



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0014291
(43) 공개일자 2019년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61L 27/46 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) C08K 3/32 (2006.01)
C08L 89/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61K 9/0092 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0097559

(22) 출원일자 2017년08월01일

심사청구일자 2017년08월01일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

고영학

경기도 용인시 수지구 성북2로 86 112동 903호
(성북동, 성동마을LG빌리지1차아파트)

최재원

서울특별시 서초구 잠원로 150 한신아파트 4동 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 17 항

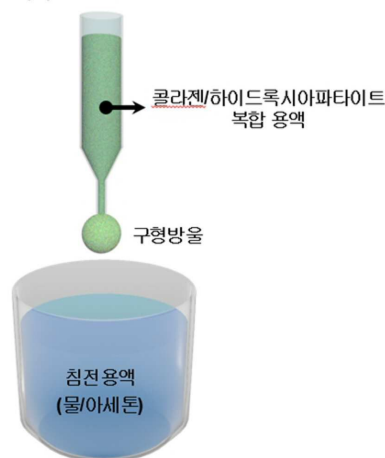
(54) 발명의 명칭 나노섬유구조형 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어 제조 기술

(57) 요약

본 발명은 세포외 기질과 유사한 콜라젠 나노섬유로 구성된 기공구조를 가지고, 생체활성도가 우수한 생체 세라믹을 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

(A) 구형지지체 형성



(52) CPC특허분류

A61K 9/1611 (2013.01)
A61K 9/1682 (2013.01)
A61L 27/46 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
C08K 3/32 (2013.01)
C08L 89/00 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)
A61L 2400/12 (2013.01)
C08K 2003/325 (2013.01)

(72) 발명자

조인환

서울특별시 성북구 오패산로 46 월곡두산위브아파트 130동 2004호

김종우

경기도 군포시 당산로 135번길 49 성균아파트 나동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1501030016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 바이오프린팅 기술을 이용한 연부조직 재생용 맞춤형 지지체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계;

상기 혼합용액을 압출용 피스톤에 충전하고, 압출기에 연결한 후 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울을 형성하는 단계; 및

상기 형성된 방울을 침전용액에 담가 침전용액과 방울 간에 상분리를 유도하여 마이크로스피어를 제조하는 단계를 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

생체 세라믹은 수산화인회석(하이드록시아파타이드, Hydroxy Apatite; HA), 불소 함유 수산화인회석(Fluoridated Hydroxy Apatite, FHA), 삼인산칼슘(tricalciumphosphate, TCP) 등의 인산 칼슘계 화합물(Calcium Phosphates), BCP(biphasic calcium phosphate), 알루미나(alumina), 지르코니아(zirconina), 실리카(silica) 및 바이오글래스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

생체 세라믹은 콜라젠 총 중량에 대하여 1 내지 30 중량%로 포함되는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액의 용매는, 물, 아세트산 또는 이들의 혼합용매인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

피스톤의 노즐의 직경은 0.2 내지 0.6 mm인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

압출기의 압력은 1초 동안 30 내지 60 kPa인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

침전용액의 pH는 10 내지 11 인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

피스톤의 노즐 끝에 형성된 방울을 침전용액에 담근 후, 상기 방울을 피스톤과 분리하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

피스톤에서 분리된 방울은 침전용액에 10 분 내지 60 분 동안 노출되는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

침전용액에서 마이크로스피어를 분리한 후, 상기 마이크로스피어를 가교 및 동결건조하는 단계를 추가로 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

가교제는 EDC(N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide), NHS(N-hydroxysuccinimide), 에틸렌글리콜디글리시딜에테르(ethylene glycol diglycidyl ether:EGDGE), 부탄디올디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether:BDDE), 헥산디올디글리시딜에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌글리콜디글리시딜에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜디글리시딜에테르(polypropylene glycol diglycidyl ether) 및 디글리세롤폴리글리시딜에테르(diglycerol polyglycidyl ether)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

가교는 10 내지 30 시간 동안 수행되는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액은 성장인자를 추가로 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어에 약물을 담지하는 단계를 추가로 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법.

