



등록특허 10-2233325



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월29일

(11) 등록번호 10-2233325

(24) 등록일자 2021년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/12 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01)

A61L 27/32 (2006.01) A61L 27/42 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/12 (2013.01)

A61F 2/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7016840

(22) 출원일자(국제) 2018년12월13일

심사청구일자 2020년06월11일

(85) 번역문제출일자 2020년06월11일

(65) 공개번호 10-2020-0076753

(43) 공개일자 2020년06월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/084783

(87) 국제공개번호 WO 2019/115704

국제공개일자 2019년06월20일

(30) 우선권주장

17207235.7 2017년12월14일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

US20120130506 A1\*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 골 대체 물질

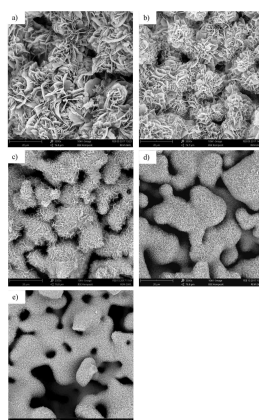
## (57) 요약

본 발명은:

- 소결된 CAP 코어 및 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장 층을 포함하는 2상 칼슘 포스페이트/하이드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질로서, 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖고, 향상된 골형성 반응을 보이는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질,

- 하기 단계를 포함하는 이의 제조 방법에 관한 것이다:

- a) 소결된 CAP 코어 물질을 제조하는 단계,
- b) 10℃ 내지 0℃ 의 온도에서 90 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 완충 용액에 소결된 CAP 코어 물질을 침지시켜 CAP 의 HAP 로의 변환 과정을 시작하여, 소결된 CAP 코어 물질 표면 상에 나노결정질 히드록시아파타이트의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 형성하는 단계로서, 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 갖고, 소결된 CAP 코어 물질 표면 상에 형성된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는 단계,
- c) HAP 의 적어도 하나의 나노결정질 층의 폐쇄된 코팅이 존재할 때 그러나 변환 과정이 완전히 끝나기 전에 한번에 수용액으로부터 고체 물질을 분리하여 변환을 정지시키는 단계, 및
- d) 임의로 단계 c) 에서 비롯되는 분리된 물질을 살균하는 단계.

(52) CPC특허분류

**A61L 27/32** (2013.01)  
**A61L 27/425** (2013.01)  
**A61L 27/58** (2013.01)  
**A61F 2002/2835** (2013.01)  
**A61F 2310/00293** (2013.01)  
**A61L 2400/12** (2013.01)  
**A61L 2400/18** (2013.01)  
**A61L 2430/02** (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Rolando A. Gittens et al., "Implant Osseointegration and the Role of Microroughness and Nanostructures: Lessons for Spine Implants", Acta Biomater.(2014). Vol. 10(8), pp.1-22\*  
 US20140127392 A1\*  
 US20030026770 A1  
 US20150024023 A1  
 US20160106674 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

소결된 CAP 코어 및 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 포함하는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질로서,

에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 가지며, 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는,

2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 거친 면이 0.2 내지 20  $\mu\text{m}$  의 크기 (주사 전자 현미경법 (SEM) 으로 결정됨) 를 갖는 소판의 인터록 (interlocked) 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함하는, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 거친 면이 0.5 내지 5  $\mu\text{m}$  의 크기 (주사 전자 현미경법 (SEM) 으로 결정됨) 를 갖는 소판의 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함하는, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 균질한 거친 외표면이 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (수은 압입법 (Mercury Intrusion Porosimetry (MIP)) 으로 결정됨) 의 공극을 함유하는 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 히드록시아파타이트 소판을 포함하는, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 균질한 거친 외표면이 원자력 현미경법 (AFM) 에 의해 특징지어지고, 이때 AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기  $R_q$  가 50 내지 400 nm 범위이고, 프로파일의 평균 최대 높이  $R_z$  가 500 내지 2000 nm 범위인, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 균질한 거친 외표면이 원자력 현미경법 (AFM) 에 의해 특징지어지고, 이때 AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 가 110 내지 150 nm 범위이고, 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 가 550 내지 750 nm 범위인, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 소결된 CAP 코어가  $\alpha$ -TCP 로 이루어지는, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질 총 중량에 대해 HAP 의 중량 백분율이 1.5 내지 30 중량% (XRD 에 의해 측정됨) 인, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서, 미립자 또는 과립인, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 10

제 1 항에 있어서, 성형체인, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질.

#### 청구항 11

천연 또는 합성 중합체를 포함하는 매트릭스 중 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 과립을 함유하는, 퍼티 (putty).

#### 청구항 12

하기 단계를 포함하는, 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 CAP/HAP 골 대체 물질의 제조 방법:

- a) 소결된 CAP 코어 물질을 제조하는 단계,
- b) 10℃ 내지 50℃ 의 온도에서 10 내지 90 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 완충 용액에 소결된 CAP 코어 물질을 침지시켜 CAP 의 HAP 로의 변환 과정을 시작하여, 소결된 CAP 코어 물질 표면에 나노결정질 히드록시아파타이트의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 형성하는 단계로서, 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 갖고, 소결된 CAP 코어 물질 표면에 형성된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는 단계,
- c) HAP 의 적어도 하나의 나노결정질 층의 폐쇄된 코팅이 존재할 때 그러나 변환 과정이 완전히 끝나기 전에 한번에 수용액으로부터 고체 물질을 분리하여 변환을 정지시키는 단계, 및
- d) 임의로 단계 c) 에서 비롯되는 분리된 물질을 살균하는 단계.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 단쇄 지방족 알코올이 에탄올인, CAP/HAP 골 대체 물질의 제조 방법.

#### 청구항 14

제 12 항에 있어서, 단계 b) 의 완충 용액이 30 내지 50 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는, CAP/HAP 골 대체 물질의 제조 방법.

#### 청구항 15

제 12 항에 있어서, 단계 b) 가 20 내지 60 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 7.0 내지 8.0 의 pH 의 포스페이트 완충 용액에서 35 내지 40℃ 의 온도에서 수행되는, CAP/HAP 골 대체 물질의 제조 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 균질한 거친 외표면을 갖는 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 에 기초하는 이중층 구조를 갖는 신규 2상 골 대체 물질, 그 물질을 제조하는 방법 및 인간 또는 동물의 결함 부위에서 골 형성, 골 재생, 골 복원 및/또는 골 대체를 지지하는 임플란트 또는 인공기관으로서의 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 골 구조의 결함은, 외상, 질병, 및 수술과 같은 여러 가지 상황에서 발생하고, 다양한 수술 분야에서 골 결함의 효과적 복원에 대한 필요가 여전히 존재한다.

[0003] 골 결함 부위에서 치유를 자극하기 위해 많은 천연 및 합성 물질 및 조성물이 사용되어 왔다. 치주 및 악안면 골성 결함에서 골 성장을 촉진하는 잘 알려진 천연 골전도성 골 대체 물질은 Geistlich Pharma AG로부터 상업적으로 입수가 가능한 Geistlich Bio-Oss<sup>®</sup> 이다. 그 물질은 미국 특허 제 5,167,961 호에 기술된 방법에 의해 천연 골로부터 제조되며, 이는 천연 골의 섬유주 구성 및 나노결정질 구조의 보존을 가능하게 하여, 재흡수되지 않거나 재흡수가 매우 느린 우수한 골전도성 매트릭스를 초래한다.

