함유하는 경조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 급속한 경제성장과 의료기술의 발전으로 평균 기대수명은 예전에 비해 현저히 증가하였으며, 그 결과 노령인구의 급격한 증가로 골다공증을 비롯한 여러 퇴행성 골질환의 유병율도 함께 늘어나고 있다. 골다공증은 골절 등 다양한 골결손을 유발하는 원인이며 치료를 위해 골충진재, 골접합재, 임플란트 및 골지지체 등의 골이식재를 필요로 한다. 하지만 골다공증 환자는 정상인에 비해 골밀도, 골량 및 골질이 매우 떨어지며 이로 인해 일반적인 골지지체를 포함한 골이식재를 삽입할 경우 이식재와의 물성차이에 의한 2차적인 골손상을 유발할 수 있어 골다공증 환자 맞춤형의 소재개발을 필요로 한다. 특히, 신체의 자가복구기능을 통해 손실된 조직을 재생시키기 위하여 지지체를 사용할 수 있으며, 조직과 조직을 이어주는 다리와 같은 역할을 하는 지지체의 경우, 뼈의 재생속도에 맞추어 분해되도록 설계되어야한다. 즉, 뼈의 재생속도가 지지체의 분해속도보다 빠른 경우 지지체가 뼈의 재생을 방해하는 요소가 되며, 뼈의 재생속도가 지지체의 분해속도보다 늦은 경우 뼈가 재생되기 전에 지지체가 분해되므로 충분한 지지체 사용 효과를 기대할 수 없다.

[0003]

[0004] 한편, 골다공증 환자는 일반적으로 정상인에 비해 뼈를 만드는 조골세포의 활성이 뼈를 흡수하는 파골세포의 활성에 비해 떨어진다. 따라서 정상인을 대상으로 개발된 골지지체를 그대로 사용할 수 없으며 충분한 지지체의

효과를 노리기 위해서는 이식부위의 조골세포의 활성을 높여주고 파골세포의 활성을 억제해주는 효과를 지지체에 부가해 줄 필요가 있다.

[0005] 현재 의료용으로 사용되고 있는 골다공증 치료제로는 크게 골 흡수 억제제와 골형성 촉진제로 분류된다. 골흡수 억제제는 비스포스포네이트계, 여성호르몬 (에스트로겐), 여성호르몬 수용체 변형제, 칼시토닌 등이 있다. 이 중에서 비스포스포네이트계 약물이 골다공증 치료의 1차 치료제로 가장 널리 처방되고 있지만 이 약물은 체내에 축적되어 장기간 복용, 혹은 대용량으로 투여 시 대표적으로 하악골 괴사와 같은 심각한 부작용이 수반될 수 있다. 한편, 골형성 촉진제로 골조직의 생성유도에 탁월한 BMP (bone morphogenic proteins) 등의 성장인자의 사용도 고려되고 있으나 대부분 외국에서 유전자 재조합 기술로 생산되며 국내에서 고가로 판매되고 있다. 따라서 골다공증 등으로 인한 골손상 부위에 적용하기 위해서는 그 의료비용 부담이 매우 크다. 한편, 치료제 개념이 아닌 예방 혹은 영양제의 개념으로 여러 가지 식품유래 성분의 효과도 보고되고 있으며 이들은 지속적 경구 섭취를 통해 골다공증을 예방하는 목적으로 사용되고 있다. 젤 혹은 패티형의 골충진재에 상기 골다공증 치료제를 포함시켜 그 효율을 높이고자 하는 연구(특허문헌 1)와 골이식재에 골형성에 긍정적 영향을 미치는 금속이온(아연, 구리, 철, 마그네슘, 은, 스트론튬 등)을 포함시켜 방출시키는 연구가 실시되고 있다. 특히, 세라믹 지지체의 경우 세라믹 제조공정의 특성상 반드시 고온 소결과정을 거쳐야 하며, 이는 열에 약한 약물이나 성장인자 등을 이용할 경우 반드시 소결 후 도입되어야하며 그 방법은 대부분 용액 내 분산시킨 약물이나 성장인자를 지지체 표면에 흡착에 의하여 도입하게 된다. 이는 약물의 초기 급성방출을 야기하고 장시간 서방형으로의 활용을 어렵게 한다. 또한 도입되는 약물의 양도 제한적이다. 따라서 세라믹을 천연 혹은 합성고분자와 혼합하여 사용하거나 세라믹의 경우 고온 열처리에 영향을 받지 않는 금속이온을 도입하는 방법이 일반적이다. 하지만 전자의 경우 충분한 기계적 물성과 생체활성을 기대하기 어려우며, 후자의 경우 충분한 양의 금속이온의 도입이 어렵거나 금속이온의 부작용 유발 등이 지적되고 있다.

[0006] 이를 해결하기 위한 방법의 하나로 특허문헌 2에서는 세라믹 지지체의 실온공정법을 제안하고 있다. 상기 방법을 사용하면 실온에서 세라믹 지지체를 제조할 수 있으므로 열에 약한 약물이나 성장인자 등을 포함한 지지체를 제조할 수 있다. 한편, 일반적으로 골다공증 예방을 목적으로 사용되고 있는 천연유래 물질인 폴리페놀계 성분은 조골세포의 활성을 촉진시키는 효과와 파골세포의 활성을 억제하는 효과가 있음이 알려져 있으나 이는 장기간 경구투여시 기대되는 효과로 알려져 있으며 지지체나 골이식재와의 조합으로 국부적 골재생 효과를 향상시키는 약물로써 도입된 경우는 없다. 하지만 조골세포 및/혹은 파골세포에 효과가 있는 천연유래 물질을 지지체에 균일하게 도입하고 오랜기간 지속적으로 방출시킬 수 있다면 비스포스포네이트 계열, 에스트로겐 및 칼시토닌에서 우려되는 부작용이나 성장인자 등의 높은 비용 및 어려운 처리공정 등을 우려하지 않고 골다공증 환자에 적용가능한 신개념의 골지지체 제조를 기대할 수 있을 것이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 골다공증 환자에 적용가능한 경조직 재생용 지지체에 관하여 연구를 진행하던 중, 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 대신 식품유래 성분을 사용하여 부작용에 대한 염려가 적으며 조골세포 거동을 촉진시키고 파골세포 거동을 억제하여 지지체의 골재생 효능 향상이 기대되는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 대표로하는 폴리페놀계 천연유래 물질을 상온에서 세라믹 지지체 전체에 균일하게 도입하는 공정을 개발하고 골형성 유효성분이 서방형으로 방출되는 경조직 재생용 지지체를 제조하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2010-0026910

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2013-0028406

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 포함하는 경조직 재생용 지지체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 포함하는 경조직 재생용 지지체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 용매, 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 볼 밀(ball mill) 장치를 사용하여 분쇄 및 혼합한 후, 건조하여 분말 혼합물을 준비하는 단계(단계 1);

[0013] 상기 단계 1에서 준비한 분말 혼합물을 용매와 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

[0014] 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

[0015] 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 나아가, 본 발명은 인산칼슘계 세라믹을 분쇄하여 인산칼슘계 세라믹 분말을 준비하는 단계(단계 1);

[0017] 골다공증 치료용 유효성분 및 상기 단계 1에서 준비한 인산칼슘계 세라믹 분말을 용매 내에서 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

[0018] 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

[0019] 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체는 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 대신 폴리페놀계 천연유래 물질을 사용하여 부작용에 대한 염려가 적으며, 조골세포 거동을 촉진시키고 동시에 파골세포 거동을 억제하여 지지체의 골재생 효능 향상이 기대되는 퀴세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 상온에서 지지체에 균일하게 도입하여 골형성 유효성분이 서방형으로 장시간 방출되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 경조직 재생용 지지체의 제조과정을 도식화한 이미지이다.

도 2는 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 퀴세틴 약물의 방출특성을 평가한 그래프이다.

도 3은 실시예 2에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 제네스테인 약물의 방출특성을 평가한 그래프이다.

도 4는 퀴세틴 투여농도에 따른, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 5는 제네스테인 투여농도에 따른, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 6은 동일한 용량의 쿼세틴, 제네스테인 및 알렌드로네이트 투여에 따른 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 7은 경조직 재생용 지지체에 함유된 쿼세틴과 제네스테인의 농도를 변화시킬때, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 8은 동일한 용량의 쿼세틴, 제네스테인 및 알렌드로네이트 투여에 따른 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 9는 경조직 재생용 지지체에 함유된 쿼세틴의 농도를 변화시킬 때, 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 10은 경조직 재생용 지지체에 함유된 제네스테인의 농도를 변화시킬 때, 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

도 11은 쿼세틴 또는 제네스테인을 함유하는 경조직 재생용 지지체가 조골세포의 초기분화에 미치는 영향을 알카린 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)의 활성변화를 통해 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

도 13은 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 Runx2에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

도 14는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

도 15은 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)에 대한 유전자 별현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

도 16는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 오스테오칼신(osteocalcin, OC)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

도 17(a)는 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 알리자린 레드 S(Alizarin red S)가 염색된 것을 나타내는 이미지이다.

도 17(b)는 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 알리자린 레드 S(Alizarin red S)가 염색된 것을 나타내는 이미지이다.

도 18은 실시예 1 단계 1에서 제조한 α-TCP(α-Tricalcium phosphate) 분말 입자크기를 관찰한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 포함하는 경조직 재생용 지지체를 제공한다. 이때, 상기 골다공증 치료용 유효성분은 폴리페놀계 천연유래 물질 또는 비스포스포네이트계 약물인 것을 특징으로 한다.

[0024] 구체적으로, 상기 골다공증 치료용 유효성분은 쿼세틴(Quercetein), 제네스테인(Genistein), 커큐민(Curcumin), 사우로락탐(Saurolactam), 사우치논(Sauchinone), 바이카린(Baicalin), 다이드제인(Daidzein), 루틴(Rutin), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 피세틴(Fisetin), 이카린(Icariin), 캠퍼롤(Kaempferol), 코리아눔 나케이(E. Koreanum Nakei), 이쿠올(Equol) 등의 폴리페놀계 천연유래 물질; 또는 알렌드로네이트(alendronate), 리세드로네이트(risedronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 네리드로네이트(neridronate), 이반드로네이트(ibandronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 올파드로네이트(olpadronate) 등의 비스포스포네이트계 약물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인

(Genistein)을 사용할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 인산칼슘계 세라믹은 α-TCP(α-Tricalcium phosphate), β-TCP(β-Tricalcium phosphate), 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite), DCPD(Dicalcium phosphate dihydrate), MCPM(Monocalcium phosphate monohydrate), DCPA(Dicalcium phosphate anhydrous) 등을 사용할 수 있으며, α-TCP(α-Tricalcium phosphate)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0026] 골다공증 환자에 적용하기 위한 지지체는 고분자 소재를 기반으로 하여 비스포스포네이트계 약물 혹은 성장인자를 포함시키는 방법이 일반적으로 제안되고 있다. 한편 골재생용 지지체는 인체골의 약 70%가 하이드록시카보네이트아파타이트로 대표되는 무기질 성분으로 되어있으므로 세라믹을 기반으로 한 것이 바람직하나 이 경우 세라믹의 특성상 소결공정을 거쳐야 하므로 세라믹 지지체 소결체를 해당 약물이 분산되어 있는 용액에 침적시켜 지지체 표면에 흡착시키는 방법이 제안되고 있다. 하지만, 상기 방법은 지지체 표면에만 약물 또는 성장인자가 흡착되어 있으므로 초기방출량 제어가 어려우며 골이 재생되는 동안 지속적인 작용이 가능한 서방형 지지체로서 사용하기에는 한계가 있다.

