



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0140405
(43) 공개일자 2024년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0652 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0034756

(22) 출원일자 2023년03월16일
심사청구일자 2023년03월16일

(71) 출원인
동아대학교 산학협력단

부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)

(72) 발명자
김수환

부산광역시 강서구 명지국제5로 30, 105동 1404호

최수미
부산광역시 동래구 안남로 47, 101동 1205호

(74) 대리인
전용철

전체 청구항 수 : 총 7 항

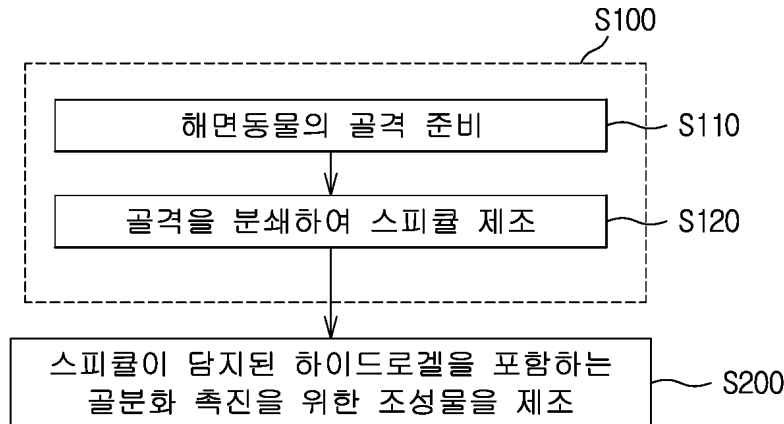
(54) 발명의 명칭 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

이러한 본 발명의 일면에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법은 보통해면류 유래의 골격을 준비하는 단계; 및 상기 골격을 분쇄하여 입자크기가 25 μ m 이하이고, 실리콘과 산소를 포함하는 스피큘을 제조하는 단계;를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2506/1346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013432
과제번호	202200872
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 전략소재 개발 및 상용화 지원
연구과제명	해양바이오 전략소재 개발 자유공모(공모용)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동아대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.15 ~ 2023.04.14

명세서

청구범위

청구항 1

보통해면류 유래 골격을 분쇄하여 제조되어 실리콘과 산소를 포함하고 입자크기가 $25\mu\text{m}$ 이하인 스피큘이 담지된 하이드로겔;을 포함하는 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 하이드로겔에 대한 상기 스피큘의 농도가 0.5 내지 4mg/ml 인 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 스피큘은

염화나트륨, 탄산수소나트륨, 염화칼륨, 인산 수소 칼륨 3수화물, 염화마그네슘 6수화물, 염화칼슘, 황산나트륨 및 트리스(히드록시메틸)아미노메테인을 포함하는 모의 체액에 1 내지 7일동안 배양하면 표면에 칼슘과 인을 형성하는 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 하이드로겔은

아래 수학적 식 1에 따라 계산되는 팽윤율이 39.5 내지 42%인 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물.

(수학적 식 1)

$$Q = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

상기 수학적 식 1에서, Q는 상기 팽윤율이고, W_d 는 동결건조한 상기 하이드로겔의 중량이며, W_s 는 동결건조된 상기 하이드로겔을 인산완충생리식염수에 24시간동안 침지한 후 측정된 중량이다.

청구항 5

보통해면류 유래의 골격을 준비하는 단계; 및

상기 골격을 분쇄하여 입자크기가 $25\mu\text{m}$ 이하이고, 실리콘과 산소를 포함하는 스피큘을 제조하는 단계;를 포함하는 것

상기 스피큘이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물을 제조하는 단계;를 포함하는 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 골분화 촉진을 위한 조성물을 제조하는 단계는

하이드로겔 전구체 용액을 준비하는 단계; 및

상기 하이드로겔 전구체 용액에 가교제와 상기 스피큘을 혼합하여 상기 스피큘이 담지된 상기 하이드로겔을 포함하는 상기 조성물을 완성하는 단계;를 포함하는 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법.

청구항 7

제 7항에 있어서,

상기 조성물을 완성하는 단계는

상기 가교제와 상기 스피큘을 상기 하이드로겔 전구체 용액에 혼합하되, 상기 하이드로겔 전구체 용액에 대해 상기 스피큘의 농도가 0.5 내지 4mg/ml가 되도록 혼합하는 단계;인 것

인 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해면동물 유래 스피큘을 이용한 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 조직공학을 이용한 재생의학 분야에서 줄기세포의 이용 기술이 난치병 치료를 위한 새로운 분야로 제시되고 있다. 이에 줄기세포의 연구에 대한 관심이 높아지고, 증식과 분화를 통하여 조직을 형성할 수 있는 줄기세포가 대부분의 질병치료뿐만 아니라, 조직 재생에 적용될 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 줄기세포(stem cell)는 미분화 상태에서 자가 복제 능력을 가지면서 적당한 조건하에서 특정 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다. 줄기세포는 그 기원에 따라 배아 줄기세포(embryonic stem cell)와 성체 줄기세포(adult stem cell)로 구분이 될 수 있다. 인간의 배아 줄기세포는 세포 증식 및 분화 능력이 우수하나 생명윤리적인 문제점을 가지고 있다.

[0004] 그에 반해, 성체 줄기세포는 배아 줄기세포에 비해 분화 능력이 한정되어 있으나, 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 골수, 혈액, 뇌, 피부 등에서 채취하여 줄기세포로 발전시킨 것으로 윤리적인 문제가 적은 장점이 있다.

[0005] 성체 줄기세포로는 조혈모세포, 중간엽 줄기세포, 신경모세포, 상피모세포 등이 존재하며, 조혈모세포의 경우 혈구 및 임파구를 생산할 수 있는 모세포로서 혈액 암을 포함한 면역계 질환 치료에 도움이 되고, 중간엽 줄기세포의 경우 뼈, 연골, 지방 및 섬유조직으로 분화되며 각 조직이 손상되었을 때 이들의 회복에 관여할 수 있다.

[0006] 즉, 줄기세포라 함은 전술한 분화능력은 가지고 있으나, 아직 분화는 일어나지 않은 '미분화' 세포를 의미하는 것이고, 이러한 미분화 상태에서 적절한 조건을 맞춰주면 줄기세포는 다양한 조직 세포로 분화할 수 있어, 줄기세포를 질병 치료 및 훼손 조직 복구에 이용하기 위해 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있는 연구 및 개발이 이루어지고 있다.

[0007] 한편, 해면동물(Porifera)은 해면동물문 동물의 총칭이다. 해면동물은 간단한 구조의 후생동물로서, 근육신경계 소화계 배설계의 분화가 없는 하등동물로서 현재 약 1,000종 정도가 알려져 있다. 골격은 작은 골편(骨片, spicule)이 몸을 지지하며, 석회질이나 규질로 되어 있고, 주대골편과 미소골편으로 구분된다. 그 형태는 일축(一軸, monaxon), 삼축(三軸, triaxon), 사축(四軸, tetraaxon), 다축(多軸, polyaxon)형이 있으며, 골편 외에 해면질섬유(spongin fiber)를 갖고 있으며 이들은 해면동물의 동정 및 분류에 있어 매우 중요한 특징으로 이용된다.

[0008] 각질해면, 관각질 해면의 부드럽고 질긴 골격은 고대부터 청소목욕칠 등에 쓰인 것으로 알려져 있다. 중세에는 태운 해면을 여러 질병 치료에 이용했다. 자연산 해면은 도자기보석을 만들거나 그림을 그릴 때 사용한 기록이 있으며, 최근 담수 해면 동물인 스폰질라 라쿠스트리스 (*Spongilla lacustris* L.), 스폰질라 프라질리스 레이디 (*Spongilla fragilis* Leidy), 및 에피다티아 플루비아틸리스(*Ephydatia fluviatilis*)의 골격으로부터 골격조직인 바늘 모양의 스피쿨을 분리하여 화장품에 이용되어 온 것으로서 사용되는 것으로 알려져 있다.

[0009] 본 발명의 발명자들은 진술한 해면동물 골격의 조성이 일반적으로 골 대체제로 사용되고 있는 바이오세라믹과 유사한 것에 착안하여 연구와 실험을 거듭한 결과 해면동물 유래 스피쿨을 이용하여 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물 및 이의 제조방법을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 10-2446907 B1
(특허문헌 0002) KR 10-2446907 B1
(특허문헌 0003) KR 10-2244147 B1
(특허문헌 0004) KR 10-1678621 B1
(특허문헌 0005) KR 10-2289197 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 줄기세포를 질병 치료 및 훼손 조직 복구에 이용할 수 있도록 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있도록 하는 스피쿨을 이용한 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 진술한 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 일면에 따른 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물은 보통해면류 유래 골격을 분쇄하여 제조되어 실리콘과 산소 및 탄소를 포함하고 입자크기가 25 μ m 이하인 스피쿨이 담지된 하이드로겔;을 포함한다.

[0014] 진술한 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 다른 면에 따른 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물의 제조방법은 보통해면류 유래의 골격을 준비하는 단계; 상기 골격을 분쇄하여 입자크기가 25 μ m 이하이고, 실리콘과 산소를 포함하는 스피쿨을 제조하는 단계; 상기 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물을 제조하는 단계;를 포함한다.

발명의 효과

[0015] 상기한 구성에 의한 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포의 골분화 촉진에 위한 조성물 및 이의 제조방법은 해면동물 유래 골격을 분쇄하여 제조되는 스피쿨을 이용하여 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 골분화 촉진에 위한 조성물의 제조방법을 설명하기 위한 순서도이다.

도 2a 내지 2d는 시험예 1에 따라 주사전자현미경을 이용한 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 3은 시험예 1에 따른 XRD 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 4a 내지 4b는 시험예 1에 따른 EDS 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 5는 시험예 1에 따른 EDS 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 6a 내지 6i는 시험예 2에 따른 주사전자현미경을 이용한 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 7a 내지 7i는 시험예 2에 따라 에너지 분광 분석법을 이용한 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 8a 내지 8b는 시험예 2에 따라 에너지 분광 분석법을 이용한 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 시험예 2에 따라 X선 분광 분석법을 이용한 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 10a 내지 10f는 시험예 3에 따라 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

도 11은 시험예 4에 따른 분석 방법을 설명하기 위한 도면이다.

도 12a 내지 12f는 시험예 4에 따라 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

도 13a 내지 13f는 시험예 5에 따라 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

도 14a 내지 14d는 각각 시험예 6에 따른 분석방법으로 COL1, OCN, ALP, RunX2 유전자의 발현수준을 분석한 그래프이다.

도 15a 내지 15f는 시험예 8에 따라 주사전자현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 한편, 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다.
- [0019] 이하, 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예들에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 및 이의 제조방법을 설명하도록 한다.
- [0021] 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법은 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물을 제조하기 위한 방법으로, 본 발명의 실시예들에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 및 이의 제조방법을 설명하는데 있어 실질적으로 동일한 구성은 도면 부호를 일치시켜 기재하고 반복되는 기재는 생략도록 한다.
- [0022] 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물의 제조방법은 스피쿨 준비단계(S100) 및 조성물 제조단계(S200)를 포함하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물(10)은 스피쿨과 하이드로겔을 포함한다.
- [0024] 먼저, 스피쿨을 준비한다(S100).
- [0025] 스피쿨 준비단계(S100)는 골격 준비단계(S110)와 분쇄단계(S120)를 포함할 수 있다.
- [0026] 골격 준비단계(S110)는 스피쿨을 제조하기 위해 해면동물(Porifera)의 골격을 준비하는 단계일 수 있다.
- [0027] 골격 준비단계(S110)에서 준비되는 골격은 해면동물로부터 얻을 수 있되, 본 발명의 다른 실시예에 따른 제조방법으로 제조된 조성물(10)이 줄기세포의 골분화 유도를 촉진할 수 있도록 체액 내에서 표면에 칼슘(Ca) 및 인(P)을 형성할 수 있는 것일 수 있으며, 예를 들어, 해면동물(Porifera) 중에서도 보통해면류(Demospongiae)의 골격을 준비하는 것일 수 있다.

- [0028] 골격 준비단계(S110)에서 해면동물(Porifera) 중에서도 보통해면류(Demospongiae)의 골격을 준비하면 본 발명의 다른 실시예에 따른 제조방법으로 제조된 조성물(10)이 체액 내에서 표면에 칼슘(Ca) 및 인(P)을 형성할 수 있고, 이에 따라, 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있다.
- [0030] 분쇄단계(S120)는 골격 준비단계(S110)에서 준비되는 골격을 분쇄하여 스피큘을 제조하는 단계일 수 있다.
- [0031] 분쇄단계(S120)는 골격의 분쇄가 원활하게 이루어질 수 있도록 골격 준비단계(S110)에서 준비되는 골격을 냉각하고, 냉각된 골격을 분쇄하여 스피큘을 제조할 수 있다.
- [0032] 분쇄단계(S120)에서 골격의 냉각은 원활하게 골격의 냉각이 이루어질 수 있도록 충분히 낮은 온도에서 충분한 시간동안 이루어지는 것이 바람직하고, 예를 들어, 분쇄단계(S120)는 골격 준비단계(S110)에서 준비되는 골격을 -200 내지 -190℃에서 30 내지 120분동안 냉각하는 것일 수 있다.
- [0033] 분쇄단계(S120)에서 골격이 냉각되는 온도가 -200℃ 미만이면 골격의 냉각이 충분히 이루어져 더 이상의 온도 하락이 의미가 없을 수 있다.
- [0034] 분쇄단계(S120)에서 골격이 냉각되는 온도가 -190℃를 초과하면 온도가 높아 골격의 냉각이 충분히 이루어지지 않음에 따라, 골격의 분쇄가 원활하게 이루어지지 않을 수 있다.
- [0035] 분쇄단계(S120)에서 골격이 냉각되는 시간이 30분 미만이면 골격의 냉각이 충분히 이루어지지 않을 수 있고, 120분을 초과하면 골격의 냉각이 이미 충분히 이루어져 더 이상 골격을 냉각하는 것의 의미가 없을 수 있다.
- [0036] 분쇄단계(S120)는 입자 크기가 25 μ m 이하인 스피큘을 제조하는 단계일 수 있다. 이를 위해 분쇄단계(S120)에서는 골격을 분쇄하여 얻어지는 스피큘을 필터링하여 입자크기가 25 μ m 이하인 스피큘을 제조할 수 있다.
- [0037] 분쇄단계(S120)에서 제조되는 스피큘의 입자 크기가 25 μ m를 초과하면 조성물 제조단계(S200)에서 조성물(10)의 제조시 스피큘이 하이드로겔 내에 전체적으로 균일하게 담지되지 못하여 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)의 골분화 형성 촉진 특성이 떨어질 수 있다.
- [0038] 바람직하게, 분쇄단계(S120)는 입자 크기가 10 μ m 이하인 스피큘을 제조하는 단계일 수 있다.
- [0039] 분쇄단계(S120)에서 제조되는 스피큘 입자 크기의 하한은 크게 제한되지 않으나, 바람직하게는 1 μ m 이상일 수 있다.
- [0040] 분쇄단계(S120)에서 제조되는 스피큘의 입자 크기가 1 μ m 미만이면 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물에 포함된 하이드로겔에 스피큘이 담지된 상태를 유지하기 어려울 수 있다.
- [0041] 분쇄단계(S120)에서 스피큘의 필터링은 통상적으로 이용되는 입자를 필터링하는 방법으로 이루어질 수 있고, 예를 들어, 체(sieve)를 이용하여 분쇄된 스피큘 중 소정 입자 크기 이상인 스피큘을 걸러냄으로써 입자 크기가 25 μ m 이하인 스피큘을 제조할 수 있다.
- [0042] 분쇄단계(S120)에서 스피큘의 필터링이 원활하게 이루어질 수 있도록 분쇄단계(S120)에서 스피큘의 필터링은 서로 다른 크기의 공극이 형성된 체를 이용하여 복수 회 이루어질 수 있다.
- [0044] 스피큘 준비단계(S100)에서 제조된 스피큘이 담지된 하이드로겔을 제조함으로써 스피큘이 담지된 하이드로겔을 포함하는 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물(10)을 제조한다(S200).
- [0045] 조성물 제조단계(S200)에서 제조되는 조성물(10)은 스피큘 준비단계(S100)에서 제조된 스피큘이 담지된 하이드로겔을 포함할 수 있다.
- [0046] 조성물 제조단계(S200)에서 제조되는 조성물(10)이 스피큘이 담지된 하이드로겔을 포함하면 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)을 줄기세포에 원활하게 생착될 수 있고, 줄기세포와 스피큘 사이에 안정적인 성분 전달이 이루어질 수 있다.
- [0048] 조성물 제조단계(S200)에서 조성물(10)의 제조시 제조되는 하이드로겔은 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)을 줄기세포 골분화 촉진을 위해 적용할 때 줄기세포의 부착이 효과적으로 이루어지도록 하기 위

한 것일 수 있다.

