



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0012632
(43) 공개일자 2017년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/46 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/46 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0102974
(22) 출원일자 2015년07월21일
심사청구일자 2015년07월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
고영환
경기도 용인시 수지구 성북2로76번길 31(성북동, 대우푸르지오)
노다영
대구광역시 북구 칠성남로30길 16 2층 (칠성동2가)
조인환
서울시 성북구 보국문로 19, 104동 503호(정릉2동, 정릉푸르지오아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

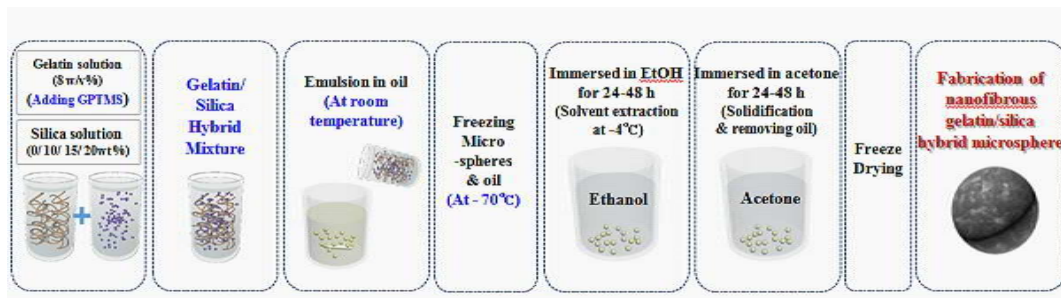
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어 제조 방법 및 이에 의해 제조된 나노섬유형 마이크로스피어

(57) 요약

본 발명의 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어 제조방법은 열유도 상분리법과 에멀전법을 이용함으로써 손쉽게 나노섬유형 마이크로스피어를 제조할 수 있는 방법이며, 이에 따라 생체친화도와 조직재생 효과가 향상된 마이크로스피어를 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어는 조직재생용 지지체, 약물전달체 등 광범위한 분야에서 식립재로 활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/222 (2013.01)

A61L 27/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI11C0388040014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 골형성 단백질 탑재기술 향상을 위한 융합 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

생체고분자, 물 및 순수 알코올을 포함하는 생체고분자 용액;과 생체활성유리 용액;의 혼합물을 오일에 투입하여 에멀전화하여 구형입자를 형성하는 단계;

상기 에멀전화 후, 오일 상층액을 제거하는 단계,

상기 오일 제거 후, 동결하여 열유도 상분리를 수행하는 단계,

용매교환 및 동결 건조하는 단계, 및

안정화 단계

를 포함하는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

물과 순수 알코올의 비율이 1:0.25 내지 1:1인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

생체활성유리 용액은 칼슘, 인 또는 이들의 혼합물을 포함하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

생체고분자는 콜라겐, 키토산, 젤라틴 또는 이들의 혼합물인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

생체활성유리는 테트라메틸 오르토실리케이트 또는 테트라에틸 오르토실리케이트인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물에 가교제를 투입하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

가교제는 GPTMS((3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane), GPTES((3-glycidoxypropyl)triethoxysilane), GPDMS((3-glycidoxypropyl)methyldiethoxy-silane) 또는 GPMES((3-glycidoxypropyl)dimethylethoxysilane)인 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

생체활성유리는 생체고분자 100 중량부에 대하여 10 내지 30 중량부를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합은 35 내지 50 °C에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

동결은 -60 내지 -75 °C에서 이루어지는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

용매 교환은 -4 내지 -25 °C에서 순수 알코올에 침적시킨 후 아세톤에 침적시킴으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

동결 건조는 -30 내지 -50 °C에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조되는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

