(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0096525
(43) 공개일자 2017년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/12 (2006.01) *A61C 8/00* (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01) *A61L 2/20* (2006.01)
C04B 33/132 (2006.01) *C04B 33/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/12 (2013.01)
A61C 8/0012 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0018021
(22) 출원일자 2016년02월16일
심사청구일자 2016년02월16일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김수관
광주광역시 서구 풍암중앙로 68, 104동 503호(풍암동 금호아파트)
이숙영
광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김은구, 송해모

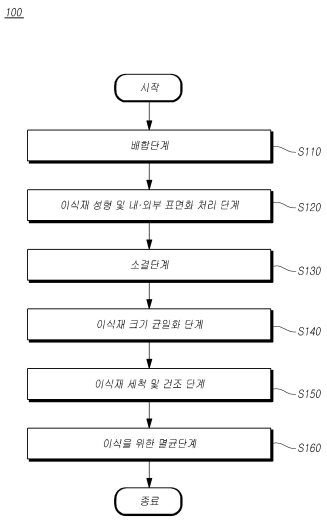
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **전복패각으로부터 합성된 수산화인회석(Hydroxyapatite) 및 베타-제삼인산칼슘(β-tricalcium phosphate)를 활용한 이상인산칼슘계열의 치과의료용 합성골 이식재 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 산업폐기물인 전복 패각으로부터 합성된 생체이식용 바이오세라믹인 수산화인회석 (Hydroxyapatite, HA) 및 베타-제삼인산칼슘 (β-tricalcium phosphate)을 원료로 하여 치조골 재생을 위한 최적 배합비율 분석, 치과의료용 골 조직 재생유도를 극대화하기 위한 이식재의 내·외부 표면화처리, 생물학적 안전성 및 생체 적합성 분석을 통하여 전복패각 유래 치과의료용 이상인산칼슘계열 합성골 이식재 및 그 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 2/0094 (2013.01)
A61L 2/20 (2013.01)
C04B 33/132 (2013.01)
C04B 33/32 (2013.01)
A61L 2202/21 (2013.01)
(72) 발명자
김재성
광주광역시 북구 일곡로 80번지 102동 1401호
강경록
광주광역시 동구 동명로14번길 44 상명빌라 302호
임민지
광주광역시 동구 지산로 31-3
정재웅
광주광역시 동구 무등로 374 두산위브 713동 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525005033
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 전복패각으로부터 생체이식용 바이오세라믹 가공 및 이를 이용한 치과의료용 합성골 이식재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.21 ~ 2016.06.20

명 세 서

청구범위

청구항 1

전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 배합하는 제 1단계;

상기 제 1단계의 배합된 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 점성물질에 교반하여 액체질소에 침지하여 합성골 이식재로 성형한 후 상기 합성골 이식재를 동결건조하는 제 2단계;

상기 제 2단계에서 동결건조된 합성골 이식재를 특정 온도에서 특정 시간 동안 소결하는 제 3단계; 및

상기 제 3단계에서 합성된 합성골 이식재로부터 직경 200 ㎛ 이상 500 ㎛ 이하의 합성골 이식재를 분리회수하는 제 4단계를 포함하는 합성골 이식재의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 점성물질은 1% 알긴산 수용액인 것을 특징으로 하는 합성골 이식재의_제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제 4단계에서 회수된 합성골 이식재의 과량 칼슘이온을 멸균수에 침지하여 제거 후 건조하는 제 5단계; 및

상기 제 5단계로부터 회수된 합성골 이식재에 대한 에틸렌옥사이드 가스 멸균하는 제 6단계를 추가로 포함하는 합성골 이식재의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제 2단계(S120)에서 합성골 이식재를 1100~1300℃에서 1시간 내지 6시간 동안 소결하는 것을 특징으로 하는 합성골 이식재의 제조방법.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 제 6단계에서, 에틸렌옥사이드 가스로 가스 멸균하는 것을 특징으로 하는 합성골 이식재의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제1 단계에서 상기 전복패각 유래 수산화인회석 : 상기 수산화인회석과 상기 베타-제3인산칼슘의 배합비율은 4:6 내지 6:4인 것을 특징으로 하는 합성골 이식재 제조방법

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 제1 단계에서 상기 전복패각 유래 수산화인회석 : 상기 수산화인회석과 상기 베타-제3인산칼슘의 배합비율은 6:4인 것을 특징으로 하는 합성골 이식재 제조방법.

청구항 8

제5항의 제조방법에 의해 제조된,

수산화인회석 : 베타-제3인산칼슘의 배합비율이 4:6 내지 6:4로 전복패각 유래 상기 수산화인회석 및 상기 베타-제3인산칼슘이 배합되 전복패각 유래 이상 인산칼슘계열 합성골 이식재.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산업폐기물인 전복 패각으로부터 합성된 생체이식용 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 원료소재로 하는 전복패각 유래 치과의료용 합성골 이식재 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 임플란트 치료가 요구되는 환자의 경우 임플란트 이식을 위하여 먼저 골 결손부 내에 골이식재 (Bone grafting material)를 사용한 골이식술 (Bone grafting) 및 골유도 재생술 (Guided bone regeneration, GBR)을 시행하여 치주 질환으로 소실된 치조골 재건하게 된다. 이는 골이식재가 임플란트와 치주 조직 간의 결합력을 향상시켜 골 재생 효과를 높여주고, 골이식재로 메워진 골 결손부의 신생골 형성에 효과적이기 때문이다. 따라서 골이식 시 사용되는 골이식재는 우수한 생물학적 안전성과 생체 적합성이 요구될 뿐만 아니라 골형성 및 이와 관련된 재혈관화를 촉진시켜 신생골을 형성하는 지지체로써의 기능성이 요구된다. 특히 골이식재는 골형성세포에 의해 직접적으로 신생골을 형성하는 우수한 골형성성 (Osteogenesis)과 더불어 이식재 내부로 혈관과 골 조직의 공급을 원활하게 하여 이식재 흡수와 신생골 침착으로 골을 형성하는 골전도성 (Osteoconduction), 그리고 이식재 내부에 있는 골형성단백질 (Bone morphogenetic protein, BMP) 등의 골유도물질을 통해 신생골을 형성시키는 골유도성 (Osteoinduction) 등 다양한 기능이 요구된다. 따라서 다양한 골이식재의 장·단점을 충분히 고려하여 환자에게 맞는 골이식재를 선택하는 것 또한 중요한 치료 요소로 꼽히고 있다.

[0003] 현재 시판 중인 골이식재는 크게 자가골 (Autogenous bone), 동종골 (Allograft bone), 이종골 (Xenograft bone) 및 합성골 이식재 (Synthetic bone substitute, Alloplastic bone material) 등으로 구분되어있다.

