



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년02월05일  
 (11) 등록번호 10-1229436  
 (24) 등록일자 2013년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61L 27/38* (2006.01) *A61L 27/14* (2006.01)  
*A61F 2/28* (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)  
 (21) 출원번호 10-2010-0072092  
 (22) 출원일자 2010년07월26일  
 심사청구일자 2010년07월26일  
 (65) 공개번호 10-2012-0010506  
 (43) 공개일자 2012년02월03일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 JP2009528090 A  
 KR1020030027934 A  
 JP05085939 A

(73) 특허권자  
**한스바이오메드 주식회사**  
 서울특별시 성동구 성수일로 55 (성수동1가)  
 (72) 발명자  
**전성현**  
 대전광역시 유성구 관들2길 72-2, 201호 (관평동)  
**채지화**  
 대전광역시 유성구 구즉로 25, 송강그린 APT 317  
 동 601호 (송강동)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**특허법인이지**

전체 청구항 수 : 총 15 항

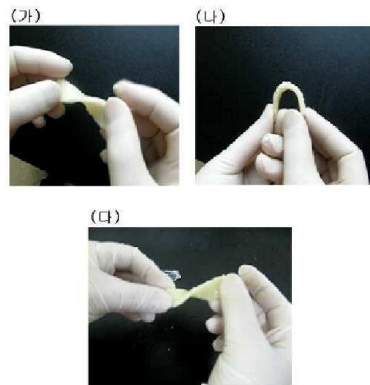
심사관 : 신주철

(54) 발명의 명칭 **골재생체 및 그 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 골 손상부위에 적용되는 골재생체 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 손상된 뼈의 재건을 목적으로 탈회골기질을 이용하여 치료를 수행하는 정형외과, 치과, 신경외과 등의 분야에서, 기술이 용이하도록 주입성이 뛰어나며, 이식 후에도 흘러내리지 않도록 생체 내에서 형태를 유지할 수 있는 물리적인 특징이 매우 중요하다. 또한, 이식된 생체 내에서 거부반응을 일으킴이 없이 우수한 골재생 능력을 나타낼 수 있도록 하는 것 또한 탈회골기질을 이용한 이식용 재료가 제공될 수 있다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**이은정**

경북 문경시 유곡동 182-8번지

**허재원**

대전광역시 대덕구 한밭대로1101번길 24 (중리동)

**강계원**

대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, 사이언스  
빌 # 4-103 (원촌동)

**황호찬**

서울특별시 광진구 구의동 631-1 현대프라임APT  
4-2702

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

인체 유래(human)의 탈회골 기질 및 피질골이 혼합된 골분(bone powder) 40~90중량% 및 젤라틴 10~20중량%를 포함하고, 방사선으로 처리된 골재생체.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 골분(bone powder)은 0.01 ~ 2mm 크기로 파쇄된 것임을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 젤라틴은 인체(human) 유래인 것을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 젤라틴은 방사선처리를 통해 가교화(cross-linked)된 것인 골재생체.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 방사선은 감마선, 전자선(E-beam) 및 X-선으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방사선의 흡수선량은 10~30K Gy인 것을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 보습제 0~50중량%을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 보습제는 글리세롤인 것을 특징으로 하는 골재생체.

### 청구항 11

하기의 단계를 포함하는 골재생체의 제조방법:

피질골을 HCl로 탈회처리하고 파쇄하고 탈회골 기질과 혼합하여 골분(bone powder)을 준비하는 단계;  
상기 골분 1g당 0.1~2부피%의 수산화칼슘(Ca(OH)<sub>2</sub>) 용액 15~25mL의 비율로 10~20℃에서 30~70일간 가수분해처리 하는 단계;  
상기 가수분해처리된 골분 1g당 5~15mL의 증류수 또는 생리식염수를 가하여 현탁액을 제조하는 단계;  
상기 제조된 현탁액을 50~90℃까지 온도를 승온시키면서 추출액을 수집하는 단계;  
상기 수집된 추출액은 여과 또는 원심분리를 통하여 골분을 제거하고 농축시켜 젤라틴을 추출하는 단계;  
상기 추출된 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계; 및  
상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사하는 단계.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

제11항에 있어서, 상기 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계는 전체 혼합물에서 골분이 40~90중량%, 젤라틴이 10~20 중량% 되도록 혼합하는 것을 특징으로 하는 골재생체의 제조방법.

**청구항 16**

제11항에 있어서, 상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사하는 단계는 흡수선량이 10~30KGy이 되도록 방사선을 조사하는 것을 특징으로 하는 골재생체의 제조방법.

**청구항 17**

제1항, 제3항 및 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 골재생체를 시트(Sheet)의 일측 또는 양측에 부착시킨 골재생용 시트.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 시트는 상피조직(Epithelium), 내피조직(Endothelium) 및 결합조직(Connective tissue)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것임을 특징으로 하는 골재생용 시트.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 상기 시트는 포유류 유래의 세포간질(Extracellular Matrix) 또는 심막(Pericardium)을 포함하는 것을 특징으로 하는 골재생용 시트.

**청구항 20**

제17항에 있어서, 상기 시트는 포유류 유래의 콜라겐 또는 기저막(basement membrane)을 포함하는 것을 특징으로 하는 골재생용 시트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 골 손상부위에 적용되는 골재생제 및 그 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 방사선으로 가교화된 젤라틴을 함유하는 골재생제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 의료기술의 발달 및 사고, 재해, 치과적 치료의 증가에 따라 이에 필요한 생체재료의 중요성이 날로 커지고 있다. 생체재료는 의약품을 제외한 인공, 천연 또는 그들의 복합재료로서 인체 내에서 단기 또는 장기간 동안 인체의 조직이나 기관의 기능을 치료, 보강, 대치 또는 회복시키는데 사용되는 재료를 일컫는다.

[0003] 손상된 뼈조직의 치료분야에 있어서 이들의 재건을 주요 목적으로 하는 여러 가지 이식재가 알려져 있다. 이들 이식재는 무유합골절의 치료, 관절 고정, 골강의 충전, 뼈 및 관절부위 손실분 대체, 관골구와 두개골의 강화, 성장판 연골의 융합 등 매우 다양한 목적으로 사용되고 있다.

[0004] 특히 뼈 이식을 통한 뼈의 재건 분야에 있어서는, 자신의 뼈 일부분을 채취하여 이식부위에 이식하는 자가이식이 가장 일반적으로 사용되고 있는 방법이다(S. Stevenson, Biology of bone graft, Orthop Clin North Am, 30, 543(1999)). 자가이식의 장점은 뼈의 기질뿐만 아니라 뼈형성에 작용하는 살아있는 세포를 그대로 이식부위에 제공함으로써 뼈생성이 여타의 이식물과 비교할 때 보다 원활하게 일어날 수 있다는 점과, 자신의 뼈 일부분을 사용하기 때문에 면역거부반응에 의한 치료효과의 반감 및 실패확률을 크게 줄일 수 있다는 점이다. 또한, 뼈의 흡수가 거의 없고 피로골절이 적으며 골유도 및 골전도 능력이 뛰어나기 때문에 뼈의 유합과 비후가 신속하게 진행되어 골간의 큰 손실부 재건에 유리하다. 그러나, 이러한 자가이식의 장점에도 불구하고, 자가이식은 피시술자의 신체에서 뼈를 채취해야하므로, 환자의 고통 및 외과적 수술에 필히 수반되는 이차감염의 문제가 항상 존재하는 단점이 있다.