평균 입자 직경은 100 μm 내지 200 μm인 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어 제조 방법 및 이에 의해 제조된 나노섬유형 마이크로스피어에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 최근 다양한 의료분야 및 뼈 조직공학 분야에서 손상되었거나 기능을 상실한 환자의 뼈 상실 부위를 지지체의 형태로 이식하는 방법이 많이 이용된다. 지지체 형태는 환자의 뼈 상실부위에 따라 이용에 한계가 있었다. 지지체의 식립 한계를 극복하기 위해, 구형입자를 제조하여, 다양한 모양의 손상부위에 이식을 할 수 있다.
- [0004] 실리카는 질병이나 외상에 의해 손상된 인체의 뼈 조직이나 연조직을 대체하기 위해 체내에 매식되는 소재로서, 다양한 의료분야에서 사용되고 있다. 실리카는 우수한 생체활성도(bioactivity)와 생체흡수성(biodegradability)을 가지고 있으며, 뼈 대체물로 사용되는 다른 매식재료에 비해 골전도성과 골유도성도 우수하다. 이러한 실리카는 여러 가지 형태로 제조될 수 있는데, 구형입자로 제조되는 경우 뼈 조직의 재생을 용이하게 하고, 약물 방출이 적합하며 염증반응을 최소화할 수 있다. 그리하여 현재까지 실리카 구형입자를 제조할 수 있는 다양한 기술들이 개발되어 있다[특허문헌 1, 비특허문헌 1~3].
- [0005] 구형입자를 제조하는 시도들은 많이 있었으나, 생체활성도 및 약물 방출에 있어 원하는 효과를 이루지 못하였다.
- [0006] 따라서, 우수한 생체활성도 및 적합한 약물 방출을 위해서는, 다공성의 구형입자를 제조할 수 있는 신기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국내 등록 특허 제759841호

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Dense silica microspheres from organic and inorganic acid hydrolysis of TEOS, Journal of Non-Crystalline Solids Vol 272, Issues 2-3, August 2000, Pages 119-126
- (비특허문헌 0002) Synthesis and Bioactivity of Sol-Gel Derived Porous, Bioactive Glass Microspheres Using Chitosan as Novel Biomolecular Template, Journal of the American Ceramic Society, Vol 95, Issue 1, pages 30-33, January 2012
- (비특허문헌 0003) Preparation of hollow silica microspheres in W/O emulsions with polymers, Journal of Colloid and Interface Science, Vol 266, Issue 1, 1 October 2003, Pages 107-114

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명자들은 단일물질의 마이크로스피어 보다 우수한 생체활성도 및 분해성을 가지는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 우수한 생체활성도 및 적합한 약물 방출을 위한 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은
- [0013] 생체고분자, 물 및 순수 알코올을 포함하는 생체고분자 용액;과 생체활성유리 용액;의 혼합물을 오일에 투입하여 에멀전화하여 구형입자를 형성하는 단계;

- [0014] 상기 에멀전화 후, 오일 상층액을 제거하는 단계,
- [0015] 상기 오일 제거 후, 동결하여 열유도 상분리를 수행하는 단계,
- [0016] 용매교환 및 동결 건조하는 단계, 및
- [0017] 안정화 단계
- [0018] 를 포함하는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법을 제공한다.
- [0019]
- [0020] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은
- [0021] 상기 방법에 의해 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 제조 방법에 의해 생체친화도와 조직재 생효과가 향상된 마이크로스피어를 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법은 열유도 상분리법과 에멀전법을 이용함으로써 손쉽게 나노섬유형 마이크로스피어를 제조하는 것이 가능하며, 조직재생용 지지체, 약물전달체 등 광범위한 분야에의 식립재로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 제조과정을 나타낸 개략도이다.
- 도 2는 실시예에 의해 제조된 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 저배율 주사전자현미경(SEM) 사진이다.
- 도 3은 실시예에 의해 제조된 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 주사전자현미경(SEM) 사진 및 마이크로스피어의 나노섬유 구조를 나타낸 사진이다. 다양한 실리카의 함량에 따른 절단면 구조를 고배율에서 촬영한 이미지이다.
- 도 4는 실시예에 의해 제조된 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 화학적 조성 및 구조를 나타내는 EDS 그래프이다.
- 도 5는 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 화학적 조성 및 구조를 나타내는 FT-IR 스펙트럼이다.
- 도 6은 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어를 SBF 용액에 침적시킨 후에 표면에 형성된 아파타이트층의 SEM 사진이다.
- 도 7은 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어를 SBF 용액에 침적시킨 후, 표면에 형성된 아파타이트층의 화학적 조성 및 구조를 나타내는 EDS 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은
- [0027] 생체고분자, 물 및 순수 알코올을 포함하는 생체고분자 용액;과 생체활성유리 용액;의 혼합물을 오일에 투입하여 에멀전화하는 단계;
- [0028] 상기 에멀전화 후, 오일 상층액을 제거하고, 구형입자를 형성하는 단계,
- [0029] 상기 구형입자를 동결하여 열유도 상분리를 수행하는 단계,
- [0030] 용매교환 및 동결 건조하는 단계, 및
- [0031] 안정화 단계
- [0032] 를 포함하는 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법에 관한 것이다.