[0004] 환자의 환부 외 지역에서 골 조직을 채취하여 치조골 손실부에 적용하는 자가골은 골전도능, 골유도능, 골형성능이 모두 우수한 반면에 환부 외 지역에서 골 조직을 채취를 위한 부가적인 수술 및 골 조직 확보에 제한성을 가지고 있다. 동종골의 경우 사체로부터 골조직을 확보하여 사용하는 것으로 비교적 양호한 골전도능과 골유도능을 갖고 있는 반면에 사체 기증자가 요구될 뿐만 아니라 수형감염에 대한 위험도가 있다. 이종골의 경우 소 또는 돼지 등으로부터 확보되며, 비교적 골전도능과 골조직 확보가 용이하다는 장점이 있는 반면, 인체 내 이식 후 면역반응 등의 위험요소가 있다.

[0005] 합성골 이식재는 생체이식이 가능한 바이오세라믹을 핵심으로 하여 합성된 골 유사체로 골 채취량의 제한성, 조직 거부반응 등의 단점을 극복하여 우수한 가격경쟁력, 높은 생체 적합성 및 생물학적 안전성을 확보할 수 있는 장점을 가지고 있다. 반면 낮은 골전도능의 단점을 가지고 있으나 고령인구의 증가에 따른 골이식수술이 요구되는 환자의 수요가 증가됨에 따라 골 이식재 시장에서 합성골 이식재의 수요는 급속히 증가하게 될 전망이다. 특히 최근 Millenium Research Group자료를 바탕으로 한 국내 28개 골이식재관련 업체 조사자료에 따르면 동종골 및 이종골의 성장률은 년 12%의 성장률을 나타내는 반면 합성골 이식재 성장률은 년 15%로 이들 동종골 및 이종골 시장성장률을 상회하고 있다. 따라서 합성골 이식재의 단점인 낮은 골전도능을 보완할 수 있는 바이오세라믹, 바이오글라스, 세라믹 산화물, 합성고분자 및 금속화합물 등을 복합화 하여 우수한 골전도능을 확보한 합성골 이식재의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 그러나 현재 국내 합성골 이식재 시장은 높은 대외수입의존도에 따른 고가의 수입산 합성골 이식재로 치조골 이식이 요구되는 환자에 있어 치료비용단가 상승의 원인 및 치료비용 부담으로 작용하고 있는 실정이다. 따라서 국민구강보건 증진을 위하여 우수한 생체 적합성, 생물학적 안전성, 골 재생효율 및 경제성과 더불어 국외 합성골 이식재 합성업체로부터 영세한 국내 합성골 이식재 합성업체를 보호육성하기 위한 국내 합성골 이식재 합성원천기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 해양 폐자원 또는 산업 폐기 자원인 전복패각으로부터 합성된 생체이식용 바이오세라믹인 수산화인회석과 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 우수한 골형성능, 생체적합성, 생물학

적 안전성 및 경제성을 확보한 이상인산칼슘계열 합성골 이식재 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 해양 폐자원 또는 산업 폐기 자원인 전복패각으로부터 합성된 생체이식용 바이오세라믹인 수산화인회석과 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 수입산 합성골이식재와 비교하여 우수한 가격경쟁력을 확보한 전복패각 유래 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재 및 그 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 해양 또는 산업폐기물인 전복패각으로부터 우수한 골형성능, 생체적합성 및 생물학적 안전성과 더불어 우수한 가격경쟁력을 확보한 치과의료용 합성골 이식재를 개발함에 따라 치조골 재생이 요구되는 구강질환환자의 치료비용 부담완화를 통한 국민구강보건 증진에 기여할 뿐만 아니라 치과용 합성골이식재의 수입을 대체할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재의 제조방법의 흐름도이다.

도 2은 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재의 제조방법을 나타내는 순서도이다.

도 3는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재 제조 시 액체질소 침지 후 동결건조를 통한 내·외부표면화처리를 검증하기 위한 전자현미경 사진이다.

도 4는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조 시 소결온도과정 중 발생될 수 있는 세라믹 변성 유무를 X-Ray Diffraction (XRD)에 의해 분석한 결과이다.

도 5는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조 시 소결온도과정 중 발생될 수 있는 세라믹 변성 유무를 Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy (FT-IR)에 의해 분석한 결과이다.

도 6는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생체골과의 유사도를 분석하기 위한 방법으로써 Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDS) 분석을 통한 칼슘 및 인의 비율을 분석한 결과이다.

도 7는 초대배양 정상구강각화세포 (Primary normal human oral keratinocyte) 및 MG-63 조골세포를 대상으로 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생물학적 안전성을 분석하기 위하여 세포독성을 MTT 분석법에 따라 시행한 결과이다.

도 8은 MG-63 조골세포를 대상으로 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 세포부착능 및 생물학적 안전성을 분석하기 위하여 DAPI를 사용한 핵염색 및 Cell live dead assay를 수행하여 시각화한 결과이다.

도 9은 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생체적합성을 분석하기 위하여 각각의 합성된 이식재를 대상으로 용출하여 이에 대한 pH를 분석한 결과이다.

도 10는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 각각의 합성골이식재를 두개골에 8㎜ 골결손을 유도한 실험용 렛트에 이식 8주 후 방사선 계측학적 분석 결과이다.

도 10는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 각각의 합성골이식재를 두개골에 8㎜ 골결손을 유도한 실험용 렛트에 이식 8주 후 조직학적 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명의 일부 실시예들을 예시적인 도면을 통해 상세하게 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가지도록 하고 있음에 유의해야 한다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.

[0012] 또한, 본 발명의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제 1, 제 2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차폐 또는 순서 등이 한정되지 않는다. 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소에 "연결", "결합" 또는 "접속"된다고 기재된 경우, 그 구성 요소는 그 다른 구성 요소에 직접적으로 연결되거나 또는 접속 될 수 있지만, 각 구성 요소 사이에 또 다른 구성 요소가 "연결", "결합" 또는 "접속"될 수 도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 생체이식용 바이오세라믹인 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘은 해양 또는 산업폐기물로 간주되고 있는 전복패각으로부터 합성되었다.

[0014] 본 발명은 치과의료용 생체재료인 합성골 이식재로 사용하기 위하여 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4의 비율로 복합화한 합성된 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재 제조방법에 관한 것이다.

[0015] 도 1은 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재의 제조방법의 흐름도이다.

[0016] 도 1을 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 합성골 이식재 제조방법(100)은

[0017] 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 배합하는 제 1단계(S110); 제 1단계(S110)의 배합된 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 합성골 이식재로 성형한 후 상기 합성골 이식재를 동결건조하는 제 2단계(S120); 제 2단계(S120)에서 동결건조된 합성골 이식재를 특정 온도에서 특정 시간 동안 소결하는 제 3단계(S130); 제 3단계(S130)에서 합성된 합성골 이식재로부터 직경 200 ㎛ 이상 500 ㎛ 이하의 합성골 이식재를 분리회수하는 제 4단계(S140)를 포함한다.

