



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052116
(43) 공개일자 2012년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/40 (2006.01) A61L 27/08 (2006.01)

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

(21) 출원번호 10-2010-0113591

(22) 출원일자 2010년11월15일

심사청구일자 2010년11월15일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트 125동 1402호 (사직동)

류보미

부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성애플 이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

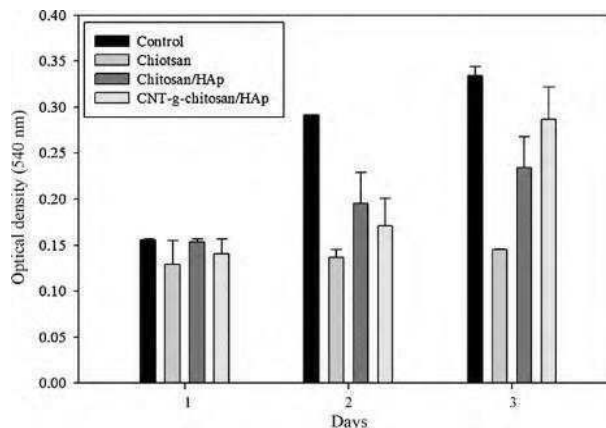
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 골조직 공학용 탄소 나노튜브-접합된 키토산-하이드록시아파타이트 복합물 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해양 생물공정 폐기물로부터 골 조직 이식을 위한 생체활성 물질을 제공하기 위한 것으로, 탄소나노튜브가 접합된 키토산/하이드록시아파타이트(CNT-gCTS/HAp) 복합 스캐폴드는 CTS의 $[NH^+]$ 및 f-MWCNT의 $[COO^-]$ 기의 주요한 이온 가교결합 상호작용으로 인해 바람직한 구조를 갖게 되며, 액체 전이 방법에 의해 측정될 때 85%를 초과하는 다공성, 각각 70 내지 200 μm 및 46 내지 200 μm 의 CTS/HAp 및 CNT-g-CTS/HAp 스캐폴드 세공 크기를 갖고, 열 안정성, 상호연결된 세공, 제어된 생물분해성 및 비-세포독성과 같은 우수한 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

벤카태산 자야찬드란

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-02

부처명 국토해양부(마린바이오프로세스연구단)

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물 유래 미백 및 주름개선 기능성 화장품 소재의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

주관기관 부경대학교

연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

키토산, 작용화된 다중벽 탄소 나노튜브 및 하이드록시아파타이트로 이루어진 골조직 공학(bone tissue engineering)용 복합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

하이드록시아파타이트가 눈다랑어(*Thunnus Obesus*) 뼈에서 유래된 하이드록시아파타이트인 복합물.

청구항 3

골조직 공학용 복합물의 제조 방법에 있어서,

키토산을 아세트산 용액에 용해시키고 초음파 처리하는 단계;

작용화된 다중벽 탄소 나노튜브를 물에 분산시키고 초음파 처리하는 단계;

하이드록시아파타이트를 물에 분산시키는 단계; 및

상기 탄소 나노튜브 분산액을 상기 키토산 용액에 천천히 첨가하고, 이 혼합물에 하이드록시아파타이트-물 현탁액을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는

작용화된 다중벽 탄소 나노튜브-접합된 키토산/하이드록시아파타이트(f-MWCNT-g-키토산/HAp)로 이루어진 골조직 공학용 복합물의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 골조직 공학용 탄소 나노튜브-접합된 키토산-하이드록시아파타이트 복합물(CNT-g-CTS/HAp) 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 키토산, 자연 유래의(naturally derived) 하이드록시아파타이트(HAp) 및 작용화된 다중벽 탄소 나노튜브(f-MWCNT)의 3원 구성성분 시스템으로 구성되어 우수한 열 안정성, 상호연결된 다공성, 시험관내 분해 제어성 및 세포 증식성을 갖는 골조직 공학용 복합물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

조직공학(Tissue Engineering)이란 생명과학, 의학, 공학의 기본개념과 기술을 바탕으로 생체조직, 예컨대 뼈, 연골, 혈관, 방광, 피부 등의 대용품을 만들어 이식함으로써 생체 기능의 유지, 향상, 복원을 가능하게 하는 분야를 말한다. 지난 40여년동안 인공장기 물질의 제조, 이식, 외과적 재건술 분야에서는 기관 또는 조직의 상실 또는 기능부전을 치료하기 위하여 인공보철을 이용하는 것에 대하여 관심이 증가하였다. 자가이식 및 동종이식이 골전도 및 골유도 증식 인자를 제공하는 골이식 절차에서 가장 바람직하다고 판단되나, 공여 부위, 추가 수술(additional surgery), 질병 전염 및 비용 측면에서의 한계로 인해, 자가이식 및 동종이식에 대한 대체재의 개발 필요성이 대두되었다.

[0003]

스캐폴드(scaffold)는 3차원 조직 형성을 지지하도록 하는, 세포가 이식 또는 종균(seeding)되어 있는 인공 구조물로서, 세포를 부착시킨 후에 이동시키거나, 세포 및 생화학 인자를 운반시킨 후에 유지시키거나, 생명 유지에 관련된 세포 영양분 및 발현 생성물을 확산시키거나, 또는 세포 단계를 변경시키기 위해 일부 기계적 및 생물학적 영향을 가하는 역할을 한다.