[0005] 이러한 단점을 해결하고자 대안으로 제시된 것이 탈회골기질(DBM; Demineralized Bone Matrix)이다. 우수한 골유도 능력을 가진 것으로 알려진 탈회골기질, 즉 탈회과정을 거친 뼈기질은 1889년 Senn이 방부제를 골수염 환자의 인체 내에 주입시키기 위한 일종의 운반체로서 사용하기 시작한 것이 그 시초이다. 그 후, 임상목적으로 탈회골기질이 실질적으로 가시화된 것은 Urist의 연구를 통해 탈회된 동결건조골에 의해 골형성이 유도되는 것이 관찰된 이후이다. 그 후 탈회골기질에 대해 많은 연구가 수행되어 Mulliken과 Glowacki에 이르러서는 비탈회골에 비해 탈회골이 골형성을 유도하는데 있어 보다 더 효과적임이 보고된 바 있다.

[0006] 탈회골기질은 골유도 능력뿐만 아니라 골 채취를 위한 부가적인 수술이 필요치 않은 장점을 갖고 있다. 그러나, 탈회골기질은 수용액과 친화성이 떨어지며, 단독으로 이식시 형태유지가 어려운 단점을 갖고 있다. 또한, 특별한 안정화제 또는 담체와 같이 사용되지 않을 경우, 탈회골기질 내에 포함되어 있는 골형성 단백질 (BMP; Bone Morphogenetic Protein)이 생체 내에서 쉽게 퇴화될 수 있는 가능성이 항상 존재하며, 손상부위에 이식할 때 탈회골기질 자체만으로는 이식이 가능하지 않은 단점이 존재한다.

[0007] 따라서, 손상된 뼈의 재건을 목적으로 탈회골기질을 이용하여 치료를 수행하는 정형외과, 치과, 신경외과 등의 분야에서, 시술이 용이하도록 주입성이 뛰어나며, 이식 후에도 흘러내리지 않도록 생체 내에서 형태를 유지할 수 있는 물리적인 특징이 매우 중요하다. 또한, 이식된 생체 내에서 거부반응을 일으키지 않아 우수한 골재생 능력을 나타낼 수 있도록 하는 것 또한 탈회골기질을 이용한 이식용 재료의 필수요건이다.

[0008] 탈회골기질을 이용한 이식용 재료의 제조공정에 있어서는 탈회과정 및 멸균공정이 수반된다. 상기 탈회 및 멸균 과정에 있어서, 화학물질의 사용을 최대한 줄여 독성성분에 의한 오염을 최대한 방지하면서도 병원체가 완전히 소거될 수 있도록 함으로써 보다 높은 신뢰도를 갖는 제품 및 공정의 개발이 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 이와 같은 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 보다 우수한 골재생능력, 생체적합성, 형태유지능력을 갖는 골재생체를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0010] 결국, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 우수한 골재생능력, 생체적합성, 유연성, 형태유지능력을 갖는 골재생체를 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 상기 골재생체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 상기 골재생체를 포함하는 골재생용 시트를 제공하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0013] 본 발명의 일 측면에 따르면, 골분(bone powder) 40~90중량% 및 젤라틴 10~20중량%를 포함하고, 방사선으로 처리된 골재생체가 제공될 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따르면, 상기 골분(bone powder)은 피질골(Cortical bone), 탈회골기질(Demineralized bone matrix, DBM) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 따르면, 상기 골분(bone powder)은 0.01 ~ 2mm 크기로 파쇄된 것일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 상기 골분은 인체(human) 유래인 것일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴은 인체(human) 유래인 것일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴은 방사선처리를 통해 가교화(cross-linked)될 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 상기 방사선은 감마선, 전자선(E-beam) 및 X-선으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 따르면, 상기 방사선의 흡수선량은 10~30Kgy일 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 따르면, 보습제 0~50중량%을 더 포함할 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 따르면, 상기 보습제는 글리세롤일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 피질골을 HCl로 탈회처리하고 파쇄하여 골분(bone powder)을 준비하는 단계; 상기 골분을 수산화칼슘(Ca(OH)<sub>2</sub>) 용액으로 가수분해처리하는 단계; 상기 가수분해처리된 골분으로부터 젤라틴을 추출하는 단계; 상기 추출된 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계; 및 상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 골재생체의 제조방법이 제공될 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 따르면, 상기 골분(bone powder)은 피질골(Cortical bone), 탈회골기질(Demineralized bone matrix, DBM) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 따르면, 상기 골분을 수산화칼슘 용액으로 가수분해처리하는 단계는 0.1 ~ 2부피%의 수산화칼슘용액을 골분 1g당 15~25ml의 비율로 10~20℃로 30~70일간 처리할 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 따르면, 상기 탈회 및 가수분해처리된 골분으로부터 젤라틴을 추출하는 단계는 증류수 또는 생리식염수에 상기 탈회처리된 골분을 현탁하고 50℃에서 90℃까지 온도를 증가시키면서 여과시켜 이루어질 수 있다.
- [0027] 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계는 전체 혼합물에서 골분이 40~90중량%, 젤라틴이 10~20중량% 되도록 혼합하는 것일 수 있다.
- [0028] 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사하는 단계는 흡수선량이 10~30Kgy이 되도록 방사선을 조사하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 골재생체를 시트(Sheet)의 일측 또는 양측에 부착시킨 골재생용 시트.
- [0030] 일 실시예에 따르면, 상기 시트는 상피조직(Epithelium), 내피조직(Endothelium) 및 결합조직(Connective tissue)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0031] 일 실시예에 따르면, 상기 시트는 포유류 유래의 세포간질(Extracellular Matrix) 또는 심막(Pericardium)을 포함할 수 있다.

[0032] 일 실시예에 따르면, 상기 시트는 포유류 유래의 콜라겐 또는 기저막(basement membrane)을 포함할 수 있다.

**발명의 효과**

[0033] 본 발명에 따르면, 손상된 뼈의 재건을 목적으로 탈회골기질을 이용하여 치료를 수행하는 정형외과, 치과, 신경외과 등의 분야에서, 시술이 용이하도록 주입성이 뛰어나며, 이식 후에도 흘러내리지 않도록 생체 내에서 형태를 유지할 수 있는 물리적인 특징이 매우 중요하다. 또한, 이식된 생체 내에서 거부반응을 일으키지 않아 우수 골재생 능력을 나타낼 수 있도록 하는 것 또한 탈회골기질을 이용한 이식용 재료가 제공될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0034] 도 1은 본 발명의 골이식재에 대한 유연성 테스트 결과이다.

