



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0032569

(43) 공개일자 2016년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61F 2/00 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01) A61L 27/40 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0122877

(22) 출원일자 2014년09월16일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

고영학

경기도 용인시 수지구 성북2로76번길 31(성북동, 대우푸르지오)

신관하

서울특별시 성북구 동소문로 248, 101동 803호(길음동, 삼부아파트)

김중우

경기도 군포시 변영로 380, 410동 1504호(오금동, 한라1차아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 나노섬유형 콜라겐 필라멘트로 이루어진 매크로/나노 다공성 콜라겐 지지체 제조를 위한 2단계 상분리 기반 3D 바이오프라팅 기술

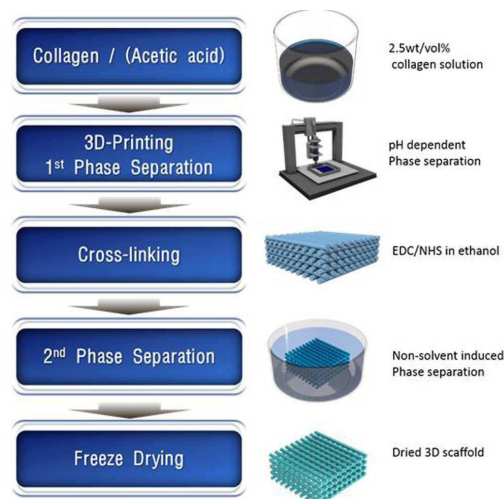
(57) 요약

본 발명은 콜라겐 고분자 및 산을 포함하는 콜라겐 용액을 제조하는 단계;

상기 콜라겐 용액을 응고 매체 내부로 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화하고, 상기 콜라겐 필라멘트를 적층하는 단계; 및

적층된 콜라겐 필라멘트를 비용매 매체에 담지하는 단계를 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1501030013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 바이오프린팅 기술을 이용한 연부조직 재생용 맞춤형 지지체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐 고분자 및 산을 포함하는 콜라겐 용액을 제조하는 단계;

상기 콜라겐 용액을 응고 매체 내부로 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화하고, 상기 콜라겐 필라멘트를 적층하는 단계; 및

적층된 콜라겐 필라멘트를 비용매 매체에 담지하는 단계를 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

콜라겐 용액의 pH는 3 내지 6이고, 응고 매체의 pH는 8 내지 11인 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

산은 아세트산, 탄산, 염산 또는 히알루론산인 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

응고 매체는 콜라겐 고분자의 비용매 또는 비용매와 용매의 혼합물인 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

압출 및 적층은 3D 바이오프린터를 통해 수행하며, 3차원으로 적층되는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

콜라겐 필라멘트의 적층은 상기 콜라겐 필라멘트들이 일방향을 향하도록 적층하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

일방향을 향하도록 적층된 필라멘트들은 10 내지 1000 μm 의 간격을 가지는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

비용매 매체는 가교제 및 비용매의 혼합물인 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 9

제 8 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 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

비용매는 에탄올 및 에틸 알코올로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

동결건조하는 단계를 추가로 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

다공성 콜라겐 지지체 중의 콜라겐 필라멘트는 나노섬유형 구조를 가지는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12항 중에서 선택된 어느 한 항에 따른 방법으로 제조되며,

평균 직경이 300 내지 1000 μm 인 하나 이상의 콜라겐 필라멘트가 일방향으로 정렬된 구조를 가지는 다공성 콜라겐 지지체.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

다공성 콜라겐 지지체는 콜라겐 필라멘트 내부에 형성된 10 내지 500 nm의 나노 기공 및 필라멘트들 사이에 형성된 평균 직경 200 내지 1000 μm 의 매크로 기공을 가지는 다공성 콜라겐 지지체.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

다공성 콜라겐 지지체는 90% 이상의 기공율을 가지는 다공성 콜라겐 지지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다공성 콜라겐 지지체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생체를 모사한 3차원 매크로 기공과 나노섬유형 필라멘트 구조로 이루어진 다공성 콜라겐 지지체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라겐(collagen)은 인체의 경조직(뼈, 치아 등) 및 연조직(연골, 피부, 인대, 근육 등)을 이루는 유기물의 주된 성분으로, 원활한 조직재생에 필수적인 성분이다. 따라서, 이러한 콜라겐 고분자를 이용하여 인체의 손상된 조직 및 장기를 효과적으로 재생하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(비특허문헌 1).

[0003] 특히, 조직재생용 콜라겐 지지체는 세포의 부착, 성장 및 분화에 적합하도록 수백 마이크로미터(100-1000 μm) 크기의 기공을 갖는 다공성 구조를 갖는 것이 바람직한 것으로 잘 알려져 있으며, 이에 따라 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있는 다양한 기술들이 개발되고 있다(비특허문헌 2).

[0004] 이러한 다공성 콜라겐 지지체를 제조하는 방법으로, 콜라겐 용액을 동결건조(freeze drying)하여 스폰지 형태로 만드는 기술이 광범위하게 사용되고 있다. 이외에 콜라겐 용액에 기공유도물질(포로젠, porogen)을 첨가한 후 매우 낮은 온도에서 동결(freezing)하여 고화시킨 후, 첨가된 포로젠을 적절한 용매로 제거하여 다공성 구조를 얻는 방법 등이 사용되고 있다(비특허문헌 3 및 4).