[0027] 상기 한계점을 해결하기 위하여, 본 발명에서는 인산칼슘계 세라믹과 골다공증 치료용 유효성분이 균일하게 혼합되어 있는 페이스트를 제조한 후, 이를 지지체로 성형하여 생체 도입시 지지체가 생분해되며 골다공증 치료용 유효성분이 서서히 방출되는 효과가 있는 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0028] 보다 구체적으로, 본 발명은 용매, 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 볼 밀(ball mill) 장치를 사용하여 분쇄 및 혼합한 후, 건조하여 분말 혼합물을 준비하는 단계(단계 1);

[0029] 상기 단계 1에서 준비한 분말 혼합물을 용매와 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

[0030] 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

[0031] 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0032] 이하, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0033] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 용매, 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹을 볼 밀(ball mill) 장치를 사용하여 분쇄 및 혼합한 후, 건조하여 분말 혼합물을 준비하는 단계이다.

[0034] 이때, 상기 골다공증 치료용 유효성분은 소수성이며 폴리페놀계 천연유래 물질 또는 비스포스포네이트계 약물을 사용할 수 있다.

[0035] 보다 구체적으로, 상기 폴리페놀계 천연유래 물질로는 퀴세틴(Quercetein), 제네스테인(Genistein), 커큐민(Curcumin), 사우로락탐(Saurolactam), 사우치논(Sauchinone), 바이카린(Baicalin), 다이드제인(Daidzein), 루틴(Rutin), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 피세틴(Fisetin), 이카린(Icariin), 캠퍼롤(Kaempferol), 코리아눔나케이(E. Koreanum Nakei), 이쿠올(Equol) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 퀴세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 비스포스포네이트계 약물로는 알렌드로네이트(alendronate), 리세드로네이트(risedronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 네리드로네이트(neridronate), 이반드로네이트(ibandronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 올파드로네이트(olpadronate) 등을 사용할 수 있다.

[0037] 나아가, 상기 인산칼슘계 세라믹은 α-TCP(α-Tricalcium phosphate), β-TCP(β-Tricalcium phosphate), 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite), DCPD(Dicalcium phosphate dihydrate), MCPM(Monocalcium phosphate

monohydrate), DCPA(Dicalcium phosphate anhydrous) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 α-TCP(α-Tricalcium phosphate)를 사용할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 용매로는 이온수, 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 에틸에테르, 1,2-디메톡시에탄, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 디클로로에탄 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 이는 소수성을 띄는 폴리페놀계 천연유래 물질을 용이하게 용해시키기 위함이다.

[0039] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 준비한 분말 혼합물을 용매와 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계이다.

[0040] 이때, 상기 용매로는 탈이온수, PBS(phosphate buffered saline), 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 에틸에테르, 1,2-디메톡시에탄, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 디클로로에탄 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 이는 소수성을 띄는 폴리페놀계 천연유래 물질을 용이하게 용해시키기 위함이다. 여기서, 상기 용매는 페이스트의 점도를 높이기 위하여 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose), 젤라틴, 콜라겐, 알지네이트 등의 점증제를 더 포함할 수 있으며, 바람직하게는 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose)를 더 포함한다.

[0041] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계이다.

[0042] 이때, 상기 지지체의 성형은 첨삭가공공정법(additive manufacturing method)을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 첨삭가공공정법은 하기 기재한 바와 같이 컴퓨터 시스템으로 조절될 수 있다.

[0043] 구체적으로, 상기 첨삭가공공정법은 갠트리 로봇식 증착장치(gantry robotic deposition apparatus)를 사용하며, 상기 장치는 3차원 지지체의 제조를 위하여 증착 노즐의 위치를 제어하기 위한 작동기가 장착되어 있다. 상기 시스템에 의하여 세 방향의 동작제어(x, y 및 z-축)가 가능하며, 주사기는 z-축 동작 스테이지에 고정된다(도 1(B) 참조).

[0044] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 4는 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계이다.

[0045] 이때, 상기 경화액은 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate), H_2O, PBS(Phosphate buffer saline), DAHP(Diammonium hydrogen phosphate), $NH_4H_2PO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaH_2PO_4 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate)를 사용할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 인산칼슘계 세라믹을 분쇄하여 인산칼슘계 세라믹 분말을 준비하는 단계(단계 1);

[0047] 골다공증 치료용 유효성분 및 상기 단계 1에서 준비한 인산칼슘계 세라믹 분말을 용매 내에서 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계(단계 2);

[0048] 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계(단계 3); 및

[0049] 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0050] 이하, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0051] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 인산칼슘계 세라믹을 분쇄하여 인산

칼슘계 세라믹 분말을 준비하는 단계이다.

[0052] 이때, 상기 분말의 평균 입자크기는 1-50㎛인 것이 바람직하고, 2-25㎛인 것이 더욱 바람직하고, 3-6㎛인 것이 가장 바람직하다. 상기 입자크기는 지지체 제조시 사용하는 노즐의 크기와 관련되어 있으며, 노즐의 크기가 작아질수록 페이스트가 막힘없이 압출되기 위하여 입자크기도 작아져야 한다. 또한, 골다공증 치료용 유효성분과 혼합하는 경우, 상기 유효성분과 세라믹 분말이 균일하게 혼합되기 위해서는 양 입자의 크기가 유사한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 쿼세틴의 평균 입자크기는 4㎛이고, 제네스테인의 평균 입자크기는 5㎛이므로 이들의 유효성분과 혼합하는 경우 세라믹 입자의 크기는 3-6㎛가 가장 적합하다.

[0053] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 골다공증 치료용 유효성분 및 인산칼슘계 세라믹 분말을 용매 내에서 혼합하여 페이스트를 준비하는 단계이다.

[0054] 이때, 상기 골다공증 치료용 유효성분은 소수성이며 폴리페놀계 천연유래 물질 또는 비스포스포네이트계 약물을 사용할 수 있다.

[0055] 보다 구체적으로, 상기 폴리페놀계 천연유래 물질로는 쿼세틴(Quercetein), 제네스테인(Genistein), 커큐민(Curcumin), 사우로락탐(Saurolactam), 사우치논(Sauchinone), 바이카린(Baicalin), 다이드제인(Daidzein), 루틴(Rutin), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 피세틴(Fisetin), 이카린(Icariin), 캠퍼롤(Kaempferol), 코리아눔 나케이(E. Koreanum Nakei), 이쿠올(Equol) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 사용할 수 있다.

[0056] 또한, 상기 비스포스포네이트계 약물로는 알렌드로네이트(alendronate), 리세드로네이트(risedronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 네리드로네이트(neridronate), 이반드로네이트(ibandronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 올파드로네이트(olpadronate) 등을 사용할 수 있다.

[0057] 나아가, 상기 인산칼슘계 세라믹은 α-TCP(α-Tricalcium phosphate), β-TCP(β-Tricalcium phosphate), 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite), DCPD(Dicalcium phosphate dihydrate), MCPM(Monocalcium phosphate monohydrate), DCPA(Dicalcium phosphate anhydrous) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 α-TCP(α-Tricalcium phosphate)를 사용할 수 있다.

[0058] 또한, 상기 용매로는 탈이온수, PBS(phosphate buffered saline), 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 에틸에테르, 1,2-디메톡시에탄, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 디클로로에탄 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 이는 소수성을 띄는 폴리페놀계 천연유래 물질을 용이하게 용해시키기 위함이다. 여기서, 상기 용매는 페이스트의 점도를 높이기 위하여 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose), 젤라틴, 콜라겐, 알지네이트 등의 점증제를 더 포함할 수 있으며, 바람직하게는 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose)를 더 포함한다.

[0059] 나아가, 골다공증 치료용 유효성분은 유기물이므로, 고온에서 열변성이 우려되므로 상기 혼합온도는 상온에서 수행하여 골다공증 치료용 유효성분의 물성변화를 방지하는 것이 바람직하다.

[0060] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 준비한 페이스트를 3차원 지지체로 성형하는 단계이다.

[0061] 이때, 상기 지지체의 성형은 첨삭가공공정법(additive manufacturing method)을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 첨삭가공공정법은 하기 기재한 바와 같이 컴퓨터 시스템으로 조절될 수 있다.

[0062] 구체적으로, 상기 첨삭가공공정법은 갠트리 로봇식 증착장치(gantry robotic deposition apparatus)를 사용하며, 상기 장치는 3차원 지지체의 제조를 위하여 증착 노즐의 위치를 제어하기 위한 작동기가 장착되어 있다. 상기 시스템에 의하여 세 방향의 동작제어(x, y 및 z-축)가 가능하며, 주사기는 z-축 동작 스테이지에 고정된다(도 1(B) 참조).

[0063] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 제조방법에 있어서, 상기 단계 4는 상기 단계 3에서 제조한 3차원 지지

체를 경화액에 담지하여 골시멘트 반응을 유도하는 단계이다.

[0064] 이때, 상기 경화액은 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate), H_2O, PBS(Phosphate buffer saline), DAHP(Diammonium hydrogen phosphate), $NH_4H_2PO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaH_2PO_4 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate)를 사용할 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체는 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 대신 폴리페놀계 천연유래 물질을 사용하여 부작용에 대한 염려가 적으며 조골세포 거동을 촉진시키고 파골세포 거동을 억제하여 지지체의 골재생 효능 향상이 기대되는 퀴세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 상온에서 지지체에 균일하게 도입하여 골형성 유효성분이 서방형으로 방출되는 효과가 있을 것이라 기대되며, 이를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0066] 먼저, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 퀴세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein) 약물의 방출특성을 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 평가기간인 68일 동안 용해용매인 에탄올에서는 40일에 걸쳐 초기 급성방출 없이 서방형으로 퀴세틴이 100% 용출되는 것으로 나타났다. 또한, 체내 방출거동을 모니터링하기 위하여 탈이온수와 PBS(Phosphate buffered saline)에서 평가한 결과, 초기 20일간 퀴세틴이 10%, 68일간 약 50% 용출되는 것으로 나타났다.

[0067] 제네스테인의 경우, 용해용매인 에탄올에서는 초기 5일간에 걸쳐 100% 용출되는 것으로 나타났다. 또한, 체내 방출거동을 모니터링하기 위하여 탈이온수와 PBS(Phosphate buffered saline)에서 평가한 결과, 초기 급성방출 없이 서방형으로 제네스테인이 55일간 60% 용출되는 것으로 나타났다(실험예 1의 도 2 및 도 3 참조).

[0068] 또한, 약물의 농도에 따른 조골세포 증식활성 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 퀴세틴의 농도를 증가시킬수록 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 나타났다. 구체적으로, 퀴세틴의 농도를 1-200㎛ 범위로 증가시킬수록 퀴세틴 농도 의존적으로 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 확인되었다. 또한, 제네스테인의 농도를 1-10㎛의 범위로 증가시킬수록 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 나타났다. 반면, 제네스테인의 농도가 10㎛ 초과일 경우 오히려 조골세포의 증식이 억제되는 것으로 나타났다(실험예 2의 도 4 및 도 5 참조).

