(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0034557
(43) 공개일자 2016년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/22 (2006.01) *A61F 2/28* (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01) *A61L 27/56* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0125486
(22) 출원일자 2014년09월22일
심사청구일자 2014년09월22일
기술이전 희망 : , **실시권허여, 기술지도**

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박찬흠
강원도 춘천시 지석로 67 현진에버빌2차 204-1302
이옥주
강원도 평창군 진부면 오대천로 703-2
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

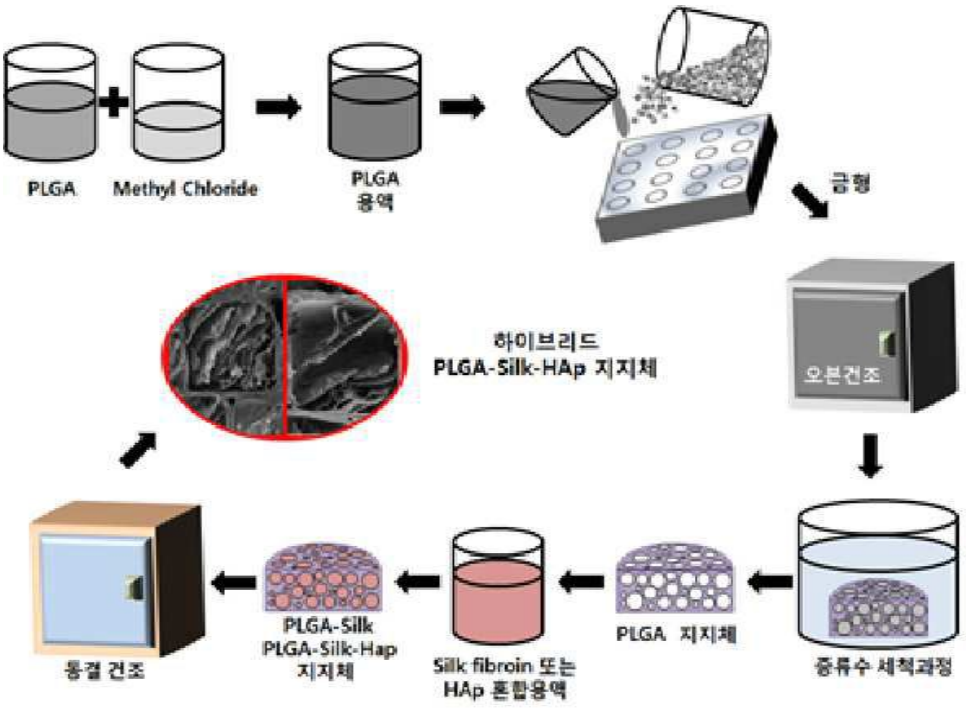
(54) 발명의 명칭 **골 재생을 유도하는 PLGA-Silk 하이브리드 구조체 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 실크단백질을 포함한 골 유도 인공 뼈 지지체 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 누에고치 또는 견섬유에서 추출한 실크단백질(또는 실크피브로인)에 하이드록시아파타이트 나노입자와 혼합하여 PLGA 지지체와 물리적으로 결합한 인공 뼈 지지체에 대한 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



현대에 이르러 손상된 골조직을 정상적인 골조직으로 대체하거나 재생시키려는 시도를 하고 있으며, 이에 따라 체내 이식을 위한 골조직의 개발에 관심이 증대 되고 있다. 하지만, 타인이나 동물의 뼈를 이식하는 방법이나 환자 자신의 조직을 이식하는 방법을 많이 사용하고 있지만 타의 조직을 이식함으로써 면역학적 거부반응이 발생되거나 손상부위가 커서 환자 몸에서 사용할 수 있는 재료가 충분하지 않은 경우가 생기기도 한다. 따라서 수급이 용이하고 다양한 형태로 제조 가능하며 안전한 인공 뼈를 개발이 필요한 상황이다.

상기 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 실크 피브로인의 대량 생산성, 생분해성, 골 재생 기능, 뛰어난 생체 적합성, 생물학적 위험성이 없다는 장점과 PLGA (polylactic-glycolic acid)의 안전성, 기계적 강도 생분해성의 장점을 혼합하여 두 물질의 구조, 형태적으로 PLGA 지지체가 실크 피브로인 지지체를 감싸고 있는 물리적으로 혼합된 하이브리드 지지체 구조를 제작하여 상기 두 물질의 장점을 갖춘 인공뼈를 제공하고자 한다.

(72) 발명자

주형우

경기도 남양주시 도농로 34 부영아파트1단지 508-2302

이정민

경기도 구리시 원수택로12번길 27, 201호

김정호

강원도 춘천시 복골길 3

문보미

서울특별시 도봉구 마들로 735-8 현대성우아파트 101-808

박현정

인천광역시 중구 하늘달빛로 113 우미린 2단지 753-1501

김동욱

서울특별시 노원구 동일로 1456 주공아파트 712-1506

이민채

경기도 구리시 원수택로 6-15 현암아파트 가동 201호

김수현

경기도 남양주시 진건읍 독정로 124-9

정주연

강원도 춘천시 효석로 67 석사아파트 110-507

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ009051062014
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린 21사업
연구과제명	진피용 실크 소재 연구
기 여 율	1/1
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

4wt%의 실크피브로인과 2wt%의 하이드록시아파타이트 용액을, PLGA 지지체에 물리적으로 결합시킨 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공뼈 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인공 뼈 조성물은 BMP-2, BMP-12, 인산칼슘 (calcium phosphate)로 이루어진 군중에서 하나 이상을 선택하여 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물

청구항 3

하이드록시아파타이트를 실크 피브로인 용액과 혼합물을 형성하는 제1단계; 공극을 포함하는 PLGA 지지체를 형성하는 제2단계; 상기 PLGA 지지체에 상기 제1단계의 혼합물 용액을 침투시켜 소수성인 PLGA 지지체와 결합하면서 친수성 및 세포친화성을 증가시키는 제3단계; 및 상기 지지체를 동결건조 하는 제4단계를 포함하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 제조 방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 내부 공극 형성 방법은 염 추출법, 동결 건조법, 직조 방법, 발포제를 이용한 방법, 및 전기 방사법 등으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 하이드록시아파타이트를 실크 피브로인 용액과 혼합물을 형성하는 제1단계와 상기 지지체를 동결건조 하는 제4단계 사이에 BMP-2, BMP-12, 인산칼슘 (calcium phosphate)로 이루어진 군중에서 하나 이상을 선택하여 더욱 포함하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 제4단계 이후에 상기 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈를 불용화 처리하는 제5단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 불용화 처리는 메탄올, 에탄올, 프로판올로 이루어진 군 중에서 하나 이상을 선택하여 처리하는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 불용화 처리는 수화 또는 고온 처리를 하는 것을 특징으로 하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 실크 피브로인 (또는 실크 단백질)을 포함한 골 유도 인공 뼈 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈는 인체를 지탱하며 동작을 수행하는 기계적 기능 이외에 체내의 칼슘이온 농도를 조절하는 역할을 하며, 골

수에서 인체에 필요한 적혈구 및 백혈구를 생산하는 중요한 생리적 기능을 한다. 뼈는 높은 기계적 강도를 가진 조밀한 구조인 피질골과 내부 스펀지와 같은 구조인 지주골로 이루어진다. 사람은 연령이 증가함에 따라 골밀도가 떨어져 작은 충격에도 쉽게 골절을 일으키게 되며, 골다공증, 관절염으로 손상되고, 이와 같은 생리적, 물리적 손상으로 골절이 발생되면 골 재생이 어려워 진다.