[0005] 한편, 조직재생용 지지체의 다공성 구조(예, 기공율, 기공크기, 기공연결도 등)를 정밀하게 제어할 수 있는 3D 바이오플라팅(3D bioplotting) 기술이 개발되어, 다양한 생분해성 고분자를 이용한 지지체 제조에 매우 활발하게 이용되고 있다(비특허문헌 5).

[0006] 3D 바이오플라팅 기술은 고분자를 고온에서 용융(melt) 시키거나 적절한 용매(solvent)를 이용하여 용액 형태로 제조한 후, 3D 프린터를 이용하여 미세노즐을 통해 고분자 용융체나 용액을 미세노즐을 통해 압출하면서 3차원적으로 적층하여 다공성 구조를 얻는 기술이다. 고분자 용융체의 경우 냉각을 통해 필라멘트를 고형화 시키고, 용액의 경우 적절한 비용매(non-solvent)내에서 압출하여 고분자를 석출(precipitation) 또는 상분리(phase separation)를 통해 고형화를 유도시킬 수 있다(비특허문헌 6 및 7).

[0007] 상기 3D 바이오플라팅 기술은 적절한 비용매의 선택에 따라 고분자 지지체를 이루는 필라멘트 내부에 수많은 미세기공을 만들 수 있어, 치밀한 필라멘트로 이루어진 다공성 지지체에 비해 더 우수한 조직 재생능을 가질 수 있을 것으로 기대되고 있다(비특허문헌 8 및 9).

[0008] 현재까지 3D 바이오플라팅 기술은 다양한 생분해성 고분자 기반 지지체 개발에 매우 활발하게 이용되었다. 하지만, 콜라겐 고분자의 경우 용융체(melt) 형태로 제조하기 위해 열을 가하는 경우 콜라겐이 물리화학적으로 변성되어 원래의 우수한 조직 재생능을 잃어버리는 문제점이 있었다. 또한 콜라겐 고분자 용액(solution)의 경우 점도가 낮고, 높은 친수성 특성을 갖기 때문에, 통상적인 3D 바이오플라팅 기술에 직접적으로 적용하기에는 다소 어려운 점이 있었다.

[0009] 최근, 콜라겐 용액을 미세노즐을 통해 압출과 동시에 매우 낮은 온도에서 급속으로 동결하여 필라멘트를 고형화시키는 방식으로 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있는 새로운 방식의 3D 바이오프린팅 기술이 개발되었다(비특허문헌 10).

[0010] 특히, 이 기술은 콜라겐 용액을 매우 낮은 온도에서 급속으로 동결하여 콜라겐 필라멘트를 고형화시키는 방식을 채택하고 있으며, 동결시 콜라겐 용액에 존재하는 다량의 물이 얼음 결정으로 성장하고, 이를 동결건조 과정을

통해 제거하므로, 다공성 콜라겐 필라멘트를 제조할 수 있었다.

[0011] 하지만, 상기 기술은 고분자 용액을 필라멘트 형태로 동결하기 위해 매우 낮은 온도(예, -40°C)가 필요하여 부가적인 장치가 필요로 한다. 또한, 적층을 반복할수록 동결부분(예, -40°C)으로부터 멀어짐으로서 콜라겐 필라멘트를 효과적으로 고형화시킬 수 없어, 두꺼운 3차원 다공성 지지체를 제조하기에는 한계가 있다.

[0012] 또한, 생체조직을 구성하는 주요 성분인 세포의 기지물질(extra cellular matrix)의 나노구조를 모방한 나노다공성 필라멘트로 구성된 다공성 콜라겐 지지체의 개발 사례는 아직 보고되지 않았으며, 빠르고 완벽한 조직재생을 유도할 수 있는 매크로 수준의 기공($100\text{--}1000\ \mu\text{m}$ 크기)과 나노수준($< 1\ \mu\text{m}$)의 기공을 동시에 갖는 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있는 새로운 기술 개발은 아직 보고되지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 1. B.D. Walters and J.P. Stegemann, "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scale," ACTA BIOMATERIALIA, 10 [4] 1488-1501 (2014)
- (비특허문헌 0002) 2. K.F. Leong, C.M. Cheah, C.K. Chua, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, Biomaterials 24 (2003) 2363-2378
- (비특허문헌 0003) 3. H. Schoof, J. Apel, I. Heschel, G. Rau, "Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges," J. Biomed. Mater. Res., 58 [4] 352-7 (2001)
- (비특허문헌 0004) 4. Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, "Preparation of collagen scaffolds with controlled pore structures and improved mechanical property for cartilage tissue engineering," Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 28 [5] 426-438 (2013)
- (비특허문헌 0005) 5. K.F. Leong, C.M. Cheah, C.K. Chua, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, Biomaterials 24 (2003) 2363-2378
- (비특허문헌 0006) 6. S.A. Park, S. H. Lee, W.D. Kim, "Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering," Bioprocess and Biosystems Engineering, 34 [4] 505-513 (2011)
- (비특허문헌 0007) 7. Y.H. Koh, I.K. Jun, H.E. Kim, "Fabrication of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite scaffold using rapid direct deposition. Materials Letters," 60, 1184-1187 (2006)
- (비특허문헌 0008) 8. B. Dorj, J.H. Park, H.W. Kim., "Robocasting chitosan/nanobioactive glass dual-pore structured scaffolds for bone engineering," Mater. Lett., 73, 119-122 (2012)
- (비특허문헌 0009) 9. K.H. Shin, I.H. Jo, S.E. Kim, Y.H. Koh, H.E. Kim, "Nonsolvent Induced Phase Separation (NIPS)-based 3D Plotting for 3-Dimensionally Macrochanneled Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds with Highly Porous Frameworks," Mater. Lett. 122, 348-351 (2014)
- (비특허문헌 0010) 10. G.H. Kim, S.H. Ahn, H. Yoon, Y.Y. Kim, W. Chun, "A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering," J. Mater. Chem., 19, 8817-8823 (2009)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 제어된 매크로 기공구조를 갖는 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있는 3D 바이오플라팅 기술과 나

