

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 22일 (22.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/204403 A1

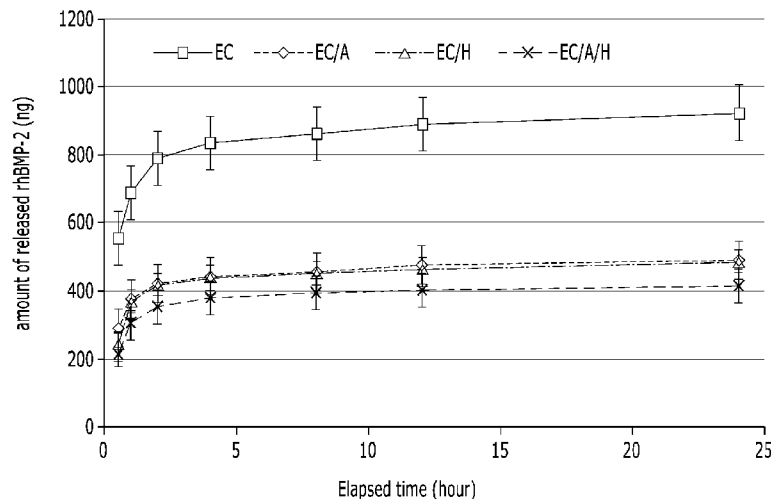
- (51) 국제특허분류:
A61K 47/42 (2006.01) A61K 31/663 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004643
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 3일 (03.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0086395 2015년 6월 18일 (18.06.2015) KR
- (71) 출원인: (주) 다림티센 (DALIM TISSEN INC.)
[KR/KR]; 03982 서울시 마포구 연희로 31, 5층, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

- (72) 발명자: 황순정 (HWANG, Soon Jung); 06560 서울시 서초구 동광로 3길 18, 402동 902호, Seoul (KR). 김인숙 (KIM, In Sook); 06560 서울시 서초구 동광로 3길 18, 402동 902호, Seoul (KR). 박시내 (PARK, Si-Nae); 03721 서울시 서대문구 봉원사길 47, Seoul (KR). 고재형 (KO, Jae-Hyung); 01010 서울시 강북구 삼양로 139길 22, Seoul (KR). 정현욱 (JEONG, Heonuk); 05272 서울시 강동구 상암로 251, 902동 508호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김명신 (KIM, Myung-Shin) 등; 04174 서울시 마포구 마포대로 44, 12층 (도화동, 진도빌딩), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COLLAGEN-BASED SUSTAINED-RELEASE BMP DELIVERY CARRIER COMPRISING BISPHOSPHONATE, AND PRODUCTION METHOD FOR SAME

(54) 발명의 명칭: 비스포스포네이트를 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention provides: a collagen-based sustained-release BMP delivery carrier wherein a collagen-based BMP delivery carrier has incorporated therein a bisphosphonate, and heparin is selectively secured thereto so as to increase the affinity between the collagen and the BMP in the collagen-based BMP delivery carrier, such that an appropriate concentration of BMP can be released on a sustained basis and the BMP release rate and release extent can be adjusted; and a production method for the collagen-based sustained-release BMP delivery carrier. According to the present invention, by releasing an appropriate concentration of BMP on a sustained basis, it is possible to induce and promote bone differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells, and it is possible to promote bone formation or bone regeneration in a bone defect.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/204403 A1



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, **공개:**

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트를 함유시키고 선택적으로 헤파린을 고정하여 콜라겐 기반의 BMP 전달체에서 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고 BMP의 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출함으로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있고, 또한 골결손부에서는 골형성 내지 골재생을 촉진할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 비스포스포네이트를 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 비스포스포네이트를 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP(Bone Morphogenetic Protein; 골형성 단백질) 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유시킴으로써 BMP의 방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [2] 구체적으로, 본 발명은 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트를 함유시키고 선택적으로 헤파린을 고정하여 콜라겐 기반의 BMP 전달체에서 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고 BMP의 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [3] 또한, 본 발명은 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 이용하여 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출함으로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진하는 과정에 관한 것이다.
- [4] 추가로, 본 발명은 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 골결손부에 이식하여 적정 농도의 BMP가 지속적으로 방출되도록 함으로써 골형성 내지 골재생을 촉진하는 과정에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 골형성단백질(Bone Morphogenetic Protein)(이하, BMP로 약칭됨)은 골재생을 촉진시키는데 있어서 중요한 성장인자이며, 그 예로서는 BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP 7 등을 들 수 있다. 이러한 다양한 BMP들 중 BMP-2는 골유도능이 가장 우수하다고 보고되어 있다. BMP를 근육 내에 이식하면 5일 내지 7일째에 먼저 연골이 형성되고, 연골조직에 모세혈관이 침입하게 되면 연골이 흡수된 후 근육 내에 이소성(異所性) 골조직이 형성되는 것으로 알려져 있다. 따라서, BMP는 골손상 부위나 골재생이 필요한 부위에 단독으로 또는 골이식재 등과 함께 적용함으로써 적용 부위의 골분화를 유도하고, 궁극적으로는 골형성 내지는 골재생을 촉진하는데 사용된다.
- [6] 그러나, BMP-2 등의 BMP는 수용성 성질로 인하여 생체 내에서 빠르게 확산되어 소실되기 때문에 원하는 골 손상 부위에 지속적인 적용에 어려움이 있다. 그러므로, 골재생 의료분야에서 효과적인 골재생을 위해서는 BMP를

- 담지하면서 적정 농도로 서서히 방출시킬 수 있는 전달체가 필수적이다.
- [7] 현재 BMP의 효과적인 적용을 위한 전달체에 관한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 기존에 연구된 β -TCP (β -Tricalcium Phosphate), FFSS (fibrin-fibronectin sealing system), MBCP (Macroporous biphasic calcium phosphate), 콜라겐 등과 같은 생체 재료는 BMP 전달체로서 기본적인 기능을 수행하지만, 골재생 의료분야에서 사용되는 골이식재의 목적에 부합하는 이상적인 BMP 전달체의 요건을 만족시키지 못하는 한계가 있다.
- [8] 예를 들어, β -TCP는 다공성을 가진 골전도성(osteoconductive)의 골대체제로 임상에서 폭 넓게 이용되고 있으며 미세공극 안에 BMP를 유지하고 천천히 유리시킬 수 있는 성질이 있으나 서방성이 약한 단점이 있다. 또, 결손부의 공간유지능이 뛰어난 반면에, 성형성이 떨어지며 생체 내에서 용해되어 흡수되는 속도가 골재생 속도와 맞지 않아 신생골 형성이 방해되는 것이 단점으로 지적되고 있다.
- [9] FFSS는 다른 전달체와 비교 시 신생골 형성량, 결손부 폐쇄량, 골밀도 등의 결과가 떨어지는 단점이 있다고 알려져 있으며 응고된 FFSS는 체내에서 일주일 후에 용해되어 서방형 BMP 전달체로서는 부적합하다.
- [10] MBCP는 하이드록시 아파타이트(Hydroxyapatite)와 β -TCP를 6:4, 7:3, 8:2의 다양한 비율로 혼합한 전달체로서, 하이드록시 아파타이트가 천천히 흡수되면서 뼈대를 제공하고 β -TCP가 빠르게 흡수되어 골이 생성될 수 있는 공간을 형성할 수 있다. 하지만, MBCP는 비교적 약한 물성과 BMP-2를 지속적으로 방출할 수 있는 전달체로서의 서방형 효과가 작다는 단점이 있다.
- [11] 콜라겐은 미국 FDA 및 우리나라 식약처의 허가를 받은 생체적합성 재료로서, BMP 전달체로 사용시 일반적으로 세포접착성이 우수하고 성형이 용이한 장점이 있다. 하지만 BMP와의 친화성이 비교적 낮으므로 콜라겐 BMP 전달체를 골결손부에 적용할 때, 고농도의 BMP 방출로 인하여 종창(swelling)이나 다른 문제점이 생길 수 있다는 단점이 있다.
- [12] 따라서, 본 발명이 속하는 기술분야에서는 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고 골이식재의 목적에 부합하는 이상적인 콜라겐 기반의 BMP 전달체 개발에 대한 요구가 여전히 존재한다.
- [13] 한편, 비스포스포네이트는 파골세포의 활성을 떨어뜨리는 역할을 하는 골흡수 억제제로서, 그 종류에는 경구투여용과 주사용이 있고, 다양한 효능세기의 약제가 개발되어 있으며, 대표적으로 알렌드로네이트, 졸레드로네이트, 이반드로네이트 등이 있으며 골다공증 및 파제씨 병의 치료와 악성종양의 골전이 억제 및 고칼슘증억제 등의 목적으로 많이 사용되고 있다. 또한, 최근 연구에서 비스포스포네이트는 골아세포와 중간엽줄기세포 등의 골분화를 유도하는 효과를 나타내는 것이 보고되고 있다. 그러나, 종래의 연구들은 비스포스포네이트가 파골세포 억제 효능 내지는 골분화 유도 효능을 갖는다는 것에 대해 주목하고 있을 뿐, 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐

기반의 전달체에 대해 미치는 영향, 특히 콜라겐 기반의 전달체에 담지된 BMP 방출에 대한 영향 등에 대해서는 전혀 주목하고 있지 않고 있다.

- [14] 이와 관련하여 S. Panzavolta 등의 논문에서는 콜라겐과 유사한 물질인 젤라틴을 α -TCP(tricalcium phosphate) 시멘트에 포함시켜 기계적 특성을 향상시키고, 젤라틴 함유에 의해 α -TCP 시멘트에 로딩되는 비스포스포네이트의 도입량을 높이는 것에 대해 개시하고 있다[S. Panzavolta et al. Functionalization of biomimetic calcium phosphate bone cements with alendronate, Journal of Inorganic Biochemistry 104 (2010) 1099-1106]. 그러나, 상기 선행기술은 인공 골이식재인 α -TCP 시멘트에 활성 성분인 비스포스포네이트를 다량 함유시키기 위해 젤라틴을 사용하고 있고 비스포스포네이트 자체를 유효성분으로서 이용하여 파골을 억제하는 것을 개시하고 있을 뿐, 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐 기반의 전달체에 대해 미치는 영향, 특히 콜라겐 기반의 전달체에 담지된 BMP 방출에 대한 영향 등에 대해서는 전혀 개시하거나 암시하고 있는 바가 없다.
- [15] 또한, 미국공개특허공보 제US 2007/0191851 A1호는 유효 성분을 담지하는 담체로서 콜라겐과, 이러한 콜라겐에 담지되는 유효 성분으로서 BMP, 비스포스포네이트 등을 사용하는 것을 개시하고 있다. 그러나, 상기 선행기술은 비스포스포네이트가 파골 억제제로서 사용되는 것과, BMP가 골유도물질로서 사용되는 것을 개별적으로 언급하고 있을 뿐, 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐 기반의 전달체에 대해 미치는 영향 등에 대해서는 전혀 개시하거나 암시하고 있지 않다. 즉, 상기 선행기술은 각 유효 성분의 개별적 효능에 입각하여 각 유효성분을 콜라겐 담체에 담지시키는 것을 개시하고 있을 뿐이며, 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐 기반의 전달체에 담지된 BMP 방출에 대해 미치는 영향 등에 대해서는 전혀 개시하거나 암시하고 있지 않다.
- [16] 또한, 국제공개특허공보 제WO 2002/098307 A1호는 비스포스포네이트가 콜라겐과 혼합된 것에 대해 개시하고 있고, 콜라겐과 비스포스포네이트 혼합조성을 뼈 고정기구에 코팅하여 골절부위의 치료를 도와 주는 것에 대해 개시하고 있다, 그러나, 상기 선행기술 역시 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐 기반의 전달체에 대해 미치는 영향 등에 대해서는 전혀 개시하거나 암시하고 있지 않다. 즉, 상기 선행기술은 비스포스포네이트의 파골 억제 효능 및 골유도 효능에 주목하여 비스포스포네이트를 골절 부위에 유효 약물 성분으로서 사용하는 것을 개시하고 있을 뿐이며, 비스포스포네이트가 콜라겐과 조합될 때 콜라겐 기반의 전달체에 담지된 BMP 방출에 대해 미치는 예기치 못한 영향 등에 대해서는 전혀 개시하거나 암시하고 있는 바가 없다.
- [17] 전술한 바와 같은 선행기술들의 문제점을 감안하여 본 발명자들은 콜라겐의 BMP와의 낮은 친화성을 보완하고 BMP의 골유도능을 증대하기 위한 기술 개발을 계속 거듭한 결과, 콜라겐 전달체에 비스포스포네이트를

함유시킴으로써 BMP의 방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있고, 골결손부에서 골형성 내지는 골재생을 촉진할 수 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

- [18] 또한, 본 발명자들은 헤파린을 콜라겐의 자유아민기와 공유 결합시키고 BMP와의 이온결합을 통해 콜라겐과 BMP의 결합에 필요한 매개 역할을 하게 함으로써 효율적으로 콜라겐 전달체의 BMP 지속성과 방출 속도를 조절하는 것도 확인하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 본 발명은 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유시킴으로써 BMP의 방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [20] 구체적으로, 본 발명은 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트를 함유시키고 선택적으로 헤파린을 고정하여 콜라겐 기반의 BMP 전달체에서 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고 BMP의 방출속도 및 방출정도를 조절할 수 있는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [21] 또한, 본 발명은 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 이용하여 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출함으로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진하는 과정을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [22] 추가로, 본 발명은 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 골결손부에 이식하여 적정 농도의 BMP가 지속적으로 방출되도록 함으로써 골형성 내지 골재생을 촉진하는 과정을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [23] 상기한 발명의 기술적 과제를 해결하고 상기한 발명의 목적에 부합되도록 예의 연구를 거듭한 결과, 본 발명자들은 콜라겐의 BMP와의 낮은 친화성을 보완하고 BMP의 골유도능을 증대하기 위해 비스포스포네이트 계열의 약물과 선택적으로 헤파린을 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 고안하기에 이르렀다.
- [24] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는,
- [25] 콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액을 혼합한 후 동결건조하여 얻은 콜라겐 지지체와, 이러한 콜라겐 지지체에 함유된 비스포스포네이트; 및
- [26] 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 담지되어 미리 결정된 시간 동안 지속적으로 방출되는 BMP를 포함한다. 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 비스포스포네이트를 함유함으로써 BMP의

방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 효율적으로 조절할 수 있다.