[0069] 일반적으로, 식품 혹은 영양제로 사용되는 폴리페놀계 천연유래 물질의 약물로써 효능을 비교하기 위하여 일반적으로 사용되는 골다공증 치료제인 알렌드로네이트와 같은 용량으로 첨가한 후, 각각의 약물이 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 조골세포의 경우 퀴세틴 및 제네스테인 모두 알렌드로네이트와 유사하거나 양호한 효과가 관찰되었다. 구체적으로, 200㎛의 약물을 처리한 경우, 제네스테인과 알렌드로네이트는 유사한 증식거동을 보이나 퀴세틴은 3일, 5일차에서 알렌드로네이트에 비해 유의하게 향상된 증식거동이 관찰되었다. 1㎛의 약물을 처리한 경우에는 퀴세틴과 제네스테인 모두 3일, 5일차에서 증식거동의 촉진효과가 관찰되었으며 제네스테인의 경우 그 효과가 더 크게 관찰되었다. 즉, 천연유래 물질이 기존 약물인 알렌드로네이트와 비교하여 조골세포 분화에 유사하거나 더욱 우수한 촉진효과가 있음을 확인하였다(실험예 2의 도 6 참조).

[0070] 또한, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 약물이 방출되며 조골세포 증식거동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 약물 비첨가 지지체에 비하여 200㎛의 퀴세틴과 1㎛의 제네스테인을 포함한 지지체가 조골세포 증식활성을 크게 증진시키는 것으로 나타났다(실험예 2의 도 7 참조).

[0071] 나아가, 퀴세틴, 제네스테인 및 알렌드로네이트의 파골세포 증식거동에 미치는 영향을 비교하기 위하여 실험을 수행한 결과, 세 가지 성분 모두 파골세포 증식을 억제하는 효과가 관찰되었다. 특히, 200㎛의 퀴세틴과 1㎛의 제네스테인이 같은 용량의 알렌드로네이트에 비해 그 억제효과가 큰 것이 확인되었다. 즉, 천연유래 물질이 기존 약물인 알렌드로네이트와 비교하여 파골세포 분화에 유사하거나 더욱 우수한 억제효과가 있음을 확인하였

다(실험예 3의 도 8 참조).

[0072] 또한, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 약물의 농도에 따른 파골세포 증식활성 변화를 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 쿼세틴을 함유하지 않은 경조직 재생용 지지체와 비교하여, 쿼세틴을 각각 1μM, 200μM 함유한 경조직 재생용 지지체는 파골세포의 증식거동을 동시에 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 200μM를 함유할 경우 그 효과가 보다 크게 관찰되었다. 또한, 제네스테인을 함유하지 않은 경조직 재생용 지지체와 비교하여, 제네스테인을 각각 1μM, 200μM 함유한 경조직 재생용 지지체는 파골세포의 증식거동을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며 1μM일 경우 그 효과가 보다 크게 관찰되었다(실험예 3의 도 9 및 도 10 참조).

[0073] 나아가, 초기 조골세포의 분화거동을 알카린 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)의 활성변화를 통해 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 약물을 포함하지 않는 지지체에 비하여 200μM 쿼세틴 또는 1μM 제네스테인을 함유하는 경조직 재생용 지지체가 보다 크게 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)를 활성화하여 조골세포의 초기 분화를 향상시키는 것으로 나타났다(실험예 4의 도 11 참조).

[0074] 또한, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체 내 함유되어 있는 쿼세틴 또는 제네스테인이 조골세포의 골분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Real-time PCR을 통하여 조골세포의 골분화에 대한 초기 또는 말기 인자인 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I), Runx2, 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP), 오스테오칼신(osteocalcin, OC) 또는 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)의 변화 거동을 관찰한 결과, 실시예 1 및 실시예 4에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 조골세포를 파종한 경우, 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 조골세포를 파종한 경우와 비교하여 조골세포의 골분화를 시간 경과에 따라 촉진하는 것으로 나타났다(실험예 5의 도 12-16 참조).

[0075] 나아가, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 쿼세틴 또는 제네스테인의 방출이 골화(골석회화, bone mineralization) 반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과, 약물을 첨가하지 않은 지지체에 비해 약물을 첨가한 지지체가 칼슘생성 농도가 증가하여 알리자린 레드 S의 염색으로 인한 붉은색이 진하게 나타나는 것으로 관찰되어 골화효율이 더욱 우수한 것을 확인하였다(실험예 6의 도 17 참조).

[0076] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0077] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] **<실시예 1> 경조직 재생용 지지체(쿼세틴 200μM 함유)의 제조**

[0079] 단계 1 : α-TCP(α-Tricalcium phosphate) 분말의 준비

[0080] 칼슘 카보네이트($CaCO_3$)와 디칼슘 포스페이트($CaHPO_4$)를 몰비 1:2로 반응시킨 후, 물리적으로 혼합하여 분말 혼합물을 제조하였다. 상기 분말 혼합물의 적절한 혼합을 위하여, 에탄올을 용매로 사용하고 24시간 동안 압연 밀(rolling mill) 하였다. 24시간 후, 생성된 슬러리를 건조하고 100μM의 체(sieve)로 걸렀다. 상기 분말을 12시간 동안 1400℃로 소결(sintering)하고, 1400℃에서 급냉(quenching)하였다. 분말의 입자 크기를 줄이기 위하여, 에탄올 내 250 rpm의 속도로 4시간 동안 볼 밀(ball mill)을 실시하였다. 이후, 분말을 건조하고 25μm의 체(sieve)로 걸렀다. Beckmen culter Machine을 통해 상기 제조한 α-TCP의 입자크기 분포를 관찰하였으며 평균 입자크기가 4.8μm임을 확인하였다(도 18 참조).

[0081] 단계 2 : 쿼세틴(Quercetein) 200μM 함유 경조직 재생용 지지체 제조용 압출 페이스트의 준비

[0082] 압출 페이스트는 상기 단계 1에서 준비한 α-TCP 분말에 쿼세틴을 일정량 첨가한 후, 균일한 분산을 위해 볼-밀

과정을 거쳐 혼합 분말을 제조하였다. 쿼세틴은 지지체 1개당 200㎛M이 되도록 혼합한다. 여기에 따로 준비한 30% 에탄올에 용해된 1% 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC, Hydroxypropyl methyl cellulose, Sigma)를 분액비 1:0.5로 첨가하고 균일하게 혼합하여 페이스트를 준비하였다. 필요에 따라 HPMC 용액에 직접 약물을 용해시켜 페이스트를 준비할 수도 있다.

[0083] 단계 3 : 쿼세틴(Quercetein) 200㎛M 함유 경조직 재생용 지지체의 제조

[0084] 첨삭가공 방법 중 페이스트 압출 증착(paste extrusion deposition, PED) 시스템을 통해 단계 2에서 얻어진 그린 페이스트(green paste)를 사용하여 경화가 유도되지 않은 칼슘 포스페이트 지지체를 제조하였다. 200㎛M/지지체로 농도가 제어된 페이스트를 도 1(A)와 같이 PED 시스템용 주사기에 장착시켰다.

[0085] 주사기에 들어있는 그린 페이스트는 노즐을 통해 빠져나오며, PED 시스템을 통해 3차원 지지체로 성형된다. 이때 제조되는 지지체의 모양과 크기는 컴퓨터 시스템으로 조절될 수 있다.

[0086] 구체적으로, 상기 PED 시스템은 갠트리 로봇식 증착장치(gantry robotic deposition apparatus)를 사용하며, 상기 장치는 3차원 지지체의 제조를 위하여 증착 노즐의 위치를 제어하기 위한 작동기가 장착되어 있다. 상기 시스템에 의하여 세 방향의 동작제어(x, y 및 z-축)가 가능하며, 주사기는 z-축 동작 스테이지에 고정된다(도 1(B) 참조). 상기 겐트리 로봇식 증착장치를 사용하여 3차원 지지체를 제조하였다.

[0087] 상기 제조한 3차원 지지체를 상온에서 24시간 동안 건조한 후, 0.1M의 MCPM(Mono Calcium Phosphate Mono Hydrate) 용액에 6시간 동안 침적시켜 골시멘트반응을 유도하였다. 이 반응으로 인하여 α-TCP는 CDHA(Calcium Deficient Hydroxyapatite)로 상변화하여 경화가 일어난다. 이후, 증류수로 세척하여 상기 지지체를 중성조건으로 유지시키고, 실온에서 48시간 동안 건조하여 쿼세틴(Quercetein) 함유 경조직 재생용 지지체를 제조하였다(도 1(C) 참조). 제조한 경조직 지지체 및 사용한 주사기 노즐의 특성으로는 하기와 같다:

[0088] 1. 경조직 지지체의 거리(strut distance) : 1.0 ㎜,

[0089] 2. 경조직 지지체의 크기(dimension) : 10×5×5 ㎜,

[0090] 3. 주사기 노즐 크기 : 21 G.

[0091] **<실시예 2> 경조직 재생용 지지체(쿼세틴 1㎛M 함유)의 제조**

[0092] 지지체 1개당 200㎛M의 쿼세틴을 함유하도록 제조하는 대신에, 지지체 1개당 1㎛M의 쿼세틴을 함유하도록 제조하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 경조직 재생용 지지체를 제조하였다.

[0093] **<실시예 3> 경조직 재생용 지지체(제네스테인 200㎛M 함유)의 제조**

[0094] 양파유래 물질 쿼세틴(Quercetein)을 사용하는 대신에, 콩유래 물질 제네스테인(Genistein)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 경조직 재생용 지지체를 제조하였다.

[0095] **<실시예 4> 경조직 재생용 지지체(제네스테인 1㎛M 함유)의 제조**

[0096] 양파유래 물질 쿼세틴(Quercetein)을 사용하는 대신에, 콩유래 물질 제네스테인(Genistein)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 경조직 재생용 지지체를 제조하였다.

[0097] **<비교예 1> 경조직 재생용 지지체(쿼세틴 또는 제네스테인 무첨가)의 제조**

[0098] 쿼세틴을 첨가하는 과정을 수행하지 않고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 골형성 유효성분을 함유하지 않은 경조직 재생용 지지체를 제조하였다.

[0099] **<실험예 1> 약물방출특성 평가**

[0100] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein) 약물의 방출특성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0101] <1-1> 쿼세틴(Quercetein) 약물방출특성 평가

[0102] 지지체에 첨가된 약물의 방출거동을 평가하기 위하여 체액과 유사한 성분의 PBS(Phosphate buffered saline) 또는 탈이온수에 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체(쿼세틴 200㎛/지지체)를 담지하고, 37℃로 온도제어된 쉐이커에 세팅한 후, 시간별로 용액을 검출하여 용액 내 방출된 쿼세틴의 농도를 평가하였다. 쿼세틴은 소수성물질이므로 용해에 의한 농도검출은 기대하기 어려우며, 단순 용해에 의한 약물검출거동도 동시에 평가하기 위하여 용해용매인 에탄올에서도 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0103] 도 2는 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 쿼세틴 약물의 방출특성을 평가한 그래프이다.