- [0049] 조성물 제조단계(S200)는 티라민 작용기(tyramine group)가 부착된 히알루론산(hyaluronic acid)과, 티라민 작용기가 부착된 콘드로이틴(Chondroitin)을 가교 반응하여 얻어지는 하이드로겔을 제조하되, 내부에 스피쿨 준비단계(S100)에서 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 제조하는 것일 수 있다.
- [0050] 보다 자세하게, 조성물 제조단계(S200)는 생리식염수에 티라민 작용기가 부착된 히알루론산을 용해하여 제조되는 히알루론산 용액과, 생리식염수에 티라민 작용기가 부착된 콘드로이틴을 용해하여 제조되는 콘드로이틴 용액을 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액을 제조하고, 제조된 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨 준비단계(S100)에서 제조된 스피쿨과 가교제를 혼합함으로써 내부에 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 제조할 수 있다.
- [0051] 조성물 제조단계(S200)에서 전술한 히알루론산 용액과 콘드로이틴 용액의 제조시 생리식염수로는 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 일반적으로 생물학적으로 하이드로겔의 제조시 사용되는 것을 이용할 수 있다.
- [0052] 조성물 제조단계(S200)에서 가교제로는 효소(enzyme) 가교제를 이용할 수 있고, 일반적으로 하이드로겔의 합성시 이용되는 효소 가교제이면 제한되지 않으나, 바람직하게는 티로시나아제(tyrosinase)를 이용할 수 있다.
- [0053] 조성물 제조단계(S200)에서 가교제로서 티로시나아제를 이용하면 하이드로겔 전구체 용액에서 가교 반응이 효과적으로 이루어져 하이드로겔의 제조가 원활하게 이루어질 수 있고, 제조되는 하이드로겔이 높은 조직 접착력을 가져 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)의 적용시 줄기세포의 골분화 촉진이 보다 효과적으로 이루어질 수 있다.
- [0054] 조성물 제조단계(S200)에서 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨 준비단계(S100)에서 제조된 스피쿨과 가교제를 혼합시 스피쿨은 하이드로겔 전구체 용액에 대해 0.5mg/ml 이상의 농도로 혼합될 수 있고, 0.8mg/ml 이상의 농도로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 1mg/ml 이상의 농도로 혼합될 수 있다.
- [0055] 조성물 제조단계(S200)에서 하이드로겔 전구체 용액에 혼합되는 스피쿨의 농도와, 조성물 제조단계(S200)에서 제조되는 조성물(10)에 포함된 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도는 서로 대응될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔 전구체 용액에 대해 스피쿨이 0.5mg/ml가 되도록 혼합되면 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도가 0.5mg/ml인 조성물(10)이 제조될 수 있다.
- [0056] 조성물 제조단계(S200)에서 하이드로겔 전구체 용액에 대해 스피쿨이 0.5mg/ml 이상의 농도로 혼합되면 조성물 제조단계(S200)에서 제조되는 조성물(10)이 충분한 양의 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함함에 따라 조성물 제조단계(S200)에서 제조되는 조성물(10)의 이용시 줄기세포의 골분화 촉진이 효과적으로 이루어질 수 있다.
- [0057] 조성물 제조단계(S200)에서 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨 준비단계(S100)에서 제조된 스피쿨과 가교제를 혼합시 혼합되는 스피쿨의 상한은 제한되지 않으나, 바람직하게는, 4mg/ml 이하일 수 있다.
- [0058] 조성물 제조단계(S200)에서 하이드로겔 전구체 용액에 대해 스피쿨이 4mg/ml 초과인 농도로 혼합되면 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨과 가교제를 혼합하여 가교시 스피쿨이 하이드로겔의 가교를 방해하여 조성물(10)의 제조가 원활하게 이루어지지 않을 수 있다.

[0060] <실시예 1>

[0061] 1. 스피쿨의 제조

[0062] 보통해면류(Demospongiae) 유래 골격을 준비하였다.

[0063] 준비된 골격을 액체 질소에 침지하여 1시간 동안 냉각시킨 후 액체 질소에서 냉각된 골격을 꺼내어 막자사발을 이용해 분쇄하여 스피쿨을 얻었다. 얻어진 스피쿨을 공극 크기가 25 μ m인 체를 이용해 필터링한 후 10 μ m인 체를 이용해 필터링하여 입자크기가 10 μ m 이하인 스피쿨을 제조하였다.

[0065] 2. 줄기세포 골분화 촉진을 위한 조성물 제조

[0066] (1) 히알루론산 제조

[0067] 히알론산 나트륨(Sodium Hyaluronate)을 탈이온수에 용해시켜 1%(w/v) 농도의 히알루론산 수용액을 제조하였다.

제조된 히알루론산 수용액을 교반하면서 히알루론산 수용액에 N-Hydroxysulfosuccinimide(sulfo-NHS, TCI) 및 N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC·HCl)와 N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride를 첨가한 후 Tyramine hydrochloride(Alfa Asser)를 히알루론산에 대해 1:1 몰비로 첨가하였다. 24시간동안 반응시킨 후 생성된 생성물을 탈이온수로 3일동안 투석하여 티라민 작용기가 부착된 히알루론산을 얻고, 얻은 히알루론산을 동결 건조하였다.

(2) 콘드로이틴 제조

콘드로이틴 황산염(Chondroitin sulfate)을 탈이온수에 용해시켜 1%(w/v) 농도의 콘드로이틴 수용액을 제조하였다. 제조된 콘드로이틴 수용액을 교반하면서 콘드로이틴 수용액에 N-Hydroxysulfosuccinimide(sulfo-NHS, TCI) 및 N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC·HCl, Sigmaaldrich)와 N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride를 첨가한 후 Tyramine hydrochloride(Alfa Asser)를 콘드로이틴에 대해 1:1 몰비로 첨가하였다. 24시간동안 반응시킨 후 생성된 생성물을 탈이온수로 3일동안 투석하여 티라민 작용기가 부착된 콘드로이틴을 얻고, 얻은 콘드로이틴을 동결 건조하였다.

(3) 조성물 제조

(1) 히알루론산 제조에서 제조된 히알루론산과 (2)콘드로이틴 제조에서 제조된 콘드로이틴을 각각 인산완충생리 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 용해시켜 2%(w/v)의 히알루론산 용액과 2%(w/v)의 콘드로이틴 용액을 제조하였다.

제조된 히알루론산 용액과 콘드로이틴 용액을 주사기 필터로 멸균한 후 멸균된 히알루론산 용액과 콘드로이틴 용액을 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액을 제조하였다.

제조된 하이드로겔 전구체 용액에 효소 가교제인 티로시나아제와 1. 스피쿨의 제조에서 제조된 스피쿨을 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액 내에서 가교가 이루어지도록 함으로써 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다. 이때, 스피쿨의 농도가 하이드로겔 전구체 용액에 대해 1mg/ml가 되도록 스피쿨을 첨가하여 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도가 1mg/ml인 조성물(10)을 제조하였다.

<실시예 2>

스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조시 스피쿨의 농도가 1mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하는 것 대신 2mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하여 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도가 2mg/ml인 조성물(10)을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다.

<실시예 3>

스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조시 스피쿨의 농도가 1mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하는 것 대신 3mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하여 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도가 3mg/ml인 조성물(10)을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다.

<실시예 4>

스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조시 스피쿨의 농도가 1mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하는 것 대신 4mg/ml가 되도록 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 첨가하여 하이드로겔에 대한 스피쿨의 농도가 4mg/ml인 조성물(10)을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다.

- [0086] <실시예 5>
- [0087] 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하되, (2) 콘드로이틴 제조에서 콘드로이틴 황산염(Chondroitin sulfate)을 탈이온수에 용해시켜 1%(w/v) 농도의 콘드로이틴 수용액을 제조하는 것 대신 콘드로이틴 황산염(Chondroitin sulfate)을 탈이온수에 용해시켜 0.5%(w/v) 농도의 콘드로이틴 수용액을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다.
- [0089] <실시예 6>
- [0090] 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하되, (2) 콘드로이틴 제조에서 콘드로이틴 황산염(Chondroitin sulfate)을 탈이온수에 용해시켜 1%(w/v) 농도의 콘드로이틴 수용액을 제조하는 것 대신 콘드로이틴 황산염(Chondroitin sulfate)을 탈이온수에 용해시켜 2%(w/v) 농도의 콘드로이틴 수용액을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 제조하였다.
- [0092] <시험예 1>
- [0093] 시험예 1에서는 스피쿨의 표면 및 원소 조성을 분석하였다.
- [0094] 시험예 1에서 스피쿨의 표면 분석은 주사전자현미경을 이용해 이루어졌고, 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 표면을 분석하였으며, 비교를 위해 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 준비되는 보통해면류 유래 골격의 표면도 함께 분석하였다.
- [0095] 도 2a 내지 2b에 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 표면을 주사전자현미경으로 분석한 결과를 나타내었고, 도 2c 내지 2d에 보통해면류 유래 골격의 표면을 주사전자현미경으로 분석한 결과를 나타내었다.
- [0097] 시험예 1에서 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 원소 조성 분석은 X-Ray 회절 분석법(X-Ray diffraction, XRD)과 에너지 분산 분광법(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)을 통해 이루어졌다.
- [0098] 도 3 및 4a 내지 4b 및 5에 시험예 1에 따른 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 원소 조성 분석 결과를 나타내었다.
- [0099] 도 3은 시험예 1에 따른 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 XRD 분석 결과를 나타낸 도면이고, 도 4a는 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨을 EDS 분석시 실리콘(Si)을 맵핑하여 분석한 결과이며, 도 4b는 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨을 EDS 분석시 산소(O)를 맵핑하여 분석한 결과이고, 도 5는 시험예 1에 따른 에너지 분산 분광법으로 분석한 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 원소 조성을 나타낸 그래프이다.
- [0100] 도 3을 참조하면 스피쿨을 XRD 분석시 실리콘에 대응되는 피크가 발견되는 것을 확인할 수 있고, 도 4a를 참조하면 스피쿨에 전체적으로 실리콘이 존재하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 4b를 참조하면 스피쿨에 전체적으로 산소가 존재하는 것을 확인할 수 있다. 아울러, 도 5를 참조하면 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨의 원소 조성이 실리콘과 산소를 포함하는 것을 확인할 수 있다.
- [0101] 이는 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨은 실리콘이 산소를 조성으로 포함하는 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0103] <시험예 2>
- [0104] 시험예 2에서는 스피쿨이 체액 내에서 존재할 때 칼슘 및 인을 형성하는지 확인하기 위한 시험이다.
- [0105] 이를 위해 시험예 2에서는 탈이온수 1L에 염화나트륨(NaCl) 7.996g, 탄산수소나트륨(NaHCO₃) 0.350g, 염화칼륨(KCl) 0.224g, 인산 수소 칼륨 3수화물(K₂HPO₄·3H₂O) 0.228g, 염화마그네슘 6수화물(MgCl₂·6H₂O) 0.305g, 염화

칼슘(CaCl_2) 0.278g, 황산나트륨(Na_2SO_4) 0.071g 및 트리스(히드록시메틸)아미노메테인($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) 6.057g이 포함된 모의 체액(Simulated Body Fluids, SBF)을 준비하고, 준비된 모의 체액에 각각 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨과 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 준비되는 보통해면류 유래 골격을 침지하고, 37°C에서 배양하였다.

- [0106] 또한, 비교를 위해 모의 체액 대신 증류수에 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨을 침지하고 37°C에서 배양한 샘플과, 증류수에 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 준비되는 보통해면류 유래 골격을 침지하고 37°C에서 배양한 샘플을 준비하였다.
- [0108] 배양 1일, 4일, 7일 차에 얻어지는 스피쿨과 보통해면류 유래 골격을 주사전자현미경과 에너지 분산 분광법으로 분석하였고, 배양 1일, 4일, 7일 차에 얻어지는 스피쿨을 X선 분광분석법으로 분석하였다.
- [0109] 분석결과를 도 6a 내지 6i, 7a 내지 7i, 8a 내지 8b 및 9에 나타내었다.
- [0110] 도 6a 내지 6c는 각각 모의 체액에서 1, 4 및 7일동안 배양된 스피쿨을 주사전자현미경으로 분석한 결과를 나타낸 사진이고, 도 6d 내지 6f는 각각 모의 체액에서 1, 4 및 7일동안 배양된 보통해면류 유래 골격을 주사전자현미경으로 분석한 결과를 나타낸 사진이며, 도 6g 내지 6i는 각각 증류수에서 1, 4 및 7일동안 배양된 보통해면류 유래 골격을 주사전자현미경으로 분석한 결과를 나타낸 사진이다.
- [0111] 도 7a 내지 7c는 각각 모의 체액에서 1, 4 및 7일동안 배양된 스피쿨을 에너지 분산 분광법으로 분석한 결과를 나타낸 사진이고, 도 7d 내지 7f는 각각 모의 체액에서 1, 4 및 7일동안 배양된 보통해면류 유래 골격을 에너지 분산 분광법으로 분석한 결과를 나타낸 사진이며, 도 7g 내지 7i는 각각 증류수에서 1, 4 및 7일동안 배양된 보통해면류 유래 골격을 에너지 분산 분광법으로 분석한 결과를 나타낸 사진이다.
- [0112] 아울러, 도 8a는 증류수에서 7일동안 배양된 스피쿨의 조성을 에너지 분산 분광법으로 분석한 그래프이고, 도 8b는 모의 체액에서 7일동안 배양된 스피쿨의 조성을 에너지 분산 분광법으로 분석한 그래프이다.
- [0113] 도 9는 모의 체액에서 7일동안 배양된 스피쿨을 X선 분광 분석법으로 분석한 결과(50)와, 증류수에서 7일동안 배양된 스피쿨을 X선 분광 분석법으로 분석한 결과(60)를 나타낸 도면이다.
- [0114] 도 6a 내지 6i, 7a 내지 7i, 8a 내지 8b 및 9를 참조하면 모의 체액에서 실시예 1의 1. 스피쿨 제조에서 제조된 스피쿨을 배양하면 칼슘(Ca)과 인(P)이 형성되는 것을 확인할 수 있고, 이는 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)을 이용하면 줄기세포의 골분화를 촉진하는데 도움을 줄 수 있는 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0116] <시험예 3>
- [0117] 시험예 3에서는 실시예 1에서 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)의 세포 독성을 분석하였다.
- [0118] 분석 방법은 다음과 같다.
- [0119] 마우스 근모세포(C2C12)를 실시예 1에서 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)에 1×10^5 밀도로 파종하였다. 마우스 근모세포가 파종된 조성물(10)에 성장 배지로 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다.
- [0120] 배양 12, 24시간 후 Live/Dead assay kit로 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)의 세포독성을 분석하였다. 마우스 근모세포의 파종 및 배양 후 얻어지는 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)을 암실에서 15분 동안 염색하고 인산완충생리식염수로 세척한 것을 실험군으로 준비하였다.
- [0122] 비교를 위해 마우스 근모세포(C2C12)를 실시예 1에서 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔을 포함하는 조성물(10)에 파종하지 않고, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 마우스 근모세포(C2C12)

를 파종하여 마우스 근모세포를 12, 24시간동안 배양하는 것을 제외하고는 실험군과 동일한 방법으로 대조군 1을 준비하였다.

