

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0102354 (43) 공개일자 2014년08월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01) A61L 27/10 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(21) 출원번호 10-2013-0015021	(72) 발명자 고영학 서울 성북구 길음로13길 39, 222동 1603호 (길음동, 길음뉴타운)	
(22) 출원일자 2013년02월12일 심사청구일자 2013년02월12일	조인환 서울 성북구 보국문로 19, 104동 503호 (정릉동, 정릉푸르지오아파트) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인다나	

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체의 제조방법 및 그에 의해 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합지지체**

(57) 요약

본 발명은 나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체의 제조방법 및 그에 의해 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법에 의해 생체 친화도, 기계적 물성 및 조직재생효과가 향상된 지지체를 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법은 열유도 상분리법을 이용함으로써 친환경적이며 안전하며 경제적으로 지지체를 제조하는 것이 가능하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

보레이

서울특별시 성북구 정릉3동 산 1번지 고려대학교
보건과학대학

송해룡

서울 구로구 신도림로 87, 105동 102호 (신도림동,
신도림1차동아아파트)

김정은

서울 강서구 강서로12길 51-13, 401호 (화곡동, 주
얼리맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A11041612120000400

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 [2차년도]골형성 단백질 탑재기술 향상을 위한 융합소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.04.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물을 동결하여 열유도 상분리를 수행하고, 용매변환 및 동결건조하는 것을 포함하는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 생체고분자 용액은 생체고분자 및 용매의 혼합물; 또는 생체고분자, 용매 및 비용매의 혼합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 용매는 물이고 비용매는 순수 알코올인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서 용매와 비용매가 함께 사용되는 경우 용매와 비용매의 비율이 1:0.5 내지 1: 1인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 생체활성유리 용액은 칼슘 및/또는 인을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 생체고분자는 콜라겐, 키토산, 젤라틴 또는 이들의 혼합물인 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 생체활성유리는 테트라메틸 오르토실리케이트 또는 테트라에틸 오르토실리케이트인 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체는 생체활성유리를 총 중량의 10 내지 30 중량 % 로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합은 35 내지 50 ℃에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 열유도 상분리는 -60 내지 -75 ℃에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 용매변환은 -15 내지 -25 ℃에서 순수 알코올에 침적시킨 후 아세톤에 침적시킴으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 용매변환은 -15 내지 -25 ℃에서 순수 알코올에 침적시킨 후 테트라하이드로퓨란에 침적시킴으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 동결건조는 0 내지 -10 ℃에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조되는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체의 제조방법 및 그에 의해 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 다양한 의료분야 및 뼈 조직공학 분야에서 손상되었거나 기능을 상실한 환자 자신의 조직이나 장기에서 세포를 일부 채취하여 생체 적합성 고분자 지지체를 이용해 체외에서 배양한 다음 체내의 원래 위치에 이식하여 조직이나 장기를 복원, 재생 또는 대체하는 조직공학이 크게 각광을 받고 있다. 생체 조직공학(Tissue Engineering)이란 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양을 통하여 필요한 양만큼 증식시키고 다공성을 가지는 생분해성 고분자 지지체에 심어 일정기간 체외 배양함으로써 형성되는 세포 배양 지지체(scaffold)를 다시 인체 내에 이식하는 것이다. 이식 후 세포들은 대부분의 조직이나 장기의 경우 신생 혈관이 형성될 때까지는 체액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받다가 인체 내의 혈관이 들어와 혈액의 공급이 이루어지면 세포들이 증식 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 생분해성 고분자 지지체는 그동안 분해되어 사라지게 된다. 이렇듯 생분해성 합성 고분자는 우수한 생체적합성과 체내에서 자연스럽게 분해되는 성질이 있어 뼈 조직공학 분야에서 지지체를 만드는데 다양하게 사용되는 소재이나 낮은 강성도(Stiffness), 제한된 생체활성도 및 소수성 등 때문에 지지체로서의 이용에 한계가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 따라서, 본 출원인은 종래의 생분해성 고분자의 단점을 보완하기 위해 유기물/무기물 복합체, 즉 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체를 제조하여 생체고분자 단일재료 지지체에 비해 생분해성을 증진시키고 물과의 친화도