[0003] 뼈 재생의 치료 방법은 자연적인 치료나 약물 또는 물리적 요법에 의한 치료방법 정형외과 수술에 의한 치료 방법 등이 존재하며, 골에 대한 손상 정도가 커서 회복이 어려운 경우, 정상조직은 보호하고 손상된 조직은 제거한다. 현대에 이르러 손상된 골조직을 정상적인 골조직으로 대체하거나 재생시키려는 시도를 하고 있으며, 이에 따라 체내 이식을 위한 골조직의 개발에 관심이 증대 되고 있다. 손상된 골조직의 보완을 위하여 골수유래줄기세포와 같은 세포를 이용하여 골 형성 효과를 증대시키려는 생체 조직 인공 뼈를 개발하려는 연구가 진행 중에 있기도 하며, 타인이나 동물의 뼈를 이식하는 방법이나 환자 자신의 조직을 이식하는 방법도 있지만 타의 조직을 이식함으로써 면역학적 거부반응이 발생되거나 손상부위가 커서 환자 몸에서 사용할 수 있는 재료가 충분하지 않은 경우가 생기기도 한다. 따라서 수급이 용이하고 다양한 형태로 제조 가능하며 안전한 인공 뼈를 개발이 필요한 상황이다.

[0004] 현재 인공 뼈 개발은 18세기 후반에는 귀금속 재료로 만든 철선, 핀 등으로부터 시작하여, 그 이후 합금들의 개발과 설계 및 외과 기술의 발달로 금속핀, 접골용 금속판, 나사 골수정 등 다양한 체내외 고정물이 개발되었다. 이러한 생체금속 재료에는 스테인레스 스틸, 코발트-크롬 (Co-Cr) 합금, 티타늄 (Ti) 금속 등이 있으며, 이런 재료로 만든 인공 뼈는 부식, 마모, 헐거워짐 또는 매식체 파괴에 따른 재수술의 경우가 있는 것이 단점이 있다. 세라믹 소재는 생체 적합성이 우수하며, 부식이 없고, 압축강도가 좋은 장점을 갖는 반면, 절단강도가 낮고 여러 형태의 고정기구로 만들기 어려우며, 유연하지 못하다는 단점이 있다. 하지만 아직까지 금속, 세라믹을 사용하여 정형외과, 성형외과, 심장 및 혈관외과, 피부비뇨기과, 안과, 뇌신경외과, 치과재료, 세포배양 등의 생체공학에서 광범위하게 응용되고 있으며, 인공 뼈는 정형외과용 뼈 고정용 (판, 스크루, 와셔, 핀 등), 뼈 수복재로 충진재, 대체재로 사용되고 있다.

[0005] 골 조직을 재생시키는 목적은 손실된 골 조직을 대치 또는 회복 시키기 위해 본래의 골조직과 유사한 조직을 만드는 것이다. 즉 골세포가 잘 부착하여 증식하고 분열 할 수 있는 다공성 주형인 지지체를 제조하여 골 형성인자 및 골세포를 지지체에 넣고 배양하여 뼈 조직 생성하기도 한다. 현재 인공 뼈에 가장 많이 사용되는 세라믹은 HAp (하이드록시아파타이트) 와 트리칼슘포스페이트류 (tricalcium phosphates, TCPs)이며, 이들은 좋은 골전도성과 골 부착성을 지녀 골수복에 유용하다. 그러나 다공체로 만들었을 때 기계적 물성이 현저하게 감소되어 가공상의 제약이 있기 때문에 다른 제제와의 혼합으로 단점을 극복할 수 있다고 생각된다.

[0006] 실크는 보통 누에로부터 얻는 섬유상의 단백질 소재를 말하는데, 의류용 소재로 널리 이용되어 왔으며, 최근에는 새로운 천연 고분자 자원으로 이용하려는 연구가 진행 되고 있다. 실크 단백질의 조성이 인체 피부를 구성하고 있는 콜라겐 단백질의 아미노산 조성과 매우 유사하여 피부 친화성에 기초한 식품 및 화장품 소재에 사용되고 있으며, 효소 고정화 담체, 세포 배양 지지체 등 생물 공학용 소재 및 창상 피복재, 인공 혈관 등 의료용 소재로 사용되고 있다.

[0007] 실크 단백질은 콜레스테롤 및 혈당 저하, 알코올 대사 촉진, 치매 예방 및 치료 효과, 기억력 증진 효과가 있는데 이러한 기능은 아미노산, 즉 글리신, 알라닌, 세린, 티로신 등의 약리효과와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 콜라겐이나 피브로넥틴 등은 세포 배양 지지체로 사용되고 있는 대표적인 천연 고분자 물질이며, 이들은 공통적으로 세포인식기능을 가지고 있다고 알려져 있는 Arg-Gly-Asp(RGD) 트리펩타이드(tripeptide)를 가지고 있다. 이는 세포의 부착과 증식을 촉진하는 역할을 하는데, 실크 피브로인 구조에도 존재한다.

[0008] 이러한 실크 단백질의 특징은 바이오 뼈와 인공피부의 응용 가능성을 보이고, 실크 피브로인은 세포의 부착과 분화에 긍정적인 효과가 입증되었다. 그러나, 실크 단백질은 뼈와 같은 기계적 강도를 가지고 있지 않으므로 인공뼈로서의 응용에 한계가 있고 일정한 형태로 가공이 어렵다는 제약이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 실크 피브로인의 대량 생산성, 생분해성, 골 재생 기능, 뛰어난 생체적합성, 생물학적 위험성이 없다는 장점과 PLGA (polylactic-glycolic acid)의 안전성, 기계적 강도 생분해성의 장점을 혼합하여 두 물질의 구조, 형태적으로 PLGA 지지체가 실크 피브로인 지지체를 감싸고 있는 물리적으로

혼합된 하이브리드 지지체 구조를 제작하여 상기 두 물질의 장점을 갖춘 인공뼈를 제공하고자 한다. 상기 지지체를 포함하여 주변 골 조직과 융합되어 새로운 골조직의 재생을 유도하고, 최종적으로 인공 뼈는 생분해되는 인공 뼈를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 4wt%의 실크피브로인과 2wt%의 하이드록시아파타이트 용액을, PLGA 지지체에 물리적으로 결합시킨 골재생용 실크 피브로인 인공뼈를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하이드록시아파타이트를 실크 피브로인 용액과 혼합물을 형성하는 제1단계; 공극을 포함하는 PLGA 지지체를 형성하는 제2단계; 상기 PLGA 지지체에 상기 제1단계의 혼합물 용액을 침투시켜 소수성인 PLGA 지지체와 결합하면서 친수성 및 세포친화성을 증가시키는 제3단계; 및 상기 지지체를 동결건조하는 제4단계를 포함하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 제조 방법을 제공한다.

[0012] 상기 공극을 포함하는 PLGA 지지체의 공극 형성 방법은 염 추출법, 동결 건조법, 직조 방법, 발포제를 이용한 방법, 및 전기 방사법 등으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이 바람직하다.

[0013] 바람직하게는, 본 발명은 골 유도 과정에 관여하는 BMP-2, BMP-12, 인산칼슘 (calcium phosphate)로 이루어진 군중에서 하나 이상을 선택하여 더욱 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 제4단계 이후에 상기 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈를 불용화 처리하는 제5단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 불용화 처리는 메탄올, 에탄올, 프로판올로 이루어진 군 중에서 하나 이상을 선택하여 처리하거나, 수화 처리하거나 고온 처리를 할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 의하면 두 가지 물질이 구조적, 형태적인 특징인 적절한 공극과 기계적 강도를 유지함으로써 인공 뼈로서의 물리적 기능을 대체 할 수 있고 주변 골 조직의 재생을 유도 함으로써 골 치유 효과가 있다. 또한 시간이 지남에 따라 인공 뼈는 인체 내에서 생분해 되어 제거됨에 따라 정상적인 골 조직으로 재생 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 실크 피브로인 용액 제조 과정이다.

도 2는 PLGA, PLGA-Silk, PLGA-Silk-HAp 3군의 골 재생용 인공 뼈 제조 방법이다.