[0124] 또한, 실시예 1에서 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔이 아닌 실시예 1의 (3) 조성물 제조시 하이드로겔 전구체 용액에 스피쿨을 혼합하지 않고 티로시나아제만 혼합하여 제조된 하이드로겔을 포함한 조성물(10)에 마우스 근모세포(C2C12)를 파종하여 12, 24시간동안 배양하는 것을 제외하고는 실험군과 동일한 방법으로 대조군 2를 준비하였다.

[0126] 준비된 실험군과 대조군 1 및 대조군 2를 형광현미경을 이용해 분석하였다.

[0127] 분석결과를 도 10a 내지 10f에 나타내었다.

[0128] 도 10a 내지 10b는 각각 시험예 1에 따라 제조되는 스피쿨이 담지된 하이드로겔에 마우스 근모세포를 12, 24시간 배양한 실험군을 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

[0129] 도 10c 내지 10d는 각각 10% 소태아혈청과 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium를 성장배지로 하여 마우스 근모세포를 12, 24시간 배양한 대조군 1을 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

[0130] 도 10e 내지 10f는 각각 스피쿨이 담지되지 않은 하이드로겔에 마우스 근모세포를 12, 24시간 배양한 대조군 2를 형광현미경을 이용해 분석한 결과를 나타낸 사진이다.

[0131] 도 10a와 10c 및 10e를 참조하면 마우스 근포세포를 12시간동안 배양한 실험군과 대조군 1 내지 2에서 비슷한 수준의 세포가 생존한 것을 확인할 수 있고, 도 10b, 10d 및 10f를 참조하면 마우스 근포세포를 24시간동안 배양한 실험군과 대조군 1 내지 2에서 비슷한 수준의 세포가 생존한 것을 확인할 수 있다.

[0132] 이는 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조되는 조성물(10)에 포함된 하이드로겔과 스피쿨이 생체에 적용하기 적합한 것을 확인할 수 있는 결과이다.

[0134] <시험예 4>

[0135] 시험예 4는 줄기세포의 골형성 분화 촉진 특성을 분석하기 위한 시험이다.

[0136] 분석 방법은 다음과 같다.

[0137] 1. 분석 방법

[0138] (1) 실험군 1 준비

[0139] 먼저, 인간 편도선유래 중간엽 줄기세포(Human Turbinate Mesenchymal Stromal Cells, hTMSC)를 12 well 세포배양 플레이트(30)에 5×10^4 밀도로 파종하였다. 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10)을 바닥에 미세한 중공이 형성된 인서트(insert) 내부에 투입하고, 조성물(10)이 투입된 인서트(40)를 세포 배양 플레이트(30)에 거치하여 14일과 21일동안 배양한 것을 실험군 1로 준비하였다. 이때, 성장배지로는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 dexamethasone, glycerol-2-phosphate, L-ascorbic acid, Antibiotic-Antimycotic의 농도가 각각 100 nM, 10 mM, 50 μ g/mL, 1%(v/v)가 되도록 혼합하여 제조되는 것을 사용하였다. 성장배지는 격일 단위로 교체되었고, hTMSC(20)의 밀도가 성장 배지 내에서 70~80%에 도달하면 계대배양되었다.

[0141] (2) 실험군 2 준비

[0142] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 2에 따라 제조되는 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 실험군 2를 준비하였다.

- [0144] (3) 대조군 준비
- [0145] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 1의 (3) 조성물 제조시 하이드로겔 전구체 용액에 스피큘을 혼합하지 않고 티로시나아제만 혼합하여 제조된 하이드로겔을 포함한 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 대조군을 준비하였다.
- [0147] (4) 줄기세포의 염색
- [0148] 실험군 1과 실험군 2 및 대조군으로 준비된 줄기세포를 4% paraformaldehyde로 10분 동안 고정한 후 고정된 세포를 탈이온수로 세척하였다. 탈이온수에 ARS(Alizarin Red S staining) 2%(w/v) 농도로 녹인 후 NH_4OH 를 이용하여 최종 pH 4.1~4.3인 ARS 용액을 제조하고, 세척된 줄기세포를 제조된 ARS 용액을 이용해 30분동안 염색하고 탈이온수로 세척하여 과량의 ARS를 제거하고, 형광현미경을 이용해 분석하였다.
- [0150] 2. 분석 결과
- [0151] 분석 결과를 도 12a 내지 12f에 나타내었다.
- [0152] 도 12a와 12b는 각각 실험군 1에서 hTMSC를 14일과 21일동안 배양한 것을 형광현미경을 이용해 분석한 사진이고, 12c와 12d는 각각 실험군 2에서 hTMSC를 14일과 21일동안 배양한 것을 형광현미경을 이용해 분석한 사진이며, 12e와 12f는 각각 대조군에서 hTMSC를 14일과 21일동안 배양한 것을 형광현미경을 이용해 분석한 사진이다.
- [0153] 도 12a 내지 12f를 참조하면 실험군 2, 실험군 1, 대조군 순으로 hTMSC(20)의 배양이 효과적으로 이루어진 것을 확인할 수 있고, 이는 실험군 2, 실험군 1, 대조군 순으로 골분화 형성이 촉진된 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0154] 즉, 대조군에 비해 실험군 2와 실험군 1에서 hTMSC(20)의 배양이 효과적으로 이루어진 것으로 볼 수 있고, 이는 본 발명의 다른 실시예에 따른 조성물(10)을 이용하면 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0155] 아울러, 실험군 2가 실험군 1보다 hTMSC(20)의 배양이 효과적으로 이루어진 것을 확인할 수 있는데 이는 하이드로겔 전구체 용액에 대해 2mg/ml의 농도가 되도록 스피큘을 혼합하여 제조한 조성물(10)이 1mg/ml의 농도가 되도록 스피큘을 혼합하여 제조한 조성물(10)보다 골분화 촉진 특성이 뛰어난 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0157] <시험예 5>
- [0158] 시험예 5는 줄기세포의 골형성 분화 촉진 특성을 분석하기 위한 시험이다.
- [0159] 분석 방법은 다음과 같다.
- [0160] 1. 분석 방법
- [0161] (1) 실험군 1 준비
- [0162] 먼저, 인간 편도선유래 중간엽 줄기세포(Human Turbinate Mesenchymal Stromal Cells, hTMSC)를 12 well 세포 배양 플레이트(30)에 5×10^4 밀도로 파종하였다. 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10)을 바닥에 미세한 중공이 형성된 인서트(insert) 내부에 투입하고, 조성물(10)이 투입된 인서트(40)를 세포 배양 플레이트(30)에 거치하여 7일동안 배양한 것을 실험군 1로 준비하였다. 이때, 성장배지로는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 dexamethasone, glycerol-2-phosphate, L-ascorbic acid, Antibiotic-Antimycotic의 농도가 각각 100 nM, 10 mM, 50 $\mu\text{g/mL}$, 1%(v/v)가 되도록 혼합하여 제조되는 것을 사용하였다. 성장배지는 격일 단위로 교체되었고, hTMSC(20)의 밀도가 성장 배지 내에서 70~80%에 도달하면 계대배양되었다.

- [0164] (2) 실험군 2 준비
- [0165] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 2에 따라 제조되는 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 실험군 2를 준비하였다.
- [0167] (3) 실험군 3 준비
- [0168] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 3에 따라 제조되는 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 실험군 2를 준비하였다.
- [0170] (4) 실험군 4 준비
- [0171] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 4에 따라 제조되는 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 실험군 2를 준비하였다.
- [0173] (5) 대조군 1 준비
- [0174] 먼저, 인간 편도선유래 중간엽 줄기세포(Human Turbinate Mesenchymal Stromal Cells, hTMSC)를 12 well 세포 배양 플레이트(30)에 5×10^4 밀도로 파종하고, 성장배지로 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다. 성장배지는 격일 단위로 교체되었고, hTMSC(20)의 밀도가 성장 배지 내에서 70~80%에 도달하면 계대배양되었다.
- [0176] (6) 대조군 2 준비
- [0177] 성장배지로 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 대신 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 dexamethasone, glycerol-2-phosphate, L-ascorbic acid, Antibiotic-Antimycotic의 농도가 각각 100 nM, 10 mM, 50 μ g/mL, 1%(v/v)가 되도록 혼합하여 제조되는 것을 제외하고는 대조군 1과 동일한 방법으로 대조군 2를 준비하였다.
- [0179] (4) 줄기세포의 염색
- [0180] 실험군 1 내지 4 및 대조군 1 내지 2로 준비된 줄기세포를 4% paraformaldehyde로 10분 동안 고정한 후 고정된 세포를 인산완충생리식염수로 세척하였다. 세척된 줄기세포를 BCIP/NBT로 30분 동안 염색하고, 인산완충생리식염수로 세척하였다. BCIP/NBT로 염색 후 인산완충생리식염수로 세척된 줄기세포를 형광현미경을 이용해 분석하였다.
- [0182] 2. 분석 결과
- [0183] 분석 결과를 도 13a 내지 13f에 나타내었다.
- [0184] 도 13a 내지 13d는 각각 실험군 1, 2, 3, 4를 형광현미경을 이용해 분석한 사진이고, 13e와 13f는 각각 대조군 1과 대조군 2를 형광현미경을 이용해 분석한 사진이다.
- [0185] 도 13a 내지 13f를 참조하면 실험군 1 내지 4에서 대조군 1 내지 2보다 hTMSC(20)의 배양이 효과적으로 이루어진 것으로 볼 수 있고, 이는 본 발명의 다른 실시예에 따른 조성물(10)을 이용하면 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0186] 아울러, 실험군 2 내지 4에서 실험군 1보다 hTMSC(20)의 배양이 효과적으로 이루어진 것을 확인할 수 있고, 특

히 실험군 3에서 hTMSC(20)의 배양이 가장 효과적으로 이루어진 것을 확인할 수 있다.

[0188] <시험예 6>

[0189] 시험예 6는 줄기세포의 골분화 유도 특성을 분석하기 위한 시험이다.

[0190] 분석 방법은 다음과 같다.

[0191] (1) 실험군 1 준비

[0192] 먼저, 인간 편도선유래 중간엽 줄기세포(hTMSC)를 12 well 세포 배양 플레이트(30)에 5×10^4 밀도로 파종하였다. 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10)을 바닥에 미세한 중공이 형성된 인서트(insert) 내부에 투입하고, 조성물(10)이 투입된 인서트(40)를 세포 배양 플레이트(30)에 거치하여 7일동안 배양한 것을 실험군 1로 준비하였다. 이때, 성장배지로는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 dexamethasone, glycerol-2-phosphate, L-ascorbic acid, Antibiotic-Antimycotic의 농도가 각각 100 nM, 10 mM, 50 μ g/mL, 1%(v/v)가 되도록 혼합하여 제조되는 것을 사용하였다. 성장배지는 격일 단위로 교체되었고, hTMSC(20)의 밀도가 성장 배지 내에서 70~80%에 도달하면 계대배양되었다.

[0194] (2) 실험군 2 준비

[0195] 실시예 1에 따라 제조되는 조성물(10) 대신 실시예 2에 따라 제조되는 조성물(10)을 인서트(40)에 투입하는 것을 제외하고는 실험군 1과 동일한 방법으로 실험군 2를 준비하였다.

[0197] (3) 대조군 1 준비

[0198] 인간 편도선유래 중간엽 줄기세포(Human Turbinate Mesenchymal Stromal Cells, hTMSC)를 12 well 세포 배양 플레이트(30)에 5×10^4 밀도로 파종하고 7일동안 배양한 것을 대조군 1로 준비하였다, 이때, 성장배지로는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다. 성장배지는 격일 단위로 교체되었고, hTMSC(20)의 밀도가 성장 배지 내에서 70~80%에 도달하면 계대배양되었다.

[0200] (4) 대조군 2 준비

[0201] 성장배지로 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 대신 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 dexamethasone, glycerol-2-phosphate, L-ascorbic acid, Antibiotic-Antimycotic의 농도가 각각 100 nM, 10 mM, 50 μ g/mL, 1%(v/v)가 되도록 혼합하여 제조되는 것을 사용하는 것을 제외하고는 대조군 1과 동일한 방법으로 대조군 2를 준비하였다.

[0203] (5) qRT-PCR 분석

[0204] 실험군 1 내지 2, 대조군 1 내지 2에서 배양된 hTMSC(20)에서 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 cDNA(complementary DNA)로 역전사한 후 SYBR Green으로 cDNA를 증폭하여 골 관련 유전자인 COL1, OCN, ALP 및 RunX2를 검출하였다. 각 유전자의 발현수준은 하우스키핑 유전자 GAPDH에 의해 정규화되었다. 각 유전자의 상대적인 발현수준(Relative expression)을 도 14a 내지 14d에 나타내었다.

[0206] (6) 분석 결과

[0207] 도 14a는 시험예 6에 따른 분석 방법으로 분석한 COL1 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프이고, 도14b는 시험예 6에 따른 분석 방법으로 분석한 OCN 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프이며, 도14c는 시험예 6에 따른 분석 방법으로 분석한 ALP 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프이고, 도 14d는 시험예 6에 따른 분석 방법으로 분석한 RunX2 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프이다.

[0208] 도 14a를 참조하면 COL1 유전자의 발현수준이 실험군 1에서 가장 높은 것을 확인할 수 있고, 실험군 2의 경우 대조군 2보다 다소 낮은 발현수준을 나타내고 있으나, 대조군 1보다는 높은 발현수준을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0209] 도 14b 내지 14d를 참조하면 실험군 1과 실험군 2의 OCN, ALP, RunX2 유전자의 발현수준이 대조군 1과 대조군 2 보다 높은 것을 확인할 수 있고, 이는 본 발명의 실시예에 따른 조성물을 이용할 때 hTMSC(20)의 골분화를 효과적으로 유도할 수 있는 것을 확인할 수 있는 결과이다.

[0211] <시험예 7>

[0212] 시험예 7에서는 실시예 1, 실시예 5 및 실시예 6의 (3) 조성물 제조에서 제조되는 하이드로겔의 팽윤율을 분석하였다.

[0213] 단, 팽윤율의 분석시 스피큘에 의한 영향을 고려하지 않기 위해 실시예 1, 실시예 5 및 실시예 6의 (3) 조성물 제조에 기재된 방법으로 하이드로겔을 준비하되, 하이드로겔의 제조시 스피큘을 혼합하지 않고 하이드로겔 전구체 용액에 효소 가교제인 티로시나아제만을 혼합하여 제조되는 하이드로겔을 준비하고, 준비된 하이드로겔의 팽윤율을 분석하였다.

[0214] 팽윤율 분석 방법은 다음과 같다.