- [0004] 스캐폴드는 세포 및 영양분 둘다의 구조를 거쳐 세포를 용이하게 증균 및 확산시키기 위해 다공성이 크고 세공 크기가 클 것을 요건으로 한다.
- [0005] 키토산(Chitosan: CTS)은 수생 갑각류와 곤충의 외피 및 균류 세포벽에서 통상적으로 발견되는 키틴의 부분 탈아세틸화로부터 유도되는 선형 다당류로, β -(1→4)-2-아세트아미도-D-글루코오스 및 β -(1→4)-2-아미노-D-글루코오스 단위 결합으로 이루어진 공중합체이다. 키토산은 지난 20여년동안 높은 생체적합성, 생물분해성, 다공성 구조, 세포 내성장(cell ingrowth), 골전도 및 내인 항균성으로 인해 연골조직공학, 상처 치유 및 정형외과에서 사용되는 것을 비롯하여 생의학(biomedical) 용도로 광범위하게 사용되고 있다.
- [0006] 키토산을 사용한 분해성 중합체 임플란트는 제2 수술을 필요로 하지 않고 새로운 골 성장을 촉진시키는 이점을 갖지만, 키토산-기재 복합 생체물질은 기계적 강도 및 상호연결된 다공성이 낮은 문제점이 있어 개선의 여지가 있다. 이와 관련하여, 일-구성성분 시스템은 모든 골(bone) 특성을 보조하고 모방할 수 없으므로, 골회복(bone repair)을 위한 대체재로서 다-구성성분 시스템에 대하여 연구가 집중되고 있다.
- [0007] 대한민국 특허출원 제10-2010-7009939호 “조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법”에는 하나 이상의 폴리사카라이드와 하나 이상의 가교결합제를 포함하는 염기성 수용액을 이용하여 다공성 스캐폴드를 제조하는 방법에 대하여 개시하고 있으나, 상기 특허출원에서는 키토산-기재 복합 생체물질의 기계적 강도 및 상호연결된 다공성이 낮은 문제점에 대한 해결책을 제시하지 못하고 있다.
- [0008] 하이드록시아파타이트 [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (HAp)는 척추유합술, 구강악안면 재건술, 골결손, 골절치료, 전체 관절 대체술(골증대술) 및 재수술(revision surgery)을 비롯한 다양한 분야에서 필수적인 역할을 갖는 것으로 판단된다. 탄화 HAp는 합성 HAp에 비해 보다 높은 골전도, 생체재흡착성 및 생체적합성을 갖는 것으로 보고되었다. 키토산과 합성 HAp의 복합물은 천연 HAp에 비해 골접합 대체재로서 보다 광범위하게 사용되고 있다. 돼지 뼈로부터 유도된 천연 HAp와 키토산의 결합이 골 재생과 관련하여 연구 보고된 바 있다.
- [0009] 대한민국 특허출원 제10-2007-7022847호 “생체적합물질”에는 생체 적합 물질의 적어도 일부가 칼슘 포스페이트 물질 및 키토산을 포함하는 다공성 공침물로부터 형성되며, 매크로포어 직경이 바람직하게 1 - 1000 마이크로미터, 더욱 바람직하게 200 - 600 마이크로미터인 합성 생체 적합 복합 물질에 대하여 개시하고 있으나, 상기 특허출원에 개시된 생체적합물질은 생체적합성 및 생체 내분해성 측면에서 더 개선될 여지가 있다.
- [0010] 최근, 키토산 스캐폴드에 비해 향상된 세포 증식을 갖는 3원 구성성분의 시스템이 개발되었다. 키토산/HAp와 함께 폴리(메틸 메타크릴레이트), 젤라틴, 콜라겐, 폴리(L-락타이드산), 폴리카프로락톤, 카복시메틸 셀룰로오스, 폴리아미드 66 및 몬모릴로나이트를 비롯한 골조직 공학을 위해 3원 구성성분의 시스템이 사용될 것이 보고된 바 있다[Kim,S., Kim,Y., Yoon,T., Park,S., Cho,I., Kim,E., et al. (2004). The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement. *Biomaterials*, 25(26), 5715-5723; Li,J., Chen,Y., Yin,Y., Yao,F., & Yao,K. (2007). Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ. *Biomaterials*, 28(5), 781-790; Zhang,L., Tang,P., Zhang,W., Xu.M., & Wang,Y. (2010). Effect of chitosan as a dispersant on collagen-hydroxyapatite composite matrices. *Tissue Engineering Part C Methods*, 16(1), 71-79].
- [0011] 탄소나노튜브는 생체적합성 및 생체 내분해성이고 생체분자에 의해 작용화될 수 있어서 조직공학 스캐폴드 재료로 연구되고 있다.
- [0012] 대한민국 특허출원 제10-2007-27248호 “탄소나노튜브 복합체 조성물, 탄소나노튜브 전도성 박막, 및 이들의 제조방법”에서는 단일 가닥 DNA가 결합된 탄소나노튜브(Carbon NanoTube: CNT)들이, 서로 다른 CNT에 결합된 단일 가닥 DNA가 금속 이온을 매개로 한 DNA-DNA 클릭 화학결합을 이용함으로써 매질 중에 분산된 CNT 복합체 조성물에 대하여 개시하고 있다.
- [0013] 그러나, 탄소나노튜브의 골조직 성장, 콜라겐 형성 및 생체적합성에 대한 우수한 기계적 특성에도 불구하고, 탄소나노튜브는 세포 독성 문제를 가지고 있어, 아직까지 그에 대한 연구가 필요한 실정임에도 불구하고, 상기 특허출원에서는 탄소나노튜브의 세포 독성 문제를 해결하지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 하이드록시아파타이트(HAp) 및 작용화된 다중벽 탄소나노튜브(f-MWCNT)를 키토산 매트릭스에 혼입시켜서, 상호연결된 다공성 및 열적 안전성을 향상시키고 세포증식 및 분해 속도 제어성을 증가시키면서도 세포 독성 문제를 갖지 않는 우수한 골조직 공학용 복합물 및 그의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 키토산, 하이드록시아파타이트(HAp) 및 작용화된 다중벽 탄소 나노튜브(f-MWCNT)를 갖는 3원 구성성분 시스템으로서의 스캐폴드를 처음으로 밝혀내어, 키토산, f-MWCNT 및 HAp를 함유하는 신규한 골조직 공학용 키토산 복합 스캐폴드(CNTg-CTS/HAp) 및 그의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 키토산-기재 복합 스캐폴드(CNTg-CTS/HAp)는 상호연결된 다공성 및 열적 안전성이 향상되고, 세포 증식 및 분해 속도 제어성이 증가되면서도 세포 독성 문제를 갖지 않아 골조직 공학용 복합물로서의 유용성이 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 키토산(CNT), 작용화된 다중벽 탄소나노튜브(f-MWCNT) 및 하이드록시아파타이트(HAp)간 상호작용의 일례를 나타낸 것이다.

도 2에서 (a)는 키토산, 키토산/HAp 및 탄소나노튜브-접합된 키토산(CNT-g-키토산)/HAp로부터 제조된 스캐폴드를 나타낸 것이고, (b)는 24시간 후에 키토산, 키토산/HAp 및 탄소나노튜브-접합된 키토산(CNT-g-키토산)/HAp 스캐폴드의 물 흡수능과 보유능을 나타낸 그래프(평균 표준편차, n=3)이다.