도 3은 동결건조와 염 추출법으로 제조된 Silk fibroin과 PLGA 지지체의 단면구조 (A) 동결건조로 제조된 silk 지지체의 단면, (B) 염 추출법으로 제조된 PLGA-Silk 지지체의 단면, (C) 염 추출법으로 제조된 PLGA-Silk 지지체의 단면, (D) 염 추출법으로 제조된 PLGA-Silk-HAp 지지체의 단면이다.

도 4는 변압 전계방사형 주사전자현미경 (VP-FE-SEM)으로 측정한 혼합 지지체의 EDS 결과. (A) Silk 지지체, (B) PLGA 지지체, (C) PLGA-Silk 지지체, (D)PLGA-Silk-HAp 지지체, (표기 S는 실크 부분, 표기 P는 PLGA 부분, 표기 HAp는 하이드록시아파타이트 나노입자를 나타낸다. (스케일 바 100 mm.)

도 5는 (A)지지체의 팽윤력 측정결과, (B) 지지체의 수분흡수율 측정결과, (C) 지지체의 공극률 측정결과, (D) 지지체의 물 접촉각 측정결과이다.

도 6은 HAp NPs, Silk, PLGA, PLGA-Silk, PLGA-Silk-HAp, 지지체의 퓨리에 변환 적외선 분광계(FT-IR) 분석결과이다.

도 7은 HAp NPs , Silk, PLGA, PLGA-Silk, PLGA-Silk-HAp, 지지체의 열 중량 분석법(TGA) 측정 결과이다.

도 8은 Silk, PLGA, PLGA-Silk, PLGA-Silk-HAp 지지체의 압축강도 측정결과.

도 9는 Silk, PLGA, PLGA-Silk, PLGA-Silk-HAp 지지체의 골아세포 배양 후 MTT 분석을 통한 세포적합성 관찰결과이다. (1,7,14일)

도 10은 DAPI 염색법을 통한 골아세포 4주 배양 후 형광현미경 관찰결과. (A) Silk 지지체, (B) PLGA 지지체, (C) PLGA-Silk 지지체, (D) PLGA-Silk-HAp 지지체이다.

도 11은 두개골 결손 Rat 모델 실험방법. (A) 직경 3mm의 골 결손 부위 생성, (B) 골 결손부위에 지지체 이식,

(C) 피부 절개 부위 봉합, (D) 지지체 이식부위 피부 절개, (E) 지지체 이식부위 두개골 적출한 것이다.

도 12는 두개골 결손 Rat 모델의 H&E 염색법을 통한 조직학적 관찰 결과(4주 후), (A) Control, (B) Silk 지지체, (C) PLGA 지지체, (D) PLGA-Silk 지지체, (E) PLGA-Silk-HAp 지지체이다.

도 13은 두개골 결손 Rat 모델의 Micro-CT를 통한 조직학적 관찰 결과(4주 후), (A) Control, (B) Silk 지지체, (C) PLGA 지지체, (D) PLGA-Silk 지지체, (E) PLGA-Silk-HAp 지지체이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 4wt%의 실크피브로인과 2wt%의 하이드록시아파타이트 용액을, PLGA 지지체에 물리적으로 결합시킨 골 재생용 실크 피브로인 인공뼈 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 실크피브로인의 기계적인 강도를 높이기 위해 PLGA를 물리적으로 혼합하여 뼈와 비슷한 강도를 갖도록 하고, 실크피브로인을 뼈의 무기염류 주성분인 하이드록시아파타이트 (Hap) 와 혼합하므로써 가공상 제약을 완화시킬 수 있는 실크피브로인에 PLGA 및 하이드록시아파타이트를 물리적으로 결합한 골 재생용 실크 피브로인 인공뼈 조성물 및 그의 제조방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 하이드록시아파타이트를 실크 피브로인 용액과 혼합물을 형성하는 제1단계; 공극을 포함하는 PLGA 지지체를 형성하는 제2단계; 상기 PLGA 지지체에 상기 제1단계의 혼합물 용액을 침투시켜 소수성인 PLGA 지지체와 결합하면서 친수성 및 세포친화성을 증가시키는 제3단계; 및 상기 지지체를 동결건조 하는 제4단계를 포함하는 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 제조 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 인공 뼈는 실크 피브로인을 높은 기계적 강도를 가지는 PLGA와 혼합함으로써 지지체로서 필요한 물리적 강도를 획득할 수 있다. 또한, 뼈의 구성 성분인 하이드록시아파타이트를 함유함에 따라, 골 세포의 분화 및 증식, 유도, 부착에 용이하다. 또한, 본 발명은 골 재생이 진행됨에 따라 본 발명에 따른 인공 뼈가 인체 내에서 스스로 생분해 되어 최종적으로 제거되는 것을 특징으로 골 재생용 실크 인공 뼈의 제조 방법을 제공한다.

[0021] 바람직하게는 상기 제조방법의 하이드록시아파타이트를 실크 피브로인 용액과 혼합물을 형성하는 제 1단계와 상기 지지체를 동결건조 하는 제4단계 사이에 골 유도 과정에 관여하는 하이드록시아파타이트, BMP-2, BMP-12, 인산칼슘(calcium phosphate)로 이루어진 군중에서 하나 이상을 선택하여 더욱 포함할 수 있으며, 상기 다양한 골 재생 인자를 함유시켜 골 재생을 촉진 시킬 수 있다.

[0022] 본 발명에 의하면 적절한 공극과 기계적 강도를 유지하여 인공 뼈로서의 물리적 기능을 대체 할 수 있고 주변 골 조직의 재생을 유도 함으로써 골 치유 효과가 있다. 또한 시간이 지남에 따라 인공 뼈는 인체 내에서 생분해 되어 제거 됨에 따라 정상적인 골 조직으로 재생 될 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈는 골 대체체로서 충분한 기계적 강도와 골 재생 능력을 제공함으로써 골절 및 골 결손 환자에서 골 재생 인공 뼈로 유용하게 사용될 수 있다.

[0024] 다시 설명하면, 본 발명에 따른 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물은 실크 피브로인 원액을 준비하는 공정, 하이드록시아파타이트와 실크 피브로인 용액을 혼합하는 공정, PLGA 지지체의 공극을 형성하는 공정, 상기 세 물질을 혼합 및 내부 공극을 더욱 형성하는 공정, 및 결정화 공정으로부터 제조될 수 있다.

[0025] 본 발명은 상기 혼합및PLGA 지지체의 공극을 채우면서 내부 공극을 형성하는 공정에 의해 골 재생 유도 효과와 우수한 기계적 강도를 가지게 되며, 인체 내에서 더욱 용이하게 생분해 되는 실크 피브로인 인공 뼈를 제조할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈 조성물의 제조 방법에서 상기 제4단계 이후에 상기 골 재생용 실크 피브로인 인공 뼈를 불용화 처리하는 제5단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 불용화 처리는 메탄올, 에탄올, 프로판올로 이루어진 군 중에서 하나 이상을 선택하여 처리하거나, 수화 처리하거나 고온 처리를 할 수 있다. 상기 불용화 처리를 함으로써 실크 피브로인 인공 뼈의 지지체는 본래의 구조를 유지하는데 더욱 유리하다.

[0027] 이하 실시 예를 통해 본 발명을 설명한다. 그러나, 이는 발명의 이해를 용이하게 하기 위한 것일 뿐, 발명이 이

에 한정되는 것으로 여겨져서는 안 된다.

[0028] 각 단계에 대해 구체적으로 설명한다.

[0029]

[0030] 1. 재료 및 방법

[0031] 1.1 시약 및 재료

[0032] 실크 생사는 울진농원에서, 하이드록시아파타이트(Hap, Hydroxyapatite)는 바이오 알파에서 공급받았다. 또한 PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid) 몰비 75:25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균 분자량 90-126 kD인 것을 사용하였다. NaCl (sodium chloride, Orient Chem. Co. Korea)은 다공 생성 물질로 이용 되었으며 180-259mm의 결정을 사용하였다. MC (Methyl Chloride, Tedia Co In, Phillipsburg, USA), Cell culture에 필요한 시약은 MEM(Welgene, Gibco,)을 사용하였으며 세포 독성 테스트는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Duchefabiochemie, Haarlem, The Netherlands)를 사용하였다. Tiletamine/Zolazepam HCl (Zoletil, Virbac, France)와 Xylazine HCl (Rompun, Bayer, korea) (1:2) 용액을 사용하여 쥐 마취용으로 사용하였다.