[0104] 도 2에 나타난 바와 같이, 평가기간인 68일 동안 용해용매인 에탄올에서는 40일에 걸쳐 초기 급성방출 없이 서방형으로 쿼세틴이 100% 용출되는 것으로 나타났으며 이는 주로 용해에 의해 방출되는 양이다. 한편, 탈이온수와 PBS(Phosphate buffered saline)에서는 초기 20일간 쿼세틴이 10%, 68일간 약 50% 용출되는 것으로 나타났다. 쿼세틴은 수용액에서의 용해도가 매우 낮으므로 이는 대부분 지지체의 생분해에 따른 물리적 용출량이다. 즉, 지지체 내 균일한 약물 분산은 일정량의 약물이 지속적으로 방출(서방)되는데 중요한 요소임을 확인하였다.

[0105] <1-2> 제네스테인(Genistein) 약물방출특성 평가

[0106] 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체(쿼세틴 200㎛/지지체)를 사용하는 대신에, 실시예 3에서 제조한 경조직 재생용 지지체(제네스테인 200㎛/지지체)를 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0107] 도 3는 실시예 3에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 제네스테인 약물의 방출특성을 평가한 그래프이다.

[0108] 도 3에 나타난 바와 같이, 용해용매인 에탄올에서는 초기 5일간에 걸쳐 제네스테인이 100% 용출되는 것으로 나타났으며, 이는 주로 용해에 의해서 방출되는 양이다. 특히, 상기 실험예 <1-1>과 비교하여 제네스테인은 쿼세틴과 비교하여 에탄올에 더욱 높은 용해도를 보인다. 또한, 탈이온수와 PBS(Phosphate buffered saline)에서는 초기 급성방출 없이 서방형으로 제네스테인이 55일간 60% 용출되는 것으로 나타났다. 제네스테인은 쿼세틴과 마찬가지로 수용액에서의 용해도가 매우 낮으므로 이는 대부분 지지체의 생분해에 따른 물리적 용출량이다. 즉, 지지체 내 균일한 약물 분산은 일정량의 약물이 지속적으로 방출(서방)되는데 중요한 요소임을 확인하였다.

[0109] **<실험예 2> 조골세포 증식활성 평가**

[0110] 약물의 농도에 따른 조골세포 증식활성 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0111] <2-1> 쿼세틴(Quercetein) 농도에 따른 조골세포 활성 관찰

[0112] MC3T3-E1 세포(MC3T3-E1 Subclone 4, ATCC CRL-2593, obtained from ATCC)를 표준 배양조건(37℃, 5% CO_2)에서 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신으로 충진된 α-MEM(α-Minimum Essential Medium, GIBCO)에서 배양하였다. 상기 세포가 70-80%로 포화되면, 트립신화(trypsinized)하고, 원심분리를 통해

수집하였다.

[0113] 이후, MC3T3-E1세포를 1.0×10^4 세포밀도로 파종하고, 2시간 동안 표준 배양한 후, 쿼세틴을 각각 0, 1, 10, 50, 100, 200㎛만큼 포함하는 배지를 첨가하였다.

[0114] 파종한 MC3T3-E1 세포의 대사 활동을 관찰하기 위하여 비색적(colorimetric) 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페놀)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸륨 (MTS) 분석(CellTiter 96® AQeous One solution Cell Proliferation Assay Promega)을 제조업자의 지시사항에 따라 수행하였다. 상기 MTS 테트라졸륨 화합물은 세포에 의하여 생물학적으로 환원되어 조직 배양배지 내 용해되어 490 nm에서 최대의 흡수를 나타내는 포르마잔(formazan) 생성물이 된다. 조골세포의 증식활성 변화는 1일, 3일, 5일에 걸쳐 관찰하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0115] 도 4는 쿼세틴 투여농도에 따른, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0116] 도 4에 나타난 바와 같이, 쿼세틴을 첨가하지 않은 세포와 비교하여(무처리군), 쿼세틴의 농도를 증가시킬수록 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 나타났다. 구체적으로, 쿼세틴의 농도를 1-200㎛ 범위로 증가시킬수록 쿼세틴 농도 의존적으로 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 확인되었다. 따라서, 쿼세틴의 바람직한 농도 범위는 1-200㎛인 것을 알 수 있다.

[0117] <2-2> 제네스테인(Genistein) 농도에 따른 조골세포 활성 관찰

[0118] 쿼세틴을 사용하는 대신에, 제네스테인을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 <2-1>과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0119] 도 5는 제네스테인 투여농도에 따른, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0120] 도 5에 나타난 바와 같이, 제네스테인을 첨가하지 않은 세포와 비교하여(무처리군), 제네스테인의 농도를 1-10㎛의 범위로 증가시킬수록 조골세포의 증식이 증가하는 것으로 나타났다. 반면, 제네스테인의 농도가 10㎛ 초과인 경우 오히려 조골세포의 증식이 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 제네스테인의 바람직한 농도 범위는 1-10㎛인 것을 알 수 있으며, 1㎛과 10㎛ 사이에서는 조골세포의 증식 차이가 관찰되지 않으므로 1㎛의 사용이 가장 바람직한 것을 알 수 있다.

[0121] <2-3> 알렌드로네이트(alendronate) 농도에 따른 조골세포 활성 관찰

[0122] 일반적인 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 중 대표적인 알렌드로네이트와 폴리페놀계 천연유래 물질인 쿼세틴 또는 제네스테인의 효과를 비교하기 위하여, 상기 실험예 <2-1> 및 <2-2>의 결과를 기준으로 동일한 농도의 알렌드로네이트 첨가시 조골세포의 증식거동에 미치는 효과를 비교관찰하였다. 실험방법은 쿼세틴 또는 제네스테인을 알렌드로네이트로 바꾸는 것 외에는 상기 실험예 <2-1> 및 <2-2>와 같으며, 농도는 1㎛ 또는 200㎛을 첨가하여 실시하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0123] 도 6은 동일한 용량의 쿼세틴, 제네스테인 및 알렌드로네이트 투여에 따른 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0124] 도 6에 나타난 바와 같이, 조골세포에 대하여 쿼세틴 및 제네스테인은 알렌드로네이트와 유사하거나 양호한 효과가 관찰되었다. 구체적으로, 200μM의 약물을 처리한 경우, 제네스테인과 알렌드로네이트는 유사한 증식거동을 보이나 쿼세틴은 3일, 5일차에서 알렌드로네이트에 비해 유의하게 향상된 증식거동이 관찰되었다. 1μM의 약물을 처리한 경우에는 쿼세틴과 제네스테인 모두 3일, 5일차에서 증식거동의 촉진효과가 관찰되었으며 제네스테인의 경우 그 효과가 더 크게 관찰되었다. 즉, 천연유래 물질이 기존 약물인 알렌드로네이트와 비교하여 조골세포 분화에 유사하거나 더욱 우수한 촉진효과가 있음을 확인하였다.

[0125] <2-4> 쿼세틴 및 제네스테인 함유 경조직 재생용 지지체의 효과 관찰

[0126] 실시예 1-4 및 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체를 자외선 하에 1시간 동안 70% 에탄올에 담지하여 살균하였고, PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세 차례에 걸쳐 세척하였다. 세포를 배양하는 동안 발생할 수 있는 오염 또는 pH 변화를 방지하기 위하여, 상기 지지체를 하루 동안 표준 배양조건에서 MC3T3-E1 세포 없이 세포 배양 배지에 담지하였다.

[0127] 이후, MC3T3-E1세포를 1.0×10^{5} 세포/지지체의 밀도로, 실시예 1-4 및 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 파종하고, 2시간 동안 표준 배양한 후, 배지를 첨가하였다. 실험도중 존재하는 비-부착 세포를 제거하기 위하여 상기 배지를 주기적으로 교체하였다. 조골세포의 증식활성 변화는 1일, 3일, 5일에 걸쳐 관찰하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0128] 도 7은 경조직 재생용 지지체에 함유된 쿼세틴과 제네스테인의 농도를 변화시킬때, 조골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0129] 도 7에 나타난 바와 같이, 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체(약물 비첨가)에 비해 실시예 1(200μM 쿼세틴/지지체) 및 실시예 4(1μM 제네스테인/지지체)에서 제조한 경조직 재생용 지지체를 사용하는 경우 조골세포의 증식이 현저히 촉진되는 것을 알 수 있다.

[0130] **<실험예 3> 파골세포 증식활성 평가**

[0131] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체에 함유되어 있는 약물의 농도에 따른 파골세포 증식활성 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0132] <3-1> 천연유래 물질(쿼세틴 또는 제네스테인)과 알렌드로네이트의 파골세포 증식에 미치는 효과 관찰

[0133] MC3T3-E1 세포(MC3T3-E1 Subclone 4, ATCC CRL-2593, obtained from ATCC)를 사용하는 대신에, NF-κB의 수용체 활성 인자 리간드(Receptor Activation for Nuclear Factor κB Ligand, RANKL)를 처리한 다핵 파골 세포인 RAW 264.7 세포를 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 <2-3>과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0134] 도 8은 동일한 용량의 쿼세틴, 제네스테인 및 알렌드로네이트 투여에 따른 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0135] 도 8에 나타난 바와 같이, 약물을 처리하지 않은 파골세포에 비해 쿼세틴, 제네스테인 또는 알렌드로네이트를 첨가한 파골세포는 증식이 현저히 억제되는 것으로 나타났다. 특히 동일한 농도를 처리하는 경우, 200μM에서는 쿼세틴이, 1μM에서는 제네스테인이 파골세포 증식억제 효과가 우수한 것으로 나타났다. 즉, 파골세포 증식억제에 있어서, 천연유래 물질(쿼세틴 또는 제네스테인)이 알렌드로네이트에 비해 유사하거나 우수한 것이 확인되었다.

[0136] <3-2> 퀴세틴(Quercetein) 함유 경조직 재생용 지지체의 효과 관찰

[0137] MC3T3-E1세포를 사용하는 대신에, 상기 실험예 <3-1>에서 준비한 RAW 264.7 세포를 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 <2-4>와 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0138] 도 9은 경조직 재생용 지지체에 함유된 퀴세틴의 농도를 변화시킬 때, 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0139] 도 9에 나타난 바와 같이, 퀴세틴을 함유하지 않은 경조직 재생용 지지체와 비교하여, 퀴세틴을 각각 1㎛M, 200㎛M 함유한 경조직 재생용 지지체는 파골세포의 증식거동을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 특히, 200㎛M 첨가의 경우 그 억제효과가 가장 우수하였다.

[0140] <3-3> 제네스테인(Genistein) 함유 경조직 재생용 지지체의 효과 관찰

[0141] 퀴세틴(Quercetein) 함유 경조직 재생용 지지체를 사용하는 대신에, 제네스테인(Genistein) 함유 경조직 재생용 지지체를 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 <3-2>와 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0142] 도 10은 경조직 재생용 지지체에 함유된 제네스테인의 농도를 변화시킬 때, 파골세포 증식활성 변화를 관찰한 그래프이다.

[0143] 도 10에 나타난 바와 같이, 제네스테인을 함유하지 않은 경조직 재생용 지지체와 비교하여, 제네스테인을 각각 1㎛M, 200㎛M 함유한 경조직 재생용 지지체는 파골세포의 증식거동을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 특히, 1㎛M의 제네스테인을 포함한 지지체가 파골세포 억제효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.

[0144] **<실험예 4> 조골세포 초기분화 평가**

[0145] 초기 조골세포 분화거동은 알카린 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)의 활성변화를 통해 알 수 있으며, BioAssay Systems의 QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit(DALP-250)를 사용하여 실험을 수행하였다.

