



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월17일

(11) 등록번호 10-1604584

(24) 등록일자 2016년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/12 (2006.01) **A61L 27/26** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0034299
 (22) 출원일자 2014년03월24일
 심사청구일자 2014년03월24일
 (65) 공개번호 10-2014-0117293
 (43) 공개일자 2014년10월07일
 (30) 우선권주장
 1020130032187 2013년03월26일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020120092443 A*
 KR1020130011354 A*
 KR1020090071982 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
포항공과대학교 산학협력단
 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
 (72) 발명자
황동수
 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 601호 (지곡동, 교수아파트)
오동엽
 부산광역시 동구 중동길 15-3, 청명골드타워 (초량동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

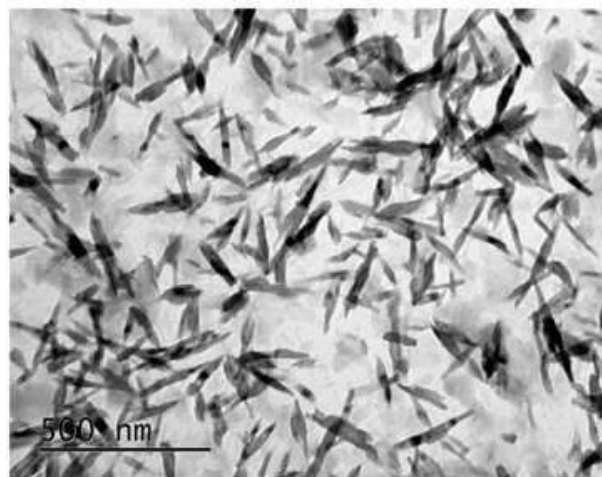
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **하이드록시아파타이트, 키토산 또는 이의 유도체, 및 카테콜 또는 이의 유도체를 함유하는 복합체 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 하이드록시아파타이트, 키토산, 키틴, 또는 이의 유도체, 및 카테콜 또는 이의 유도체를 포함하는 복합체, 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물, 상기 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품, 및 상기 복합체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공되는 복합체는 카테콜 또는 카테콜 유도체가 첨가된 물질로서 인체에 무해한 특징을 가지며, 강한 기계적 강도를 나타내어 인공힘줄, 인공인대, 인공 치과 재료 등 다양한 생체 재료로서 이용될 수 있고, 용도를 이에 제한하지 않고 필요로 하는 각종 재료로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4a



(72) 발명자

프라자테리스티아 에카비안티

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
내 (지곡동)

이진우

서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 7동 1803호
(방배동, 방배래미안타워)

예영진

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
남자기숙사 2동 305호 (지곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D11008112H320000110
부처명	국토해양부
연구관리전문기관	(재)한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	해양바이오산업신소재 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	포항공과대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

하이드록시아파타이트(hydroxyapatite);
 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물; 및
 카테콜, 도파민, 도파(DOPA) 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 유도체를 포함하고,
 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 아민기가 카테콜 유도체의 파라위치에 결합되며,
 상기 카테콜 유도체의 다이올이 하이드록시아파타이트에 가교결합되고,
 상기 하이드록시아파타이트의 함량은 복합체의 중량 기준으로 25 내지 75 중량%이며,
 복합체의 건조 상태 탄성 계수는 0.5 내지 3.5Gpa인,
 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,
 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량은 복합체의 중량 기준으로 30 내지 70 중량%인, 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 카테콜 유도체는 도파민, 도파, 또는 이들의 혼합물인, 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,
 상기 카테콜 유도체의 함량비는 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 중량 기준으로 5 내지 15 중량%인,
 복합체.

청구항 6

제1항, 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 필름, 필라멘트 또는 부직포 형태인 유기 보강 소재 조성물.

청구항 8

제1항, 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제품은 인공인대, 인공힘줄, 인공 치과용 재료, 인공 피부, 수술용 봉합사, 인공 투석막, 인공 치료 보조 용품, 의복용 섬유, 및 타이어 코드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것인 제품.

청구항 10

- (a) 수산화칼슘 수용액 및 인산 수용액의 혼합물에, 물, 이온성 용매 또는 이들의 혼합물에 용해된 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물을 첨가하여 혼합하는 단계;
- (b) 상기 혼합하는 단계 후의 결과물에 물, 이온성 용매 또는 이들의 혼합물에 용해된 카테콜, 도파민, 도파(DOPA), 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 유도체를 첨가하는 단계; 및
- (c) 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite)를 첨가하는 단계를 포함하고,
 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 아민기가 카테콜 유도체의 파라위치에 결합되며,
 상기 카테콜 유도체의 다이올이 하이드록시아파타이트에 가교결합되고,
 상기 하이드록시아파타이트의 함량은 복합체의 중량 기준으로 25 내지 75 중량%이고,
 복합체의 건조 상태 탄성 계수는 0.5 내지 3.5Gpa인,
 복합체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (a)단계 및 (b)단계는 가열 조건에서 수행하고, 상기 (c)단계는 냉각하여 실온에서 수행되는 것인 복합체의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량은 복합체의 중량 기준으로 30 내지 70 중량%인 복합체의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 카테콜 유도체는 도파민, 도파, 또는 이들의 혼합물인, 복합체의 제조 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 카테콜, 도파민, 도파(DOPA) 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 함량은 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 중량 기준으로 5 내지 15 중량%인 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 하이드록시아파타이트, 키틴, 키토산, 또는 이의 유도체, 및 카테콜 또는 이의 유도체를 포함하는 복합체, 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물, 상기 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품, 및 상기 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

해부생물학적 측면에서 척추동물의 뼈를 구성하는 물질은 뼈를 구성하는 세포 (골아세포, 골세포, 및 파골세포)들과 상기 세포들이 분비하는 질긴조직(hard tissue)으로 구성되어 있다. 화학적 측면에서 뼈를 구성하는 물질로는 약 70 wt%를 차지하는 무기물 (대부분이 하이드록시아파타이트(HA), $Ca_5(PO_4)_3OH$)과 나머지는 30 wt%를 구성하는 유기물 (대부분이 콜라겐 타입 I)로 구성되어 있다. 척추동물의 뼈는 부서지기 쉬운 (Brittle) 하이드록시아파타이트와 질긴 콜라겐의 조합을 통하여 강하면서 어느 정도 인성(toughness)을 가지는 복합체의 소재가 된다.