[0215] 먼저, 전술한 방법으로 하이드로겔 전구체 용액에 티로시나아제만을 혼합하여 제조되는 하이드로겔을 동결건조하여 중량(W_d)을 측정하였다. 동결건조된 하이드로겔을 인산완충생리식염수에 24시간동안 침지한 후 꺼내어 중량(W_s)를 측정하였다. 이후 아래 수학적 식 1을 이용하여 팽윤율을 계산하였다.

[0216] (수학적 식 1)

[0217]
$$Q = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

[0218] 표 1에 팽윤율 분석 결과를 나타내었다.

표 1

	실시예 1	실시예 5	실시예 6
팽윤율	41	42	39.5

[0220] 표 1을 참조하면 하이드로겔의 팽윤율이 실시예 5, 실시예 1 및 실시예 6에 따라 제조된 하이드로겔 순으로 높은 것을 확인할 수 있고, 이는 실시예 6, 실시예 1 및 실시예 5에 따라 제조된 하이드로겔 순으로 가교밀도가 높은 것을 확인할 수 있는 결과이다.

[0222] <시험예 8>

[0223] 시험예 8에서는 실시예 1, 실시예 5 및 실시예 6의 (3) 조성물 제조에서 제조되는 하이드로겔의 내부 구조를 분석하였다.

[0224] 단, 스피큘에 의한 영향을 고려하지 않기 위해 하이드로겔의 제조시 스피큘을 혼합하지 않고 하이드로겔 전구체 용액에 효소 가교제인 티로시나아제만을 혼합하여 제조되는 하이드로겔의 내부구조를 주사전자현미경을 이용해 분석하였다. 주사전자현미경을 이용해 내부구조 분석시 하이드로겔을 동결건조하고, 동결건조된 하이드로겔을 분석하였다.

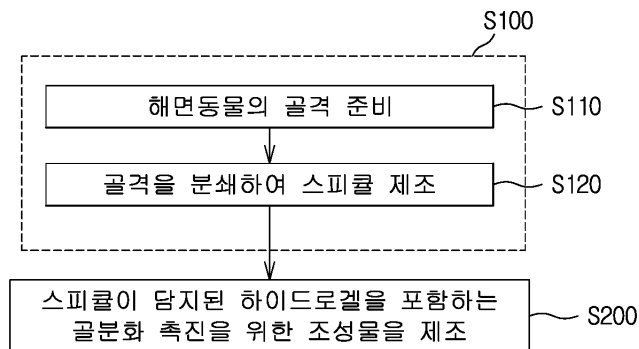
- [0225] 도 15a 내지 15f에 분석 결과를 나타내었다.
- [0226] 도 15a와 15b는 실시예 1에 따라 제조된 하이드로겔의 내부 구조를 주사전자현미경을 이용해 분석한 이미지이고, 도 15c와 15d는 실시예 5에 따라 제조된 하이드로겔의 내부 구조를 주사전자현미경을 이용해 분석한 이미지이며, 도 15e와 15f는 실시예 6에 따라 제조된 하이드로겔의 내부 구조를 주사전자현미경을 이용해 분석한 이미지이다.
- [0227] 도 15a 내지 15f를 참조하면 실시예 6, 실시예 1 및 실시예 5 순으로 하이드로겔에 형성된 기공이 많은 것을 확인할 수 있고, 이는 하이드로겔의 가교밀도가 실시예 6, 실시예 1 및 실시예 5 순으로 높은 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [0229] 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

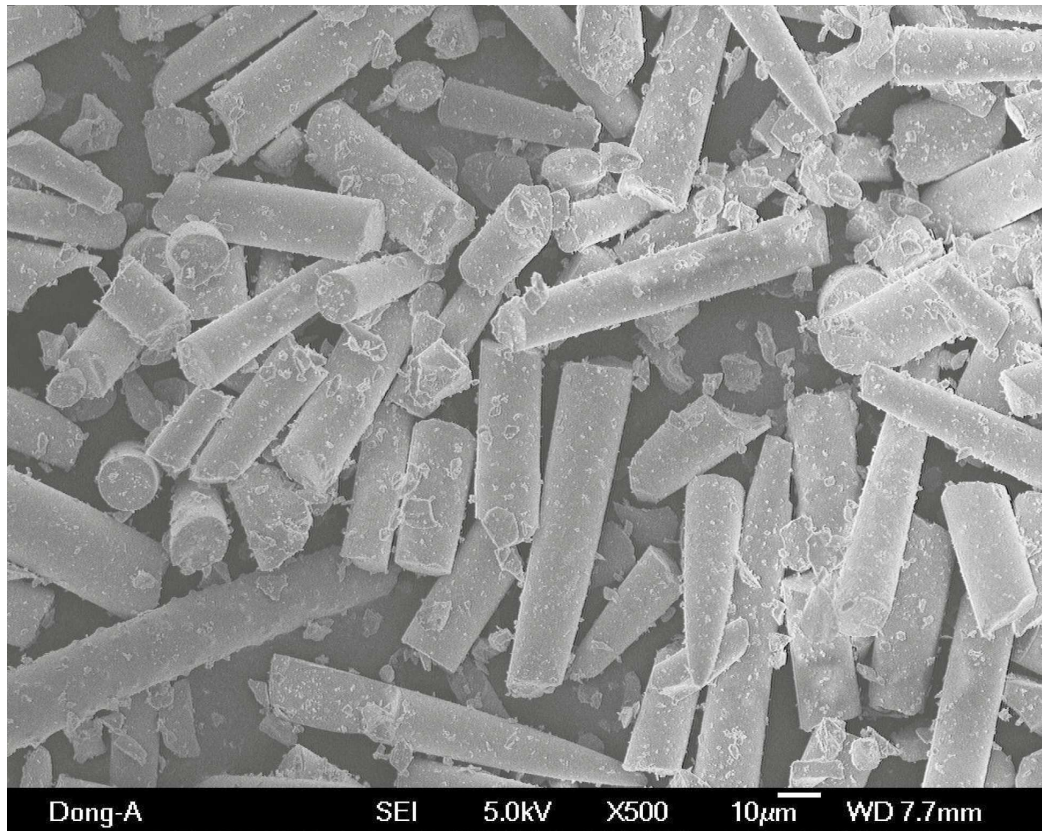
- [0230] S100: 스피쿨 준비단계,
S110: 골격 준비단계, S120: 분쇄단계,
S200: 조성물 제조단계.