[0146] 조골세포(MC3T3-E1)의 분화를 위하여 아스코브산이 함유한 것을 제외하고는 상기 실험예 <2-4>의 세포파종과 동일한 방법으로 수행하였다. 배양중인 웰 플레이트의 배지를 잘 섞은 뒤 100 ㎕씩 옮겨 담고 nPP((p-Nitrophenyl) phosphate)용액을 50 ㎕ 주입한 후 60분동안 배양하였다. 발색된 용액 100 ㎕를 96웰 플레이트에 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배지를 모두 제거하고 PBS로 세정한 후 ALP-키트(kit)의 에세이 버퍼를 500 ㎕ 넣어서 10분 동안 반응시킨 후 피펫으로 강하게 수십 회 섞어준 후 용액을 수거하여 13,000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 이 용액의 상층액을 100 ㎕씩 옮겨담고 nPP 용액을 50 ㎕ 넣어 60분간 배양한다. 발색된 용액 100 ㎕를 96 웰 플레이트에 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하기의 공식을 사용하여 측정된 배지내의 흡광도 및 세포외 흡광도를 합하여 계산하였다.

[0147] ALP 활성도 = 흡광도 / 측정량 /시간

[0148] 표준화된 ALP 활성도 = ALP 활성도 / 세포 수

[0149] 알칼리 포스페타아제 활성(Alkaline phosphatase activity)은 특정 기질을 탈인산화 하는 효소의 활성을 측정하는 것으로 알칼리 포스페타아제는 뼈 생성에 중요한 요소로써 조골세포의 활성이 증가할수록 활성도가 증가한다. 상기 실험을 통해 MC3T3-E1 세포가 조골세포로 분화한 정도를 알 수 있다. 그 결과를 도 11에 나타내

었다.

[0150] 도 11은 퀴세틴 또는 제네스테인을 함유하는 경조직 재생용 지지체가 조골세포의 초기분화에 미치는 영향을 알카린 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)의 활성변화를 통해 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0151] 도 11에 나타난 바와 같이, 퀴세틴 또는 제네스테인을 함유하는 경조직 재생용 지지체는 인산분해 효소(Alkaline phosphatase)를 활성화하여 조골세포의 초기분화를 향상시키는 것으로 나타났다. 특히, 초기 골분화를 촉진시키는 효과는 200㎛M의 퀴세틴을 함유하는 지지체(실시예 1)와 1㎛M의 제네스테인을 포함한 지지체(실시예 4)가 가장 우수한 것으로 나타났다.

[0152] 즉, 폴리페놀계 천연유래 물질인 퀴세틴 또는 제네스테인을 특정 농도로 함유하는 지지체는 조골세포의 초기 골분화를 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0153] **<실험예 5> Real-time PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통한 조골세포의 골분화 평가**

[0154] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체 내 함유되어 있는 퀴세틴 또는 제네스테인이 조골세포의 골분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Real-time PCR을 통하여 조골세포의 골분화에 대한 초기 또는 말기 인자인 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I), Runx2, 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP), 오스테오칼신(osteocalcin, OC) 또는 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)의 변화 거동을 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0155] MC3T3-E1 세포(MC3T3-E1 Subclone 4, ATCC CRL-2593, obtained from ATCC)를 실시예 1, 실시예 4 및 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 1.0×10^5 세포밀도로 파종하였다. 24시간 후, 배양 배지(10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 100㎛g/ml 페니실린 및 100㎛g/ml 스트렙토마이신으로 충진된 α-MEM(α-Minimum Essential Medium, GIBCO))를 골형성촉진용(osteogenic) 배양 배지(10 mM β-글리세로포스페이트(β-glycerophosphate) 및 50㎛g/ml L-아스코르빈산-2 포스페이트로 충진된 배양 배지, Sigma)로 교체하였다. 세포들은 7일, 14일, 21일 및 28일에 수확하고 모든 RNA를 illustra RNA spin Mini RNA isolation Kit(GE Healthcare)를 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 고립하였다. cDNA를 Superscript II(Invitrogen)을 사용하여 합성하였으며, ABI 7500 real-time PCR 기기(Applied Biosystem)를 사용하여 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머(marker primer, 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I), Runx2, 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP), 오스테오칼신(osteocalcin, OC) 및 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP))와 함께 PCR 반응을 수행하였다. 각 샘플을 삼중화(triplicate)하고, GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)로 표준화하였다. 실시예 1, 실시예 4 및 비교예 1에서 제조한 지지체에 대하여 각 골형성촉진용 표지 프라이머에 대한 결과를 상대치로 도 12-15, 18에 나타내었다.

[0156] 도 12는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

[0157] 도 13은 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 Runx2에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

[0158] 도 14는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

[0159] 도 15는 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)에 대한 유전자 별현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

[0160] 도 16은 골형성촉진용(osteogenic) 표지 프라이머 중 오스테오칼신(osteocalcin, OC)에 대한 유전자 발현 정도를 상대치로 나타낸 그래프이다.

[0161] 도 12-16에 나타난 바와 같이, 실시예 1 및 실시예 4에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 조골세포를 파종한 경우, 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 조골세포를 파종한 경우와 비교하여 조골세포의 골분화를 시간 경과에 따라 촉진하는 것으로 나타났다. 보다 구체적으로, 콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I)의 경우 실시예 1에서 제조한 지지체는 비교예 1에서 제조한 지지체에 비해 14일차부터 유의한 촉진효과가 발생하는 것으로 나타났다.

[0162] Runx2의 경우, 실시예 1 및 실시예 4 모두 비교예 1에 비해 7일차부터 높은 촉진효과가 발생하는 것으로 나타났다.

[0163] 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)의 경우 실시예 1 및 실시예 4에서 제조한 지지체가 비교예 1에서 제조한 지지체에 비해 14일차부터 높은 촉진효과가 발생하는 것으로 나타났으며, 오스테오칼신(osteocalcin)의 경우 21일차부터 유의한 촉진효과가 발생하는 것으로 나타났다.

[0164] 뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)의 경우, 실시예 1 및 실시예 4 모두 비교예 1에 비해 21차부터 높은 촉진효과가 발생하는 것으로 나타났다.

[0165] 즉, 폴리페놀계 천연유래 물질인 쿼세틴 또는 제네스테인을 특정 농도로 함유하는 지지체는 조골세포의 골분화를 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0166] **<실험예 6> 약물방출이 골석회화(mineralization) 반응에 미치는 영향 관찰**

[0167] 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체의 골석회화(mineralization) 반응 진행시, 쿼세틴 또는 제네스테인의 방출이 골석회화 반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0168] 6-웰 플레이트(10 cm^2/웰)에서 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고, 상온에서 15분 동안 10% (v/v) 포름알데하이드(Sigma-Aldrich)에서 고정하였다. 상기 지지체를 과량의 물로 세척하고, 알리자린 레드 S(Alizarin red S, pH 4.1)를 각 웰마다 1 mL씩 첨가하였다. 상기 플레이트를 20분 동안 흔들며 상온에서 배양하였다. 염색되지 않은 염료를 흡인하고, 4 mL의 물로 네 차례에 걸쳐 흔들며 세척하였다. 과량의 물을 제거하기 위하여, 상기 플레이트를 2분 동안 비스듬하게 위치시킨 후, 재흡인하고, 염료를 추출하기 이전에 -20℃에서 저장하였다. 도립현미경(inverted microscope, Nikon)을 사용한 위상 현미경(phase microscopy)을 통해 염색 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[0169] 도 17(a)는 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 알리자린 레드 S(Alizarin red S)가 염색된 것을 나타내는 이미지이다.

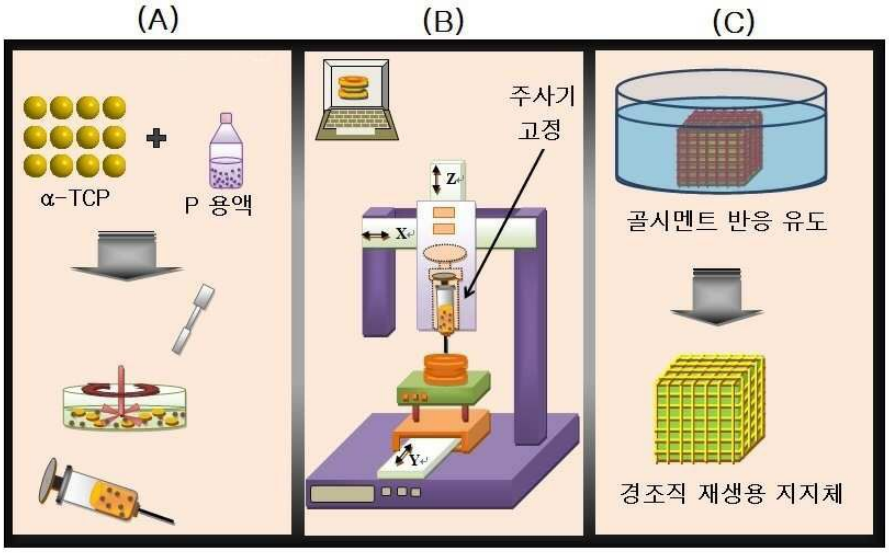
[0170] 도 17(b)는 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 알리자린 레드 S(Alizarin red S)가 염색된 것을 나타내는 이미지이다.

[0171] 도 17에 나타난 바와 같이, 비교예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체와 비교하여, 실시예 1에서 제조한 경조직 재생용 지지체에 대한 알리자린 레드 S의 염색정도가 우수한 것으로 나타나 칼슘의 형성, 즉 골석회화가 촉진되는 효과가 관찰되었다.

[0172] 따라서, 본 발명에 따른 경조직 재생용 지지체는 골다공증 치료제인 비스포스포네이트계 약물 대신 폴리페놀계 천연유래 물질을 사용하여 부작용에 대한 염려가 적으며, 조골세포 거동을 촉진시키고 동시에 파골세포 거동을 억제하여 지지체의 골재생 효능 향상이 기대되는 쿼세틴(Quercetein) 또는 제네스테인(Genistein)을 상온에서 지지체에 균일하게 도입하여 골형성 유효성분이 서방형으로 장시간 방출되는 장점이 있다.