[0033] 1.2 실크 피브로인 추출

[0034] 누에고치 (Bombyx mori)로부터 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거했다. 이를 위해 잘게 자른 후 0.02 M Na2CO3 이나 염기성 수용액에 넣고 1시간 동안 100로 가열하고 증류수로 2-3번 세척하는 과정을 거쳤다. 상기 과정을 거친 실크 피브로인을 clean bench에서 하루 동안 건조 시켰으며, 건조된 실크 피브로인은 CaCl2/Ethanol/H2O(1:2:8,moleratio)용액에 15wt%의 농도로 95에서 40분간 동안 용해시켰다. 다음 한번 더 불순물 제거를 위해 miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA)로 걸러 주었다. 걸러진 실크 피브로인 용액을 12,000-14,000 Da (Spectra/Por, Rancho Dominguez, CA, USA) 투석막에 넣고 증류수에서 3일 동안 투석하여 순수한 실크 피브로인 용액(SF)을 제조하였다. 이때 제조된 실크 피브로인의 최종 농도를 7-9 wt%로 했다.

[0035] 1.3 PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트(PLGA-Silk-Hap) 지지체 제작

[0036] 지지체의 기계적 강도 보완 및 골 재생 능력 향상을 위해 PLGA, 실크 피보로인, 하이드록시아파타이트로 구성된 실크 피브로인 혼합 지지체를 제조했다. 8wt% 실크 피브로인 용액과 4wt% 하이드록시아파타이트 와 혼합하여 준비했다. 하이드록시아파타이트는 나노입자 (nanoparticle) 이기 때문에 고르게 분산시켜 주기 위해서 증류수에 4 wt% 혼합하여 주고 Sonication (operating 20 kHz, amplitude 20%, 15분)을 시행했다. 8wt% 실크 피브로인 용액과 4wt% 하이드록시아파타이트를 1 : 1 로 혼합하였다. 최종적으로 4wt% 실크 피브로인, 2wt% 하이드록시아파타이트의 혼합 용액을 준비했다. PLGA는 소수성이며 강도가 우수하기 때문에 지지체의 뼈대 구조로 제작하여 준비하였다. 먼저 PLGA를 메칠클로라이드(methyl chloride, MC)에 20wt%로 상온에서 overnight 해주며 녹여 주었다. PLGA 용액을 NaCl particles (180-250mm)과 1 : 9 비율로 혼합하여 준 후, 미리 준비하여둔 실리콘 금형(silicon molds, 지름 7mm, 높이 3mm)에 채워주었다. 금형(Mold)에 채워진 지지체를 Carver Press (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 사용하여 24시간동안 상온에서 60 kgf/cm2의 힘으로 압력을 가해주었다. PLGA 지지체에 남은 용매를 제거하기 위해 1주간 진공오븐(vacuum oven)에서 25로 유지하여 주었다. 완성된 PLGA 지지체를 실크 피브로인-하이드록시아파타이트(Silk-Hap) 혼합 용액에 담궈 주었다. PLGA 지지체는 소수성을 띄기 때문에 친수성인 실크 피브로인-하이드록시아파타이트(Silk-Hap) 용액의 침투가 어렵다. 따라서 진공펌프(vacuum pump)를 이용하여 PLGA 지지체 안의 공극에 실크 피브로인-하이드록시아파타이트 (Silk-Hap) 용액을 채워주었다. 제조된 지지체를 -80에서 동결 시킨 후, 동결건조를 행하여 수분을 모두 제거해 주었다. 동결건조시 실크 피브로인은 무작위의 작은 공극 구조를 가지게 된다.

[0037] 이를 제조하는 과정은 다음과 같다.

[0038] 1.3.1 실크 피브로인 지지체 제작

[0039] 실크 피브로인 지지체는 8wt%로 제작된 실크 피브로인 용액을 증류수로 희석하여 4 wt%의 실크 피브로인 용액으로 제작하였다. 4 wt%의 실크 피브로인 용액을 네모 그릇(square dishes)에 넣은 후 -80에서 12시간 동안 동결시켰다. 완전히 동결된 샘플을 24시간 동안 동결건조하여 지지체 내의 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 실크 피브로인 지지체의 불용화를 유도하기 위해 100% Et-OH에 15분 동안 담궈준 후에 농도별 Et-OH로 치환하여 최종적으로 Et-OH를 제거한 실크 피브로인 지지체를 완성하였다.

[0040] 1.3.2 PLGA 지지체 제작

[0041] PLGA 지지체는 NaCl leaching 방법을 이용하여 제작하였다. 먼저 PLGA를 메칠클로라이드(methyl chloride, MC)에 20wt%로 상온에서 overnight해주며 녹여 주었다. PLGA 용액을 NaCl particles (180-250mm)과 1 : 9 비율로 혼합하여 준 후, 미리 준비하여둔 실리콘 금형(silicon molds, 지름 7mm, 높이 3mm)에 채워주었다. 금형(Mold)에 채워진 지지체를 Carver Press (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 사용하여 24시간동안 상온에서 60 kgf/cm2의 힘으로 압력을 가해주었다. 샘플의 남은 용매를 제거하기 위해 1주간 진공오븐(vacuum oven)에서 25를 유지하여 주었다.

[0042] 1.3.3 PLGA-실크 피브로인 지지체 제작

[0043] PLGA-실크 피브로인 지지체를 제작하기 위해 위와 같은 방법으로 4 wt% 실크 피브로인 용액을 준비하였다. PLGA 역시 위와 동일한 방법으로 PLGA 지지체를 준비하였다. 소수성의 PLGA 지지체에 친수성인 4 wt% 실크 피브로인 용액을 넣기 위해 4-6회 진공(vacuum) 스위치를 켰다 껐다(on and off)를 하였다. 그리고 -80에서 동결하여 준 후, 24hr 동결건조하고 100% Et-OH에 담궈서 결정화 하였다.

[0044] 1.4 실크 피브로인 함유 골 지지체 불용화 처리

[0045] 상기 제작된 PLGA-Silk-HAp 지지체에서 실크 피브로인은 친수성으로 물에 쉽게 녹아 구조를 유지하기 어렵기 때문에, 생체내 분해도 조절 및 물성 유지를 위해 불용화 공정을 거쳤다. 불용화 공정으로는 메탄올, 에탄올, 프로판을로 처리하거나, 수화 처리 또는 고온 처리를 함으로써 PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 구조를 유지했다. PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 뼈 재생효과 및 구조적 특징, 물성 분석을 위해 대조군으로 각각 단독의 실크 피브로인 지지체, PLGA 지지체, PLGA-실크 피브로인 지지체를 사용하여 비교했으며 다음과 같이 실험을 진행 하였다.

[0046] 2. 상기방법으로 제조된 지지체의 분석

[0047] 2.1 SEM, FT-IR, TGA를 통한 지지체의 구조분석 방법

[0048] Korean Basic Science Institute (Chuncheon)에서 Variable pressure field emission scanning electron microscope (VP-FE-SEM, S-3500N, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다. 샘플은 수직으로 절단하여 카본 테이프(carbon tape)에 올려놓고 gold/palladium를 120초, 10nm의 두께로 코팅한 후 샘플 단면을 관찰하였다. 또한 VP-FE-SEM에 장착된 EVO LS10를 통하여 EDS를 측정하였다. FT-IR (BIO-RAD Excalibur Series, FT-IR Spectrometer, Cambridge, U.S.A)를 이용하여 spectra range 2250-500 cm-1를 측정하였다. 열에 의한 지지체의 분해도 측정을 위해 thermal analysis system (TA Instruments, New Castle, DE, USA)를 사용하였으며, 측정은 30 to 700, 가열 속도는 10C/min로 하고, 질소(nitrogen)를 100mL/min로 주입하여 주었다.