- [27] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 고정된 헤파린을 추가로 함유하는 것이 바람직하다. 이때, 헤파린은 콜라겐 지지체의 자유아민기와는 공유 결합을 하고 BMP와는 이온 결합을 함으로써 콜라겐 지지체와 BMP와의 결합에 필요한 매개 역할을 하게 된다. 따라서, 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 헤파린을 추가로 함유함으로써 BMP의 방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 더욱 효율적으로 조절할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에 있어서, 상기 콜라겐 지지체는 콜라겐에서 텔로펩타이드를 제거한 아텔로 콜라겐을 이온화한 것이 바람직하며, 더욱 바람직하기로는 양이온화 콜라겐 지지체이다. 예를 들어, 양이온화 콜라겐 지지체(또는 음이온화 콜라겐 지지체)는 표면에 양이온(또는 음이온)을 띠기 때문에 음전하(또는 양전하)를 띠는 물질과의 결합이 용이하게 되며 BMP 전달체 제조시 BMP와의 결합력을 증대시키고 일반 콜라겐 지지체에 비해 세포의 부착이 향상된다.
- [29] 이와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어인 "이온화 콜라겐"이란 양이온화 콜라겐 또는 음이온화 콜라겐을 포괄하는 것으로서, 당업계에 널리 알려진 동물조직의 전처리 과정 및 추출 과정을 통해 준비된 콜라겐을 이온화함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 일실시예의 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 구성하는 이온화 콜라겐은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 수득될 수 있다. 예를 들어 양이온화 콜라겐은 에탄올 또는 메탄올에 콜라겐을 넣은 후 에스테르화 과정을 거쳐 수득될 수 있고, 음이온화 콜라겐은 콜라겐과 숙신산 무수물을 반응시켜 수득될 수 있다(미국공개특허공보 US 2013/0071645 A1 및 US 2014/0377737 A1 참조). 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고, 양이온화 콜라겐 및 음이온화 콜라겐을 제조할 수 있는 다양한 공지의 방법들 중 어느 것이라도 사용가능함은 물론이다.
- [30] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에 있어서, 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체는 가교화되는 것이 바람직하며, EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) 용액으로 가교화되는 것이 더욱 바람직하다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 가교물질이 사용가능될 수 있음은 물론이다.
- [31] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에 있어서, EDC와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 MES(4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 헤파린을 용해시킨 용액으로 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체를 처리함으로써, 상기 헤파린은 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 고정될 수 있다.
- [32] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 하이드록시 아파타이트, 하이드록시 아파타이트와 TCP(tri-calcium phosphate)의 혼합물,

TCP(tri-calcium phosphate) 또는 동물의 뼈, 예를 들어 소뼈, 말뼈, 또는 돼지뼈를 추가로 포함할 수 있다. 이때 동물의 뼈는 단백질과 지방을 제거한 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 인체에 부작용 없이 적용가능한 동물의 뼈라면 어느 것이라도 사용될 수 있음은 물론이다.

- [33] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법은, 콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액을 혼합하는 단계와, 콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액의 혼합 용액을 동결건조하는 단계와, 동결건조하여 얻은 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 BMP를 담지하는 단계를 포함한다.
- [34] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법은, 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 헤파린을 고정하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 이때, 헤파린은 콜라겐 지지체의 자유아민기와는 공유 결합을 하고 BMP와는 이온 결합을 함으로써 콜라겐과 BMP의 결합에 필요한 매개 역할을 하게 된다.
- [35] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법에 있어서, 상기 콜라겐 지지체는 콜라겐에서 텔로펩타이드를 제거한 아텔로 콜라겐을 이온화한 것이 바람직하며, 더욱 바람직하기로는 양이온화 콜라겐 지지체이다.
- [36] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법에 있어서, 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체는 가교화되는 것이 바람직하며, EDC 용액으로 가교화되는 것이 더욱 바람직하다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 가교물질이 사용가능될 수 있음은 물론이다.
- [37] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법에 있어서, EDC와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 MES(4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 헤파린을 용해시킨 용액으로 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체를 처리함으로써, 상기 헤파린을 고정하는 단계가 수행될 수 있다.
- [38] 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법은 하이드록시 아파타이트, 하이드록시 아파타이트와 TCP(tri-calcium phosphate)의 혼합물, TCP(tri-calcium phosphate) 또는 동물의 뼈, 예를 들어 소뼈, 말뼈, 또는 돼지뼈를 추가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때 동물의 뼈는 단백질과 지방을 제거한 것이 바람직하다.
- [39] 또한, 본 발명의 일실시예의 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 예를 들어, 전술한 바와 같은 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있다.
- [40] 추가로, 본 발명의 골이식재는 전술한 바와 같은 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [41] 한편, 본 발명에 있어서, 비스포스포네이트는 알렌드로네이트(alendronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 이반드로네이트(ibandronate), 팔미드로네이트(pamidronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 리세드로네이트(risedronate), 틸루드로네이트(tiludronate), 인카드로네이트(incadronate), 올파드로네이트(olpadronate) 및 네리드로네이트(neridronate) 등일 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 비스포스포네이트가 사용될 수 있음은 물론이다.

발명의 효과

- [42] 본 발명에 따르면, 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유시킴으로써 BMP의 방출지속성, 방출속도 및 방출정도를 효율적으로 조절할 수 있다.
- [43] 구체적으로, 본 발명은 콜라겐 기반의 BMP 전달체에 비스포스포네이트를 함유시키고 선택적으로 헤파린을 고정하여 콜라겐 기반의 BMP 전달체에서 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고 BMP의 방출속도 및 방출정도를 효율적으로 조절할 수 있다.
- [44] 또한, 본 발명에 따르면, 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 이용하여 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출함으로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있다.
- [45] 추가로, 본 발명에 따르면, 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 함유한 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 골결손부에 이식하여 적정 농도의 BMP가 지속적으로 방출되도록 함으로써 골형성 내지 골재생을 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H)의 시간 경과에 따른 BMP-2 방출량을 비교하여 도시하는 그래프이다 (n=4, mean $\pm$ SE).
- [47] 도 2는 천연 콜라겐(이온화되지 않은 콜라겐) 단독 전달체(NC), 비스포스포네이트 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A), 헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/H), 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A/H)의 시간 경과에 따른 BMP-2 방출량을 비교하여 도시하는 그래프이다 (n=4, mean $\pm$ SE).
- [48] 도 3은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H), 배양 접시(C) 상에서 골분화 유도된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 알리자린 레드 에스 염색 사진이다. 도 3의 아래쪽 사진은 위쪽 사진을 100배 확대한 현미경 사진이다.

- [49] 도 4는 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H), 배양 접시(C) 상에서 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 칼슘 침착량을 비교하여 도시하는 막대그래프이다 [n=3, mean $\pm$ SE; * p<0.05, ** p<0.01 (이온화 콜라겐 단독 전달체에 대한 통계학적 유의수준); # p<0.05 (모든 전달체에 대한 통계학적 유의수준)].
- [50] 도 5는 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 코팅, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 코팅, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 코팅, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 코팅, 배양 접시(C) 상에서 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자(ALP, OCN 및 OPN) 발현량을 비교하여 도시하는 막대그래프이다 [n=3, mean $\pm$ SE; * p<0.05, ** p<0.01 (배양 접시에 대한 통계학적 유의수준); ## p<0.01 (이온화 콜라겐 단독 전달체에 대한 통계학적 유의수준)].
- [51] 도 6은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 스펀지, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 스펀지, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 스펀지, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 스펀지 상에서 골분화 유도 배양(3차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자(ALP, OCN 및 OPN) 발현량을 비교하여 도시하는 막대그래프이다 [n=6, mean $\pm$ SE; * p<0.05, ** p<0.01 (이온화 콜라겐 단독 전달체에 대한 통계학적 유의수준)].
- [52] 도 7은 백서 두개골 골결손부 모델에 이온화 콜라겐 전달체에 BMP를 함유하는 대조군과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐에 BMP를 함유하는 전달체를 각각 이식한 후, 4주 및 8주가 경과한 시점에서 비교 촬영한 마이크로 CT(micro-CT) 사진이다.
- [53] 도 8은 백서 두개골 골결손부 모델에 이온화 콜라겐 전달체에 BMP를 함유하는 대조군과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐에 BMP를 함유하는 전달체를 각각 이식한 후, 4주 및 8주가 경과한 시점에서 시행한 MT (Masson's trichrome) 염색 사진이다.
- [54] 도 9는 백서 두개골 골결손부 모델에 이온화 콜라겐 전달체 대조군들과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체를 각각 이식한 후, 4주 및 8주가 경과한 시점에서 측정한 두개골 결손부의 신생골 형성 관련 지표인 TV(tissue volume), BV(bone volume) 및 BV/TV를 비교하여 도시하는 막대그래프이다.
- [55] 도 10은 백서 두개골 골결손부 모델에 이온화 콜라겐 전달체 대조군들과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체를 각각 이식한 후, 4주 및 8주가 경과한 시점에서 측정한 두개골 결손부의 신생골 형성 관련 지표인 Tb.Th (trabecular thickness), Tb.N (trabecular number) 및 Tb.Sp (trabecular space)를 비교하여 도시하는 막대그래프이다.

- [56] 도 11은 백서 두개골 골결손부 모델에 이온화 콜라겐 전달체 대조군들과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체를 각각 이식한 후, 4주 및 8주가 경과한 시점에서 측정된 두개골 결손부의 신생골 형성 관련 지표인 BMD (bone mineral density)를 비교하여 도시하는 막대그래프이다.
- [57] 도 12는 이온화 콜라겐과 합성골의 비율, 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 여부에 따른 이온화 콜라겐/합성골 전달체의 BMP-2 방출량을 비교하여 도시하는 그래프이다 (n=4, mean $\pm$ SE). 도 12의 BMP-2 방출량 데이터는 이온화 콜라겐과 합성골의 질량비가 각각 100:0, 50:50, 10:90 및 5:95인 이온화 콜라겐/합성골 전달체로부터 얻었으며, 95:5(A/H)는 이온화 콜라겐과 합성골의 질량비가 95:5이면서 비스포스포네이트 및 헤파린이 함유된 이온화 콜라겐/합성골 전달체로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [58] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[59]

- [60] **실시예 1: 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 포함하는 이온화 콜라겐 전달체의 제조**

- [61] 우선, 이온화 콜라겐은 당업계에서 널리 알려진 동물조직의 전처리 과정, 추출 과정 및 이온화 과정을 통해 제조한다(예를 들어 미국공개특허공보 US 2013/0071645 A1 및 US 2014/0377737 A1 참조). 이러한 공지의 과정을 통해 준비된 이온화 콜라겐을 아래에서 기술하는 바와 같은 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 포함하는 이온화 콜라겐 전달체의 제조에 사용한다. 이온화 콜라겐으로는 텔로펩타이드가 제거된 이온화 아텔로 콜라겐을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일실시예의 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 포함하는 이온화 콜라겐 전달체의 제조방법은 다음과 같다.