[0003]

다양한 경로의 외부적 충격이나 인간 내의 내부적 질환에 의해서 인간의 뼈는 손상되는 경우가 많으며, 손상된 뼈를 재생하기 위해서 다양한 방법들이 고안되어 왔다. 그 방법 중 하나로 소나 돼지의 뼈들이 멸균되어 많이 사용되고 있지만, 사용 되었을 때의 인간 생체 내에서의 염증 반응과 거부 반응 때문에 새로운 소재로 대체되어야 할 필요가 있다. 대안으로 합성한 하이드록시아파타이트(Synthetic HA), 네이티브 콜라겐(Native collagen), 재조합 콜라겐이 있지만, 합성한 하이드록시아파타이트는 잘 부러지는 물성을 가져 인성을 가지는 유기소재와

복합화가 필요하며, 네이티브 콜라겐은 쥐의 꼬리에서 추출해서 사용할 수 있지만 인체의 거부반응을 일으킬 수 있기에 사용하기가 어렵고, 재조합 콜라겐은 네이티브 콜라겐이 가지는 폴리-프롤린 타입 II를 가지기 힘들기 때문에 인간의 뼈를 재생하는 소재로 사용하기에는 한계가 있다.

[0004] 뼈를 재생하기 위해서 하이드록시아파타이트와 함께 복합체를 만드는 물질로써 키틴 또는 키토산이 제시되어 왔다. 키틴과 키토산은 무미 및 무취의 천연 고분자 다당체로서, 키틴은 N-아세틸-D-글루코사민 단위체가 무수히 결합하여 이루어진 다당류 고분자 물질이고, 키토산은 키틴에서 아세틸기가 떨어져 나간 단위체가 무수히 결합하여 이루어진 다당류 고분자 물질이다. 키틴과 키토산은 천연성분이기 때문에 생체에 대한 적합성이 뛰어나고 인체에 상기 키틴 또는 키토산을 분해해주는 효소가 없어서 인공피부, 수술용봉합사, 인공투석막, 인공인대, 각종 치료 보조 용품 등의 의약분야에 다양하게 사용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 인체에 무해하며 강한 기계적 강도를 갖는, 하이드록시아파타이트, 키틴, 키토산, 또는 이의 유도체, 및 카테콜 또는 이의 유도체를 포함하는 복합체를 제공한다.

[0006] 또 다른 예는 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물을 제공한다.

[0007] 또 다른 예는 상기 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품을 제공한다.

[0008] 또 다른 예는 상기 복합체의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 발명은 하이드록시아파타이트; 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물; 및 카테콜, 도파민, 도파(DOPA) 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체; 를 포함하는 복합체, 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물, 상기 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품, 및 상기 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 하이드록시아파타이트와 키토산 및/또는 키틴에 카테콜, 도파민, 도파, 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체를 첨가하면 인체에 무해하면서 강도가 증진된 재료를 구현할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 상기 복합체는 카테콜 또는 카테콜 유도체를 포함하여 인체에 무해한 특징을 가지며, 강한 기계적 강도를 나타내는 이점을 가진다. 특히, 인공힘줄(tendon) 및 인공인대(ligament)용 소재로서 상기 복합체가 제공될 수 있다. 인공힘줄 및 인공인대는 힘줄과 인대가 파괴되었을 때 이들 조직을 대신하여 골격과 근육을 이어주는 역할을 할 수 있도록 높은 강도를 갖고, 새로운 조직이 생겨나 더 이상 필요로 하지 않을 때에는 생체로 흡수 가능하도록 생체적합성이 높은 것이 좋다.

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명의 일례에 따른 복합체는 하이드록시아파타이트; 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물; 및 카테콜, 도파민, 도파(DOPA) 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체를 포함한다.

[0014] 하이드록시아파타이트는 뼈와 치아를 구성하는 주성분과 동일한 구조를 이루며, 생체친화성이 우수하여 뼈나 피부 속의 생체조직과 쉽게 융화될 수 있는 생체친화성이 우수한 물질이다.

[0015] 본 발명에 따른 복합체는 키틴 또는 이의 유도체를 이루여지는 군에서 1종 이상 포함하며, 구체적으로 키틴, 키토산 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 상기 키틴과 키토산은 곤충류, 갑각류 등의 절지 동물의 외피 등 자연계에 풍부하게 존재하고 친환경적인 자원으로서, 생분해성, 항바이러스성, 상처 치유능 등 다양한 장점을 가지고 있어 인공힘줄 및 인공인대와 같은 생체재료로서 적합한 소재이다. 상기 키틴과 키토산은 대략적으로 5만 이상, 20만 이상, 60만 이상, 또는 100만 이상, 예컨대, 1,000,000 내지 200,000,000 정도의 분자량을 갖는 것