도면

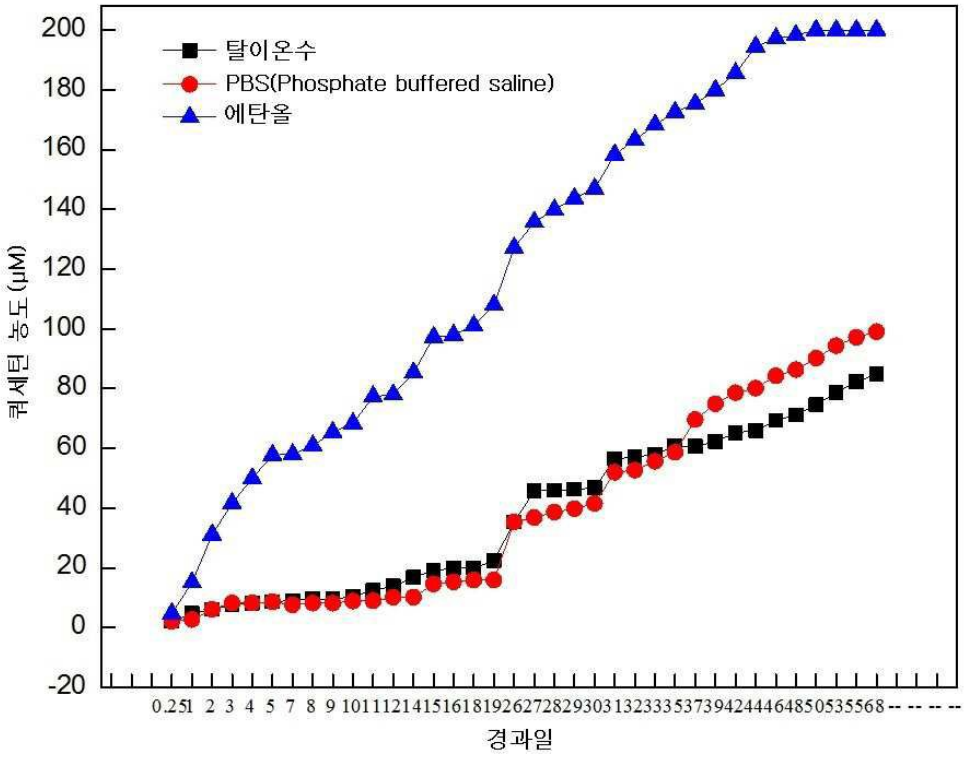
도면1



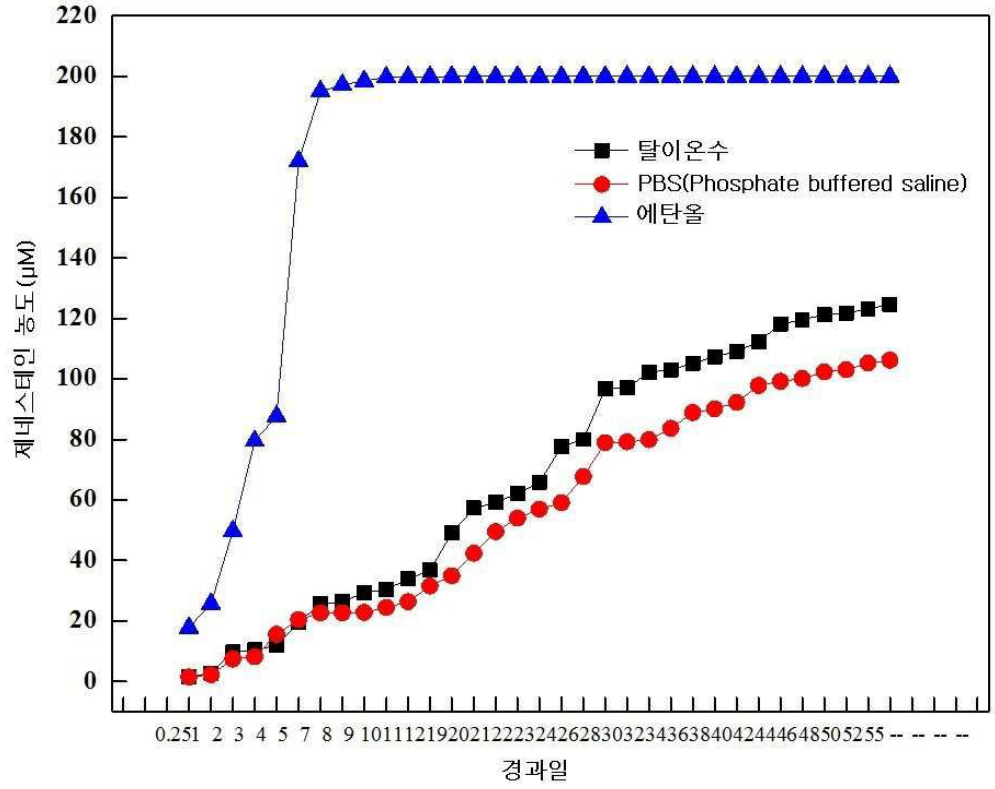
P 용액 : 30% 에탄올에 용해된 1% 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 및 쿼세틴 혼합물 용액

α-TCP : α-트리칼슘 포스페이트 (α-Tricalcium phosphate)

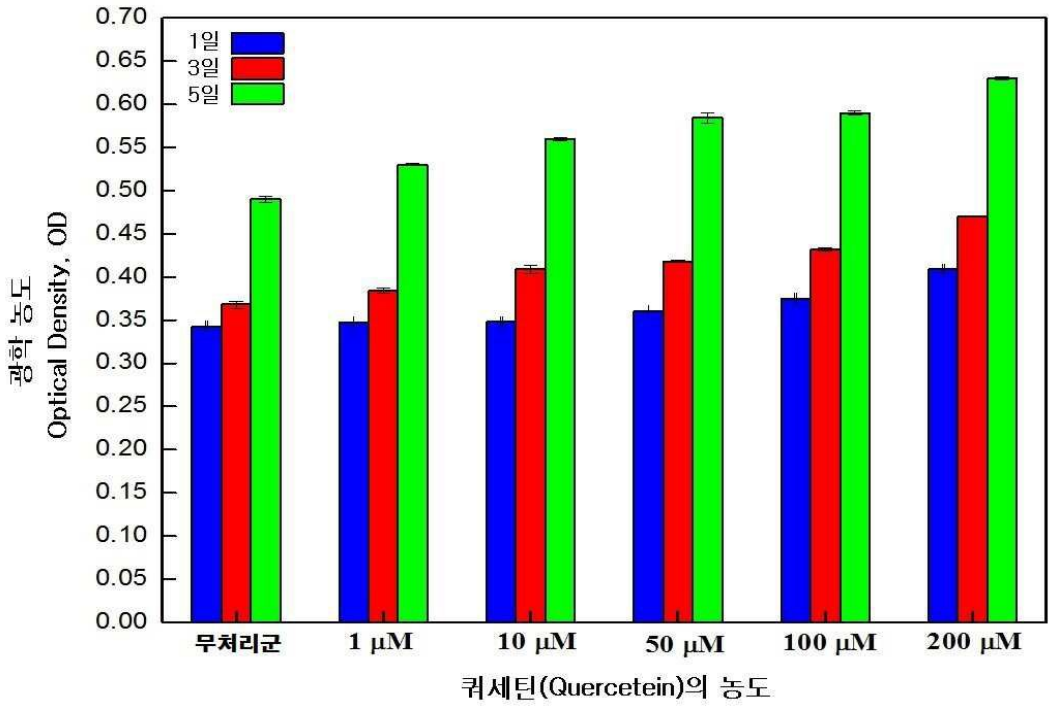
도면2



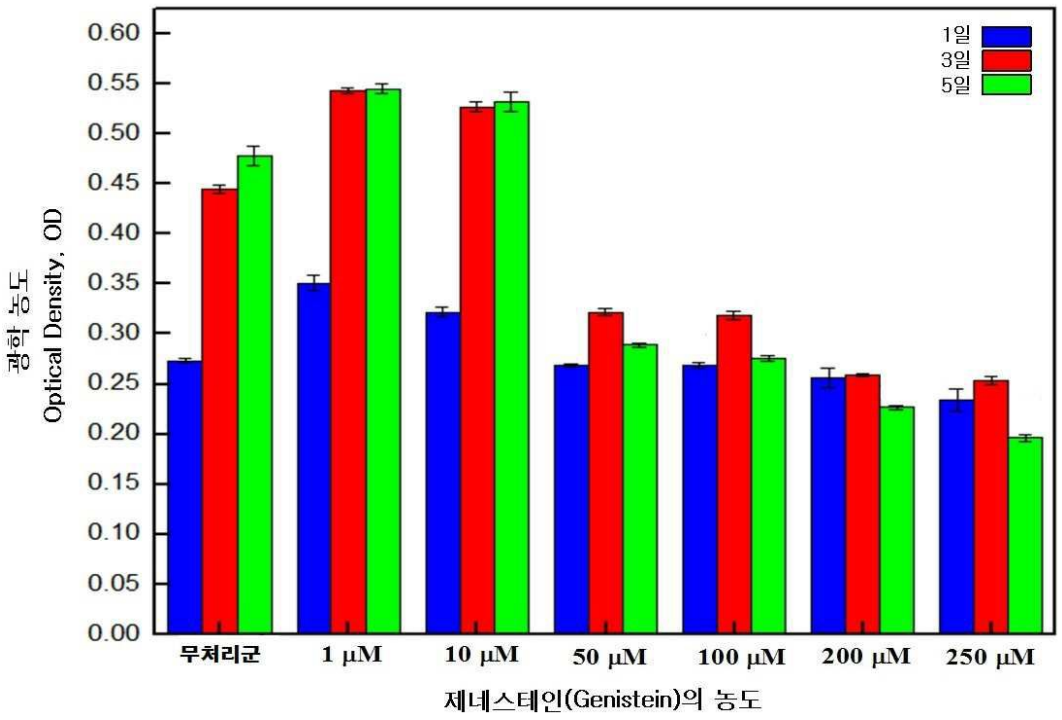
도면3


220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
제네스테인 농도(μM)
탈이온수
PBS(Phosphate buffered saline)
에탄올
0.251 2 3 4 5 7 8 9 10 11 12 19 20 21 22 23 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 55 -- -- -- --
경과일

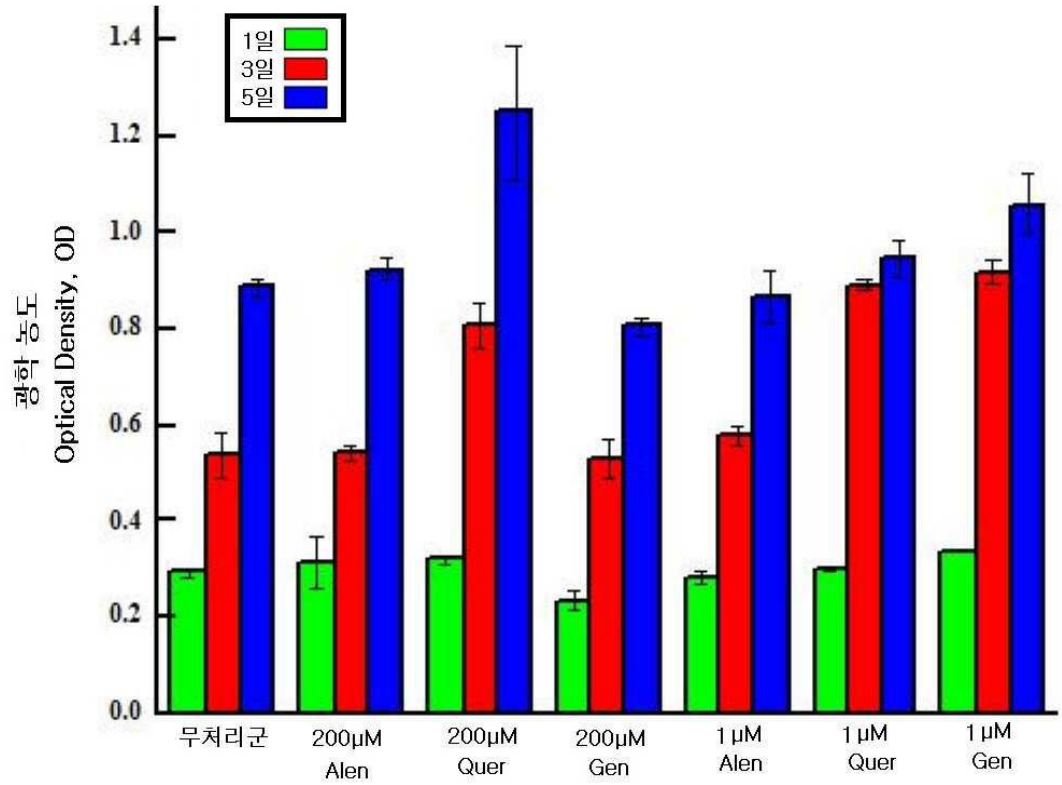
도면4


0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
광학 농도
Optical Density, OD
1일
3일
5일
무처리군
1 μM
10 μM
50 μM
100 μM
200 μM
퀴세틴(Quercetein)의 농도