청구항 15

제 1 항에 따른 제조 방법에 의해 제조되며,

나노섬유형 구조를 가지는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 평균 입자 직경은 600 내지 1000 μm 인 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는 나노섬유형 구조 내에 성장인자 또는 약물이 담지되는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포의 기질과 유사한 콜라젠 나노섬유로 구성된 기공구조를 가지고, 생체활성도가 우수한 생체 세라믹을 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 다공성 구형지지체, 즉 마이크로스피어는 넓은 표면적을 가져 생체활성도가 높은 분자들을 높은 효율로 탑재할 수 있고, 또한 긴 물질 전달 경로를 가져 상기 탑재된 분자들의 방출거동 조절이 가능하므로, 최근 주목을 받고 있다.

[0004] 생체적합성과 생체분해도가 우수한 구형지지체는 뼈, 연골 및 근육의 손상된 부위를 치료/재생하기 위한 약물, 단백질, 세포를 전달하는 담지체로서 다양한 분야에서 폭넓게 사용된다. 또한, 구형지지체는 조직재생을 유도하기 위한 필러로써 복잡한 형태의 결손부위를 효율적으로 채우는 역할을 수행한다.

[0005] 다공성 구형지지체는 에멀전(emulsion) 공법을 통해 제조된다(특허문헌 1). 그러나, 에멀전 공법을 통해 제조된 구형지지체는 크기가 일정하지 않고, 크기 분포가 다양하므로, 균일한 크기로 제조하는 것이 어렵다. 또한, 에멀전 공법은 친유성(비친수성)용매를 제거하는 공정을 필요로 하므로, 친유성 용매를 완전히 제거하기 어렵다는 문제점을 가진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-1115964호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 세포외 기질과 유사한 콜라겐 나노섬유로 구성된 기공구조를 가지고, 생체활성도가 우수한 생체 세라믹을 포함하는 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어를 제조하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 콜라겐 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계;
- [0011] 상기 혼합용액을 압출용 피스톤에 충전하고, 압출기에 연결한 후 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울을 형성하는 단계; 및
- [0012] 상기 형성된 방울을 침전용액에 담가 침전용액과 방울 간에 상분리를 유도하여 마이크로스피어를 제조하는 단계를 포함하는 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 전술한 제조 방법에 따라 제조되고, 나노섬유형 구조를 가지는 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어를 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어는 생체적합성이 우수하고, 세포독성(cytotoxicity)이 낮은 천연고분자인 콜라겐을 이용함으로써 생체 내에서의 안정성을 제공할 수 있다.
- [0017] 또한, 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어는 상기 마이크로스피어 내부가 나노섬유형 기공구조를 가지므로, 약물이나 성장인자(growth factor) 등을 담지 및 전달하는 매개체로서의 적용이 가능하다.
- [0018] 또한, 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어는 생체의 세포외 기질과 유사한 내부구조를 가지므로, 생체 내 결손 부위의 필러로 사용될 수 있으며, 이 경우, 우수한 조직 재생능력뿐만 아니라 세포의 부착, 증식, 분화를 유도/자극 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법은 압출 시간과 압출 압력을 제어함으로써, 상기 마이크로스피어의 크기를 일정한 크기로 제어할 수 있으며, 생체 세라믹의 양을 조절함으로써 생체활성도를 인위적으로 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 콜라겐/하이드록시아파타이트 혼합용액이 피스톤에 충전된 후, 압출기에 의해 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울이 맺힌 모습을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 피스톤의 노즐 끝에 맺힌 방울이 침전용액에 침전되었을 때의 상태를 나타내는 모식도이다.
- 도 3은 피스톤 끝에서 분리되어 침전용액에 가라앉은 방울이 침전용액 안에서 시간이 지남에 따라 서서히 안쪽까지 상분리되어 마이크로스피어로 제조되는 모습을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 콜라겐/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 형태를 보여주는

현미경 사진이다.

도 5는 하이드록시아파타이트의 함량에 따른(A: 0, B: 10 wt%, C: 15 wt%, D: 20 wt%) 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 내부의 기공구조를 보여주는 전자현미경 사진이다.