노섬유형 콜라겐 필라멘트를 제조할 수 있는 2단계 상분리 공정(two-step phase separation) 기술을 결합하여, '2단계 상분리 기반 3D 바이오플라팅 기술'을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명에서는 콜라겐 고분자 및 산을 포함하는 콜라겐 용액을 제조하는 단계;
- [0016] 상기 콜라겐 용액을 응고 매체 내부로 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화하고, 상기 콜라겐 필라멘트를 적층하는 단계; 및
- [0017] 적층된 콜라겐 필라멘트를 비용매 매체에 담지하는 단계를 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명에서는 전술한 제조 방법에 의해 제조되고, 평균 직경이 300 내지 1000 μm 인 하나 이상의 콜라겐 필라멘트가 일방향으로 정렬된 구조를 가지는 다공성 콜라겐 지지체를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에서는 3D 바이오프린터를 부가적인 장치, 예를 들어, 동결 시스템 없이 상온에서 3차원적으로 연결된 매크로 기공과 나노기공을 동시에 갖는 매크로/나노 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 컴퓨터 제어기반 3D 바이오플라팅 기술을 응용한 것으로, 다공성 콜라겐 지지체의 매크로 기공구조(기공율, 기공 크기, 기공연결도 등)를 임의로 제어할 수 있으며, 다양한 조직재생 부위에 적합한 맞춤형 기계적 물성(강도) 및 조직 재생능을 갖는 다공성 지지체를 제조할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에서는 생체의 세포외기질물질의 나노구조를 모방한 나노섬유형 콜라겐 필라멘트를 제조할 수 있어, 다공성 콜라겐 지지체의 조직재생능을 향상시킬 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 다공성 콜라겐 지지체는 3차원적으로 연결된 매크로 기공과 나노기공을 동시에 갖는 독특한 구조를 가지므로, 상기 다공성 콜라겐 지지체를 조직 재생용 지지체로 활용시 매우 우수한 골조직 재생능을 보일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법을 나타내는 개략도이다.
- 도 2는 1차 상분리 유도 후의 다공성 콜라겐 지지체의 형상을 보여주는 광학현미경 이미지이다.
- 도 3은 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 형상 및 콜라겐 필라멘트의 표면구조를 보여주는 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscopy)이미지이다.
- 도 4는 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 형상(횡단면) 및 나노섬유형 콜라겐 필라멘트 구조를 보여주는 주사전자현미경 이미지이다.
- 도 5는 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 기계적 물성(인장강도 및 압축강도)을 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 생체적합성을 보여주는 공초점주사전자현미경(CLSM; Confocal Laser Scanning Microscopy) 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 콜라겐 고분자 및 산을 포함하는 콜라겐 용액을 제조하는 단계;
- [0025] 상기 콜라겐 용액을 응고 매체 내부로 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화하고, 상기 콜라겐 필라멘트를 적층하는 단계; 및