를 증가 시키며 기계적 물성 또한 향상시킨 생체고분자/생체활성 유리 복합 지지체의 제조방법 및 그에 의해 제조된 지지체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0004] 이에 본 발명자들은 종래의 생분해성 고분자의 단점을 보완하여 기계적 물성 및 생분해성이 향상된 지지체를 제조하기 위한 방법을 개발하고자 연구하였다. 그 결과, 열유도 상분리법에 의해 생체고분자/생체활성유리를 복합 화합으로써 생체 친화성을 높이면서, 조직재생능력도 향상된 지지체를 제조할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0005] 따라서 본 발명은 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물을 동결하여 열유도 상분리를 수행하고, 용매 변환 및 동결건조하는 것을 포함하는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [0006] 생체고분자란 유기체에 의해 생산되는 고분자 화합물을 의미하는 것으로 생체고분자 용액은 생체고분자와 용매를 혼합하거나, 생체고분자, 용매 및 비용매를 혼합하여 제조할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 생체고분자는 콜라겐, 키토산, 젤라틴 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 또한, 용매로는 물을 비용매로는 순수 에탄올, 순수 메탄올, 순수 부탄올 등의 순수 알코올을 사용할 수 있다. 함유되는 용매 및 비용매의 비율에 따라 나노섬유형 지지체의 공극의 크기, 공극률 또는 모양이 결정된다. 따라서 제조과정 중에 용매 및 비용매의 비율이 달라지는 경우 지지체의 형태 등의 특성이 달라질 수 있으므로 용매와 비용매를 혼합하여 사용할 경우에는 용매 및 비용매의 비율을 일정하게 유지하는 것이 중요하다. 비용매로 사용되는 알코올에 물이 함유되어 있는 경우 용매 및 비용매의 비율이 변할 수 있기 때문에 비용매로는 순수 알코올을 사용한다. 특히, 지지체의 공극률은 생체고분자 또는 하기 기술된 생체활성 유리의 함량과는 관계없이 용매 및 비용매의 비율에 따라 결정된다. 본 발명의 한 구체예에서, 용매 및 비용매의 비율은 1:0.5 내지 1: 1일 수 있다. 예를 들어, 에탄올이 50 wt% 함유된 물-에탄올 혼합액을 사용하여 복합 지지체를 제조할 수 있다.
- [0007] 생체활성유리란 유리-세라믹 생체재료(biomaterial)를 의미하는 것으로 생체활성유리는 생체적합성 때문에 조직 재생을 위한 임플란트, 지지체로 널리 이용된다. 생체활성유리는 졸-겔(sol-gel)법을 이용하여 합성할 수 있으며 이는 업계에서 잘 알려져 있다. 생체활성유리 용액은 액상의 생체활성유리와 촉매, 용매 등을 포함하며 본 발명의 한 구체예에서 생체활성유리 용액은 칼슘, 인 또는 이들의 혼합물을 더 포함할 수 있다. 칼슘 성분과 인 성분을 포함함으로써 인체 골조직과 지지체간에 화학적 유사성을 갖도록 할 수 있다. 생체활성유리 용액은 생체활성유리, 촉매, 용매, 칼슘 및 인을 혼합하여 전자교반하여 제조할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 생체활성유리는 테트라알킬 오르토실리케이트일 수 있다. 예를 들어, 테트라에틸 오르토실리케이트(TEOS) 또는 테트라메틸 오르토실리케이트일 수 있다. 또한 용매는 물, 촉매는 염산, 칼슘클로라이드 및 트리에틸포스페이트(TEP)를 사용할 수 있다.
- [0008] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다(도 1). 제조된 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액을 혼합하여 복합화한다. 본 발명의 한 구체예에서 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합은 35 내지 50 °C에서 이루어질 수 있다. 본 발명의 실시예에서 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액으로 사용된 젤라틴 용액 및 실리카졸은 유사하게 친수성 성질을 갖고 있어 간단하게 전자교반하여 균일하게 혼합할 수 있다. 이러한 친수성 성질로 인하여 물과의 친화도가 증가된 지지체를 제조할 수 있다. 또한 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체를 제조함으로써 생체고분자 단일재료 지지체에 비해 생분해성을 증진시킬 수 있고 친수성을 향상시켜 물과의 친화도를 증가시킬 수 있으며 기계적 물성 또한 향상된 지지체를 제조할 수 있다.
- [0009] 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액을 혼합할 때 생체활성유리의 비율을 조절할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체는 생체활성유리를 총 중량의 10 내지 30 wt% 로 포함할 수 있다. 생체활성유리의 함량을 조절함으로써 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 생물학적 분해속도를 조절할 수 있다. 예를 들어, 젤라틴/실리카 복합 지지체의 경우 실리카 함량을 높임으로써 실리카 내의 실리카 하이드록실기(Si-OH)와 젤라틴 폴리머 내의 아미노기가 정전결합 및 수소결합을 통하여 상호작용을 하여 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 생물학적 분해속도를 감소시킬 수 있다.
- [0010] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조에 있어서 열유도 상분리법을 적용함으로써 조직 재생능이 향상된 지지체를 제조할 수 있다. 열유도 상분리법을 적용하기 위해 제조된 생체고분자 용액 및 생체활성유리 용액의 복합화 용액을 폴리에틸렌 주형에 부어 -60 내지 -75°C의 에탄올 수조에 담가 동결시킨다. 본

발명의 한 구체예에서 열유도 상분리법으로 젤라틴-실리카가 풍부한 상 및 에탄올-물 혼합액이 풍부한 상 사이에 상분리를 유도하였다. 열유도 상분리법을 적용함으로써 세포외기질(ECM) 및 생체 모방형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조가 가능하다. 세포외기질을 모방하여 세포외기질 구조가 갖는 장점인 세포의 부착, 성장, 이동, 분화 등을 유도해 새로운 세포형성을 촉진하는 지지체를 제조할 수 있고 이에 따라 구조적으로 효과적인 조직 재생을 유도할 수 있는 다공성 지지체를 제조할 수 있다.

[0011] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조에 있어서 용매변환 과정을 거침으로써 안정한 지지체를 제조할 수 있다. 용매변환에 사용되는 제1용매 및 제2용매는 용해도에 있어 차이가 있는 것을 사용하면 된다. 통상의 기술자는 용매 변환을 위하여 용해도가 상이한 적절한 용매를 선택하여 사용할 수 있으며 이는 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 용매변환을 위해 동결된 생체고분자/생체활성유리 복합화 물질을 폴리에틸렌 주형에서 꺼내어 -15 내지 -25℃의 순수 알코올에 약 12시간 내지 약 24시간 동안 침적시킨 후 -15 내지 -25℃의 아세톤에 약 12시간 내지 약 24시간 동안 침적시킨다. 이때, 아세톤 대신 테트라하이드로퓨란을 사용할 수 있다. 용매변환 과정을 통하여 본 발명의 지지체에 기공구조를 도입하여 나노 섬유형 다공성 지지체의 제조를 가능하게 한다. 용매변환 후 남아있는 액체상을 완전히 제거하기 위해 다시 0 내지 -10℃에서 동결 건조시켜 안정화시켜 지지체를 완성한다.

[0012] 본 발명에 따른 제조방법에서는 용매로 물, 비용매로 순수 에탄올, 메탄올, 부탄올 등의 알코올을 사용하고 용매 변환과정으로 알코올, 아세톤 또는 테트라하이드로퓨란을 사용함으로써 친환경적이며 안전하고 경제적인 공정으로 지지체를 제조할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체를 제공한다. 본 발명에 따라 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체는 도 2에 도시한 바와같이, 견고한 나노섬유형 구조를 가지며 80 내지 90 vol%의 공극률은 갖는다. 또한 도 4에 도시한 바와 같이 젤라틴-실리카 혼합물을 사용하고 젤라틴 나노섬유 내에 견고하고 균질하게 실리카 상이 분배됨으로써 본 발명에 따라 제조된 지지체는 기계적 물성이 향상되었음을 알 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법에 의해 생체 친화도, 기계적 물성 및 조직재생효과가 향상된 지지체를 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 생체고분자/생체활성유리 복합 지지체의 제조방법은 열유도 상분리법을 이용함으로써 친환경적이며 안전하며 경제적으로 지지체를 제조하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 생체고분자/생체활성유리 복합체 나노섬유 지지체의 제조과정을 나타내는 개략도이다.

도 2는 실시예에 의해 제조된 생체고분자/생체활성유리 복합체 나노섬유 지지체의 전형적인 주사 현미경(SEM) 사진 및 지지체의 나노섬유 구조를 나타낸 사진이다(실리카 함량이 A, D: 0 wt%, B, E: 10 wt% C, F: 30 wt%).

도 3은 실시예 및 비교예에 의해 제조된 순수 생체고분자 나노섬유 지지체(A) 및 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체(B)의 화학적 조성 및 구조를 나타내는 EDS 그래프 및 맵핑 기술을 이용한 Si(C) 및 Ca(D)원소의 분포도이다.

도 4는 순수 생체고분자 나노섬유 지지체(A), 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체(B, C, D)의 화학적 조성 및 구조를 나타내는 FT-IR 스펙트럼이다.

도 5는 순수 생체고분자 나노섬유 지지체(A), 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체(B, C)의 기계적 물성을 나타내는 압축 응력 변형(Compressive stress-strain) 이다.

도 6은 순수 젤라틴 나노섬유 지지체(A), 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체(B)의 생체분해성을 질량감소율로 나타낸 그래프이다.