도 3은 하이드록시아파타이트(a), 작용화된 다중벽 탄소 나노튜브(b), 키토산 스캐폴드(c), 키토산/HAp 스캐폴드(d), f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드(e)의 적외선 분광분석 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는 키토산, HAp, f-MWCNT, 키토산/HAp 스캐폴드, f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 XRD 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 키토산 스캐폴드(a), 키토산/HAp 스캐폴드(b), f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드(c) 및 키토산 매트릭스 중의 HAp 입자 분산(d)의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 6은 키토산 스캐폴드(a), 키토산/HAp 스캐폴드(b), f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드(c)의 광학 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 7은 생존 세포의 활성 미토콘드리아 활성도(active mitochondrial activity)를 나타내는 MTT (3-(4,5-다이메틸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드) 분석에 의해 측정된 스캐폴드에 대한 MG-63 세포 증식을 시간 함수로 나타낸 그래프로서, 복합 스캐폴드에서 3일째의 광학 밀도가 순수 키토산 스캐폴드에 비해 유의하게 높았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에서는 생체적합성, 생물분해성 및 생체활성과 같은 뼈 세포의 매트릭스의 모든 특성을 모방할 수 있도록 키토산, 하이드록시아파타이트(HAp), 작용화된 다중벽 탄소나노튜브(f-MWCNT)의 3가지 원료 물질로 이루어진 골조직 공학용 복합물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서는 자연 뼈의 특성을 모방하기 위하여 스캐폴드 함유물로서 HAp 70중량%, 키토산 29.9중량% 및 f-MWCNT 0.1중량%를 사용한다. 이러한 비율은 자연 뼈가 HAp 70% 및 결합 단백질(connective protein)인 콜라겐 약 30%를 함유한다는 사실에 근거한 것이다. 따라서, 본 발명에서 제조된 스캐폴드는 이전에 보고된 것보다 더욱 효율적이다.

[0020] 본 발명에서 세포의 매트릭스로서 키토산을 선택한 근거는 HAp에 대한 높은 친화도, 및 HAp 및 f-MWCNT를 함유하는 수용액의 균질한 분포를 용이하게 하는 친수성 특징에 있다. 키토산 및 HAp의 친수성은 또한 세포 부

작, 증식 및 분화를 용이하게 한다.

- [0021] 본 발명에서 사용할 수 있는 키토산은 500 kDa이라면, 상업적으로 시판되는 키토산 분말을 비롯하여 그 종류 면에서 특별히 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명에서 하이드록시아파타이트(HAp)는 스캐폴드의 주요 구성성분으로, 그 종류 면에서 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 자연에서 유래된(naturally derived) 하이드록시아파타이트이고, 특히 바람직하게는 눈다랑어(*Thunnus Obesus*) 뼈로부터 유도된 하이드록시아파타이트이다. 가공된 눈다랑어(참치) 뼈 부산물로부터 유래된 HAp를 사용하면, 참치 뼈의 가공 폐기물에서 탄화 HAp이 분리되는 선택성이 증가하고 환경 오염이 감소하므로 바람직하다. 탄화 HAp는 보다 높은 골전도, 골재흡착 및 생체적합성을 갖는다.
- [0023] 본 발명에서 탄소나노튜브(CNT)는 기계적 강도를 증가시키는데 사용되지만, 자연 그대로의(pristine) CNT는 세포에 독성이 있는 것으로 보고되므로, CNT를 작용화시켜 독성을 감소시키는 것이 중요하다. COOH의 첨가는 수성 상에서의 분산을 증가시켜 다른 양이온 분자와의 상호작용을 가능하게 하여서 CNT를 스캐폴드 제조에 적합하게 만든다.
- [0024] 본 발명에서 사용할 수 있는 탄소나노튜브는 외경 8nm 미만, 길이 10 내지 30 μ m을 가지며 COOH에 의해 작용화된 다중벽 탄소나노튜브이나, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다.
- [0025] 이하, 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 예를 하기에 기재하였으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것이 아님이 당업자에게 명백하다.
- [0026] 1. 재료 및 방법
- [0027] 키토산 분말(탈아세틸화도 70 내지 90%, 분자량 500kDa)은 와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈 리미티드(Wako Pure Chemical Industries Ltd., 일본)에서 구입하였다.
- [0028] 하이드록시아파타이트는 하소법(thermal calcination method)에 의해 눈다랑어로부터 분리하였다. 다중벽 탄소 나노튜브(외경 8nm 미만, 길이 10 내지 30 μ m)는 cheap tubes.com(미국)으로부터 입수하였다.
- [0029] 인간 골육종(MG-63) 세포주는 American Type of Culture Collection (미국 버지니아주 매나새스(Manassas) 소재)에서 입수하였다.
- [0030] 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM)는 깁코 비알엘, 라이프 테크놀로지(Gibco BRL, Life Technology, 미국)에서 입수하였다.
- [0031] MTT (3-(4,5-다이메틸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드)는 몰리큘러 프로브(molecular probe, 미국 오레곤주 유젠(Eugene) 소재)에서 입수하였다.
- [0032] 본 실험에서 사용한 다른 시약은 모두 분석용 품위이었다.
- [0033] (1) 눈다랑어에서 HAp의 분리
- [0034] 다랑어 뼈를 2일동안 열수로 세척하여서 혼량의 고기와 피부를 제거하였다. 세척한 뼈를 1.0% 수산화나트륨 및 아세톤과 혼합하여서 단백질, 지질, 오일 및 다른 유기 불순물을 제거하였다 (뼈와 수산화나트륨 고형물/액체의 비는 1:50이었다). 완전히 세척한 후에, 뼈를 막자사발에서 분쇄하고, 이어서 24시간동안 60℃에서 건조시켰다. 하소처리에서, 다랑어 뼈가루 2g을 석영도가니에 놓고, 전기로(electrical muffle furnace)에서 900℃ 온도로 5시간동안 처리하였다.
- [0035] (2) 탄소 나노튜브(CNT)의 작용화 및 정제
- [0036] 다중벽 탄소 나노튜브(MWCNT)를 정제하고, 산 처리하여 카복실화한다.
- [0037] MWCNT 2.0g을 둥근바닥 플라스크에 놓고, 96% 황산 50 mL 및 64 - 66% 질산 17 mL의 혼합물을 첨가하였다(3/1 ¼ v/v). 반응물을 bath type으로 10분동안 40Hz로 초음파 처리하였다. 이어서, 초음파기에서 반응 플라스

크를 꺼내고, 환류 응축기를 갖춘 오일조(oil bath)에 놓았다. 반응기에서 발생한 기체를 NaOH 수용액으로 중화시켰다. 300 rpm으로 격렬하게 교반하면서 3시간동안 반응 온도를 90에서 130 °C로 서서히 올리면서 혼합물을 더 반응시켰다. 이어서, 혼합물을 과량의 탈이온수로 희석시키고, 0.45 μ m PVDF 멤브레인 (친수성, Millipore)에 여과시켜서 고형 구성성분을 분리시켰다. 여과액의 pH가 근접하게 될 때까지 세척 절차를 반복하였다. 이어서, 수득된 고형 생성물을 아세톤 200 mL로 반복 세척하였다. 마지막으로, 고형 생성물을 THF로 2회 세척하고, 진공 하에 60°C에서 24시간동안 건조시켜서 카복실 작용기를 갖는 MWCNT (MWCNT-COOH)를 생성하였다.