도 2의 (가)는 SD rat의 척추를 중심으로 양쪽의 근육을 갈라서 절개한 후 L4 ~ 5번 요추를 노출시킨 사진이다.

도 2의 (나)는 SD rat의 요추 L4~L5번에 본 발명에 따른 골재생재를 삽입한 모양이다.

도 3은 시술직후 촬영한 X-ray사진이다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 4는 이식 후 6주 후에 촬영한 골이식재의 X-ray 촬영결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 5는 이식 후 6주 후에 촬영한 골이식재의 Micro CT 결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 6은 이식 후 6주 후에 촬영한 골이식재의 H&E 조직검사 결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 7은 이식 후 12주 후에 촬영한 골이식재의 X-ray결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 8은 이식 후 12주 후에 촬영한 골이식재의 Micro CT 결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 9는 이식 후 12주 후에 촬영한 골이식재의 H&E 조직검사 결과를 나타내고 있다. (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

도 10은 젤라틴이 포함된 골이식재와 기적막을 포함하는 시트(SureDerm)를 접합한 후 MT 염색한 사진이다.

도 11은 젤라틴이 포함된 골이식재와 무세포진피층이 접합된 물질을 rat의 피하에 이식한 후 4주 조직검사 사진이다. M은 근육, S는 시트(SureDerm), D는 진피, DBM은 골재생재를 나타내며, 화살표는 기저막 부분을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0035] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

- [0036] 본 발명은 우수한 골재생능력, 생체적합성, 유연성 및 형태유지능력을 갖는 골재생체 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0037] 본 발명의 일 측면에 따르면, 골분(bone powder) 40~90중량%, 방사선으로 가교화(cross-linked)되는 젤라틴 10~20중량%를 포함하는 골재생체가 제공될 수 있다.
- [0038] 이 때, 상기 골분은 피질골(Cortical bone), 탈회골기질(Demineralized bone matrix, DBM) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 골분의 원료가 되는 뼈는 ESB사, TSC사, Hopital Erasme사, TBI사, Allosource사 및 Lifelink사등 으로부터 입수가 가능하며, Rt/Lt. Humerus(좌우측 상완골), Rt/Lt. Radius(요골), Rt/Lt. Ulna(척골), Rt/Lt. Femur(대퇴골), Rt/Lt. Tibia(경골), Rt/Lt. Fibula(비골)등을 이용가능하나, 이에 한정되는 것은 아니며 그 외에 어떠한 종류의 인체뼈나 동물뼈도 무방하다.
- [0040] 상기 골분(bone powder)은 0.01 ~ 2 mm크기의 입자를 갖도록 뼈가 파쇄된 상태를 의미한다. 보다 바람직하게는 파쇄된 뼈입자의 크기가 0.15mm ~ 0.85mm인 것이 좋다.
- [0041] 상기 피질골은 뼈의 주요기능인 신체의 지지기능 및 내장기관의 보호, 운동력의 전달 및 다양한 화학물질, 특히 칼슘을 저장하고 방출하는 기능을 담당하고 있는 뼈의 바깥부분인 피질을 이루는 부분으로서 치밀골이라고도 불리는 밀도가 매우 높은 뼈조직을 말한다.
- [0042] 본 발명에 사용되는 피질골의 기원은, 시술하고자하는 대상물과 다른 종(species)으로부터 유래된 것도 무방하나, 같은 종일 경우에는 보다 높은 골재생효과 및 골재생 후의 형태유지 효과를 기대할 수 있다. 인간에게 시술하고자 하는 경우에는 인체로부터 유래한 피질골인 것이 바람직하다. 이와 마찬가지로 상기 젤라틴 역시 시술하고자하는 대상물과 다른 종(species)으로부터 유래된 것도 무관하나, 같은 종일 경우에는 보다 높은 골재생효과 및 골재생 후의 형태유지 효과를 기대할 수 있다. 인간에게 시술하고자 하는 경우에는 인체로부터 유래한 젤라틴인 것이 바람직하다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴은 방사선으로 가교화(cross-linked)될 수 있는데, 상기 방사선은 감마선, 전자선(E-beam) 및 X-선으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 전자선과 감마선일 수 있다.
- [0044] 일 실시예에 따르면, 상기 방사선의 흡수선량은 10~30K Gy, 보다 바람직하게는 15~25K Gy인 것이 좋다. 방사선 흡수선량이 10K Gy 미만인 경우에는 젤라틴의 가교화가 충분히 진행되지 않아 최종 결과물인 골재생체의 인장강도가 낮아지며, 따라서 이식에 요구되는 유연성 또한 나빠지게 되어 바람직하지 않다. 방사선 흡수선량이 30K Gy 이상인 경우에는 골재생용 조성물 내 생체분자의 변형 및 과도한 라디칼의 생성이 유발될 수 있어 바람직하지 않다.
- [0045] 본 발명에 따르면, 상기 골분과 방사선으로 가교화된 젤라틴의 혼합물에 보습제가 더 포함될 수 있다.
- [0046] 일 실시예에 따르면, 상기 보습제는 선택적 성분으로서 첨가되지 않을 수도 있으나, 첨가되는 경우에는 글리세롤일 수 있으며 전체 골재생체의 0~50중량% 첨가될 수 있다. 보습제가 50중량%를 초과하여 첨가될 경우에는 골재생체의 강도가 낮아지고 연성이 높아져 가교화과정을 거치더라도 유연성 및 형태유지가 어려울 수 있어 바람직하지 않다.
- [0047] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 골재생체는 원하는 형태의 몰드에 투입시키고 저온에서 성형공정을 거친 것일 수 있다.
- [0048] 골재생체는 그 형태와 상관없이 이식의 대상이 되는 골손상부위의 형태와 반드시 일치할 필요는 없고, 유사한 형태로 성형이 가공한 정도의 상태이면 족하다. 그러나, 필요에 따라서는 이식 대상의 골손상부위의 형태를 미리 파악하여 이에 맞는 모양을 제조할 수도 있으며, 다양한 상황에 일반적으로 적용될 수 있도록 막의 구조 또는 띠의 구조 등으로 미리 형상화시킨 것일 수도 있다.
- [0049] 이를 위해서는 상기의 골재생체의 성형성을 증가시키기 위한 다양한 재료가 더 첨가될 수 있다. 즉, 생체적합성이 뛰어난 선형의 소재, 튜브형의 소재, 입자형의 소재 및 부정형의 소재 등이 더 첨가되어 상기 골재생체의 물리적 특성을 향상시킬 수 있다. 이러한 형태의 소재들은 콜라겐, CMC(Carboxymethylcellulose) 또는 동물유래 젤라틴 등의 소재로부터 선택될 수 있으며, 이식 대상에 면역반응을 유발하지 않는다면 특별한 제한은 없다.