도 6은 하이드록시아파타이트의 함량에 따른(A: 0, B: 10 wt%, C: 15 wt%, D: 20 wt%) 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 생체활성도를 보여주는 전자현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계;
- [0023] 상기 혼합용액을 압출용 피스톤에 충전하고, 압출기에 연결한 후 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울을 형성하는 단계; 및
- [0024] 상기 형성된 방울을 침전용액에 담가 침전용액과 방울 간에 상분리를 유도하여 마이크로스피어를 제조하는 단계를 포함하는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 피스톤의 노즐에 형성된 방울을 구형지지체라 표현할 수 있으며, 상기 상분리가 완료된 방울(구형지지체)을 마이크로스피어라 표현할 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명의 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법을 보다 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명에 따른 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는
- [0029] (A) 콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계;
- [0030] (B) 상기 혼합용액을 압출용 피스톤에 충전하고, 압출기에 연결한 후 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울을 형성하는 단계; 및
- [0031] (C) 상기 형성된 방울을 침전용액에 담가 침전용액과 방울 간에 상분리를 유도하여 마이크로스피어를 제조하는 단계를 통해 제조될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 단계 (A)는 콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계이다. 상기 콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액은 콜라젠/생체 세라믹 혼합용액(복합용액)이라 표현할 수 있다.
- [0033] 콜라젠은 피부의 섬유 모세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서 세포외간질에 존재하고, 생체 단백질 총 중량의 30%를 차지하는 중요한 단백질로 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. 주된 기능으로는 피부의 기계적, 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착의 지탱 및 세포분화와 분화(유기체의 성장 혹은 상처 치유시)의 유도 등이 알려져 있다.
- [0034] 본 발명에서 생체 세라믹은 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어에 생체활성도를 부여한다. 상기 생체 세라믹으로는 수산화인회석(하이드록시아파타이트, Hydroxy Apatite; HA), 불소 함유 수산화인회석(Fluoridated Hydroxy Apatite, FHA), 삼인산칼슘(tricalciumphosphate, TCP) 등의 인산 칼슘계 화합물(Calcium Phosphates), BCP(biphasic calcium phosphate), 알루미나(alumina), 지르코니아(zirconina), 실리카(silica) 및 바이오글래스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서는 생체 세라믹으로 하이드록시아파타이트를 사용할 수 있다. 상기 하이드록시아파타이트는 인체 뼈의 구성성분과 동일한 무기물이며, 생체활성도가 우수하여 세포부착과 세포증식을 유도할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 생체 세라믹은 분말 형태로 사용할 수 있다.
- [0037] 이러한 생체 세라믹은 콜라젠 총 중량(100 중량%(wt%))에 대하여 1 내지 30 중량%, 또는 10 내지 20 중량%(wt%)로 사용할 수 있다. 상기 함량 범위에서 구형지지체로의 제조가 용이하며, 생체활성도 및 골재생능을 부여할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 혼합용액의 용매는 콜라젠을 용해시킬 수 있다면 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 구체적으로, 물, 아세트산 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 물 및 아세트산의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 혼합용액의 pH는 4 내지 4.2일 수 있다. 상기 범위에서 후술할 상분리에 의해 혼합용액 중

의 콜라겐이 나노단위의 콜라겐 나노섬유로 제조될 수 있다.