[0038] (3) 스캐폴드의 제조

[0039] a. 키토산 스캐폴드의 제조

[0040] 고분자량의 키토산 1.74g을 2% 아세트산 용액 250 mL에 용해시켰다. 상기 용액을 6시간동안 기계적 교반기 (RW 20.n Labortechnik)로 교반하고, 1시간동안 초음파 처리하여서 기포를 제거하였다. 이어서, 이 용액을 웰 1개당 3g 및 5g 용액을 포함하는 적절한 12웰(well) 및 6웰 플레이트로 옮겼다. 시료를 -80°C에서 5시간동안 추가로 냉동시키고, 동결건조기로 동결건조시켜서 스캐폴드를 형성시켰다. 스캐폴드를 10% NaOH 용액에 1일 동안 담그었다. 1일 후에, pH가 중성이 될 때까지 과량의 물로 스캐폴드를 세척하고, 다시 동결건조시켰다.

[0041] b. 키토산/하이드록시아파타이트(키토산/HAp) 스캐폴드의 제조

[0042] 고분자량 키토산 1.8g을 2% 아세트산 용액 250mL에 용해시켰다. 상기 용액을 6시간동안 교반하고, 1시간동안 초음파 처리하여서 기포를 제거하였다. 자연 유래의 HAp 4.2g을 물 50mL에 현탁시키고, 점적기(dropper)를 이용하여 키토산 용액으로 조심스럽게 옮겼다. 상기 용액을 48시간동안 기계적으로 교반시켜서 HAp 입자를 중합체 매트릭스 내에 균질하게 분산시켰다. 이어서, 수득된 유백색 용액을 웰 1개당 3g 및 5g 용액을 포함하는 적절한 12웰 및 6웰 플레이트로 옮기고, 키토산 스캐폴드와 동일한 절차로 처리하였다.

[0043] c. 탄소 나노튜브 접합된 키토산/하이드록시아파타이트(f-MWCNT-g-키토산/HAp) 스캐폴드의 제조

[0044] 고분자량 키토산 1.74g을 2% 아세트산 용액 220mL에 용해시켰다. 상기 용액을 6시간동안 교반하고, 1시간동안 초음파 처리하여서 기포를 제거하였다. 이와 동시에, 작용화된 다중벽 탄소 나노튜브(f-MWCNT) 0.06 g를 물 20 mL에 분산시키고, 30분동안 초음파 처리하였다. 분산된 f-MWCNT를 교반중인 키토산 용액에 천천히 첨가하고, 혼합물을 6시간동안 교반하였다. 동시에, 자연 유래의 하이드록시아파타이트(HAp) 4.20 g를 물 20 mL에 별도로 분산시켰다. 이 HAp-물 현탁액을 키토산/f-MWCNT 혼합물에 천천히 첨가하고, 48시간동안 기계적으로 교반하였다. 마지막으로, 상기 흑색 혼합물을 웰 1개당 3g 및 5g 용액을 포함하는 적절한 12웰 및 6웰 플레이트로 옮기고, 키토산 스캐폴드와 동일한 절차로 처리하였다.

[0045] (4) 일반적인 특징 분석

[0046] 육안 검사

[0047] 동결건조된 키토산 스캐폴드 및 복합 스캐폴드의 육안 검사에 의하면 이들이 뽀뽀하고 비탄성인 것으로 나타났다. 키토산 스캐폴드는 신속하게 팽윤되고 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에 비해 더 가요성인 반면, 복합 스캐폴드는 더 강체(rigid)인 것으로 관찰되었다. 이러한 특성은 HAp 및 f-MWCNT가 혼입되었기 때문이다. 화학적인 근거를 살펴보면, 도 1에 나타난 바와 같이, f-MWCNT에 존재하는 카복실기, 키토산의 NH₂ 기 및 HAp의 OH 기 간의 분자간 수소 결합 상호작용 때문이다. 키토산 및 키토산/HAp 스캐폴드는 무색으로 수득되는 반면, f-MWCNT-g-키토산/HAp는 암흑색이었다: 이는 f-MWCNT가 중합체 및 세라믹 매트릭스에 분산되기 때문이다. 또한, 모든 스캐폴드 물질은 물에서 매우 안정한 것으로 밝혀졌고, 본래의 형태를 유지하였으며, 초기에는 분해가 관찰되지 않았다.

[0048] 다공성 측정

[0049] 액체 전이법[Zhang, Y. & Zhang, M., 2001, Synthesis and characterization of macroporous chitosan /calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering]에 따라 전체 다공도를 측정하였다.

[0050] 이 절차의 제1 단계에서는 스캐폴드의 체적 및 중량을 측정하고, 이들을 각각 V_0 및 W_0 로 표기한다. 제2 단계에서는 시료가 탈수 알코올을 흡수하여 포화될 때까지 시료를 48시간동안 탈수 알코올에 담그고, 시료를 다시 칭량하고, W_1 로 표기한다.

[0051] 마지막 단계에서, 시료의 다공도를 하기 수학적식에 근거하여 계산한다:

[0052]
$$P = (W_1 - W_0) / \rho V_0$$

[0053] 상기 식에서,

[0054] ‘ ρ ’은 탈수 알코올의 밀도를 나타내고, 3개의 parallel set는 모든 스캐폴드에 대하여 분석하고, 상이한 스캐폴드의 다공도의 평균값을 구한다.

[0055] 액체 전이법에 따라 측정된 키토산 스캐폴드, 키토산/HAp 스캐폴드 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 V_0 , W_0 , W_1 을 하기 표 1에 기재하였고, 탈수 알코올의 밀도는 0.789 gcm^{-3} 이었다.

표 1

[0056]

	V_0	W_0	W_1
키토산 스캐폴드	1	0.7905	0.0584
키토산/HAp 스캐폴드	1	0.8640	0.1442
f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드	1	0.8838	0.1917

[0057] 상기로부터, 키토산 스캐폴드의 다공도(92.9%)가 키토산/HAp 스캐폴드의 다공도(90.2%) 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 다공도(86.74%)에 비해 더 높았다. 키토산/HAp 스캐폴드에서는 키토산의 NH_2 기와 HAp의 OH 기 간에 상호작용이 발생하여 다공도가 감소하였다. f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에서는 키토산의 NH_2 기와 f-MWCNT의 COOH 기의 상호작용 및 HAp의 칼슘 이온과의 일부 부가적인 배위 상호작용 때문에 다공도가 더 감소하였다.

[0058] 물 흡수능 및 보유능의 평가

[0059] 하기 절차를 이용하여 스캐폴드의 물 흡수능과 보유능을 연구하였다. 무수 스캐폴드를 칭량하고(W_{dry}) 증류수에 24시간동안 담그었다. 이어서, 24시간 후에 스캐폴드를 비이커로부터 조심스럽게 제거하고, 와이어 그물 선반(wire mesh rack) 위에 놓았다. 과량의 물을 배수시키고, 5분 후에 스캐폴드를 칭량하여(W_{wet}) 물 흡수능을 결정하였다.