도면

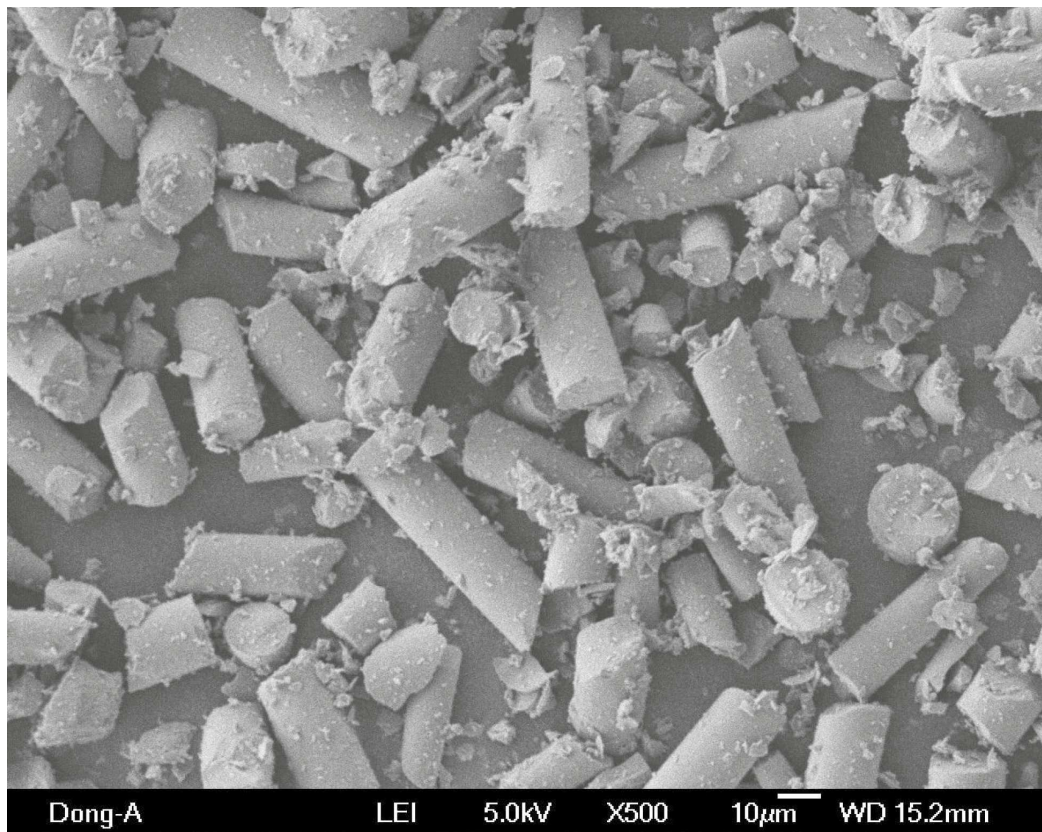
도면1



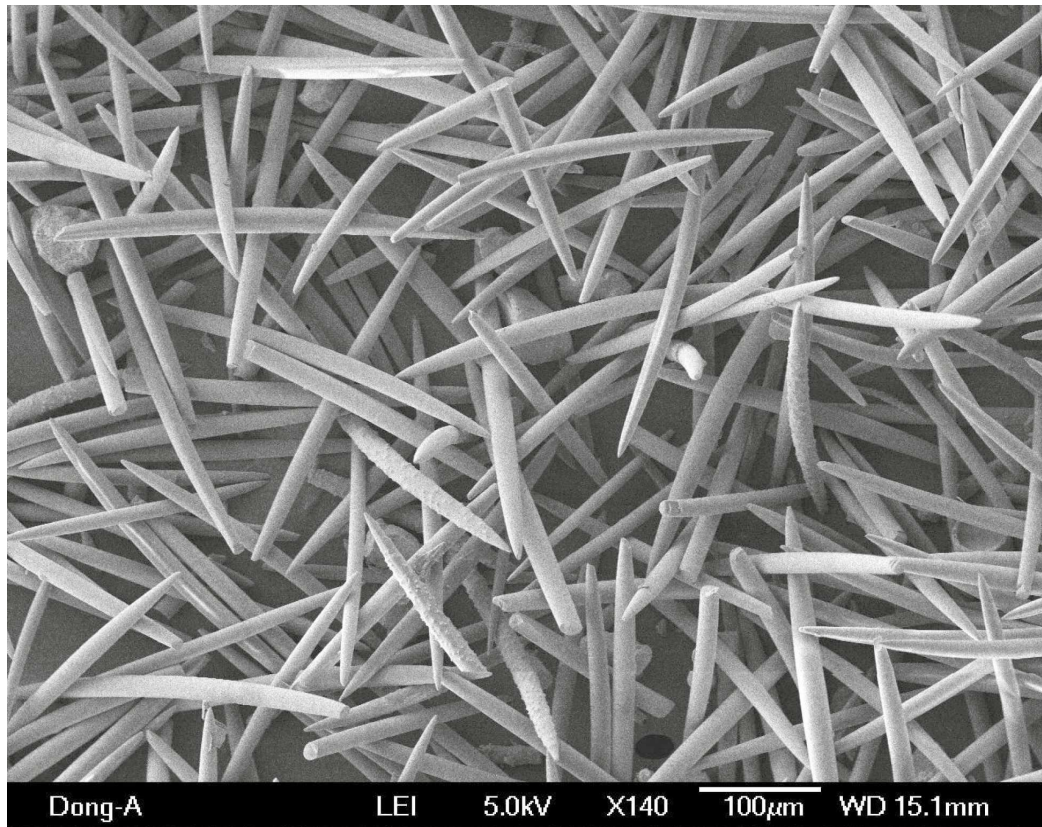
도면2a



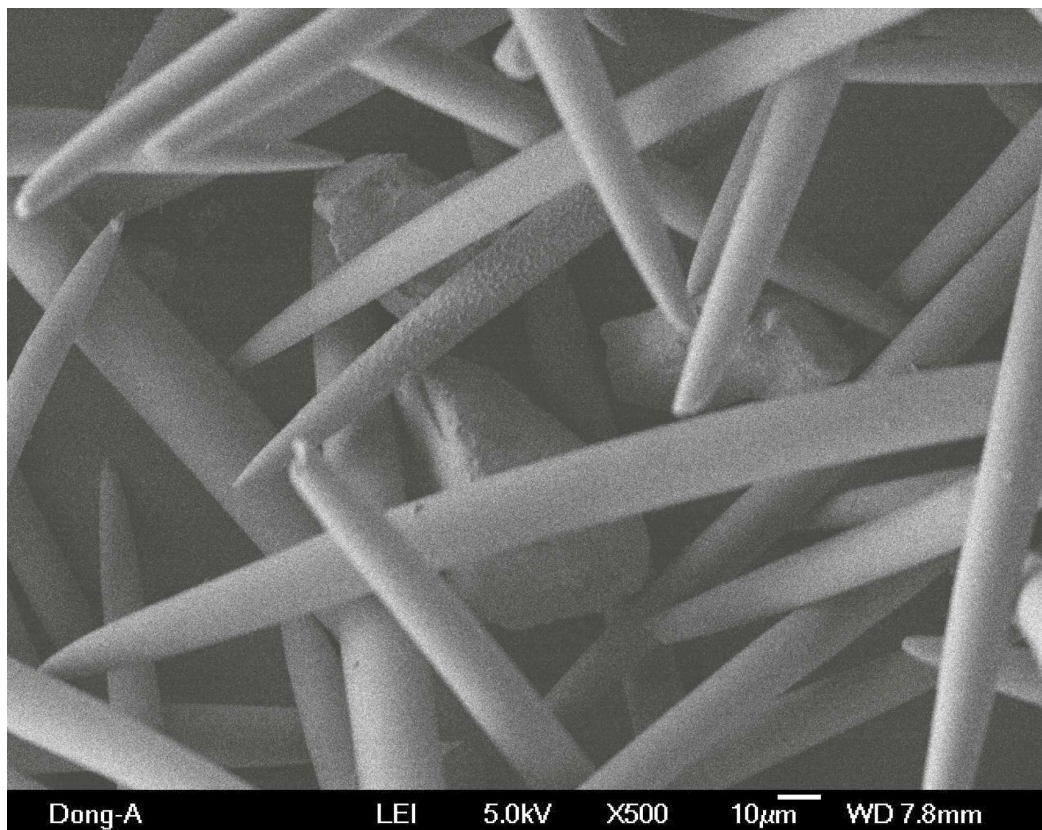
도면2b



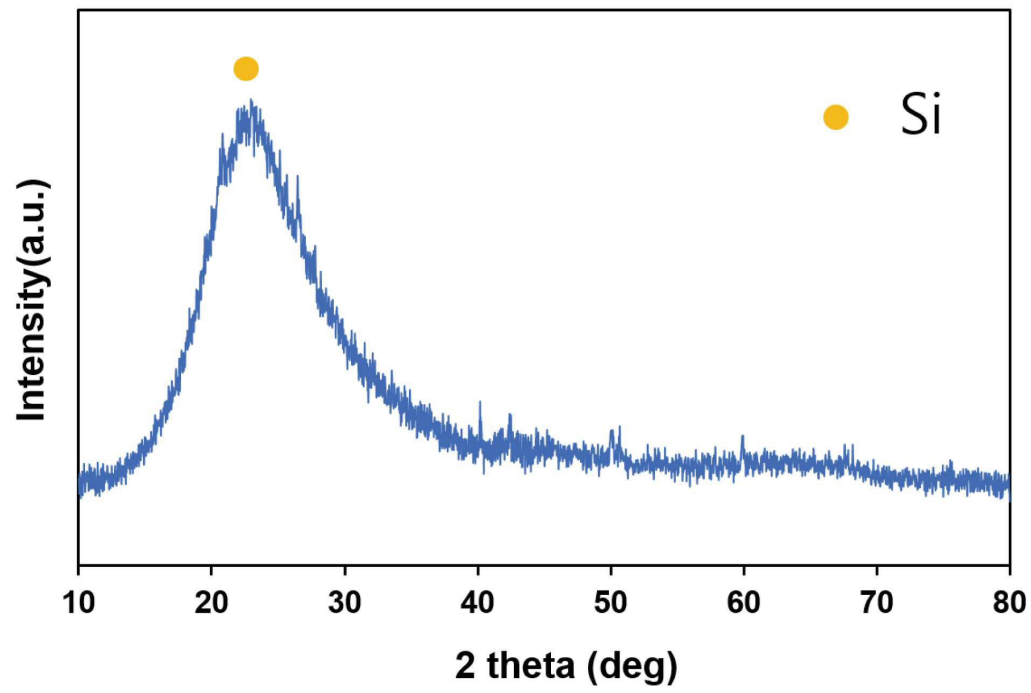
도면2c



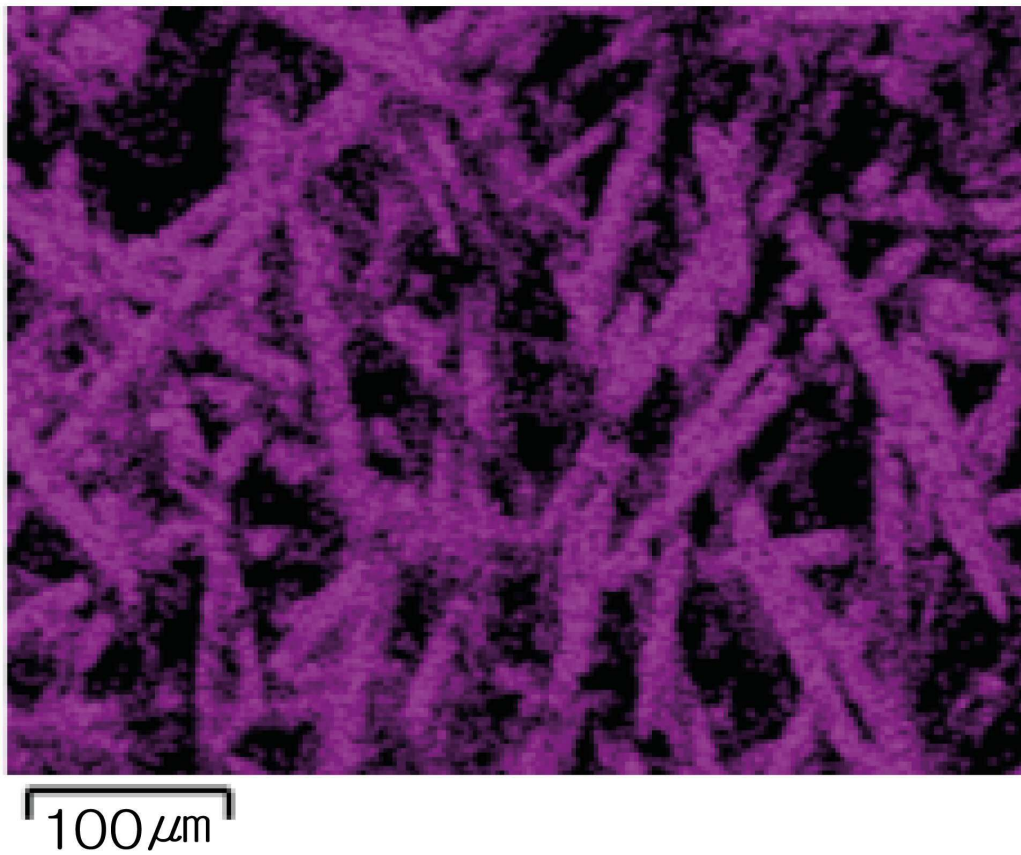
도면2d



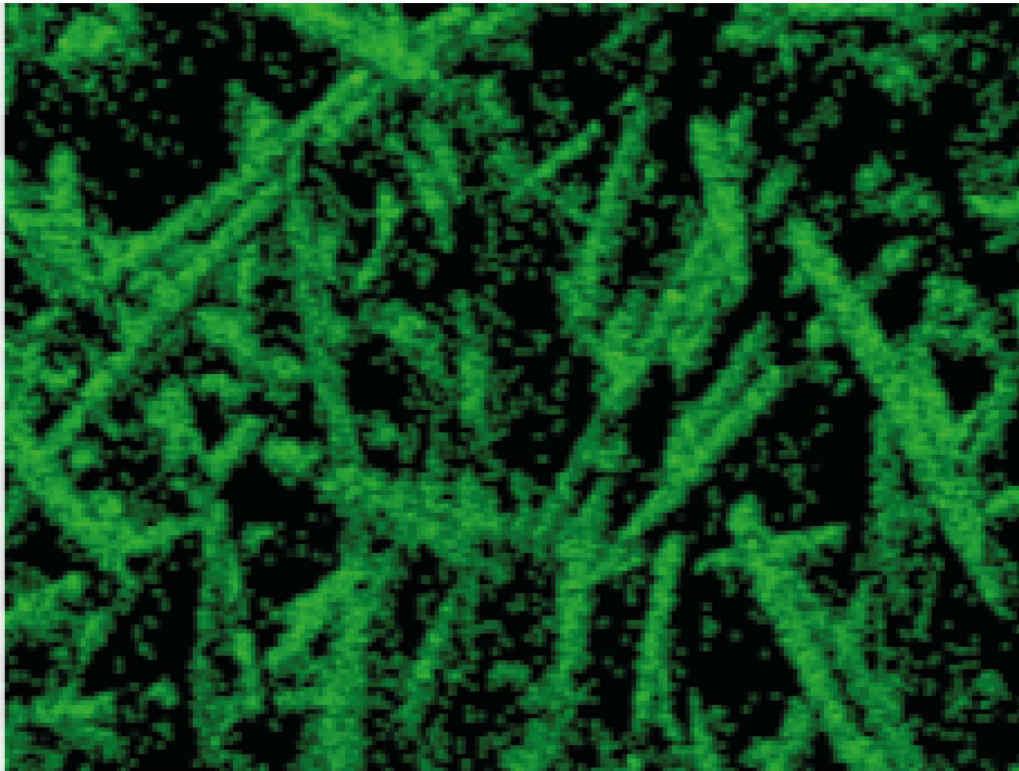
도면3



도면4a