- [62] (1) 정제수에 0~1% (w/v) 비스포스포네이트를 용해시킨다.
- [63] (2) 상기 (1)번 과정에서 얻은 비스포스포네이트 용액에 1% (w/v) 이온화 콜라겐을 용해시킨다.
- [64] (3) 상기 (2)번 과정에서 얻은 이온화 콜라겐/비스포스포네이트 용액을 분주하고 -40°C로 24시간 동안 동결건조하여 스펀지 형태의 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체를 제조한다.
- [65] (4) 상기 (3)번 과정에서 얻은 이온화 콜라겐 전달체를 70% 에탄올에 용해시킨 2 mM EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)

용액으로 4시간 동안 가교화한다.

[66] (5) 상기 (4)번 과정에서 얻은 가교화된 이온화 콜라겐 전달체를 정제수로 10분씩 10회 세척한다.

[67] (6) 상기 (5)번 과정에서 얻은 이온화 콜라겐 전달체 내에 헤파린을 고정하기 위해, 2 mM EDC와 1 mM NHS(N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 5 mM MES(4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 1% (w/v)의 헤파린을 용해시킨 용액으로 4시간 동안 반응시킨다. 반면에, 헤파린 고정을 필요로 하지 않는 이온화 콜라겐 전달체는 헤파린을 용해시키지 않은 2 mM EDC와 1 mM NHS를 포함하는 5 mM MES 버퍼에 반응시킨다.

[68] (7) 상기 (6)번 과정에서 MES 버퍼에 반응시킨 이온화 콜라겐 전달체를 정제수로 10분씩 10회 세척한다.

[69] (8) 상기 (7)번 과정에서 세척한 이온화 콜라겐 전달체를 -80°C로 동결한 후, 24시간 동안 건조한다.

[70] (9) 상기 (8)번 과정에서 얻은 이온화 콜라겐 전달체를 EO(Ethylene Oxide) 가스로 멸균처리한다.

[71]

[72] **실시예 2: 이온화 콜라겐 전달체에서의 BMP-2 방출속도 비교**

[73] 실시예 1에서 준비된 본 발명의 일실시예의 비스포스포네이트와 선택적으로 헤파린을 포함하는 이온화 콜라겐(이하, "비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐"으로 표기함)에서 방출되는 BMP-2의 양상을 측정하기 위하여 아래와 같은 과정을 수행하였다.

[74] (1) PBS 완충액에 BMP-2를 50 μ g/ml 용해시킨다.

[75] (2) 상기 (1)번 과정에서 얻은 BMP-2 용액 100 μ L를 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 이온화 콜라겐 전달체에 적신 후, 1시간 동안 상온보관한다.

[76] (3) 상기 (2)번 과정에서 BMP-2 용액에 적신 이온화 콜라겐 전달체를 PBS 완충액 2ml에 침지하여 37°C에서 15rpm의 조건으로 진탕배양기에서 보관한다.

[77] (4) 상기 (3)번 과정에서 이온화 콜라겐 전달체가 침지된 PBS 완충용액의 상층액을 정해진 시간대 별로 취하여 동결보존한다.

[78] (5) 상기 (4)번 과정에서 시간대 별로 상층액을 취한 후 남은 PBS 완충액을 버리고, 이온화 콜라겐 전달체를 새로이 PBS 완충액 2ml에 침지한 후 다시 진탕배양기에 보관한다.

[79] (6) 상기 (4)번 과정에서 취한 상층액을 BMP-2 ELISA 키트 (Antigenix America Inc., 미국)로 분석하여 이온화 콜라겐 전달체에서 방출된 BMP-2의 양을 측정한다.

[80] 그 결과는 도 1에 도시된 바와 같다(n=4, mean $\pm$ SE). 도 1에 도시된 바와 같이, 통상적인 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC)에 비해 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A)와, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H)에서 BMP-2 방출 속도가 지연되면서 제어되는 것을 확인할 수

있다.

- [81] 이러한 결과로부터 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 비스포스포네이트를 함유하지 않는 이온화 콜라겐 전달체에 비해 BMP의 방출을 지연시키고, 그 방출 속도 및 정도가 시간의 경과에 따라 일정하게 조절되는 것을 알 수 있다. 즉, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 이온화 콜라겐 전달체 내에 비스포스포네이트 계열의 약물을 함유시킴으로써, BMP와 함께 골형성을 촉진하는 효능 외에 BMP의 지속적인 방출을 유지하며 BMP의 방출 속도를 일정하게 제어하는 효능을 나타낸다.
- [82] 또한, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서는 콜라겐을 메탄올 또는 에탄올 등으로 화학적 처리를 함으로써 양이온화한 경우에 변형된 콜라겐의 표면이 양이온을 띠기 때문에 음전하를 띠는 물질과의 결합이 용이하게 되며, BMP 전달체 제조시 BMP와의 결합력을 증대시키고 일반 콜라겐에 비해 세포의 부착이 향상된다.
- [83] 뿐만아니라, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서는 헤파린을 콜라겐의 자유아민기와 공유 결합시키고 BMP와의 이온결합을 통해 콜라겐과 BMP의 결합에 필요한 매개 역할을 하게 함으로써 효율적으로 콜라겐 전달체의 BMP 지속성과 방출 속도를 조절할 수 있다.
- [84] 이러한 결과들을 종합할 때, 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체가 이온화 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, BMP의 방출 지속성을 유지할 수 있고, 또한 BMP의 방출 속도 및 방출 정도를 효율적으로 조절할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [85]
- [86] **실시예 3: 천연 콜라겐 전달체에서의 rhBMP-2 방출속도 비교**
- [87] 실시예 2에서는 이온화 콜라겐을 이용한 전달체에 대해 BMP-2 방출속도를 측정한 반면에, 본 실시예에서는 이온화 콜라겐 대신에 천연 콜라겐(이온화되지 않은 콜라겐)을 이용한 전달체를 이용하여 BMP-2 방출 속도를 측정하였다.
- [88] 이온화 콜라겐을 이용하는 대신에 천연 콜라겐을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 방법에 따라 천연 콜라겐 단독 전달체(NC) 스펀지, 비스포스포네이트 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A) 스펀지, 헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/H) 스펀지, 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A/H) 스펀지를 준비한다.
- [89] 준비된 전달체 스펀지 각각에 5 μ g의 rhBMP-2를 담지시킨 후 PBS/CaCl₂ 완충액 2ml(2.5mM Ca²⁺)에 침지하여 37°C에서 15rpm의 조건으로 진탕배양기에서 보관한다. 그리고 나서, 실시예 2와 같은 방법으로 각 시간대 별(0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 시간)로 상층액을 취하여 보관한 후 BMP-2의 양을 측정한다.
- [90] 그 결과는 도 2에 도시된 바와 같다(n=4, mean $\pm$ SE). 도 2에 도시된 바와 같이,

천연 콜라겐 단독 전달체(NC)에 비해 비스포스포네이트 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A)와, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체(NC/A/H)에서 BMP-2 방출 속도가 지연되면서 제어되는 것을 확인할 수 있다. 즉, 천연 콜라겐을 기초로 한 비스포스포네이트/헤파린 함유 전달체 역시 이온화 콜라겐을 기초로 한 비스포스포네이트/헤파린 함유 전달체에 대등한 BMP-2 방출 지연 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

- [91] 이러한 결과로부터 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 천연 콜라겐 전달체는 비스포스포네이트를 함유하지 않는 천연 콜라겐 전달체에 비해 BMP의 방출을 지연시키고, 그 방출 속도 및 정도가 시간의 경과에 따라 일정하게 조절되는 것을 알 수 있다. 즉, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 천연 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 천연 콜라겐 전달체 내에 비스포스포네이트 계열의 약물을 함유시킴으로써, BMP와 함께 골형성을 촉진하는 효능 외에 BMP의 지속적인 방출을 유지하며 BMP의 방출 속도를 일정하게 제어하는 효능을 나타낸다.
- [92] 뿐만아니라, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 천연 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서는 헤파린을 콜라겐의 자유아민기와 공유 결합시키고 BMP와의 이온결합을 통해 콜라겐과 BMP의 결합에 필요한 매개 역할을 하게 함으로써 효율적으로 콜라겐 전달체의 BMP 지속성과 방출 속도를 조절할 수 있다.
- [93] 이러한 결과들을 종합할 때, 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 천연 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 역시 천연 콜라겐과 BMP의 친화성을 높임으로써, BMP의 방출 지속성을 유지할 수 있고, 또한 BMP의 방출 속도 및 방출 정도를 효율적으로 조절할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [94]
- [95] **실시예 4: 비스포스포네이트/헤파린을 포함하는 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화 확인 시험**
- [96] 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체 상에서의 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화 효능을 확인하기 위하여 아래와 같은 시험관내 시험을 실시하였다.

[97]

[98] **실시예 4-1: 골수 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양**

[99] (1) 정제수에 0~1% (w/v) 비스포스포네이트를 용해시킨다.

[100] (2) 상기 (1)번 과정에서 얻은 비스포스포네이트 용액에 1% (w/v) 이온화 콜라겐을 용해시킨다.

[101] (3) 상기 (2)번 과정에서 얻은 콜라겐/비스포스포네이트 용액을 배양접시에 분주하여 완전히 건조한 후, 70% 에탄올에 용해시킨 2 mM EDC용액으로 4시간 동안 가교화하고 정제수로 세척한다.

[102] (4) 상기 (3)번 과정에서 준비된 배양접시에 헤파린을 고정하기 위해, 2 mM

EDC와 1 mM NHS를 포함하는 5 mM MES 버퍼에 1% (w/v)의 헤파린을 용해시킨 용액으로 배양접시를 4시간 반응시킨다. 반면에, 헤파린 고정을 필요로 하지 않는 경우, 헤파린을 용해시키지 않은 2 mM EDC와 1 mM NHS를 포함하는 5 mM MES 버퍼에 배양접시를 반응시킨다.

[103] (5) 상기 (4)번 과정에서 준비된 배양접시를 PBS 완충액으로 세척한다.

[104] (6) 상기 (5)번 과정에서 세척된 배양접시에 SD 래트(Sprague Dawley rat)에서 분리한 골수 유래 중간엽 줄기세포 1×10^4 개를 접종하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 골분화를 유도하면서 배양한다. 여기서, 골분화 유도 배양을 위한 배양액으로 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 1% 항생제를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 고농도 글루코오스)에 골분화 유도제 (10^{-8} M 텍사메타손, 50 µg/ml 아스코르브산, 10 mM β-글리세로포스페이트)를 추가하여 사용한다. 배양하는 동안 2-3일마다 배양액을 교체한다.

[105]

[106] 실시예 4-2: 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 알리자린 레드 에스 염색

[107] 골분화된 세포의 석회화를 비색정량하기 위하여 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포에 대한 알리자린 레드 에스 염색을 하기와 같이 실시하였다. 또한, 대비를 위해 실시예 4-1과 동일한 방법으로 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 및 배양 접시(C) 등에서 2주 동안 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포에 대해서도 하기와 같은 방법에 따라 알리자린 레드 에스 염색을 실시하였다.

[108] (1) 실시예 4-1의 방법으로 2주 동안 배양한 골수 유래 중간엽 줄기세포를 10% 포르말린으로 15분간 고정된 후, PBS 완충액으로 3회 세척한다.

[109] (2) 상기 (1)번 과정에서 고정된 세포를 2% (w/v) 알리자린 레드 에스 용액에 20분간 침지한 후, PBS 완충액으로 5회 세척한다.

[110] 그 결과가 도 3에 도시되어 있다. 도 3에 도시된 바와 같이, 알리자린 레드 에스 염색을 통하여 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 상에서의 골수 유래 중간엽 줄기세포가 붉게 염색됨으로써 골분화로 인한 석회화를 관찰하였다. 이들 결과는 배양접시(C)에서 배양한 줄기세포에 대한 염색 결과에 비해 확연한 차이를 나타내었다. 또한, 알리자린 레드 에스 염색 결과, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A)와 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H)가 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 보다 더 붉은 색을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[111] 이러한 결과들로부터 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화

콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체가 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고, 이로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[112]

[113] 실시예 4-3: 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 칼슘 침착 정량

[114] 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 칼슘 침착량을 확인하기 위하여 실시예 4-1의 방법으로 2주 동안 배양한 골수 유래 중간엽 줄기세포에 0.5 N HCl을 가하고 그 상층액의 칼슘 침착량을 QuantiChrom™ 칼슘 어세이 키트(QuantiChrom™ Calcium Assay Kit)(BioAssay Systems, 미국)로 측정하였다. 또한, 대비를 위해 실시예 4-1과 동일한 방법으로 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 및 배양 접시(C) 등에서 2주 동안 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포에 대해서도 각각 0.5 N HCl을 가하고 그 상층액의 칼슘 침착량을 QuantiChrom™ 칼슘 어세이 키트(BioAssay Systems, 미국)로 측정하였다.

[115] 그 결과는 도 4에 도시된 바와 같다. 도 4에 도시된 바와 같이, 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 상에서 골분화 유도 배양한 골수 유래 중간엽 줄기세포의 칼슘 침착량은 배양접시(C)와 대비하여 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A)와, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H)에서의 칼슘 침착량은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC)에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 추가로, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H)에서의 칼슘 침착량은 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A)에 비해 낮은 값을 보였으나 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 보다는 대체적으로 높은 값을 나타냈다.