- [0050] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 피질골을 HCl로 탈회처리하고 과쇄하여 골분(bone powder)을 준비하는 단계; 상기 골분을 수산화칼슘(Ca(OH)<sub>2</sub>) 용액으로 가수분해처리하는 단계; 상기 가수분해처리된 골분으로부터 젤라틴을 추출하는 단계; 상기 추출된 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계; 및 상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 골재생제의 제조방법이 제공될 수 있다.
- [0051] 상기 탈회처리 단계에 있어서, 피질골의 경우에는 1차로 0.1 ~ 2N의 HCl을 가하여 2 ~ 8시간 동안 탈회처리한다. 이와는 달리, 상기와 같은 탈회과정을 거친 바 있는 탈회골기질(DBM)은 추가적인 탈회처리없이 곧바로 다음 과정으로 투입될 수 있다. 탈회처리의 횟수에는 제한이 없으나, HCl의 처리에도 칼슘이 더 이상 추출되지 않을 정도이면 충분하다.
- [0052] 상기 탈회된 피질골인 탈회골기질(DBM)은 콜라겐의 가수분해를 위해 수산화칼슘 용액으로 30 ~ 80일간 처리한다. 처리하는 동안 매일 일 회 이상 교반하고, 매주 새로운 수산화칼슘 용액을 교체해 주는 것이 바람직하다.
- [0053] 이 때, 가수분해를 위한 수산화칼슘 용액의 농도는 0.1 ~ 2 부피%인 것이 바람직하다. 0.1 부피% 미만의 농도에서는 뼈에서 콜라겐의 가수분해가 원활하게 일어나지 않으며, 2 부피% 이상의 농도에서는 수산화칼슘의 축적에 따른 가수분해과정이 끝난 후 잔류 수산화칼슘의 제거가 어려워 바람직하지 않다.
- [0054] 수산화칼슘용액은 골분 1g당 15~25ml의 비율로 처리하는 것이 바람직한데, 15ml 미만에서는 충분한 가수분해처리가 일어나지 않을 수 있으며, 현탁시 골분의 비율이 너무 높아 추후 젤라틴의 수집을 위한 여과공정 등에 지나치게 많은 시간 소요될 수 있어 바람직하지 않으며, 25ml을 초과하는 경우에는 추후 수산화칼슘 제거 과정이 불필요하게 길어지게 되므로 바람직하지 않다.
- [0055] 상기 가수분해처리는 상기 골분을 수산화칼슘용액에 10~20℃로 30~70일간 처리하는 것이 바람직한데, 필요에 따라 침지와 교반(Agitation)을 통해 수행될 수 있다. 이 때, 처리온도가 10℃미만인 경우에는 골분에 존재하는 지질 및 단백질 성분 등의 응고로 인해 수산화칼슘용액과 골분사이의 탈회반응이 저해될 수 있어 바람직하지 않으며, 20℃를 초과하는 경우에는 과도한 가수분해 및 미생물에 의한 오염의 위험성이 증가하게 되어 바람직하지 않다. 또한, 상기 처리과정을 30일 미만으로 처리하는 경우에는 충분한 가수분해가 이루어지지 않으며, 70일을 초과하는 경우에는 역시 과도한 가수분해 및 미생물에 의한 오염의 가능성이 높아지게 되어 바람직하지 않다.
- [0056] 상기 탈회처리 및 가수분해 처리된 골분은 PBS 및 증류수로 세정하고, pH를 중성으로 조절한 후 바로 젤라틴 추출 작업에 들어가는 것이 바람직하다.
- [0057] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 탈회 및 가수분해 처리된 골분으로부터 젤라틴을 추출하는 단계는 증류수 또는 생리식염수에 상기 탈회처리된 골분을 현탁하여 이를 여과시켜 생성되는 겔(gel)상태의 상층액을 건조시켜 이루어질 수 있다.
- [0058] 이 때, 골분 1g 당 5~15ml의 증류수 또는 생리식염수를 가하여 현탁액을 제조하고 온도를 50℃에서 90℃까지 서서히 올리면서 매 10℃가 증가할 때마다 추출액을 수집하는 것이 바람직하다. 이 경우, 50℃보다 온도가 낮은 경우에는 젤라틴 성분이 응집하여 추출이 용이하지 않을 수 있어 바람직하지 않으며, 90℃를 초과하여 온도를 높이면 젤라틴의 변성이 발생할 수 있어 바람직하지 않다.
- [0059] 이 때, 온도별 젤라틴 추출 시간은 4~6시간이 되도록 하는 것이 바람직한데, 4시간 미만인 경우에는 젤라틴이 제대로 용출되지 않아 추출효율이 낮아질 수 있으며, 6시간을 초과한 경우에는 공정이 지나치게 길어지게 되어 바람직하지 않다.
- [0060] 상기 과정을 통해 수집된 현탁액은 여과지 등으로 여과하여 골분의 입자들을 제거하고 용액만 수집하는 것이 바람직하다. 또는 원심분리 등을 이용하여 골분을 침전시키고 상등액만을 수집하는 방식도 가능하다.
- [0061] 상기 수집된 상등액은 진공농축기에서 50~70℃로 농축시키는 것이 바람직하다. 이를 거쳐 젤라틴이 겔상태로 농축되는데, 이를 건조기 등을 이용하여 건조시키면 고형의 젤라틴을 얻을 수 있다. 이를 분쇄기로 0.5~2mm의 크기로 분쇄하는 것이 좋다. 이 때, 입자의 크기가 0.5mm미만인 경우에는 향후 젤라틴을 용해시킬 때 응집되므로 바람직하지 않고, 2mm를 초과하는 경우에는 용해시키는데 시간이 오래걸려 바람직하지 않다.

