(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0004739
(43) 공개일자 2012년01월13일

(51) Int. Cl.
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/32* (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01) *A61F 2/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0065388
(22) 출원일자 2010년07월07일
심사청구일자 2010년07월07일

(71) 출원인
한국기계연구원
대전광역시 유성구 가정북로 156 (장동, 한국해사연구소(한국기계연구원))
(72) 발명자
윤희숙
경상남도 창원시 성산구 중앙대로 48, B동 1605호 (상남동, 상남 아크로타워)
(74) 대리인
이원희

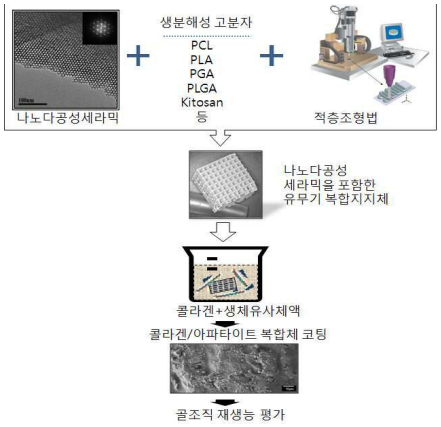
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 골기질 성분인 콜라겐 및 하이드록시아파타이트가 공침법에 의하여 코팅된 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 대략적인 제조과정은 다공성생체활성유리를 제조한 후 생분해성고분자와 혼합하여 지지체를 제조하여, 콜라겐을 함유한 생체유사체액에 침지하여 하이드록시아파타이트 및 콜라겐을 코팅하는 것으로 구성된다. 본 발명에서 제조된 다공성생체활성유리를 포함하며 경조직 재생용 지지체는 하이드록시아파타이트를 형성하면서 콜라겐과 같이 코팅되어, 높은 골재생 유도효과를 비롯하여 세포에 대하여 초기 접착, 증식 및 분화와 같은 세포의 거동에 있어서 뛰어난 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090083991
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 나노다공성 생체세라믹을 이용한 경조직재생 및 면역 안전성에 대한 연구
기여율
주관기관 한국기계연구원 부설 재료연구소
연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다공성 생체활성유리를 포함하며 공침법(co-precipitation)에 의하여 콜라겐 및 하이드록시아파타이트가 코팅된 경조직 재생용 지지체.

청구항 2

알코올을 포함하는 용매에 블록공중합체를 용해시켜 템플레이트 용액을 합성하는 단계 (단계 1);

상기 템플레이트 용액에 규소 화합물, 칼슘 화합물 및 인 화합물을 혼합하여 다공성 생체활성유리 용액을 합성하는 단계 (단계 2);

상기 다공성 생체활성유리 용액을 건조 및 소성하여 다공성 생체활성유리를 얻는 단계 (단계 3);

상기 다공성 생체활성유리를 서브미크론 크기로 분쇄하는 단계 (단계 4);

상기 분쇄된 다공성 생체활성유리를 생분해성 고분자와 혼합하여 페이스트를 얻는 단계 (단계 5);

상기 페이스트를 적층조형법을 이용하여 지지체를 제조하는 단계 (단계 6);

상기 제조된 지지체를 세정 및 건조하는 단계 (단계 7);

상기 용매가 제거된 지지체의 표면에 골기질 성분을 공침법을 사용하여 코팅하는 단계 (단계 8);

상기 코팅된 지지체를 세정 및 건조하는 단계 (단계 9); 및

상기 건조된 지지체를 멸균 및 건조하는 단계 (단계 10)를 포함하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 3

제 3항에 있어서, 상기 단계 1에서 블록공중합체는 F127, F108, F98, F88, P123, P105 및 P104로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 4

상기 제 3항에 있어서, 상기 단계 2에서 생체활성유리를 합성하는 방법은 졸-겔(sol-gel)법을 이용하는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 단계 2에서 규소화합물, 칼슘화합물 및 인 화합물의 첨가량은 규소, 칼슘 및 인이 50~80 : 18~45 : 2~10의 원소비율인 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 단계 2에서 템플레이트 용액은 상기 생체활성유리 용액에 대하여 30~50 질량%로 첨가되

는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 단계 3은 -15~80 ℃ 범위의 온도 및 5~100 %의 상대습도에서 건조되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 8

제 3항에 있어서, 상기 단계 3에서 소성은 0.2~2 ℃/min의 승온 속도로 400~800 ℃의 온도 범위 에서 2~6시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 9

제 3항에 있어서, 상기 단계 5에서 생분해성 고분자는 폴리ε-카프로락톤(Poly-ε-caprolactone. PCL), 폴리락타이드(Poly-L-lactide, PLA), 폴리글라이콜라이드(Polyglycolide, PGA), 폴리락타이드-글라이콜라이드(poly(glycolide-lactide), PLGA) 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 10

제 3항에 있어서, 상기 단계 5는 생분해성 고분자가 상기 다공성 생체활성유리와 50~80 : 50~20의 질량% 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 11

제 3항에 있어서, 상기 단계 6에서 적층조형법으로 제조된 지지체의 X축 및 Y축 사이의 간격은 0.5 ~ 2.0 ㎜이고, 기공크기는 500 ~ 800 ㎛인 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 12

제 3항에 있어서, 상기 단계 7은 진공동결건조를 통하여 수행되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 13

제 3항에 있어서, 상기단계 8에서 콜라겐은 산 용액에 용해하여 생체유사체액(SBF)에 넣되, 콜라겐의 최종 농도가 1 ~ 100 ㎍/ml가 되는 양으로 도입되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 14

제 3항에 있어서, 상기 단계 8의 코팅은 지지체를 콜라겐이 용해되어 있는 생체유사체액에 12 ~ 48 시간동안 침지하여 하이드록시아파타이트를 부착 및 형성시키는 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 15

제 3항에 있어서, 상기 단계 9에서 건조는 동결건조의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식량과 생활환경의 개선 및 의료기술의 진보 등으로 인하여 선진국을 중심으로 고령화 사회가 진행되고 있다. 길어진 수명 동안 인간이 풍요로운 삶을 누리기 위해서는 건강이 동반된 삶의 질이 보장되어야 하며 이를 위하여 최근 조직재생 특히 뼈나 치아와 같은 경조직 재생과 관련된 분야가 주목받고 있다. 뼈는 손상부위가 임계크기 이하일 경우 자가재생이 가능한 기관이다. 그러나 손상부위가 임계크기보다 클 경우 골조직 재생을 유도하고 지탱하여 줄 지지체(scaffold)가 필요하다.