[0018] 제2단계(S120)에서, 제 1단계(S110)의 배합된 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 점성물질에 교반하여 액체질소에 침지하여 합성골 이식재로 성형한 후 상기 합성골 이식재를 동결건조할 수 있다. 이때 점성물질은 제 1단계(S110)의 배합된 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 합성골 이식재로 성형하는데 필요한 점성을 갖는 물질을 의미한다. 예를 들어 점성물질은 알긴산(Alginate) 수용액과 같은 점성 수용액이나 제라틴, 아가(agar) 등을 예를 들수 있으나, 본 명세서에는 알긴산 수용액을 예를 들어 설명한다. 즉 점성물질은 특정 농도, 예를 들어 1% 알긴산 수용액일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명의 실시예에 따른 합성골 이식재 제조방법(100)은 제 4단계(S140)에서 회수된 합성골 이식재의 과량 칼슘이온을 멸균수에 침지하여 제거 후 건조하는 제 5단계(S150); 및 제 5단계(S150)로부터 회수된 합성골 이식재에 대한 가스 멸균하는 제 6단계(S160)를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 이때 제3단계(S130)에서 제 2단계(S120)의 합성골 이식재를 1100~1300℃, 예를 들어 1230℃에서 1시간 내지 6시간, 예를 들어 2시간 소결할 수 있다.

[0021] 구체적으로, 제1단계(S110)의 배합단계는 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4, 5:5 및 4:6의 비율로 지르코니아 (Zirconia) 볼(Ball)이 포함된 1% 알긴산(Alginate) 용액에 혼합한 후 밀링머신에서 250 rpm으로 상온에서 12시간 동안 분쇄하여 수산화인회석과 베타-제3인산칼슘이 균일한 농도로 섞일 수 있도록 유도하는 공정이다.

[0022] 또한 밀링공정은 이후에 시행될 주사바늘 (Gauge #21)을 통한 성형과정 시 주사바늘 내 막힘 현상을 해결하여 이식재 합성손실률을 낮출 뿐만 아니라 지르코니아 볼에 의하여 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 입자크기가 작아짐으로써 알긴산을 지지체로 하여 액체질소 내에서 구형의 형태로 성형 및 동결건조 후 이식재의 풀림현상을 해결할 수 있다.

[0023] 제2단계(S120)의 이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 단계에서 혼합된 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘 혼합용액을 회수하여 구형의 직경 200 ㎛~500 ㎛ 크기의 이식재의 형태를 성형하기 위하여 주사바늘(Gauge #21)이 장착된 주사기로 옮겨 실리지 펌프에 장착시키고, 이후 실리지 펌프를 2 ~ 3 ml/min으로 고

정하여 주사기 내의 혼합된 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘용액을 사출하여 즉시 액체질소 내에 침지시켜 구형의 형태로 급속냉동하여 이식재를 성형하는 공정이다.

[0024] 이후 액체질소에 10분 이상 침지시킨 구형의 이식재를 80℃로 고정된 동결건조기에서 24시간 동안 동결건조 공정을 수행하여 이식재 내부에 흡수된 액체질소와 수분이 이식재 외부로 배출되는 과정에서 이식재 외부표면을 거칠게 하여 표면 마찰력을 증가시켜 구형형태의 이식재 이식 후 발생될 수 있는 이식재의 골이식부위 이탈률을 현저히 감소시킨다. 뿐만 아니라 동결건조 공정을 수행하여 이식재 내부에 흡수된 액체질소와 수분이 이식재 외부로 배출되는 과정에서 이식재 내부에 미세기공을 형성시킴으로써 이식 후 골세포가 안착될 수 있는 내·외부 표면을 극대화시킬 뿐만 아니라 수분흡수도 및 안정적인 생체 내 물질 교환이 이루어지게 하여 골유도능을 증진시킬 수 있다.

[0025] 제3단계(S130)의 소결단계는 제 2단계(S120)를 수행한 후 회수된 이식재를 소결로를 활용하여 1230℃까지 1시간에 100℃씩 승온시킨 후 2시간 동안 소결하고, 이후 1시간에 100℃씩 단계적으로 냉각하여 소결로 온도가 30~60℃에 도달 시 합성된 이식재를 회수하는 공정이다.

[0026] 특히 본 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘으로 구성된 이상인산칼슘계열의 합성골 이식재 합성공정 시 1234℃ 이상의 소결온도에서 소결되는 경우 베타-제3인산칼슘이 알파-제3인산칼슘으로 전환될 수 있기 때문에 본 특허에서 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정을 실시할 수 있다.

[0027] 제 4단계(S140)의 이식재 크기 균일화 단계는 200 ㎛이상 500 ㎛ 이하의 구형 이식재가 골형성 유도에 적합한 공극간극을 유지하기 때문에 합성공정 3단계 수행 후 합성된 이식재를 Diameter sieve를 활용하여 직경 200 ㎛ 이상 500 ㎛ 이하의 구형 이식재를 분리 회수하는 단계이다.

[0028] 제 5단계(S150)의 이식재 세척 및 건조 단계는 합성공정 시 형성된 이식재 표면에 과량으로 존재하는 칼슘이온은 이식 후 조직 내에 세포괴사를 유도할 수 있음에 따라 멸균수를 사용하여 37℃에서 15분씩 3회 반복하여 이식재를 회수한 후 50℃로 내부온도가 조절된 건조기를 활용하여 24시간 완전건조 실시하는 공정이다.

[0029] 제 6단계(S160)의 이식을 위한 멸균단계는 완전건조된 이식재는 이식을 위하여 0.5g으로 단위포장한 후 에틸렌옥사이드 가스 멸균을 수행하는 공정이다.

[0030] 또한 본 발명은 치과용합성골 이식재로써 사용하기 위한 생물학적 안전성, 물리·화학적 특성분석 및 생체이식 후 성능평가 (조지학적 및 방사선계측학적 분석)를 통하여 분석된 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘이 6:4로 배합된 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은, 우수한 골형성능, 생체적합성 및 생물학적 안전성을 확보하기 위하여 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5 및 4:6으로 제조하고 생체 이식 8주 후 조직학적 및 방사선계측학적 분석을 통한 최적 배합비율 결정, 조골세포 부착을 극대화하고 혈관형성 및 생체 내 성장인자의 교환이 용이한 공극간격을 유지하기에 적합한 형태를 유지하기 위하여 직경 200 ㎛ ~ 500 ㎛ 구형의 형태로 제조하기 위한 실린지펌핑 공정, 이식 시 이식재의 골결손부 이탈을 방지하기 위한 표면마찰력 증진 및 인체골과 유사한 이식재 내부 미세기공 형성를 위한 액체질소 침지 후 동결건조를 통한 합성골 이식재 내·외부 표면화처리 등을 포함하는 전복패각 유래 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재를 제공한다.