일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0016] 본 발명에 따른 복합체는 카테콜 및 카테콜 유도체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하며, 구체적으로는 카테콜, 도파민, 도파(DOPA) 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다. 상기 카테콜 및 카테콜 유도체는 인체에 무해하다고 알려진 화합물(Ku et al, Biomaterials, 31, 2535-41, 2010)이며, 카테콜은 벤젠고리의 OH기가 올쏘 위치에 다이올로 붙어 있는 구조로 산소분자의 비공유 전자쌍이 주변의 친전자성을 띠는 분자에 배위결합, 공유결합, 이온결합 등의 형태로 가교결합을 형성하는 능력을 가지고 있다. 소망하는 복합체의 물성 (예컨대, 적절한 다공성 등)을 달성하기 위하여, 상기 카테콜 유도체는 카테콜 작용기와 아민 작용기를 모두 갖는 화합물인 것이 좋으며, 예컨대, 도파민, 도파(DOPA) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 복합체에 있어서, 도파민, 도파(DOPA), 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0017] 상기 복합체는 키토산의 아민기가 카테콜 또는 카테콜 유도체의 파라위치에 친전자성 방향족 치환반응으로 결합이 되고, 카테콜 또는 카테콜 유도체의 다이올이 하이드록시아파타이트와 배위결합을 통해 가교결합을 형성할 수 있다.
- [0018] 상기 복합체에서 하이드록시아파타이트의 함량에 따라 복합체는 다른 기계적 강도를 나타내며, 하이드록시아파타이트가 복합체 중량기준으로 25 내지 75 중량% 범위 내에서 최대인장강도의 증가를 보이며, 약 50 중량%일 때 최대인장강도를 보여 인간 뼈의 최대인장강도와 가장 유사한 값을 나타낸다. 따라서 상기 복합체에서 하이드록시아파타이트의 함량은 발명의 목적에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 예컨대 하이드록시아파타이트의 함량은 복합체 중량기준으로 25 내지 75 중량%, 25 내지 70 중량%, 30 내지 75 중량%, 30 내지 70 중량% 또는 40 내지 60 중량%일 수 있다.
- [0019] 상기 복합체에서 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량에 따라 복합체는 생체 유용성을 유지하면서 다른 강도를 나타내므로 생체 유용성을 유지하면서 높은 강도를 가지기 위하여 복합체에서 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량은 적절히 조절될 수 있다. 예컨대, 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량은 복합체 중량기준으로 30 내지 70 중량%, 또는 40 내지 60 중량% 일 수 있다. 또한, 앞서 설명한 바와 같은 강도 증진의 기술적 효과를 달성하기 위하여 상기 하이드록시아파타이트와 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 혼합비는 1:3 내지 3:1 일 수 있다.
- [0020] 상기 복합체에서 카테콜 또는 카테콜 유도체의 함량에 따라 복합체는 생체 유용성을 유지하면서 다른 강도를 나타내므로 생체 유용성을 유지하면서 높은 강도를 가지기 위하여 복합체에 카테콜 또는 카테콜 유도체의 함량은 적절히 조절될 수 있다. 예컨대 상기 카테콜, 도파민, 도파 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체의 함량비는 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 중량 기준으로 5 내지 15 중량%, 또는 7 내지 12 중량%인 복합체 일 수 있다.
- [0021] 상기 복합체는 유기 보강 소재 조성물로서 유용하게 사용되기 위하여 적절한 기계적 강도를 갖는 것이 유리할 수 있으며, 본 발명에 따른 복합체는 건조 상태의 탄성 계수가 약 0.5 내지 3.5Gpa, 0.7 내지 3Gpa, 1 내지 3Gpa, 2 내지 3Gpa, 또는 1.2 내지 1.83Gpa이거나, 및/또는 젖은 상태 (포화)에서의 탄성 계수는 10 내지 100Mpa 정도인 것일 수 있다. 또한 소망하는 인장 강도를 얻기 위하여, 상기 복합체는 포화상태에서의 흡습률이 복합체 중량 대비 180% 이하, 100% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 또는 60%일 수 있다. 또한, 생체에서 소망하는 효능을 얻기 위하여, 상기 복합체는 중형비(aspect ratio: 장축과 단축의 비율)가 1 내지 10, 2 내지 8, 또는 3 내지 6 정도일 수 있다.
- [0022] 다른 일 구현예는 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물을 제공한다. 상기 유기 보강 소재 조성물은 필름, 장섬유(filament), 부직포 등의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 강도를 필요로 하는 모든 소재 조성물일 수 있다.
- [0023] 또 다른 일 구현예는 상기 복합체를 포함하는 유기 보강 소재 조성물로 제조된 제품을 제공한다. 상기 제품은 생체에 적용되는 생체 재료를 포함하여 강도를 요구하는 모든 보강재 제품일 수 있다.
- [0024] 상기 보강재 제품은, 예컨대, 인공인대, 인공힘줄, 인공 치과용 재료 (예컨대, 인공사피섬유(artificial Sharpey's fiber), 인공치조골(artificial periodontal ligament) 등), 인공 피부, 수술용봉합사, 인공투석막, 각종 치료 보조 용품, 의복용 섬유, 타이어 코드(tire cord, 타이어의 내구성과 주행성, 안정성을 높이기 위해 고무 내부에 들어가는 섬유 재질의 보강재) 등일 수 있다.
- [0025] 또 다른 일 구현예는 상기 복합체의 제조방법을 제공한다. 보다 구체적으로 상기 제조방법은 하이드록시아파타

이트에 물, 이온성 용매 또는 이들의 혼합물에 용해된 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물을 첨가하여 혼합하는 단계; 및 상기 혼합하는 단계 후의 결과물에 물, 이온성 용매 또는 이들의 혼합물에 용해된 카테콜, 도파민, 도파(DOPA), 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체를 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 이온성 용매는 키토산, 키틴, 카테콜 또는 카테콜 유도체를 용해시킬 수 있는 모든 이온성 액체(ionic liquid)를 의미하는 것으로, 예컨대, 아세트산 또는 아세트산 수용액, DMAc(dimethylacetamide)/LiCl(DMF(dimethylformamide)에 LiCl을 녹인 용액), 에틸메틸이미다졸륨 아세테이트 등일 수 있으며, 구체적으로 0.1 내지 5M의 아세트산 수용액일 수 있다.

[0027] 상기 하이드록시아파타이트; 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물; 및 카테콜 또는 카테콜 유도체의 함량에 대한 설명은 앞선 설명과 같다. 예컨대 상기 하이드록시아파타이트의 함량은 복합체 중량기준으로 25 내지 75 중량%, 25 내지 70 중량%, 30 내지 75 중량%, 30 내지 70 중량% 또는 40 내지 60 중량% 일 수 있다. 또한 상기 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 함량은 복합체 중량기준으로 30 내지 70 중량%, 또는 40 내지 60 중량% 일 수 있다. 또한 상기 카테콜, 도파민, 도파 및 메틸카테콜로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 카테콜 또는 카테콜 유도체의 함량비는 키토산, 키틴, 또는 이들의 혼합물의 중량 기준으로 5 내지 15 중량%인 복합체 일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에서 제공되는 복합체는 카테콜 또는 카테콜 유도체가 첨가된 물질로서 인체에 무해한 특징을 가지며, 강한 기계적 강도를 나타내어 인공힘줄, 인공인대, 인공 치과 재료 등 다양한 생체 재료로서 이용될 수 있고, 용도를 이에 제한하지 않고 필요로 하는 각종 재료로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 실시예 1에 따른 복합체의 제조방법의 모식도를 나타낸 것이다.
 도 2a 내지 도 2c는 실시예 1에 따른 합성된 필름의 표면 SEM 측정 사진을 나타낸 것으로, 도 2a는 합성된 #HA25 필름 표면, 도 2b는 합성된 #HA50 필름 표면, 도 2c는 합성된 #HA75 필름 표면을 나타낸 것이다.
 도 3은 실시예 1에 따른 합성된 필름의 단면 SEM 측정 사진을 나타낸 것이다.
 도 4a 및 도 4b는 합성된 필름 단면의 TEM 측정 사진을 나타낸 것으로, 도 4a는 실시예 1에 따른 합성된 #HA50 필름의 단면, 도 4b는 비교예 2에 따른 합성된 50% HA 필름의 단면을 나타낸 것이다.
 도 5는 실시예 5에 따른 FTIR 분석 결과를 나타낸 것으로 3500cm⁻¹는 OH peak를 나타내며, 1020 cm⁻¹, 600 cm⁻¹, 562 cm⁻¹는 phosphate mode의 apaptide를 나타낸 것이다.
 도 6은 실시예 6에 따른 복합체의 인장강도를 보여주는 그래프이다.
 도 7은 실시예 7에 따른 복합체의 흡습률을 보여주는 그래프이다.
 도 8은 실시예 8에 따른 조골모세포에 대한 독성 정도를 세포 생존률(cell wiability)을 보여주는 그래프로, 흰색 원(○)은 실시예 1의 복합체 #HA50 (50% HA + Dopamine)의 결과를 나타낸 것이며, 검은 역삼각형(▼)은 비교예 2의 복합체(50% HA)의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0031] [실시예]