- [0062] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 젤라틴을 골분과 혼합하는 단계는 전체 혼합물에서 골분이 40~90중량%, 젤라틴이 10~20중량%가 되도록 혼합하는 것이 바람직하다. 이 경우 골분이 40중량%미만인 경우에는 최종제품의 골재생 촉진효과가 떨어져 바람직하지 않으며, 90중량%를 초과하는 경우에는 제품의 유연성이 저하되므로 바람직하지 않다.
- [0063] 상기 젤라틴은 10중량%미만인 경우에는 생성된 골재생체의 유연성(인장강도)이 낮아지므로 바람직하지 않으며, 20중량%를 초과하는 경우에는 성형성이 저하되어 바람직하지 않다.
- [0064] 본 발명에 따르면, 상기 젤라틴과 골분의 혼합물에 방사선을 조사할 수 있다. 상기 방사선의 조사를 위해 앞서 상기 젤라틴과 골분을 혼합한 혼합물을 성형을 위한 몰드에 넣어 저온에서 안정화시킨 다음, 이를 분리하여 방사선 투과 및 포장에 위한 용기에 옮긴 후 방사선을 조사할 수 있다. 이와 같이 방사선을 조사하는 단계에서는 방사선의 흡수선량이 10~30Kgy, 보다 바람직하게는 15~25Kgy인 것이 바람직하다.
- [0065] 이 경우 방사선 흡수선량이 10Kgy 미만인 경우에는 젤라틴의 가교화가 충분히 진행되지 않아 골재생체의 인장강도가 낮아질 수 있으며, 따라서 이식에 요구되는 유연성이 나빠지게 되어 바람직하지 않다.
- [0066] 상기 실시예에 따라 제조된 골이식체는 시술할 부위 및 부상의 형태와 정도에 따라 다양한 매질과 함께 시술될 수 있다. 골이식체를 시술하게 되는 경우, 골조직의 부상부위에 골조직보다 연조직이 먼저 재생되어 차오르는 현상이 일어날 수 있으며, 이럴 경우 정상적인 골조직의 재생을 기대하기 어렵다.
- [0067] 따라서, 본 발명에 따른 골재생체는 골이식 부위로 시술시 연조직을 차폐할 수 있는 구조를 적용하여 시술하면 이러한 현상을 방지할 수 있다.
- [0068] 본 발명에 따른 또 다른 측면에서는, 이러한 점을 해결하기 위해 골재생체를 시트(Sheet)의 일측에 부착시켜 연조직이 골이식부위로 침범하는 것을 방지할 수 있는 골재생용 시트가 제공될 수 있다.
- [0069] 또한 골재생체에 시트를 부착시켜 이식할 경우 시트에 골이식체가 부착되어 있어 골재생체의 흐트러짐이 방지된다. 이는 골 결손부에 골재생체가 보다 안정적으로 고정될 수 있어 골유도에 더 유리하다.
- [0070] 이 때, 상기 시트는 포유류의 피부조직일 수 있으며, 체내 시술을 위해 표피가 제거되고, 면역원성을 제거하기 위해 진피층의 세포가 제거된 것일 수 있다.
- [0071] 일 실시예에 따르면, 상기 피부조직은 기저막(basement membrane)일 수 있다.
- [0072] 본 실시예에서는 포유류의 기저막을 골이식부위의 차폐를 위한 용도로 사용하고 있지만, 생체에 부작용이 없으며, 골이식 부위의 연조직의 침범을 막을 수 있는 매질이라면 무엇이든 본 발명에 따른 골재생체와 함께 사용될 수 있으며, 그 예로는 콜라겐 막, 포유류 유래 심막(Pericardium) 등을 들 수 있다.
- [0073] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.
- [0074] 골재생체를 제조하는데 있어서, 인체유래의 젤라틴을 포함하도록 하여 생체적합성을 증가시키고, 이를 방사선으로 가교화 및 멸균 처리함으로써 병원체에 대한 충분한 멸균효과뿐만 아니라, 시술 전후 형태유지에 적합한 인장강도를 나타내도록 하였다. 방사선 가교화 공정을 거치고 난 골재생체는 유연성이 우수하여 시술에 적합한 형태로의 가공이 용이하여, 시술하고자 하는 대상의 뼈종류, 손상부위의 크기 및 재건에 요구되는 기타 필요사항에 따라 자유롭게 모양을 변형할 수 있었다. 본 발명의 일 실시예에서는 척추뼈의 손상에 있어 시술이 간편한 형태인 띠(strip) 모양의 기질로 제조하였다.
- [0075] **원료의 사전처리 및 탈회골기질(DBM)의 준비**
- [0076] 원료가 되는 뼈는 ESB사, TSC사, Hopital Erasme사, TBI사, Allosource사 및 Lifelink사로부터 입수한 Rt/Lt. Humerus(좌우측 상완골), Rt/Lt. Radius(요골), Rt/Lt. Ulna(척골), Rt/Lt. Femur(대퇴골), Rt/Lt. Tibia(경골), Rt/Lt. Fibula(비골)을 이용하였다. 우선 초저온 냉동고에서 보관된 뼈를 무균상태에서 뼈에 붙어 있는 연조직을 제거하였다. 연조직이 제거된 뼈는 에테르에 넣고 탈지하였다. 탈지 후 건조된 뼈를 자르고 뼈

분쇄기에 넣은 다음, 뼈는 분쇄하여 크기별로 분류한 후 HCl로 탈회처리하였다. 상기 탈회된 골분, 즉 탈회골기질(DBM)을 과포화 수산화칼슘 (Ca(OH<sub>2</sub>))용액에 15℃에서 50일간 처리하였다. 이 때, 하루에 1회씩 교반해주고 7일마다 새로운 과포화 수산화 칼슘용액으로 교체해 주었다. 처리가 끝나면 탈회 및 가수분해된 탈회골기질 분말을 PBS 및 증류수로 세척하고, pH를 중성으로 조절하였다.

[0077] **인체 유래 젤라틴의 추출 및 여과**

[0078] 상기와 같은 방법으로 제조된 탈회골기질 분말 1g 당 10ml의 증류수를 첨가하였다. 이를 50~90℃ 까지 10℃간격으로 총 5회 추출하였다. 각 온도 단계별로 4~6시간 동안 처리하여 추출된 추출액을 30 μm 여과지(Whatman사)를 이용하여 여과하였다. 이를 통해 탈회골기질 입자만 제거하고 남은 용액을 수집하였다.

[0079] **젤라틴의 농축, 건조 및 분쇄**

[0080] 상기에서 탈회골기질 입자만 제거하고 남은 용액을 진공농축기로 60에서 농축시켰다. 상기용액이 젤 상태로 농축되면 젤라틴이 주요성분으로 남게 되는데, 이를 건조기에서 건조시킨 다음, 입자가 0.5 ~ 2mm가 되도록 분쇄기로 분쇄하였다.

[0081] **골재생재의 제조**

[0082] 상기의 과정에서 취득된 젤라틴 분쇄물을 생리식염수에 용해시킨 후, 보습제인 글리세롤과 혼합하였다. 글리세롤의 혼합은 보습이 목적이므로, 시술시 글리세롤의 혼합이 필요하지 않은 경우는 이를 제외하고 조성물을 제조하였다.

[0083] 여러 가지 조성비를 적용하여 하기 표 1과 같이 골재생재를 제조하였다.

**표 1**

	대조군 (가)	실시에 1 (나)	실시에 2 (다)	실시에 3 (라)
탈회골기질 (DBM)	-	50 gram	-	15 gram
피질골 (Cortical bone)	-	-	50 gram	35 gram
젤라틴 용액 (20% 젤라틴 in saline)	50cc	50 cc	50 cc	50 cc

[0085] 상기 표 1에서 젤라틴 용액은 글리세롤 15cc, 0.9% saline 용액 35cc 및 젤라틴 10g을 혼합하여 제조된 것이다.

[0086] 대조군은 뼈성분이 전혀 포함되지 않은 것을 말하며, 실시에 1~3은 각각 탈회골기질, 피질골 및 이들의 조합(탈회골기질 30%;피질골 70%)으로 각각 제조된 혼합물을 기질 모양의 몰드에 넣고 10℃ 정도의 저온에서 30분간 안정화시켜 제조한 골이식재를 의미한다. 안정화된 골이식재는 몰드에서 분리하여 포장용기로 옮기고, 감마선을 20Kgy 조사하여 멸균과 동시에 젤라틴을 가교화(Crosslink)시킨 후 물성을 조사하였다.