[0032] 이하 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 배합하여 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재의 제조방법의 실시예에 대하여 도 2 내지 도 11을 참조하여 구체적으로 설명한다.

[0033] [실시예]

[0034] 도 2는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 원료로 하여 이상인산칼슘계열 치과의료용 합성골 이식재의 제조방법의 실시예를 나타내는 순서도이다.

[0035] 도 2에는 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 배합하는 제 1단계, 성형 및 이식재 내외부 표면화 처리하는 제 2단계, 소결하는 제 3단계, 이식재 크기 균일화하는 제 4단계, 이식재 세척 및 건조하는 제 5단계와 마지막으로 멸균하는 제 6단계를 도식화하였다.

[0036] 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따른 합성골 이식재 제조방법(100)은 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 배합하는 제 1단계(S110)부터 시작된다. 먼저, 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4, 5:5 및 4:6의 비율로 1% 알긴산 (Alginate) 용액에 혼합하여 총 200 ml의 중량으로 제조한 후 500 ml 용량의 혼합용기에 넣은 후 직경 5 mm 지르코니아 (Zirconia) 볼(Ball) 250g을 첨가하여 밀링머신에서 250 rpm

으로 상온에서 12시간 동안 분쇄하여 수산화인회석과 베타-제3인산칼슘이 균일한 밀도 및 농도로 균질화 하였다.

[0037] 상기 1단계(S110)의 배합단계에서 밀링공정은 2단계 이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 공정에서 시행될 주사바늘 (Gauge #21)을 통한 성형과정 시 주사바늘 내 막힘 현상을 해결하여 이식재 합성손실률을 낮출 뿐만 아니라 지르코니아 볼에 의하여 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 입자크기가 작아짐으로써 알긴산을 지지체로 하여 액체질소 내에서 구형의 형태로 성형 및 동결건조 후 이식재의 풀림현상을 해결할 수 있었다.

[0038] 상기 1단계(S110)의 배합단계 후 제 2단계(S120)로 이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 단계를 시행하였다. 구체적으로, 상기 1단계(S110)의 배합단계 후 지르코니아 볼을 제거하고 1% 알긴산에 혼합시킨 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘 용액 200 ml을 회수하여 구형의 직경 200 μm~500 μm 크기의 이식재의 형태를 성형하기 위하여 주사바늘(Gauge #21)이 장착된 50 ml 용량의 주사기로 옮겨 실리지 펌프에 장착하였다.

[0039] 이후 실리지 펌프를 2 ~ 3 ml/min으로 고정하여 주사기 내의 혼합된 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘용액을 사출하여 즉시 액체질소 내에 침지시켜 구형의 형태로 급속냉동하여 이식재를 성형하였다. 이후 액체질소에 10분 이상 침지시킨 구형의 이식재를 80℃로 고정된 동결건조기에서 24시간 동안 동결건조 공정을 수행하여 이식재 내부에 흡수된 액체질소와 수분이 이식재 외부로 배출을 시켰다.

[0040] 도 3는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재 제조 시 액체질소 침지 후 동결건조를 통한 내·외부표면화처리를 검증하기 위한 전자현미경 사진이다.

[0041] 도 3를 참조하면, 합성된 이식재의 전자현미경적 이식재 내·외부 표면화 처리결과에서 보는 바와 같이 액체질소 침지 후 동결건조되는 과정에서 이식재 외부표면을 거칠게 하여 표면 마찰력을 증가시켜 구형형태의 이식재 이식 후 발생될 수 있는 이식재의 골이식부위 이탈률을 현저히 감소시켰다.

[0042] 뿐만 아니라 동결건조 공정을 수행하여 이식재 내부에 흡수된 액체질소와 수분이 이식재 외부로 배출되는 과정에서 이식재 내부에 미세기공을 형성시킴으로써 이식 후 골세포가 안착될 수 있는 내·외부 표면을 극대화시킬 뿐만 아니라 수분흡수도 및 안정적인 생체 내 물질 교환이 이루어지게 하여 골유도능을 증진시킬 수 있었다.

[0043] 제 2단계(S120)의 이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 단계를 시행 후 제 3단계(S130)의 소결단계를 시행하였다. 제 2단계(S120)의 이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 단계을 시행 후 회수된 이식재는 소결로를 활용하여 1230℃까지 1시간에 100℃씩 승온시킨 후 2시간 동안 소결하였다.

[0044] 이후 소결 후 급속한 냉각으로 인한 이식재 균열을 방지하기 위하여 1시간에 100℃씩 단계적으로 냉각하여 소결로 온도가 30~60℃에 도달 시 합성된 이식재를 회수하였다.

[0045] 특히 본 실시예에서는 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘으로 구성된 이상인산칼슘계열의 합성골 이식재 합성공정 시 1234℃ 이상의 소결온도에서 소결되는 경우 베타-제3인산칼슘이 알파-제3인산칼슘으로 전환될 수 있기 때문에 본 실시예에서 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정을 실시하였다.

[0046] 도 4는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조 시 소결온도과정 중 발생될 수 있는 세라믹 변성 유무를 X-Ray Diffraction (XRD)에 의해 분석한 결과이다.

[0047] 도 4를 참조하면, 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정 후 회수된 합성골 이식재를 대상으로 X-ray diffraction (XRD) 분석을 시행한 결과 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재에서 모두 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘에서 나타나는 고유 피크포지션이 확인되었으며, 부수적인 피크포지션이 확인되지 않음에 따라 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정에 의한 부수적인 세라믹 산화물이 합성되지 않음을 확인 할 수 있었다.

[0048] 도 5는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조 시 소결온도과정 중 발생될 수 있는 세라믹 변성 유무를 Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy (FT-IR)에 의해 분석한 결과이다.

[0049] 도 5를 참조하면, 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정 후 회수된 합성골 이식재를 대상으로 Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) 분석을 시행한 결과에서도 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재에서 모두 수산화인회석 및

베타-제3인산칼슘에서 나타나는 고유 피크포지션이 확인되었으며, 부수적인 피크포지션이 확인되지 않음에 따라 1230℃의 소결온도 조건에서 2시간 소결공정에 의한 부수적인 세라믹 산화물이 합성되지 않음을 확인 할 수 있었다.

[0050] 도 6는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생체골과의 유사도를 분석하기 위한 방법으로써 Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDS) 분석을 통한 칼슘 및 인의 비율을 분석한 결과이다.

[0051] 도 6를 참조하면, 생체골과 유사도를 분석하기 위해 칼슘 (Calcium, Ca) : 인 (Phosphate, P)의 비율을 Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) 분석을 시행한 결과 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재의 칼슘/인 비율은 각각 1.79, 1.91 및 1.64로 확인됨에 따라 인체골의 칼슘/인 비율인 1.67과 비교 시 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 4:6으로 배합하여 합성한 합성골 이식재가 가장 유사하였다.