[0032] **실시예 1. 하이드록시아파타이트/키토산/도파민 복합체 제조**

[0033] 복합체는 도 1에 나타난 바와 같이 제조하였다. 구체적으로 반응용기에 수산화칼슘 수용액(96% pure and maximum 3 wt% CaCO₂)을 넣고 98℃로 일정하게 가열하였다. 가열하면서 오르토티인산 수용액(85% orthophosphoric acid, H₃PO₄)을 2mL/min로 첨가하였다. 반응용기 내 용액의 pH가 8.01이 되었을 때(t1) 반응용기에 1%(v/v) 아세트산 수용액에 키토산을 10g/L의 농도로 용해시킨 용액을 첨가하였고, pH 6 이하에서 도파민의 산화가 최소로 일어나기 때문에 반응용기 내 pH가 6이 되었을 때 1%(v/v) 아세트산 수용액에 도파민을 1g/L 농도로 용해시킨 용액을 첨가하였고, 30분 동안 교반기로 저어주었다.

[0034] 상기 수산화칼슘 수용액, 오르토티인산 수용액을 포함하여 첨가되는 화합물의 혼합량은 아래 표 1에 나타내었으며, 도파민은 첨가한 키토산의 10% (w/w)로 첨가하였다.

표 1

샘플명	혼합량				하이드록시아파타이트 (wt%)
	Ca(OH) ₂ (mmol)	H ₃ PO ₄ (mmol)	Chitosan solution (mL)	Dopamine Solution (mL)	
#HA25	3	1.8	90	90	25
#HA50	10	6	90	90	50
#HA75	21	12.6	90	90	75

[0036] 그 후 반응용기 내의 온도를 실온까지 낮춘 후 반응용기 내의 각 #HA25, #HA50, #HA75을 페트리 디쉬(petri dish)에 옮겨 주었고(각 샘플별로 별도의 페트리 디쉬 사용), 상기 페트리 디쉬를 진공오븐에 넣고 37℃를 유지시키면서 각각의 샘플을 하루 동안 건조시켰다. 건조된 각각의 샘플에 수산화나트륨(NaOH)을 30분 동안 처리하여 각각의 필름을 완성시켰고, 상기 각각의 필름을 물과 에탄올에 침지시켜 필름에 남아있는 수산화나트륨을 제거하였다. 그리고 페트리 디쉬에 만들어진 각각의 필름을 떼어내어 SEM(scanning electron microscope)(JEOL 전자 현미경)을 통하여 필름을 구성하는 분자의 모양을 관찰하였으며, 그 결과를 도 2a, 도 2b 및 도 2c에 나타내었다.

[0037] 도 2a는 상기 합성된 #HA25 필름 표면의 SEM 측정 사진을 나타낸 것이며, 도 2b는 상기 합성된 #HA50 필름 표면의 SEM 측정 사진을 나타낸 것이며, 도 2c는 상기 합성된 #HA75 필름 표면의 SEM 측정 사진을 나타낸 것이다.

[0038] 상기 합성된 #HA50 필름의 단면을 SEM(JEOL 전자 현미경)을 통하여 관찰하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0039] 도 3은 합성된 #HA50 필름 단면의 SEM 측정 사진을 나타낸 것으로, 필름 전체적으로 고르게 나노구조가 분포함을 나타낸다.

[0040] 상기 합성된 #HA50 필름의 단면을 TEM을 통하여 관찰하였으며, 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0041] 도 4a는 합성된 #HA50 필름 단면의 TEM 측정 사진을 나타낸 것으로 필름에 바늘모양의 나노구조가 형성되어 있음과 aspect ratio가 증가함을 확인하였다

[0042] **실시예 2. 하이드록시아파타이트/키토산/도파 복합체 제조**

[0043] 상기 실시예 1의 #HA50의 제조방법에서 도파민 대신 도파(DOPA)를 사용한 것 이외에는 동일한 방법으로 필름을 제조하였다.

[0044] 상기 필름을 실시예 1과 동일한 방법으로 필름의 표면 및 단면을 SEM을 통하여 관찰하였으며, 또한 필름의 단면을 TEM을 통하여 관찰하였고, 그 결과 aspect ratio가 증가함을 확인하였다.

[0045] **실시예 3. 하이드록시아파타이트/키토산/메틸카테콜 복합체 제조**

[0046] 상기 실시예 1의 #HA50의 제조방법에서 도파민 대신 메틸카테콜을 사용한 것 이외에는 동일한 방법으로 필름을

제조하였다.

[0047] 상기 필름을 실시예 1과 동일한 방법으로 필름의 표면 및 단면을 SEM을 통하여 관찰하였으며, 또한 필름의 단면을 TEM을 통하여 확인하였다.

[0048] **실시예 4. 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체 제조**

[0049] 상기 실시예 1의 #HA50의 제조방법에서 도파민 대신 카테콜을 사용한 것 이외에는 동일한 방법으로 필름을 제조하였다.

[0050] 상기 필름을 실시예 1과 동일한 방법으로 필름의 표면 및 단면을 SEM을 통하여 관찰하였으며, 또한 필름의 단면을 TEM을 통하여 확인하였다.

[0051] **비교예 1. 키토산 복합체 제조**

[0052] 1% (v/v) 아세트산 용액에 10 g/L의 키토산 (High molecular weight, sigma-aldrich, Chitosan 419419-(Coarse ground flakes and powder) 800-2000 cP, 1 % in 1% acetic acid, Brookfield(lit.), DDA: 80% 이상) 녹이고 24시간 동안 40℃에서 초음파 하에 녹여서 키토산이 용해된 아세트산 수용액을 제조하였다. 바닥 전체가 테프론 테이프로 코팅된 페트리 디쉬에 상기 키토산이 용해된 아세트산 수용액을 30ml를 넣었다. 상기 페트리 디쉬를 40℃ 대류식 오븐(convection oven)에서 2일 동안 건조시켜, 약 0.1mm의 freestanding 100% 필름을 제작하였다.