[0087] **시험예 1. 골재생재의 유연성 테스트**

[0088] 상기 방법에 따라 각각 제조된 골재생재의 유연성을 테스트하였다. 도 1에는 본 발명의 실시에 3에 따라 제작된 골재생재에 변형을 가한 사진이 나타나 있다. 강한 뒤틀림과 같은 변형에도 찢어지거나 변형됨이 없이 원형 그대로 잘 보존됨을 나타내고 있다(도 1의 (가) 및 (나) 참조) 수분의 증발을 방지할 수 있도록 비닐랩으로 포장한 다음 실온에서 3일 이상 방치한 다음 테스트한 경우에도 양호한 유연성을 나타내었다(도 1의 (다) 참조).

[0089] **골재생재의 이식**

[0090] 상기 표 1에 기재된 여러 조성물의 골재생 효과를 확인하기 위해 동물실험을 수행하여 골재생재의 안정성 및 골재생효과를 테스트하였다. 실험대상 동물은 SD rat(Sprague-Dawley rat, 암컷, female, 200gram)을

이용하였다.

[0091] 우선, 대상 동물에 zoletil50(virbac korea)을 0.4mg/kg 조건으로 복강주사 및 근육주사하여 마취한 후 수술대에 고정하였다. 시술할 부위의 주변을 제모크림 및 면도기를 이용하여 제모하고 소독하였다. 메스를 이용하여 시술 부위의 피부를 절개하여 근육을 노출시킨 다음, 메스를 이용하여 척추를 중심으로 양쪽의 근육을 갈라서 절개한 후 L4 ~ 5번 요추 노출(도 2의 (가) 참조)시킨 다음, L4, L5번 요추 표면의 피질골(cortical bone)을 갈아내었다. L4, L5번 요추 부위에 골재생체를 올리고 소독한 다음, 절개했던 근육 및 피부를 봉합하고 항생제를 투여하였다.

[0092] 도 2의 (나)는 봉합하기 전 SD rat의 요추 L4-L5번에 본 발명에 따른 골재생체를 삽입한 모양이다.

[0093] 하기에서는 시술직후, 시술 후 6주 및 12주 후에 X-ray, MicroCT 및 H&E 조직검사를 수행하여 본 발명에 따른 골이식재의 이식기간에 따른 형태 및 부피유지 정도, 염증반응 정도 및 골재생 촉진효과를 평가하였다.

[0094] **시험예 2. 이식 직후 골이식재의 삽입 양상 확인**

[0095] 도 3은 시술직후 촬영한 X-ray사진이다. (가)는 뼈성분이 전혀 포함되지 않은 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이다. (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

[0096] 도 3을 참조하면, (나)의 경우 탈회골기질 성분만 포함하므로 골이식재에 미네랄성분이 거의 없어 X-ray로도 확연하게 나타나지는 않으나 골이식재가 척추 옆에 잘 삽입된 것이 확인되었으며, (다) 및 (라)의 경우에는 미네랄 성분으로 인해 X-ray에서도 잘 관찰되었다.

[0097] **시험예 3. 이식 후 6주 후의 골이식재의 형태, 부피, 염증반응 정도 및 골재생 촉진 효과**

[0098] 도 4, 도 5 및 도 6은 이식 후 6주 후에 촬영한 골이식재의 X-ray, Micro CT 및 H&E 조직검사 결과를 각각 나타내고 있다.

[0099] 도 4의 X-ray 결과를 통해 6주가 지난 후에도 이식된 골이식재의 형태는 큰 변화가 없음을 나타내고 있다. 도 5는 MicroCT의 결과를 나타내고 있는데, 이를 통해 이식 후 6주 후 골이식재의 부피를 수치화하여 표 2에 나타내었다.

**표 2**

이식재	좌 우	이식재 부피 (mm <sup>3</sup> )	부피합계 (mm <sup>3</sup> )	형태유지정도 (초기부피 360 mm <sup>3</sup> )
대조군 (가)	L	0	0	0 %
	R	0		
실시예 1 (나) (DBM 성분만 함유)	L	128.79	226.84	63.01 %
	R	98.05		
실시예 2 (다) (Cortical 성분만 함유)	L	97.14	219.87	61.07 %
	R	122.73		
실시예 3 (라) (DBM 30% + Cortical 70%)	L	155.18	306.41	85.11 %
	R	151.23		

[0101] 표 3에 나타난 바와 같이, 이식 후 6주가 지난 시점에서의 골이식재의 부피는 탈회골기질과 피질골이 혼합된 골이식재 (다)의 경우에서 원래 부피의 85% 정도로 보다 높게 나타났다.

[0102] 도 6은 골이식재의 이식 후 6주 후의 H&E(Hematoxylin and Eosin) staining 결과를 나타내고 있다. 대조군인 (가)에서는 일반적인 근 섬유, 국소성 임파구 침윤(Focal lymphocyte infiltration)등이 관찰되며, (나), (다) 및 (라)에서는 모두 골이식재 주변 다수의 섬유아세포(Fibroblast)로 구성된 결합조직(Connective tissue) 및 파골세포(Osteoclast)가 소수 관찰되었다. 또한, 골이식재와 주변 섬유성 결합조직(Fibrotic connective

tissue)과는 연결되지 않은 빈 공간으로 관찰되는 것으로 나타나, 염증반응 등의 면역거부반응이 없이 높은 안정성과 생체적합성을 나타내고 있다.

[0103] 결과적으로, 본 발명에 따른 골이식재는 이식 후 6주 후에도 형태, 부피, 염증반응 정도 및 골재생축진 효과에서 우수함을 알 수 있다.

[0104] **시험예 4. 이식 후 12주 후의 골이식재의 형태, 부피, 염증반응 정도 및 골재생축진 효과**

[0105] 도 7은 시술 12주 후에 촬영한 X-ray사진이다. 역시 (가)는 대조군이며, (나)는 탈회골기질 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이며, (다)는 피질골(cortical bone) 성분만 포함하는 골이식재를 이식한 모습이다. (라)는 탈회골기질과 피질골의 비율을 3:7로 혼합하여 제조한 골이식재를 이식한 모습이다.

[0106] 도 7을 참조하면, 이식한 후 12주 지났지만 삽입된 골이식재의 크기는 도 4와 비교하였을 때 다소 감소되었으나, 형태 및 위치는 그대로 유지되고 있는 것으로 나타나고 있다. 이와 같은 결과를 좀 더 정확하게 확인하기 위하여 도 8과 같이 MicroCT를 수행하였다. 도 8의 MicroCT의 결과를 통해 이식 12주 후 골이식재의 부피를 수치화하여 표 3에 나타내었다.