[0060] 물 보유능 측정을 위해서는 젖은 스캐폴드를 바닥에 여과지가 있는 원심분리관으로 옮기고, 3분동안 500rpm으로 원심분리(Combi514-Hanil Science Industrial)하고, 즉시 칭량하였다(W'_{wet}).

[0061] 측정된 키토산, 키토산/HAp 스캐폴드 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 W_{dry} , W_{wet} 및 W'_{wet} 을 하기 표 2에 기재하였다:

표 2

[0062]

	W_{dry}	W_{wet}	W'_{wet}
키토산 스캐폴드	0.0611	1.5386	0.3526
키토산/HAp 스캐폴드	0.1596	2.0589	0.5082
f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드	0.2110	1.9871	0.5988

[0063] 평형 상태의 스캐폴드의 물 흡수능(E_A) 및 물 보유능(E_R)의 백분율을 하기 수학식을 이용하여 계산하였다:

$$E_A = \left[\frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \right] \times 100$$

[0064]

$$E_R = \left[\frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \right] \times 100$$

[0065]

[0066] 측정 결과, 키토산 스캐폴드의 물 흡수 및 물 보유능이 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에 비해서 더 높았다(도 2(b)).

[0067] 상기 결과로부터 명백한 바와 같이, 순수한 키토산에 HAp 및 f-MWCNT를 첨가하였더니 물 흡수능이 감소하였다. 또한, 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 물 보유능은 약간의 차이만을 가질 뿐 유사하나, 순수한 키토산 스캐폴드에 비해서는 훨씬 낮았다. 그 원인의 일부는 세라믹 첨가 및 f-MWCNT의 소수성 특징에 기인한다. HAp는 자연 뼈의 중요한 구성성분으로, 스캐폴드 제조를 위해서 뼈와 유사한 조성을 갖도록 하기 위해 HAp 70중량%를 사용하였으므로, 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에 의한 낮은 물 보유능이 허용될 수 있고, 골조직 공학에서 사용되는데 아무런 문제가 되지 않는다.

[0068] 인산염 완충액(PBS)에 의한 시험관내 분해

[0069] 키토산은 인체 유액 및 조직에서의 세포의 환경을 모방한 PBS에 의해 분해되는 것으로 나타났다. 본 발명에서 0.1M PBS를 침윤액, 및 분해 및 구조적 안정성을 연구하기에 적합하고 신뢰할만한 매질(medium)로서 선택하였다.

[0070] 인산나트륨 1가 및 인산나트륨 2가 7수화물을 사용하여 0.1M PBS를 제조하고, pH는 7.2로 조정하였다. PBS 10 mL을 함유하는 시험관에 키토산 스캐폴드 0.0748 g, 키토산/HAp 스캐폴드 0.2498 g 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드 0.2295 g를 각각 담그고, $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 계속 진동시켰다. 상기 스캐폴드를 5, 10, 15, 20, 25 및 30일동안 담근 후에 꺼내고, 탈이온수로 세정하고, 동결 건조하고, 다시 칭량하였다. 그 결과, 키토산 스캐폴드 0.0084 g, 키토산/HAp 스캐폴드 0.061 g 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드 0.0544 g이었다. 키토산 스캐폴드 및 복합 스캐폴드의 3개 parallel 시료를 이용하였다.

[0071] 중량 손실(WL)은 하기 수학식에 따라 계산하였다:

$$WL = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\%$$

[0072]

[0073] 상기 식에서,

[0074] W_0 및 W_1 은 각각 침지 전후의 시료 중량을 나타낸다.

[0075] 키토산 스캐폴드는 0.1M PBS에서 30일 침지시킨 이후에 본래 중량의 약 30%까지 분해되는 반면, 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp에서의 분해 속도는 더 느렸다(30일 후에 약 10% 분해). 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 분해 속도가 더 느린 원인은 HAp 및 f-MWCNT가 스캐폴드 물질에 부가되었기 때문이다.

[0076] f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 경우에 물이 스캐폴드 내로 침투하여 f-MWCNT-g-키토산 간의 결합을 파괴하여 높은 중합체 사슬로부터 짧은 중합체 사슬을 생성시킴으로써 분해를 증가시킨 것으로 보인다.

[0077] 열안정성 평가

[0078] 스캐폴드의 열안정성을 TGA 분석에 의해 측정하였다.

[0079] Pyris 7TGA 분석기(Perkin-Elmer Inc., USA)를 사용하여 $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 의 일정한 가열 속도로 50°C 내지 900°C 의 스캔 범위에서 질소를 연속적으로 흘리면서 열중량 분석을 실시하였다.

[0080] TGA 및 DTG 곡선으로부터, 키토산 잔기에 해당하는 키토산 중량 손실을 304°C 에서 관찰하였다. 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 복합 스캐폴드의 경우, 약 17.8% 및 17.12%의 중량 손실이 각각 304.12°C 및 302.08°C 에서 관찰되었고, 이는 키토산 잔기 때문이다. f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에서 관찰된 약간의 온도 차이는 f-MWCNT 및 키토산 간의 일부 공유 결합때문일 수 있다. 900°C 에서 키토산 스캐폴드는 모든 중량을 잃은 반면, 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에서는 중량 손실이 관찰되지 않아서 HAp의 높은 열안정성을 나타내었다. 본 결과는 복합 스캐폴드 물질이 고온에서 매우 안정함을 증명한다.

[0081] FT-IR 분광분석

[0082] 스캐폴드 구성성분간의 분자간 상호작용을 나타내기 위하여 푸리에 변환 적외선 분광분석기(Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Perkin-Elmer, 미국) 및 스펙트럼 GX 분광계를 사용하여 600 내지 4000cm^{-1} 범위에서 시료의 신축 주파수(stretching frequency)를 연구하였다.

[0083] 도 3은 HAp, f-MWCNT, 키토산, 키토산/HAp 및 CNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 FT-IR 스펙트럼이다. HAp의 경우, 스펙트럼은 보고된 바와 같이 천연 HAp의 특징적인 흡수 밴드를 나타낸다. 이 밴드는 1031 내지 1089cm^{-1} 에서 신축하는 $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$, 962cm^{-1} 에서의 $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, 570cm^{-1} 에서 비대칭 bending 신축하는 $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, 1412 내지 1415cm^{-1} 에서의 $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ 및 872cm^{-1} 에서의 $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ 이었다. 키토산 스캐폴드의 경우, 스펙트럼은 이미 보고된 바와 같이 키토산의 전형적인 특징 흡수 밴드, 즉, 1736cm^{-1} 에서 카보닐 기(C=O), 1418cm^{-1} 및 1377cm^{-1} 에서 C-H rock 신축 및 bending, 및 1145cm^{-1} , 1077cm^{-1} 및 1030cm^{-1} 각각에서 아민 신축 주파수 $\nu_s(\text{N-H})$, 피라노오스(pyranose) $\nu_3(\text{C-O-C})$ 신축 모드를 나타낸다. 또한, f-MWCNT의 특징적인 신축 주파수는 1738cm^{-1} 에서의 $\nu(\text{COOH})$ 에서 관찰되었고, OH 신축 주파수는 3500cm^{-1} 에서 관찰되었다. 진동의 CH rock 모드는 1365cm^{-1} 에서 관찰되었다.