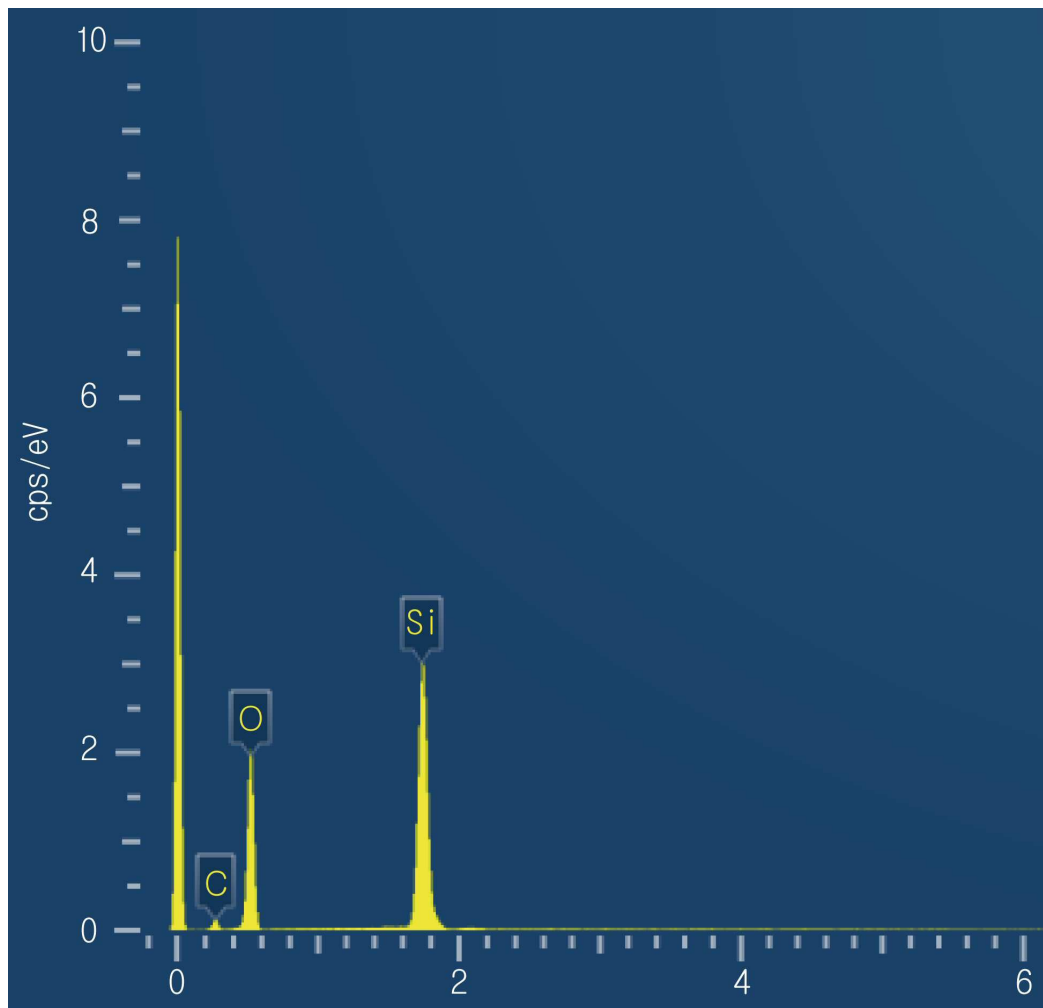


도면4b

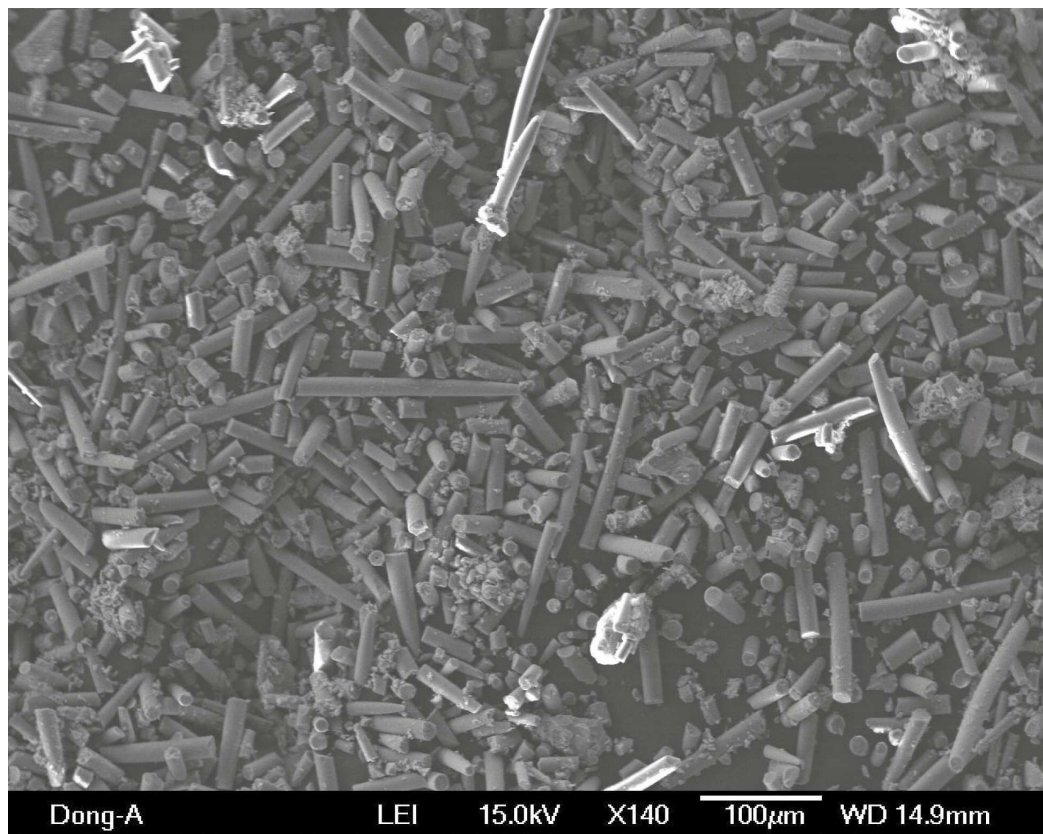


100 μm

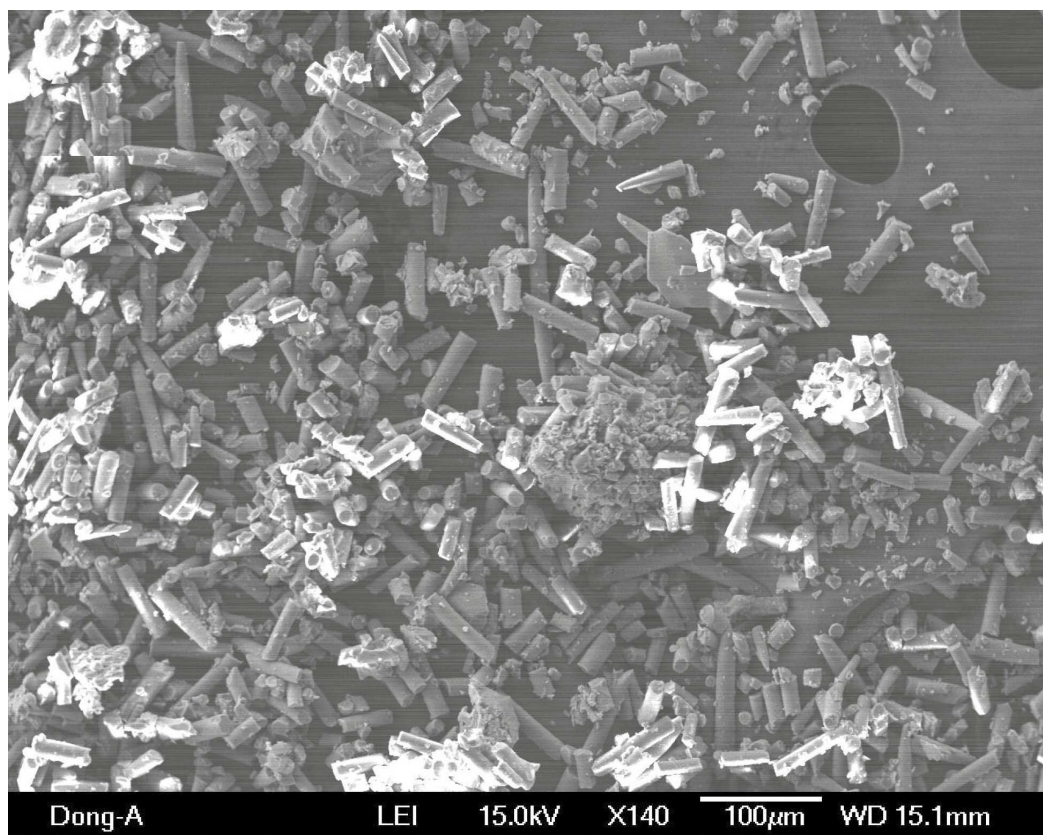
도면5



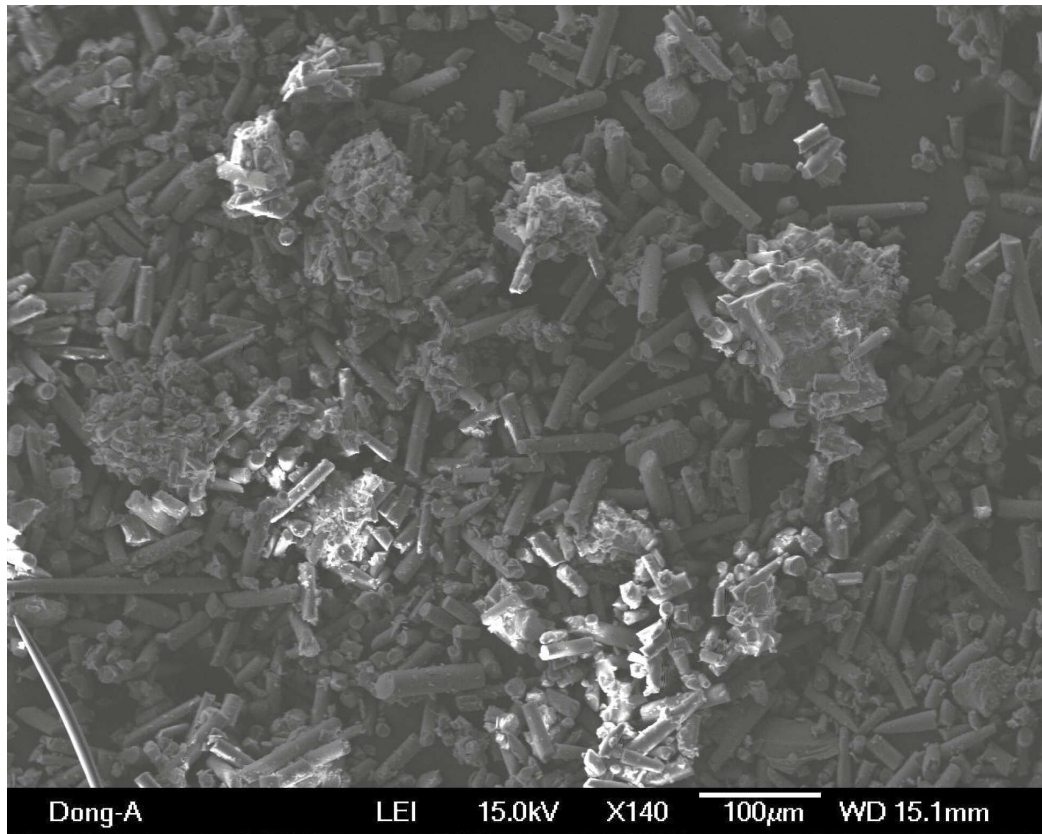
도면6a



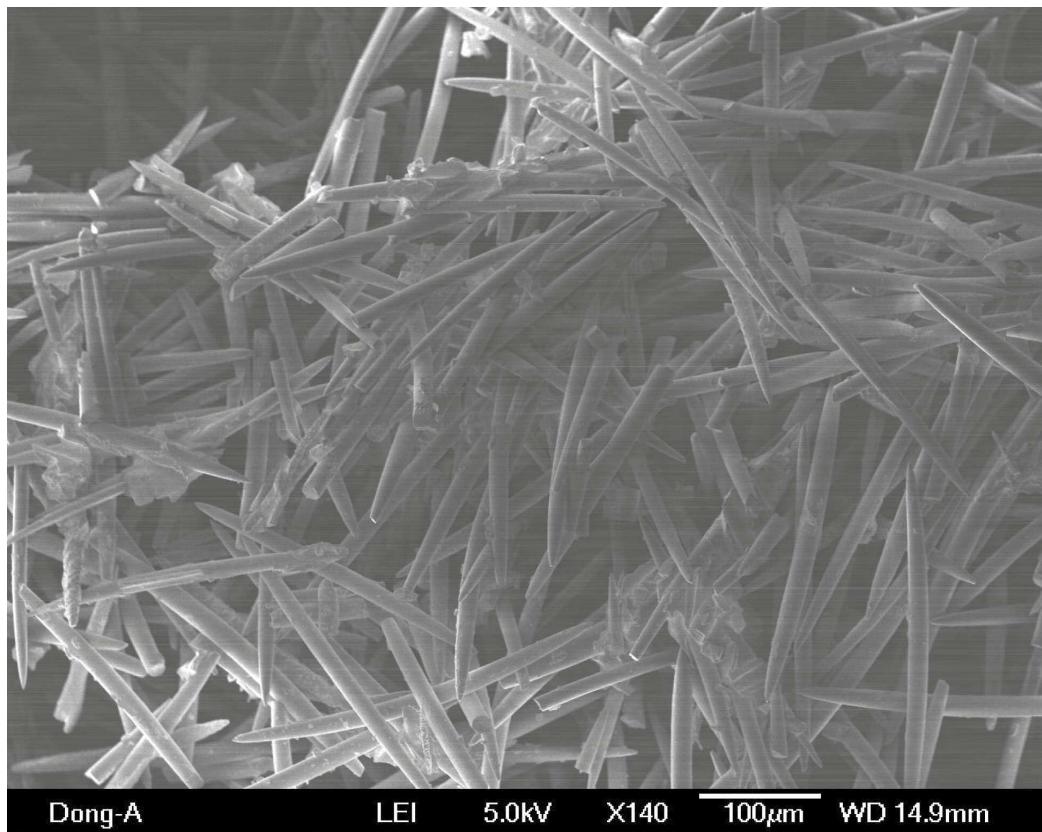
도면6b



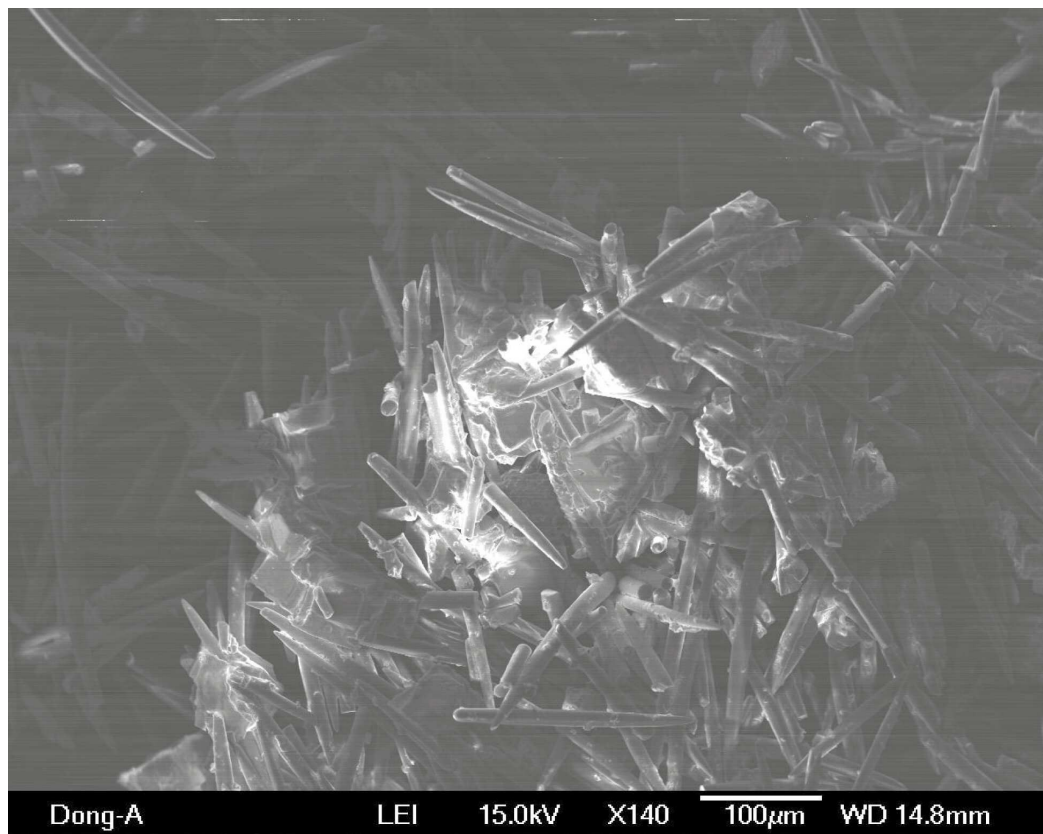
도면6c



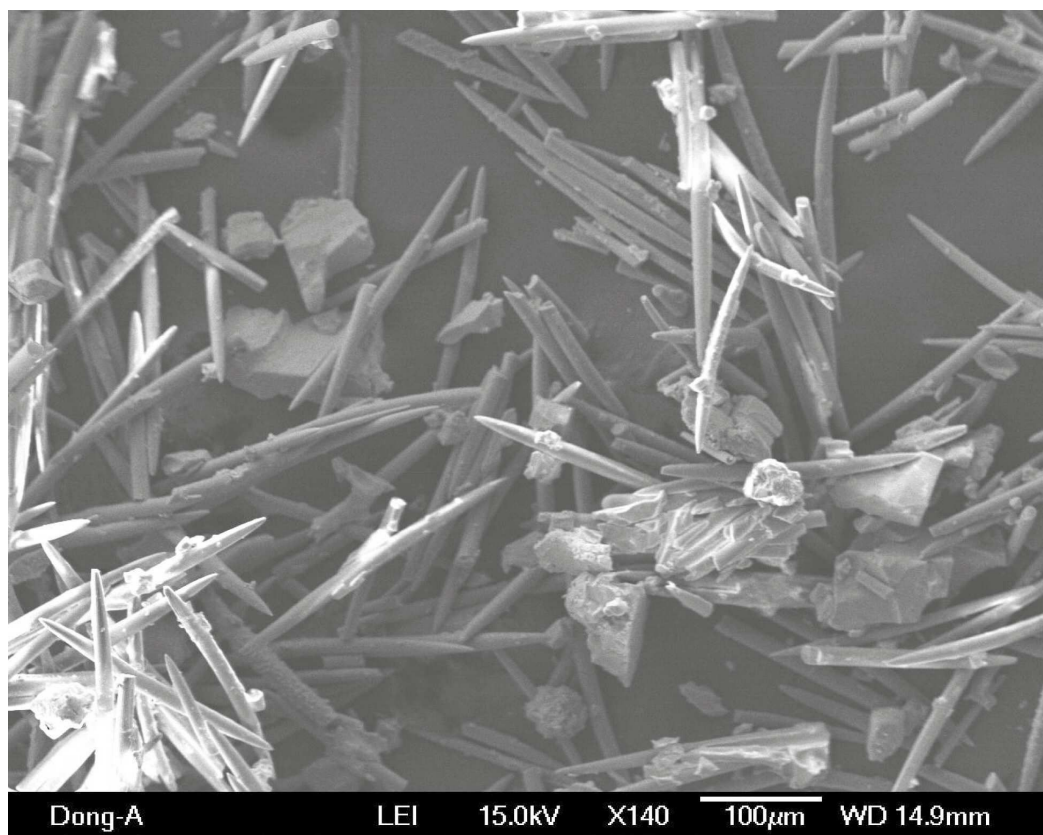