[0053] **비교예 2. 하이드록시아파타이트/키토산 복합체 제조**

[0054] 상기 실시예 1의 #HA25, #HA50, #HA75의 제조방법에서 도파민을 첨가하지 않는 것을 제외하고는 동일한 방법으로 25wt%, 50wt%, 75wt% 하이드록시아파타이트/키토산 필름을 제조하였다. 이와 같이 제조된 도파민이 포함되지 않은 하이드록시아파타이트/키토산 필름의 샘플을 각각 25%HA, 50%HA, 및 75%HA로 각각 명명하였으며, 상기 샘플에 포함된 각 성분의 함량을 아래의 표 2에 나타내었다.

표 2

[0055]

샘플명	혼합량			하이드록시아파타이트 (wt%)
	Ca(OH) ₂ (mmol)	H ₃ PO ₄ (mmol)	Chitosan solution (mL)	
25%HA	3	1.8	90	25
50%HA	10	6	90	50
75%HA	21	12.6	90	75

[0056] 상기 제조된 필름의 단면을 상기 실시예 1과 같이 TEM을 통하여 관찰하였으며, 이 중에서 50%HA에 대한 결과로도 4b에 나타내었다.

[0057] 도 4b는 상기 50wt% 하이드록시아파타이트/키토산 필름(50%HA) 단면의 TEM 측정 사진을 나타낸 것이다.

[0058] 도 4b와 도 4a를 비교하였을 때 도 4a에 나타난 사진에는 필름에 바늘모양의 나노구조가 형성되었으며 상대적으로 aspect ratio가 증가된 것을 나타내었다.

[0059] **실시예 5. FTIR 분석**

[0060] 실시예 1에서 제조된 각 필름들을 BIORAD-excalibur series를 사용하여 Attenuated total reflection(ATR) 모드로 해상도 2/cm를 통해 4000-400/cm 로 스캔하여 FTIR 분석을 실시하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0061] 도 5는 FTIR 분석 결과를 나타낸 것으로 3500cm⁻¹는 OH peak를 나타내며, 1020 cm⁻¹, 600 cm⁻¹, 562 cm⁻¹는

phosphate mode의 apaptide를 나타낸 것이며, 도 5의 검정색은 #HA25, 빨간색은 #HA50, 파란색은 #HA75를 의미한다.

[0062] 도 5에 나타난 바와 같이 필름의 하이드록시아파타이트의 구별되는 피크들을 다 가지고 있는 것을 확인하였으며, 이는 하이드록시아파타이트를 포함하는 복합체가 성공적으로 제조되었다는 것을 의미한다.

[0063] **실시예 6. 인장강도 테스트**

[0064] 100wt% 하이드록시아파타이드 필름은 너무 잘 부서져서 인장강도 테스트를 하지 못하였고, 75wt% 하이드록시아파타이트/키토산/도파민 필름 샘플도 다소 부서지는 경향을 보였다. 실시예 1에서 제조된 #HA25의 필름과 #HA50의 필름, 비교예 2에서 제조된 25%HA 필름과 50%HA 필름을 1cm x 3cm의 직사각형 형태로 자르고 두께는 micrometer를 이용하여 0.001mm 자리까지 측정하였다. Dry의 경우 진공오븐에서 3시간 이상 건조시킨 필름을 의미하며, Wet의 경우에는 0.15M PBS에서 5시간 침지시켜 포화시킨 샘플을 의미한다.

[0065] 인장강도 테스트 기구(Instron 3340 모델)을 이용해서 young's constant extension rate 모드에서 변형속도를 0.5mm/min으로 하고, 시편 집게와 집게 사이의 거리를 1cm로 하였고, 얻어진 결과를 하기 표 2 및 도 6에 나타내었다.

[0066] 표 3는 상기 필름들을 측정된 탄성계수(E, elastic modulus or Young's modulus), 최대인장강도(UTS, ultimate tensile strength) 및 연장(elongation)을 나타낸 것이고, 도 6은 인장강도 테스트 결과를 나타낸 것이다.

[0067] 도 6을 구체적으로 설명하면, stress는 F(force)/A(area, 면적)으로 잡아당기는 힘을 단면적으로 나눈 값이며 단위는 N/m²이다. elongation 은 늘어난 비율을 의미하며 [(최종길이-처음길이)/처음길이]x100 을 의미한다. 이와 같이, 처음길이와 면적을 상기 최대인장강도 테스트 기구에 대입하고 작동시켜 값을 얻게 된다. X축은 elongation, Y축은 stress인 그래프가 얻어지는데, 여기서 변곡점이 일어나기 전의 초기 기울기에 100을 곱해준 값을 를 young's modulus라고 하고, 변곡점이 일어나는 점을 yield point라고 하며, 이때의 strain을 yield strain, 이때의 스트레스를 yield stress라고 한다. 최종적으로 파괴되는 지점을 breaking point라고 하며, 이때의 strain을 Breaking strain, 이때의 stress를 Breaking stress라고 한다. 파괴될 때의 최대의 strain을 최대 인장강도라고 한다.

표 3

샘플명	탄성계수(Mpa)	최대인장강도(Mpa)	연장(%)
25%HA(dry)	1744.00437.96	34.00	3
25%HA(wet)	30.03	5.81	21
#HA25(25% Ha + Dopamine(dry))	1469.03	24.72	4
#HA25(25% Ha + Dopamine(wet))	39.23	3.22	12
50%HA(dry)	2259.00	39.58	11
50%HA(wet)	28.88	4.81	9
#HA50(50% Ha + Dopamine(dry))	2613.80	30.02	4
#HA50(50% Ha + Dopamine(wet))	47.70	4.55	11

[0069] 표 3 및 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조된 #HA50의 필름은 비교예 2의 50%HA 필름에 비하여 상대적으로 높은 탄성계수 및 최대인장강도를 보임과 동시에 낮은 연장을 나타내었다.

[0070] 실시예 1에서 제조된 #HA50의 필름의 탄성계수는 약 2 Gpa를 나타내었고, 이러한 결과는 인간의 뼈(12-18 Gpa)에 비해서는 약하지만 치주(periodontal), 인대(ligament)와 같은 뼈와 질긴조직(1.2-1.8 Gpa) 사이의 계면조직 등에는 충분히 활용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0071] **실시예 7. 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 흡습률 테스트**

[0072] 상기 실시예 4에서 만들어진 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 흡습률(EWC, equilibrium water content)을 측정하였다. 시료의 흡습률은 다음과 같이 측정되었다.