**표 3**

[0107]

이식재	좌 우	이식재 부피 (mm <sup>3</sup> )	부피합계 (mm <sup>3</sup> )	형태유지정도 (초기부피 360 mm <sup>3</sup> )
대조군 (가)	L	0	0	0 %
	R	0		
(나) (DBM 성분만 함유)	L	78.83	152.14	42.26 %
	R	73.31		
(다) (Cortical 성분만 함유)	L	49.58	154.41	42.89 %
	R	104.83		
(라) (DBM 30% + Cortical 70%)	L	139.55	266.74	74.09 %
	R	127.19		

[0108] 표 3에 나타난 바와 같이, 이식 후 12주가 지난 시점에서의 골이식재의 부피는 탈회골기질만 사용하여 제조된 골이식재 (나)와 피질골만 사용된 (다)에서 약 40%이상 유지되는 것으로 나타났으며, 탈회골기질과 피질골이 혼합된 골이식재 (다)에서는 원래 부피의 75% 정도로 보다 높게 나타났다.

[0109] 도 9는 골이식재의 이식 후 6주 후의 H&E(Hematoxylin and Eosin) staining 결과를 나타내고 있다. 대조군인 (가)에서는 일반적인 근 섬유 및 근육 구조만이 관찰되며, (나)에서는 골이식재 주변으로 섬유아세포 및 파골세포(Osteoclast)가 관찰되었고 충전부의 골형성은 관찰되지 않았다.

[0110] (다)에서는 소수 임파구 침윤(Lymphocyte infiltration), 섬유아세포(Fibroblast)와 섬유성 결합조직(Fibrotic connective tissue) 및 대식세포 침윤(Macrophage infiltration)등의 현상이 관찰되었으며, 충전재 주변으로 파골세포(Osteoclast)가 관찰되었다.

[0111] (라)에서는 섬유아세포와 섬유성 결합조직이 관찰되었으며, 소수의 호중성 백혈구(Neutrophil)과 대식세포 침윤(Macrophage infiltration)이 관찰되었다.

[0112] 이를 통해, 본 발명의 골이식재가 면역거부반응을 일으키지 않으며, 높은 안전성과 생체적합성을 나타내고 있음을 알 수 있다.

[0113] **실시예 4. 골재생용 시트의 제조**

[0114] 실시예 3에 따라 제조된 골이식재를 60℃로 가열한 후, 한국 등록특허 0469661의 실시예 1에 따라 기저막의 손상없이 표피층과 진피층의 세포가 제거되어 면역반응이 일어나지 않도록 제조된 기저막을 포함하는 시트 위에 놓았다. 이를 실온에 방치 하여 젤라틴이 기저막을 포함하는 시트에 스며들도록 하였다. 일정시간이 지나고 젤라틴이 굳음으로 골이식재에 포함된 젤라틴과 기저막을 포함하는 시트에 스며든 젤라틴이 응고되어 두 물질이

접합되었다.

[0115] 도 10에는 젤라틴이 포함된 골이식재와 기적막을 포함하는 시트(SureDerm)를 접합한 후 MT 염색한 사진이 나타나 있다. MT 염색에서 콜라겐은 푸른 빛을 띄고 젤라틴은 붉은 색을 띄며, 상기 무세포진피층은 대부분이 콜라겐으로 이루어져 푸른 빛을 나타낸다. 하지만 젤라틴이 스며들어 접합되었기 때문에 젤라틴이 스며든 부분이 붉은 색으로 나타나고 있는 것을 확인할 수 있다.

[0116] **실시예 5. 골재생용 시트의 시술**

[0117] 상기 실시예 4에 따라 제조된 골재생용 시트를 시술하여 부상 부위에 인접한 연조직이 골조직의 재생범위를 침범하지 않도록 하였다.

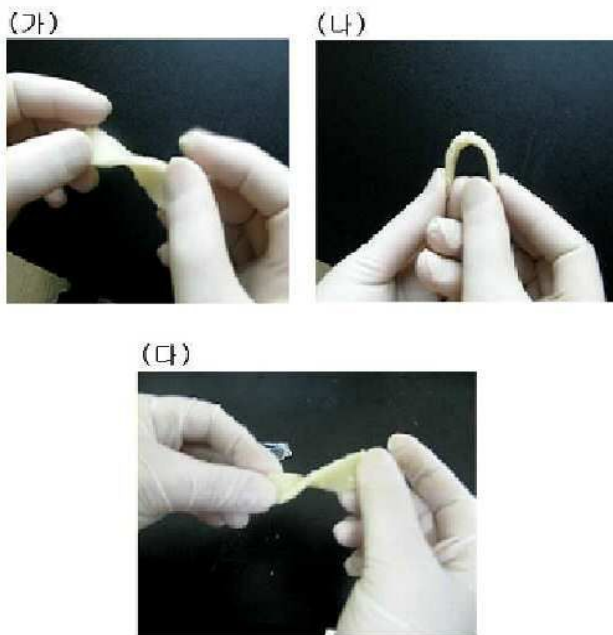
[0118] 도 11에는 젤라틴이 포함된 골이식재와 무세포진피층이 접합된 물질을 rat의 피하에 이식한 후 4주 조직검사 사진이 나타나 있다. 도 11에서 M은 근육, S는 시트(SureDerm), D는 진피, DBM은 골재생재를 나타내며, 화살표는 기저막 부분을 나타낸다.

[0119] 이를 참고하면, 골이식재가 피하에서 모양을 잘 잡고 있으며, 상기 방법을 통해 부착되어진 무세포진피층과 근육이 맞닿은 부분에서는 연조직이 침입이 방지되고 있는 것을 확인할 수 있다.

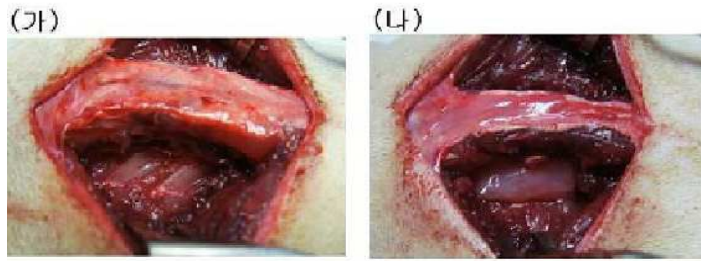
[0120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

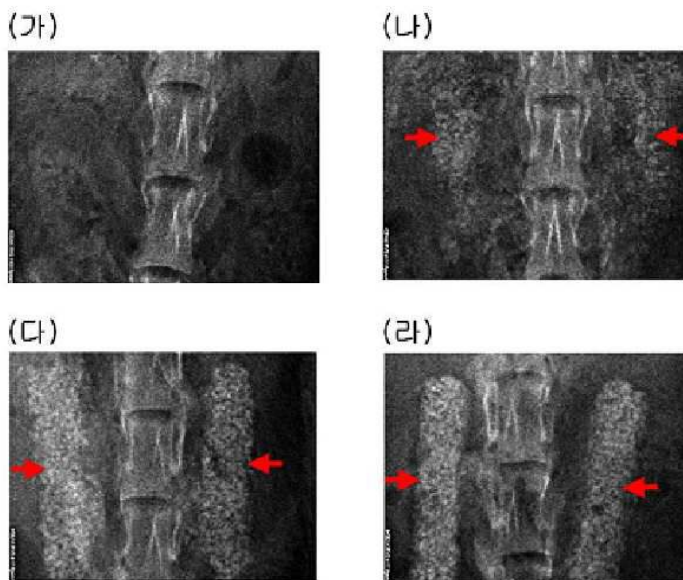
**도면1**



도면2

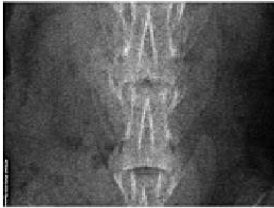


도면3

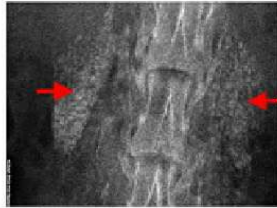


도면4

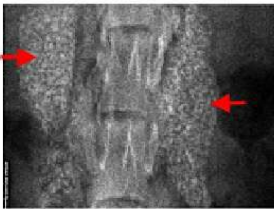
(가)