- [0004] 트리칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (TCP/HAP) 시스템 및 골 대체 물질로서의 그의 용도는, 예를 들어, 암모늄 포스페이트 및 HAP의 분말 혼합물을 1200-1500°C에서 가열함으로써  $\alpha$ -TCP/HAP의 2상 시멘트를 제조하는 방법을 공개하는 US-6,338,752에 기술되어 있다.
- [0005] 유럽 특허 EP-285826은  $\alpha$ -TCP의 층을 도포하고, 80-100°C에서 pH 2 내지 7의 물과의 반응에 의해  $\alpha$ -TCP 층을 HAP로 완전히 전환시킴으로써 임플란트용 금속성 및 비금속성 바디 상에 HAP의 층을 생성하는 방법을 기술한다. 얻어진 생성물은 HAP의 층으로 덮인 금속성 또는 비금속성 바디이다.
- [0006] WO 97/41273에는 (a) 50°C 미만의 온도에서 칼슘 이온, 포스페이트 이온 및 바이카르보네이트 이온을 함유하는 pH 6.8 내지 8.0의 용액에 기재를 침지시키는 단계, (b) 기재와 접촉하고 있는 용액의 부분을 pH가 8을 초과할 때까지 50 내지 80°C의 온도로 가열하는 단계, (c) 기재를 단계 (b)에서 얻어진 알칼리 용액과 접촉된 상태로 유지하여 카르보네이트화된 히드록시아파타이트 코팅을 형성하는 단계, 및 (d) 기재를 용액으로부터 꺼내고 코팅을 건조하는 단계를 포함하는 방법에 의해, 카르보네이트화된 히드록시아파타이트, 즉, 포스페이트 및/또는 히드록실 이온이 바이카르보네이트 이온으로 부분적으로 대체되어 있는 히드록시아파타이트의 코팅으로 기재 예컨대 특히 히드록시아파타이트 (HAP) 또는 다른 칼슘 포스페이트 (CAP)를 코팅하는 방법이 기술되어 있다. 바이카르보네이트 이온은 히드록시아파타이트 결정 성장의 억제제로서 작용하여, 결합을 함유하고 상당히 작은 치수, 즉 10-40 nm 길이 및 3-10 nm 폭을 갖는 비-화학적 결정 결정을 초래하는 것으로 공개되어 있다 (페이지 7, 라인 1-7 참조).
- [0007] 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 시스템, 특히, TCP/HAP 시스템의 성분들은 그들의 열역학적 안정성에서 상이하다. 이러한 차이로 인해, CAP/HAP 시스템이 포유동물, 특히 인간 환자 내로 이식될 때, 체액에서 TCP 및 다른 칼슘 포스페이트의 용해도는 HAP의 용해도보다 더 높다. 더 양호한 가용성인 화합물 CAP (예를 들어, TCP)이 HAP보다 더 빠르게 제거되기 때문에 칼슘 포스페이트와 HAP 사이의 용해도의 차이는 CAP/HAP 시스템의 무질서한 소결구조의 파괴를 야기한다. 고온에서 생성되는 CAP와 HAP 사이의 소결된 상호연결은 또한 생리학적 환경에서 디바이스의 더 높은 용해도에 현저한 기여를 할 것이다. 두가지 상이한 유형의 반응이 그러한 세라믹의 가속화된 생체내 분해를 지배한다: 화학적 용해 및 세포에 의한 생물학적 재흡수. 두가지 과정은 모두 세라믹 물질의 용해를 야기하고, 게다가 칼슘 이온의 국소 과포화를 야기하여, 방출되는 칼슘 이온이 흡수되는 칼슘 이온보다 더 많다. 칼슘 이온의 자연 평형은 세포와 매트릭스에서도 임플란트 주변 조직에서도 더 이상 존재하지 않는다. 칼슘 이온의 과포화의 면에서 자연 칼슘 평형의 국소 교란은 증가된 파골세포 활성 및 그러므로 세라믹 물질의 가속화된 질병 제어 재흡수 및 유해 염증 반응의 위험을 초래하며, 특히 다량의 합성 골 대체 물질을 사용할 때 그러하다.
- [0008] 골 대체 물질 Geistlich Bio-Oss®이 인간 환자 내로 이식될 때에, 자연 칼슘 평형은 실질적으로 영향을 받지 않으며, 물질의 표면에서 및 그의 국소 환경 내에서 칼슘 이온의 농도는 거의 일정하게 유지된다. 따라서 물질의 생물학적 재흡수는 일어나지 않거나 유해 염증 반응의 위험 없이 매우 느린 속도로 진행된다.
- [0009] EP-B1-2445543은 매우 유리한 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질을 공개하며, 이는, 골 대체 물질 Geistlich Bio-Oss®처럼, 생체내 고정 후에 물질의 표면에서 및 그의 국소 환경 내에서 칼슘 이온의 농도를 거의 일정하게 유지시키고, 그에 따라 증가된 파골세포 활성을 초래하지 않는다.
- [0010] 실제로, 최적 골 재생에 필수적인 자연 칼슘 평형은 교란 또는 파괴되지 않는다. 더욱이, 재생 과정이 완료될 때까지 자연 칼슘 농도 평형은 골 대체 물질에 의해 지속적으로 지지된다. 이들 조건이 충족될 때 파골세포 활성의 증가는 존재하지 않으며, 그에 따라 유해 염증 반응의 위험이 존재하지 않는다.
- [0011] EP-B1-2445543의 발명은 소결된 CAP 코어 및 소결된 CAP 코어의 상부에 침착된 나노결정질 HAP의 적어도 하나의 균일하고 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 포함하는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질에 관한 것이며, 여기에서 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태, 즉 30 내지 46 nm 길이 및 14 내지 22 nm 폭을 갖는다.
- [0012] 소결된 CAP 코어는 트리칼슘 포스페이트 (TCP), 특히  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 또는  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), 및/또는 테트라칼슘 포스페이트 (TTCP) Ca<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O를 포함할 수 있다.
- [0013] 빈번히 사용되는 실시형태에 따르면, 소결된 CAP 코어는 TCP로 본질적으로 이루어지며,  $\alpha$ -TCP가 바람직하다.
- [0014] 나노결정질 HAP의 에피택시 성장한 층은 천연 인간 골 무기물과 구조적으로 및 화학적으로 거의 동일하다.

- [0015] 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층은 일반적으로 적어도 15 내지 50 nm, 바람직하게는 적어도 20 내지 40 nm, 더욱 바람직하게는 적어도 25 내지 35 nm 의 두께를 갖는다. 그 최소 두께는 에피택시 배향에서 HAP 나노결정의 하나의 층에 해당한다.
- [0016] 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층은 에피택시 배향에서 HAP 나노결정의 단일 또는 다중 층을 포함할 수 있다. 에피택시 배향에서 HAP 나노결정의 그러한 층의 수와 관련되는, 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층의 두께는 바디의 상이하게 로딩된 부분에서 임플란트 또는 인공기관으로서 골 대체 물질의 의도되는 적용에 따라 선택될 것이다. 발명의 골 대체 물질은 실제로 생체내에서 살아 있는 것 같은 시스템으로서 기능하여 소결된 CAP 코어를 인간 골 무기물과 크기 및 형태가 유사한 히드록시아파타이트로 점진적으로 변환시키도록 설계되며, 변화 속도는 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층의 두께에 의해 큰 정도로 제어되는 소결된 CAP 코어에 의한 칼슘 방출의 속도에 의존한다.
- [0017] CAP/HAP 골 대체 물질의 특성은 결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층의 두께에 의해 큰 정도로 제어된다. "특성" 이라는 용어는, 시험관내에서 및 생체내에서 국소 환경으로 일정한 농도의 칼슘 이온을 방출시키는 CAP/HAP 골 대체물의 능력을 포함한다.
- [0018] 결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층의 두께는 소결된 CAP 코어 물질 대 HAP 의 비와 관련되며, 상기 비는 일반적으로 5:95 내지 95:5, 바람직하게는 10:90 내지 90:10 이다.
- [0019] CAP/HAP 골 대체 물질은 미립자 또는 과립일 수 있으며, 입자 또는 과립은 요망되는 크기 및 형상을 갖는다. 일반적으로, 입자 또는 과립은 대략적으로 구형이며, 250 내지 5000  $\mu\text{m}$  의 직경을 갖는다.
- [0020] CAP/HAP 골 대체 물질은 또한 성형체, 예를 들어, 나사, 못, 핀 또는 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조 예컨대 특히 고관절, 쇄골, 늑골, 하악골 또는 두개골 부분일 수 있다. 이러한 나사, 못 또는 핀은 재건 정형외과 수술에서, 예를 들어, 무릎 또는 팔꿈치에서 인대를 뼈에 고정하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조는 정형외과 수술에서 결손 또는 결함 뼈 또는 뼈 부분을 대체하기 위한 인공기관으로서 사용될 수 있다.
- [0021] 상기 EP-B1-2445543 의 CAP/HAP 골 대체 물질은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되는 것으로 교시된다:
- [0022] a) 소결된 CAP 코어 물질을 제조하는 단계,
- [0023] b) 10 $^{\circ}\text{C}$  내지 50 $^{\circ}\text{C}$  의 온도에서 수용액에 소결된 CAP 코어 물질을 침지시켜 CAP 의 HAP 로의 변환 과정을 시작하여, 소결된 CAP 코어 물질 표면 상에 나노결정질 히드록시아파타이트의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 형성하는 단계로서, 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 갖는 단계,
- [0024] c) HAP 의 적어도 하나의 나노결정질 층의 균일하고 폐쇄된 코팅이 존재할 때 그러나 변환 과정이 완전히 끝나기 전에 한 번에 수용액으로부터 고체 물질을 분리하여 변환을 정지시키는 단계,
- [0025] d) 임의로 단계 c) 에서 비롯되는 분리된 물질을 살균하는 단계.
- [0026] 소결된 CAP 코어 물질의 제조는 먼저 칼슘 히드로젠 포스페이트 ( $\text{CaHPO}_4$ ), 칼슘 카르보네이트 및/또는 칼슘 히드록시드의 분말을 혼합한 후, 혼합물을 적절한 온도 범위 내에서 하소 및 소결하여 벌크 소결된 CAP 코어 물질을 수득하는 것을 포함하는 당해 기술분야에 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다 (예를 들어 Mathew M. et al., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens B. et al., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; 및 Durucan C. et al., 2002, J. Mat. Sci., 37:963 참조).
- [0027] 벌크 소결된 TCP 코어 물질은 따라서 칼슘 히드로젠 포스페이트 ( $\text{CaHPO}_4$ ), 칼슘 카르보네이트 및/또는 칼슘 히드록시드의 분말을 화학량론적 비로 혼합하고, 혼합물을 1200~1450 $^{\circ}\text{C}$  의 범위, 바람직하게는 약 1400 $^{\circ}\text{C}$  의 온도에서 하소 및 소결하여 얻어질 수 있다.
- [0028] 벌크 소결된 TTCP 코어 물질은 또한 위에 기술된 과정에 의해 얻어질 수 있다.
- [0029] 이러한 방법에 의해 제조된 벌크 소결된 CAP 물질은 2 내지 80 부피% 의 공극을 및 공극의 넓은 분포를 갖는 다공성일 수 있다. 다공성 파라미터는 CAP/HAP 골 대체 물질의 의도되는 응용에 따라 선택될 것이다.
- [0030] 단계 b) 에서 사용되는 소결된 CAP 코어 물질은
- [0031] - 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 CAP 코어 물질,