도 7은 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체의 생체활성유리의 생체분해도를 누적하여 나타낸 그래프이다(A). B는 A의 자료를 1차 함수로 나타내어 생체활성유리의 용출을 정량하였으며 C는 생체활성유리가 용출

된 용액의 생체활성유리의 농도를 나타낸 막대그래프이다.

도 8은 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체를 하루동안 SBF 용액에 침적시킨 후의 SEM 사진(A, B), 화학적 구조를 나타내는 ATR-FTIR 스펙트럼(C) 및 화학적 조성을 나타내는 EDS 스펙트럼(D)이다.

도9는 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체의 생체 친화성을 평가하기 위한 세포실험 수행 후의 1일간 세포 배양한 경우(A, B) 및 3일간 세포 배양한 경우(C, D)의 CLSM(confocal laser scanning microscope) 사진이다.

도10은 순수 생체고분자 나노섬유 지지체(A), 생체고분자/생체활성유리 복합 나노섬유 지지체(B, C)의 밀도, 기공도, 압축응력에 대한 탄성계수를 정리한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 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.

<실시예>

제조예: 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 제조

명시적으로 별도의 기재가 없는 한 모든 시약은 Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 실리카 졸은 B. Lei, X. Chen, Y. Wang, N. Zhao, C. Du 및 L. Fang, J. Non-Cryst. Solids, 2009, 355, 2678에 기재된 것과 유사한 방법으로 제조하여 준비하였다. 요약하면, 테트라에틸 오르토실리케이트 (TEOS), 트리에틸포스페이트(TEP) 및 칼슘 클로라이드 (CC)를 두 시간 동안 전자교반(magnetic stirring)하여 1N 염산 수용액에 용해시켜 60% SiO₂, 36% CaO 및 4% P₂O₅의 조성을 갖는 조성물을 얻었다. 이와는 별도로, 1 g의 젤라틴 입자(GLA, 소로부터 추출한 type B)를 40 °C에서 1 시간 동안 전자교반하여 10 mL의 물-에탄올 혼합액(부피비 1:1)에 용해시켜 젤라틴 용액을 준비하였다. 이때 물은 용매로, 순수 에탄올은 비용매로 사용되었다.

그리고 나서, 다양한 양의 실리카(젤라틴에 대하여 0 wt%, 10 wt%, 20 wt% 및 30 wt%)가 함유된 복합 지지체를 제조하기 위하여 미리 정해놓은 양의 실리카 졸을 40 °C에서 1 시간 동안 전자교반하여 젤라틴 용액에 균일하게 혼합하였다. 혼합액을 직경 5 mm인 폴리에틸렌 주형에 붓고 나서 즉시 -70 °C의 에탄올 수조에 담가 4 시간 동안 냉동시켰다.

냉동된 샘플을 주형으로부터 분리하고 -20 °C의 순수 에탄올 수조에 담근 후 용매변환을 위해서 아세톤에 24 시간 동안 침적시켰다. 그리고 나서, 샘플을 -70 °C에서 냉동시키고 3일 동안 동결 건조시켰다. 제조된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체를 72 시간 동안 진공 상태에서 건조하고 추가의 실험을 위하여 진공상태에서 보관하였다.

도 1은 열유도 상분리법(TIPS)에 의한 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체를 제조하기 위한 실험과정을 나타낸 것으로 젤라틴 용액 및 졸-겔 프로세스로 유도된 실리카 졸의 혼합액을 이용하여 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체를 제조하였다. 젤라틴 용액 및 실리카 졸은 유사하게 친수성 성질을 갖고 있어 간단한 전자교반에 의해 그들을 균일하게 혼합할 수 있고 이에 따라 분자 수준에서 젤라틴과 실리카 상을 복합화할 수 있었다. 그리고 나서 혼합물을 -70 °C의 매우 낮은 온도에서 동결하여 젤라틴-실리카가 풍부한 상 및 에탄올-물 혼합액이 풍부한 상 사이에 상분리를 유도하였다. 냉동된 샘플을 용매변환을 위해 아세톤에 담그고 난 후, 남아있는 액체 상을 완전히 제거하기 위해 동결건조 하였다. 이 간단한 공정으로 분자 수준에서 젤라틴 및 실리카 상을 포함하는 나노섬유형 구조물을 제조할 수 있다.

<실험예>

실험예 1: 복합 지지체의 물리화학적 구조 분석

1.1. 공극률

[0026] 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 공극률(P)을 겉보기밀도(P_a) 및 골격밀도(P_s)를 고려하여 다음과 같이 계산하였다:

$$P = 1 - (P_a / P_s) \quad (1)$$

[0028] 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 겉보기밀도(P_a)를 질량 (m) 및 부피(V)를 측정하여 계산하였다 (즉, $P = m/V$). 골격밀도(P_s) 또한 젤라틴 ($P_G = 1.35 \text{ g/cm}^3$) 및 실리카 ($P_s = 2.65 \text{ g/cm}^3$)의 이론상 밀도를 고려하여 다음과 같이 계산하였다:

$$P_s = X_{GPG} + X_{SPs} \quad (2)$$

[0030] 여기에서 X_G 및 X_s 는 젤라틴 및 실리카 각각의 부피 분율을 나타낸다.

[0031] 1.2. 모폴로지 분석

[0032] 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 모폴로지(morphologie) 및 미세구조는 FE-SEM(전계방사형 주사전자현미경) (JSM6701F, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. SEM(주사전자현미경) 관찰에 앞서, 모든 복합 지지체를 32 mTorr 압력에서, 150 초 동안 스퍼터 코팅기를 이용하여 Pt의 얇은 층으로 코팅하였다. 도 2(A)-(F)는 다양한 농도의 실리카가 함유된(A, D: 0 wt%, B, E: 10 wt%, 및 C, F: 30 wt%) 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 전형적인 모폴로지 및 마이크로구조를 나타낸다. 실리카 함량에 관계없이, 모든 제조된 복합 지지체는 견고한 나노섬유형 구조(도 2(A)-(C))를 가졌다. 게다가, 제조된 나노파이버는 어느 것에서도 실리카 상이 나타나지 않았는데(도 2(E) 및 (F)), 이는 그들의 유사한 친수성에 기인하여 분자 수준에서 젤라틴 용액 및 실리카 줄이 균일하게 혼합됨에 의하여 젤라틴 및 실리카 상이 균질하게 복합화되었다는 것을 보여준다. 모든 제조된 복합 지지체는 겉보기밀도 및 골격밀도를 고려하여 계산된 84-86 vol% 범위의 유사한 공극률을 보였다(도 10). 기본적으로, TIPS 기술로 제조된 나노섬유형 지지체의 공극률은 일차적으로 비-용매/용매 비율에 의해 결정되었다. 다시 말해, 균일한 나노섬유형 구조를 갖는, 따라서 유사한 공극률을 갖는 복합 지지체를 제조하기 위하여 모든 복합 지지체의 제조에 물-에탄올 혼합액 중 50 vol% 함유된 에탄올이 항상 사용되었다. 그러나, 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체 (예를 들어, 공극률, 공극의 크기 및 파이버의 기하학적 구조)의 구조는 비-용매/용매 (에탄올/물) 비율 및 용액 중의 폴리머의 농도를 조절함으로써 맞출 수 있고, 다른 포어(pore) 구조가 요구되는 잠재적인 분야로 적용을 넓힐 수 있다.