[0003] 1) 세포성장, 혈관생성, 영양분 공급 및 노폐물 배출을 위하여 기공이 3차원적으로 상호 연결된 계층적 기공구조체 2) 반흔조직(scar tissue)의 생성 없이 조직과 잘 결합하기 위한 높은 생체 활성 및 골전도성 3) 체내에서 독성 혹은 면역반응을 나타내지 않는 우수한 생체적합성 4) 이식 부위에 적합한 기계적 강도 5) 세포 및 조직 성장에 맞추어 조절 가능한 생분해성 6) 환자의 이식부위에 따라 복잡 다양한 결함형상에 맞추어 제조 가능한 다양한 합성법 등 이러한 조건을 만족시키기 위하여 인체골을 모방한 지지체 제조법에 관한 연구가 제안되고 있다.

[0004] 골 치료 및 재생에는 중간엽 줄기세포 및 조골세포와 같은 특정한 세포와 그들이 3차원으로 자라날 때까지는 지지체가 필요하며 성장인자와 세포외분자 및 기계적 강도가 요구된다. 뼈는 콜라겐 섬유다발과 콜라겐 피브릴을 따라 침전되어 있는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 나노결정들로 이루어진 복합 구조를 가진다. 또한 뼈는 생명 현상을 유지하기 위해 혈관과 뼈 세포, 점다당체(mucopolysaccharide)를 가지고 있다. 뼈의 구성 성분과 탄성계수의 관계를 살펴보면, 낮은 탄성계수를 가지는 콜라겐 섬유다발이 뼈의 주요 응력 방향을 따라 배열되어 있고 뼈 건조 중량의 70% 정도를 차지하는 하이드록시아파타이트 미네랄 부분이 뼈 강도의 상당 부분을 유지하게 된다.

[0005] 인체골은 수 나노에서 수백 마이크로 크기 영역에 걸쳐 계층적 복합구조체로 이루어져 있으나, 대부분의 지지체 제조법은 주로 마이크로 크기 영역의 기공구조 모방을 중심으로 진행되어 왔다. 한편, 최근 나노 크기영역의 기공 및 결정 구조가 여러 가지 조직재생 환경에 미치는 영향이 보고됨에 따라 마이크로 영역을 비롯하여 나노 크기영역까지 모방한 지지체 제조법이 주목받고 있다. 대표적인 지지체 소재로는 생체골 유사성분인 수산화 아파타이트 비롯한 인산칼슘계합물이 있다.

[0006] 생체활성유리는 실리카를 주요성분으로 인, 칼슘을 함유한 재료로 조성에 따라 골융합과 생분해를 통한 골 재생을 유도한다. 이들이 방출하는 이온들은 세포가 세포외 미네랄화 매트릭스(extracelluar mineralize matrix)를 형성하도록 한다. 다공성생체유리(MBG)는 생체활성유리가 나노크기의 기공을 갖는 다공성 구조로 제조하여 비표면적 및 공극률을 증가시켜 생분해성을 높이고 생체적합성을 부여하였다(대한민국 특허등록 10-0831348). 또한 생체유사체액(SBF)에 침적시킬 경우 높은 비표면적으로 인해 이온들의 교환이 빨라지고, 이에 MBG 표면에 뼈의

모체인 하이드록시아파타이트(HAp)의 형성이 가속화된다. 따라서 골재생용 3차원 지지체에 MBG가 포함될 경우 높은 생체활성을 유도할 수 있다(대한민국 특허등록 10-751504, 10-0805303, 10-0814730, 10-0941374). 하지만 MBG가 생체 활성은 높으나 그 때문에 오히려 많은 양의 칼슘이 용출됨으로 인하여 독성을 띠게 된다는 단점이 발견되었다.

[0007] 또한 생분해성 고분자로 콜라겐은 골을 재생하는 재료로 사용되어 왔다. 콜라겐은 유기질의 고분자로 쉽게 성형이 가능하고 다양한 형태로의 제조가 가능하지만 콜라겐 멤브레인의 경우 탄성이 낮고 체내에서 효소에 의하여 쉽게 용해된다는 단점이 제기되어 왔다.

[0008] 이에 본 발명자는 MBG를 포함하며 지지체를 바로 생체에 이식하지 않고, 생체유사체액에 MBG를 침지하여 하이드록시아파타이트 및 콜라겐을 공침(co-precipitation)하는 방법으로 지지체에 코팅하였으며, in vitro 실험결과 세포증식과 분화 모두 우수한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분인 콜라겐 및 하이드록시아파타이트가 코팅된 경조직 재생용 지지체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 공침법을 이용한 상기 지지체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면 다공성생체유리를 포함한 지지체를 콜라겐이 용해된 생체유사체액에 침지하면 지지체 표면에는 다공성생체유리에서 유출되는 칼슘의 영향으로 하이드록시아파타이트를 형성하면서 콜라겐이 같이 코팅되어, 높은 골재생 유도효과를 비롯하여 세포에 대하여 초기 접착, 증식 및 분화와 같은 세포의 거동에 있어서 뛰어난 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명을 개괄적으로 나타낸 개괄도이고,

도 2는 코팅으로 표면 처리하기 전/후의 SEM 사진이고,

도 3은 지지체의 세포 증식 거동을 평가한 그래프이고,

도 4는 조골세포의 활성을 나타낸 그래프이고,

도 5는 세포파종 5일 후 지지체의 표면을 측정한 SEM 사진이고,

도 6은 세포파종 5일 후 지지체의 위치별 표면 SEM 사진이고,

도 7은 세포파종 21일 후 지지체의 표면을 측정한 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은,

[0017] 다공성 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체를 제공한다. 상기 생체활성유리를 포함하는 지지체의 표면은 다공성생체유리에서 유출되는 칼슘의 영향으로 하이드록시아파타이트를 형성하면서 콜라겐이 같이 코팅되어, 높은 골재생 유도효과를 비롯하여 세포에 대하여 초기 접착, 증식 및 분화와 같은 세포의 거동에 있어서 뛰어난 효과를 나타낸다. 한편, 상기 공침법이란 일반적인 석출과정에서 수행되는 공침법과는 다른 것으로, 본 발명에서는 생리환경과 동일한 환경에서 골기질 성분을 이루는 물질을 동시에 흡착시켜 코팅하는 방법을 뜻한다.