[0049] 2.2 PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 구조분석 결과

[0050] 상기 방법으로 제작된 PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 구조를 확인하기 위하여 주사 전자현미경을 이용하여 관찰 하였다. 모두 골 지지체로 사용하기 적합한 공극 구조를 가지고 있으며 이러한 공극 구조는 골 분화 세포들의 침투가 가능한 크기이다. 각 공극 중 PLGA로 만들어진 비교적 큰 공극 안에 실크 피브로

인, HAp 혼합 용액으로 만들어진 작은 공극이 분포하고 있는 구조로써 PLGA의 큰 공극은 기계적 강도를 증가 시키고 작은 공극은 서로 연결되어 골 세포 재생시 세포간 물질대사 및 가스교환을 용이하게 한다. 동시에 작은 크기의 공극은 골 세포의 침투가 용이하며, 골 세포의 밀도가 적당할 것으로 예상된다.

[0051] SEM-EDS 분석결과 각각 실크 피브로인, PLGA, 하이드록시아파타이트가 분리 및 혼합되어 일정한 구조로 배열되어있는 것을 각각의 피크(PLGA는 N이 없음, 실크 피브로인은 단백질의 대표적 특징인 N이 있음, 하이드록시아파타이트는 Ca와 P의 피크)로 확인하였고 이처럼 소수성 PLGA와 친수성 실크 피브로인-하이드록시아파타이트의 물리적 혼합이 친수성을 가지는 세포 부착 및 침투, 증식에 유리할 것으로 판단 되었다.

[0052] FT-IR 측정 결과 PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트의 각각의 고유 피크가 혼재되어 있는 것을 확인하였다. PLGA-실크 피브로인-하이드록시아파타이트에서 실크 단백질의 고유 피크인 Amide (1624), Amide (1511), Amide (1228)와 하이드록시아파타이트의 1022, 601, 559의 피크, PLGA의 1748, 1179의 피크가 혼재 되어 있는 것을 확인 하였다.

[0053] TGA 분석결과 열에 의한 지지체 변성의 시작 온도는 각각 실크 피브로인은 274, PLGA는 301, PLGA-실크피브로인은 298, 및 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트는 317로 측정 되었고 하이드록시아파타이트가 첨가 됨에 따라 열에 의한 안정성이 높아지는 것을 확인하였다. 이와 같은 변성온도의 변화를 보아 각각의 제제들이 화학구조적 변화 없이 물리적으로 혼합된 것을 확인 할 수 있었다.

[0054] 2.3 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 물성 평가

[0055] 2.3.1 팽윤력, 물 흡수도 측정

[0056] 상기 실시예에서 제작된 실크피브로인골지지체의팽윤력및물흡수도테스트를위해, 각 지지체를 지름 6mm, 두께 2mm 크기로 펀칭(punching)하여 증류수에 24시간동안 침지시켜 준비하였다. 이때 지지체가 물에 충분히 젖은 무게는 Ws로 기입하고 모든 지지체를 60 오븐에서 진공 건조 시켜준 후의 무게를 Wd로 기입하였다. 마지막으로 각각의 수치를 이용하여 다음과 같은 식에 대입함으로써 팽윤력 및 물 흡수도를 계산하였다.

[0057] $$\text{Swelling ratio}(\%) = \frac{Ws - Wd}{Ws} \times 100$$

[0058] $$\text{Water uptake}(\%) = \frac{Ws - Wd}{Ws} \times 100$$

[0059] 2.3.2 공극률 측정

[0060] 각 지지체를 위와 같은 방법으로 동일하게 펀칭한 후, Et-OH를 사용하여서 공극률을 측정 하였다. Et-OH를 사용한 이유는 실크 피브로인은 친수성을 띄지만 PLGA는 소수성을 띄기 때문에, 이에 따른 오차를 줄이기 위하여 Et-OH를 사용하였다. 지지체를 넣기전, Et-OH가 담겨있는 실린더 볼륨을 측정하여 V1으로 기록하였다. 지지체를 넣고 5분간 침지 후 Et-OH의 총 볼륨을 측정하여 V2로 기록하고, Et-OH에 침지된 지지체를 제거하고 난 후 실린더의 볼륨을 측정하여 V3로 기록하였다. 마지막으로 지지체의 공극률 측정을 위하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

[0061] $$\text{Prosity}(\%) = \frac{(V1 - V3)}{(V2 - V3)} \times 100$$

[0062] 2.3.3 물 접촉각 측정

[0063] Contact angle microscope (LEICA. E24D, software LAS EZ)를 사용하여 지지체 위에서 물 접촉각을 측정하였다. 각 지지체를 위와 같은 방법으로 동일하게 펀칭한 후, 슬라이드 글라스 위에 올려두고 15ml 세포배양액(cell culture media)을 지지체 위에 떨어뜨려 주었다. 30초 후 물 접촉각을 측정 하였다.

[0064] 2.3.4. 지지체의 물성 측정 결과

[0065] 팽윤력 측정 결과 실크 피브로인 지지체가 가장 높은 수치를 나타내었으며, PLGA가 가장 낮은 수치를 보였다. 예상되는 바와 같이 PLGA-실크피브로인은 실크피브로인과 PLGA의 중간 수치를 나타내었고 하이드록시아파타이트가 포함됨에 따라 증가하였지만 유의성있게 증가하지는 않았다. 물 흡수도 측정 결과 역시 팽윤력과 같은 양상으로 특정되었다.

[0066] 상기 팽윤력 및 물 흡수도가 증가한 수치의 의미는 체내에 삽입시 골 세포들이 발현하는 각종 성장 인자를 오랜 시간 담아 낼 수 있다는 것을 의미하고 세포와 세포의 물질 대사 및 가스교환이 용이하기 때문에 골 재생에 더욱 도움을 줄 수 있다 것을 의미한다.

[0067] 공극률 측정 결과 실크 피브로인 지지체의 공극률이 가장 높았으며 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트의 공극률이 가장 낮았다. 이와 같은 결과는 단독 물질로 제작된 지지체보다 혼합물질로 제작된 지지체의 공극이 줄어드는 양상을 나타낸다. 하지만, 위와 같은 결과는 5%내외의 공극률 차이를 보였기에 유의성있는 차이는 아니었다.

[0068] 물의 접촉각 측정 결과 역시 실크피브로인이 첨가되면 증가하고, 하이드록시아파타이트가 첨가되면 더욱 증가하는 것으로 확인되었다. 따라서 단독 PLGA 지지체 보다 실크 피브로인이 첨가 되었을 때 친수성이 높아지고, 하이드록시아파타이트가 첨가 되었을 때 친수성은 더욱 높아지는 것으로 확인 하였다. 상기 결과로 미루어보아 소수성인 PLGA 지지체에 실크피브로인과 하이드록시아파타이트의 혼합물질이 첨가됨으로 전체 지지체의 극성이 친수성을 띄게 되며, 이와 같은 결과는 세포친화성 및 세포부착력과 밀접한 관련이 있다.

[0069] 2.3.5 기계적 압축 강도 측정

[0070] 6mm Biopsy punch를 사용하여 각 샘플을 지름 6mm 두께 2mm의 round disk 형태로 펀칭하였다. 준비된 샘플은 Universal Testing Machine (QM 100)으로, 지그헤드 속도는 5mm/min으로 설정하여 준 후 기계적 압축 강도를 측정하였다. 압축 강도 측정 결과 단독 실크 피브로인, PLGA 지지체에 비하여 PLGA-실크피브로인 지지체의 압축강도가 증가함을 확인 하였고, 하이드록시아파타이트가 첨가 됨에 따라 더욱 증가하는 것을 확인하였다. 골 대체제의 기능 특성상 압축강도는 매우 중요하므로 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트는 골 대체제로서 물리적 기능을 대체 할 수 있는 가장 바람직한 형태인 것으로 생각된다.