- [0033] 상기 생체고분자는 유기체에 의해 생산되는 고분자 화합물을 의미하는 것으로, 생체고분자 용액은 생체고분자와 물을 혼합하거나, 생체고분자, 물 및 순수 알코올을 혼합하여 제조할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 생체고분자는 콜라겐, 키토산, 젤라틴 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 순수 알코올의 예로, 순수 에탄올, 순수 메탄올, 순수 부탄올 등을 사용할 수 있다. 함유되는 물 및 순수 알코올의 비율에 따라 나노섬유형 구형입자의 기공율 또는 기공 구조가 결정된다. 따라서 제조과정 중에 물 및 순수 알코올의 비율이 달라지는 경우 구형입자의 형태 등의 특성이 달라질 수 있으므로 물과 순수 알코올을 혼합하여 사용할 경우에는 물 및 순수 알코올의 비율을 일정하게 유지하는 것이 중요하다. 사용되는 알코올에 물이 함유되어 있는 경우 물 및 알코올의 비율이 변할 수 있기 때문에 순수 알코올을 사용한다. 특히, 구형입자의 공극률은 생체고분자 또는 하기 기술된 생체활성 유리의 함량과는 관계없이 물 및 순수 알코올의 비율에 따라 결정된다. 본 발명의 한 구체예에서, 물 및 순수 알코올의 비율은 1:0.25 내지 1: 1일 수 있다. 예를 들어, 순수 에탄올이 함유된 물-에탄올 혼합액을 사용하여 하이브리드 마이크로스피어를 제조할 수 있다.
- [0034] 상기 생체활성유리는 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 지지체 간에 화학적 유사성을 갖도록 할 수 있다. 생체활성유리 용액은 생체활성유리, 촉매, 용매, 칼슘 및 인을 혼합하여 전자 교반하여 제조할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 생체활성유리는 테트라알킬 오르토실리케이트일 수 있다. 예를 들어, 테트라에틸오르토실리케이트(TEOS) 또는 테트라메틸 오르토실리케이트일 수 있다. 또한, 용매는 물, 촉매는 염산, 칼슘클로라이드 및 트리에틸포스페이트(TEP)를 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다(도 1).
- [0036] 제조된 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액을 혼합하여 복합화한다. 본 발명의 한 구체예에서 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합은 35 내지 50 ℃에서 이루어질 수 있다. 혼합하기 전에 생체 고분자 용액에 안정적인 결합을 위하여 가교제를 투입하는 것이 바람직하며, 상기 가교제로는 구체적으로 GPTMS((3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane), GPTES((3-glycidoxypropyl)triethoxysilane), GPDMS((3-glycidoxypropyl)methyldiethoxy-silane) 또는 GPMES((3-glycidoxypropyl)dimethylethoxysilane)일 수 있다. 상기 가교제는 생체 고분자 100 중량부에 대하여 50 내지 150 중량부를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0037] 본 발명의 실시예에서 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액으로 사용된 젤라틴 용액 및 실리카 졸은 유사하게 친수성 성질을 갖고 있어 간단하게 전자 교반하여 균일하게 혼합할 수 있다. 이러한 친수성 성질로 인하여 물과의 친화도가 증가된 복합 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.
- [0038] 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액을 혼합할 때 생체활성유리의 비율을 조절할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서 생체활성유리를 생체 고분자 100 중량부에 대하여 10 내지 30 중량부로 포함할 수 있다.
- [0039] 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.
- [0040] 상기 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물을 오일에 투입하여 에멀전화하여 구형입자를 제조한다.
- [0041] 상기 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물을 오일에 투입하고 교반하여 구형입자의 형태를 제조한다. 상기 오일은 구체적으로, 식용유, 에틸렌글리콜(Ethylene glycol), 에틸아세테이트(Ethyl acetate)등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 오일은 생체고분자 용액과 생체활성유리 용액의 혼합물 100 부피부에 대하여 300 내지 500 부피부를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0042] 상기 교반은 100 내지 200 rpm으로 실시하고, 구형입자의 형태 유지를 안정화하기 위해 10분 내지 60분 동안 전자 교반한다.