- [0073] 완전히 건조된 시료의 무게(W_0)를 잰 후, 0.15 M phosphate Buffered Saline (pH 7.4)에 5시간 담근 후 꺼내어 그 무게(W_t)를 재었다. 상기 무게는 0.0001를 최소단위로 하는 정밀저울로 측정하였다. 흡습률(%)를 $100 \times (W_t - W_0)/W_t$ 로 정의하였다.
- [0074] 선행연구에서 얻어진 결과로 순수 키토산의 흡습률은 약 66%였고 (Biotechnology Progress, 2013, 29,505-512), 하이드록시아파타이트/키토산 복합체의 경우는 약 160~180% 정도를 보여주고 있으나, 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 흡습률은 약 50%였다. 이는 이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 water-resistance가 키토산 및 하이드록시아파타이트/키토산 복합체에 비해 현저하게 개선되었음을 나타낸다.
- [0075] **실시예 8. 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 조골모세포 실험**
- [0076] 상기 실시예 4에서 만들어진 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 세포활성을 다음과 같이 측정하였다.
- [0077] 구체적으로, 쥐 조골모세포(MC3T3-E1; Riken cell bank)를 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone), 1% antibiotic-antimycotic(Hyclone)이 포함된 동물세포배양액(alpha-MEM; Hyclone)을 사용하여 37°C 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0078] 상기 세포를 세포배양 접시에서 떼어내어 1% antibiotic-antimycotic(Hyclone)이 포함된 동물세포배양액(alpha-MEM; Hyclone; FBS-free)에 2×10^5 개/ml 농도로 희석하고, 12-well 세포배양접시(Falcon, USA)에 실시예 4의 복합체 필름(하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체)을 배양접시 크기에 맞게 잘라 넣은 후, 상기 세포를 1×10^5 개/well의 양으로 주입하고 최대 3일 동안 인큐베이터에서 배양하였으며 매 24시간 마다 살아있는 세포를 정량화해주었다. 살아있는 세포를 정량화하기 위해서 CCK-8 (cell counting kit-8; Dojindo, Japan) 용액 50ul(microliter)을 well에 주입하고, 3시간 추가 배양한 후, 다음과 같은 분석을 실시하였다.
- [0079] 살아있는 세포는 미토콘드리아에서 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8)를 물에 녹는 포르마잔(formazan)으로 환원시켜주기 때문에 분광기(spectrophotometer)를 통하여 450nm에서의 흡광도를 측정하여 배지 속에 녹아 있는 포르마잔의 양을 측정하였다.
- [0080] 또한, 이를 계속 배양하기 위해서 PBS로 씻어내고, 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone), 1% antibiotic-antimycotic(Hyclone)이 포함된 동물세포배양액(alpha-MEM; Hyclone) 1ml를 넣어 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. CCK 배지의 450nm에서 상대적 흡광계수는 특정표면 위의 상대적인 생존 세포수를 의미한다. 3일동안 배양하면서 배양 시간에 따른 상대적 흡광계수를 측정하고, 접착 시와 비교해 상대적 생존 세포수를 도 8에 나타내었다.
- [0081] 상기 측정방법에서 실시예 4의 복합체 대신 비교예 2의 복합체를 사용한 것 이외에는 동일한 방법으로 세포활성을 측정하여 도 8에 나타내었다. 흰색원은 실시예 1의 복합체 #HA50 (50% HA + Dopamine)의 결과를 나타낸 것이며, 검은역삼각형은 비교예 2의 복합체 50%HA의 결과를 나타낸 것이다. 도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 4의 복합체 위의 생존 조골세포 수는 비교예 2의 복합체 위의 생존 조골세포 수에 비하여는 약 20% 정도 적었다. 하지만 그 차이가 크지 않고, 느리지만 성장곡선을 그리기 때문에, 도파민 또는 카테콜 화합물의 첨가는 세포독성을 증가시키지 않음을 나타낸다.
- [0082] **실시예 9. 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 aspect ratio 측정**
- [0083] 상기 비교예 2의 하이드록시아파타이트/키토산 복합체와 실시예 4의 하이드록시아파타이트/키토산/카테콜 복합체의 aspect ratio를, TEM과 SEM에 나타난 이미지를 ImageJ프로그램(미국, NIH 국립보건원)으로 분석하여 표로 정리하였다.
- [0084] Dopamine을 첨가하는 경우 aspect ratio의 증가가 관찰되었으며, 25 %에서는 aspect ratio의 증가가 거의 존재하지 않아서 명시하지 않았다.

표 4

[0085]

샘플명	Aspect ratio
50%HA	2.48
#HA50	4.44
75%HA	2.50
#HA75	5.71

[0086]

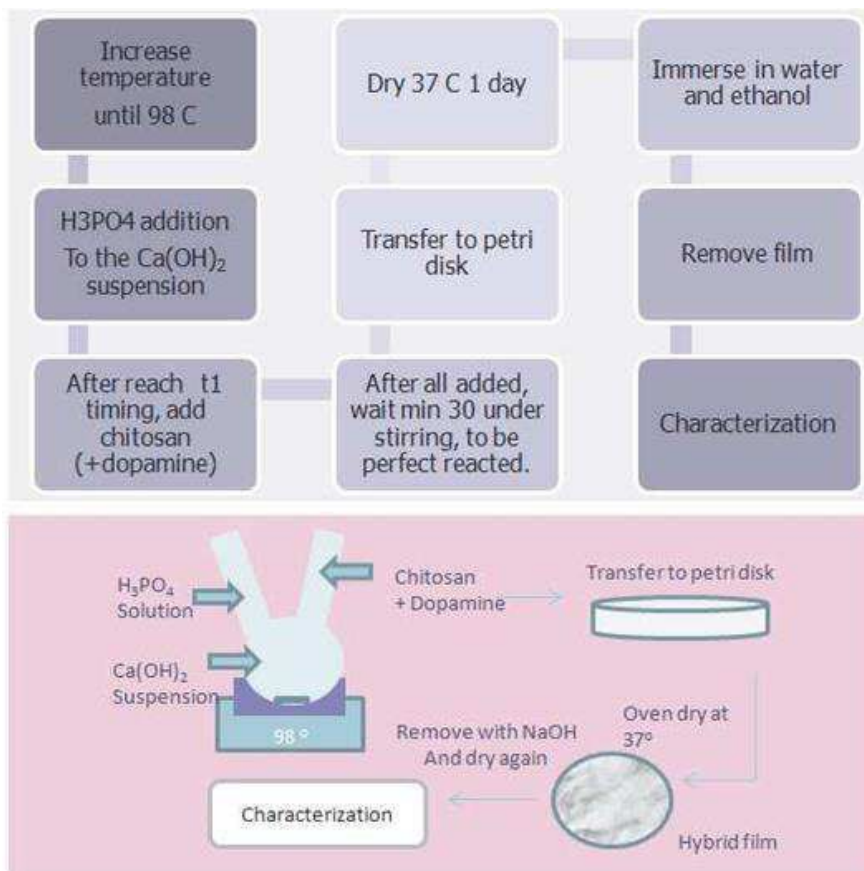
표 4는 Aspect ratio(중형비)를 나타내며, 표 4에 나타난 바와 같이, 몸속의 HA는 높은 aspect ratio를 가지고 있는바, 약 3~6정도의 aspect ratio를 가지는 경우에 효능이 있다고 볼 수 있다. 비교예 2에서 제조된 50%HA 및 75%HA의 경우 aspect ratio가 3에 미치지 못하였으나, 실시예 1에서 제조된 #HA50 및 #HA75 필름은, 각각 4.44와 5.71의 aspect ratio를 보여주었다.