도면6d



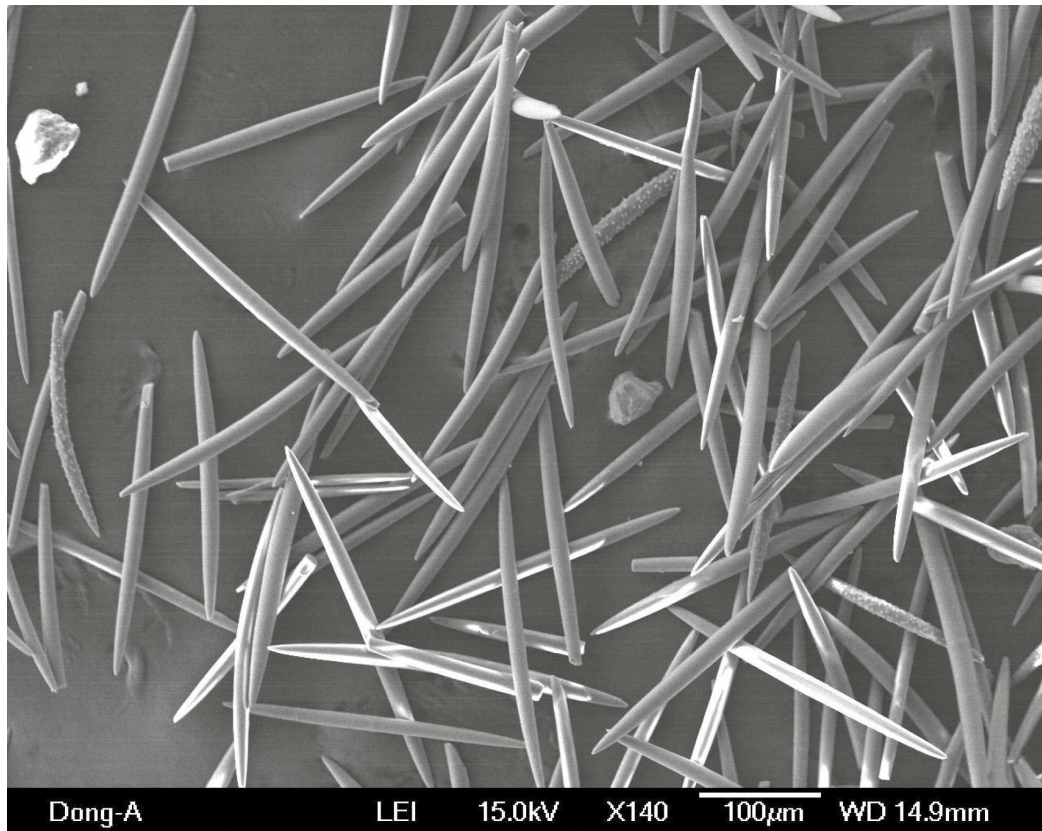
도면6e



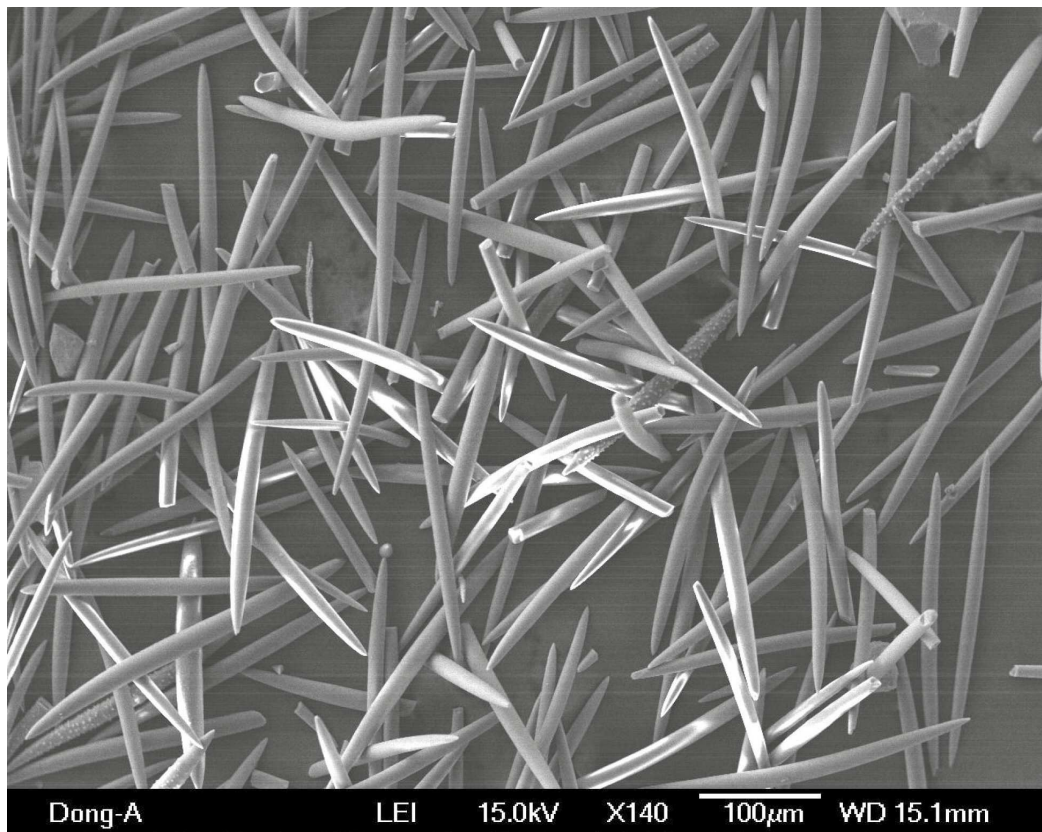
도면6f



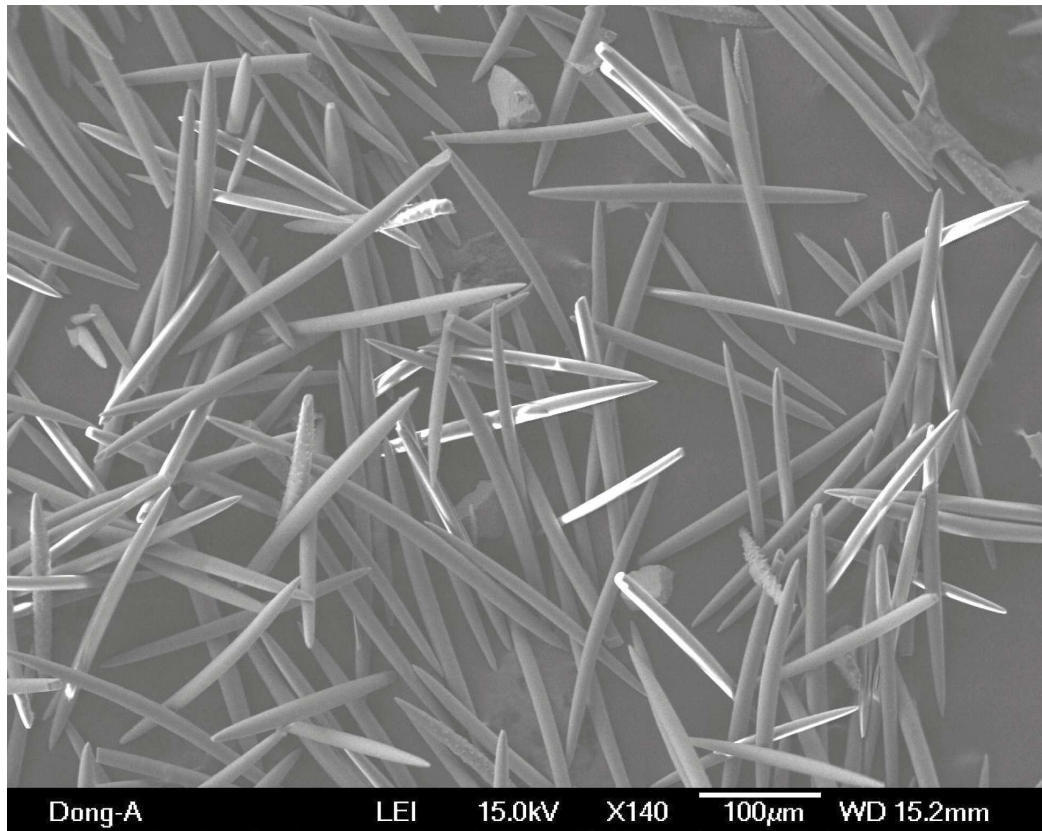
도면6g



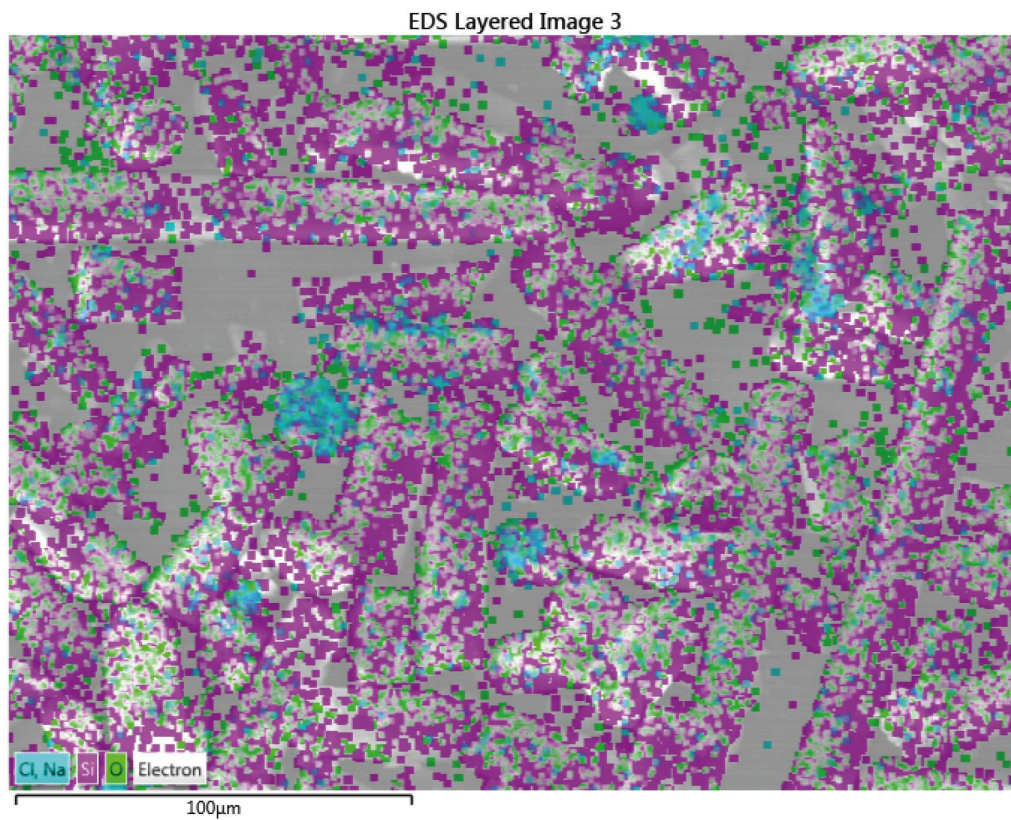
도면6h



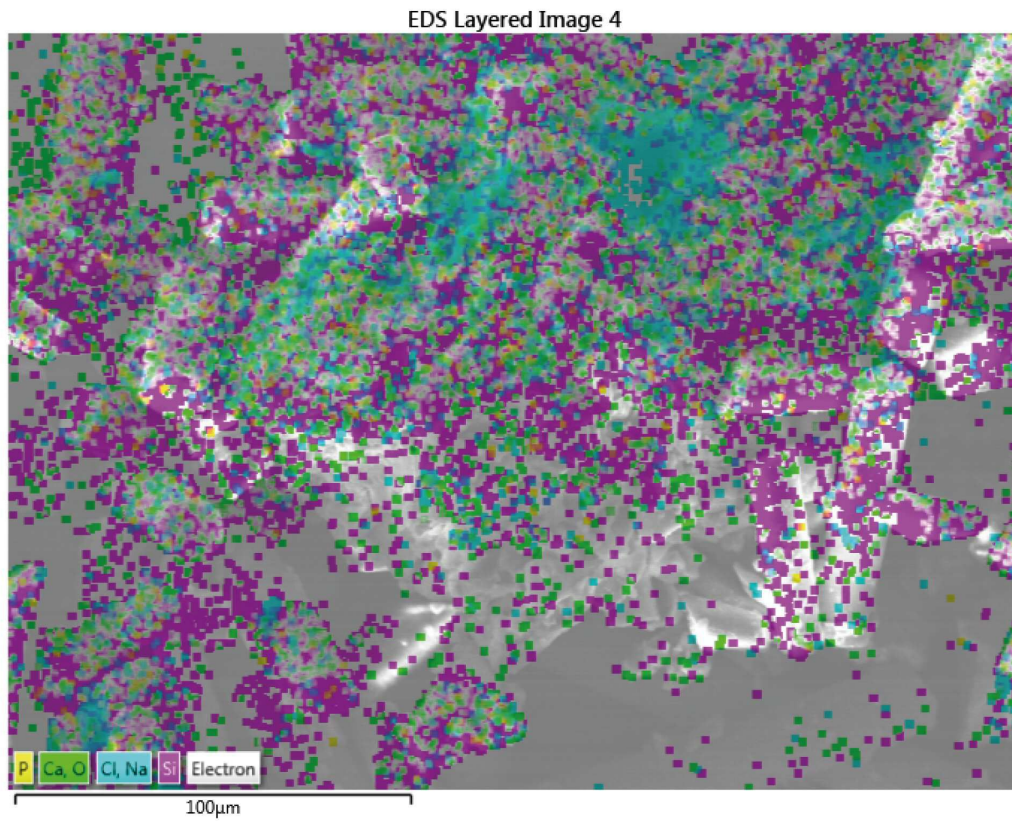
도면6i



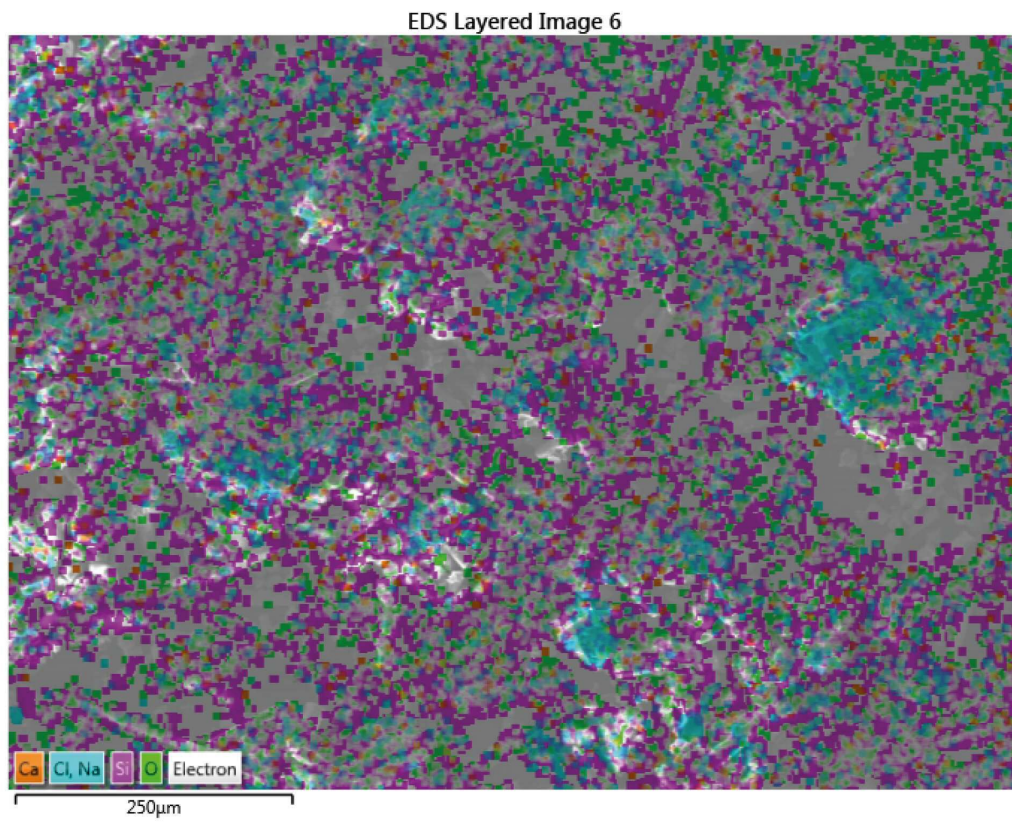
도면7a



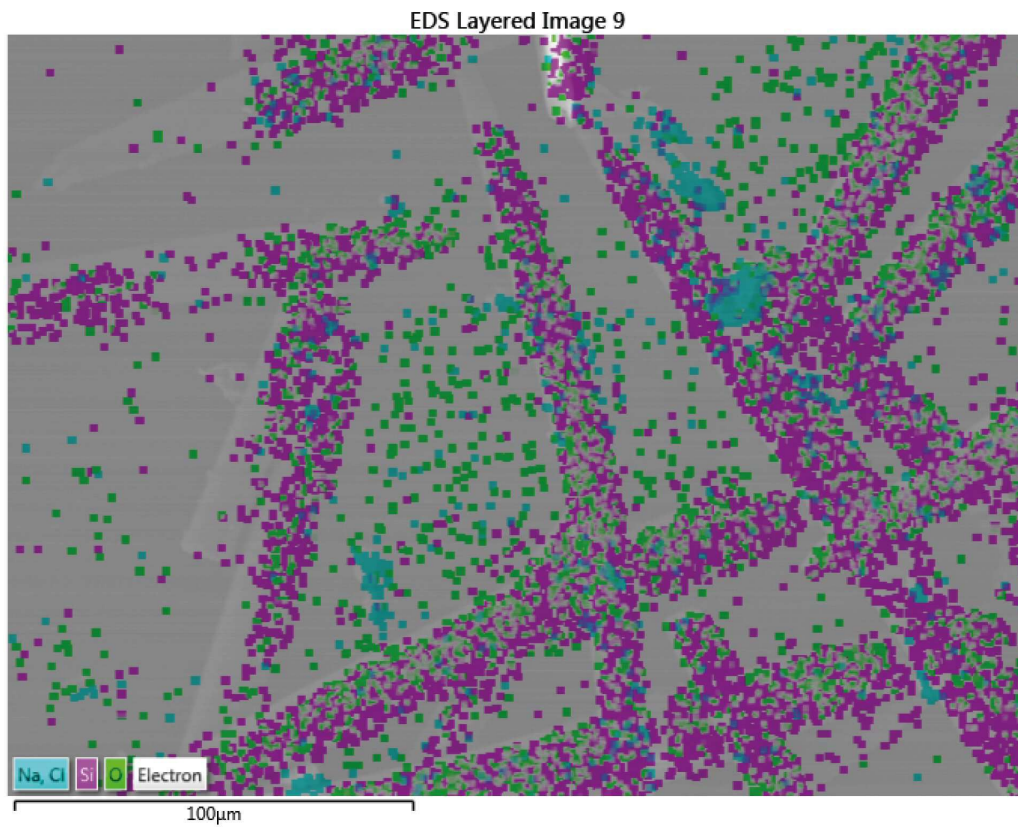