[0084] 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 복합 스캐폴드의 FT-IR 스펙트럼은 키토산, HAp 및 f-MWCNT과 같은 모든 원료 물질의 특징적인 피크를 함유한다. f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 FT-IR 스펙트럼은 1638cm^{-1} (아미드기에 해당)에서 새로운 강한 흡수를 나타내었으며, 이는 f-MWCNT의 $-\text{COOH}$ 기가 키토산의 $-\text{NH}_2$ 와 반응하여, 이를 아미드($-\text{CONH}-$) 기로 전환시킴을 의미한다. 이러한 독특한 밴드 주파수는 키토산과 f-MWCNT 간의 접합(f-MWCNT-g-키토산)이 형성되었음을 명백히 나타낸다.

[0085] X-선 회절분석

[0086] X-선 회절계(PHILIPS X'Pert-MPD diffractometer, 네덜란드) 및 Cu-K α 방사선($1.5405\text{\AA}$)을 사용하여 5° 내지 80° 각도 범위, 0.02의 스텝 크기(step size), $4^{\circ}/\text{min}$ 스캔 속도로 40kV 및 30mA에서 키토산, 천연 HAp, f-MWCNT, 키토산/HAp 및 CNT-g-키토산/HAp의 회절 패턴의 상 및 결정도를 평가하였으며, 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0087] 키토산 스캐폴드에서는 키토산의 특징적인 피크에 각각 상응하는 10.5° , 20.0° (최대 강도) 및 22.5° 에서 3개 주요 피크가 관찰되었다. 상기 피크 각도 20.0° 는 3가지 스캐폴드 유형 모두에서 발견되었으며, 3가지 스캐폴드 유형 모두에 키토산이 존재함을 확인시켜준다. 키토산/HAp 복합 스캐폴드의 경우에, 회절 피크는 25.4° 및 31.4° 에서 관찰되었고, 이는 HAp의 존재를 나타낸다. f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 경우에 강한 흡수 피크가 26.3° , 32.3° , 32.7° , 33.4° 및 47.1° 에서 관찰되었고, 이는 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스

캐폴드에서 HAp 입자의 결정도 상태가 불량함을 나타낸다.

[0088] 주사전자현미경 및 광학현미경 분석

[0089] 주사전자현미경(SEM HITACHI S-2400, 일본)으로 스캐폴드의 다공성 및 형태를 연구하고, 그 결과를 도 5에서 (a) 키토산 스캐폴드, (b) 키토산/HAp 스캐폴드, (c) f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드, (d) 키토산 매트릭스 중의 HAp 분산으로 나타내었다. 상기 SEM 이미지에 따르면, 복합 스캐폴드는 거의 동일한 다공성 구조를 갖고 양호하게 상호연결된 3차원 구조이었다. 또한, 상기 SEM 이미지에 따르면, HAp 입자는 키토산에 균일하게 분산되어 있다(도 5(d)). 상호연결된 다공성 구조가 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp에서 발견되었으나, 키토산 스캐폴드에는 존재하지 않았다. 이는 키토산 스캐폴드의 가요적 양태에 근거한 것일 수 있다. 중합체 매트릭스 내의 HAp 입자 및 f-MWCNT의 균일한 분포가 관찰되는데, 이는 키토산 망상구조(network)의 전기적 하전 특성에 기인한다.

[0090] 키토산/HAp 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드의 세공 크기는 SEM으로 측정될 때 각각 70 μ m 내지 200 μ m 및 46 μ m 내지 200 μ m으로 다양하다. 이 결과는 보다 큰 세공 크기(100 μ m)를 갖는 스캐폴드에서 세포 이동 및 증식이 더 많음을 시사한다. 본 발명자들은 상기 결과 패턴으로부터, f-MWCNT를 중합체 및 세라믹 매트릭스에 첨가하면 상호연결된 세공 크기를 증가시킬 수 있다는 결론에 이르렀다.

[0091] 키토산 매트릭스 중의 HAp 입자 및 f-MWCNT의 분산을 광학 현미경으로 관찰한 결과를 도 6에 도시하였다. 광학 현미경의 입사광은 키토산 매트릭스를 쉽게 침투하는 반면, HAp 및 f-MWCNT는 입사광을 반사시킨다. 키토산의 광학 현미경 이미지에선 부적절한 다공성 구조가 명백히 나타나는 반면, HAp 및 f-MWCNT 중합체 매트릭스가 부가되면 다공성이 향상된다. f-MWCNT-g-키토산/HAp의 광학 현미경 이미지는 f-MWCNT가 매트릭스에서 약간 응집되면서 충분히 분산되어 있는 상태를 보여준다. 이는 f-MWCNT가 키토산 매트릭스내에 균일하게 분포되어 있음을 나타내며, 이러한 결과는 SEM 관찰과 일치하는 것이다.

[0092] 시험관내 세포독성 분석 및 세포 증식

[0093] 골조직 공학용 스캐폴드는 세포 부착, 증식, 조직 성장 및 적절한 영양분 흐름을 위해 생물학적 환경이 고 다공성이고 상호연결된 다공성 구조일 것을 필요로 한다. 각각의 스캐폴드의 세포독성 효과 및 세포증식을 MTT 분석을 통해 연구하였다.

[0094] 5% 소태아혈청, 2mM 글루타민 및 100 μ g/ml 페니실린-스트렙토마이신으로 보충한 DMEM 배지에서 MG-63 세포(인간 골육종 세포주)를 배양하고, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂의 가습 분위기에서 배양하였다. 살아있는 세포에 의한 MTT 염료 흡수를 측정함으로써 MG-63 세포독성 및 세포증식에 대한 스캐폴드의 시험관내 효과를 결정하였다.

[0095] 세포를 6웰 플레이트에서 3 x 10⁵ 세포/well의 농도로 증식시켰다. 24시간 후에, 세포를 신선한 배지로 세척하고, 2가지 상이한 농도(10 및 20mg ml⁻¹)의 스캐폴드 물질로 처리하였다. 스캐폴드 물질을 첨가하지 않은 세포를 대조군으로 하였다. 48시간 배양한 후에, 세포를 다시 세척하고, MTT(1mg ml⁻¹) 100 μ l를 첨가하고, 4시간 더 배양하였다. 마지막으로, 다이메틸 설펝사이드를 첨가하여서, 형성된 포르마잔 염을 용해시키고, aGENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Tecan Austria GmbH, 오스트리아)를 이용하여 540nm에서 OD를 측정함으로써 포르마잔 염의 양을 측정하였다. 포르마잔 염으로 전환되는 MTT 양에 의해 상대적인 세포 생존도를 측정하였다. 세포 생존도를 대조군과 비교하여 그에 대한 백분율로 정량화하였다.