- [0026] 적층된 콜라겐 필라멘트를 비용매 매체에 담지하는 단계를 포함하는 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0027] 이하, 본 발명에 따른 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법에 대해 구체적으로 설명한다.
- [0028] 본 발명에서는 먼저, 콜라겐 고분자 및 산을 포함하는 콜라겐 용액을 제조한다. 본 발명에서는 상기 단계를 ‘콜라겐 용액 제조’라 명칭할 수 있다.
- [0029] 상기 콜라겐 용액은 콜라겐 고분자 및 산을 혼합하여 제조할 수 있다.
- [0030] 콜라겐은 피부의 섬유 모세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서 세포외간질에 존재하고, 생체 단백질 총중량의 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.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 콜라겐은 콜라겐 I, III, 및 IV형일 수 있으며, 구체적으로 콜라겐 I형 일 수 있다. 상기 콜라겐은 가축의 가죽과 뼈, 소의 무릎관절 등에서 추출함으로써 생산하거나 인간의 사체 또는 태반조직으로부터 추출하여 생산할 수 있다. 또한, 세포배양 방법을 이용하여 생산할 수 있다.
- [0032] 산은 콜라겐 고분자를 용해시킬 수 있다면, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 이러한 산으로, 아세트산(acetic acid), 탄산, 염산 또는 히알루론산을 사용할 수 있다.
- [0033] 상기 콜라겐 용액의 pH는 3 내지 6일 수 있다. 상기 범위에서 후술할 1차 상분리 유도에 의해 콜라겐 용액 중의 콜라겐 고분자가 나노섬유형 콜라겐 필라멘트로 겔화할 수 있다.
- [0034] 또한, 콜라겐 용액에서 콜라겐 고분자는 1 내지 10 wt/vol%로 존재할 수 있다. 일 구체예에서 상기 콜라겐 고분자는 산 100 ml 대비 1 내지 10 g으로 포함될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서는 콜라겐 고분자 및 용매의 혼합을 위해 자석 교반기 등의 교반기를 이용하여 교반하는 과정을 추가로 수행할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서는 콜라겐 용액을 제조한 후, 상기 콜라겐 용액을 응고 매체 내부로 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화하고, 상기 콜라겐 필라멘트를 적층하는 단계를 수행한다. 상기 단계에서는 콜라겐 용액을 3D 바이오프린터 장비를 이용하여 응고 욕조 내에서 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔(gel)화하여 형상을 유지하고, 3차원적으로 적층할 수 있다. 이는 콜라겐 용액과 응고 매체의 수소 이온 농도에 의한 상분리 현상의 유도에 의해 이루어진다. 따라서, 본 발명에서는 상기 단계를 ‘1차 상분리 유도’라 명칭할 수 있다.
- [0037] 구체적으로, 콜라겐 용액을 응고 매체가 담지된 응고 욕조(coagulation bath) 내에서 압출하여 1차 상분리를 유도하는데, 상기 응고 매체의 종류는 콜라겐 용액을 겔화시킬 수 있는 액체라면 특별히 제한되지 않는다.
- [0038] 구체적으로, 응고 매체는 콜라겐 고분자의 비용매 또는 비용매와 용매의 혼합물일 수 있다. 상기 콜라겐 고분자의 비용매는 아세톤 등의 케톤 계열 유기 용매일 수 있으며, 용매는 물 또는 아세트산일 수 있다. 상기 응고 매체로 비용매와 용매의 혼합물을 사용할 경우, 비용매 및 용매의 비율은 1:99 내지 10:90 또는 3:97 내지 7:93일 수 있다.
- [0039] 상기 응고 매체의 pH는 8 내지 11일 수 있다. 상기 범위에서 콜라겐 용액 및 응고 매체 사이의 상분리 유도 현상이 용이하게 일어나며, 콜라겐 용액 중의 콜라겐 고분자가 나노섬유형 콜라겐 필라멘트로 겔화할 수 있다. 상기 응고 매체의 pH는 암모니아수 또는 염산(1N-HCl)을 사용하여 8 내지 11로 조정할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 콜라겐 용액의 압출 및 적층은 3D 바이오프린터를 사용하여 수행하는데, 3D 바이오프린터를 사용함으로써 사용자가 원하는 구조로 프로그램하여 적층할 수 있으며, 복잡한 구조의 지지체를 용이하게 제조할 수 있다. 성형체의 적층 시 바이오프린터의 속도는 압출 속도에 따라 제어될 수 있다. 상기 3D 바이오프린터는 파이버를 압출하는 압출 시스템(압출기)와 연결 설치되어, 압출 시스템에서 압출된 성형체를 프로그램된 디자인에 따라 적층할 수 있다. 구체적으로 압출된 성형체를 원하는 방향에 따라 적층할 수 있으며 수회 적층할 수 있다.
- [0041] 일 구체예에서, 3D 바이오프린터를 이용하여 콜라겐 용액을 응고 욕조 내에 미세노즐을 통해 압출할 수 있다.

상기 pH 3 내지 6의 콜라겐 용액은 pH 8 내지 11인 응고 매체와 pH 농도 차에 의해 상 분리되어 응고 매체 내에서 콜라겐 필라멘트로 겔화되고, 상기 콜라겐 필라멘트를 용이하게 적층할 수 있다.

[0042] 상기 적층은 3차원으로 적층될 수 있으며, 일 구체예에서는 콜라겐 필라멘트가 일 방향성을 가지도록 적층할 수 있다. 상기 일 방향성이란 필라멘트가 다층으로 형성된 필라멘트 적층체에서 필라멘트들이 일정 간격으로 적층된 하나의 층을 기준으로 한 쪽 방향으로 향함을 의미한다. 즉, 필라멘트가 다층으로 형성될 경우, 하나의 층은 필라멘트들이 한 방향으로 일정 간격을 가지도록 형성되며, 상기 하나의 층과 접하는 다른 층은 필라멘트들이 하나의 층과 수직하는 방향으로 일정 간격을 가지도록 형성될 수 있다. 이때, 필라멘트 사이의 간격은 10 내지 1000 μm 일 수 있다.

[0043] 일 구체예에서, 콜라겐 용액의 압출 시 10 내지 20 kPa의 압축공기를 주입하여 압출할 수 있으며, 노즐의 입경은 1,000 μm , 800 μm 이하, 600 μm 이하 또는 400 μm 이하일 수 있다. 또한, 3D 프린팅 속도, 즉 압출 속도는 1 내지 10 mm/s 또는 1 내지 5 mm/s 범위 내로 제어할 수 있으며, 높이 방향으로 50 내지 150 mm/s 또는 80 내지 120mm/s 의 속도로 적층할 수 있다.

[0044] 상기 단계에 의해 콜라겐 필라멘트의 적층체를 제조할 수 있다.

[0045] 본 발명에서는 ‘1차 상분리 유도 단계’ 후에, 적층된 콜라겐 필라멘트를 비용매 매체에 담지하는 단계를 수행한다. 상기 단계에서는 겔화된 콜라겐 필라멘트 내의 콜라겐 고분자간의 화학적 가교를 유도하여 콜라겐 필라멘트를 구조적으로 안정화할 수 있다. 즉, 상기 단계에서는 콜라겐 필라멘트 간의 접착을 증진시킬 수 있다. 또한, 잔류하고 있는 물을 용매추출법을 이용하여 제거하여 나노섬유형 구조를 갖는 콜라겐 필라멘트를 형성할 수 있다. 본 발명에서는 상기 단계를 ‘2차 상분리 유도 단계’ 라 명칭할 수 있다.