[0052] 제 3단계(S130)의 소결단계 수행 후 제 4단계(S140) 이식재 크기 균일화 단계를 수행하였다. 200 μm이상 500 μm의 구형 이식재가 골형성 유도에 적합한 공극간극을 유지하기 때문에 제 3단계(S130)의 소결단계 후 회수된 이식재를 Diameter sieve를 활용하여 도 3에서와 같이 직경 200 μm이상 500 μm의 구형 이식재를 분리 회수하였다.

[0053] 제 4단계(S140)의 이식재 크기 균일화 단계 후 제 5단계(S150)의 이식재 세척 및 건조 단계를 수행하였다. 이는 합성공정 시 형성된 이식재 표면에 과량으로 존재하는 칼슘이온은 이식 후 조직 내에 세포괴사를 유도할 수 있다. 따라서 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재 0.1g을 1 ml의 무혈청배지에 침지하여 37℃에서 72시간 용출하여 1차 용출물을 준비하였으며, 1차 용출 후 동일 조건에서 2차 및 3차 용출을 시행하였다. 이후 각각 회수된 용출물을 정상구강각화세포 및 MG-63조골 세포를 대상으로 세포독성분석을 MTT 분석법 및 Cell live & Dead 염색법을 수행하였다.

[0054] 도 7는 초대배양 정상 구강각화세포 (Primary normal human oral keratinocyte) 및 MG-63 조골세포를 대상으로 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생물학적 안전성을 분석하기 위하여 세포독성을 MTT 분석법에 따라 시행한 결과이다.

[0055] 도 7을 참조하면, 정상각화세포 및 MG-63조골세포에 용출물을 투여하여 24시간 동안 배양시킨 후 실시한 MTT 세포독성분석결과 합성된 이식재의 용출을 통한 세척단계가 증가됨에 따라 정강구강각화세포 및 MG-63 세포의 세포생존율이 증가됨을 확인하였다.

[0056] 도 8은 MG-63 조골세포를 대상으로 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 세포부착능 및 생물학적 안전성을 분석하기 위하여 DAPI를 사용한 핵염색 및 Cell live dead assay를 수행하여 시각화한 결과이다.

[0057] 도 8를 참조하면, 3차 용출 후 회수된 합성골 이식재에 MG-63 조골세포 배양하여 합성골 이식재 표면에 부착된 세포를 DAPI 핵염색을 수행하여 분석한 결과 높은 수준의 세포부착력을 확인하였을 뿐만 아니라 부착 후 Cell live & Dead 분석을 수행하여 분석한 결과 생존세포의 세포막을 투과하여 세포질에 존재하는 에스터레이즈 (Esterase)에 분해되어 녹색의 형광색을 발생하는 Green calcein AM에 염색된 생존세포가 확인됨에 따라 우수한 세포생존율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0058] 반면 도 8의 a 및 b에서 나타난 바와 같이 죽어있는 세포의 경우 세포막에 형성된 결손부위를 따라 핵 내에 존재하여 염색체 사이에 위치되어지는 Etidium homodimer-1에 의해 붉은 형광색을 나타내는 죽은 세포의 수를 분석한 결과 모든 이식재에서 유의적인 차이 없이 높은 수준의 세포생존율을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

[0059] 그러나 특히 수산화인회석 : 베타-제3인산칼슘이 6:4로 배합된 합성골 이식재에서 가장 높은 수준의 세포생존율을 나타내었다. 따라서 이러한 결과를 기초로 하여 합성된 이식재를 멸균수를 사용하여 37℃에서 60분씩 3회 반복하여 이식재를 회수한 후 50℃로 내부온도가 조절된 건조기를 활용하여 24시간 완전건조 실시하게 되었다.

[0060] 도 9는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 합성골이식재에 대한 생체적합성을 분석하기 위하여 각각의 합성된 이식재를 대상으로 용출하여 이에 대한 pH를 분석한 결과이다.

[0061] 도 9을 참조하면, 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재 0.1g을 1 ml의 무혈청배지에 침지하여 37℃에서 72시간 용출시킨 3차 용출물을 대

상으로 물리화학적 특성분석의 일환으로 pH를 분석한 결과 모두 각각의 배합비율로 합성된 이식재는 pH7로 생체 조건과 유사한 pH를 나타내었다.

[0062] 제 5단계(S150)의 이식재 세척 및 건조 단계 후 제 6단계(S160)의 이식을 위한 멸균단계를 수행하였다. 제 5단계(S150)의 이식재 세척 및 건조단계 후 회수된 이식재를 0.5g으로 단위포장한 후 에틸렌옥사이드 가스 멸균 수행하였다.

[0063] 제 6단계(S160)에서 이식을 위한 멸균공정 후 생체 내 효능 분석 및 생체 안전성을 분석하기 위하여 실험동물인 렛트를 마취시킨 후 두개골에 직경 8 ㎜ 골결손을 생성하였다. 이후 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 각각 6:4, 5:5 및 4:6의 배합비율에 따라 합성된 각각의 합성골 이식재 0.5g을 이식시킨 후 이식재 이탈을 방지하기 위하여 차단막으로 골결손부위를 봉합하여 8주 후 두개골을 적출하여 조직학적 및 방사선 계측학적 분석을 시행하였다.

[0064] 도 10는 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 각각의 합성골이식재를 두개골에 8㎜ 골결손을 유도한 실험용 렛트에 이식 8주 후 방사선 계측학적 분석 결과이다.

[0065] 도 10를 참조하면, Micro computed tomography (micro-CT)에 의한 방사선 계측학적 분석을 시행한 결과 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4의 비율로 배합하여 합성한 합성골 이식재에서 가장 우수한 골재생효능을 확인할 수 있었다.

[0066] 반면, 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 5:5 및 4:6의 비율로 배합하여 합성한 합성골 이식재는 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4의 비율로 배합하여 합성한 합성골 이식재에 비하여 높은 생체 흡수율을 나타내었다. 이는 베타-제3인산칼슘의 단점으로 지적되고 있는 높은 생체 흡수율로 기인된 결과로 베타-제3인산칼슘 비율이 높아질수록 생체흡수도가 빨라짐에 따라 골재생을 위한 효과적인 지지체로써 역할이 상대적으로 낮을 수 있을 제시하고 있다.

[0067] 도 11은 전복패각 유래 바이오세라믹 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘의 배합비율을 각각 6:4, 5:5, 및 4:6으로 제조된 각각의 합성골이식재를 두개골에 8㎜ 골결손을 유도한 실험용 렛트에 이식 8주 후 조직학적 분석 결과이다.

[0068] 도 11을 참조하면, 조직학적 분석을 시행한 결과에서도 도 10의 방사선 계측학적 분석결과와 동일하게 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4의 비율로 배합하여 합성한 합성골 이식재에서 가장 우수한 골재생효능을 확인할 수 있었다.