[0018] 또한, 본 발명은

[0019] 알코올을 포함하는 용매에 블록공중합체를 용해시켜 템플레이트 용액을 합성하는 단계 (단계 1);

[0020] 상기 템플레이트 용액에 규소 화합물, 칼슘 화합물 및 인 화합물을 혼합하여 다공성 생체활성유리 용액을 합성하는 단계 (단계 2);

[0021] 상기 다공성 생체활성유리 용액을 건조 및 소성하여 다공성 생체활성유리를 얻는 단계 (단계 3);

[0022] 상기 다공성 생체활성유리를 서브 미크론 크기로 분쇄하는 단계 (단계 4);

[0023] 상기 분쇄된 다공성 생체활성유리를 생분해성 고분자와 혼합하여 페이스트를 얻는 단계 (단계 5);

[0024] 상기 페이스트를 적층조형법을 이용하여 지지체를 제조하는 단계 (단계 6);

[0025] 상기 제조된 지지체를 세정 및 건조하는 단계 (단계 7);

[0026] 상기 용매가 제거된 지지체의 표면에 골기질 성분을 공침법을 사용하여 코팅하는 단계 (단계 8);

[0027] 상기 코팅된 지지체를 세정 및 건조하는 단계 (단계 9); 및

[0028] 상기 건조된 지지체를 멸균 및 건조하는 단계 (단계 10)를 포함하며 다공성생체유리를 포함하며 공침법에 의하여 골기질 성분이 코팅된 경조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0029] 단계 1은 알코올을 포함하는 용매에 템플레이트인 블록공중합체를 용해시켜 블록공중합체 템플레이트 용액을 합성하는 단계로, 상기 블록공중합체 템플레이트로는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드의 구조를 갖는 폴록사머(poloxamer)를 사용할 수 있는데, 이때 사용하는 폴록사머는 친수성기 및 소수성기를 갖는 플루로닉(Pluronic)계 또는 테트로닉(Tetronic)계 고분자이다. 이 중, F127((폴리에틸렌옥사이드)100(폴리프로필렌옥사이드)65(폴리에틸렌옥사이드)100, BASF), F108((폴리에틸렌옥사이드)133(폴리프로필렌옥사이드)50(폴리에틸렌옥사이드)133, BASF), F98((폴리에틸렌옥사이드)118(폴리프로필렌옥사이드)44(폴리에틸렌옥사이드)118, BASF), F88((폴리에틸렌옥사이드)104(폴리프로필렌옥사이드)39(폴리에틸렌옥사이드)104, BASF), P123((폴리에틸렌옥사이드)20(폴리프로필렌옥사이드)70(폴리에틸렌옥사이드)20, BASF), P105((폴리에틸렌옥사이드)37(폴리프로필렌옥사이드)56(폴리에틸렌옥사이드)37 ,BASF), 및 P104((폴리에틸렌옥사이드)27(폴리프로필렌옥사이드)61(폴리에틸렌옥사이드)27, BASF)로 이루어진 군 으로부터 선택되는 1종인 것으로 친수성 고분자 블록 및 소수성 고분자 블록으로 이루어지는 블록공중합체라면 이에 한정되지 않는다.

[0030] 단계 2는 상기 템플레이트 용액에 규소화합물, 칼슘화합물 및 인화합물을 혼합하여 다공성생체활성유리를 합성하는 단계로, 생체활성유리를 합성하는 방법은 졸-겔(sol-gel)법을 사용하는 것이 바람직하다. 한편, 졸-겔법의 화학적인 과정은 실리콘이나 금속 알콕사이드 단위 전구체(monomer precursor)로부터 다양한 종류의 무기질 망상 조직(network)을 만드는 것이다. 이 과정을 이용하면 고온에서 용융과정을 거쳐 무기질 유리를 만드는 전통적인 방법과는 달리 상온에서 경도와 투명도, 화학적 안정도, 조절된 기공, 열전도도 등 좋은 성질의 균질한 무기질 산화물질을 만들 수 있다.

[0031] 상기 단계 2에서 규소화합물, 칼슘화합물 및 인 화합물의 첨가량은 규소, 칼슘 및 인이 50~80 : 18~45 : 2~10의 원소비율로 템플레이트 용액으로 도입하는 것이 바람직하다. 상기의 원소비율 범위에서 가장 안정한 3차원의 입방정 나노기공구조가 형성되기 때문이다. 범위를 초과하거나 미만의 비율이 되면 3차원이 아닌 2차원의 구조를 형성하게 된다. 상기 단계는 템플레이트를 사용한 졸-겔법으로 생체활성유리액체를 제조하되 템플레이트 용액에 규소화합물을 도입하여 반응시키고, 이후 인 화합물을 도입하여 완벽히 용해한 후 칼슘 화합물을 도입하여 수행된다.

[0032] 상기 단계 2에서 템플레이트 용액은 상기 생체활성유리 용액에 대하여 30~50 질량%로 첨가되는 것이 바람직하다. 템플레이트 용액이 30% 미만으로 첨가되면 나노입자가 규칙적으로 형성되지 않을 수 있으며, 템플레이트 용액이 50%를 초과하여 첨가되면 규소 화합물, 인 화합물, 칼슘 화합물이 잘 용해되지 않는 문제점이 있다.

[0033] 상기 단계 2와 관련하여 교반속도, 온도 및 시간에 관련한 내용 및 청구항은 삭제하였습니다.

[0034] 상기 단계 3은 다공성 생체활성유리 용액을 건조 및 소성하여 다공성 생체활성유리를 얻는 단계이다. 상기 건조 과정을 통하여 졸-겔 반응 및 고분자의 자기조립화 반응으로 만들어진 메조구조는 균일하게 형성되고 안정화된다. 제조된 생체활성유리액은 -15~80 ℃ 범위의 온도 및 5~100 %의 상대습도에서 건조되는 것이 바람직하다. 상기 온도 범위 및 습도를 벗어나면 균일하지 못한 메조구조체가 형성되게 되는데, 상기 온도범위를 벗어난 경우는 전혀 다른 구조체의 형성하게 되고, 습도가 5 % 미만인 경우 습도가 너무 낮아 빨리 건조되게 되어 메조기공구조가 형성되지 않는 문제가 있다.