[0046] 비용매 매체는 콜라겐 고분자의 비용매와 가교제의 혼합물일 수 있다.

[0047] 가교제는 콜라겐 필라멘트 간의 화학적 가교를 유도하고 콜라겐 필라멘트를 구조적으로 안정화하여, 최종 제조되는 다공성 콜라겐 지지체의 물성을 향상시킬 수 있다. 이러한, 가교제로는 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 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 가교제로 EDC(N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide) 및 NHS(N-hydroxysuccinimide)을 혼합 사용할 수 있는데, 이 때 EDC 및 NHS의 부피비는 7:1 내지 2:1 또는 5:1 내지 3:1 일 수 있다.

[0048] 콜라겐 고분자의 비용매는 용매추출법을 통해 콜라겐 필라멘트에 잔류하는 물을 제거하여 나노섬유형 구조를 갖는 콜라겐 필라멘트를 형성하도록 할 수 있다. 이러한 비용매로는 에탄올 및 에틸 알코올로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0049] 상기 콜라겐 필라멘트 적층체의 비용매 매체에서의 담지는 10 내지 30 시간, 또는 15 내지 25 시간 동안 수행할 수 있다.

[0050] 상기 단계를 통해 콜라겐 필라멘트의 상분리가 유도되며, 콜라겐 나노섬유가 가교(cross-linking)되어 다공성 콜라겐 지지체가 제조될 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에서는 1차 상분리 유도 단계 후에, 다공성 콜라겐 지지체를 동결건조하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0052] 상기 단계를 통해 다공성 콜라겐 지지체 내부에 잔존하는 물을 제거할 수 있다. 상기 동결건조는 통상적인 동결 건조기를 이용하여 예를 들어, -40℃ 이하의 온도에서 20 내지 30시간 동안 수행할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 제조 방법에 의해 콜라겐 필라멘트가 일방으로 정렬된 다공성 콜라겐 지지체가 형성된다.

[0054] 상기 일방향성은 필라멘트가 다층으로 형성된 다공성 지지체에서 필라멘트가 일정 간격으로 적층된 하나의 층을

기준으로 한 쪽 방향으로 향함을 의미한다.

- [0055] 본 발명은, 또한 상기 방법으로 제조된 다공성 콜라겐 지지체에 관한 것이다.
- [0056] 특히, 상기 다공성 콜라겐 지지체는 평균 직경(지름)이 300 내지 1000 μm , 400 내지 900 μm 또는 500 내지 800 μm 인 필라멘트가 하나의 층마다 일방향으로 형성되어 있다.
- [0057] 상기 다공성 콜라겐 지지체는 필라멘트들 사이에 평균 직경(지름)이 10 내지 1000 μm 또는 100 내지 900 μm 또는 200 내지 800 μm 인 매크로 기공이 형성된다. 또한, 다공성 콜라겐 지지체에서 콜라겐 지지체는 나노섬유형 구성을 가지며, 상기 콜라겐 필라멘트 내부에는 10 내지 500 nm, 20 내지 100 nm 또는 30 내지 50 nm의 나노 기공을 갖는다.
- [0058] 즉, 다공성 콜라겐 지지체는 나노기공 및 매크로 기공의 이중 기공 구조를 지닌다.
- [0059] 상기 다공성 콜라겐 지지체에서 기공율은 90% 이상이며, 기공이 정렬된 방향에서의 높은 강도를 가지며, 우수한 세포 접착성을 가진다.
- [0060] 본 발명은, 또한 상기 다공성 콜라겐 지지체를 포함하는 제품에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명에 따른 다공성 콜라겐 지지체는 나노 기공/매크로 기공의 이중 기공구조 및 우수한 물성을 가지므로, 인체의 뼈나 치아 등의 경조직 재생뿐만 아니라, 연골, 피부, 인대, 근육 등의 다양한 연조직 재생에도 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명은 제어된 매크로 기공구조를 갖는 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있는 3D 바이오플라팅 기술과 나노섬유형 콜라겐 필라멘트를 제조할 수 있는 2단계 상분리 공정(two-step phase separation) 기술을 결합한 2단계 상분리 기반 3D 바이오플라팅 기술에 관한 것으로,
- [0063] 상기 ‘2단계 상분리 기반 3D 바이오플라팅 기술’은, 콜라겐 용액을 응고 용매 내에서 압출하여 1차 상분리를 유도하여, 콜라겐 필라멘트를 겔(gel)화하여 3차원적으로 연결된 겔화된 콜라겐 필라멘트로 구성된 다공성 지지체를 제조한 후, 이를 비응고 매체에 담지하여 겔화된 콜라겐 필라멘트 내의 콜라겐 고분자의 2차 상분리를 유도하여 나노섬유형 콜라겐 필라멘트로 변환시킬 수 있다.
- [0064] 본 발명에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체는, 3차원적으로 연결된 매크로 기공(10 내지 1000 μm)을 가짐과 동시에, 나노섬유형 콜라겐 필라멘트 구조로 이루어진 독특한 구조를 가질 수 있다.
- [0065] 또한, 컴퓨터 제어 기반 기술로서, 다양한 조직재생에 적합한 맞춤형 기공구조(기공율, 기공 크기 등)를 갖는 나노섬유형 콜라겐 필라멘트로 이루어진 매크로 다공성 콜라겐 지지체를 제조할 수 있다.
- [0066] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0067] **실시예 1: 매크로/마이크로 이중기공구조형 다공성 콜라겐 지지체 제조**
- [0068] 하기 (1) 내지 (4)의 방법으로 다공성 콜라겐 지지체를 제조하였다. 상기 다공성 콜라겐 지지체의 제조 방법은 도 1에 개략적으로 도시하였다.
- [0069]
- [0070] (1) 콜라겐 용액제조
- [0071] 아세트산(acetic acid, 0.05 M, pH 3.4) 20 ml에 콜라겐(Type-I) 0.5 g을 넣고 자석 교반기를 이용하여 24 시간 동안 교반하여 콜라겐 용액(2.5 wt/vol%)을 제조하였다.