- [0043] 구형입자의 형태 유지가 안정화되면, 상기 에멀전화 후, 오일 상층액을 제거한다.
- [0044] 일반적으로 에멀전 공정 이후, 오일을 제거하기 위하여 필터링 과정을 거치게 되는데, 이를 본 발명에 적용시킬 경우에는 구형입자 획득이 어려웠고, 획득되더라도 구형입자의 형태가 무너져 있는 문제가 발생하였으며, 필터링 시간이 길어질수록 에탄올 증발이 많이 일어나 물의 비율이 높아져 이후 공정에서 상 분리가 제대로 일어나지 않고 그 결과 나노섬유 구조가 잘 관찰되지 않았다.
- [0045] 이러한 문제를 해결하기 위하여 오일 필터링 대신 에멀전화로 형성된 구형입자를 최대한 가라앉혀 오일의 상층액을 제거함으로써 구형입자를 획득할 수 있다.
- [0046] 최대한으로 오일을 제거한 후, 동결하여 열유도 상 분리를 수행한다.
- [0047] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 제조에 있어서 열유도 상 분리법을 적용함으로써 조직재생능이 향상된 마이크로스피어를 제조할 수 있다. 열유도 상 분리법을 적용하기 위해 제조된 복합화 용액을 -60 내지 -75℃에서 동결시킨다. 본 발명의 한 구체예에서 열유도 상분리법으로 젤라틴-실리카가 풍부한 상 및 에탄올-물 혼합액이 풍부한 상 사이에 상 분리를 유도하였다. 열유도 상분리법을 적용함으로써 세포외기질(ECM) 및 생체 모방형 생체고분자/생체활성유리 복합 구형입자의 제조가 가능하다. 세포외기질을 모방하여 세포외기질 구조가 갖는 장점인 세포의 부착, 성장, 이동, 분화 등을 유도해 새로운 세포 형성을 촉진하는 구형입자를 제조할 수 있고, 이에 따라 구조적으로 효과적인 조직 재생을 유도할 수 있는 다공성 구형입자를 제조할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 생체고분자/생체활성유리 복합 구형입자의 제조에 있어서 용매교환 과정을 거침으로써 안정한 마이크로스피어를 제조할 수 있다. 용매교환에 사용되는 제1용매 및 제2용매는 용해도에 있어 차이가 있는 것을 사용하면 된다. 통상의 기술자는 용매 교환을 위하여 용해도가 상이한 적절한 용매를 선택하여 사용할 수 있으며 이는 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 용매교환을 위해 동결된 생체고분자/생체활성유리 복합화 물질을 폴리에틸렌 주형에서 꺼내어 -4℃ 내지 -25℃의 순수 알코올에 약 12시간 내지 약 24시간 동안 침적하여 용매 추출한 후, -4℃ 내지 -25℃의 아세톤에 약 12시간 내지 약 24시간 동안 침적시켜 고체화 및 오일을 제거한다. 이때, 아세톤 대신 테트라하이드로퓨란을 사용할 수 있다. 용매교환 과정을 통하여 본 발명의 지지체에 기공구조를 도입하여 나노 섬유형 다공성 구형입자의 제조를 가능하게 한다. 용매교환 후 남아있는 액체상을 완전히 제거하기 위해 다시 -30 내지 -50℃에서 동결 건조시켜 안정화시켜 구형입자를 완성한다.
- [0049] 젤라틴/실리카 하이브리드 구형입자를 제작 후, 구형입자의 형태 유지 및 생체 내 식립 시 빠른 용해를 막기 위해 고정 처리를 추가적으로 시행할 수 있다.
- [0050] 상기 고정 처리는 글루타알데하이드(Glutaraldehyde)를 사용하여 실시 가능하다.
- [0051] 본 발명에 따른 제조방법에서는 물, 에탄올 등의 알코올을 사용하고 용매 교환과정으로 알코올, 아세톤 또는 테트라하이드로퓨란을 사용함으로써 친환경적이며 안전하고 경제적인 공정으로 구형입자를 제조할 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어를 제공한다.
- [0053] 본 발명에 따라 제조된 나노섬유형 생체고분자/생체활성유리 하이브리드 마이크로스피어의 평균 입자 직경은 100 μm 내지 200 μm 이다[도 2 참조]. 또한, 나노 섬유형 구조를 가지고 있음을 알 수 있으며[도 3 참조], 단일 재료의 구형입자 보다 우수한 생체친화도를 가진다는 것을 알 수 있다[도 6 및 도 7 참조].
- [0055] 이하, 본 발명의 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 지식이 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0057] [실시예]
- [0058] **제조예: 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 제조**
- [0059] 명시적으로 별도의 기재가 없는 한 모든 시약은 Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)로부터 구

매하였다. 실리카 졸은 B.Lei, X. Chen, Y. Wang, N. Zhao, C. Du L. Fang, J. Non-Cryst.Solids, 2009, 355, 2678에 기재된 것과 유사한 방법으로 제조하여 준비하였다. 요약하면 테트라에틸 오르토실리케이트(TEOS), 트리 에틸포스페이트(TEP) 및 칼슘 클로라이드(CC)를 2시간 동안 전자 교반하여 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 1시간 동안 전자 교반하여 10 ml의 물-에탄올 혼합액(부피비 1:1)에 용해시켜 젤라틴 용액을 준비하였다. 이때, 물은 용매로, 순수 에탄올은 비용매로 사용되었다.