- [0040] 또한, 일 구체예에서, 콜라겐, 생체 세라믹 및 용매의 혼합을 위해 회전교반기 등의 교반기를 이용하여 교반하는 과정을 추가로 수행할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 혼합용액은 후술할 피스톤의 노즐에 구형지지체의 방울의 형성이 가능한 정도의 점도를 가질 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 단계 (B)는 단계 (A)에서 제조된 혼합용액을 압출용 피스톤에 충전하고, 압출기에 연결한 후 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울을 형성하는 단계이다.
- [0043] 본 발명에서는 혼합용액을 피스톤에 충전한 후 상온에서 10 내지 30 시간동안 보관하여 혼합용액 내의 기포를 최소화할 수 있다.
- [0044] 상기 압출용 피스톤은 당업계에서 사용되는 제품을 제한없이 사용할 수 있다. 피스톤의 노즐의 직경은 특별히 제한되지 않으며, 제조하고자 하는 마이크로스피어의 입자 크기에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 노즐의 직경은 0.2 내지 0.6 mm, 또는 0.2 내지 0.3 mm일 수 있다.
- [0045] 또한, 압출기의 압력은 제조하고자 하는 마이크로스피어의 입자 크기에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 1초 동안 30 내지 60 kPa, 또는 40 내지 50 kPa의 압력을 가질 수 있다.
- [0046] 또한, 방울의 형성은 공기 중에서 수행할 수 있다.
- [0047] 상기 단계에서는 콜라겐/생체 세라믹 혼합용액이 피스톤에 충전되고, 압출기를 통한 압력에 의해 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울이 형성될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 단계 (C)는 단계 (B)에서 형성된 방울을 침전용액에 담가 침전용액과 방울 간에 상분리를 유도하는 단계이다.
- [0049] 상기 침전용액의 용매로는 콜라겐의 비용매, 또는 비용매와 용매의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 아세톤 등의 케톤 계열 유기 용매를 포함하는 용매를 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 침전용액의 pH는 10 내지 11 일 수 있다. 상기 pH는 염기, 예를 들어, 암모니아수를 사용하여 조절할 수 있다. 상기 pH 범위에서 콜라겐/생체 세라믹 혼합용액 및 침전용액 사이에 상분리가 용이하게 일어날 수 있다. pH가 10 미만일 경우, 나노섬유형 구조의 형성에 어려움이 있다.
- [0051] 본 발명에서는 비용매상분리법에 의해 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어를 제조할 수 있다. 상기 비용매상분리법은 콜라겐을 포함하는 혼합용액 내의 용매와 침전용액 내의 비용매의 상호확산을 통해 상분리가 이루어지는 방법으로, 용매는 침전용액으로 비용매는 혼합용액(방울) 내부로 확산됨에 따라 고분자는 매트릭스를 형성하고 용매는 제거되어 기공을 형성하게 된다. 이러한, 비용매상분리법을 통한 용매와 비용매의 교환을 통해 높은 기공도를 가짐과 동시에 3차원적으로 연결된 콜라겐 나노섬유를 형성할 수 있다.
- [0052] 상기 비용매상분리법은 다른 종래 기술, 예를 들어 에멀전법을 통한 방법과 비교하여, 생체의 세포외 기질과 유사한 구조를 갖는 콜라겐 섬유 기공구조를 가지며, 용액 제조시 첨가되는 하이드록시아파타이트의 양을 조절함으로써 마이크로스피어의 생체활성도를 조절할 수 있다. 또한, 본 발명은 마이크로스피어의 크기가 일정하지 않았던 에멀전(emulsion) 공법과는 달리, 일정한 크기의 마이크로스피어를 형성할 수 있다는 장점을 가진다.
- [0053] 본 발명에서는 피스톤의 노즐 끝에 형성된 방울을 침전용액에 담근 후, 상기 피스톤과 방울을 분리할 수 있다. 이때, 방울은 피스톤에서 분리되어 침전용액에 가라앉게 된다. 즉, 방울을 침전용액에 담갔다 뺄 때 구형의 방울이 노즐에서 분리되는 방법을 통해 마이크로스피어를 제조할 수 있다.
- [0054] 상기 피스톤에서 분리된 방울은 침전용액에 10 분 내지 60 분, 또는 10 분 내지 30 분 동안 노출될 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 방울을 침전용액에 담그면(노출하면), 피스톤과 연결된 부분을 제외한 방울의 나머지 표면은 상분리 현상을 통해 빠르게 고화되며, 기공구조의 형태를 띄게된다. 또한, 피스톤 끝에서 분리되어 침전용액에 가라앉은 방울은 침전용액 안에서 시간이 지남에 따라 서서히 안쪽까지 상분리되며, 나노섬유형 구조를 가지는 콜라겐/생체 세라믹 마이크로스피어가 형성될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 나노섬유형 구조는 나노사이즈의 나노섬유(nanofiber)들이 서로 얹혀있으며, 상기 나노섬유들 사이에 미세 기공이 형성된 구조를 의미한다. 상기 미세기공은 3차원적으로 연결될 수 있다.