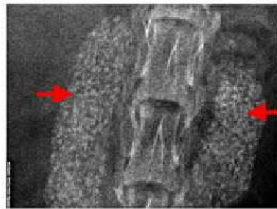
(나)



(다)



(라)

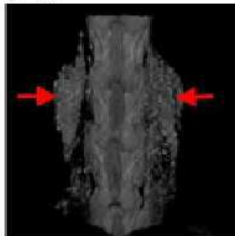


도면5

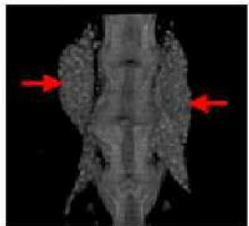
(가)



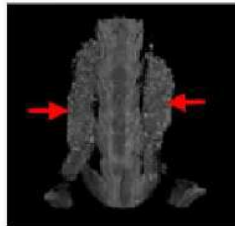
(나)



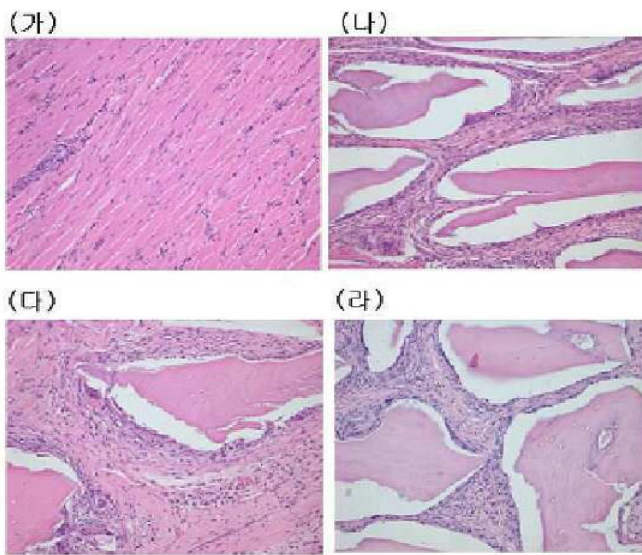
(다)



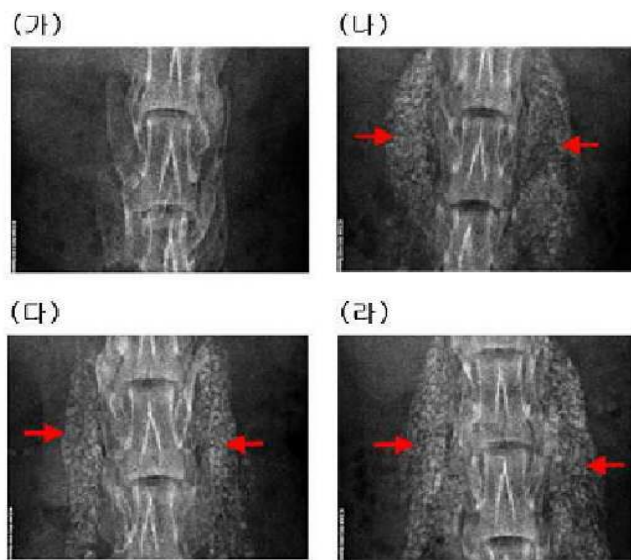
(라)



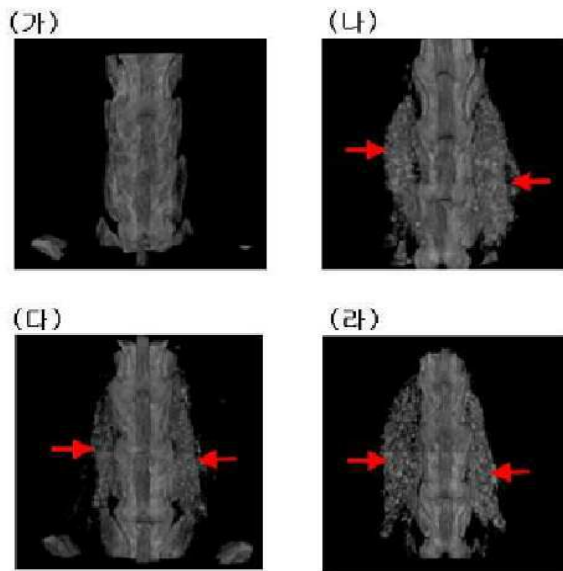
도면6



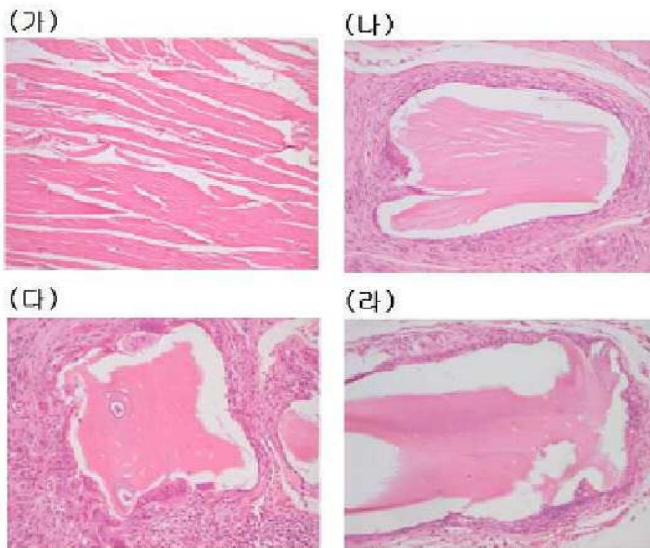
도면7



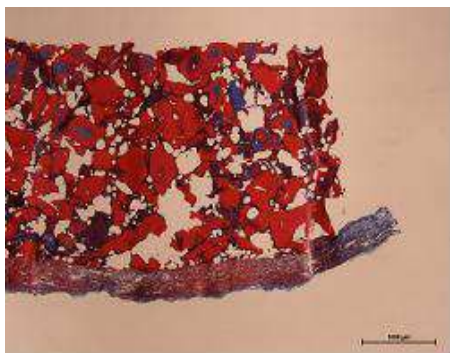
도면8



도면9



도면10



도면11