도면5

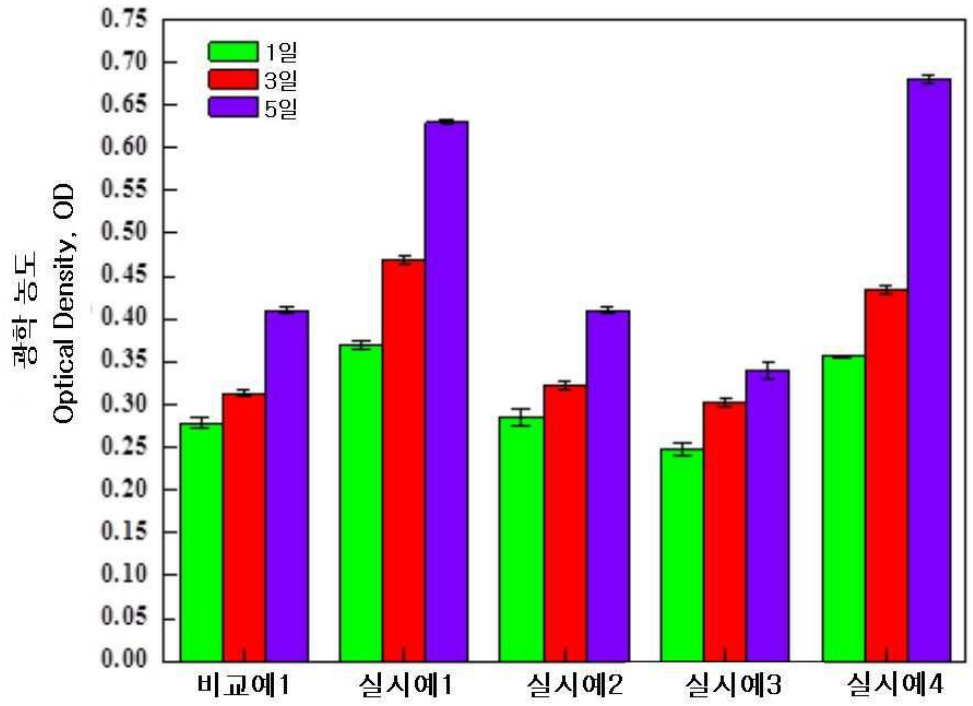


도면6

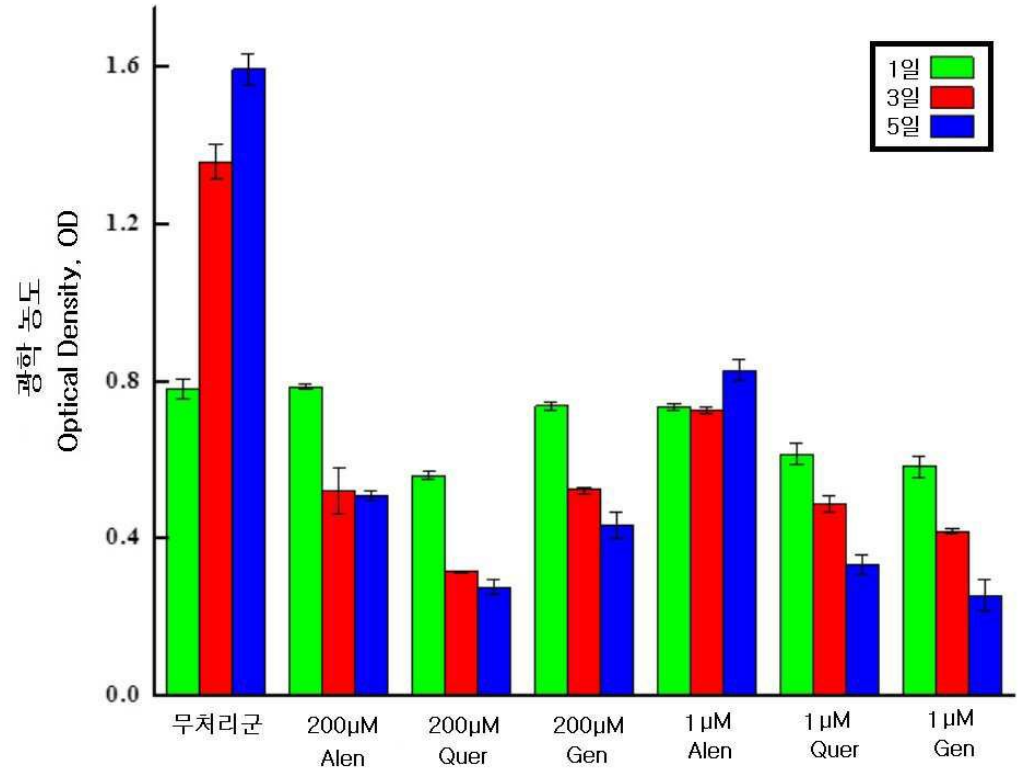


Alen : 알렌드로네이트
Quer : 쿼세틴
Gen : 제네스테인

도면7

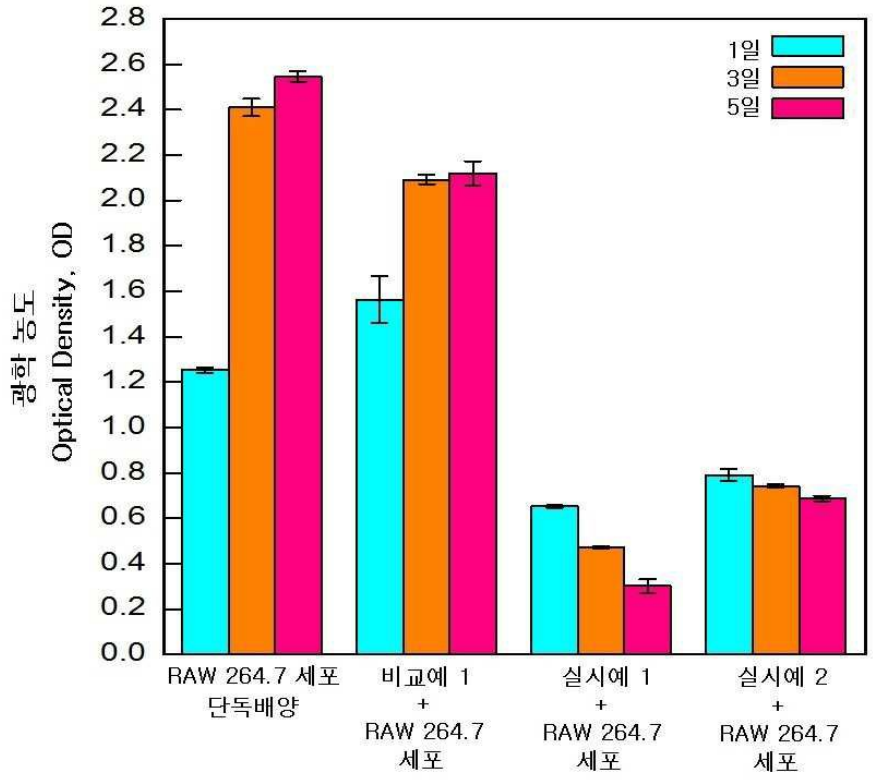


도면8

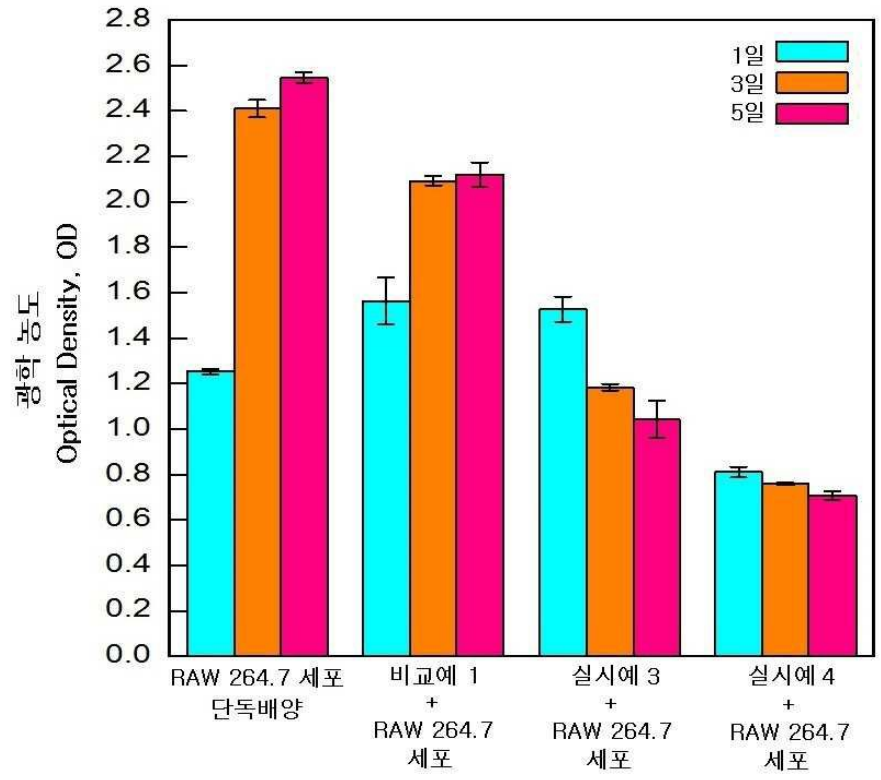


Alen : 알렌드로네이트
Quer : 쿼세틴
Gen : 제네스테인

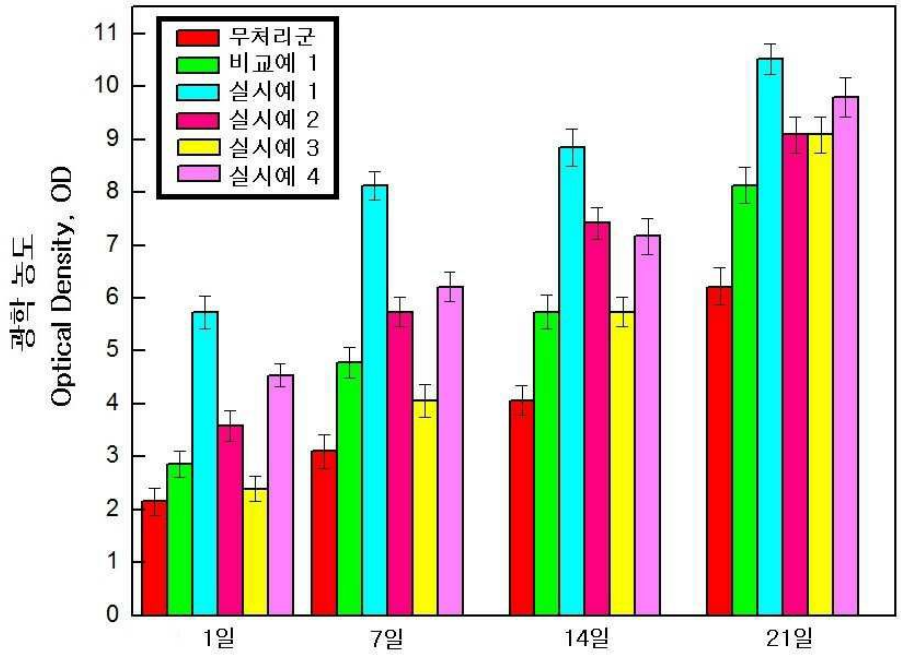
도면9


광학 농도
Optical Density, OD
2.8
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1일
3일
5일
RAW 264.7 세포
단독배양
비교예 1
+
RAW 264.7
세포
실시예 1
+
RAW 264.7
세포
실시예 2
+
RAW 264.7
세포