- [0032] - 파쇄, 연마 및/또는 분쇄, 및 체거름과 같은 종래의 방법을 사용함으로써 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 CAP 코어 물질로부터 얻어지는 소결된 CAP 코어 물질의 미립자 또는 과립, 또는
- [0033] - 요망되는 형상 및 크기를 갖는 소결된 CAP 코어 물질의 예비형태, 예를 들어, 나사, 못, 핀, 또는 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조
- [0034] 일 수 있다.
- [0035] 임의의 요망되는 형상 및 크기를 갖는 그러한 예비형태는 CNC 분쇄 또는 3D 프린팅과 같은 잘 알려진 프로토타이핑 기술을 사용함으로써 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 코어 물질로부터 얻어질 수 있다 (예를 들어 Bartolo P. et al., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers R. et al., 2002, Biomaterials 23(23), 4437; Yeong W.-Y. et al., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; 및 Seitz H. et al., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782 참조).
- [0036] 단계 b)의 수용액은 순수한 물, 유사 체액 또는 완충액일 수 있다. 단계 b)의 침지 용액의 pH 값이 거의 중성이고, 바람직하게는 5.5 내지 9.0의 pH 범위 내에서 변환 과정 전체에 걸쳐 안정하게 유지되는 것이 중요하다.
- [0037] "유사 체액"이라는 용어는, 체액을 모방하는 임의의 용액을 의미한다. 바람직하게는, 유사 체액은 혈장의 이온 농도와 유사한 이온 농도를 갖는다.
- [0038] 완충액은 상기 pH 범위에 있는 임의의 완충액일 수 있지만, 바람직하게는 칼슘, 마그네슘 및/또는 소듐을 포함하거나 포함하지 않는 포스페이트 완충액이다.
- [0039] 실시예 (실시예 4 및 5 참조)에서 사용되는 완충액은 수성 포스페이트 완충액이다.
- [0040] 단계 b)에서 온도 범위는 일반적으로 10°C 내지 50°C, 바람직하게는 25°C 내지 45°C, 더욱 바람직하게는 35°C 내지 40°C이다.
- [0041] 침지 단계 b)는 제 1 단계에서 CAP 코어 물질의 일차 상 전이 및 그에 따른 HAP 나노결정 전구물질의 핵형성을 유도한다. 제 2 단계 동안, 제 1 단계로부터의 생성된 HAP 전구물질이 성장하고, 폐쇄된 (즉, 완전히 코팅된) 에피택시 나노결정질 복합 층을 확립할 것이다. 제 1 HAP 나노결정 층은 균일하고 폐쇄되어야 하고, 소결된 CAP 코어 물질에 에피택시 연결되어야 한다.
- [0042] 제 3 단계 동안, 새로 형성된 이중층 복합체 내에서 일차 상 전이가 진행되어, 소결된 CAP 코어 물질 (TCP 또는 TTCP)을 나노결정질 HAP로 추가로 변환시킬 수 있다. 상 전이의 제 3 단계 동안, 소결된 CAP 코어 물질의 일부가 나노결정질 HAP로 변환될 때까지 느린 확산 제어 과정에 의해 제어가능한 시간 동안 칼슘 이온이 방출될 것이다. HAP 층의 두께 및 그에 따른 칼슘 방출 속도는 변환 시간의 변동에 의해 제어될 수 있다.
- [0043] 적절한 두께의 에피택시 성장한 나노결정질 HAP 층은 시험관내에서 제조될 것이며, CAP에서 HAP로의 변환은 그것이 완료되기 전에 정지된다.
- [0044] CAP/HAP 골 대체 물질이 생체내에서 고정되자마자, CAP에서 HAP로의 변환 과정은 체액과의 접촉에 의해 재활성화될 것이고, 골 대체 물질은 살아 있는 것 같은 시스템으로서 기능하여 인간 골 무기물과 크기 및 형태가 유사한 새로운 히드록시아파타이트를 형성할 것이다.
- [0045] 생체내 상 변환 과정 동안, 운반된 칼슘 이온은 국소 환경으로 방출되어, 골 재생 과정에 중요하고 유익한 국소 칼슘 평형을 지지할 것이다.
- [0046] 신체의 상이하게 로딩된 영역에서 골 결핍의 상이한 재생 시간으로 인해, 칼슘 방출 속도가 제어될 수 있는 것이 중요하다. 이는 히드록시아파타이트의 에피택시 성장한 층의 두께의 변동에 의해 달성될 수 있다.
- [0047] 따라서, 단계 c)는 매우 중요한 단계이다. 단계 b)의 수용액에서의 노출 시간은 요망되는 HAP 층의 두께에 기반한다. 에피택시 배향의 나노결정질 HAP의 적어도 하나의 층이 필요하다. CAP에서 HAP로의 변환이 완료되지 않는 것이 필수적이다.
- [0048] 요망되는 두께에 따른 적절한 노출 시간은 칼슘 포스페이트, 시멘트 및 콘크리트 화학 분야의 당업자에게 잘 알려진 여러 열역학적 미분 방정식을 사용하여 계산될 수 있다.

- [0049] 예를 들어 다음을 참조한다: Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; 및 Schluessler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlin.
- [0050] 위에서 언급된 미분 방정식의 해법을 CAP/HAP 시스템에 적용함으로써 CAP 의 HAP 로의 상 전이 및 HAP 의 에피택시 층이 안정하고 재현가능한 방식으로 제조될 수 있게 하는 층의 두께를 예측하는 것이 가능하다.
- [0051] 단계 c) 의 마지막에 수용액으로부터 고체 물질을 분리하는 것은 통상적으로 당해 기술분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 여과, 세정 및 건조에 의해 수행된다.
- [0052] EP-B1-2445543 의 실시예 (즉 실시예 4 [0057] 및 실시예 5 [0058]) 에서, 세정은 분리된 과립을 정제수로 3 회 세정하여 완충 용액으로부터 잔류물을 제거함으로써 수행된다.
- [0053] 임의적 살균 단계 d) 는 감마선-조사 또는 X-선 방사와 같은 당해 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다.
- [0054] EP-B1-2445543 의 실시예 4 및 5 에서 교시되는 바와 같이 수성 포스페이트 완충액을 단계 b) 의 수용액으로 사용하고 정제수를 사용하여 단계 c) 의 마지막에 분리된 과립을 3 회 세정함으로써, 소결된 CAP 코어 및 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 포함하는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질이 얻어지며, 여기에서 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 가지며 (즉 30 내지 46 nm 의 길이 및 14 내지 22 nm 의 폭), 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 에피택시 성장한 HAP 나노결정으로 이루어지는 편평한 결정 소판의 개별 (분리된) 클러스터 및 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 사이의 매끄러운 영역을 포함하는 비-균질 외표면을 가지며, 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 사이의 매끄러운 영역이 차지하는 외표면의 % 는 주어진 변환 조건에서 변환 시간에 따라 좌우된다.
- [0055] 도면을 참조하면 도 1A 는 30 min 의 변환 시간을 갖는 프로토타입 (prototype) 1 (1-2 mm 과립) 의 SEM (주사 전자 현미경법) 사진을 나타내며, 여기에서 매끄러운 영역은 SEM 에 의해 측정되는 총 외표면의 약 70 % 에 해당하고, 도 1B 는 40 min 의 변환 시간을 갖는 프로토타입 2 (1-2 mm 과립) 의 SEM 사진을 나타내며, 여기에서 매끄러운 영역은 SEM 에 의해 측정되는 총 외표면의 약 50 % 에 해당한다.
- [0056] WO 2015/009154 는 개선된 골유도 능력을 갖는 골유도성 물질의 제조 방법을 개시하고, 이는 그레인으로 이루어지는 표면 토폰그래피를 갖는 소결된 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 물질을, 개시 물질의 표면 상에서 칼슘 포스페이트 그레인을 직경 10-1500 nm 의 칼슘 포스페이트 니들로 변경하기에 충분한 지속기간 동안 pH 를 제어하지 않으면서, 125℃ 이상의 온도에서 2-4 bar 의 압력 하에서 열수 처리에 적용하는 것을 포함한다. 125℃ 이상의 온도 및 2 bar 이상의 압력은 EP-B1-2445543 에서 사용된 조건 (온도 35-40℃, pH 5.5-9.0, 주변 압력) (인간 신체 생리학과 근접함) 과 거리가 멀고, 이는 HAP 나노결정의 에피택시 성장을 가능하게 한다. 이러한 니들은 에피택시 성장하지 않지만 코어 물질 베이스 상에 침착되거나 이에 부착되고, 단지 부분적으로 (통상적으로 40-90 %) 후자를 코팅하여, 이의 표면적 및 단백질 함유 능력을 증가시키고, 이에 따라 이의 골유도 잠재력을 향상시킨다.
- [0057] 10 내지 90 %, 바람직하게는 20 내지 60% 의 비제한적으로 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올을 포함하는 단쇄 지방족 알코올을, EP-B1-2445543 에 따른 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 제조 중 단계 b) 의 수성 포스페이트 완충액에 첨가함으로써, 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 및 매끄러운 영역을 그 사이에 포함하는, 소결된 CAP 코어 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층의 비-균질한 외표면은 편평한 결정 소판의 임의의 개별 결정 클러스터 없이 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면으로 대체된다는 것이 발견되었다. 상기 균질한 거친 외표면은 일반적으로 사용된 지방족 알코올의 양에 따라, 0.2 내지 20  $\mu$ m, 바람직하게는 0.5 내지 5  $\mu$ m 의 개별 소판 크기 (SEM 으로 결정됨) 를 갖는 소판의 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함한다.
- [0058] 태아 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) 의 골형성 분화의 시험관내 시험에 의해 나타난 바와 같이, 생체내 골형성 반응은, 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 및 매끄러운 영역을 그 사이에 포함하는 비-균질 외표면을 갖는 EP-B1-2445543 에 의해 교시된 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질보다, 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질에 대해 더 강한 것으로 보인다.