[0035] 상기 단계 3에서 소성은 0.2 ~ 2 ℃/min의 승온 속도로 400~800 ℃의 온도 범위에서 2~6시간 동안 수행되는 것이 바람직하다. 승온 속도가 0.2 ℃/min 미만인 경우 생체활성유리의 골격이 너무 치밀화될 수 있으며, 2 ℃/min를 초과하는 경우 빠른 온도 증가로 인하여 템플레이트의 급격한 분해가 일어나 구조체가 붕괴될 수 있는 문제가 있다. 소성 온도가 400 ℃ 미만인 경우 템플레이트가 제거되지 않을 수 있으며, 800 ℃를 초과하면 결정화 및 치밀화로 인하여 메조구조체가 붕괴되는 문제점이 있다. 또한 소성시간이 2시간 미만인 경우 소성이 제대로 되지 않을 수 있으며, 6시간을 초과하여도 이로 인한 유리한 효과가 없으므로 바람직하지 않다.

[0036] 단계 4는 다공성 생체활성유리를 서브미크론 크기로 분쇄하는 단계이다. 예를 들면 볼밀링(ball-milling)이나 유발을 사용하여 균일하게 분쇄할 수 있다.

[0037] 단계 5는 분쇄된 다공성 생체활성유리를 생분해성 고분자와 혼합하여 페이스트를 얻는 단계로, 상기 생분해성 고분자로는 인공피부 이식재료나 수술용 봉합제 등으로 응용이 가능한 PCL(poly(ε-caprolactone)), PLA(poly(lactic acid)), PGA(Polyglycolide), PLGA (poly(glycolide-lactide)) 및 키토산 등을 사용할 수 있으나, 인체에 무해하고 지지체를 구성할 수 있다면 이에 한정되지 않는다. PCL을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. PCL은 특히 장기간의 치료를 요하는 골절치료에 적합한 소재로 생체내에 이식되었을 때 젖산으로 분해되어 신진대사를 통해 인체에 무해하다.

[0038] 단계 5에서 생분해성 고분자가 다공성 생체활성유리와 혼합되는 비율은 50~80 : 50 ~20 질량%가 바람직하다. 다공성 생체활성유리의 비율이 50 질량%를 초과하면 지지체의 기계적 강도가 약해질 수 있으며, 20 질량% 미만으로 도입되면 생체활성유리에서 발휘되는 생체친화도 및 하이드록시아파타이트의 형성에 문제가 생길 수 있다.

[0039] 단계 6에서는 상기 페이스트를 3축 조형기에 넣고 분사하여 마이크로 기공을 형성하는 단계로, 3축 조형기의 분출입경 크기와 X축, Y축의 방향을 제어하고 페이스트 분출 스피드를 제어하여 2차원 또는 3차원 형상을 간편하

게 디자인할 수 있다. 이때 형상유지를 위하여 필요에 따라 기판에 적당한 온도의 열을 가해주어 경화를 촉진시킬 수 있으며, 지그재그로 적층한다.

[0040] 단계 6에서 상기 적층조형법으로 제조된 지지체의 기둥간격은 0.5 ~ 2.0 ㎜인 것이 바람직하고, 1 ㎜ 인 것이 더욱 바람직하다. 지지체의 간격이 0.5 ㎜ 미만이면 기둥 간의 간격이 좁아져 지지체 기공형성이 어려우며, 2.0 ㎜를 초과하면 지지체 기둥 간의 간격이 넓어져 기계적 강도가 떨어짐과 동시에 세포재생 효율이 저하되는 문제점이 발생한다. 또한 지지체에 생성되는 기공의 크기는 100 ~ 600 ㎛인 것이 바람직하다. 기공의 크기가 100 ㎛ 미만이면 세포가 부착하여 자라는 경로가 확보되지 않아 세포의 부착, 증식, 분화 및 조직 재생이 잘 되지 않을 수 있으며, 600 ㎛를 초과하면 세포성장 저하와 동시에 지지체의 기계적 강도가 약해질 수 있다.

[0041] 단계 7은 제조된 지지체를 세정하고 및 건조하는 단계로, 지지체 제조시 사용된 유해용매를 제거하기 위한 것이다. PCL의 경우 인체 유해한 클로로포름에 용해시켜 지지체를 제조하므로 충분한 세정이 필요하며 세정에는 에탄올을 사용하는 것이 바람직하다. 하지만 인체에 무해하고 상기 지지체를 구성하는데 사용된 용매를 세정할 수 있다면 이에 한정되지 않는다. 세정 후 진공 건조를 실시 하여 지지체 내부에 있는 유해 용매성분까지 제거를 유도하며 이 과정은 세정-건조로 여러 번 반복 실시한다. 최소 4회 이상 실시하며 클로로포름이 검출되지 않음을 확인할 필요가 있다. 건조 방법은 진공건조가 바람직하나 상기 지지체의 생체활성 및 기계적 강도에 문제를 야기하지 않으며 건조할 수 있다면 이에 한정되지 않는다.

[0042] 단계 8은 상기 세정 및 건조된 지지체의 표면에 골기질 성분을 코팅하는 단계로, 공침법을 사용한다. 콜라겐을 산 용액에 용해하여 생체유사체액(SBF)에 넣되, 최종 농도가 1 ~ 100 ㎍/ml가 되도록 도입되는 것이 바람직하다. 콜라겐의 농도가 1 ㎍/ml 미만인 경우는 콜라겐의 농도가 너무 낮아 콜라겐의 특성을 발휘하는데 문제가 있으며, 100 ㎍/ml를 초과하는 경우는 독성을 초래할 수 있는 문제가 있다.

[0043] 단계 8에서 상기 세정 및 건조된 지지체를 상기 콜라겐이 용해되어 있는 생체유사체액에 12 ~ 48시간동안을 침지하여 하이이드록시아파타이트를 부착 및 형성시킨다. 침지 시간이 12시간 미만이면 충분한 하이드록시아파타이트가 형성되지 않고, 48시간을 초과하여도 이로 인한 유리한 효과가 없어 바람직하지 않다.