[0071] 2.3.6 세포 생존율 및 독성 테스트

[0072] 세포 생존률 및 세포 독성테스트를 하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) assay를 진행하였다. 각각의 지지체는 지름 6mm, 두께 2mm로 절단한 후 멸균 후 96well에 넣어 두었다. 세포는 랫트의 장골로부터 추출한 조골세포(Osteoblast)를 사용하였으며 2 X 105cell/ml의 세포를 각각의 지지체에 100ml (2 X 104cell/100ml)씩 분주 하였다. 세포의 지지체 부착이 쉽도록 30분동안 37, 5% CO2인 큐베이터에서 배양하고 난 후 새로운 배지(media)를 100ml씩 더 넣어 주었다. 세포배지는 DMEM (10% FBS, 1% A/A)을 사용하였고, 주 2회 새로운 배지로 갈아주며 37도, 5% CO2 인큐베이터에서 1, 7, 14일 배양하였다. 각각의 관찰 시기에 MTT와 배지를 1:9로 혼합한 배지로 교체 하여 주고 2시간 동안 인큐베이션 하면서 세포의 반응을 유도 하였다. 반응이 완료 된 지지체를 DMSO에 넣어 발색을 유도한 후 발색된 DMSO를 각각 100ml씩 새로운 96well에 넣고 ELISA를 사용하여 540nm의 파장으로 측정하였다.

[0073] 1일차 세포의 증식률은 비교적 큰 차이 없이 비슷한 수치를 띄고 있지만 기간이 지남에 따라 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트의 지지체에서 높은 세포 증식률이 확임 됨에 따라 세포 독성은 없고 오히려 증식률을 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0074] 2.3.7 지지체 세포의 침투력

[0075] 위와 동일하게 조골세포(Osteoblast)를 4 주 동안 배양한 후, 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)에 4시간동안 보관하여 세포를 고정 시켰다. 일반적인 파라핀 섹션 (paraffin section) 과정을 진행하여 지지체의 단면적을 관찰하였으며, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 세포의 핵을 염색하였다. 관찰은 DAPI 필터와 FITC 필터를 사용하였으며 세포의 핵은 파란색으로, 실크피브로인은 자발형광 (autofluorescent)을 가지

기 때문에 녹색으로 관찰되었다. 관찰 결과 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트에서 많은 세포의 개수와 지지체 깊숙히 파고들어 증식 한 것으로 관찰되었고, 따라서 본 발명에 따른 인공 뼈는 생채내에서 골 재생 능력이 탁월 할 것으로 생각된다.

[0076] 3. 골 재생효과 측정

[0077] 본 연구에서 제작된 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 골 재생 효과를 확인하기 위해, 동물 모델에서의 골 재생 효과를 확인 하였다. 실험 동물로는 쥐를 사용하였으며, 마취 후 지름 3㎜의 두개골을 제거하였다. 제거된 부위에 멸균된 각각의 지름 3㎜, 높이 0.5㎜의 지지체를 삽입 하고 완전히 봉해 주었다. 4주 동안 사육한 뒤 마이크로-CT(micro-CT)로 촬영하고 H&E 염색(Stain)을 통하여 관찰 하였다.

[0078] H&E 결과에서 대조군(Blank)의 경우 골조직이 자라 들어오기 전 재생이 빠른 섬유아세포의 증식으로 골조직의 재생이 지연됐음을 확인할 수 있었고, 실크 피브로인, PLGA, PLGA-실크피브로인 지지체의 경우 지지체가 완전히 생분해 되지 않았으며 새로운 골조직 역시 완전히 재생되지 못했다. 하지만 PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트 지지체의 경우 새로운 골 조직이 재생되었으며 지지체는 완전히 분해 된 것을 확인 할 수 있었다.

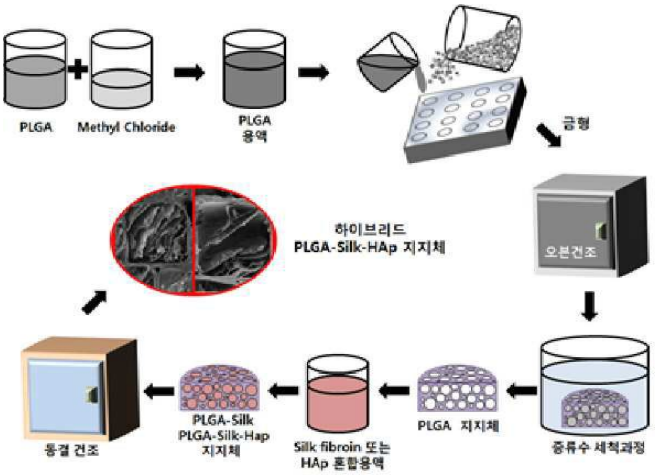
[0079] 역시, 마이크로-CT 결과에서도 H&E 염색과 같은 양상이 관찰 되었으며, PLGA-실크피브로인-하이드록시아파타이트의 골 재생 능력이 우수한 것으로 관찰 되었다.

[0080] 따라서 본 발명에 따른 실크 피브로인, PLGA, 하이드록시아파타이트 지지체는 조직 재생용 지지체 뿐만 아니라 정형외과적 인공 뼈, 치주 조직 재생 유도재 및 골 이식재 등으로 활용 될 수 있다.

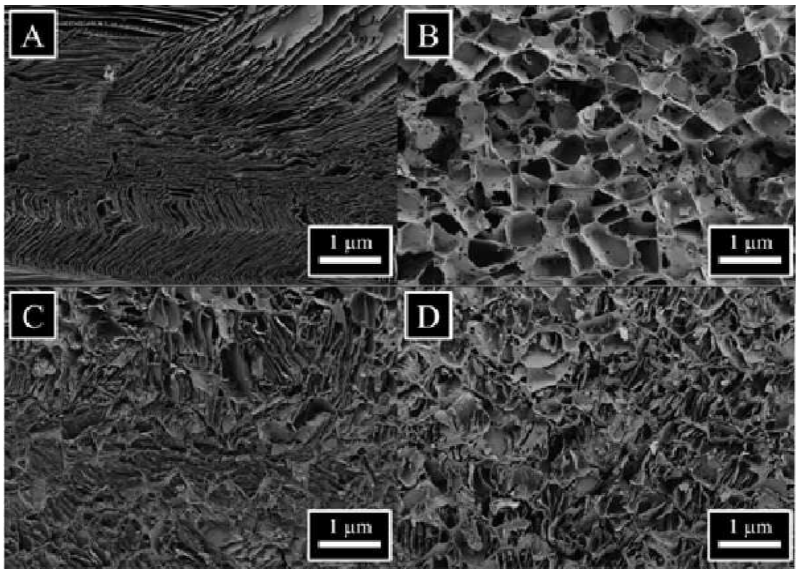
도면

도면1

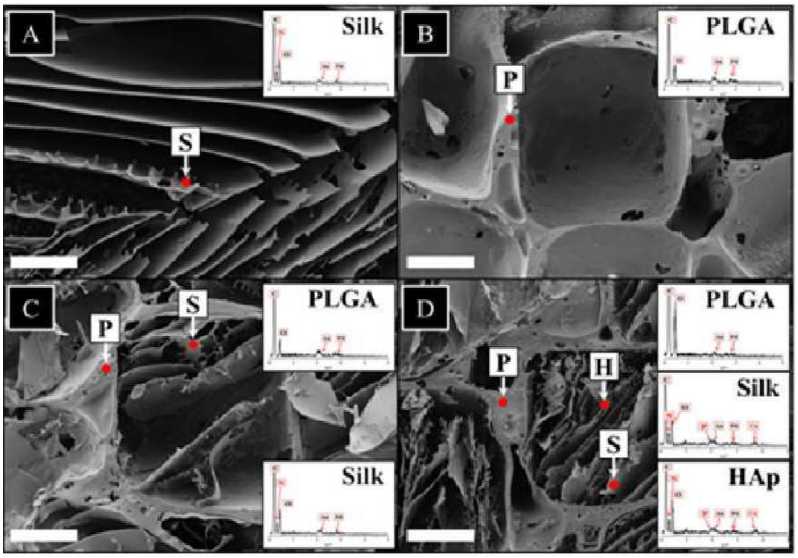
도면2


PLGA
Methyl Chloride
PLGA
용액
금형
하이브리드
PLGA-Silk-HAp 지지체
오븐건조
증류수 세척과정
PLGA 지지체
Silk fibroin 또는
HAp 혼합용액
PLGA-Silk
PLGA-Silk-Hap
지지체
동결 건조