## 발명의 내용

- [0059] 본 발명은 따라서 소결된 CAP 코어 및 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 포함하는 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질로서, 에피택시 성장한 나노결정질은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 가지며, 소결된 CAP 코어의 외표면에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는다.
- [0060] 상기 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질은 태아 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) 의 증가된 골형성 분화를 보여주고, 이는 향상된 생체내 골형성 반응의 강한 표시이다.
- [0061] 용어 "소결된 CAP 코어의 외표면 상에 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층" 은 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층이 소결된 CAP 코어의 전체 외표면을 완전히 덮는다는 것을 의미한다.
- [0062] 용어 "편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면" 은 거시적으로 편평한 결정 소판에 의해 야기된 외표면의 조도가 편평한 결정 소판의 개별 결정 클러스터 없이 CAP 코어의 표면 상에 통계적으로 고르게 분포됨을 의미한다. 다양한 정도의 조도를 갖는 균질한 거친 외표면을 갖는 본 발명의 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 프로토타입 3 내지 7 의 SEM 사진을 나타내는 도 2 를 참조한다.
- [0063] 용어 "편평한 결정 소판" 은 높이 (두께) 가 3 개의 수직 방향에 대한 폭 및 길이보다 상당히 작은 결정 어셈블리를 의미한다. 상기 편평한 결정 소판은 명백하게 도 3B 에서 가시적이다.
- [0064] 일반적으로, 균질한 거친 외표면은 0.2 내지 20  $\mu\text{m}$  (SEM 으로 결정됨) 의 크기 (폭 및 길이) 를 갖는 소판의 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함한다. 소판의 크기가 더 클수록, 외표면의 거칠기가 더 높다.
- [0065] 바람직하게는, 균질한 거친 외표면은 0.5 내지 5  $\mu\text{m}$  (SEM 으로 결정됨) 의 크기를 갖는 소판의 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함한다.
- [0066] 통상적으로, 상기 균질한 거친 외표면은 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (수은 압입법 (MIP) 으로 결정됨) 의 공극을 함유하는 인터록 네트워크를 형성하는 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판을 포함한다. 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  의 공극 부피가 더 높을수록, 외표면의 거칠기는 더 높다.
- [0067] 일반적으로, 상기 균질한 거친 외표면은 AFM (원자력 현미경법) 에 의해 특징지어질 수 있고, 이때 AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 는 50 내지 400 nm 범위이고, 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 는 500 내지 2000 nm 범위이다.
- [0068] 바람직하게는, 균질한 거친 외표면은 110 내지 150 nm 범위의 AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 550 내지 750 nm 범위의 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 에 의해 특징지어질 수 있다.
- [0069] 일반적으로, 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질 중 HAP 의 백분율은 1 내지 90 % (XRD 로 측정됨) 이다.
- [0070] 바람직하게는, 상기 백분율은 1.5 내지 30%, 보다 바람직하게는 2 내지 15 % (XRD 로 측정됨) 이다.
- [0071] 소결된 CAP 코어는 트리칼슘 포스페이트 (TCP), 특히  $\alpha$ -TCP ( $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) 또는  $\beta$ -TCP ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 및/또는 테트라칼슘 포스페이트 (TTCP)  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  를 포함한다.
- [0072] 빈번히 사용되는 실시형태에 따르면, 소결된 CAP 코어는 TCP 로 본질적으로 이루어지며,  $\alpha$ -TCP 가 바람직하다.
- [0073] 나노결정질 HAP 의 에피택시 성장한 층은 천연 인간 골 무기물과 구조적으로 거의 동일하다.
- [0074] CAP/HAP 골 대체 물질은 미립자 또는 과립일 수 있으며, 입자 또는 과립은 요망되는 크기 및 형상을 갖는다. 일반적으로, 입자 또는 과립은 250 내지 5000  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 1000 내지 2000  $\mu\text{m}$  의 크기를 갖는다.
- [0075] CAP/HAP 골 대체 물질은 또한 성형체, 예를 들어, 나사, 못, 핀 또는 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조에 견대 특히 고관절, 쇄골, 늑골, 하악골 또는 두개골 부분일 수 있다. 이러한 나사, 못 또는 핀은 재건 정형외과 수술에서, 예를 들어, 무릎 또는 팔꿈치에서 인대를 뼈에 고정하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조는 정형외과 수술에서 결손 또는 결함 뼈 또는 뼈 부분을 대체하기 위한 인공기

관으로서 사용될 수 있다.

- [0076] 본 발명은 또한 일반적으로 천연 또는 합성 중합체를 포함하는 적합한 매트릭스에 위에 정의된 CAP/HAP 골 대체 물의 입자 또는 과립을 포함하는 퍼티에 관한 것이다. 일반적으로, 입자 또는 과립은 250 내지 5000  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 1000 내지 2000  $\mu\text{m}$  의 크기를 갖는다.
- [0077] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 위에 정의된 CAP/HAP 골 대체 물질의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0078] a) 소결된 CAP 코어 물질을 제조하는 단계,
- [0079] b) 10℃ 내지 50℃ 의 온도에서 10 내지 90 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 완충 용액에 소결된 CAP 코어 물질을 침지시켜 CAP 의 HAP 로의 변환 과정을 시작하여, 소결된 CAP 코어 물질 표면 상에 나노결정질 히드록시아파타이트의 폐쇄된 에피택시 성장한 층을 형성하는 단계로서, 에피택시 성장한 나노결정은 인간 골 무기물과 동일한 크기 및 형태를 갖고, 소결된 CAP 코어 물질 표면 상에 형성된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층은 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 외표면을 갖는 단계,
- [0080] c) HAP 의 적어도 하나의 나노결정질 층의 폐쇄된 코팅이 존재할 때 그러나 변환 과정이 완전히 끝나기 전에 한 번에 수용액으로부터 고체 물질을 분리하여 변환을 정지시키는 단계,
- [0081] d) 임의로 단계 c) 에서 비롯되는 분리된 물질을 살균하는 단계.
- [0082] 적합한 단쇄 지방족 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0083] 바람직하게는 단쇄 지방족 알코올은 에탄올이다.
- [0084] 바람직하게는, 단계 b) 의 완충 용액은 20 내지 60 %, 보다 바람직하게는 30 내지 50 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유한다.
- [0085] 소결된 CAP 코어의 외표면 상에서 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층의 균질한 거친 외표면의 조도 파라미터, 특히:
- [0086] - AFM 파라미터: AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ),
  - [0087] - 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판의 크기 (SEM 으로 결정됨) 및
  - [0088] - 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (MIP 로 결정됨) 의 공극의 부피
- [0089] 는 변환 용액의 완충 용액 중 단쇄 지방족 알코올의 백분율을 조정함으로써 유리하게 조정될 수 있다.
- [0090] 백분율이 더 높을수록, AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 가 더 낮고, 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판의 크기 (SEM 로 결정됨) 및 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (MIP 로 결정됨) 의 공극의 부피가 더 작다.
- [0091] 10 내지 90 % 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 단계 b) 의 완충 용액은 다양한 양의 단쇄 지방족 알코올과 완충 수용액을 혼합함으로써 수득된다. 완충 수용액은 10 내지 90 % 의 단쇄 지방족 알코올을 추가로 함유하는 단계 b) 의 침지 용액의 pH 값이 거의 중성이고, 바람직하게는 5.5 내지 9.0, 보다 바람직하게는 7.0 내지 8.0 의 pH 범위 내의 변환 과정 전반에 걸쳐 안정하게 유지되도록 선택된다.
- [0092] 완충액은 상기 pH 범위의 임의의 완충액일 수 있지만, 바람직하게는 칼슘, 마그네슘 및/또는 소듐을 갖거나 갖지 않는 포스페이트 완충액이다.
- [0093] 적합한 완충 용액은 예를 들어 7.3 내지 7.6 의 pH 값의 소듐 디히드로젠 포스페이트 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 의 0.05-0.3 M 수용액이다.
- [0094] 단계 b) 에서 온도 범위는 일반적으로 10℃ 내지 50℃, 바람직하게는 25℃ 내지 45℃, 더욱 바람직하게는 35℃ 내지 40℃ 이다.
- [0095] 바람직하게는 단계 b) 는 35 내지 40℃ 의 온도에서 20 내지 60% 의 단쇄 지방족 알코올을 함유하는 pH 7.0 내지 8.0 의 포스페이트 완충 용액에서 수행된다.
- [0096] 소결된 CAP 코어 물질의 제조는 먼저 칼슘 히드로젠 포스페이트 ( $\text{CaHPO}_4$ ), 칼슘 카르보네이트 및/또는 칼슘 히드록시드의 분말을 혼합한 후, 혼합물을 적절한 온도 범위 내에서 하소 및 소결하여 벌크 소결된 CAP 코어 물질

을 수득하는 것을 포함하는 당해 기술분야에 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다 (예를 들어 Mathew M. et al., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens B. et al., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; 및 Durucan C. et al., 2002, J. Mat. Sci., 37:963 참조).

- [0097] 벌크 소결된 TCP 코어 물질은 따라서 칼슘 히드로젠 포스페이트 ( $\text{CaHPO}_4$ ), 칼슘 카르보네이트 및/또는 칼슘 히드록시드의 분말을 화학량론적 비로 혼합하고, 혼합물을 1200~1450℃의 범위, 바람직하게는 약 1400℃의 온도에서 하소 및 소결하여 얻어질 수 있다.
- [0098] 벌크 소결된 TTCP 코어 물질이 또한 위에 기술된 과정에 의해 얻어질 수 있다.
- [0099] 이러한 방법에 의해 제조된 벌크 소결된 CAP 물질은 2 내지 80 부피%의 공극율 및 공극의 넓은 분포를 갖는 다공성일 수 있다. 다공성 파라미터는 CAP/HAP 골 대체 물질의 의도되는 응용에 따라 선택될 것이다.
- [0100] 단계 b)에서 사용되는 소결된 CAP 코어 물질은
- [0101] - 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 CAP 코어 물질,
- [0102] - 과쇄, 연마 및/또는 분쇄, 및 체거름과 같은 종래의 방법을 사용함으로써 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 CAP 코어 물질로부터 얻어지는 소결된 CAP 코어 물질의 미립자 또는 과립, 또는
- [0103] - 요망되는 형상 및 크기를 갖는 소결된 CAP 코어 물질의 예비형태, 예를 들어, 나사, 못, 핀, 또는 골성 신체 부분의 프로필을 갖는 구조
- [0104] 일 수 있다.
- [0105] 임의의 요망되는 형상 및 크기를 갖는 이러한 예비형태는 CNC 분쇄 또는 3D 프린팅과 같은 잘 알려진 프로토타이핑 기술을 사용함으로써 위에 기술된 바와 같이 제조된 벌크 소결된 코어 물질로부터 얻어질 수 있다 (예를 들어 Bartolo P. et al., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers R. et al., 2002, Biomaterials 23(23), 4437; Yeong W.-Y. et al., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; 및 Seitz H. et al., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782 참조).
- [0106] 침지 단계 b)는 제 1 단계에서 CAP 코어 물질의 일차 상 전이 및 그에 따른 HAP 나노결정 전구물질의 핵형성을 유도한다. 제 2 단계 동안, 제 1 단계로부터의 생성된 HAP 전구물질이 성장하고, 폐쇄된 (즉, 완전히 코팅된) 에피택시 나노결정질 복합 층을 확립할 것이다. 제 1 HAP 나노결정 층은 균일하고 폐쇄되어야 하고, 소결된 CAP 코어 물질에 에피택시 연결되어야 한다.
- [0107] 제 3 단계 동안, 새로 형성된 이중층 복합체 내에서 일차 상 전이가 진행되어, 소결된 CAP 코어 물질 (TCP 또는 TTCP)을 나노결정질 HAP로 추가로 변환시킬 수 있다. 상 전이의 제 3 단계 동안, 소결된 CAP 코어 물질의 일부가 나노결정질 HAP로 변환될 때까지 느린 확산 제어 과정에 의해 제어가능한 시간 동안 칼슘 이온이 방출될 것이다. HAP 층의 두께 및 그에 따른 칼슘 방출 속도는 변환 시간의 변동에 의해 제어될 수 있다.
- [0108] 적절한 두께의 에피택시 성장한 나노결정질 HAP 층은 시험관내에서 제조될 것이며, CAP에서 HAP로의 변환은 그것이 완료되기 전에 정지된다.
- [0109] CAP/HAP 골 대체 물질이 생체내에서 고정되자마자, CAP의 HAP로의 변환 과정은 체액과의 접촉에 의해 재활성화될 것이고, 골 대체 물질은 살아 있는 것 같은 시스템으로서 기능하여 인간 골 무기물과 크기 및 형태가 유사한 새로운 히드록시아파타이트를 형성할 것이다.
- [0110] 생체내 상 변환 과정 동안, 운반된 칼슘 이온은 국소 환경으로 방출되어, 골 재생 과정에 중요하고 유익한 국소 칼슘 평형을 지지할 것이다.
- [0111] 신체의 상이하게 로딩된 영역에서 골 결함의 상이한 재생 시간으로 인해, 칼슘 방출 속도가 제어될 수 있는 것이 중요하다. 이는 히드록시아파타이트의 에피택시 성장한 층의 두께의 변동에 의해 달성될 수 있다.
- [0112] 따라서, 단계 c)는 매우 중요한 단계이다. 단계 b)의 수용액에서의 노출 시간은 요망되는 HAP 층의 두께에 기반한다. 에피택시 배향의 나노결정질 HAP의 적어도 하나의 층이 필요하다. CAP의 HAP로의 변환이 완료되지 않는 것이 필수적이다.
- [0113] 요망되는 두께에 따른 적절한 노출 시간은 칼슘 포스페이트 및 시멘트 및 콘크리트 화학 분야의 당업자에게 잘