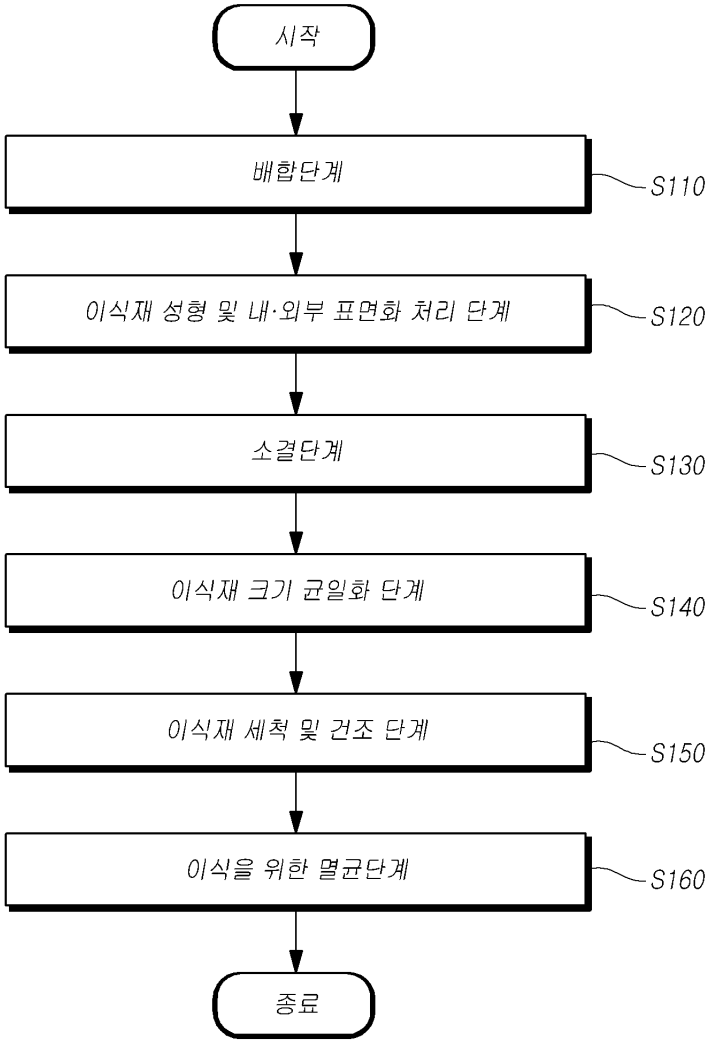
[0069] 따라서 전술한 바와 같이, 전복패각 유래 수산화인회석 및 베타-제3인산칼슘을 6:4의 비율로 배합하여 합성한 합성골 이식재가 높은 생물학적 안전성, 생체안전성 및 우수한 골형성능을 가지고 있음을 확인하였다.

[0070] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

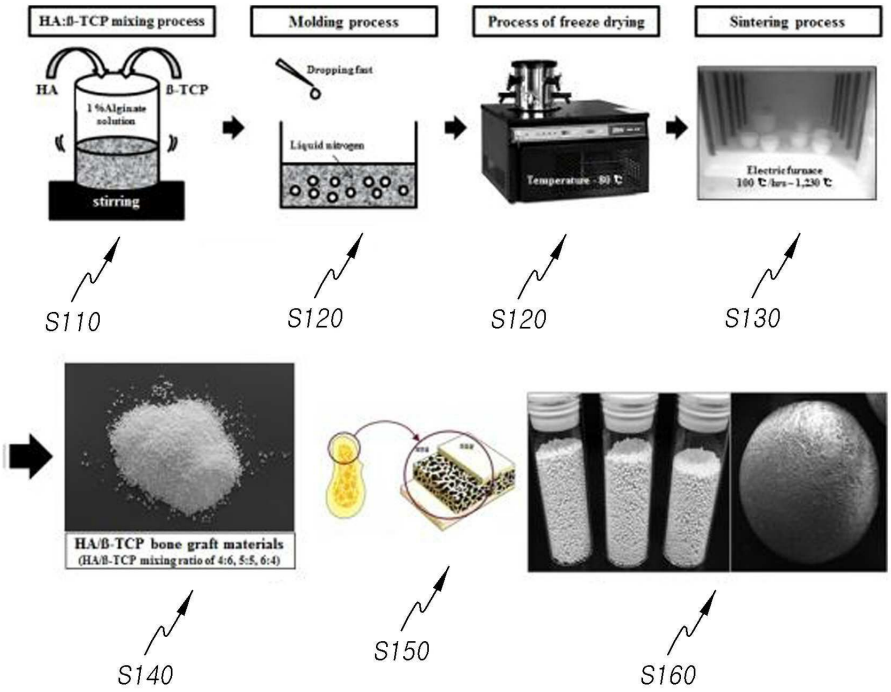
도면

도면1

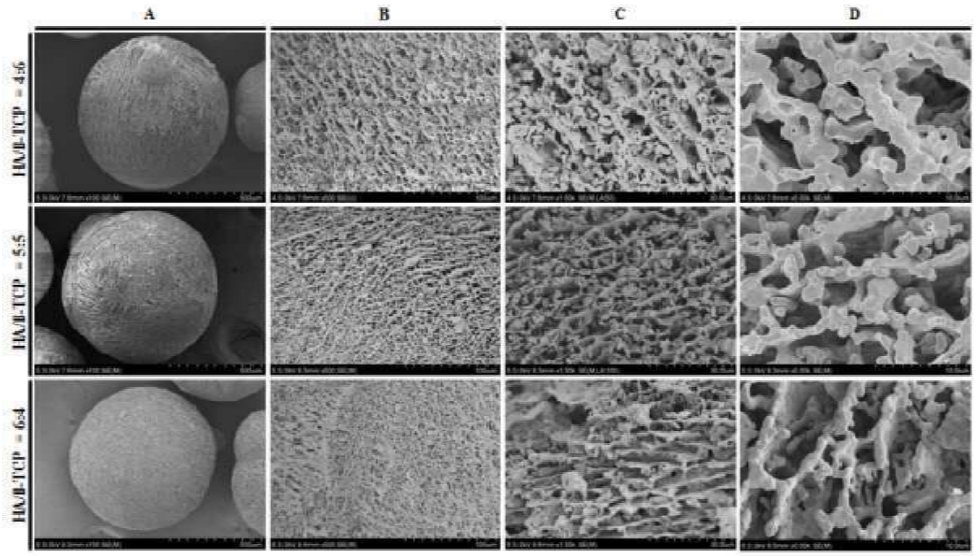
100


시작
배합단계
S110
이식재 성형 및 내·외부 표면화 처리 단계
S120
소결단계
S130
이식재 크기 균일화 단계
S140
이식재 세척 및 건조 단계
S150
이식을 위한 멸균단계
S160
종료