- [0057] 본 발명에서는 단계 (C)를 수행한 후, (D) 침전용액에서 마이크로스피어를 분리한 후, 상기 마이크로스피어를 가교 및 동결건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서는 마이크로스피어를 가교하여 상기 마이크로스피어 자체의 수축을 방지하고, 구조적 안정성을 부여할 수 있다.
- [0059] 상기 가교시 사용되는 가교제의 종류는 특별히 제한되지 않으며, EDC(N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide), NHS(N-hydroxysuccinimide), 에틸렌글리콜디글리시딜에테르(ethylene glycol diglycidyl ether:EGDGE), 부탄디올디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether:BDDE), 헥산디올디글리시딜에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌글리콜디글리시딜에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜디글리시딜에테르(polypropylene glycol diglycidyl ether) 및 디글리세롤폴리글리시딜에테르(diglycerol polyglycidyl ether)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0060] 상기 가교는 가교제를 포함하는 용액에 마이크로스피어를 담지하여 수행할 수 있으며, 10 내지 30 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명에서 동결건조는 마이크로스피어에 남아있는 에탄올, 물 등의 불순물을 제거하기 위해 수행할 수 있다.
- [0062] 상기 동결건조는 동결건조기를 사용하여 수행할 수 있으며, 10 내지 30 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서는 동결건조를 수행하기 전에 가교된 마이크로스피어를 세척하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 제조 방법은 상기 마이크로스피어 내에 성장인자 또는 약물을 담지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 성장인자를 담지할 경우, 단계 (A)의 콜라젠 및 생체 세라믹을 포함하는 혼합용액의 제조 시 성장인자를 추가로 혼합하여 혼합용액을 제조할 수 있다. 상기 성장인자를 추가로 포함하는 혼합용액을 사용할 경우, 최종 제조되는 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는 그 구조 내의 기공에 성장인자를 포함하게 된다.
- [0066] 또한, 상기 약물을 담지할 경우, 단계 (C)에 의해 제조된 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어 또는 가교 및 동결건조된 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어를 약물을 포함하는 용액에 담지하는 방법을 통해 마이크로스피어의 기공 내부에 약물을 담지할 수 있다.
- [0067] 이때, 약물의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 항염제 및 항생제로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0069] 본 발명은, 또한 진술한 방법으로 제조된 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명에 의해 제조된 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는 나노섬유형 구조를 가질 수 있다.
- [0071] 상기 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어의 평균 입자 직경은 600 내지 1000 μm 일 수 있다.
- [0072] 또한, 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는 기공 내부에 성장인자 또는 약물이 담지될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 콜라젠/생체 세라믹 마이크로스피어는 약물이나 성장인자를 담지 및 전달하는 매개체로 사용할 수 있으며, 또한, 생체 내 결손부위의 필러로 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0077] 실시예