[116] 이러한 결과들로부터 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체가 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고, 이로써 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있을 뿐만 아니라 나아가서는 골결손부에서 골형성 내지 골재생을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있다.

[117]

[118] 실시예 4-4: 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자 발현량 확인

[119] 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자 발현량을 확인하기 위하여 하기와 같은 과정을 수행하였다. 또한, 대비를 위해

실시에 4-1과 동일한 방법으로 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC), 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H), 및 배양 접시(C) 등에서 2주 동안 골분화 유도 배양(2차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포에 대해서도 하기와 같은 방법에 따라 골형성 인자 발현량을 확인하였다.

- [120] (1) 실시예 4-1의 방법으로 2주 동안 배양한 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 전체 mRNA를 RNeasy 미니 키트(RNeasy Mini kit)(Qiagen, 미국)를 사용하여 추출하였다.
- [121] (2) 상기 (1)번 과정에서 추출한 골수 유래 중간엽 줄기세포의 전체 mRNA를 옴니스크립트 RT 키트(Omniscrypt RT kit)(Qiagen, 미국)를 사용하여 역전사반응시켜 cDNA를 얻었다.
- [122] (3) 상기 (2)번 과정에서 얻은 cDNA를 이용하여 리얼타임 PCR (Polymerase chain recation)을 수행하였다. 골분화 유도 배양된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 유전자(ALP, OCN 및 OPN) 증폭용 프라이머 쌍의 염기 서열은 하기 표 1과 같다.
- [123] [표1]
골형성 유전자(ALP, OCN 및 OPN) 증폭용 프라이머 쌍의 염기서열

서열번호	프라이머 염기서열 (5'→3')	타겟 유전자
서열번호 1	정방향: AGGCAGGATTGACCACGG	ALP (Alkaline phosphatase)
서열번호 2	역방향: TGTAGTTCTGCTCATGGA	
서열번호 3	정방향: AAAGCCCAGCGACTCTC	OCN (Osteocalcin)
서열번호 4	역방향: CTAAACGGTGGTGCCATAGAT	
서열번호 5	정방향: CGACGGCCGAGGTGATAGCTT	OPN (Osteopontin)
서열번호 6	역방향: CATGGCTGGTCTTCCCGTTGCC	
서열번호 7	정방향: AACCCATCACCATCTTCCAGG	GAPDH(housekeeping gene)
서열번호 8	역방향: GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	

- [124] 골형성 유전자(ALP, OCN 및 OPN) 발현량에 대한 결과는 도 5에 도시된 바와 같다. 도 5에 도시된 바와 같이, 대체적으로 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 코팅, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 코팅, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 코팅, 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 코팅 상에서의 골분화 인자의 발현량(즉 ALP, OCN 및 OPN의 발현량)은 배양접시(C) 상에서의 골분화 인자의 발현량에 비해 높은 값을 나타냈다.
- [125] 또한, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 코팅과, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 코팅 상에서의

골분화 인자의 발현량은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 코팅에 비해 통계학적으로 유의성을 갖고 높게 나타났다. 추가로, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 코팅은 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 코팅 및 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 코팅 보다 높은 골분화 인자의 발현량을 보였다. OPN 유전자의 경우, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 코팅이 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 코팅에 비해 유의적으로 높은 발현량을 보였다.

[126] 이러한 결과들로부터도 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있을 뿐만 아니라 나아가서는 골결손부에서 골형성 내지 골재생을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있다.

[127]

[128] 실시예 4-5: 골분화 유도 배양(3차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자 발현량 확인

[129] 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체에서 골분화 유도 배양(3차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골형성 인자 발현량을 확인하기 위하여 하기와 같은 과정을 수행하였다. 즉, 실시예 1의 방법에 따라 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 스펀지, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 스펀지, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 스펀지, 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 스펀지를 준비하였다. 이들 스펀지 각각에 실시예 2와 같은 방식으로 10 ng의 BMP-2를 담지시킨 후 BMP-2가 담지된 각각의 스펀지에서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 2주 동안 3차원 배양하였다. 각각의 스펀지에서 2주 동안 골분화 유도 배양(3차원 배양)된 골수 유래 중간엽 줄기세포에 대해 실시예 4-4와 같은 방법에 따라 골형성 인자 발현량을 확인하였다.

[130] 그 결과는 도 6에 도시된 바와 같다. 도 6에 도시된 바와 같이, 대체적으로 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 스펀지, 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 스펀지, 그리고 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 스펀지 상에서의 골분화 인자의 발현량(즉 ALP, OCN 및 OPN의 발현량)은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 스펀지 상에서의 골분화 인자의 발현량에 비해 높은 값을 나타냈다. 또한, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 스펀지와, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 스펀지 상에서의 골분화 인자의 발현량은 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 스펀지에 비해 통계학적 유의성을 갖고 높게 나타났다. 추가로, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A) 스펀지는 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 스펀지 및 이온화 콜라겐 단독 전달체(EC) 스펀지 보다 높은 골분화 인자의 발현량을 보였다. OCN 유전자의 경우, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/A/H) 스펀지가

헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체(EC/H) 스펀지에 비해 유의적으로 높은 발현량을 보였다.

- [131] 이러한 결과들로부터도 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진할 수 있을 뿐만 아니라 나아가서는 골결손부에서 골형성 내지 골재생을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있다.

[132]

[133] **실시예 5: 동물실험 모델을 통한 골재생 효능 시험**

- [134] 본 실시예에서는 비스포스포네이트/헤파린 함유 이온화 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 생체내 효능(생체내 골형성 내지 골재생 효능)을 확인하기 위하여 백서의 두개골 모델을 이용하였다. 그리고, 아래의 과정에 따라 골형성 내지 골재생 효능 시험을 수행하였다. 또한, 대비를 위해 이온화 콜라겐 전달체 대조군(BMP 없는 것 및/또는 비스포스포네이트 없는 것)에 대해서도 아래의 과정에 따라 골형성 내지 골재생 효능 시험을 수행하였다.

- [135] (1) 백서를 전신마취를 시행한 후, 두개골의 수술부위를 절개하고 외경 8mm의 드릴을 이용하여 골결손부를 형성한다.

- [136] (2) 실시예 1의 방법으로 제조한 비스포스포네이트 및 헤파린을 함유하는 이온화 콜라겐 전달체와, 이온화 콜라겐 전달체 대조군을 각각 상기 (1)번 과정에서 형성한 백서 두개골 결손부에 충전한다. 이때, 충전되는 콜라겐 전달체는 이온화 콜라겐 단독으로 이루어진 전달체 그룹(Native collagen group)과, 비스포스포네이트 및 헤파린을 함유하는 이온화 콜라겐 전달체 그룹으로 나눈 후, 이들 각각의 그룹을 다시 BMP-2를 40 μ g 담지한 그룹과 담지하지 않는 그룹으로 추가로 나누어 시험을 진행한다.

- [137] (3) 수술 후 4주 및 8주가 경과한 시점에서, 콜라겐 전달체 각각을 충전한 백서의 두개골 결손부의 마이크로 CT(micro-CT) 사진을 촬영하고 이식 주변 조직을 회수하여 MT(Masson's trichrome) 염색을 실시한다. 또한, 이와 같이 촬영된 마이크로 CT를 통해, 콜라겐 전달체 각각을 충전한 두개골 결손부의 신생골 형성에 관련된 지표들을 측정 및 계산한다.

- [138] 그 결과가 도 7의 마이크로 CT 사진과 도 8의 MT(Masson's trichrome) 염색 사진에 도시되어 있다. 도 7 및 도 8에 도시된 바와 같이, 콜라겐 전달체 각각을 백서 두개골 골결손부에 이식한 후 4주 및 8주가 경과 한 시점에서 이식 부위를 관찰한 결과, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린을 함유하는 이온화 콜라겐 전달체가 BMP 만을 담지한 이온화 콜라겐 단독 전달체 보다 신생골의 형성을 더 촉진하였음을 확인할 수 있다.

- [139] 또한, 두개골 결손부의 신생골 형성에 관련된 지표들을 측정 및 계산한 결과는 도 9 내지 도 11에 비교 도시되어 있다.

- [140] 도 9에 도시된 바와 같이, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 BMP 만을 담지한 이온화 콜라겐 단독 전달체에 비해

BV(bone volume) 및 BV(bone volume)/TV(tissue volume)(%)의 값들이 높은 것을 알 수 있다. TV(tissue volume)값은 새로 생성된 조직(예를 들어, 골 및 육아 조직, 연조직 등)의 양을 나타내고, BV값은 새로 생성된 골 조직의 양을 나타내며, BV/TV(%) 값은 새로 생성된 조직의 양에서 골조직이 차지하는 비율을 나타낸다. BV값과 BV/TV(%)값이 높다는 것은 새로 생성된 골 조직의 절대적 양과 상대적 양이 많다는 것을 의미한다. 따라서, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 골조직 재생에 효과적이고, BMP의 문제점 중 하나인 골과 관계없는 주변 조직도 함께 성장 촉진되어 나타나는 종창 현상 및 골이식부 자체 내의 부종으로 인한 골이식체의 퍼짐 현상을 줄일 수 있다.

[141] 다음으로, 도 10을 참조하면, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 BMP 만을 담지한 이온화 콜라겐 단독 전달체에 비해 소주(trabecular)(골에서 기둥 모양의 골 조직을 지칭함)의 두께(trabecular thickness; Tb.Th로 약칭)가 두껍고, 소주의 개수(trabecular number; Tb.N으로 약칭)가 많으며, 소주의 간격(trabecular space; Tb.Sp로 약칭)이 좁은 것을 확인할 수 있다. 소주의 개수가 많고 소주의 간격이 좁을 수록 형성된 골이 치밀하고, 소주의 개수와 소주 간의 거리가 같다면 소주의 두께가 두꺼울 수록 형성된 골이 단단하다. 따라서, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 골결손이 일어난 두개골 부위에서 골을 치밀하면서도 단단하게 재생할 수 있다.

[142] 또한, 도 11을 참조하면, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 BMP 만을 담지한 이온화 콜라겐 단독 전달체에 비해 BMD(bone mineral density), 즉 골밀도가 높은 것을 확인할 수 있다. BMD(bone mineral density)는 아주 작은 차이라도 임상적 효과는 대단히 큰 차이를 나타내는 대표적 골 지표로서, 1 표준편차는 대략 10-15% 골밀도 수치(g/cm^2)의 차이를 의미한다. 따라서, BMP를 담지한 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체는 골결손이 일어난 두개골 부위에서 골밀도를 효과적으로 높일 수 있다.

[143] 이러한 결과들로부터, 이온화 콜라겐 단독으로 이루어진 전달체 보다 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐 전달체에서 두개골 결손부의 신생골 형성과 관련된 지표가 더 우수하다고 할 수 있다.

[144]

[145] 실시예 6: 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐/합성골 전달체 제조

[146] 본 발명의 일실시예의 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐/합성골 전달체의 제조방법은 다음과 같다. 본 실시예에서는 예시로서 합성골을 하이드록시 아파타이트와 TCP(tri-calcium phosphate)가 6:4 (질량비)로 혼합된 것[상품명: MBCP (미국 Keystone Dental, Inc. 제품)]을 사용한다.

- [147] (1) 정제수에 2.5% (w/v) 이온화 콜라겐을 용해시킨다. 또한, 비스포스포네이트 및 헤파린 함유 이온화 콜라겐/합성골 전달체를 제조하기 위해 0.1% (w/v) 비스포스포네이트 용액에 2.5% (w/v) 이온화 콜라겐을 용해시킨다.
- [148] (2) 상기 (1)번 과정에서 얻은 이온화 콜라겐 용액에 합성골을 혼합한다. 이때, 이온화 콜라겐과 합성골의 비율은 질량을 기준으로 100:0, 50:50, 10:90, 5:95로 한다. 한편, 비스포스포네이트와 이온화 콜라겐의 혼합 용액에는 5:95의 질량비로 합성골을 혼합한다.
- [149] (3) 상기 (2)번 과정에서 얻은 혼합물을 40°C에서 24시간 동안 동결건조한다.
- [150] (4) 상기 (3)번 과정에서 동결건조한 혼합물을 70% 에탄올에 용해시킨 5 mM EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) 용액으로 4시간 동안 가교화한다.
- [151] (5) 상기 (4)번 과정에서 가교화한 전달체를 정제수로 10분씩 10회 세척한다. 한편, 비스포스포네이트 함유 이온화 콜라겐/합성골 전달체는 헤파린을 고정하기 위해, 5 mM EDC와 1 mM NHS (N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 5 mM MES (4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 1% (w/v)의 헤파린을 용해시킨 용액으로 4시간 동안 반응시킨다.
- [152] (6) 상기 (5)번 과정에서 헤파린을 고정시킨 전달체를 정제수로 10분씩 10회 세척한 후, -80°C에서 동결하여 24시간 동안 건조한다.