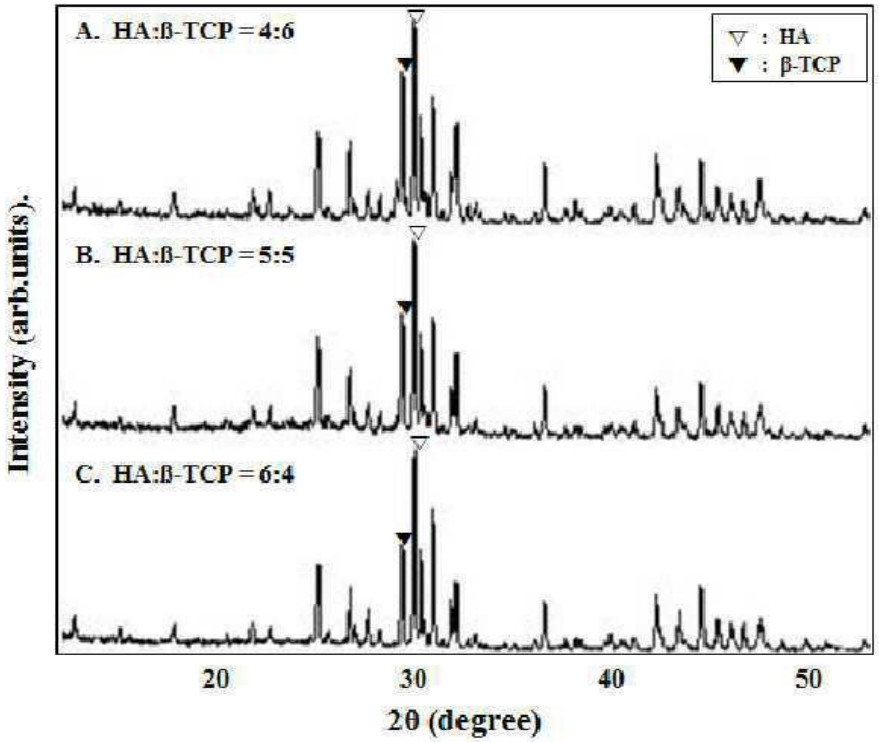
도면2


100
HA:ß-TCP mixing process
Molding process
Process of freeze drying
Sintering process
HA
ß-TCP
1 %Alginate solution
stirring
Dropping fast
Liquid nitrogen
Temperature : -80 ℃
Electric furnace
100 ℃/hrs~1,230 ℃
S110
S120
S120
S130
HA/ß-TCP bone graft materials
(HA/ß-TCP mixing ratio of 4:6, 5:5, 6:4)
S140
S150
S160

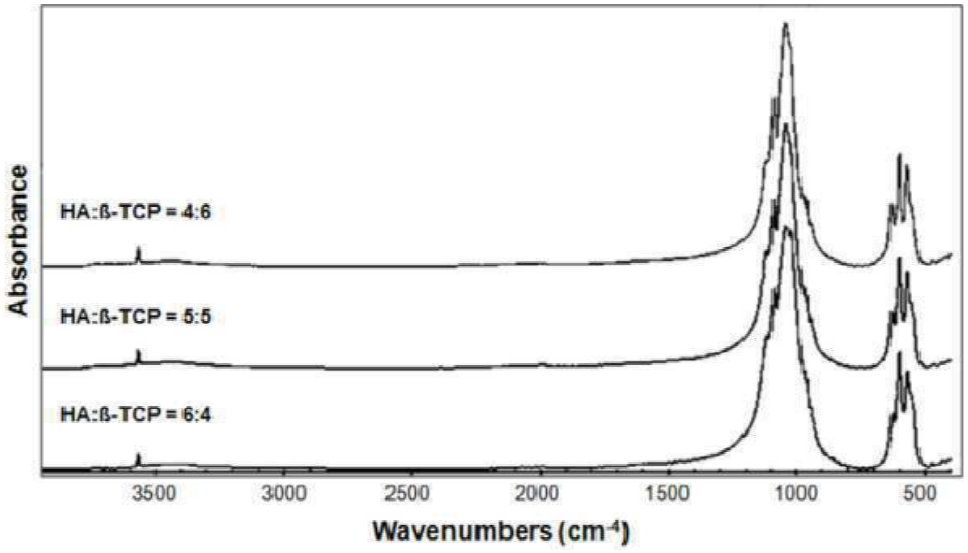
도면3


A
B
C
D
HA/ß-TCP = 4:6
HA/ß-TCP = 5:5
HA/ß-TCP = 6:4

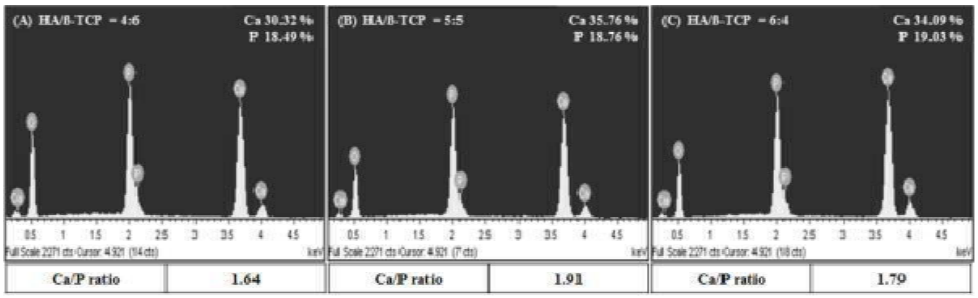
도면4


A. HA:ß-TCP = 4:6
▽ : HA
▼ : β-TCP
B. HA:ß-TCP = 5:5
C. HA:ß-TCP = 6:4
Intensity (arb.units).
20
30
40
50
2θ (degree)

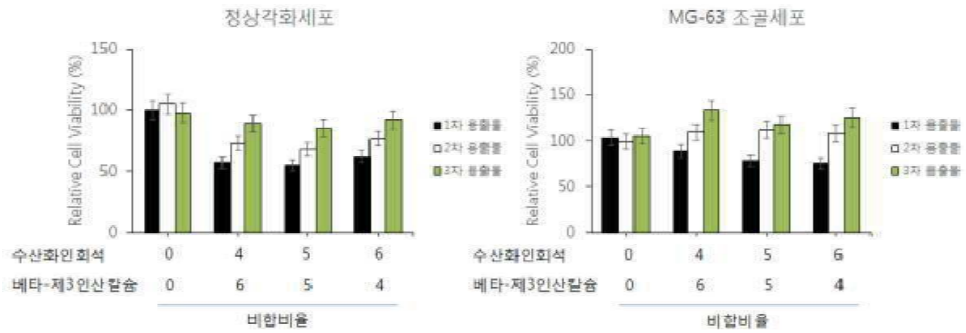
도면5


Absorbance
HA:ß-TCP = 4:6
HA:ß-TCP = 5:5
HA:ß-TCP = 6:4
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumbers (cm-1)