[0087]

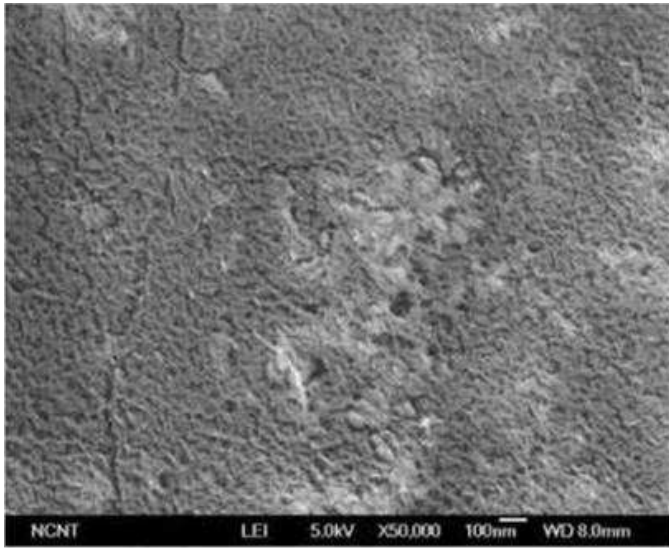
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

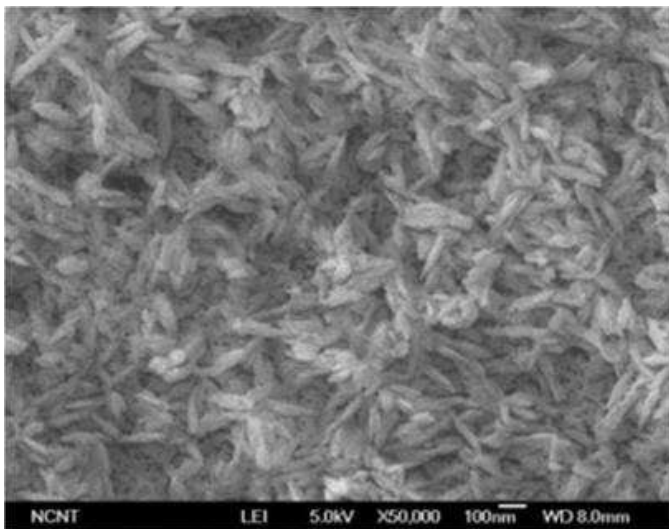
도면1



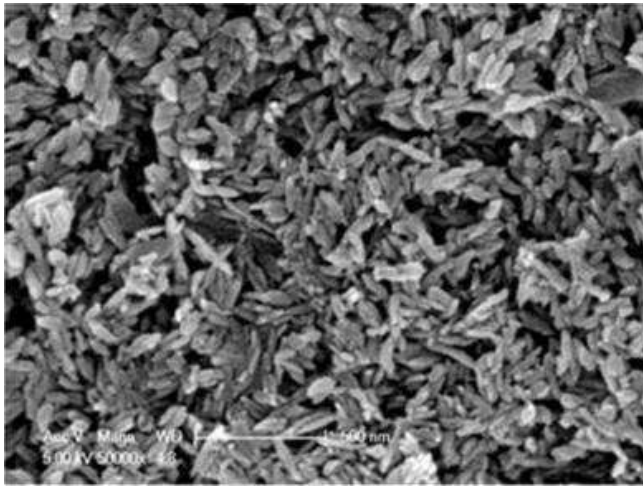
도면2a



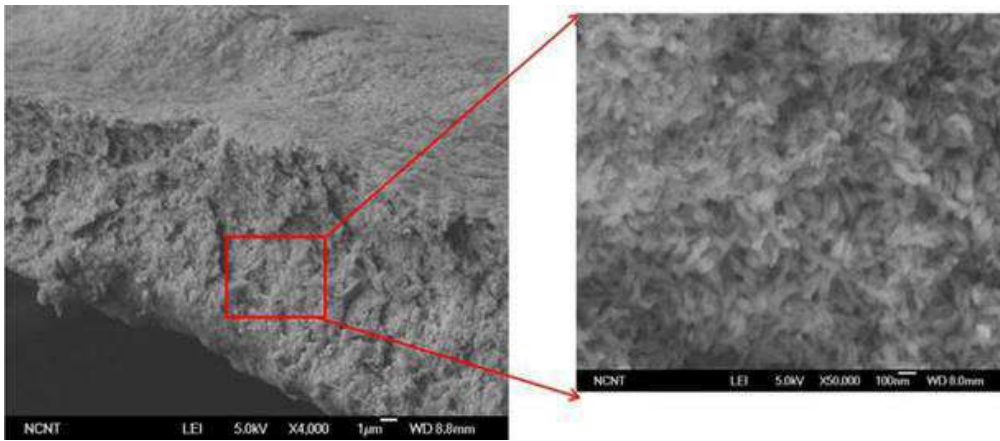
도면2b