[0060] 그리고 나서 다양한 양의 실리카(젤라틴 1 g에 대하여 0 wt%, 10 wt%(0.1 g), 15 wt%(0.15 g), 20 wt%(0.2 g))가 함유된 복합 지지체를 제조하기 위하여 미리 정해놓은 양의 실리카 졸(0.64 ml, 0.96 ml 1.28 ml이 각각 10 wt%, 15 wt%, 20 wt%)을 40 °C에서 1시간 동안 전자 교반하여 젤라틴 용액에 균일하게 혼합하였다. 단, 실리카 졸과 젤라틴 용액을 혼합하기 전에 젤라틴 용액에 가교제로 GPTMS((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane) 1 g을 투입하였다.

[0061] 복합화된 젤라틴/실리카 용액 10 ml을 200 rpm으로 전자 교반 중인 식용유 40 ml에 스포이드로 떨어뜨려 구형입자를 형성하였다. 이때, 전자 교반은 10분 내지 30분 동안 실시하였다. 에멀전 공정을 통해 구형입자의 형태가 완성되면, 형성된 구형입자를 바닥에 가라앉히고, 다량의 상층액(식용유)을 제거하였다. 남아 있는 유기용액 일부와 젤라틴/실리카 구형입자를 동시에 -70 °C에서 냉동시키고, 4시간 유지하였다.

[0062] 그 후, 용매 변환을 위해 상기 과정에 의해 제작된 구형입자 전체를 -4 °C의 에탄올 50ml에 24시간 동안 침적시킨 후, 잔여 유기용액의 제거와 구형입자의 고형화를 위해 50ml의 아세톤에 24시간 동안 침적시키고, 마지막으로 24시간 동안 -40°C에서 동결 건조를 하여 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어를 제작하였다. 상기 용매 치환 과정에서 에탄올과 아세톤을 꾸준히 갈아주었다. 용매를 꾸준히 교체함으로써, 용매 치환 과정과 동시에 구형입자 제조 직후 완전히 제거하지 못하였던 오일을 용해시켰다.

[0063] 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어를 제작한 후, 구형입자의 형태 유지 및 생체 내 식립 시 빠른 용해를 막기 위해 다음과 같이 고정 처리를 추가적으로 시행하였다.

[0064] 순수 젤라틴 마이크로스피어 및 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어 1 g을 0.5% 글루타알데하이드(Glutaraldehyde) 용액 20 ml에 24시간 동안 담구어 둔 후, 에탄올로 세척하고 12시간 동안 진공 상태에서 건조하였다.

[0066] 실험예 1: 복합 지지체의 물리화학적 구조 분석

[0067] 1.1. 모폴로지 분석

[0068] 나노섬유형 젤라틴-실리카 하이브리드 마이크로스피어의 모폴로지(morphology) 및 미세구조는 FE-SEM(전계방사형 주사전자현미경) (JSM6701F, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. SEM(주사전자현미경) 관찰에 앞서, 모든 복합 지지체를 32 mTorr 압력에서, 150초 동안 스퍼터 코팅기를 이용하여 Pt의 얇은 층으로 코팅하였다.

[0069] 도 2와 도 3은 다양한 농도의 실리카가 함유된 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 전형적인 모폴로지 및 마이크로 구조를 나타낸 것이다. 실리카 함량에 관계없이, 모든 제조된 복합 지지체는 나노섬유형 구조를 가졌다.

표 1

[0070] 마이크로스피어의 평균 입자 직경

구분	순수 젤라틴	실리카 10 wt%	실리카 15 wt%	실리카 20 wt%
평균 입자 직경(μm)	234.08 $\pm$ 73.61	142.91 $\pm$ 35.60	139.26 $\pm$ 23.19	151.01 $\pm$ 27.65

[0072] 1.2. 화학적 분석

[0073] 복합 지지체의 화학적 조성 및 원소의 분포를 SEM에 부착된 EDS(energy dispersive spectroscopy)에 의해 측정하였다. 그리고, 화학적 구조를 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy, PerkinElmer spectrum 300,

USA)로 분석하였다. 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어 내의 실리카 상의 존재를 EDS 분석으로 확인하였다. 나노섬유형 순수 젤라틴마이크로스피어(A) 및 실리카가 0, 10, 15, 20 wt% 함유된 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어(B, C, D) 각각의 전형적인 EDS 스펙트럼을 도 4에 나타내었다. 복합 지지체는 Si 및 Ca 원소에 상응하는 강한 피크를 나타내었다.