- [0072] (2) 1차 상분리 유도
- [0073] 증류수 380 ml 및 아세톤 20 ml를 혼합하여 상기 증류수 및 아세톤의 부피비가 95:5인 혼합용액을 제조하고, 암모니아수 2 ml를 천천히 첨가한 후(혼합용액 100 ml 당 암모니아수 0.5 ml), 염산 4 ml를 첨가하여 용액의 pH 값이 10이 되도록 조정하였다.
- [0074] 3D 바이오프린터를 이용하여 콜라겐 용액을 응고 욕조내에서 미세노즐을 통해 압출하여 콜라겐 필라멘트를 겔화시키고, 이를 3차원적으로 적층하여 겔화된 콜라겐 필라멘트 적층체를 제조하였다. 구체적으로, 콜라겐 용액을 20 ml 용량의 주사기에 부은 후, 10-20 kPa의 압축공기를 주입하여 주사기의 20게이지(~600 μ m) 노즐로부터 콜라겐 용액이 토출되어 적층 욕조 내에서 산성용액인 콜라겐 용액 내의 아세트산과 응고 매체 내의 암모니아수의 pH 농도 차에 의해 상 분리되어 수조 내에서 콜라겐 필라멘트가 형성되도록 하였으며, 3D 프린팅은 3 mm/s의 속도로 조절하였고, 높이 방향으로 100 mm/s의 속도로 적층하였다.
- [0075] 이때, 압출은 겔화되는 필라멘트가 일방향을 향하도록 지그재그로 형성되도록 하였으며, 파이버들간의 간격 역시 1mm를 주었다. 그 다음 층은 90도 회전하여, 위에서 바라보았을 때 모눈눈금을 나타내게 하였다. 가로방향으로 20 mm, 세로방향으로 20 mm 되도록 적층하였으며, 적층 횟수는 2, 5, 7 및 9회로 하였다.
- [0076] 본 발명에서 도 2는 1차 상분리 유도 후 다공성 콜라겐 지지체의 형상을 보여주는 광학현미경 이미지이다. 상기 도 2에서 콜라겐 필라멘트의 층 수는 왼쪽에서부터 각각 2, 5, 7 및 9개이다.
- [0077] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에서는 상온에서 다양한 층의 수로 이루어진 콜라겐 필라멘트를 제조할 있으며, 상온에서 이루어지는 공정의 특성상 적층 수를 임의로 조절할 수 있으며, 종래 3D 바이오프라팅 기술과는 달리 두꺼운 샘플의 제조도 용이하다.
- [0078] (3) 2차 상분리 유도
- [0079] EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 0.05 M 농도가 되도록 각각 95% 에탄올에 0.05 M이 되도록 용해시켜 EDC 용액 및 NHS 용액을 제조한 뒤, EDC 용액과 NHS 용액이 부피비로 4:1이 되도록 하여 비용매 매체를 제조하였다.
- [0080] 상기에서 제조된 용액에 콜라겐 필라멘트 적층체를 비용매 매체 내에 24시간 담지하였다.
- [0081] (4) 동결건조
- [0082] (3)의 다공성 콜라겐 지지체를 동결건조기를 이용하여 -40℃ 이하의 온도에서 24시간 동안 동결건조하였다.
- [0083] 본 발명에서 도 3은 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 형상 및 콜라겐 필라멘트 표면구조를 보여주는 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscopy)이미지로, (A)는 다공성 콜라겐 지지체의 형상을, (B)는 콜라겐 필라멘트의 표면구조를 나타낸다.
- [0084] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 다공성 콜라겐 지지체는 콜라겐 필라멘트가 하나의 층마다 일방향으로 형성되며, 위에서 바라보았을 때 모눈눈금 형상을 가지는 것을 확인할 수 있다. 또한, 콜라겐 필라멘트는 나노 섬유형 형상을 지니며, 나노 크기의 미세 기공이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0085] 또한, 도 4는 실시예에 의해 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 횡단면 형상 및 나노섬유형 콜라겐 필라멘트의 구조를 보여주는 주사전자현미경 이미지로, (A)는 다공성 콜라겐 지지체의 형상(횡단면)을, (B)는 콜라겐 필라멘트(저배율)를, (C) 콜라겐 필라멘트(고배율)를 나타낸다.
- [0086] 상기 도 4에 나타난 바와 같이, 다공성 콜라겐 지지체의 횡단면을 관찰한 결과, 높이 방향으로도 콜라겐 필라멘트가 원 형상을 잘 유지하고 있는 것을 확인할 수 있으며, 또한, 콜라겐 필라멘트는 나노 섬유형 형상을 지니며, 나노 크기의 미세 기공이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있다.