알려진 여러 열역학적 미분 방정식을 사용하여 계산될 수 있다.

- [0114] 예를 들어 다음을 참조한다: Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; 및 Schluessler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlin.
- [0115] 위에서 언급된 미분 방정식의 해법을 CAP/HAP 시스템에 적용함으로써 CAP 의 HAP 로의 상 전이 및 HAP 의 에피택시 층이 안정하고 재현가능한 방식으로 제조될 수 있게 하는 층의 두께를 예측하는 것이 가능하다.
- [0116] 수용액으로부터 고체 물질을 분리하는 것은 통상적으로 당해 기술분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 여과 및 건조에 의해 수행된다.
- [0117] 임의적 살균 단계 d) 는 감마선-조사 또는 X-선 방사와 같은 당해 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다.
- [0118] 본 발명은 또한 인간 또는 동물의 결합 부위에서 골 형성, 골 재생, 골 복원 및/또는 골 대체를 지지하기 위한 임플란트 또는 인공기관으로서의, 일반적으로 미립자, 퍼티 또는 성형체 형태의, 위에 정의된 CAP/HAP 골 대체 물질의 용도에 관한 것이다.
- [0119] 본 발명은 또한, 일반적으로 미립자, 퍼티 또는 성형체 형태의, 위에 정의된 CAP/HAP 골 대체 물질을 이식함으로써 인간 또는 동물의 결합 부위에서 골 형성, 골 재생 및/또는 골 복원을 촉진하는 방법에 관한 것이다.
- [0120] **본 발명의 CAP/HAP 골 대체 물질 및 이의 제조 방법의 이점.**
- [0121] 편평한 결정 소판을 포함하는 균질한 거친 외표면을 갖는 본 발명의 상기 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질은, 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 및 매끄러운 영역을 그 사이에 포함하는 비-균질 외표면을 갖는 EP-B1-2445543 에 의해 교시된 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질에 비해, 증가된 태아 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) 의 골형성 분화, 특히 분화 마커 오스테오폰틴 (OPN) 및 오스테오칼신 (OCN) 의 더 높은 발현을 나타낸다. 이는 향상된 생체내 골형성 반응의 강한 표시이다.
- [0122] 이는 R.A. Gittens et al. 에 의해 Biomaterials 2011 May, 32(13): 3395-3403 에서 공개된 결과와 일치하며, 이는 마이크로-서브마이크로-스케일 거칠기와 조합으로 나노스케일 구조의 도입이 골아세포 분화 및 국소 인자 생산을 개선한다는 것을 보여주며, 이는 결국 생체내에서 개선된 임플란트 골유착능에 대한 잠재성을 시사한다.
- [0123] 본 발명의 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 제조 방법은 소결된 CAP 코어의 외표면 상에서 침착된 나노결정질 HAP 의 폐쇄된 에피택시 성장한 층의 균질한 거친 외표면의 조도 파라미터, 특히:
- [0124] - AFM 파라미터: AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ),
- [0125] - 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판의 크기 (SEM 으로 결정됨) 및
- [0126] - 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (MIP 로 결정됨) 의 공극의 부피
- [0127] 를, 변환 용액의 완충 용액 중 단쇄 지방족 알코올의 백분율을 조정함으로써, 유리하게 조정하는 것을 허용한다.
- [0128] 백분율이 더 높을수록, AFM-유도된 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 가 더 낮고, 에피택시 성장한 나노결정질 히드록시아파타이트 소판의 크기 (SEM 로 결정됨) 및 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  (MIP 로 결정됨) 의 공극의 부피가 더 작다.

### 도면의 간단한 설명

- [0129] 본 발명은 본 발명의 바람직한 구현예의 예시적인 실시예 및 하기와 같은 첨부된 도면을 참조로 이하에서 더 상세하게 기재될 것이다:
- 도 1A 는 EP-B1-2445543 에 개시되어 있고, 변환 시간이 30 min 인 실시예 1 에서 제조된 골 대체 물질의 프로토타입 1 (1-2 mm 과립) 의 SEM 사진을 나타내고, 여기서 매끄러운 영역은 SEM 에 의해 측정된 총 외표면의 약

70% 에 해당한다.

도 1B 는 EP-B1-2445543 에 개시되어 있고, 변환 시간이 40 min 인 실시예 1 에서 제조된 골 대체 물질의 프로토타입 2 (1-2 mm 과립) 의 SEM 사진을 나타내고, 여기서 매끄러운 영역은 SEM 에 의해 측정된 총 외표면의 약 50% 에 해당한다.

도 2A-2E 는 본 발명에 따른 골 대체 물질의 프로토타입 3 (도 2A): 20 % 에탄올, 1-2 mm 과립), 프로토타입 4 (도 2B): 30 % 에탄올, 1-2 mm 과립), 프로토타입 5 (도 2C): 40 % 에탄올, 1-2 mm 과립), 프로토타입 6 (도 2D): 50 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 및 프로토타입 7 (도 2E): 60 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 의 SEM 사진을 나타낸다.

도 1 및 도 2A-2E 의 모든 SEM 사진은 배율이 3500 이다.

도 3A 는 저배율 (1000 x) 에서 프로토타입 5 (40 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 의 단면의 SEM 사진을 나타낸다. 우측 하단 코너는 과립의 외표면을 보여주고, 과립의 중심은 좌측 상단 코너를 향해 위치한다.

도 3B 는 고배율 (14'000 x) 에서 프로토타입 5 (40 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 의 단면의 SEM 사진을 나타낸다.

도 4 는 실시예 2 에서 제조된 본 발명에 따른 골 대체 물질의 비-다공성 디스크의 프로토타입 3a (좌측: 20 % 에탄올) 및 6a (우측: 50 % 에탄올) 의 SEM 사진 (2 개의 상부 사진) 및 AFM 사진 (다른 4 개의 사진) 을 나타낸다.

도 5A-5B 는 시험관내 시험에서 선행 기술의 골 대체 물질에 비해, 본 발명에 따른 골 대체 물질과 접촉하는 데 야 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) 의 오스테오칼신 (OCN, 도 5A) 및 오스테오키프론 (OPN, 도 5B) 반응을 나타낸다.

도 6 은 실시예 1 에 기재된 바와 같이 제조된 순수한  $\alpha$ -TCP 및 실시예 2 에서 제조된 본 발명에 따른 골 대체 물질의 1-2 mm 과립의 프로토타입 3 (20 % 에탄올), 5 (40 % 에탄올) 및 7 (60 % 에탄올) 의 1-2 mm 과립의 MIP 다이어그램을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0130] 하기 실시예는 본 발명을 설명하지만 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0131] **실시예 1** EP-B1-2445543 에 따른 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 제조.

[0132] 알파-TCP 의 벌크 소결된 물질, 1.0-2.0 mm 의 입자 크기를 갖는 그것의 다공성 과립 및 에피택시 성장한 HAP 코팅을 갖는 변환된 과립을 EP-B1-2445543 의 실시예 1, 2 및 4 와 유사하게 제조했다.

[0133] 364 g 디칼슘 포스페이트 무수 분말, 136 g 칼슘 카르보네이트 분말 및 220 ml 탈염수를 실험실 교반기를 사용하여 700 rpm 에서 5 min 동안 혼합했다. 혼합 과정으로부터의 슬러리를 고온 안정한 백금 컵 내로 즉시 옮겼다. 충전된 백금 컵을 차가운 퍼니스 (furnace) 에 놓았다. 퍼니스를 100℃/시간의 가열 속도를 사용하여 1400℃ 로 가열했다. 이 온도를 12 시간 동안 유지하고, 그 후 퍼니스를 500℃/시간의 냉각 속도로 800℃ 로 냉각시키고, 그 후 125℃/시간의 냉각 속도로 300℃ 로 냉각시키고, 마지막으로 퍼니스를 전환하여 실온으로 냉각시켰다. 벌크 소결된 물질 (상 순수한  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 을 퍼니스 및 백금 컵으로부터 제거했다.

분말 X-선 회절 분석을 사용하여 상 순도의 제어를 수행했다.