[0074] 도 5에 나타낸 것과 같이, 젤라틴 및 실리카 상의 화학적 상호작용을 시험하기 위해서 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 화학적 구조를 FT-IR 로 조사하였다. 순수 젤라틴 지지체는 젤라틴 폴리머의 전형적인 밴드를 나타내었다; 즉, C=O에 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 5).

[0075] 반면에, 실리카가 10 wt%, 15 wt% 및 20 wt% 함유된 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어는 실리카 함량이 증가됨에 따라 실리카 상에 상응하는 밴드의 상대 강도가 증가하면서 졸-겔 유래 실리카 상 내에 Si-OH 및 Si-O-Si에 해당하는 추가의 밴드를 나타내었다.

[0077] 실험예 2: 인 비트로 아파타이트(apatite) 형성능 평가

[0078] 인체유사용액(simulated body fluid; SBF)에 나노섬유형 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어를 침적시켜 인 비트로 아파타이트 형성능을 평가하였다.

[0079] 표본을 온도 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 하여 일정 시간(1일) 동안 인큐베이터에 놓은 후, 추출 및 에탄올로 세 번 세척한 후 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 건조하였다. 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 표면에 형성된 아파타이트층을 FE-SEM와 EDS를 이용하여 분석하였다.

[0080] 인비트로 아파타이트 형성능은 인 비보에서 골 조직 형성능을 나타내는 가장 중요한 평가요소이다. 1일 이후에, 순수 젤라틴 마이크로스피어 보다 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어에서 플레이크형 나노입자(flake-like nanoparticles)의 활발한 침전을 보였다.

[0081] 도 6은 실시예에 의해 제조된 순수 젤라틴 마이크로스피어와 젤라틴/실리카 마이크로스피어를 생체유사용액 광화(Mineralization) 실험 후 표면 SEM 사진이다.

[0082] A는 순수 젤라틴 마이크로스피어로, 1일 동안 생체유사용액에 담구어 두어도 표면에 인회석 결정(apatite crystal)이 출현하지 않았다.

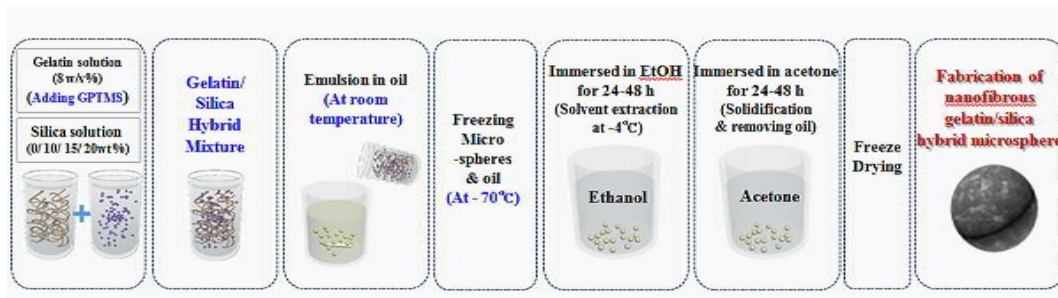
[0083] B, C, D는 각각 10, 15, 20wt%의 실리카가 함유된 젤라틴/실리카 마이크로스피어로, 1일 동안 생체유사용액에 담구어 둔 후 표면에 인회석 결정(apatite crystal)이 다량 출현되었다.

[0084] 도 7은 실시예에 의해 제조된 순수 젤라틴 젤라틴 마이크로스피어와 젤라틴/실리카 마이크로스피어를 생체유사용액 광화(Mineralization) 실험 후 마이크로스피어 표면의 EDS 스펙트럼이다.