[0044] 단계 9는 상기 코팅된 지지체를 세정 및 건조하는 단계이다. 증류수를 이용하여 잔여 생체유사체액을 제거하고, 건조 방법은 동결건조를 사용하되, 지지체의 생체활성 및 기계적 강도에 영향을 주지 않는 건조법이면 이에 한정되지 않는다.

[0045] 단계 10은 건조된 지지체를 멸균 및 건조하는 단계이다. 무균상태에서 70 % 에탄올을 사용하여 멸균하되, 인체에 무해하고 지지체의 특성을 저해하지 않고 멸균할 수 있다면 이에 한정되지 않는다. 멸균된 지지체를 진공건조기를 이용하여 건조하는 것이 바람직하나, 상기 지지체의 생체활성 및 기계적 강도에 문제를 야기하지 않고 건조할 수 있다면 이에 한정되지 않는다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 내용이 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0047] <실시예 1> 콜라겐 및 하이드록시아파타이트가 코팅된 MBG/PCL 지지체 제조

[0048] 단계 1. 템플레이트 용액을 합성하는 단계

[0049] 졸-겔법을 이용한 것으로 2.95 g의 폴록사머 F-127을 에탄올 30 mL와 1M 염산 0.95 mL에 넣고, 40 ℃에서 1시간 동안 900 rpm으로 교반하면서 용해하는 방법으로 템플레이트 용액을 합성하였다.

[0050] 단계 2. 다공성 생체활성유리를 합성하는 단계

[0051] 상기 단계 1에서 합성된 템플레이트 용액의 F-127이 완벽히 녹은 것을 확인한 후, 템플레이트 용액에 TEOS(tetraethyl orthosilicate) 6.15 mL을 첨가하였다. 30분간 교반하여 반응시킨 후 0.33 mL의 트리에틸포스페이트($(C_2H_5O)3PO$)를 천천히 넣었다. 반응시킨 후 1.26 g의 칼슘나이트레이트 4수화물($Ca(NO_3)_24H_2O$)를 서서히 녹여가면서 넣었다. 이후 40 ℃에서 900 rpm으로 교반하면서 4시간동안 반응시켜 다공성 생체활성유리용액을 제조하였다.

[0052] 단계 3. 다공성 생체유리용액을 건조 및 소성하여 다공성 생체활성유리를 얻는 단계

[0053] 상기 단계 2에서 제조된 다공성 생체활성유리용액을 증발접시에 10 mL씩 나누어 담고, 40 ℃의 온도 및 40 %의 상대습도로 설정된 항온항습기에 넣어 건조하되, 투명한 필름상이 될 때까지 건조하였다.

[0054] 상기 건조된 다공성 생체활성유리필름을 600 ℃에서 4시간 소결시켜 다공성 생체활성유리를 제조하였다.

[0055] 단계 4. 다공성 생체유리를 분쇄하는 단계

[0056] 제조된 생체활성유리를 유발을 사용하여 25 ㎛로 분쇄하여 생체활성유리(MBG) 파우더를 제조하였다.

[0057] 단계 5. MBG 파우더와 생분해성 고분자를 혼합하여 페이스트를 제조하는 단계

[0058] PCL(poly ε-caprolacton) 5 g을 10 mL의 클로로포름에 녹여 MBG 파우더를 PCL용액에 대하여 60 질량%로 넣어 고르게 분산시켰다.

[0059] 단계 6. 적층조형법을 이용하여 지지체를 제조하는 단계

[0060] 상기 제조된 페이스트가 적절한 점도가 되었을 때, 3축 조형기에 넣고 X축과 Y축의 간격은 1 mm로 설정하고, 지그재그로 적층하여 지지체를 제조하였다.

[0061] 단계 7. 제조된 지지체를 세정 및 건조하는 단계

[0062] 상기 제조된 지지체에 포함된 클로로포름을 제거하기 위해 99.9 %의 에탄올로 20 분간 세척한 후 진공동결건조기에서 30분간 건조하였다. 이를 5회 반복하여 MBG의 메조구조에 있는 클로로포름까지 완전히 제거하였다. 마지막 5회째 진공동결건조는 하루 동안 실시하였다.

[0063] 단계 8. 지지체에 골기질 성분을 공침법으로 코팅하는 단계

[0064] 콜라겐을 0.1M 아세트산에 2 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 생체활성유사체액에 1 부피%로 도입하였다. 콜라겐이 포함된 생체활성유사체액에 상기 단계 7에서 세정 및 건조된 지지체를 1일간 침지하여 콜라겐과 하이드록시아파타이트를 부착 및 형성시켜 코팅하였다.

[0065] 단계 9. 코팅된 지지체를 세정 및 건조하는 단계

[0066] 골기질 성분이 코팅된 지지체를 생체활성유사체액이 완벽히 제거되도록 증류수로 세정하고, 12시간동안 진공동결건조하였다.

[0067] 단계 10. 건조된 지지체를 멸균 및 건조하는 단계

[0068] 상기 세정된 지지체를 70% 에탄올로 30분간 멸균하고 클린벤치 안에서 진공건조하는 단계를 거쳐 골기질 성분이 코팅된 지지체를 제조하였다.

[0069] <비교예 1> MBG/PCL 지지체의 제조

[0070] 상기 실시예 1에서 단계 8 및 9를 수행하지 않은 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 MBG/PCL 지지체를 제조하였다.

[0071] <실험예 1> 코팅 전/후 지지체의 표면 측정

[0072] 지지체의 표면 특성을 살펴보기 위하여 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 골기질 성분의 코팅 전/후의 지지체 표면을 관찰하였고, 도 2에 나타내었다.

[0073] 도 2에 나타난 바와 같이 표면처리 전의 지지체는 PCL에 MBG가 분포되어 있으며 비교적 거친 표면을 가지고 있었다. 수십 마이크로 크기의 굴곡은 MBG입자에 의한 것이며 SBF처리 후 아파타이트가 생성되어 있음을 알 수 있다. 또한 생성된 아파타이트 사이로 콜라겐이 분포되어 있음을 알 수 있다.

[0074] <실험예 2> 지지체의 셀 증식거동 평가

[0075] 세포 증식거동을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0076] 상기 실시예 1 및 비교예 1에 의하여 제조된 지지체를 α-MEM (1% penicilin-streptomycin, 10% FBS)에 30분 동안 침지한 후, 지지체를 꺼내어 새로운 α-MEM에 추가로 30분간 더 침지시켰다. 다시 α-MEM을 바꾸어 지지체를 침지하고, 데시케이터에 넣어 진공을 유지하면서 기포를 10분 이상 2번씩 제거하였다. 이후 α-MEM을 모두 제거하고 48웰(well) 플레이트에 지지체를 옮겼다.