[0134] 벌크 산물을 조 (jaw) 크러셔 (조 거리는 10 내지 1 mm 로 다르다) 를 사용하여 파쇄했다. 생성된 과립을 체거름 기계 (sieving machine) 및 2 mm 및 1 mm 의 메시 구멍이 있는 체 삽입물을 사용하여 체거름했다. 체거름 후에, 과립을 에탄올로 행구어서 과립에 흡착된 미세 분말 잔류물을 분리했다. 다공성 과립을 캐비넷 건조기에서 1 h 동안 80℃ 에서 건조시켰다. 행구 후에 입자 표면의 청결을 주사 전자 현미경법을 사용하여 표면 관찰에 의해 제어했다.

[0135] 0.4 mol/l 소듐 디히드로젠 포스페이트 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 를 증류수에 용해하여 코팅 및 상 변환 과정에 적절한 완충 용액을 제조했다. 용액의 pH 를 소듐 히드록사이드 (NaOH) 를 사용하여 실온에서 7.45 로 조정했다. 이전 단락에 따라 생성된 과립을 제조된 용액 내로 침지하고, 웰 템퍼드 (well-tempered) 수조 (40℃) 내에서 각각 30 min (프로토타입 1) 40 min (프로토타입 2) 동안 저장했다. 침지 후에, 과립을 증류수로 3 회 행구어서 상 변환 과정을 정지시키고, 완충 용액으로부터 잔류물을 제거했다. 다공성 과립을 2 시간 동안 캐비넷 건



조기에서 100℃ 에서 건조시켰다.

- [0136] 배율 3500 x 의 SEM 을 프로토타입 1 및 프로토타입 2 의 과립에 대해 수행하였다.
- [0137] 프로토타입 1 및 2 의 SEM 사진을 나타내는 도 1A 및 1B 로부터 명백한 것과 같이, 과립의 외표면은 에피택시 성장한 HAP 나노결정으로 이루어지는 편평한 결정 소판의 개별 (분리된) 클러스터 및 결정 사이의 매끄러운 영역을 포함하며 비-균질이다.
- [0138] 프로토타입 1 및 프로토타입 2 각각에 관한 SEM 사진에서 개별 클러스터 및 매끄러운 영역이 차지하는 표면을 측정함으로써, 매끄러운 영역이 프로토타입 1 의 경우에 외표면의 약 70 % 에 해당하고, 프로토타입 2 의 경우에 외표면의 약 50 % 에 해당한다는 것을 확인했다.
- [0139] **실시예 2** 본 발명에 따른 2상 칼슘 포스페이트/히드록시아파타이트 (CAP/HAP) 골 대체 물질의 제조.
- [0140] 1) 골 대체 물질의 과립의 제조
- [0141] 상 순수한  $\alpha$ -TCP 의 1-2 mm 크기의 다공성 과립을 상기 실시예 1 에 기재된 바에 따라 생성했다.
- [0142] 상 변환 및 코팅 단계를 40℃ 로 설정된 수조에 배치된 유리 플라스크에서 수행했다. 변환 완충액은 상이한 비율의 에탄올과 혼합된 소듐 디히드로젠 포스페이트 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 의 수용액이었다. 소듐 디히드로젠 포스페이트의 수용액의 몰농도는 0.05 M 내지 0.3M 에서 가변적이었고, 에탄올 함량은 20 내지 60 w/w % 에서 가변적이었다. 변환 용액의 pH 는 7.3 내지 7.6 이었다.
- [0143] 유리 플라스크에 변환 완충액을 채우고, 알파-TCP 과립을 1:40 내지 1:80 (과립 대 변환 용액) 의 비로 첨가했다. 과립을 24 내지 72 시간의 기간 동안 40℃ 에서 변환 용액에 침지시켰다. 침지 후에, 과립을 탈염수 (과립 대 물 비는 중량에 대해 1:10 이다) 로 5 회 및 에탄올 (99.9%, 과립 대 에탄올 비는 중량에 대해 1:10 이다) 로 2 회 행구어서, 상 변환 과정을 정지시키고, 완충 용액으로부터 잔류물을 제거했다. 다공성 과립을 2 시간 동안 캐비넷 건조기에서 100℃ 에서 건조시켰다.
- [0144] 코팅 및 상 변환 과정 후 표면 형상을 SEM 을 사용하여 관찰했다.
- [0145] 도 2 는 본 발명에 따른 골 대체 물질의 프로토타입 3 (20 % 에탄올), 프로토타입 4 (30 % 에탄올), 프로토타입 5 (40 % 에탄올), 프로토타입 6 (50 % 에탄올) 및 프로토타입 7 (60 % 에탄올) 의 3500 x 배율의 SEM 사진을 나타낸다. 도 1A 및 1B 와 도 2 를 비교함으로써, 편평한 결정 소판의 개별 클러스터 및 매끄러운 영역을 그 사이에 갖는 프로토타입 1 및 2 의 비-균질한 외표면이 임의의 개별 결정 클러스터를 갖지 않는 균질한 거친 외표면으로 대체된다는 것이 확인될 수 있다. 균질한 거친 외표면은 에피택시 성장한 히드록시아파타이트 소판의 인τερ록 네트워크의 빌트 업이다. 개별 소판 크기는 SEM 분석에 의해 관찰된 바와 같이 변환 용액 중 에탄올 함량을 증가시킴으로써 감소되고, 이에 따라 외표면의 거칠기 또는 조도는 감소한다.
- [0146] 도 3A 는 저배율 (1000 x) 에서 프로토타입 5 (40 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 의 단면도의 SEM 사진을 나타낸다. 우측 하단 코너는 과립의 외표면을 보여주고, 과립의 중심은 좌측 상단 코너를 향해 위치한다.
- [0147] 도 3B 는 고배율 (14'000 x) 에서 프로토타입 5 (40 % 에탄올, 1-2 mm 과립) 의 단면도의 SEM 사진을 나타내고, 여기서 거친 표면의 빌딩 블록인 개별 편평한 결정 소판을 명확히 볼 수 있다. 과립의 중심의 거친 외표면과 과립의 외표면 상의 거친 외표면 사이에는 차이가 없다.
- [0148] 수은 압입법 (MIP) 에 의한 공극 크기 분포의 결정
- [0149] 과립의 공극 크기 분포를 수은 압입법 (MIP) 을 사용하여 결정했다. MIP 는 다공성 물질의 공극 크기 분포를 결정하기 위해 사용된 표준 특징규명 기술이다. 상기 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, Gregg, S. J. and Sing, K.S.W., Adsorption, Surface Area and Porosity, 2nd ed., Academic Press Inc. (1982), 173-190 에 예를 들어 기재되어 있다.
- [0150] 도 6 은 순수한  $\alpha$ -TCP (실시예 1 에 따라 제조됨 및 프로토타입 3, 5 및 7 의 코어 물질) 에 비해 본 발명에 따른 골 대체 물질의 프로토타입 3, 5 및 7 의 MIP 다이어그램을 나타낸다. 모든 측정을 1-2 mm 과립으로 수행했다.
- [0151] 매끄러운 표면으로 인해 순수한  $\alpha$ -TCP 샘플은 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  범위의 임의의 공극을 갖지 않는 것을 확인할 수 있다. 본 발명에 따른 모든 골 대체 물질은 에피택시 성장한 히드록시아파타이트 소판의 인τερ록 네트워크의 빌트 업인 균질한 거친 외표면의 다공성 성질로 인해 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  범위의 공극을 함유한다. MIP 곡선 하

면적에 해당하는 거친 외표면의 공극 부피는 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  범위이고, 이는 인터록 네트워크의 개별 소판 크기에 의존한다. 개별 소판이 더 클수록, 인터록 네트워크의 포함된 공극 부피가 더 높다. 따라서, 인터록 네트워크의 포함된 공극 부피는 표면의 조도와 직접 상관관계가 있을 수 있다. MIP 다이어그램 중 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  범위의 공극 부피가 더 높을수록, 표면의 조도는 더 높다. 프로토타입 3 은 나타난 프로토타입 중 0.03 내지 2  $\mu\text{m}$  범위의 가장 큰 공극 부피 (곡선 하 면적) 을 갖는다 (이어서, 프로토타입 5 및 7). 도 2A-2E 의 SEM 분석에 의해, 프로토타입의 조도가 프로토타입 3 에서 프로토타입 5 및 7 로 감소하는 것이 확인된다.

## [0152] 2) 골 대체 물질의 비-다공성 디스크의 제조

상기 실시예 1 에 기재된 바와 같이 제조된 상 순수한  $\alpha$ -TCP 의 1-2 mm 크기 과립을 150 rpm 으로 20 시간 동안 플라네타리 밀 (planetary mill) 로 분쇄하여 미세 분말을 수득했다. 미세 분말을 가압 몰드에 채우고, 1 톤의 로드 로 핸드 프레스로 압축했다. 몰드로부터 그린 바디를 제거하고, 고온 퍼니스로 옮겼다. 퍼니스를 250°C/시간의 가열 속도를 사용하여 1450°C 로 가열했다. 이 온도를 24 시간 동안 유지하고, 그 후 500°C/시간의 냉각 속도로 800°C 로 냉각시킨 후 150°C/시간의 냉각 속도로 실온으로 냉각시켰다. 벌크 소결된 비-다공성 물질 (상 순수한  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 을 퍼니스로부터 제거했다. 상 순도의 제어를 분말 X-선 회절 분석을 사용하여 수행하고, 표면 특징을 SEM 을 사용하여 분석했다.

[0154]  $\alpha$ -TCP 대 변환 용액의 중량 비가 1 대 3.5 라는 유일한 차이로, 제조된 디스크의 코팅 및 상 변환을 상기 1) 에 기재된 바와 같이 수행했다.

[0155] 본 발명에 따른 골 대체 물질의 프로토타입 3a (20 % 에탄올) 및 6a (50 % 에탄올) 를 이에 따라 제조했다.

[0156] 코팅 및 상 변환 과정 후 표면 형태를 SEM 을 사용하여 관찰했다. 상응하는 거칠기 파라미터를 원자력 현미경법 AFM 을 사용하여 결정했다.

[0157] 도 4 의 SEM 이미지는, 비-다공성 디스크의 균질한 거친 외표면의 형태가 실시예 2 단락 1 로부터의 상응하는 에탄올 함량으로 제조된 과립 (프로토타입 3 및 3a 및 프로토타입 6 및 6a) 의 거친 외표면과 동일하다는 것을 확인시켜준다.