실험예 1. 기공구조 분석

실시예 1에서 제작된 다공성 콜라겐 지지체에 대하여 정렬된 기공구조를 확인하기 위하여 전계 방사 주사전자현미경(FE-SEM; JSM-6701F; JEOL Techniques, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

다공성 콜라겐 지지체의 전체 기공율(porosity)은 그 단면적과 무게로 계산되었다.

나노섬유 크기 및 기공의 크기는 샘플의 전계 방사 주사전자현미경의 사진을 통해 계산되었다.

상기 측정된 결과를 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

Porous structure of 3D collagen scaffold				
Macro pore size				Nano porous structure
Filament to Filament distance			Filament diameter	Fiber diameter
Width [X] [μm]	Depth [Y] [μm]	Height [Z] [μm]	[μm]	[nm]
451.35 ± 44.52	489.93 ± 42.17	304.82 ± 44.93	506.51 ± 40.40	40.3 ± 10.17

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 제조된 다공성 콜라겐 지지체는 약 95% 이상의 기공율을 가지며, 직경이 약 500 μm인 콜라겐 필라멘트 내부에 약 40 nm 수준의 나노기공을 가지는 것을 확인할 수 있다.

실험예 2. 기계적 물성 평가

실시예 1에서 제작된 다공성 콜라겐 지지체에서 정렬된 기공구조를 가지는 채널의 구조상 짜임새를 평가하기 위하여 인장강도 및 압축강도를 측정하였다.

인장강도는 만능시험기 OTU-05D, Oriental TM Corp., Korea)를 이용하여 크로스헤드 스피드를 5 mm/min하여 측정을 이용하여 측정하였다.

또한, 압축강도는 만능재료시험기의 크로스헤드 스피드를 1 mm/min하여 측정하였다.

상기 측정된 결과를 도 5에 나타내었다. 상기 도 5에서 왼쪽 그래프는 다공성 콜라겐 지지체의 인장강도를 오른쪽 그래프는 압축강도를 나타낸다.

실시예 1에서 제조된 다공성 콜라겐 지지체의 최대 인장강도는 약 353 kPa 및 0.0 내지 0.1 구간(mm/mm)에서의 압축강도는 약 30 kPa 수준으로, 조직 재생에 적합한 것을 확인할 수 있다.

실험예 3. 생체적합성 평가

실시예 1에서 제작된 다공성 콜라겐 지지체의 생체적합성을 in vitro cell test를 이용하여 평가하였다.

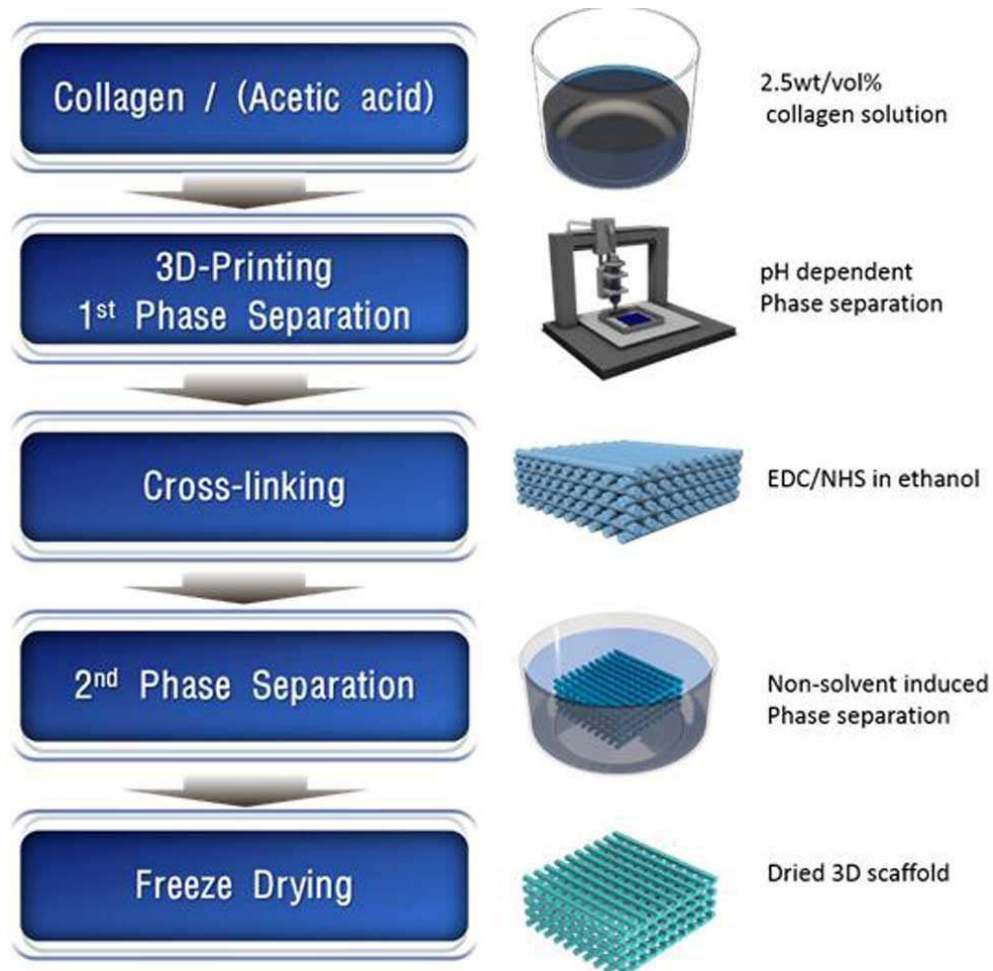
구체적으로 분화 조골 세포인 MC3T3-E1 세포를 2×10^5 cells/ml의 밀도로 부착한 후 3시간 및 24시간 경과 후 공초점주사현미경(CLSM; fluoview fv1000; Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 부착 및 분화 양상을 평가하였다.