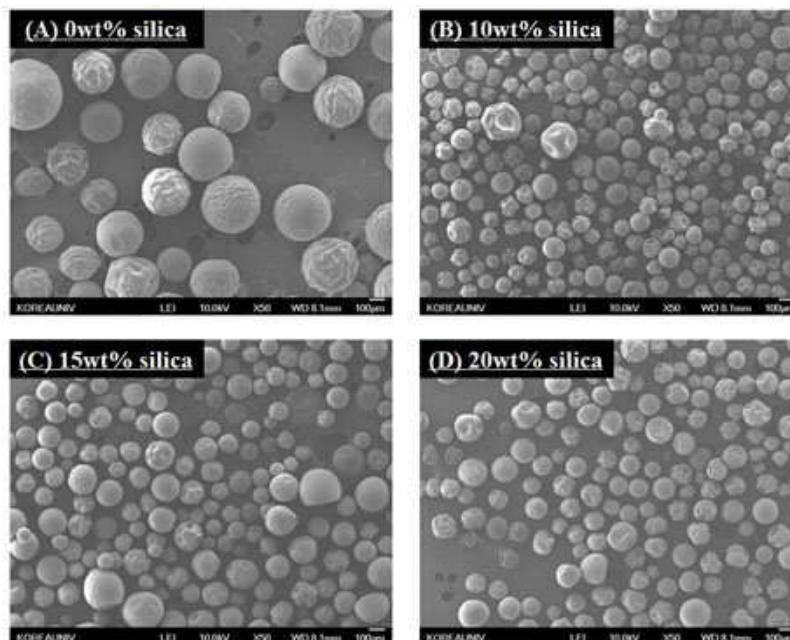
[0085] A는 순수 젤라틴 마이크로 스피어, B, C, D는 각각 10, 15, 20 wt%의 실리카가 함유된 젤라틴/실리카 마이크로스피어의 EDS 스펙트럼으로, 표면에 다량의 인회석 결정(apatite crystal)이 출현 된 젤라틴/실리카 마이크로스피어의 EDS 스펙트럼에서 인회석 결정의 성분인 Ca 및 P 원소에 상응하는 강한 피크를 나타내었다. 이 역시 젤라틴/실리카 하이브리드 마이크로스피어의 표면에 인회석층이 형성되었음을 의미한다.