## [0158] 원자력 현미경법 (AFM)

[0159] 나노스케일에서의 표면 측정을 태핑 모드의 원자력 현미경법 (TT-AFM, AFM Workshop) 을 사용하여 평가했다. AFM 분석을 직경이 11 mm 이고, 높이가 1 mm 인 비-다공성 원통 디스크를 사용하여 주변 분위기 하에서 실시했다. 190 kHz 의 공진 주파수 및 10 nm 이하의 팁 반경을 사용했다. 각각의 AFM 분석을 50  $\mu\text{m}$   $\times$  50  $\mu\text{m}$  면적에 걸쳐 수행하고, 모든 그룹의 3 개의 샘플을 스캔했다. 원래 데이터를 수치 보정을 적용함으로써 평면-레벨링하여 틸트를 제거하고, 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 및 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 의 평균 값을 Gwyddion 소프트웨어를 사용하여 결정했다.

[0160] 표면의 유사한 표면 특징규명은 예를 들어 US-2013-0045360-A1 에 기재되어 있다.

[0161] 도 4 는 본 발명에 따라 제조된 비-다공성 디스크의 프로토타입 3a (20 % 에탄올, 좌측 사이드) 및 6a (50 % 에탄올, 우측 사이드) 의 AFM 사진을 나타낸다. 프로토타입 3a 및 6a 에 대한 AFM-유도된 거칠기 값은 하기 표 1 에서 확인될 수 있다.

[0162] 표 1

[0163] 프로토타입 3a 및 6a 에 대한 AFM 유도된 거칠기 값.

	$R_q$ [nm]	$R_z$ [nm]
프로토타입 3a (20% 에탄올)	237 $\pm$ 31	1391 $\pm$ 194
프로토타입 6a (50% 에탄올)	130 $\pm$ 13	630 $\pm$ 82

[0164]

[0165] 표 1 에서 확인된 바와 같이, 에탄올 함량을 20% 에서 50% 로 증가시킴으로써 루트 평균 제곱 거칠기 ( $R_q$ ) 의 평균 값은 237 nm 에서 130 nm 로 감소했고, 프로파일의 평균 최대 높이 ( $R_z$ ) 는 1391 nm 에서 630 nm 로 감소했다.

[0166] **실시예 3** 태아 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) 의 골형성 분화의 시험관내 시험.

[0167] 실시예 1 및 2 에서 제조된 골 대체 물질 프로토타입이 골형성 분화를 지지하는지를 평가하기 위해, 임신 22 주 후 인간 태아 대퇴골로부터 단리된 약 200'000 hMSC (ScienCell: Cat#7500, Lot# 6890 로 시판됨) 를 상기 골 대체 물질 프로토타입의 320 mg 과립에 파종하고, 3 주 동안 배양했다. 배양 첫 7 일에, 시판 hMSC 확장 배지 (MSCM Medium, Cat# 7501, ScienCell) 를 사용하여 세포 증식을 최적으로 지지했다. 이후 14 일 동안, 배지를 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 으로 변경했다. 추가적인 골형성제는 세포 배양 배지에 첨가되지 않았다. hMSC 배양 3 주 후, 총 mRNA 를 단리하고, cDNA 로 전사하고, Real Time Quantitative PCR 을 수행했다. 유전자 발현을, GAPDH 를 하우스-키팅 유전자로서 사용하여,  $\Delta\Delta CT$  방법 후 계산했다 (Livak K.J. and Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method, 2001, Methods 25, pp. 402-408 참조). 골형성 분화 마커 오스테오폰틴 (OPN) 및 오스테오칼신 (OCN) 의 발현을 실시예 1 및 2 에서 제조된 과립 형태 (1-2 mm) 의 모든 골 대체 물질 프로토타입에 대해 측정하였다.

[0168] 상기 측정은 실시예 1 의 선행 기술 골 대체 물질 프로토타입에 비해 실시예 2 의 본 발명에 따른 골 대체 물질 프로토타입의 경우 골형성 분화 마커 OPN 및 OCN 의 발현이 유의하게 더 높은 것을 보였다 (도 5A-5B 참조).

[0169] 이러한 시험관내 결과에 기초하여, 본 발명에 따른 골 대체 물질 프로토타입에 대한 향상된 골형성 반응이 생체 내에서 예측된다.

[0170] **실시예 4** 인간 골 무기물 및 본 발명의 2상 CAP/HAP 골 대체 물질의 HAP 나노결정에 대한 결정 크기 및 형태의 비교.

[0171] EP-B1-2445543 에서와 같이, 천연 인간 골 무기물 및 프로토타입 3 의 샘플에 대해 Bragg 방법을 적용함으로써 X-선 회절 데이터의 개선을 사용하여 결정 크기 분석을 수행하였다.

[0172] 따라서, 본 발명의 2상 CAP/HAP 골 대체 물질 및 인간 골 무기물은 동일한 형태 및 동일한 결정 크기를 갖는 것으로 나타났다.

[0173] 하기 표 2 를 참조한다.

[0174] 표 2

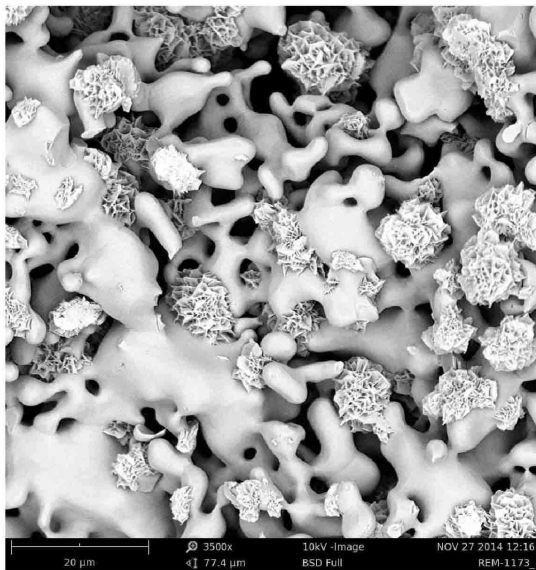
[0175] 인간 골 무기물 및 본 발명의 CAP/HAP 골 대체물에 대한 HAP 결정 크기 및 형태의 비교

결정 축 (6 각형 공간 군 P6 <sub>3</sub> /m)	생리학적 온도에서 제조된 본 발명의 CAP/HAP. 결정 크기* [nm]	천연 인간 골 무기물 결정 크기* [nm]
a (1,0,0)	18 (±4)	15-21
b (0,1,0)	18 (±4)	15-21
c (0,0,1)	38 (±8)	34-45

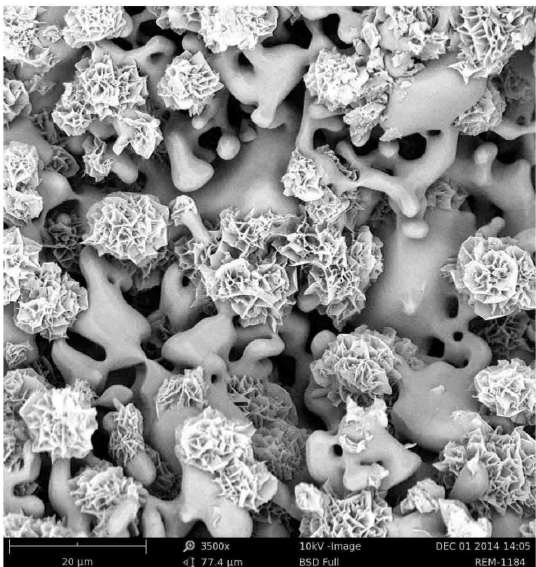
[0176]