[153]

[154] 실시예 7: 이온화 콜라겐/합성골 전달체에서의 BMP-2 방출속도 비교

[155] 본 발명의 일실시예의 이온화 콜라겐/합성골 전달체에서 방출되는 BMP-2의 양상을 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

- [156] (1) PBS 완충액에 BMP-2를 50 μ g/ml 용해시킨다.
- [157] (2) 상기 (1)번 과정에서 얻은 BMP-2 용액 100 μ L를 실시예 6의 방법으로 제조한 이온화 콜라겐/합성골 전달체에 적신 후, 1시간 동안 상온보관한다.
- [158] (3) BMP-2 용액에 적신 이온화 콜라겐/합성골 전달체를 PBS 완충액 2ml에 침지하여 37°C에서 15rpm의 조건으로 진탕배양기에서 보관한다.
- [159] (4) 상기 (3)번 과정에서 이온화 콜라겐/합성골 전달체가 침지된 PBS 완충용액의 상층액을 정해진 시간대 별로 취하여 동결보존한다.
- [160] (5) 상기 (4)번 과정에서 시간대 별로 상층액을 취한 후 남은 PBS 완충액을 버리고, 이온화 콜라겐/합성골 전달체를 새로이 PBS 완충액 2ml에 침지한 후 다시 진탕배양기에 보관한다.
- [161] (6) 상기 (4)번 과정에서 취한 상층액을 BMP-2 ELISA 키트 (Antigenix America Inc., 미국)로 분석하여 이온화 콜라겐/합성골 전달체에서 방출된 BMP-2의 양을 측정한다.
- [162] 그 결과, 이온화 콜라겐과 합성골의 질량비가 각각 100:0, 50:50, 10:90 및 5:95인 이온화 콜라겐/합성골 전달체로부터 BMP-2 방출량 데이터를 얻었으며, 또한 이온화 콜라겐과 합성골의 질량비가 95:5이면서 비스포스포네이트 및 헤파린이

함유된 이온화 콜라겐/합성골 전달체(95:5(A/H))로부터 BMP-2 방출량 데이터를 얻었다.

- [163] 도 12에 도시된 바와 같이, 이온화 콜라겐과 합성골의 비율을 달리한 이온화 콜라겐/합성골 전달체에서의 BMP-2 방출 양상을 측정한 결과, 48시간 동안 773 ± 60 ng (100:0), 559 ± 40 ng (50:50), 494 ± 29 ng (10:90), 395 ± 31 ng (5:95)의 BMP-2가 방출되었으며, 이로부터 합성골의 비율이 높을수록 BMP-2의 방출 속도가 지연되는 것을 확인할 수 있다.
- [164] 또한, 비스포스포네이트 및 헤파린의 포함 유무에 따른 전달체의 BMP-2 방출량을 비교했을 경우, 비스포스포네이트 함유 및 헤파린 고정 이온화 콜라겐/합성골 전달체에서는 48시간 동안 168 ± 17 ng의 BMP-2가 방출되어 이온화 콜라겐/합성골로만 이루어진 전달체 보다 방출량이 적은 것으로 확인되었다. 따라서, 이온화 콜라겐/합성골 전달의 경우에도 비스포스포네이트 및 헤파린의 방출 지연 효과를 확인할 수 있다.
- [165] 전술한 바와 같은 실시예들의 결과들을 종합할 때, 본 발명의 비스포스포네이트/헤파린 함유 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체는 골결손부에 적용 시 적정 농도의 BMP를 지속적으로 방출할 수 있고, 이로 인해 골수 유래 중간엽 줄기세포의 골분화를 유도 및 촉진함으로써 골결손부에서 골형성 내지는 골재생을 촉진할 수 있는 장점이 있다고 할 수 있다.
- [166] 이상 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

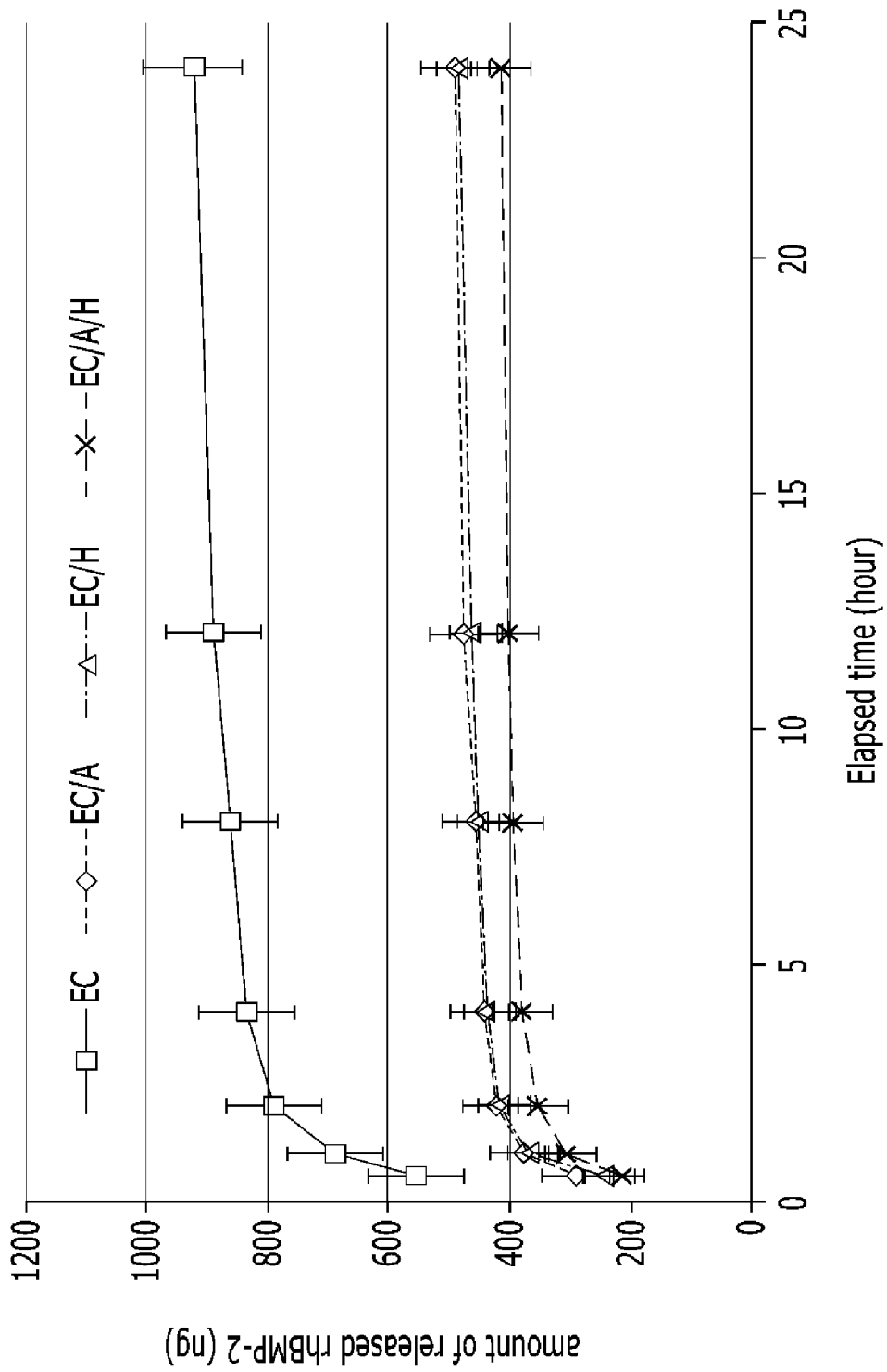
청구범위

- [청구항 1] 콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액을 혼합한 후 동결건조하여 얻은 콜라겐 지지체와, 이러한 콜라겐 지지체에 함유된 비스포스포네이트; 및 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 담지되어 미리 결정된 시간 동안 지속적으로 방출되는 BMP를 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 고정된 헤파린을 추가로 함유하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 고정된 헤파린은 상기 콜라겐 지지체의 자유아민기와는 공유 결합을 하고 상기 BMP와는 이온 결합을 함으로써 상기 콜라겐 지지체와 상기 BMP와의 결합에 필요한 매개 역할을 하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체는 이온화 콜라겐 지지체인 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체는
EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) 용액으로 가교화되는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 6] 제2항 또는 제3항에 있어서,
EDC와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 MES(4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 헤파린을 용해시킨 용액으로 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체를 처리함으로써, 상기 헤파린이 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 고정되는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
하이드록시 아파타이트, 하이드록시 아파타이트와 TCP(tri-calcium phosphate)의 혼합물, TCP(tri-calcium phosphate), 소뼈, 말뼈 및 돼지뼈로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체.
- [청구항 8] 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법에 있어서,
콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액을 혼합하는 단계와,
콜라겐 용액과 비스포스포네이트 용액의 혼합 용액을 동결건조하는 단계와,

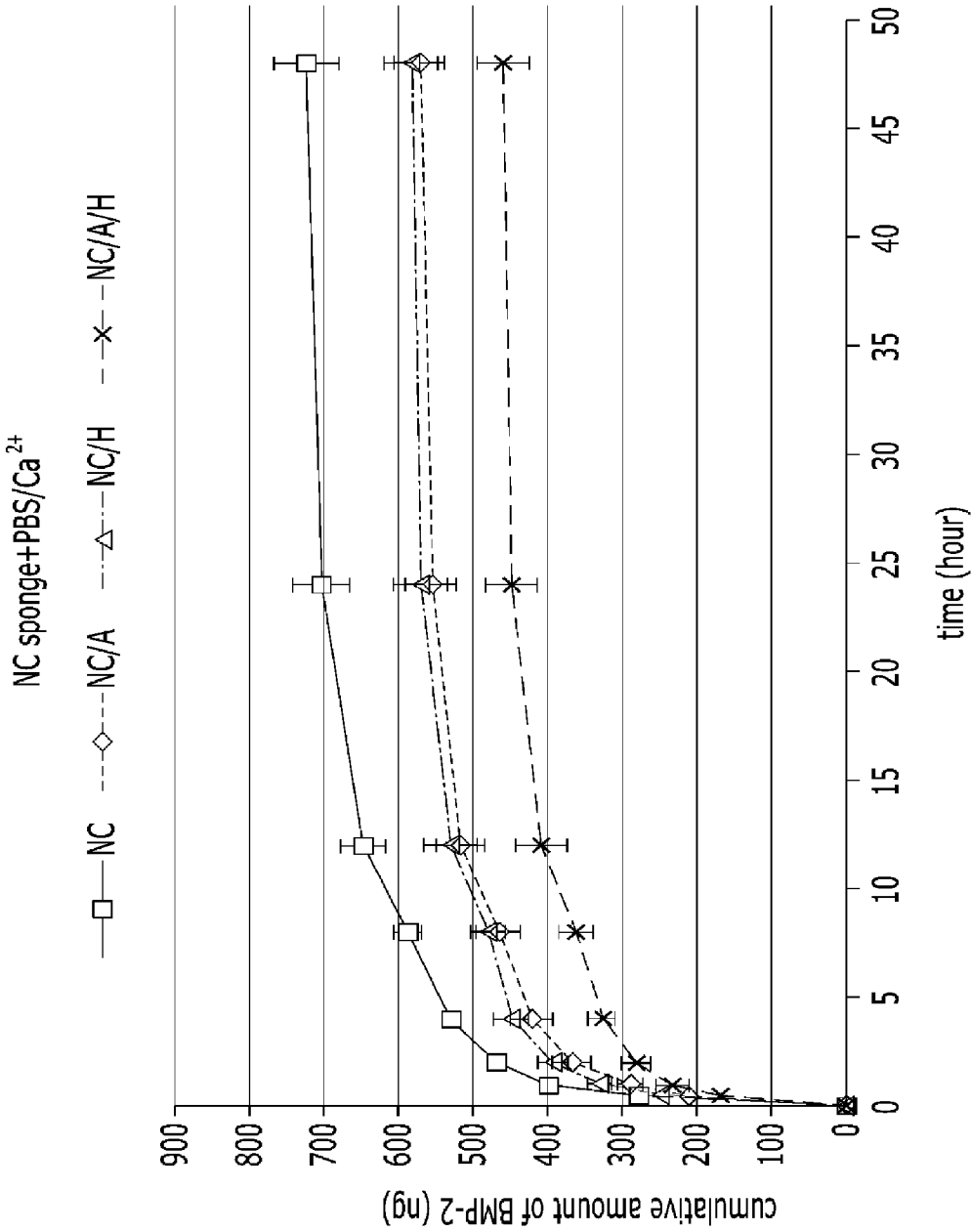
동결건조하여 얻은 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 BMP를 담지하는 단계를 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.

- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 헤파린을 고정하는 단계를 더 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 고정된 헤파린은 상기 콜라겐 지지체의 자유아민기와는 공유 결합을 하고 상기 BMP와는 이온 결합을 함으로써 상기 콜라겐 지지체와 상기 BMP와의 결합에 필요한 매개 역할을 하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 11] 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체는 이온화 콜라겐 지지체인 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 12] 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체를
EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) 용액으로 가교화하는 단계를 더 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 13] 제9항 또는 제10항에 있어서,
EDC와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 포함하는 MES(4-Morpholine ethane sulfonic acid) 버퍼에 헤파린을 용해시킨 용액으로 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체를 처리함으로써, 상기 헤파린을 상기 비스포스포네이트가 함유된 콜라겐 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 14] 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
하이드록시 아파타이트, 하이드록시 아파타이트와 TCP(tri-calcium phosphate)의 혼합물, TCP(tri-calcium phosphate), 소뼈, 말뼈 및 돼지뼈로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나를 추가하는 단계를 더 포함하는 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체의 제조방법.
- [청구항 15] 제7항에 기재된 콜라겐 기반의 서방형 BMP 전달체를 포함하는 골이식재.

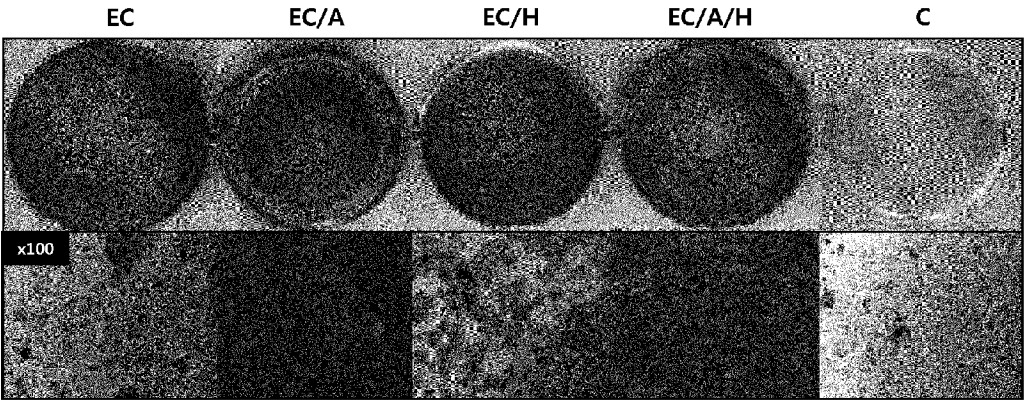
[도1]



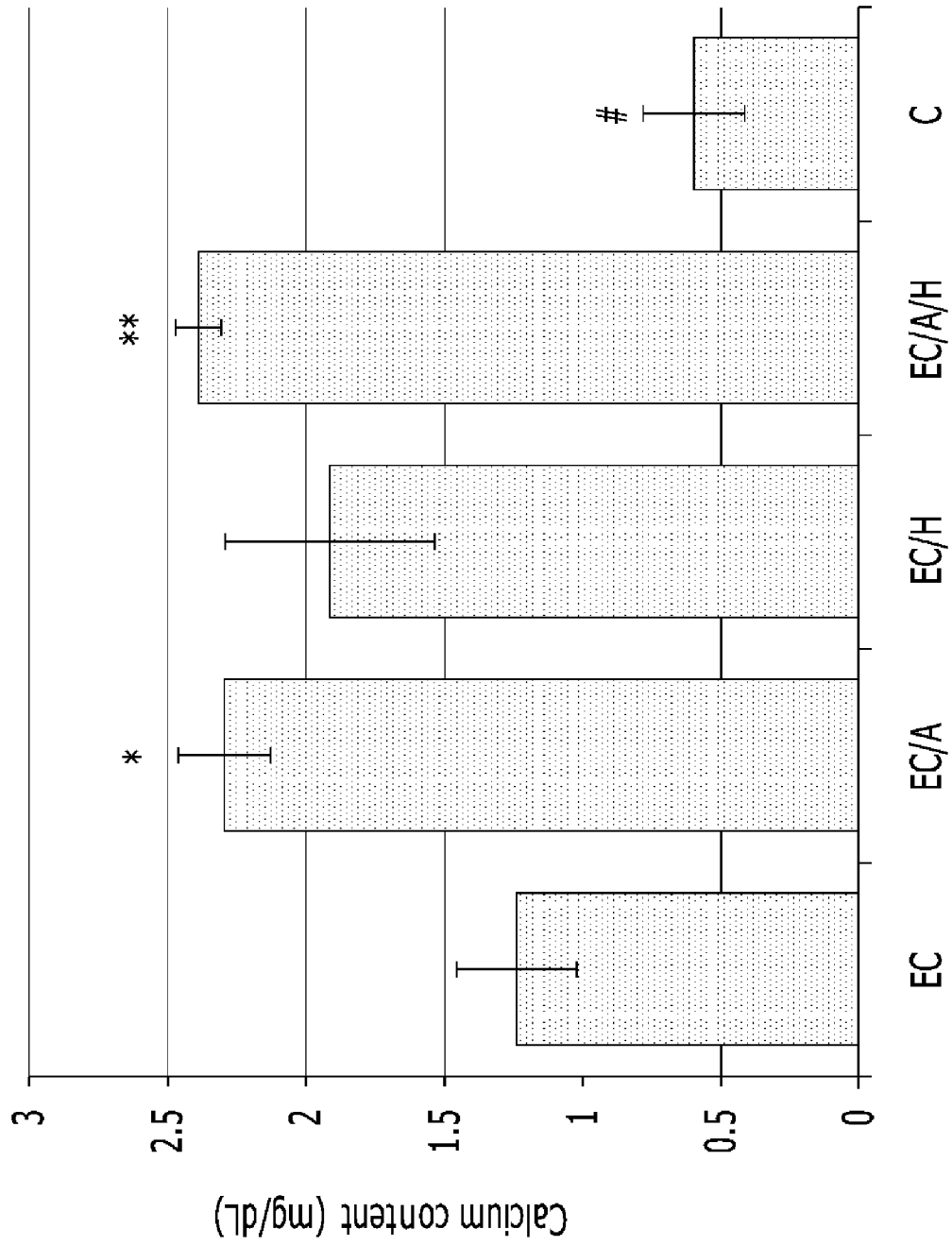
[도2]



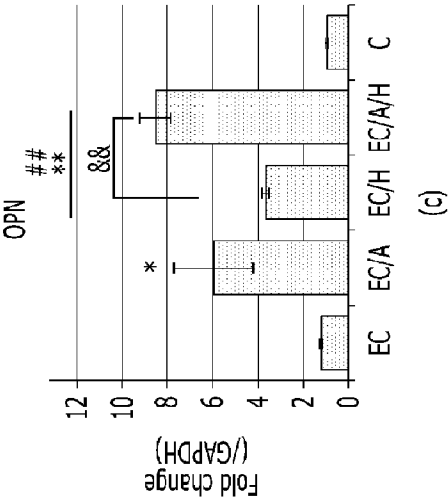
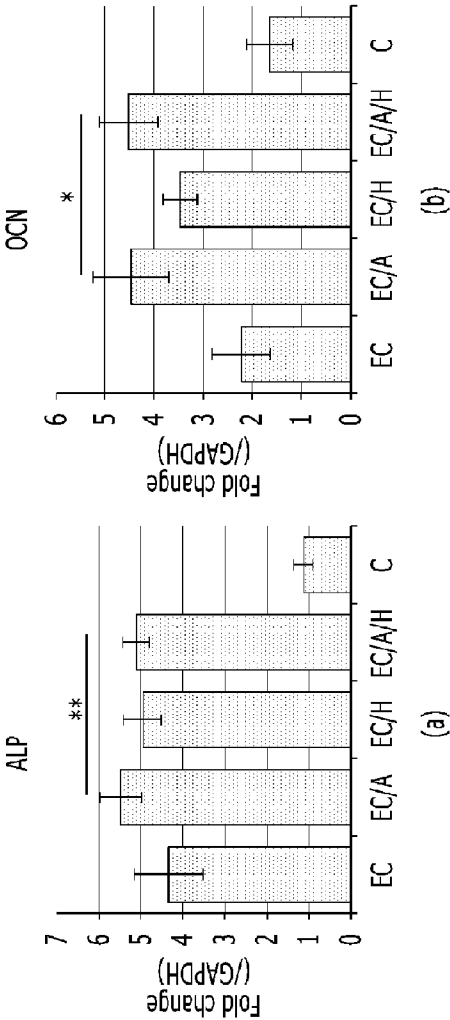
[도3]



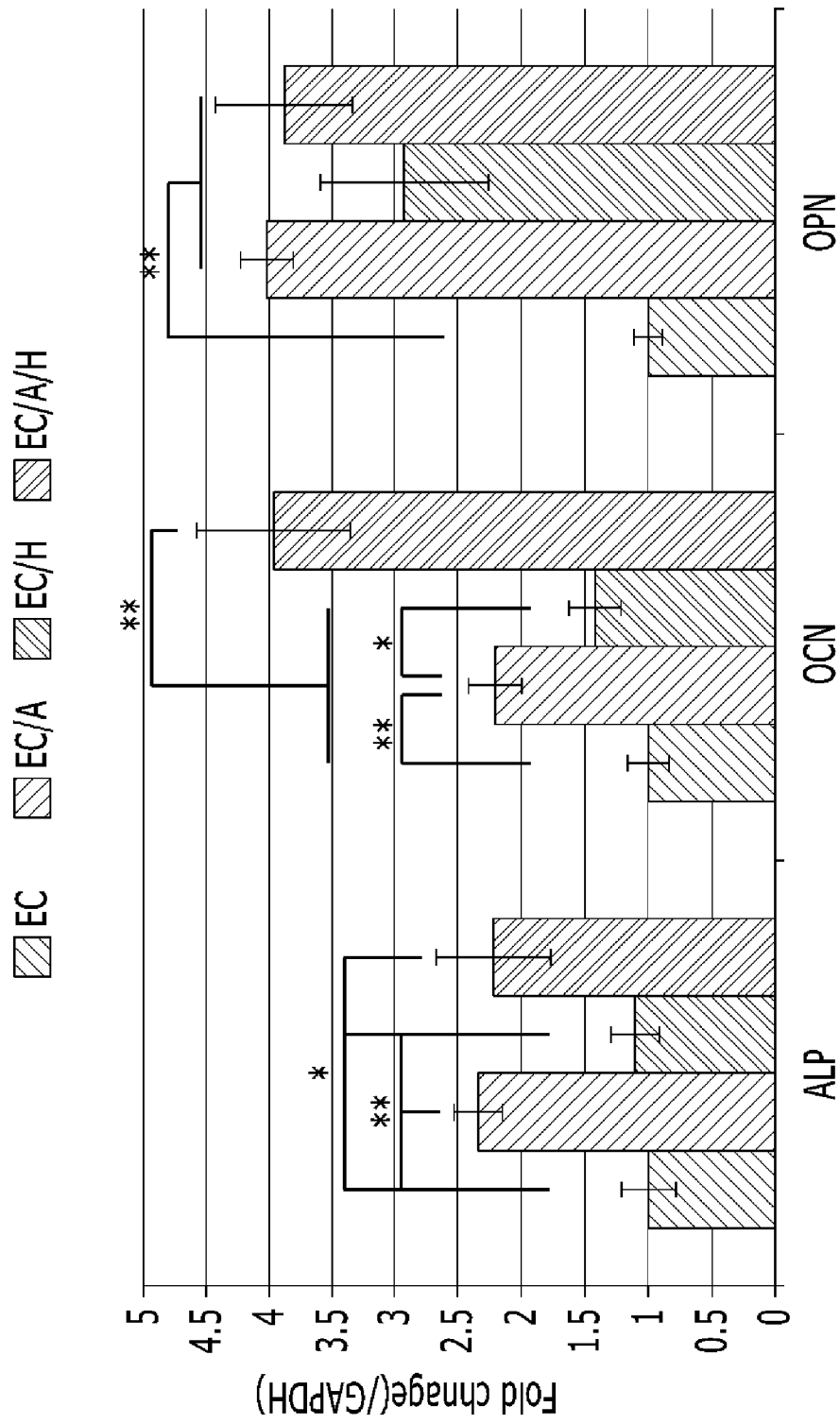
[도4]