[0077] MC3T3-E1(Mouse Osteoblastic Cells) 조골모세포(pre-osteoblast)를 1×10^5 (cell/50㎕/지지체)의 농도로 파종하였다. 30분 동안 배양한 후 지지체를 다시 뒤집어 세포가 외부로 나오는 것을 방지하였다. 2시간을 더 배양한 후 1 mL의 배지(α-MEM)를 추가하였다.

[0078] 상기에서 배양 중인 웰의 배지를 모두 제거하고 500 ㎕의 배지에 1% MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 용액을 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 발색된 배지를 100 ㎕씩 96웰 플레이트에 옮겨 담고 490 nm에서 흡광도를 측정하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0079] 도 3에 따르면 세포파종 3시간 경과 후 본 초기부착거동에 있어서는 표면처리 전후에 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 하지만 5일, 7일 경과 후 세포 증식거동에 있어서는 표면처리전의 샘플인 비교예 1에 비해 표면 처리한 샘플이 우수한 증식을 유도하고 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 공침법으로 처리한 샘플이 표면처리 전에 비하여 2배 정도의 우수한 증식거동을 나타냄이 확인되었다.

[0080] <실험예 3> 조골세포의 활성도 평가

[0081] 특정 기질을 탈인산화 하는 효소의 활성을 측정하여 조골세포의 활성도를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 조골모세포인 MC3T3 E-1 세포의 분화를 위하여 아스코브산이 함유한 것을 제외하고는 상기 실험예 2의 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.

[0082] ALP 활성도 = 흡광도 / 측정량 /시간

[0083] 표준화된 ALP 활성도 = ALP 활성도 / 세포 수

[0084] 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. 이 실험을 통해 MC3T3 E-1 셀이 조골세포로 분화한 정도를 알 수 있다. 도 4에 따르면, 실험결과 활성의 정도는 군 간에 특별한 차이가 없다가 21일차에 공침법(실시예 1)에서 급격히 증가하였다. 세포 당 활성도로 표준화한 그래프를 보면 14일차에서 활성도가 줄었다가 21일차에 다시 향상되었는데, 14일에 세포수가 급격히 증가하여 이와 같은 결과를 보이는 것으로 판단된다. 세포가 증식하는 과정에서 세포분화가 줄어들어 ALP 활성도가 줄어든 것으로 사료되며, 21일 결과를 보면 하이드록시아파타이트 및 콜라겐이 모두 유도된 군(실시예 1)에서 월등한 활성도를 나타낸다. 이는 표준화결과에서도 동일하게 나타났다. 즉, 세포의 증식과 분화에서 모두 세포외기질의 성분인 하이드록시아파타이트가 함유된 것이 유리함을 보여주는 것이다. 또한 생체와 가장 유사하게 모방된 구조를 유도하는 공침법을 사용함으로써 지지체 표면에 하이드록시아파타이트 및 콜라겐이 모두 노출 및 분포되어 있는 실시예 1은 조골세포로의 분화효과가 우수함을 확인시켜주었다.