도면

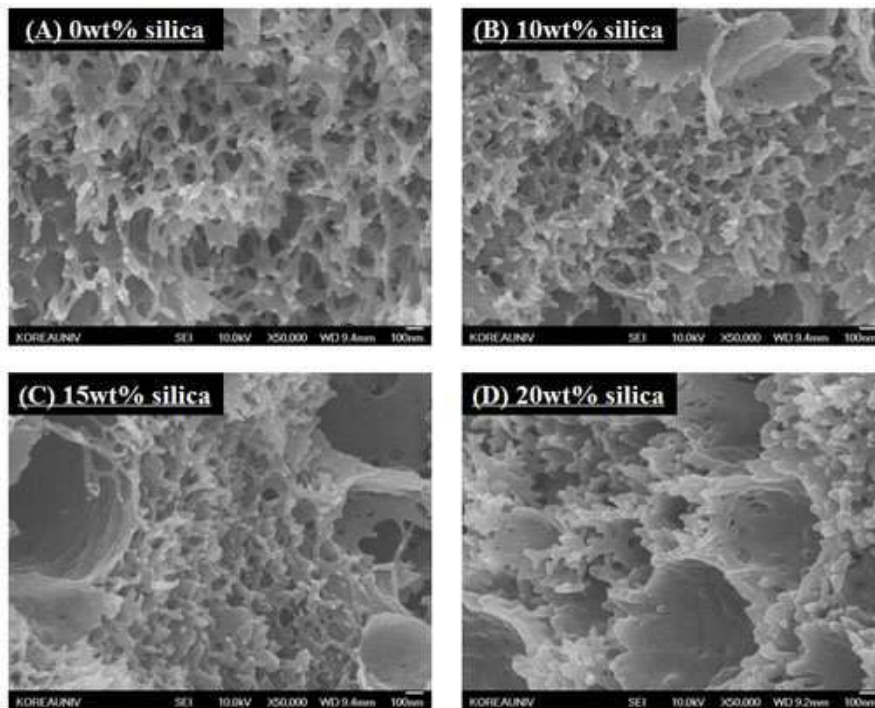
도면1



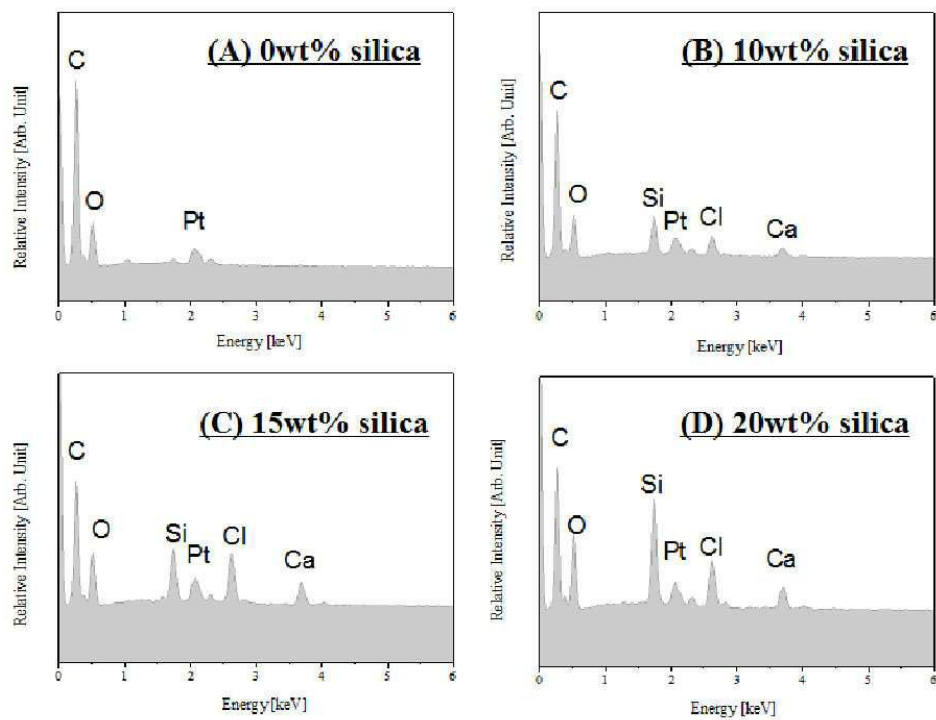
도면2



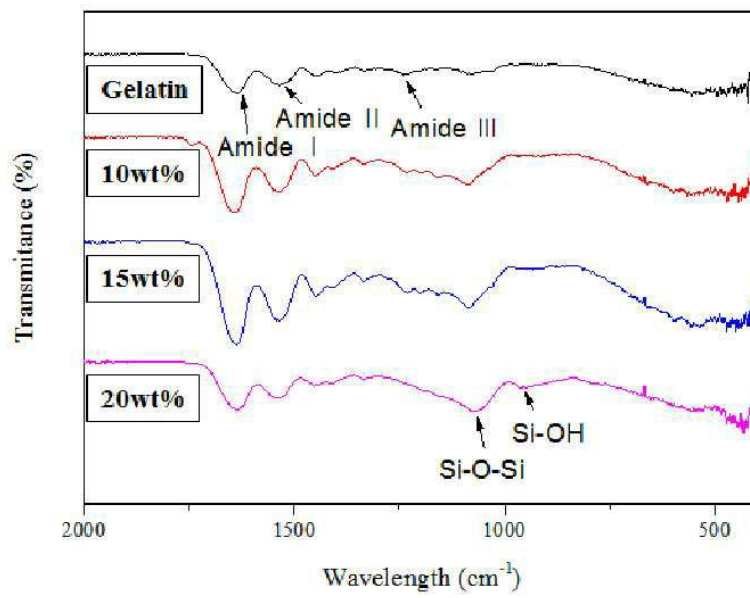
도면3



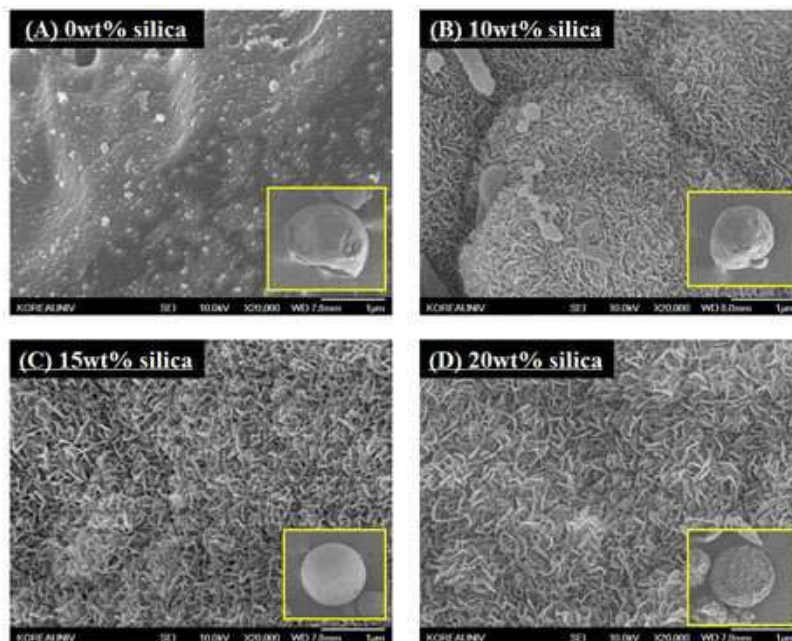
도면4



도면5



도면6



도면7