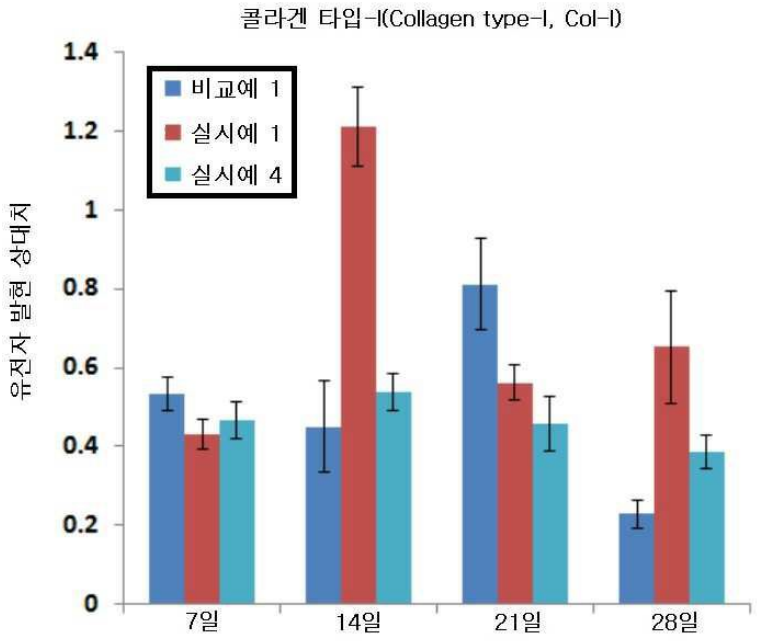
도면10


광학 농도
Optical Density, OD
2.8
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1일
3일
5일
RAW 264.7 세포
단독배양
비교예 1
+
RAW 264.7
세포
실시예 3
+
RAW 264.7
세포
실시예 4
+
RAW 264.7
세포

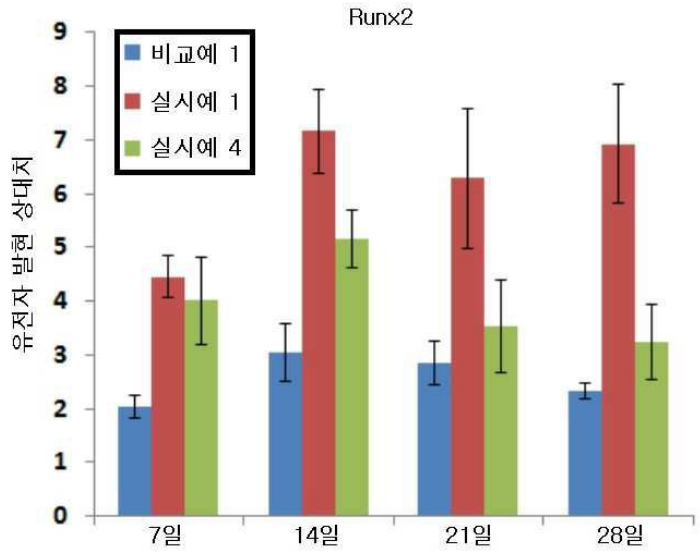
도면11


무처리군
비교예 1
실시예 1
실시예 2
실시예 3
실시예 4
광학 농도
Optical Density, OD
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
1일
7일
14일
21일

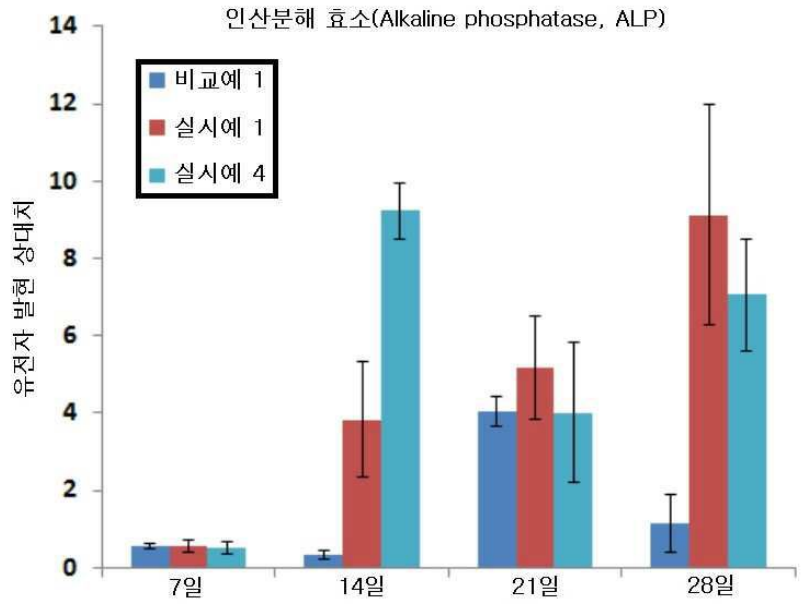
도면12


콜라겐 타입-I(Collagen type-I, Col-I)
비교예 1
실시예 1
실시예 4
유전자 발현 상대치
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
7일
14일
21일
28일

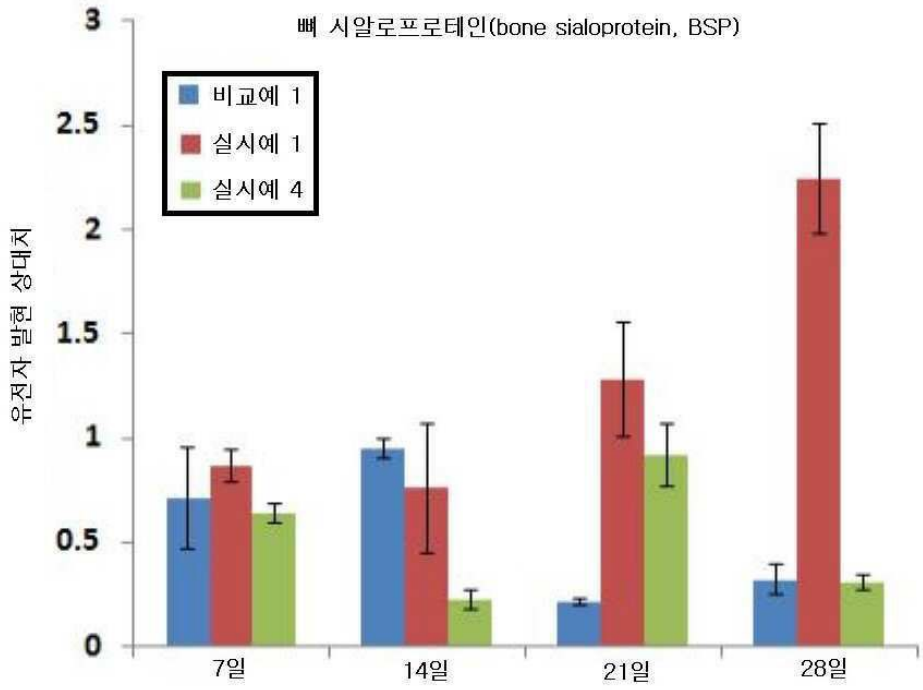
도면13


Runx2
비교예 1
실시예 1
실시예 4
유전자 발현 상대치
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
7일
14일
21일
28일

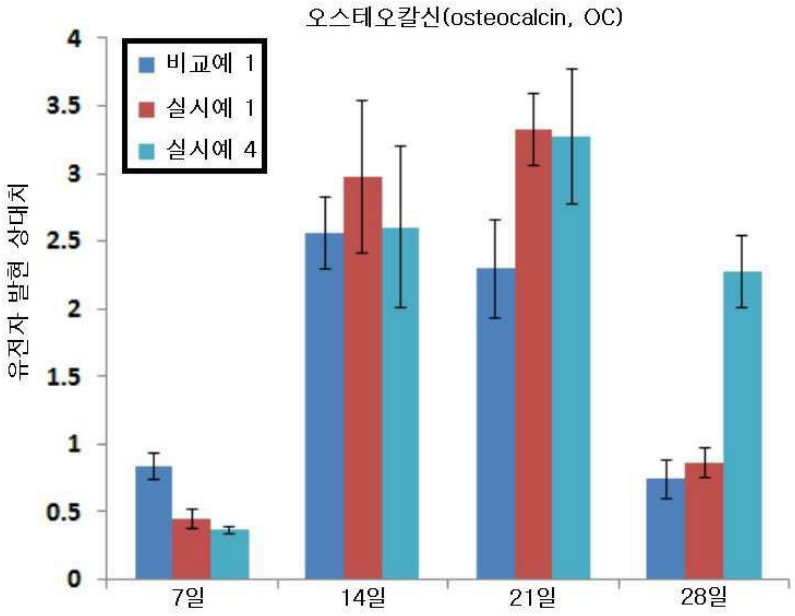
도면14


인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)
비교예 1
실시예 1
실시예 4
유전자 발현 상대치
0
2
4
6
8
10
12
14
7일
14일
21일
28일

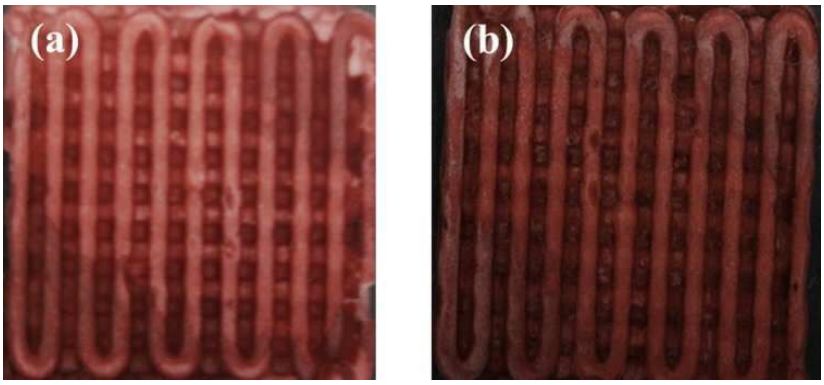
도면15


뼈 시알로프로테인(bone sialoprotein, BSP)
비교예 1
실시예 1
실시예 4
유전자 발현 상대치
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
7일
14일
21일
28일

도면16


오스테오칼신(osteocalcin, OC)
비교예 1
실시예 1
실시예 4
유전자 발현 상대치
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
7일
14일
21일
28일

도면17



도면18