- [0078] 실시예.
- [0079] 1. 콜라젠/하이드로아파타이트 혼합용액 제조
- [0080] 상온에서 아세트산(acetic acid) 0.5 ml 및 증류수 9.5 ml를 혼합하여 콜라젠 분말을 용해시킬 산성용액을 제조하였다.
- [0081] 상기 산성용액에 콜라젠(Sewon Cellontech Co., Ltd., Seoul, Korea) 분말 0.25 g을 넣고 섞어 일정수준 이상의 점성을 갖는 콜라젠 용액을 제조하였다.
- [0082] 상기 콜라젠 용액에 하이드록시아파타이트(OssGen, Daegu, Korea) 분말 0.025 내지 0.050 g을 넣은 후, 24 시간 동안 회전교반기(MS-MP4)를 사용하여 콜라젠 용액에 하이드록시아파타이트 분말이 고르게 분산되도록 하였다.
- [0084] 2. 콜라젠/하이드로아파타이트 마이크로스피어 제조
- [0085] 아세톤 50 ml와 물 350 ml를 혼합한 후, 암모니아 1 ml 넣어 pH가 10.2인 침전용액을 제조하였다.
- [0086] 1.에서 제조된 콜라젠/하이드록시아파타이트 혼합용액을 압출용 피스톤(PS10S, Iwashita engineering, inc)에 충전하고, 상온에서 24 시간 보관하여 혼합용액 내 기포를 최소화하였다.
- [0087] 상기 콜라젠/하이드록시아파타이트 혼합용액이 충전된 피스톤을 압출기에 연결한 다음, 1 초 동안 45 kPa의 압력을 공기 중에서 가해 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체를 형성시켰다.
- [0088] 상기 피스톤의 노즐 끝에 형성된 구형지지체를 침전용액에 완전히 담가 침전용액과 구형지지체 간에 상분리가 일어나도록 하였다.
- [0089] 그 후, 피스톤을 침전용액에서 분리하여, 상기 구형지지체가 피스톤 끝에서 분리되어 침전용액으로 가라앉도록 하였다. 상기 구형지지체가 침전용액에 가라앉은 후, 침전용액에서 30분 동안 노출 시켰다.
- [0091] 3. 콜라젠/하이드로아파타이트 마이크로스피어 형태 안정화 및 불순물 제거
- [0092] EDC(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide) 0.9585 g을 에탄올 100 g에 넣어 가교제 용액을 제조하였다.
- [0093] 2.의 침전용액에 가라앉은 마이크로스피어를 가교제 용액으로 옮겨 담가 24시간 동안 가교시켜 마이크로스피어의 구조적 안정성을 강화하였다.
- [0094] 가교가 완료된 마이크로스피어는 증류수 200 ml로 5분 동안 세척하고, 동결건조기에 연결해 24 시간 동안 마이크로스피어에 남아있는 에탄올과 증류수를 완전히 제거하였다.
- [0096] 본 발명에서 도 1은 콜라젠/하이드록시아파타이트 혼합용액이 피스톤에 충전된 후, 압출기에 의해 피스톤의 노즐 끝에 구형지지체의 형태를 띄는 방울이 맺힌 모습을 나타내는 모식도이다.
- [0098] 또한, 도 2는 피스톤의 노즐 끝에 맺힌 구형지지체가 침전용액에 침전되었을 때의 상태를 나타내는 모식도이다.
- [0099] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 구형지지체는 침전용액에 노출되면 피스톤과 연결된 부분을 제외한 나머지 표면은 상분리 현상을 통해 빠르게 고화되며, 기공구조의 형태를 띄는 것을 확인할 수 있다.
- [0101] 또한, 도 3은 피스톤 끝에서 분리되어 침전용액에 가라앉은 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어가 침전용액 안에서 시간이 지남에 따라 서서히 안쪽까지 상분리되는 모습을 나타낸 모식도이다.
- [0103] 실험예 1. 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 이미지

[0104] 본 발명의 실시예에서 제조된 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 이미지를 측정하였다.

[0105] 상기 마이크로스피어의 이미지는 eld emission scanning electron microscopy(FE-SEM; JSM-6701F; JEOL Techniques, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[0107] 상기 측정 결과를 표 1 및 도 4에 나타내었다.

표 1

	콜라젠 질량 대비 하이드록시아파타이트 함량(wt%)	평균직경(μm)
A	0	802
B	10	798
C	15	806
D	20	809

[0111] 상기 표 1에서 평균직경은 각 군(A 내지 D)별로 20개의 마이크로스피어의 직경을 평균화한 것이다.

[0112] 본 발명에서 도 4는 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 형태를 나타내는 이미지이다.

[0113] 표 1 및 도 4에 나타난 바와 같이, 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 마이크로스피어의 평균직경에 유의미한 변화는 나타나지 않았다.

[0115] 실험예 2. 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 기공구조

[0116] 본 발명의 실시예에서 제조된 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 기공구조를 측정하였다.

[0118] 본 발명에서 도 5는 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 내부의 기공구조를 보여주는 이미지이다. 이때, A는 콜라젠 100 중량% 대비 하이드록시아파타이트를 0 wt%, B는 10 wt%, C는 15 wt% 및 D는 20 wt%를 포함하는 경우를 나타낸다.