도면

도면1a

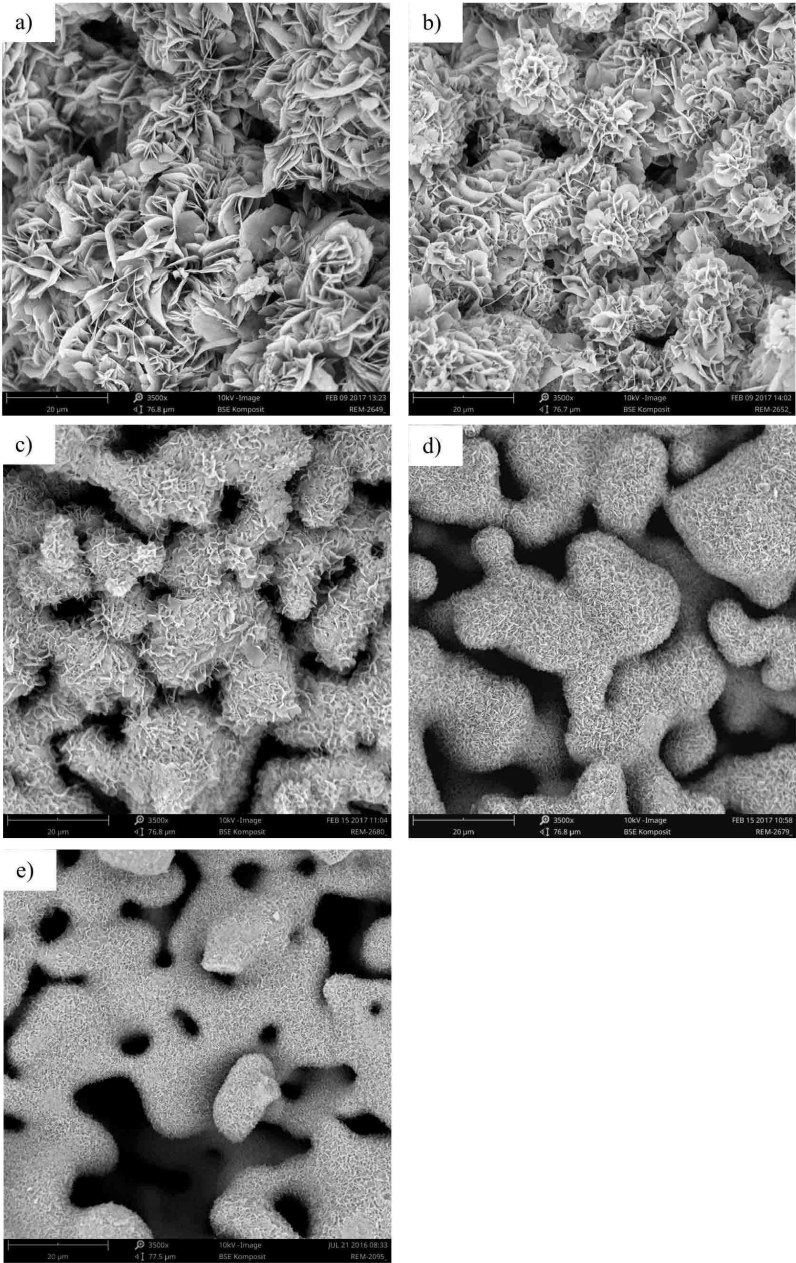


도면1b



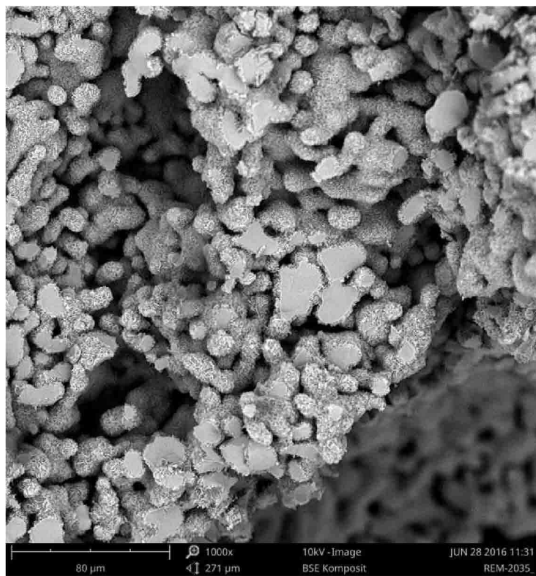


도면2

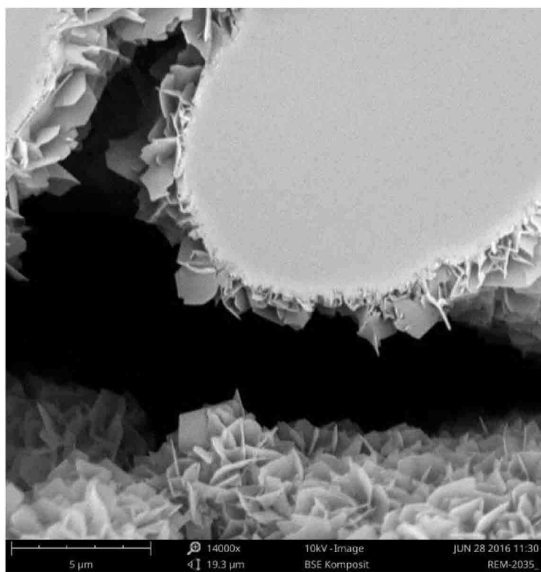




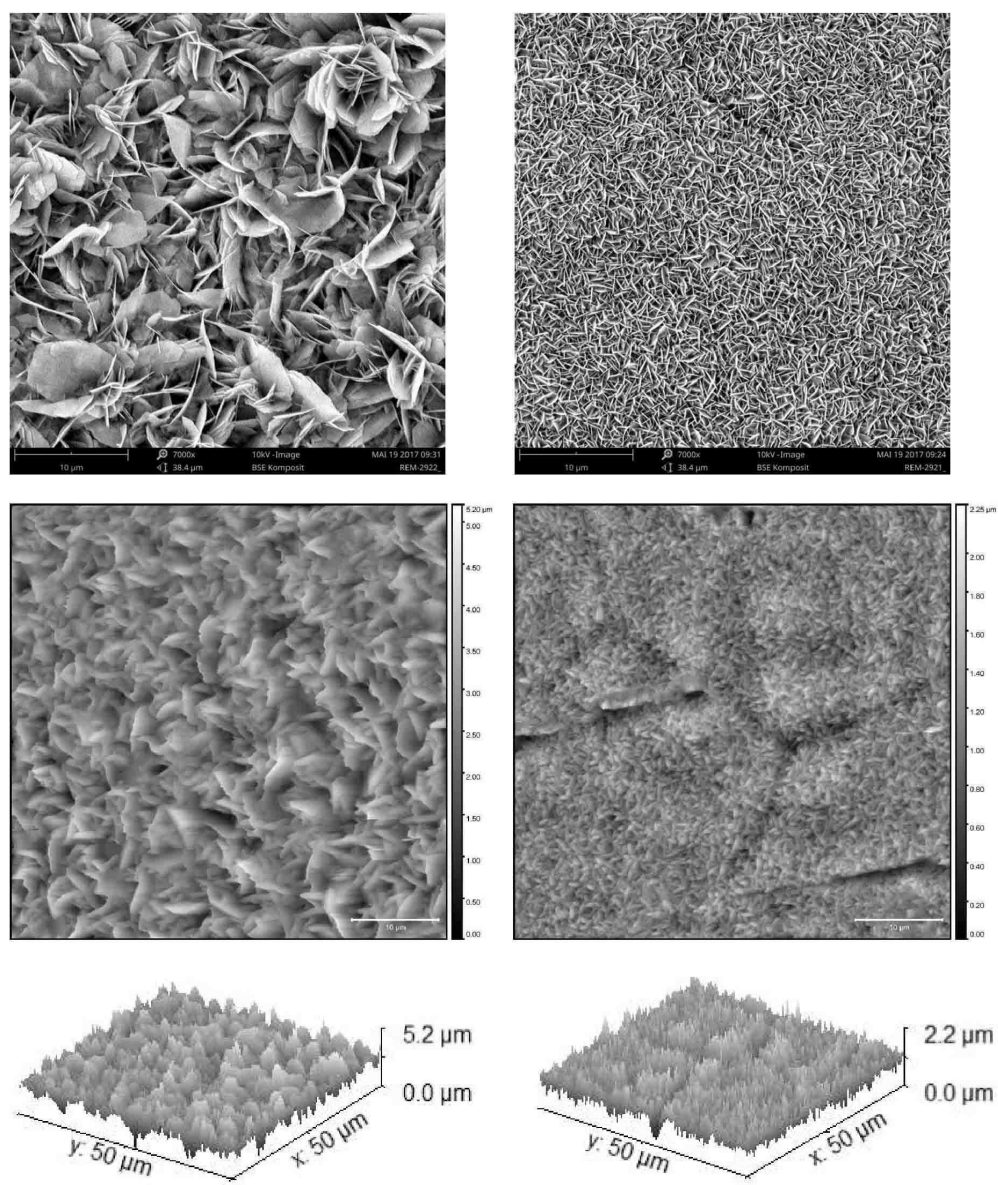
도면3a



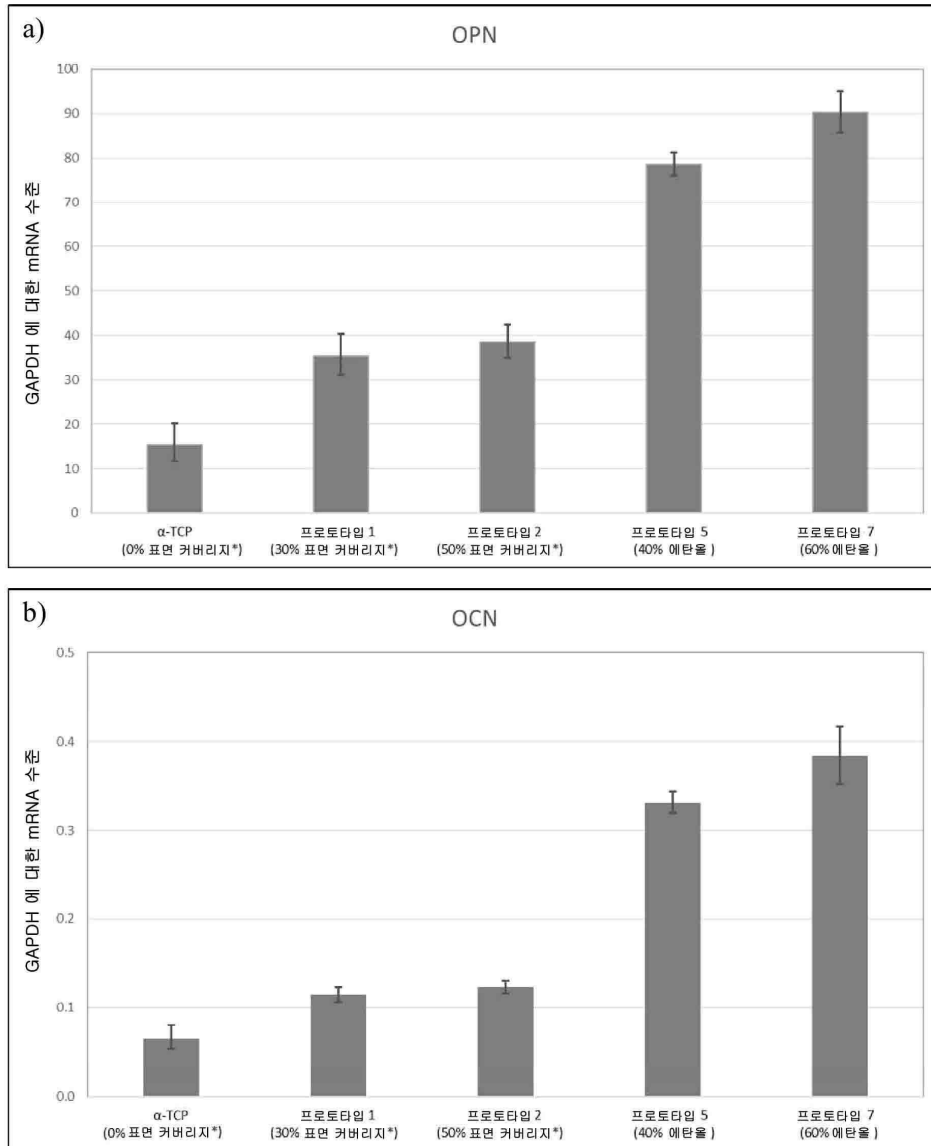
도면3b



도면4



도면5



\* SEM 으로 측정된 편평한 결정 소판의 개별 클러스터로의 표면 커버리지

도면6