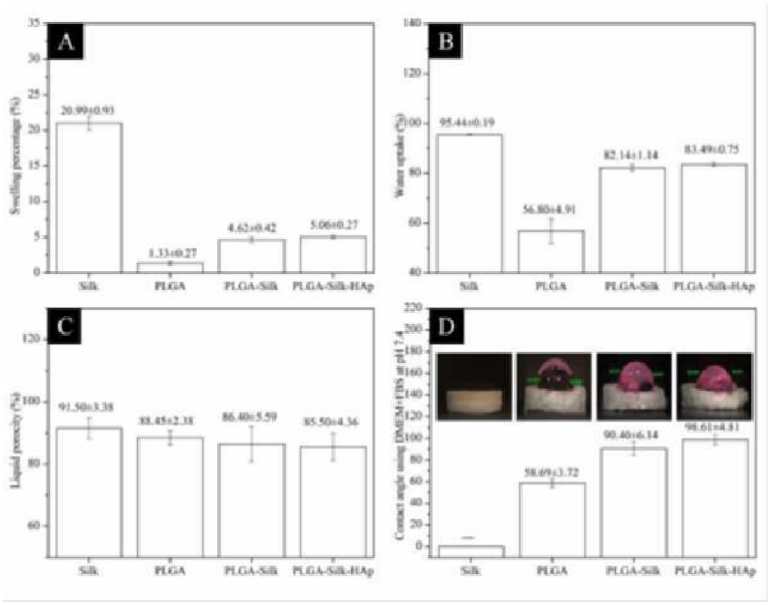
도면3


A
B
C
D
1 μm
1 μm
1 μm
1 μm

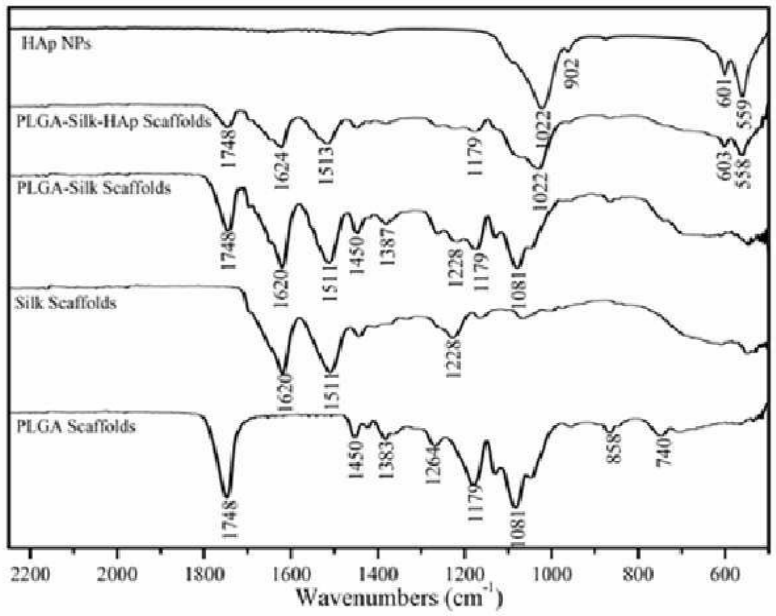
도면4


A
Silk
S
B
PLGA
P
C
P
S
PLGA
Silk
D
PLGA
P
H
Silk
S
HAp

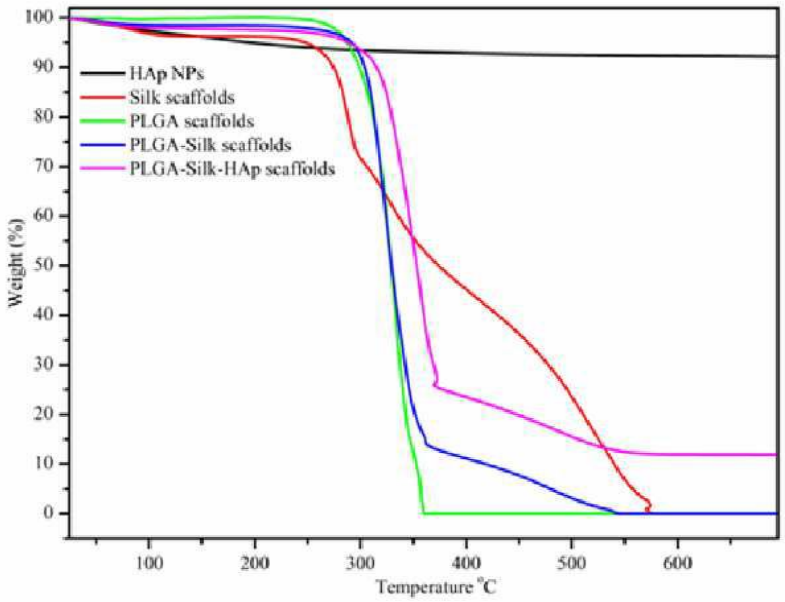
도면5


A
20.99±0.93
1.33±0.27
4.62±0.42
5.06±0.27
Silk
PLGA
PLGA-Silk
PLGA-Silk-HAp
B
95.44±0.19
56.80±4.91
82.14±1.14
83.49±0.75
C
91.50±3.38
88.45±2.38
86.40±5.59
85.50±4.36
D
58.09±3.72
90.40±6.14
98.61±4.81

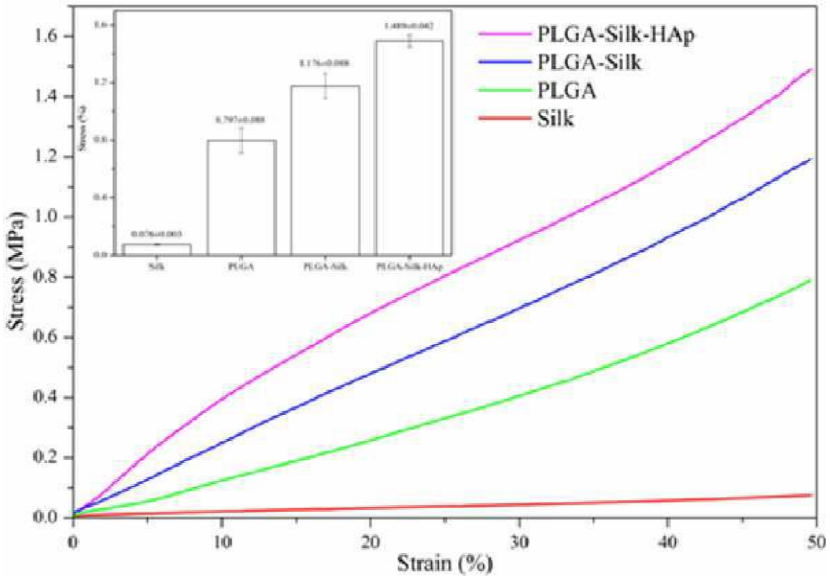
도면6


HAp NPs
902
601
559
PLGA-Silk-HAp Scaffolds
1748
1624
1513
1179
1022
603
558
PLGA-Silk Scaffolds
1748
1620
1511
1450
1387
1228
1179
1081
Silk Scaffolds
1620
1511
1228
PLGA Scaffolds
1748
1450
1383
1264
1179
1081
858
740
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
Wavenumbers (cm-1)