[0033] 1.3 화학적 분석

[0034] 복합 지지체의 화학적 조성 및 원소의 분포를 SEM 에 부착된 EDS(energy dispersive spectroscopy)에 의해 측정하였다. 그리고, 화학적 구조를 TR-FTIR(감쇠 총 반사 푸리에 변환 적외선 분광기), Nicolet 6700, Thermo Scientific.,USA)로 분석하였다. 젤라틴 나노파이버 내의 실리카 상의 존재를 EDS 분석으로 확인하였다. 나노섬유형 순수 젤라틴(A) 및 실리카가 30 wt% 함유된 젤라틴-실리카 복합 지지체(B) 각각의 전형적인 EDS 스펙트럼을 도 3에 나타내었다. 복합 지지체는 Si 및 Ca 원소에 상응하는 강한 피크를 나타내었다 3(B)). 게다가, 도 3(C) 및 (D)에 나타난 것과 같이, EDS 맵핑에 의해 특정된 Si 및 Ca 원소는 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체 중에 균질하게 분산되었다. 이는 졸-겔 프로세스와 조합한 TIPS 기술에 의해 균질하게 복합된 젤라틴젤라틴-실리카 상을 갖는 다공성 나노섬유형 구조물을 얻을 수 있음을 제시한다.

[0035] 도 4(A)-(C)에 나타난 것과 같이, 젤라틴 및 실리카 상의 화학적 상호작용을 시험하기 위해서 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 화학적 구조를 ATR-FTIR로 조사하였다. 순수 젤라틴 지지체는 젤라틴 폴리머의 전형적인 밴드를 나타내었다; 즉, C=O 에 해당하는 1636 cm^{-1} (아마이드 I), N-H에 해당하는 1542 cm^{-1} (아마이드 II) 및 C-N 공명에 해당하는 1240 cm^{-1} (아마이드 III)의 밴드(도 4(A)).

[0036] 반면에, 실리카가 10 wt% (도 4(B)) 및 30 wt% (도 4(C)) 함유된 젤라틴-실리카 복합 지지체는 실리카 함량이 증가됨에 따라 실리카 상에 상응하는 밴드의 상대강도가 증가하면서 졸-겔 유래 실리카 상 내에 Si-OH 및 Si-O-Si에 해당하는 추가의 밴드를 나타내었다. 그러나, 실리카 상의 Ca^{2+} 및 젤라틴 폴리머의 C=O 사이의 배위 때문에 아마이드 I 밴드의 위치는 1636 cm^{-1} 에서 1626 cm^{-1} 까지 감소되었다. 또한, 아마이드 III 밴드는 아마도 젤라틴 폴리머 내의 실리카 하이드록실 및 아미노기 사이의 상호작용 때문에 사라졌다. 젤라틴과 실리카 상 간의 이러한 상호작용이 수성환경에서 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 안정성을 향상시킨다.

[0037] **실험예 2: 기계적 내구성 평가**

[0038] 압축 강도 평가를 위해, 직경 5 mm 및 높이 10 mm의 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체를 screw-driven load frame (Oriental Testing Machine Co, Korea)을 이용하여 0.5 mm min^{-1} 의 cross-head 속도로 압축하였다. 압축 강도를 시험하는 동안 표본의 응력 대 변형률을 기록하고 압축 모듈러스(compressive modulus)를 측정하였다. 각 지지체의 평균 및 표준 편차를 얻기 위해 최소 3 개의 표본을 시험하였다. 통계는 software Origin Lab 8.0(Microcal Co, USA)에 기초하여 one-way ANOVA test로 데이터 간의 유의차를 분석하였다. $P \text{ 값} < 0.05$ (*)인 경우 의미 있는 것으로 고려된다. 이하의 모든 통계 분석에 있어서도 동일하다.

[0039] 다양한 실리카 함량의 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체(0 wt%, 10 wt%, 및 30 wt%)의 골 지지체로서 성공적인 적용을 위해 중요한 기계적 성질을 압축강도 시험으로 평가하였다. 순수 젤라틴 지지체(A)와 10 wt%(B) 및 30 wt%(C)의 실리카가 함유된 젤라틴-실리카 복합 지지체의 통상적인 응력에 대한 변형률을 도 5에 나타내었다. 견고한 다공성 폴리머 지지체에서 종종 있는 경우로서, 모든 제조된 복합 지지체는 처음에 탄성 반응을 나타내어 평탄하다가 응력 증가에 따라 급속히 증가하였다.

[0040] 그러나, 실리카 함량이 증가함에 따라 피크 응력이 증가하였다. 게다가, 실리카 함량이 0 wt%에서 30 wt% (도 10)까지 증가함에 따라 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 압축 모듈러스가 $9.2 \pm 0.4 \text{ MPa}$ 에서 해면골(0.01-9.8 GPa)의 범위 내인 $21.4 \pm 8.2 \text{ MPa}$ 까지 상당히 향상되었다. 탄성 반응(elastic response) 및 탄성 모듈러스(elastic modulus)의 상당한 향상은 젤라틴-실리카 혼합물의 사용과 실리카내의 하이드록실기 및 젤라틴 폴리머 내의 아미노기 간의 상호작용(도 4)에 의해 얻을 수 있는 분자 수준에서의 젤라틴 나노파이버 내의 실리카 상의 균질한 분배에 기인한다(도 2 및 3). 도 10에 순수 젤라틴 나노섬유 지지체(A), 실리카 함량이 10 wt%(B), 30 wt%(C)인 젤라틴/실리카 복합 나노섬유 지지체의 밀도, 기공도, 압축응력에 대한 탄성계수를 정리하여 도시하였다.