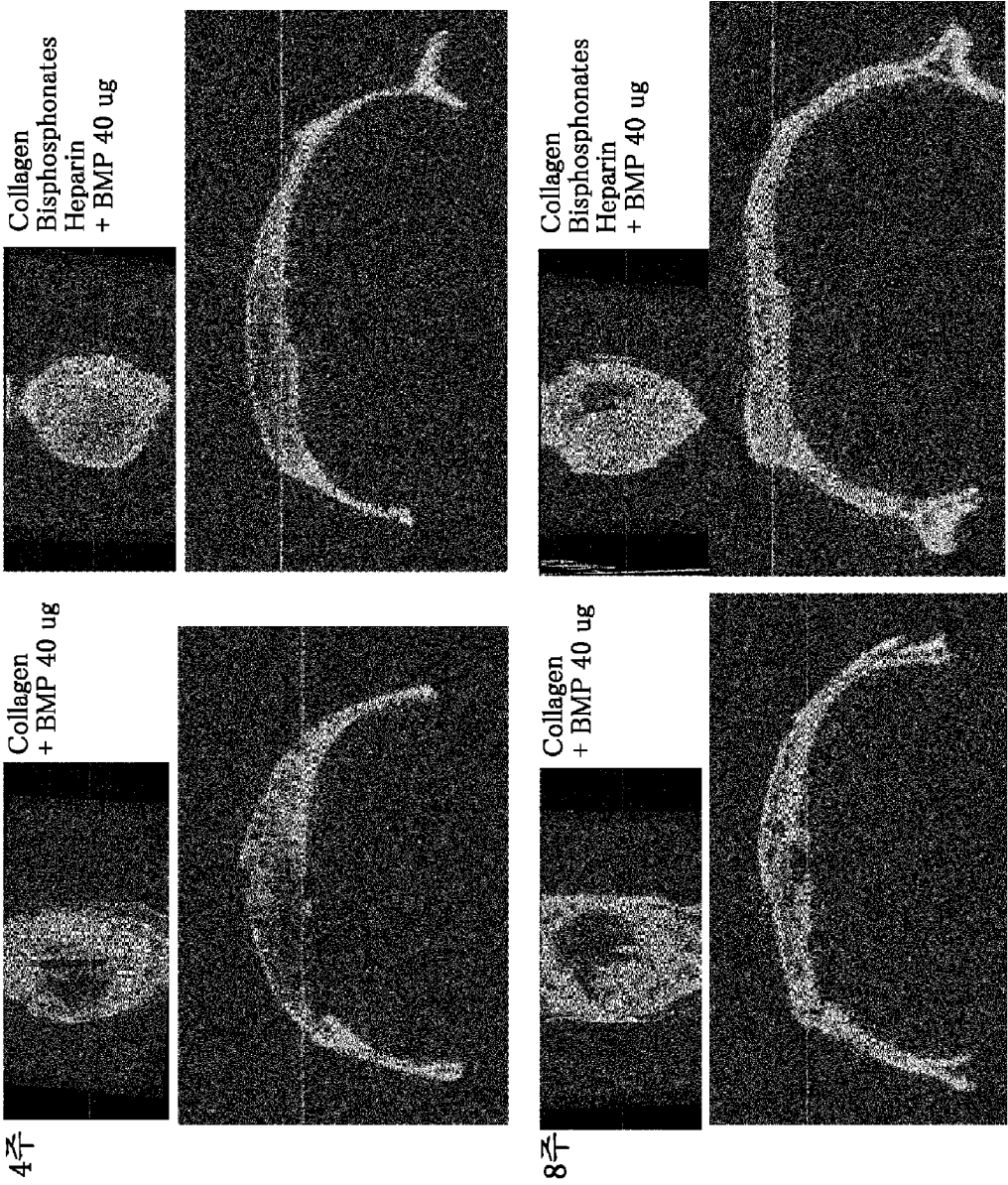
[도5]



[도6]

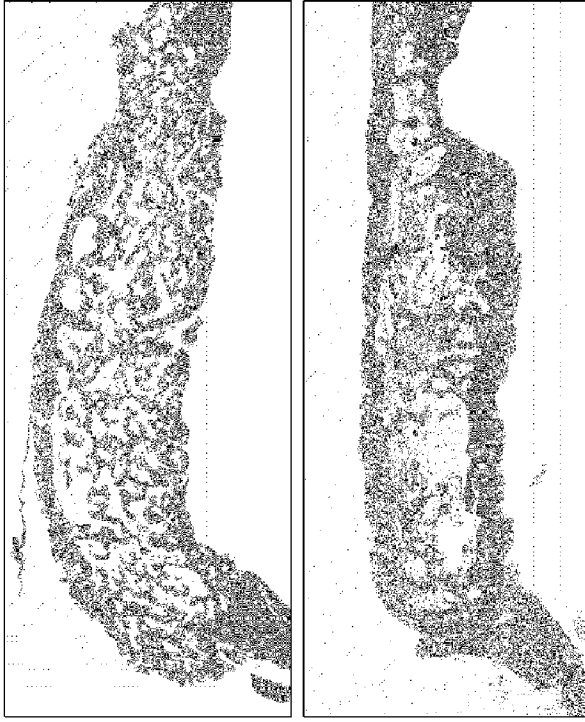


[도7]

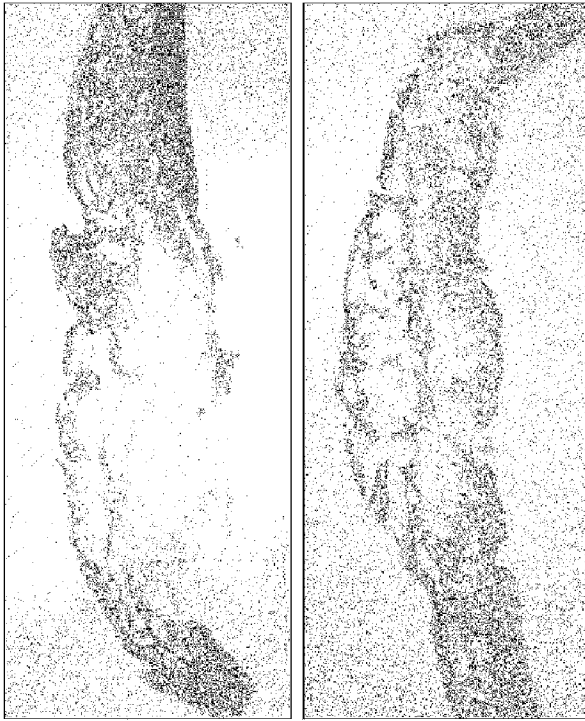


[도8]