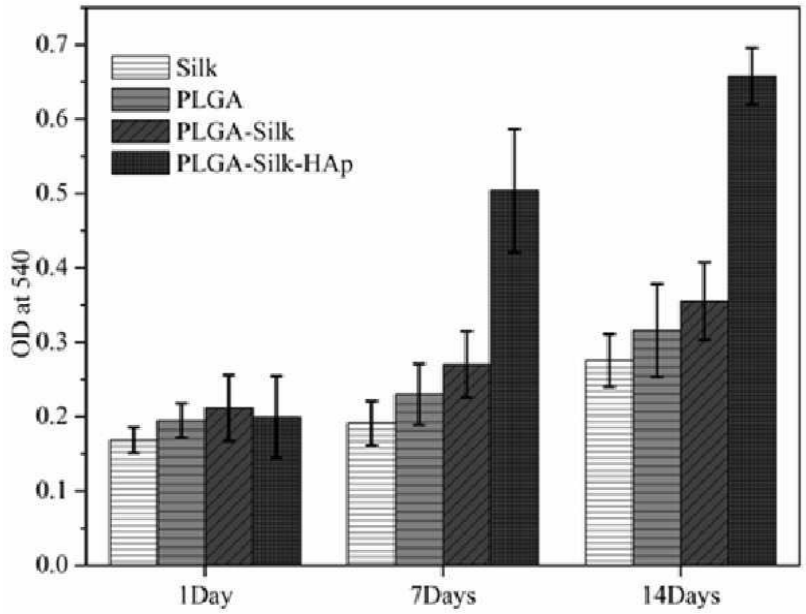
도면7


HAp NPs
Silk scaffolds
PLGA scaffolds
PLGA-Silk scaffolds
PLGA-Silk-HAp scaffolds
Weight (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100
200
300
400
500
600
Temperature °C

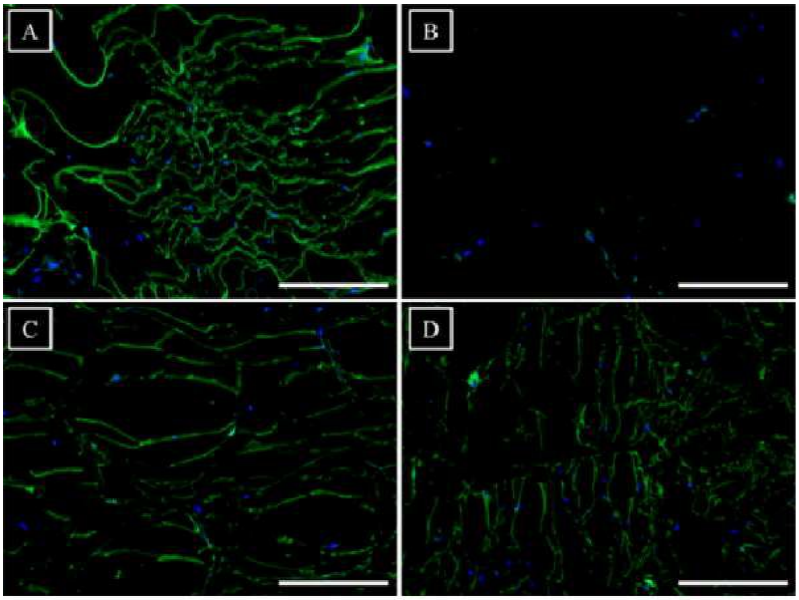
도면8


PLGA-Silk-HAp
PLGA-Silk
PLGA
Silk
Stress (MPa)
Strain (%)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
0
10
20
30
40
50

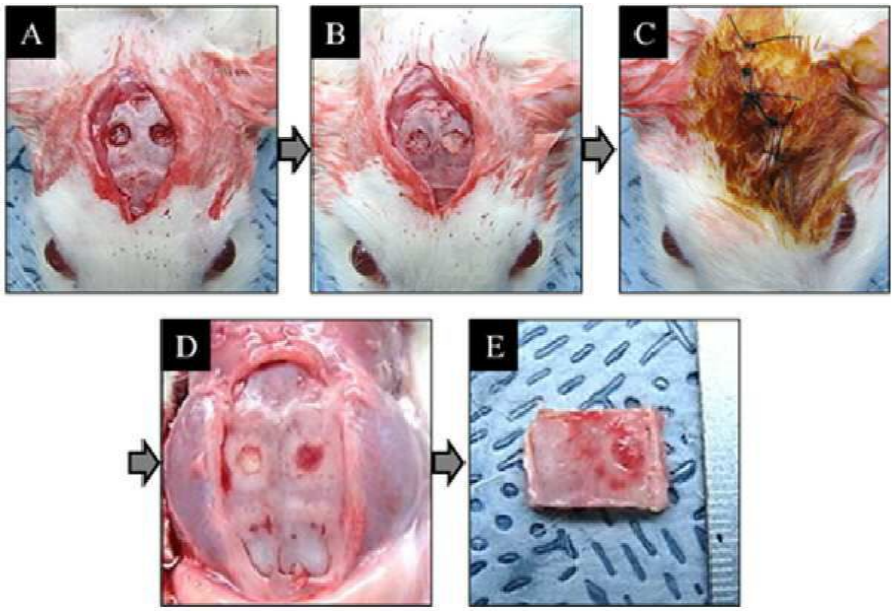
도면9


Silk
PLGA
PLGA-Silk
PLGA-Silk-HAp
OD at 540
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
1Day
7Days
14Days

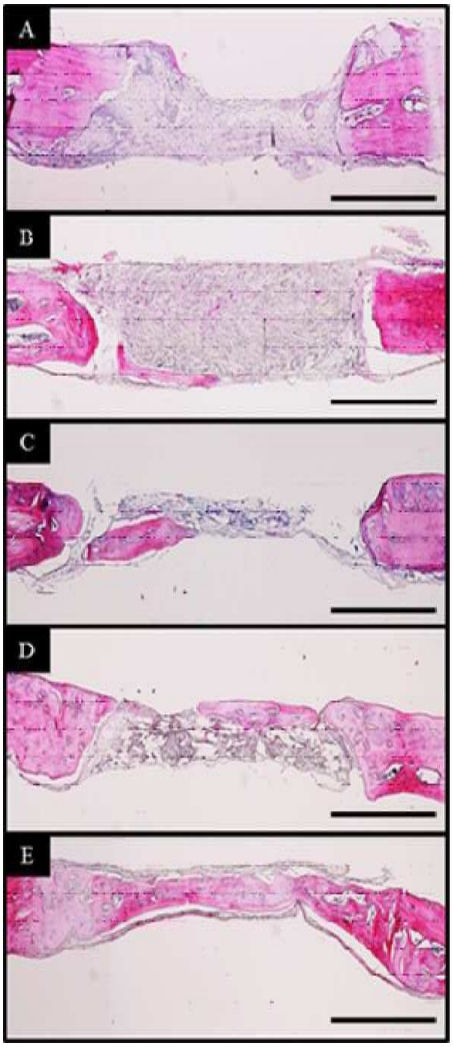
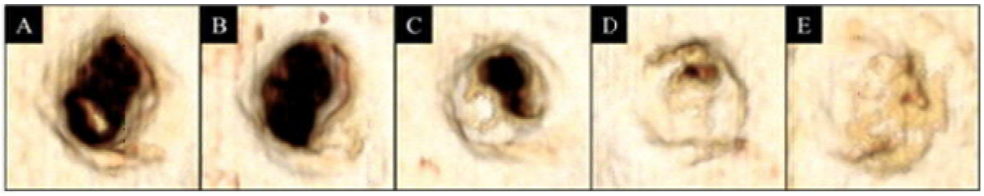
도면10



도면11



도면12



도면13