[0103]

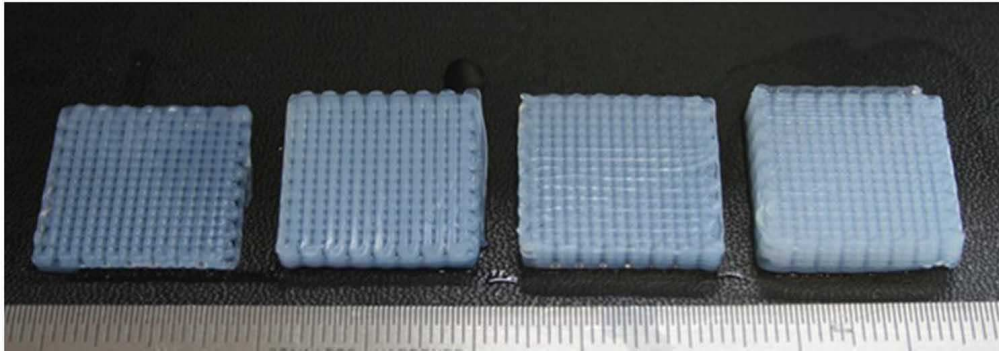
상기 측정된 결과를 도 6에 나타내었다. 상기 도 6은 MC3T3-E1 세포 부착후 3 시간 및 24 시간 이후의 나타낸다. 상기 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조된 MC3T3-E1 세포는 다공성 콜라겐 지지체 잘 부착하여 우수한 생체적성을 보이는 것을 확인할 수 있다.

도면

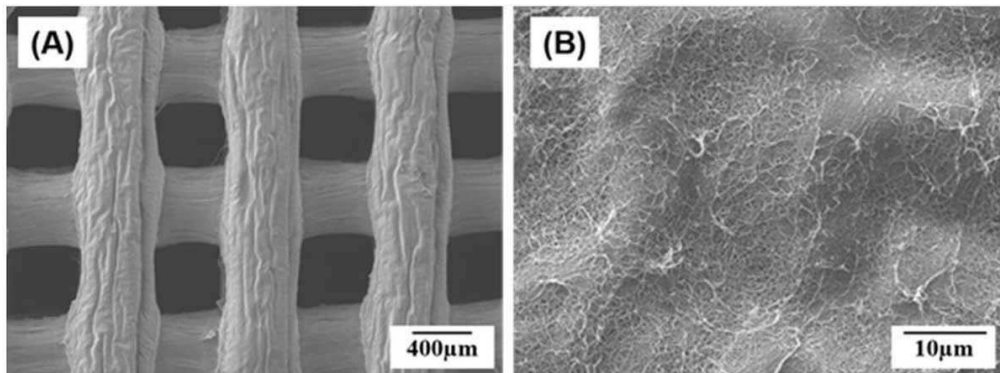
도면1



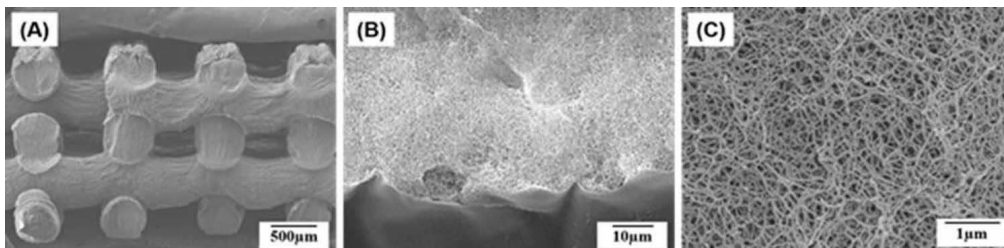
도면2



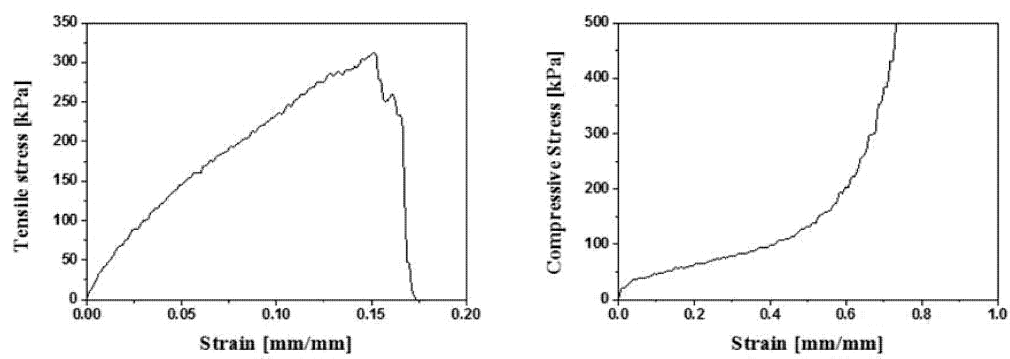
도면3



도면4



도면5



도면6