[0096] 스캐폴드 상에서의 세포 증식에 대하여 각각의 스캐폴드의 3개 복제물을 24웰 세포 배양 플레이트에 놓고, 3.7 x 10⁴ 세포/웰 세포 현탁액을 스캐폴드 상에 종균(seed) 적가하였다. 이어서, 스캐폴드를 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양하여서 세포가 상기 물질에 부착되도록 하고, 이어서 신선한 배지 1.5 ml를 각각의 웰에 첨가하였다. 시료를 포함하지 않는 세포 배양물은 대조군으로 하였다. 배양 1, 2 및 3일 후에 배지를 제거하고, MTT 분석을 통해 세포독성 분석을 실시하였다.

[0097] f-MWCNT-g-키토산/HAp의 세포독성은 MG-63 세포주에서는 발견되지 않았다. 복합 스캐폴드의 세포 생존도가 키토산 스캐폴드의 생존도보다 높았다. 이는 스캐폴드에 HAp 결정이 첨가되기 때문이다. 또한, 3가지 스캐폴드 전부는 MG-63 세포주를 사용하여 시험될 때 비독성인 것으로 밝혀졌다. 스캐폴드 상에서의 MG-63의 세

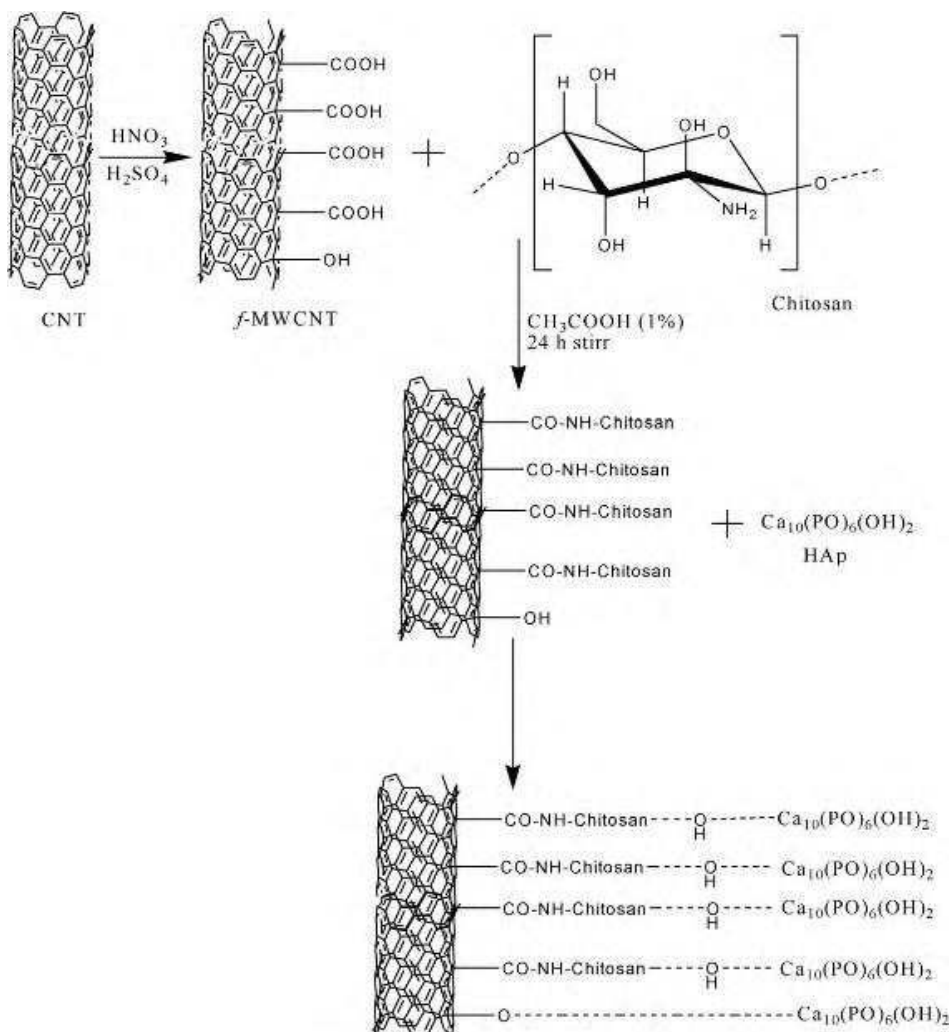
포 증식은 키토산 스캐폴드에 비해 복합 스캐폴드의 경우에 2배인 것으로 관찰되었다.

[0098]

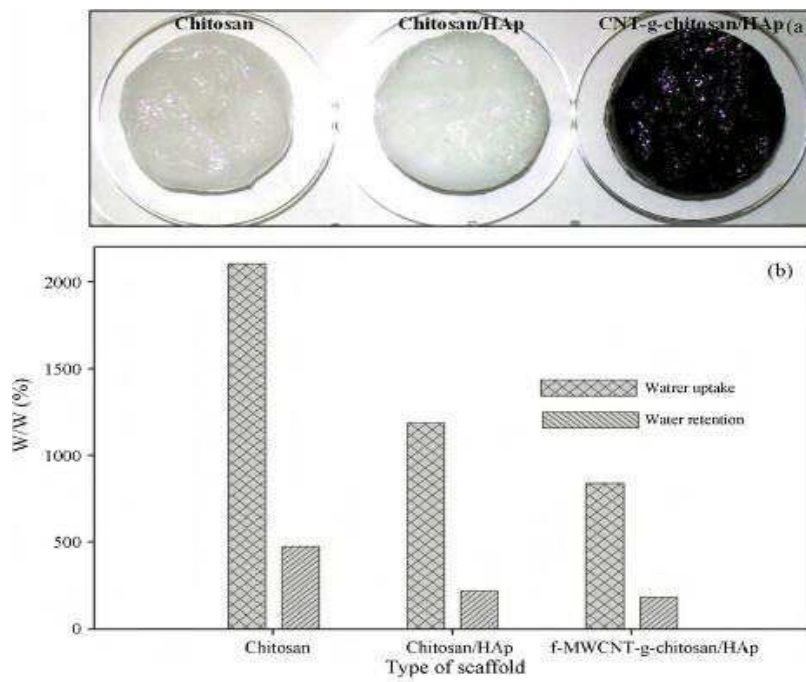
본 발명자들은 뼈의 세포외 매트릭스의 필요 특성 전부를 모방하기 위하여 동결건조 방법에 의해 신규한 f-MWCNT-g-키토산/HAp 복합 스캐폴드를 개발하였다. 키토산의 $[\text{NH}_3^+]$ 와 f-MWCNT의 $[\text{COO}^-]$ 기의 이온 가교결합 및 f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드에 있는 HAp와 키토산의 금속 상호작용이 명백하게 관찰되었다. 우수한 열 안정성, 상호연결된 다공성, 제어되는 시험관내 분해 및 세포 증식과 같은 특성에 근거하여, f-MWCNT-g-키토산/HAp 스캐폴드가 골조직 공학 분야에서 매우 유망한 용도를 갖는 신규한 복합 스캐폴드라는 결론에 이르렀다.