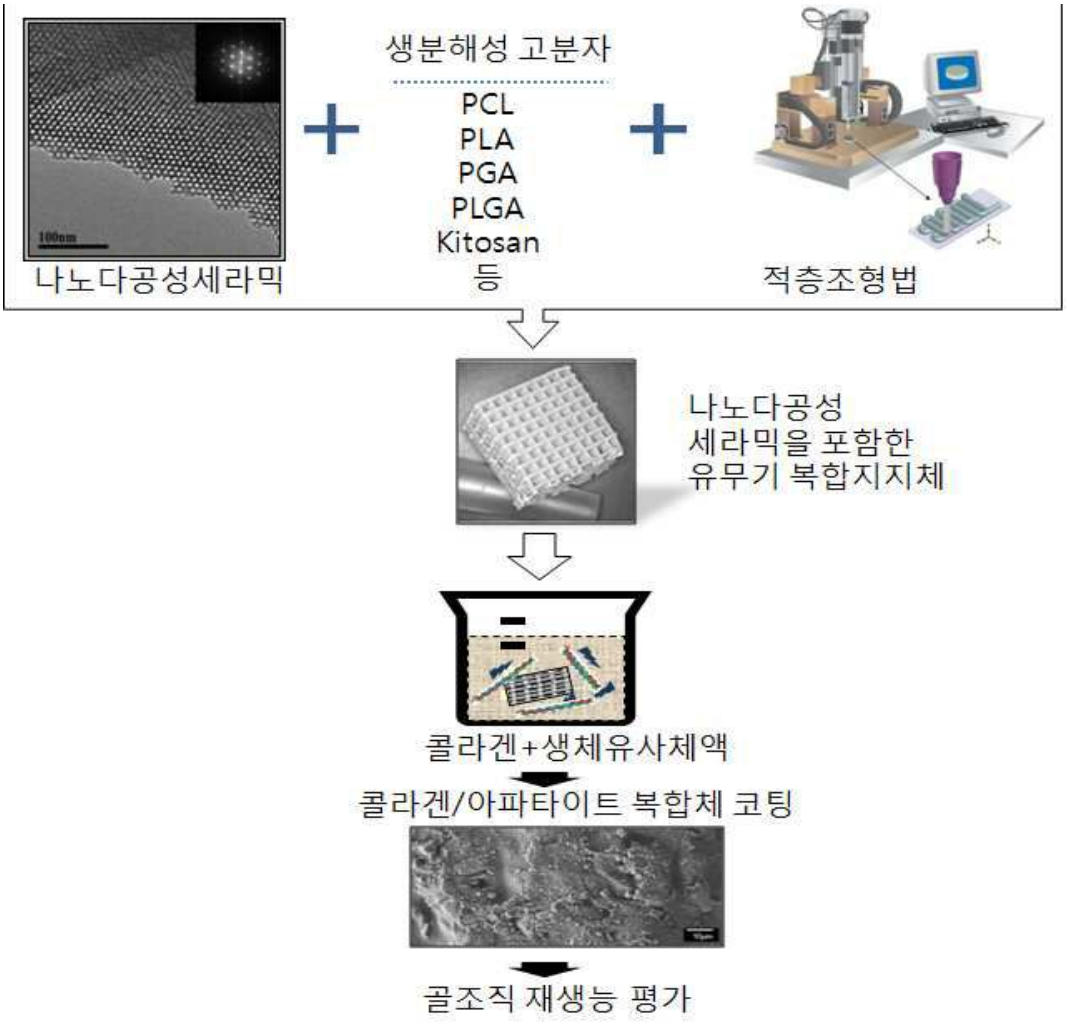
[0085] <실험예 4> 지지체 표면의 세포거동 관찰

[0086] 실시예 1 및 비교예 1에 대하여 세포파종이 이루어진 후, 지지체 표면에 파종하여 배양한 세포의 거동을 살펴보기 위하여 하기와 같은 처리를 하고, 전자주사현미경(SEM)의 관찰하고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 배지를 모두 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 지지체를 세정한 후 2.5% 글루타알데히드 용액을 넣고 30분간 빛의 차단을 유지하였다. 다시 PBS로 세정하고 50, 70, 90, 100 % 에탄올로 탈수과정을 거친 다음 클린벤치 내에서 완전히 건조시켰다.

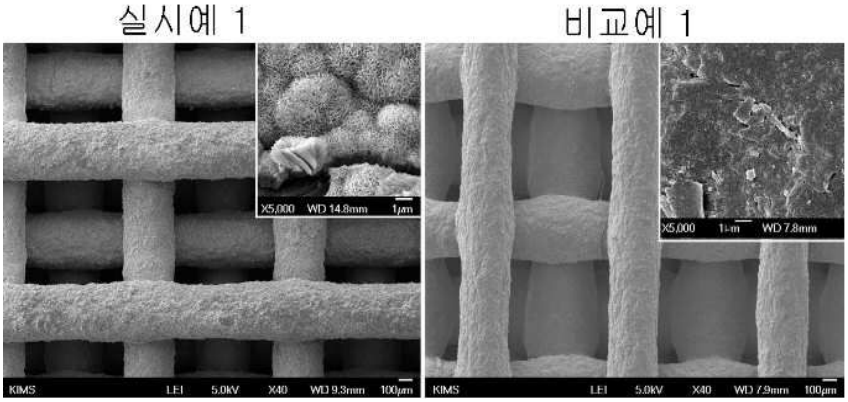
[0087] 도 5의 사진과 같이, 세포파종 5일 경과 후 지지체 표면을 관찰한 결과 표면처리를 하지 않은 지지체에서는 세포 성장을 관찰하기가 어려웠으나 공침법으로 표면처리되어 HAp 및 콜라겐이 표면에 공존하고 있는 지지체의 경우 세포성장이 우수하게 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 세포성장은 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 공침법으로 표면처리된 지지체의 전역에서 균일하게 이루어지고 있음이 확인되어 본 발명의 유효성이 입증되었다. 도7의 사진은 세포파종 21일 경과 후 지지체를 관찰한 결과이며 표면처리를 하지 않은 지지체에 비해 표면처리 한 지지체에 확연하게 세포재생활동이 우수하게 일어나고 있음이 확인되었다.

도면

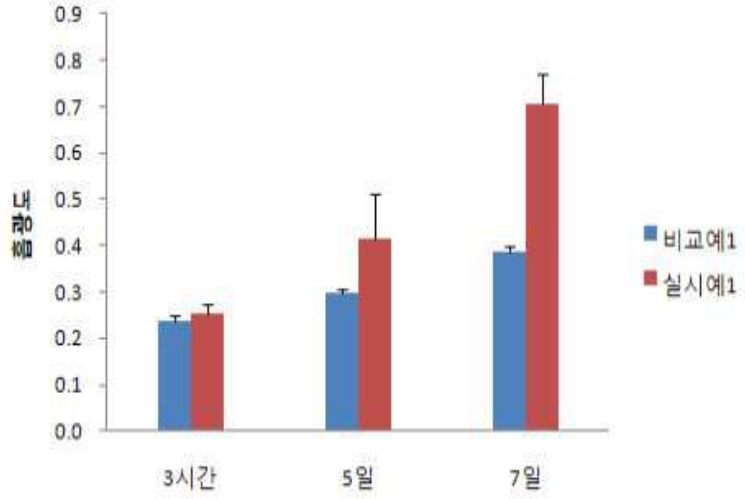
도면1


생분해성 고분자
PCL
PLA
PGA
PLGA
Kitosan
등
나노다공성세라믹
적층조형법
나노다공성
세라믹을 포함한
유무기 복합지지체
콜라겐+생체유사체액
콜라겐/아파타이트 복합체 코팅
골조직 재생능 평가