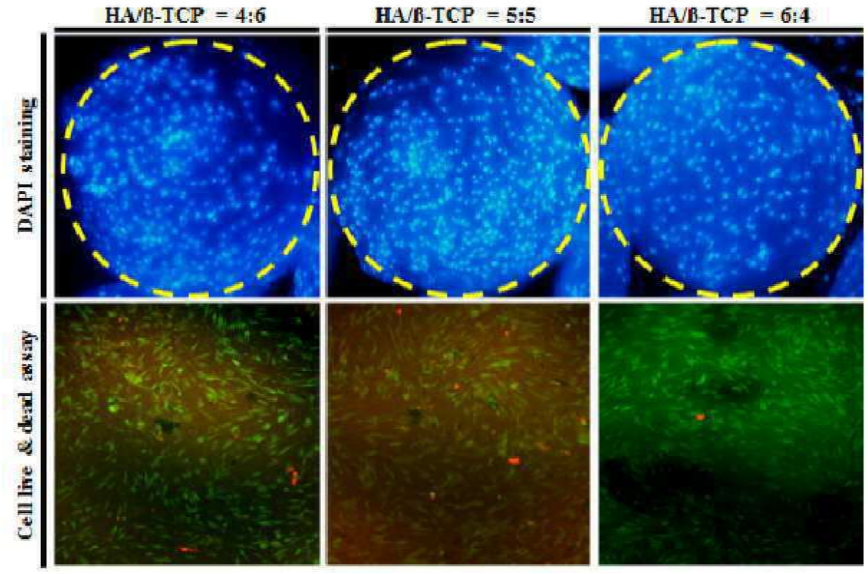
도면6


(A) HA/ß-TCP = 4:6
Ca 30.32 %
P 18.49 %
(B) HA/ß-TCP = 5:5
Ca 35.76 %
P 18.76 %
(C) HA/ß-TCP = 6:4
Ca 34.09 %
P 19.03 %
Ca/P ratio
1.64
Ca/P ratio
1.91
Ca/P ratio
1.79

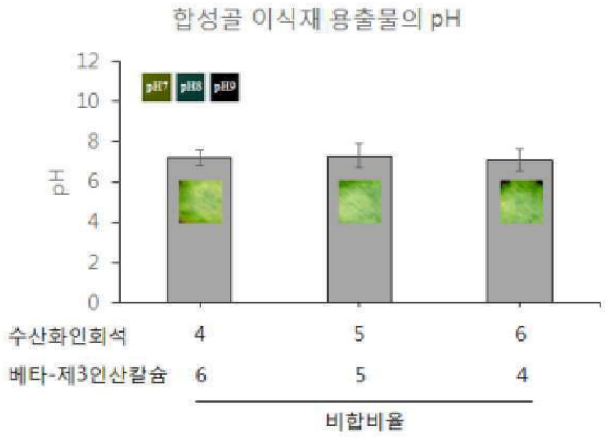
도면7


정상각화세포
MG-63 조골세포
Relative Cell Viability (%)
수산화인회석
베타-제3인산칼슘
비합비율

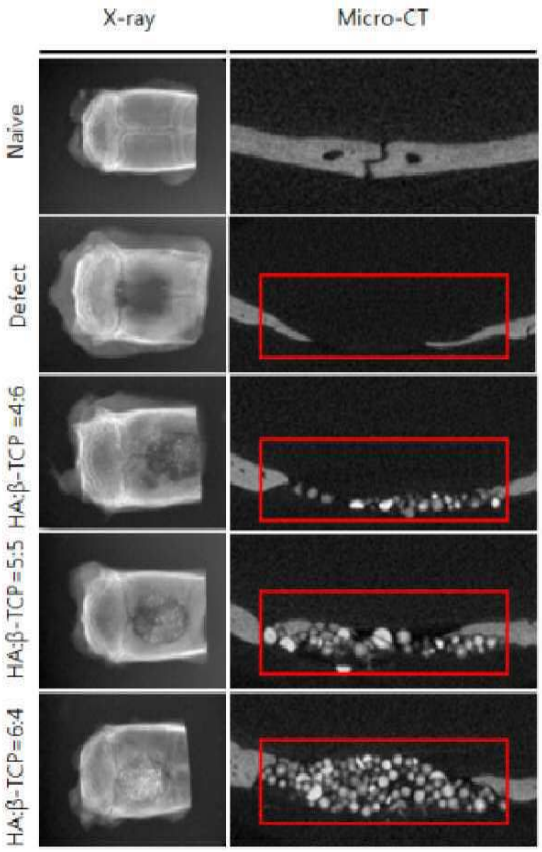
도면8


HA/ß-TCP = 4:6
HA/ß-TCP = 5:5
HA/ß-TCP = 6:4
DAPI staining
Cell live & dead assay

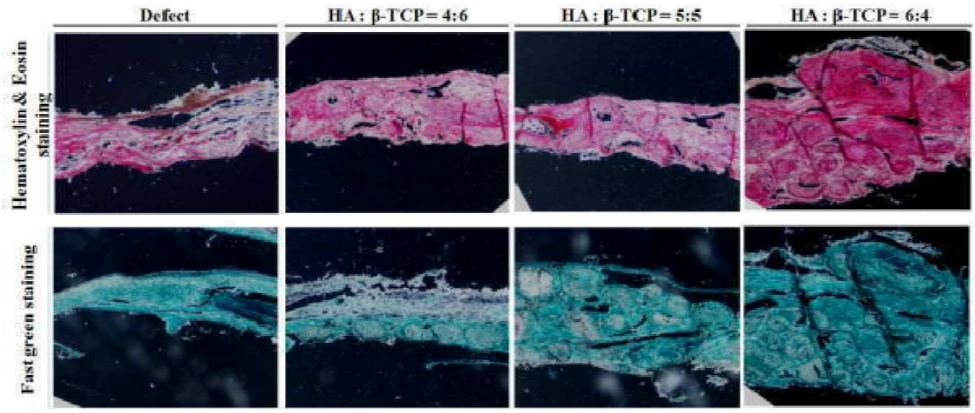
도면9


합성골 이식재 용출물의 pH
12
10
8
6
4
2
0
pH
수산화인회석 4 5 6
베타-제3인산칼슘 6 5 4
비합비율

도면10


X-ray
Micro-CT
Naive
Defect
HA:β-TCP =4:6
HA:β-TCP=5:5
HA:β-TCP=6:4

도면11


Defect
HA : β-TCP= 4:6
HA : β-TCP= 5:5
HA : β-TCP= 6:4
Hematoxylin & Eosin staining
Fast green staining