Collagen/Bisphosphonates/Heparin + BMP 40 ug



Collagen + BMP 40 ug

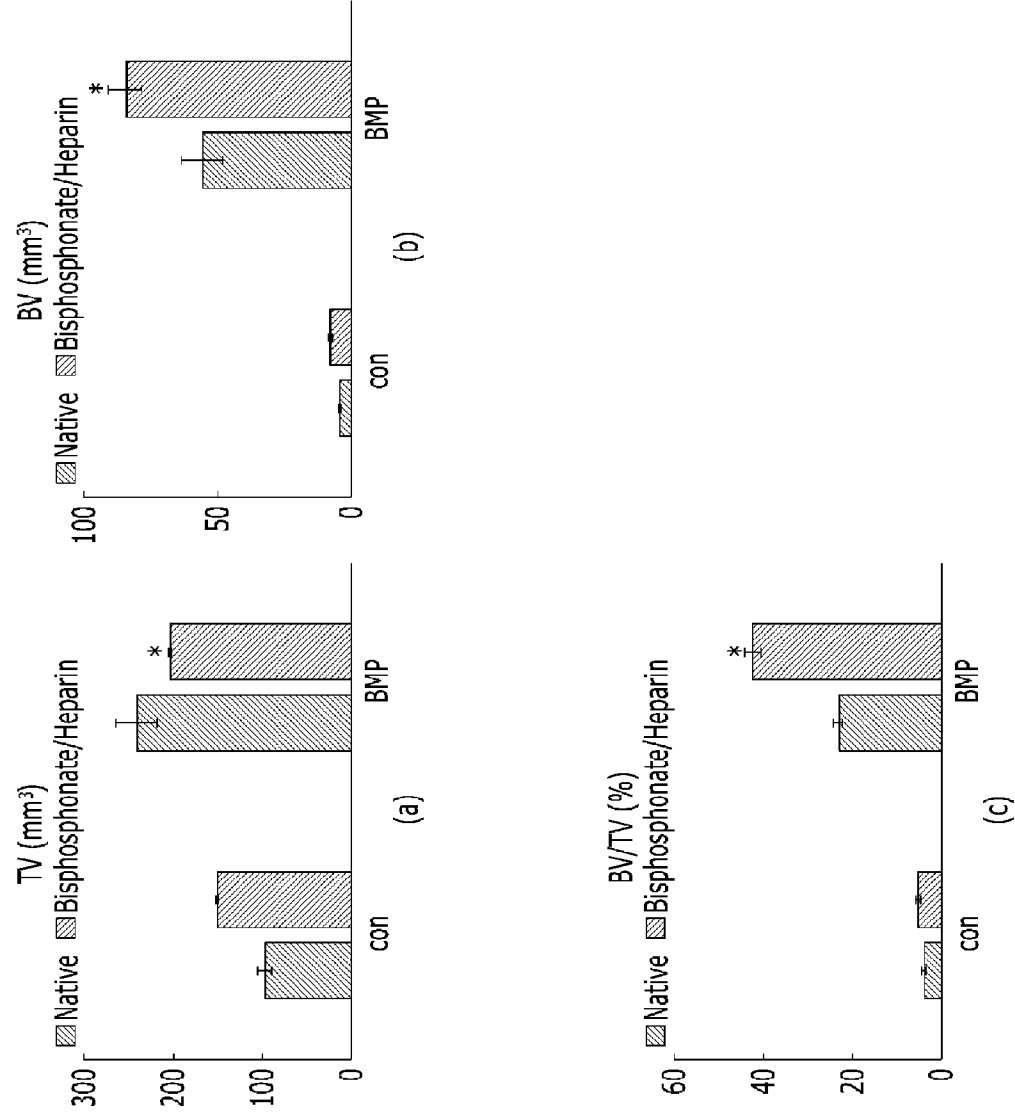


4주

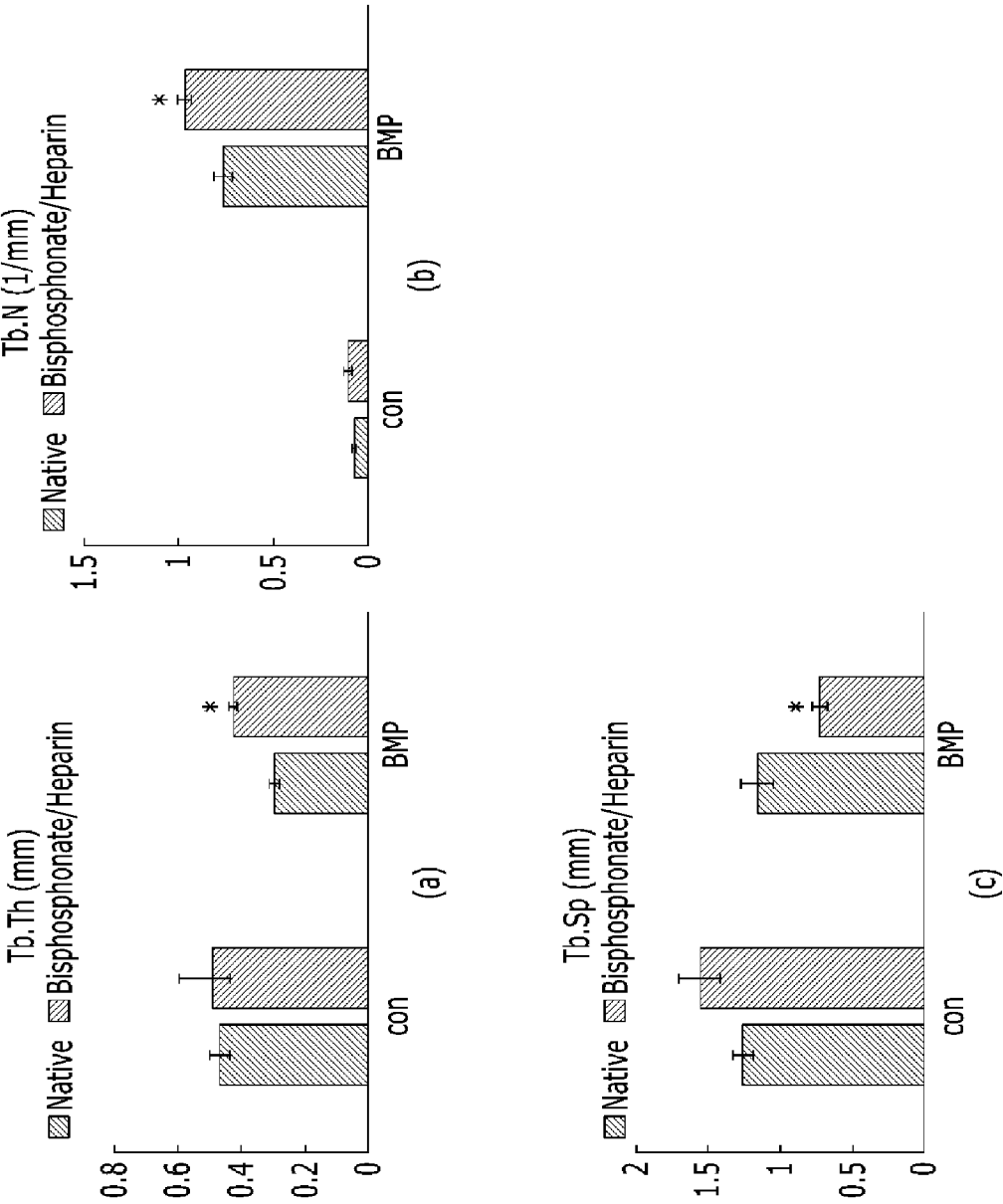
8주

어두운 부분이 콜라겐 및 뼈

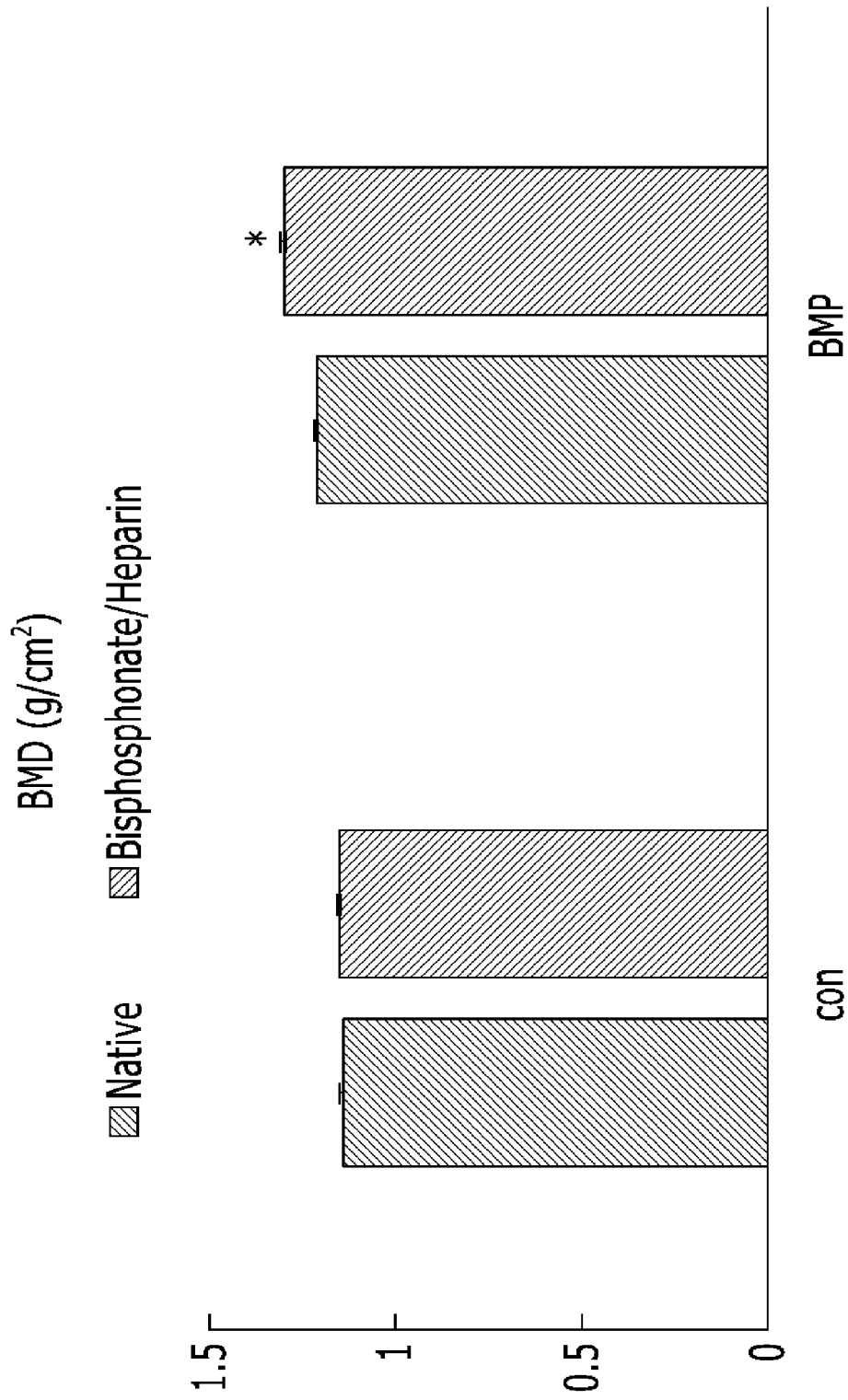
[도9]



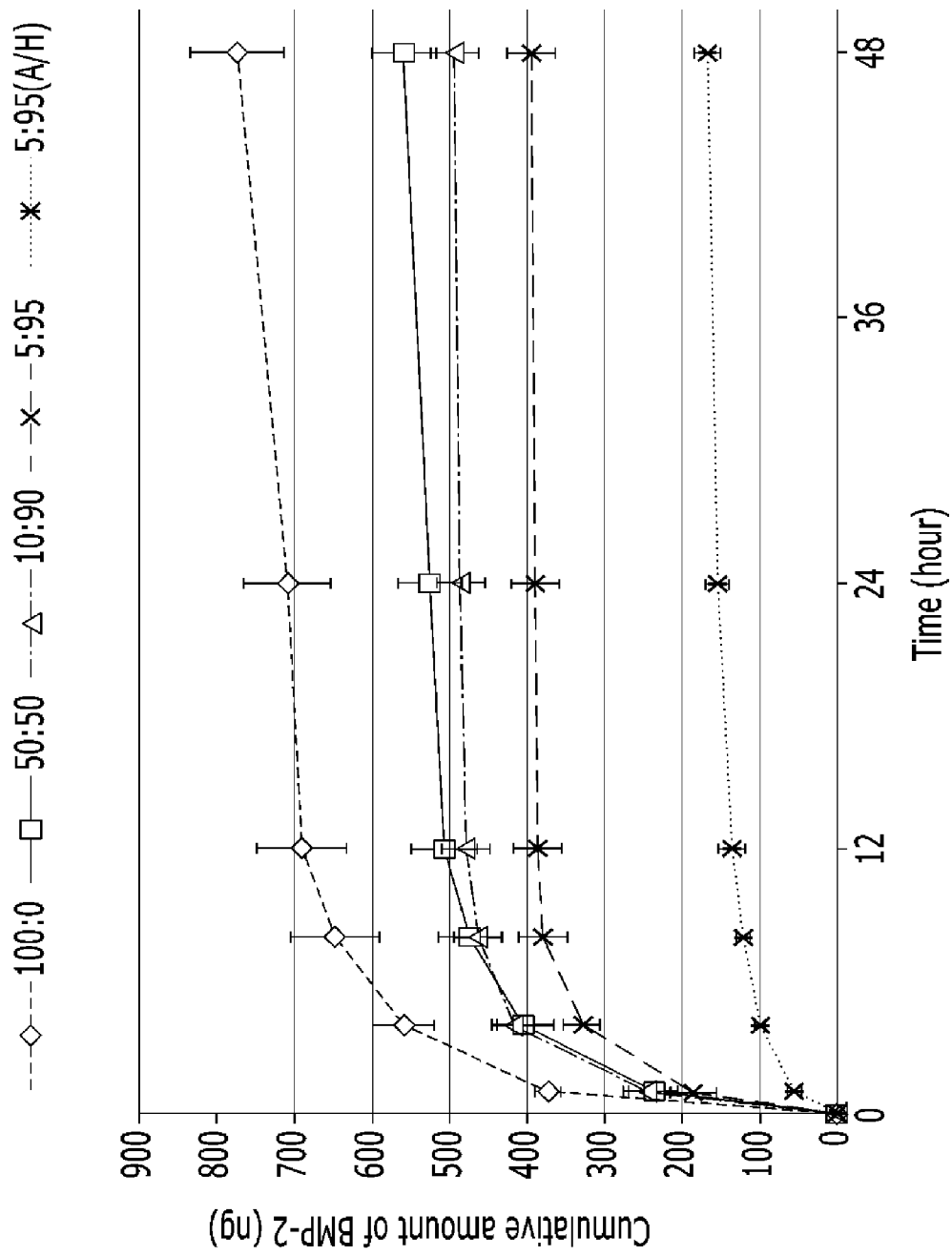
[도10]



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/42(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 31/663(2006.01)i, A61K 38/18(2006.01)i, A61L 27/24(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/42; A01N 63/00; A61L 27/34; A61F 2/00; A61L 27/24; A61L 27/56; A61L 27/54; A61K 47/36; A61K 9/00; A61K 31/663; A61K 38/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: collagen support, bisphosphonate, bone morphogenetic protein, sustained release delivery, heparin, hydroxyapatite, bone graft material

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MURPHY, C. M. et al., A Collagen-hydroxyapatite Scaffold allows for Binding and Co-delivery of Recombinant Bone Morphogenetic Proteins and Bisphosphonates. <i>Acta Biomaterialia</i> , 2014, vol. 10, pages 2250-2258 See abstract and pages 2251, 2255-2257.	1,4,7,8,11,14,15
Y		2,3,5,6,9,10,12,13
Y	WISSINK, M. J. B. et al., Immobilization of Heparin to EDC/NHS-crosslinked Collagen. Characterization and in Vitro Evaluation. <i>Biomaterials</i> , 2001, vol. 22, pages 151-163 See abstract and pages 152, 153, 161.	2,3,5,6,9,10,12,13
A	KR 10-2013-0092511 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 20 August 2013 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2014-0094305 A (SNU R&DB FOUNDATION) 30 July 2014 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2008-0065606 A (INTERFACE BIOTECH A/S.) 14 July 2008 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 SEPTEMBER 2016 (29.09.2016)

Date of mailing of the international search report

29 SEPTEMBER 2016 (29.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0092511 A	20/08/2013	CN 104245004 A	24/12/2014
		KR 10-1527934 B1	10/06/2015
		WO 2013-119058 A1	15/08/2013
KR 10-2014-0094305 A	30/07/2014	KR 10-1527934 B1	10/06/2015
		KR 10-2014-0121804 A	16/10/2014
		WO 2014-116000 A1	31/07/2014
KR 10-2008-0065606 A	14/07/2008	CN 101291586 A	22/10/2008
		EP 1924146 A2	28/05/2008
		KR 10-1449237 B1	08/10/2014
		US 2009-0214614 A1	27/08/2009
		WO 2007-028169 A2	08/03/2007
		WO 2007-028169 A3	05/07/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/42(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 31/663(2006.01)i, A61K 38/18(2006.01)i, A61L 27/24(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/42; A01N 63/00; A61L 27/34; A61F 2/00; A61L 27/24; A61L 27/56; A61L 27/54; A61K 47/36; A61K 9/00; A61K 31/663; A61K 38/18

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 콜라겐 지지체, 비스포스포네이트, 골형성단백질, 서방형 전달체, 헤파린, 하이드록시 아파타이트, 골이식체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MURPHY, C. M. 등, A collagen-hydroxyapatite scaffold allows for binding and co-delivery of recombinant bone morphogenetic proteins and bisphosphonates. Acta Biomaterialia, 2014년, 10권, 페이지 2250-2258 초록 및 페이지 2251, 2255-2257 참조.	1,4,7,8,11,14,15
Y		2,3,5,6,9,10,12,13
Y	WISSINK, M. J. B. 등, Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. Biomaterials, 2001년, 22권, 페이지 151-163 초록 및 페이지 152, 153, 161 참조.	2,3,5,6,9,10,12,13
A	KR 10-2013-0092511 A (고려대학교 산학협력단) 2013.08.20. 문헌 전체 참조.	1-15
A	KR 10-2014-0094305 A (서울대학교산학협력단) 2014.07.30. 문헌 전체 참조.	1-15
A	KR 10-2008-0065606 A (인터페이스 바이오텍 에이/에스) 2008.07.14. 문헌 전체 참조.	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 29일 (29.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 29일 (29.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0092511 A	2013/08/20	CN 104245004 A KR 10-1527934 B1 WO 2013-119058 A1	2014/12/24 2015/06/10 2013/08/15
KR 10-2014-0094305 A	2014/07/30	KR 10-1527934 B1 KR 10-2014-0121804 A WO 2014-116000 A1	2015/06/10 2014/10/16 2014/07/31
KR 10-2008-0065606 A	2008/07/14	CN 101291586 A EP 1924146 A2 KR 10-1449237 B1 US 2009-0214614 A1 WO 2007-028169 A2 WO 2007-028169 A3	2008/10/22 2008/05/28 2014/10/08 2009/08/27 2007/03/08 2007/07/05