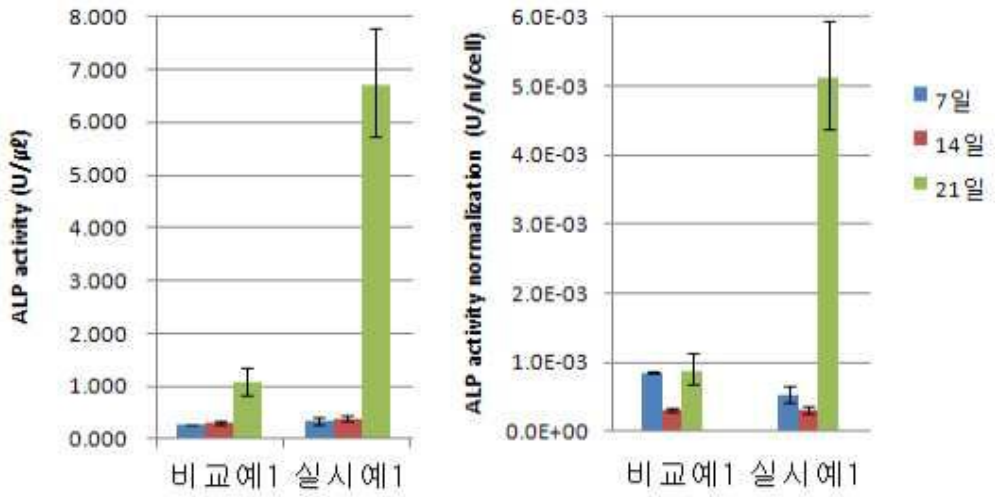
도면2


실시예 1
비교예 1

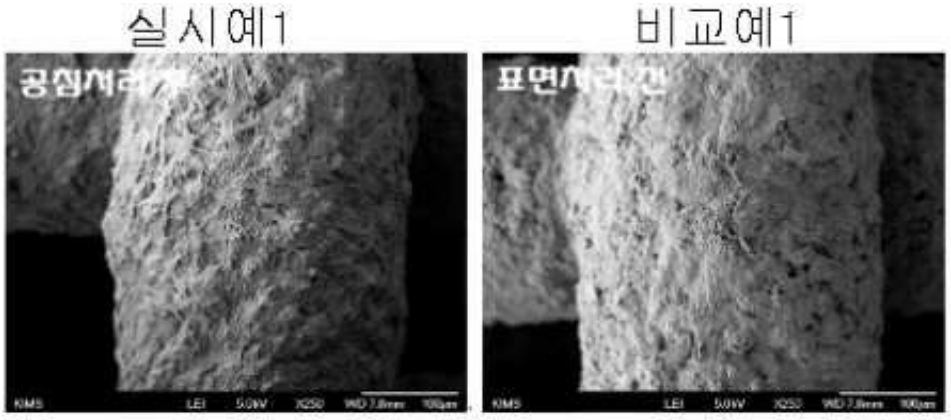
도면3


흡광도
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
3시간
5일
7일
비교예1
실시예1

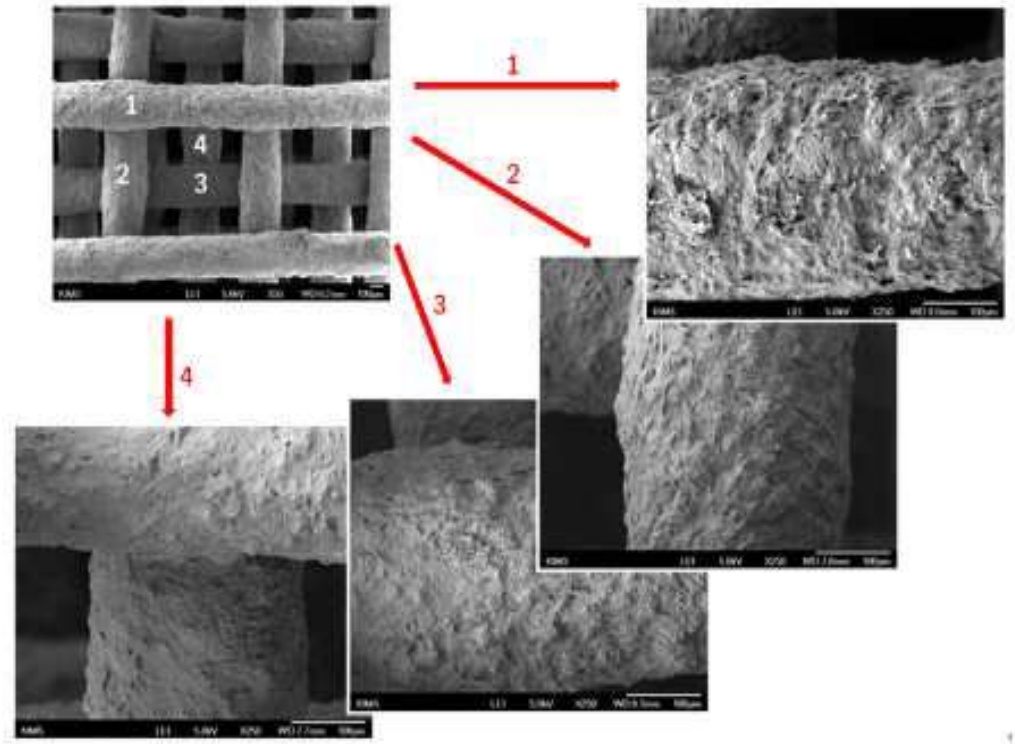
도면4


ALP activity (U/μℓ)
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
비교예1 실시예1
ALP activity normalization (U/nl/cell)
6.0E-03
5.0E-03
4.0E-03
3.0E-03
2.0E-03
1.0E-03
0.0E+00
비교예1 실시예1
7일
14일
21일

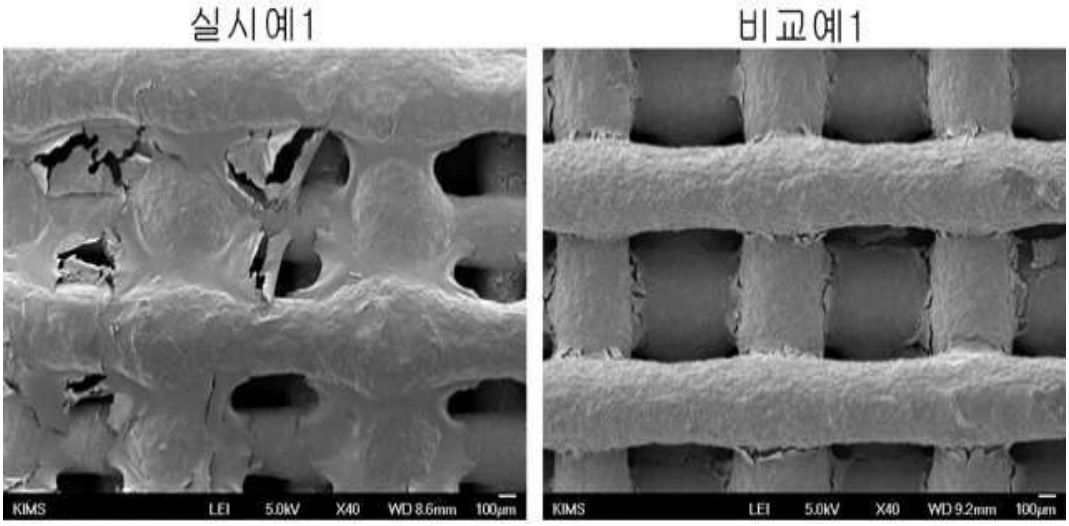
도면5


실시예1
비교예1

도면6


1
2
3
4
1
2
3
4

도면7


실시예1
비교예1
KIMS LEI 5.0kV X40 WD 8.6mm 100μm
KIMS LEI 5.0kV X40 WD 9.2mm 100μm