[0041] **실험예 3: 인 비트로 분해 시험**

[0042] 2 mg/mL 농도의 인체유사용액(simulated body fluid; SBF)에 13일 동안 침적시킨 후 중량 소실 및 실리콘(Si) 농도 변화를 모니터링하여 실리카가 30 wt% 함유된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 분해 동태를 평가하였다. 대조군으로 나노섬유형 순수 젤라틴 지지체 또한 시험하였다. 각 복합 지지체의 직경 4mm 및 높이 7mm인 세 개의 표본을 37 °C에서 SBF에 1, 3, 7, 9, 11 또는 13 일 동안 담가두었다. 그리고 나서, 표본을 추출하고 중량 소실을 계산하기 위해 무게를 측정하였다. 이에 더하여, 복합 지지체로부터 방출된 Si의 농도를 유도결합 플라즈마 원자발광 분광법(inductively coupled plasma optical emission spectrometer; ICP-OES; Thermo Scientific, USA)으로 측정하였다. 시험을 위하여 용액 4 mL를 추출한 후에, 용액 내 표본의 농도를 유지하기 위하여 같은 양의 신선한 SBF 용액을 가하였다.

[0043] 실리카가 30 wt% 함유된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 성공적인 골 재생을 위해 가장 중요한 특징 중의 하나인 생물학적 분해동태를 SBF 용액에 담근 지지체의 무게 변화를 측정하여 분석하였다. 또한, 복합 지지체로부터 방출된 Si 이온은 골형성 반응을 촉진시키므로 침적시간의 작용으로서 SBF 용액 내의 Si 농도의 변화를 측정하였다. 나노섬유형 순수 젤라틴 지지체를 대조군으로 시험하였다. 도 6(A)에 나타낸 것과 같이, 나노섬유형 순수 젤라틴 지지체는 수성환경에서 높은 용해성을 나타내므로 1일 이내에 완전히 SBF 용액에 용해되었다. 이와 유사하게는, 실리카가 10 wt% 함유된 젤라틴-실리카 복합 지지체는 빠르게 생물학적으로 분해되었기 때문에 다른 인 비트로 실험에서 제외하였다. 반면에, 실리카가 30 wt% 함유된 젤라틴-실리카 복합 지지체는 SBF 용액 내에서 13일이 지난 후에도 모양이 유지되었다(도 6). 도 6(B)에 도시한 바와 같이, 복합 지지체의 무게는 하루 후 처음 무게의 절반이 될 때까지 매우 신속히 감소하였고 SBF 용액 내에서의 침적시간을 증가함에 따라 계속하여 감소하였다. 이는 실리카 상이 효과적인 물리적 가교제로서 역할, 즉, 실리카 내의 실리카 하이드록실기(Si-OH)와 젤라틴 폴리머 내의 아미노기가 정전결합 및 수소결합을 통하여 상호작용을 하여 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 생물학적 분해속도를 감소시킬 수 있음을 제시한다.

[0044] SBF 용액 중의 실리카 함량이 30 wt%인 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체로부터 방출된 Si의 농도를 침적 시간에 따라 모니터링하였고(도 7(A)) 이는 무게 손실의 변화와 유사하였다(도 6(B)). Si의 농도에 비례하여 증가하는 지지체는(도 7(B)) 세포 반응에 있어서 매우 유용할 것이다. 이는 젤라틴-실리카 상의 상호작용으로 균질하게 복합된 젤라틴-실리카 상을 획득할 수 있기 때문에 SBF 용액 내 복합 지지체의 분해로서 제어된 방식으로 Si

이온이 계속적으로 방출될 수 있음을 제시한다. 게다가, 온전히 방출되는 기간 동안 SBF 용액 내 Si 농도는 실리카의 생체활성 부분(유전자 활성화) 내에서 5-60 mg/L 이었다(도 7(C)). 복합 젤라틴-실리카 지지체의 생물학적 분해속도 및 Si 방출 동태는 젤라틴 및 실리카 상의 화학적 상호작용을 제어함으로써 조절할 수 있다. 예를 들어, 젤라틴 분자를 가교시키면 생물학적 분해 속도가 감소된다.

[0045] 실험예 4: 인 비트로 아파타이트(apatite) 형성능 평가

[0046] SBF 용액에 하룻동안 침적시켜 실리카가 30 wt% 함유된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 인 비트로 아파타이트 형성능을 평가하였다(도 8). 용액의 최초 pH를 7.40으로 하여 표본을 SBF 용액이 3 mg/mL 농도로 함유된 폴리에틸렌 병에 담갔다. 그리고 나서 표본을 온도를 37 °C로 하여 하루 동안 인큐베이터에 놓은 후, 추출 및 에탄올로 세 번 세척한 후 37 °C에서 12 시간 동안 건조하였다. 복합 지지체의 표면에 형성된 아파타이트층을 FE-SEM, EDS 및 ATR-FTIR을 이용하여 분석하였다.

[0047] 인 비보에서 골 조직 형성능을 나타내는 가장 중요한 마커 중 하나인 칼슘이 도핑된(doped) 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 인 비트로 아파타이트 형성능을 하루 동안 SBF 용액에 지지체를 침적시켜 평가하였다. 젤라틴 폴리머는 고농도로 SBF 용액에 담갔을 때만 아파타이트 형성능을 나타낼 수 있다. 그러나, 도 8(A) 및 (B)에 도시한 바와 같이 젤라틴-실리카 복합 지지체는 나노섬유형 구조의 흔적과 함께 플레이크형 나노입자(flake-like nanoparticles)의 활발한 침전을 보였다. 도 8(C)에 도시한 바와 같이, 침전된 나노입자의 화학적 구조를 ATR-FTIR에 의해 특정하였다. SBF 용액에 하루 동안 침적시킨 후에, 복합 지지체는 아파타이트 입자의 특정 밴드를 나타내었다. 다시 말해, 결정성 아파타이트 내 PO_4^{3-} 사면체의 P-O 벤딩 진동(bending vibration)에 해당하는 562 cm^{-1} , 603 cm^{-1} 및 1026 cm^{-1} 에서의 밴드가 관찰되었다. 그러나, 상대적으로 약한 강도의 603 cm^{-1} 의 밴드는 아파타이트 상이 잘 결정화되지 못했음을 나타낸다. EDS 분석에 의해 계산된 아파타이트 입자의 Ca/P 비율(도 8(D))은 대략 1이었는데 이는 Ca이 부족한 아파타이트 상의 형성되었음을 제시한다. 이는 Ca이 도핑된 실리카 상의 우수한 아파타이트 형성능에 기인하여 아파타이트 입자가 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 표면에 활발하게 형성되었음을 제시한다.