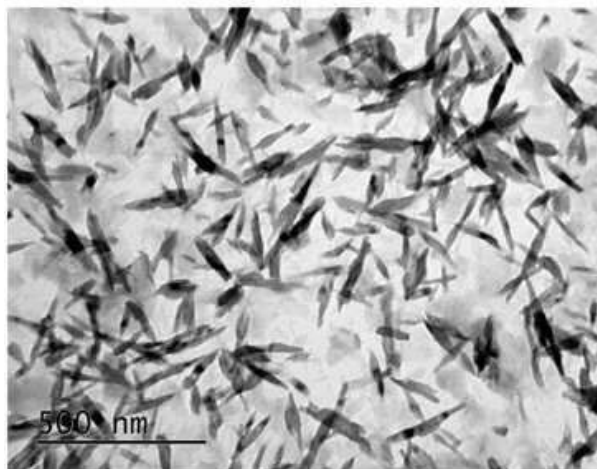
도면2c



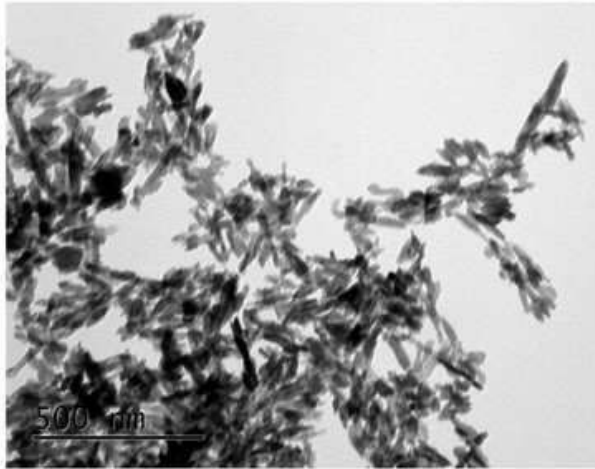
도면3



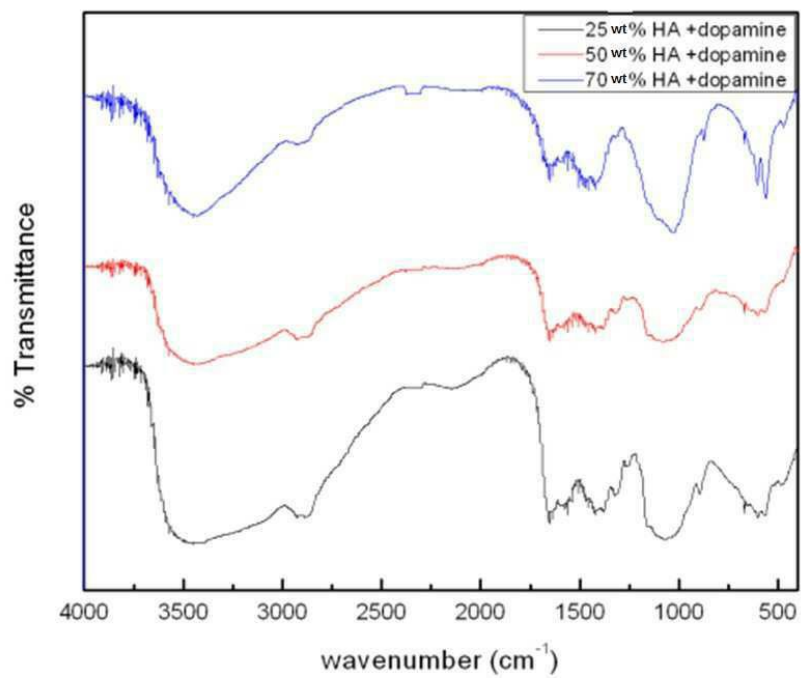
도면4a



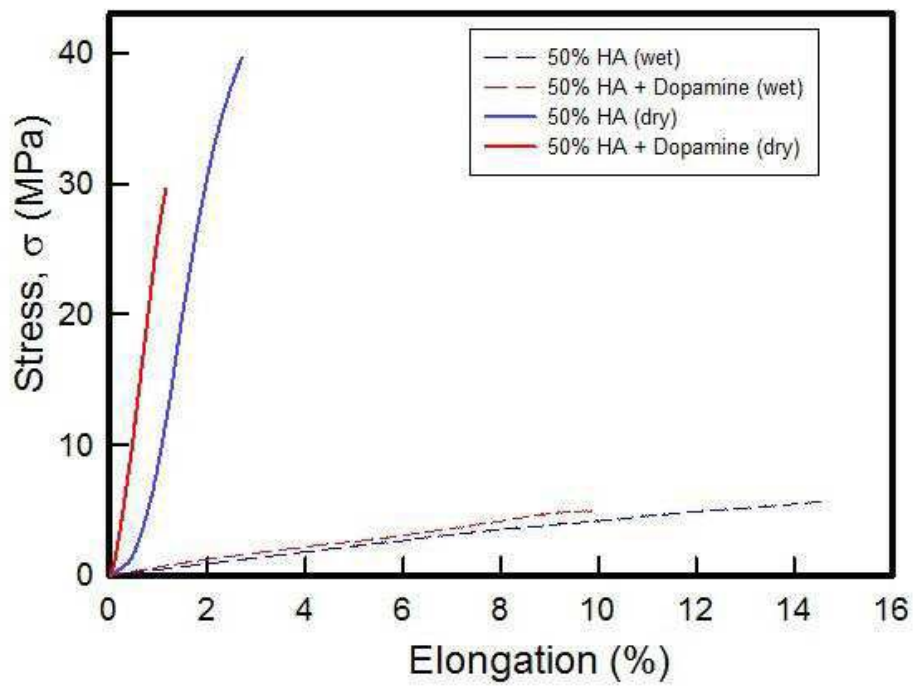
도면4b



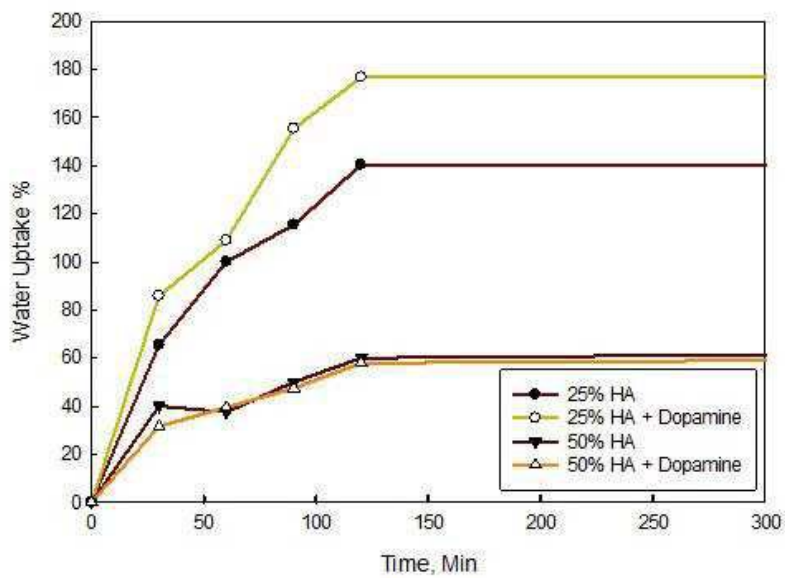
도면5



도면6



도면7



도면8