[0119] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 마이크로스피어의 내부는 나노단위의 콜라젠 나노섬유로 이루어져 있으며, 기공 구조는 3차원적으로 연결되어있는 것을 확인할 수 있다.

[0120] 아울러, 하이드록시아파타이트의 함량에 상관없이, 내부 기공구조는 동일한 것을 확인할 수 있다.

[0122] 실험예 3. 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 생체활성도 측정

[0123] 본 발명의 실시예에서 제조된 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어의 생체활성도를 측정하였다.

[0124] 상기 생체활성도는 마이크로스피어를 생체유사용액(stimulated body fluid)에 24 시간 동안 노출시켜 아파타이트(인회석)가 형성되는 정도를 관찰하였다.

[0126] 본 발명에서 도 6은 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 콜라젠/하이드록시아파타이트 마이크로스피어 생체활성도를 보여주는 이미지이다. 이때, A는 콜라젠 100 중량% 대비 하이드록시아파타이트를 0 wt%, B는 10 wt%, C는 15 wt% 및 D는 20 wt%를 포함하는 경우를 나타낸다.

[0127] 상기 도 6에 나타난 바와 같이, 하이드록시아파타이트의 함량이 높아질수록, 생성되는 아파타이트의 양이 비례하여 증가함을 확인할 수 있다. 즉, 하이드록시아파타이트의 함량이 높아질수록 마이크로스피어의 생체활성도가

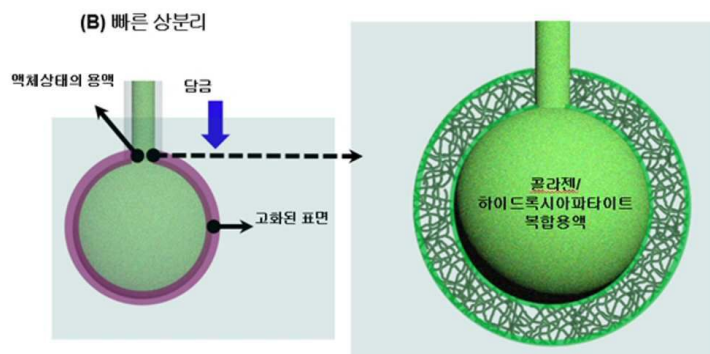
높아짐을 확인할 수 있다.

도면

도면1

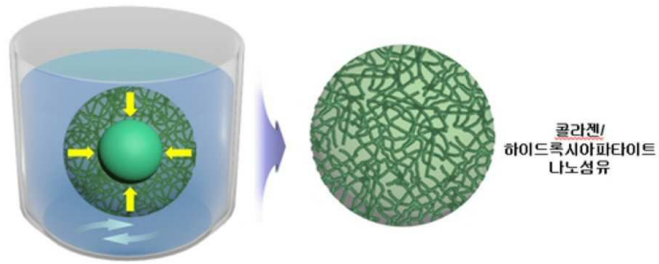


도면2

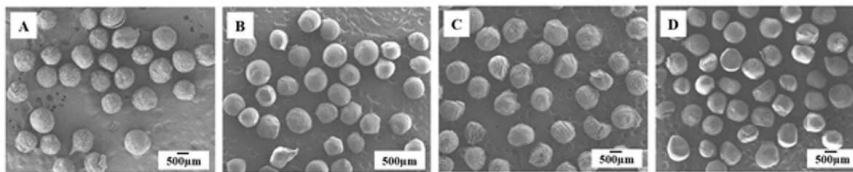


도면3

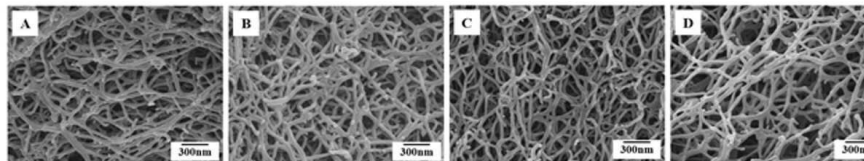
(C) 비용매에 의해 유도되는 상분리



도면4



도면5



도면6