[0048] 실험예 5: 인 비트로 생체적합성 평가

[0049] 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 인 비트로 생체적합성을 전구-조골세포(pre-osteoblast)의 세포주(MC3T3-E1; ATCC, CRL-2593, Rockville, MD, USA)를 이용하여 평가하였다. 세포를 시딩(seeding)하기에 앞서, 샘플을 30분 동안 자외선을 조사하면서 70% 에탄올로 2 시간 동안 멸균시킨 후 포스페이티 버퍼 용액(PBS)에 20 분 동안 담갔다. MC3T3-E1 세포를 mL 당 2×10^4 세포의 농도로 심고 37 °C, 5% CO_2 대기의 습식 인큐베이터(humidified incubator)에서 배양하였다. 10% 우태아혈청(FBS), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 10 mM β -글리세로포스페이트(Sigma) 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 아스코르브산이 보충된 최소 필수 배지(Minimum essential medium(α -MEM): Welgene Co., Ltd., 서울, 한국)를 배양배지로 사용하였다. 1일 및 3일 동안 배양한 후 FE-SEM에 의해 실리카가 30 wt% 함유된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체에 부착된 세포의 모폴로지를 분석하였다. 관찰하기에 앞서, 샘플을 2.5% 글루타르알데히드에 30분간 고정하고 단계별 에탄올(순서대로 70, 90, 95 및 100% 에탄올) 중에 탈수시킨 후 실온에서 건조시켰다. SEM 관찰을 위해 샘플을 얇은 Pt 층으로 코팅하였다. 이에 더하여, 세포 부착을 confocal laser scanning microscopy (CLSM; C1 PLUS, Nikon, Tokyo, Japan)로 면밀히 분석하였다. CLSM 관찰을 위해, 배양한 세포를 Alexa Fluor 546 phalloidin (Eugene)으로 염색하였다. 염색된 기재를 커버슬라이드에 놓고 세포 모폴로지를 관찰하였다. 미토콘드리아의 환원을 위해 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸리움(MTS, Promega, Madison, WI, USA)으로 MTS(methoxyphenyl tetrazolium salt) 어세이를 수행하여 세포 증식 속도를 측정하였다. 마이크로플레이트 리더(Model 550; BioPad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정되는 포르마잔의 양은 배지에 살아있는 세포의 수에 대해 직접적으로 비례한다. 이를 평가하기 위해, 세포 배양 배지에서 세포의 안정성을 향상시키기 위해 나노섬유형 순수 젤라틴 및 젤라틴-실리카 복합 지지체에 0.5% 글루타르알데히드 용액을 24 시간 동안 처리하였다. 그리고 나서, 샘플을 에탄올로 행구고 12시간 동안 진공 상태에서 건조하였다. 비교를 위해, 양성 대조군으로 조직배양 플레이트(tissue culture plate; TCP) 또한 시험하였다. 평균 및 표준 편차를 구하기 위해 각 조건에 따라 네 가지 종류를 시험하였다.

[0050]

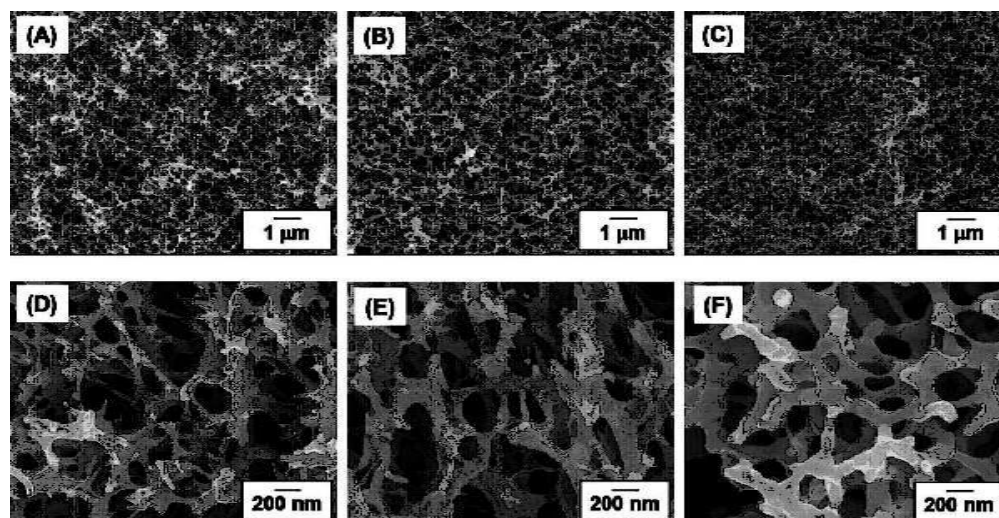
골 조직 엔지니어링에의 적용가능성을 평가하기 위해 실리카가 30 wt% 함유된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체의 인 비트로 생체적합성을 MC3T3-E1 세포를 이용한 인 비트로 세포 테스트에 의해 평가하였다(도 9). 도 9(A)-(D)는 배양 1일(도 9(A) 및 (B)) 및 3일 (도 9(C) 및 (D)) 후의 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체에 부착된 MC3T3 세포의 전형적인 CLSM 이미지를 나타낸다. 많은 수의 세포가 복합 지지체의 표면, 액틴이 붉게 보이는 부분에 부착되고 활발히 퍼졌다(도 9(A) 및 (B)). 3일 동안 배양한 후 세포의 수는 증가하였다(도 9(C) 및 (D)). 게다가, 세포골격의 주요한 성분의 하나이고 세포 활성의 여러 부분에서의 제어에 중요한 역할을 하는 액틴 스트레스 섬유(actin stress fibers)가 활발히 조직되었는데 이는 조골세포가 매우 활성화되었음을 제시한다. 이는 실리카 상이 젤라틴 폴리머의 생체적합성을 악화시키지 않아 높은 생체적합성을 갖도록 제조된 나노섬유형 젤라틴-실리카 복합 지지체를 허용케 함을 의미한다.