도면

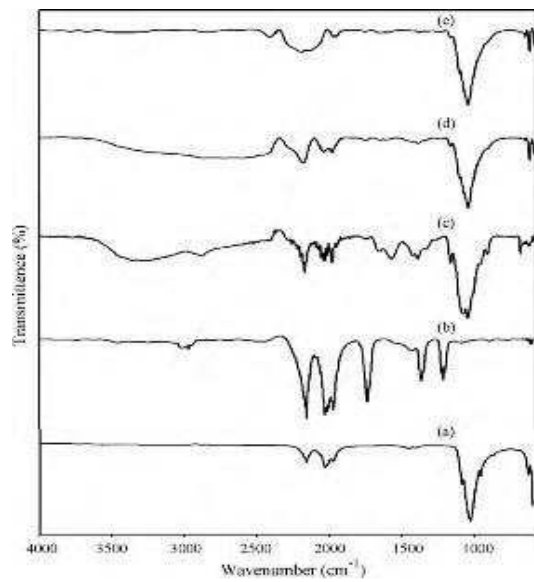
도면1



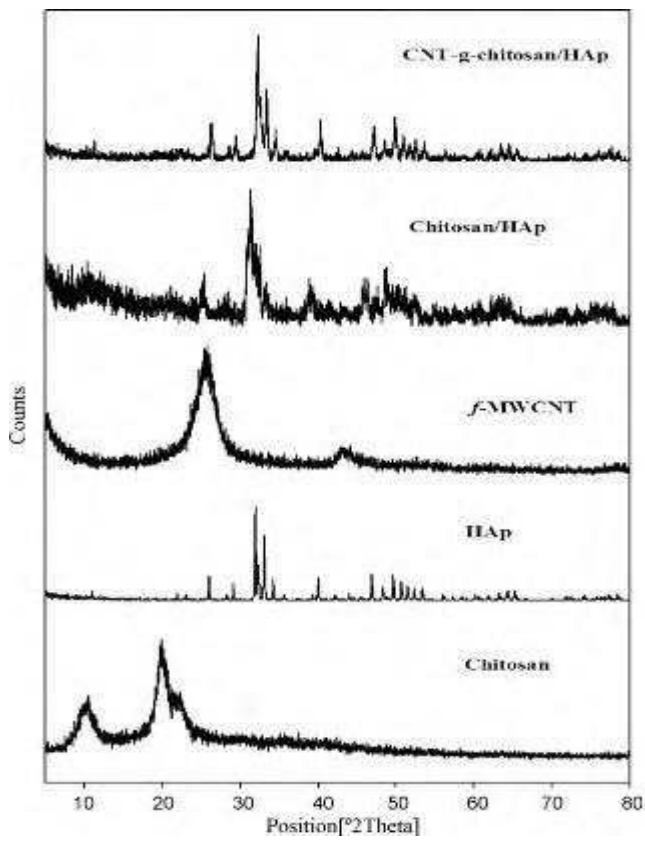
도면2



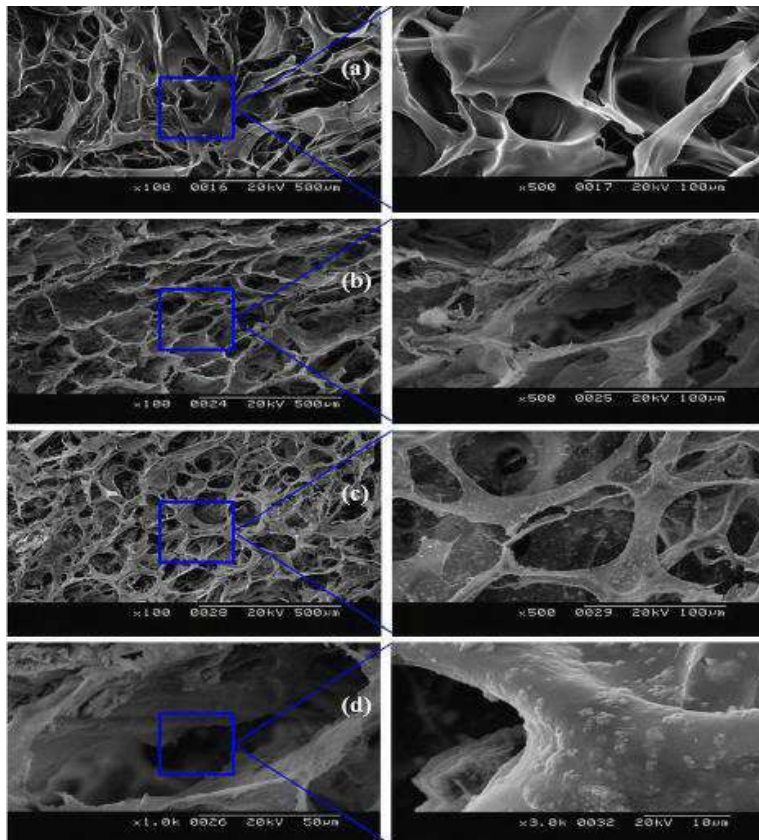
도면3



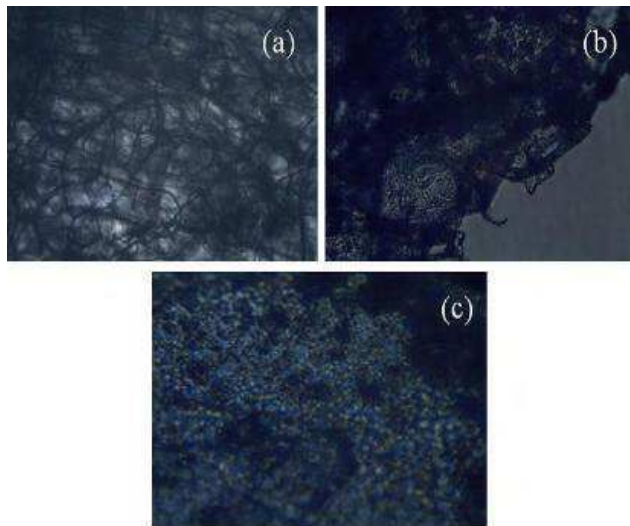
도면4



도면5



도면6



도면7