도면

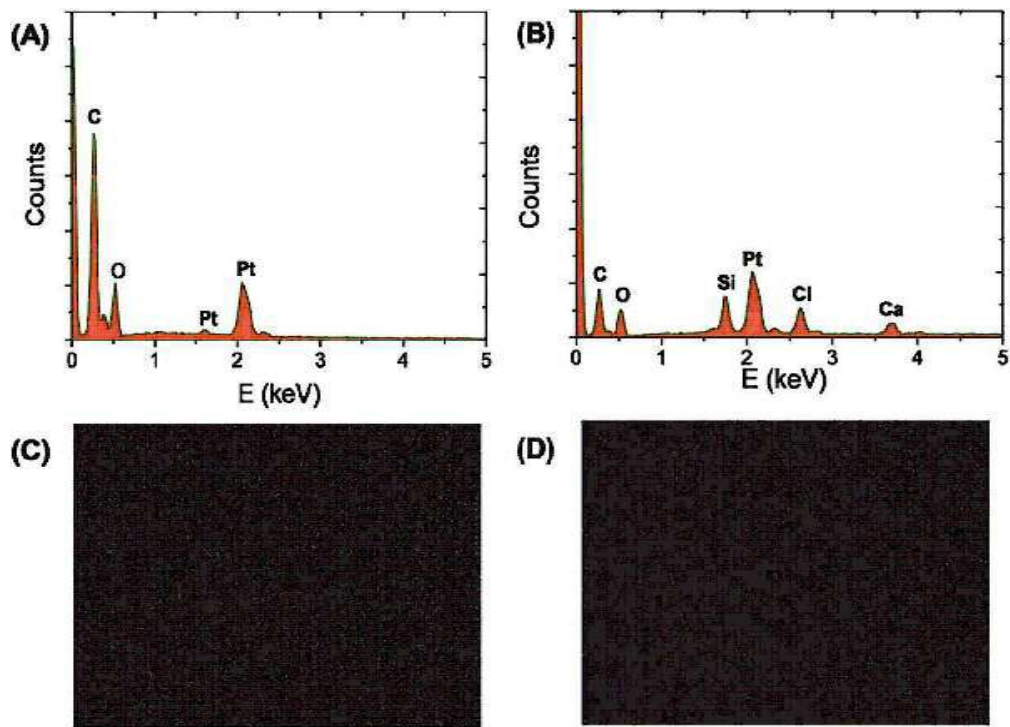
도면1



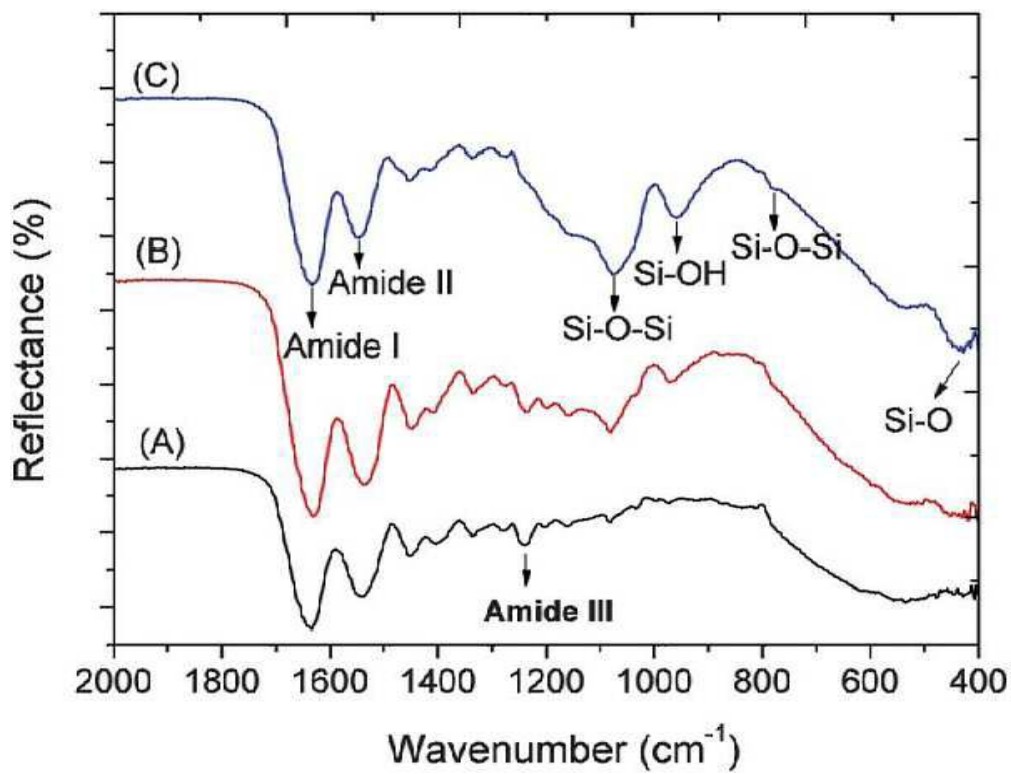
도면2



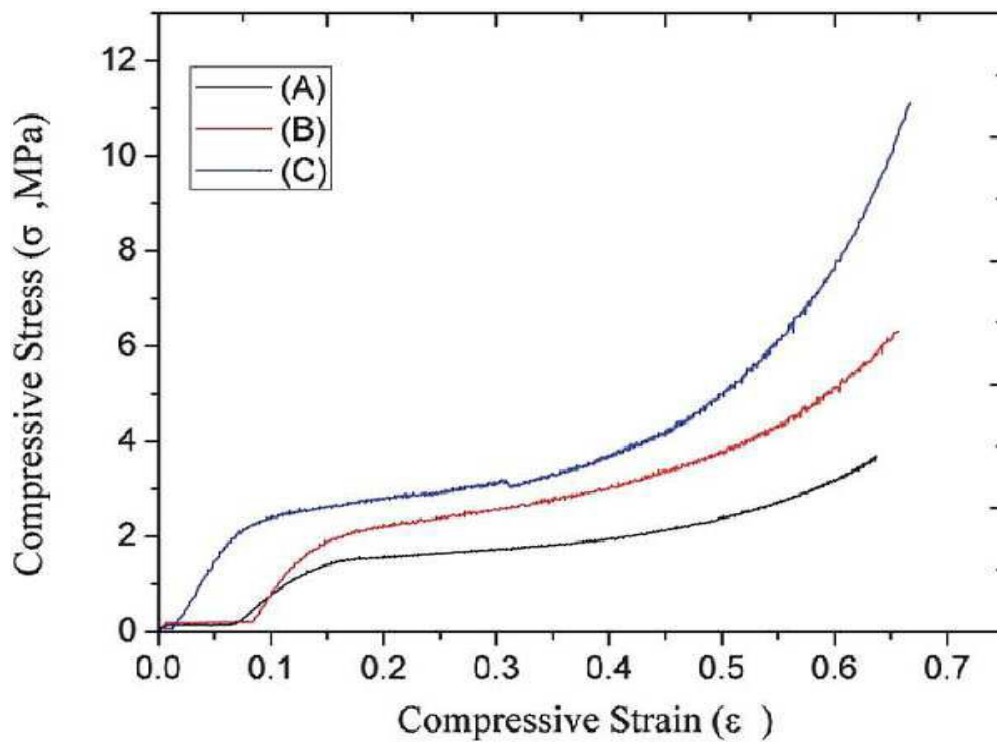
도면3



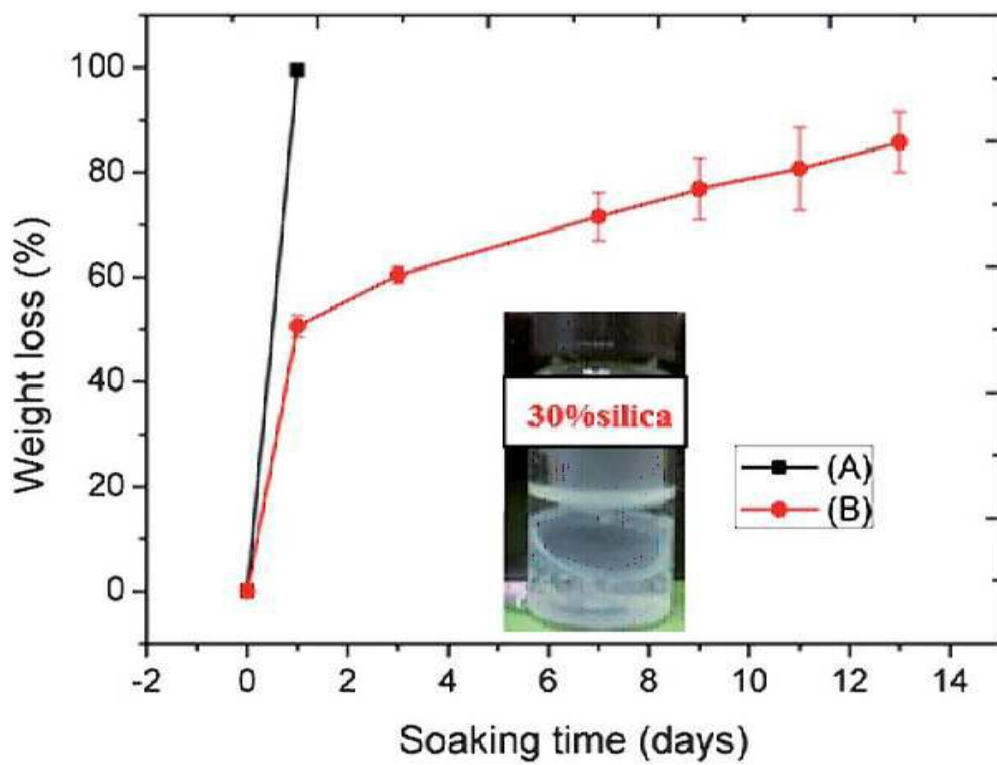
도면4



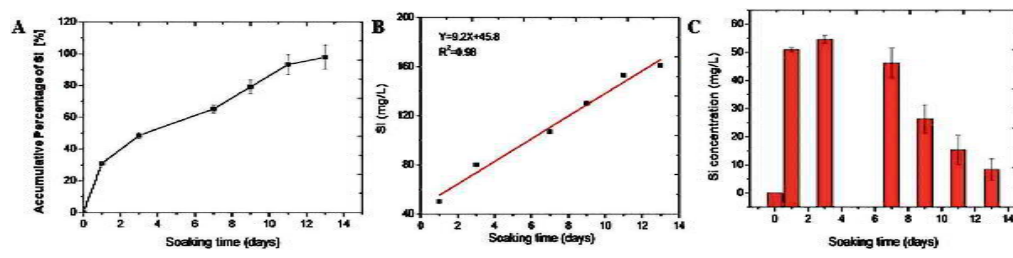
도면5



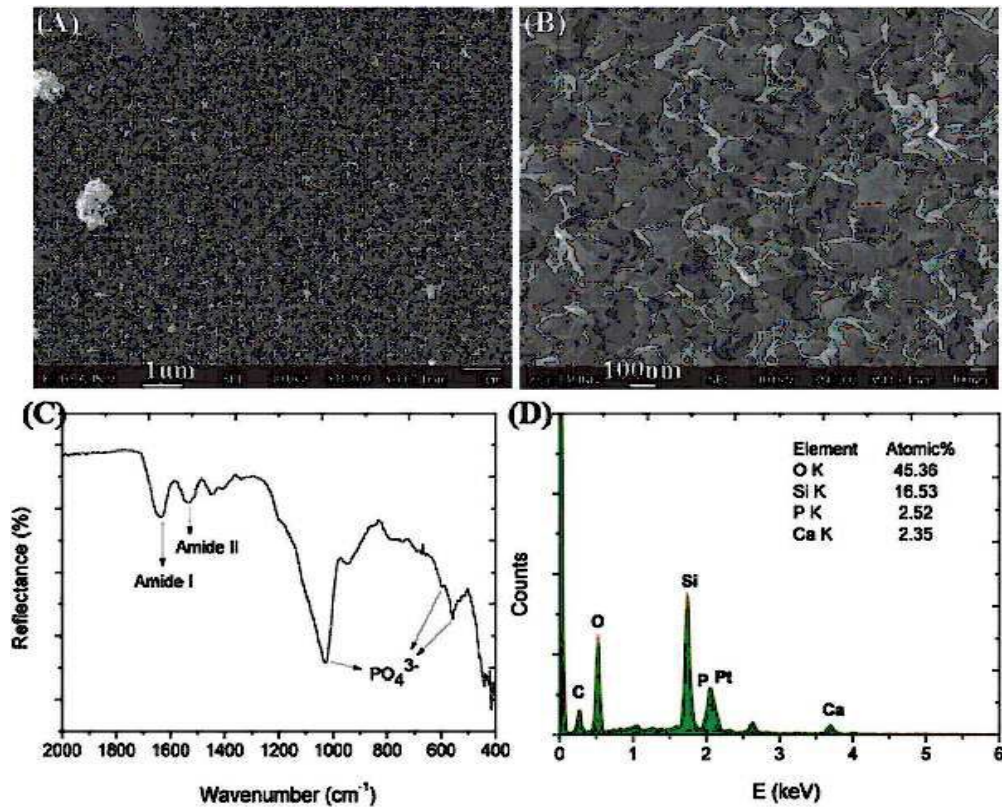
도면6



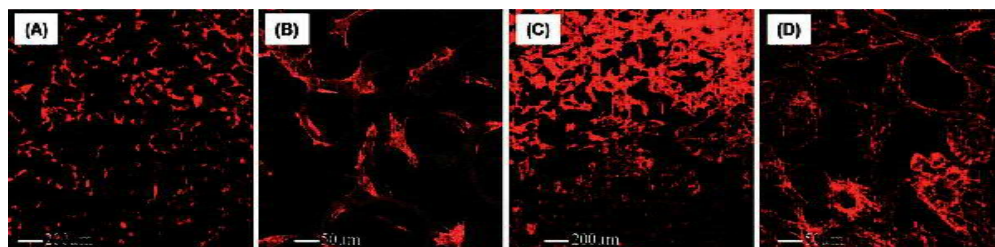
도면7



도면8



도면9



도면10

실리카 [wt%]	밀도 [g cm^{-3}]	I공극률 [%]	압축 모듈러스(MPa)
(A) 0	0.203	84.2 ± 0.1	9.2 ± 0.4
(B) 10	0.194	85.9 ± 0.6	13.9 ± 0.8^a
(C) 30	0.265	83.6 ± 0.8	21.4 ± 8.2^b

^a Significant difference between the silica contents of 0 wt% and 10 wt% ($P < 0.05$). ^b Significant difference between the silica contents of 10 wt% and 30 wt% ($P < 0.05$).

(A):순수 젤라틴 나노섬유 지지체
 (B): 실리카가 10 wt%함유된 젤라틴-실리카 복합 나노 섬유 지지체
 (C): 실리카가 30 wt% 함유된 젤라틴-실리카 복합 나노 섬유 지지체