도면7b



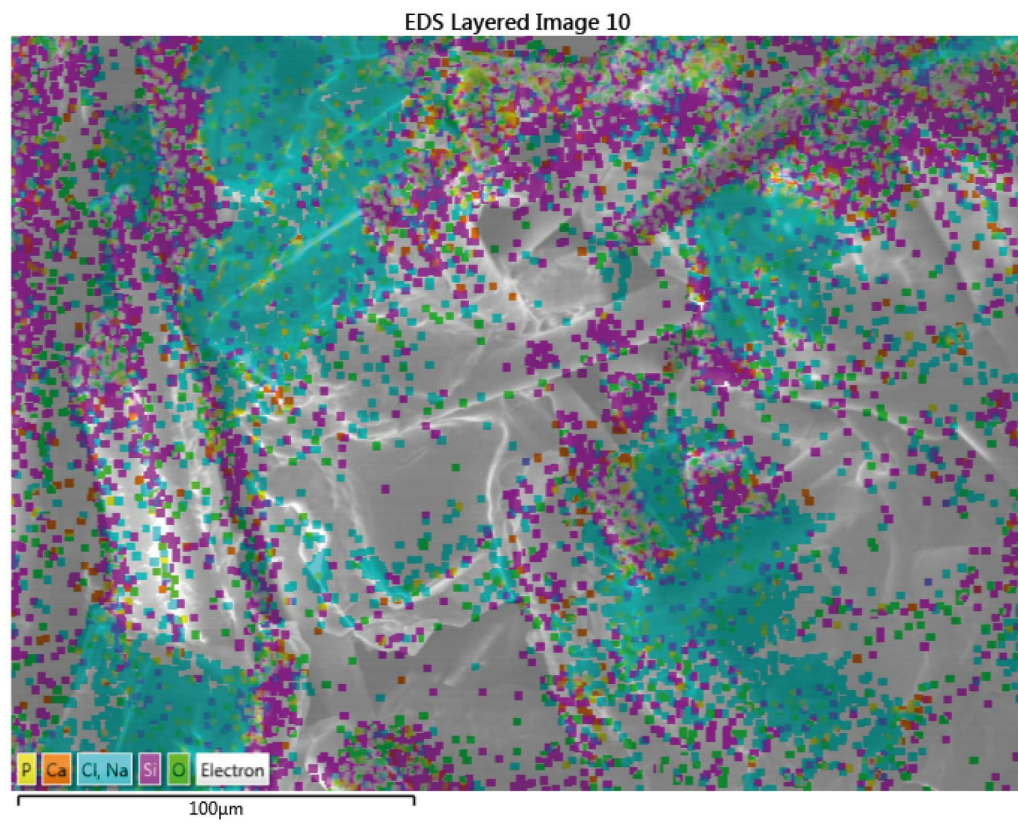
도면7c



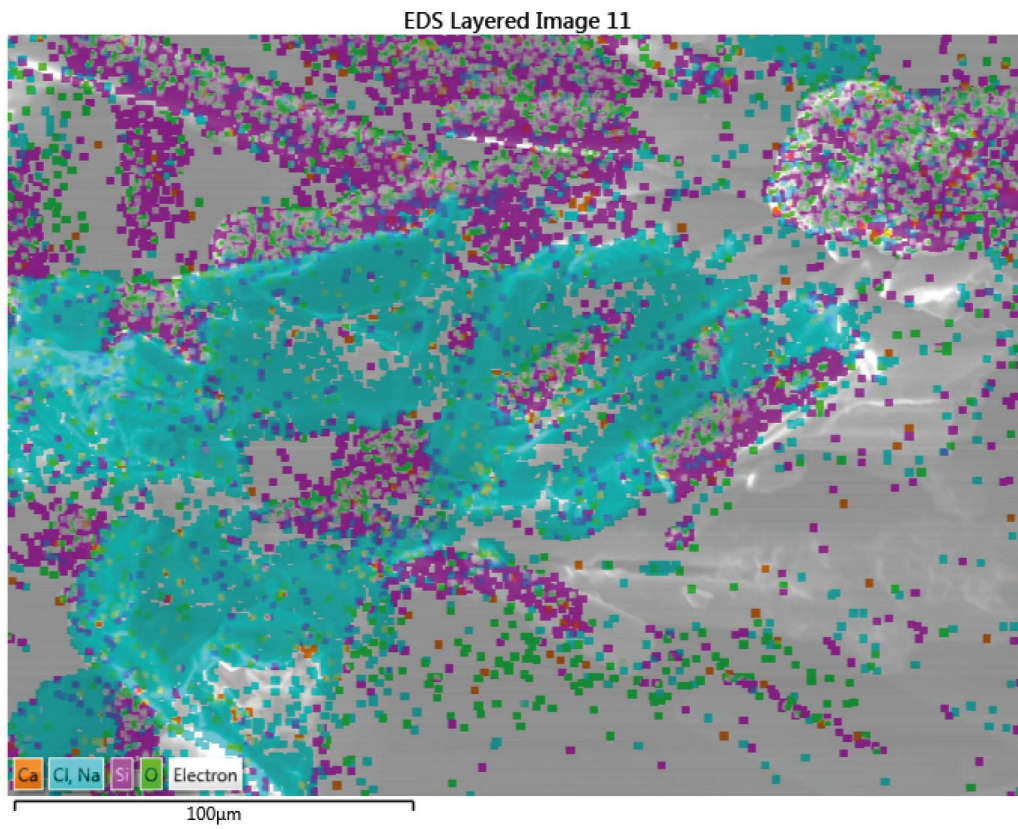
도면7d



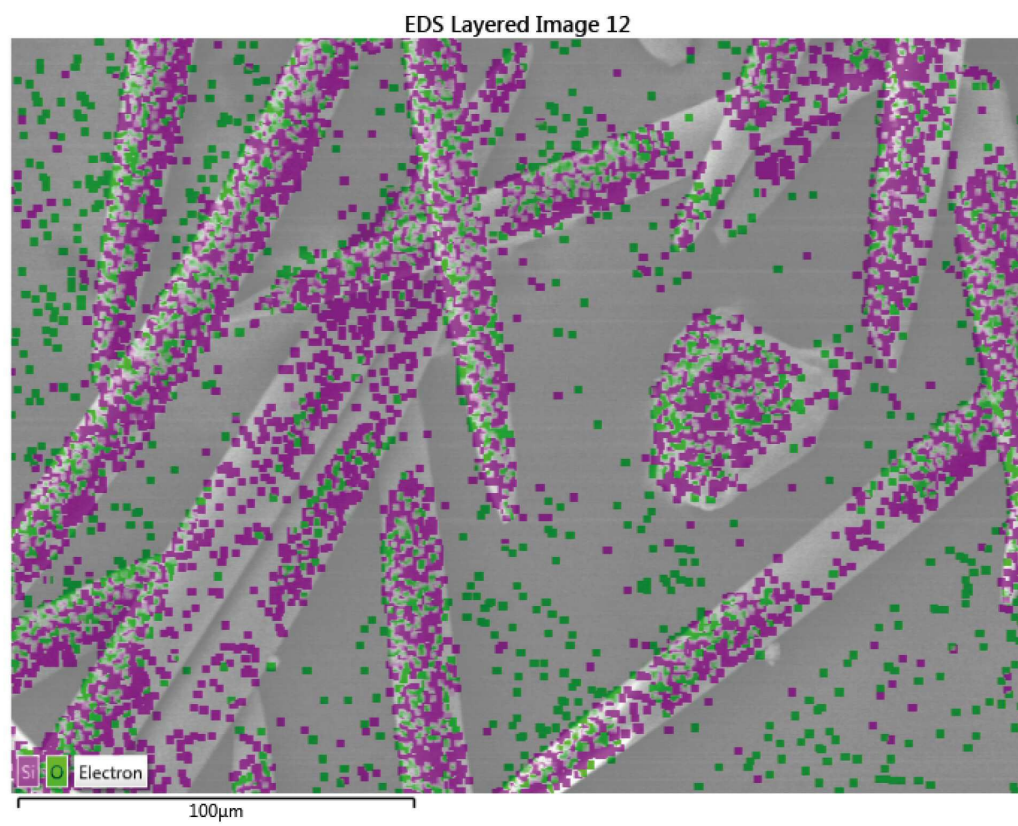
도면7e



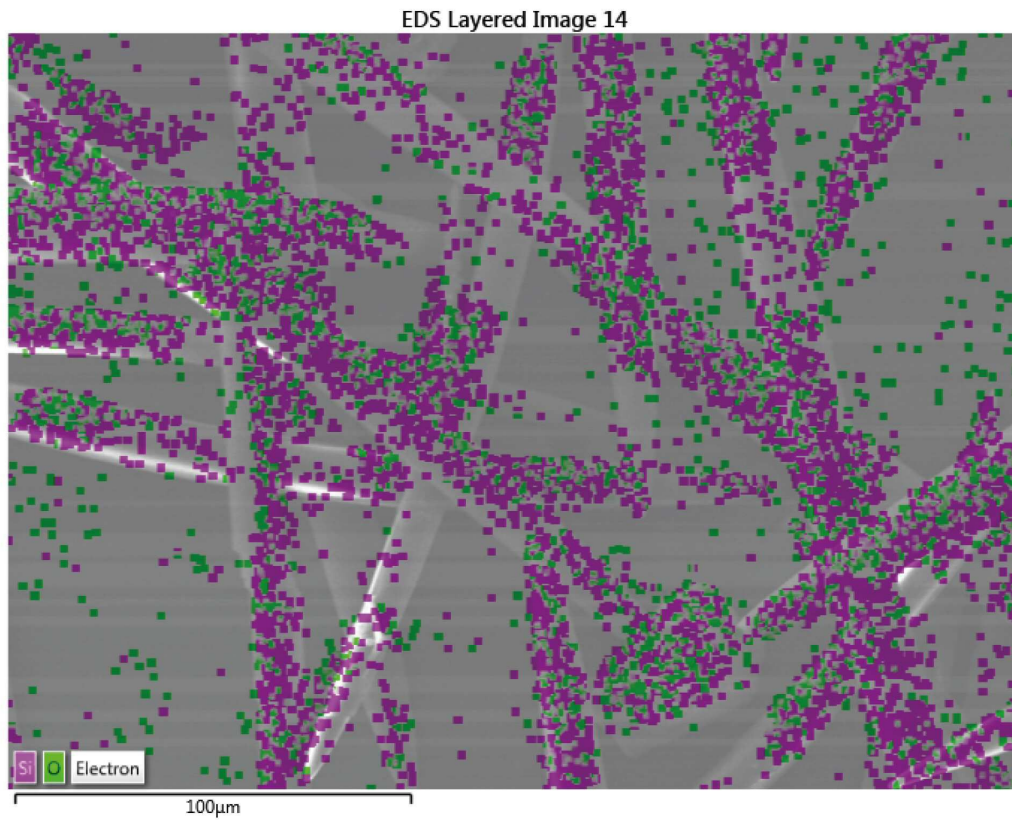
도면7f



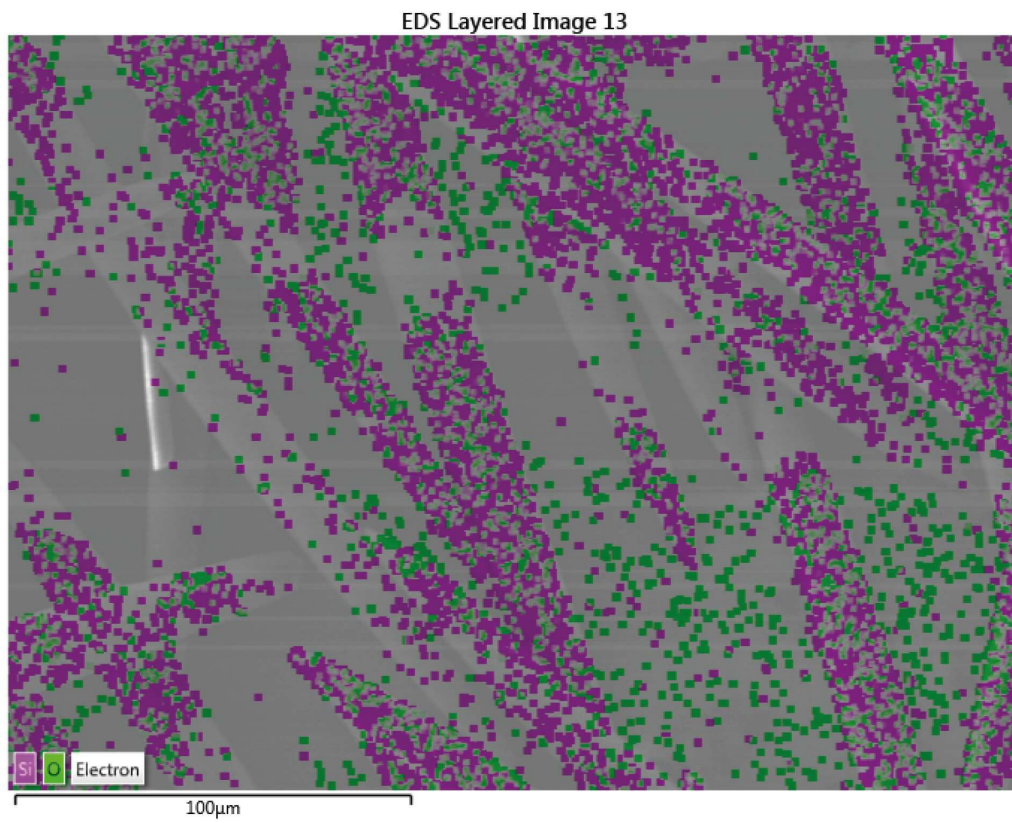
도면7g



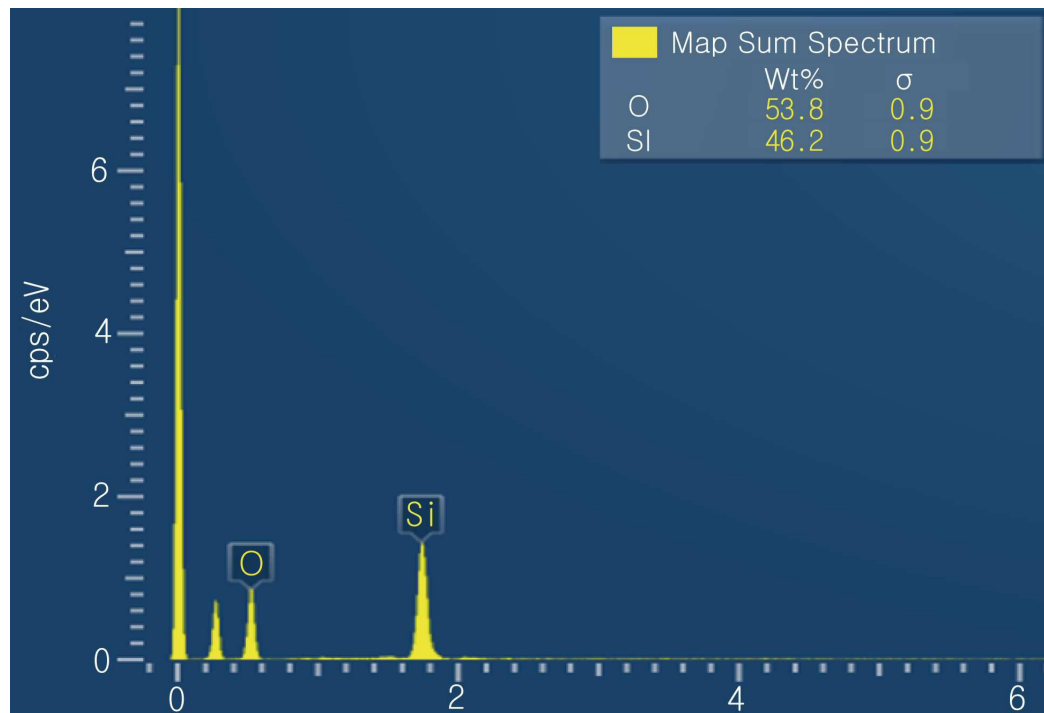
도면7h



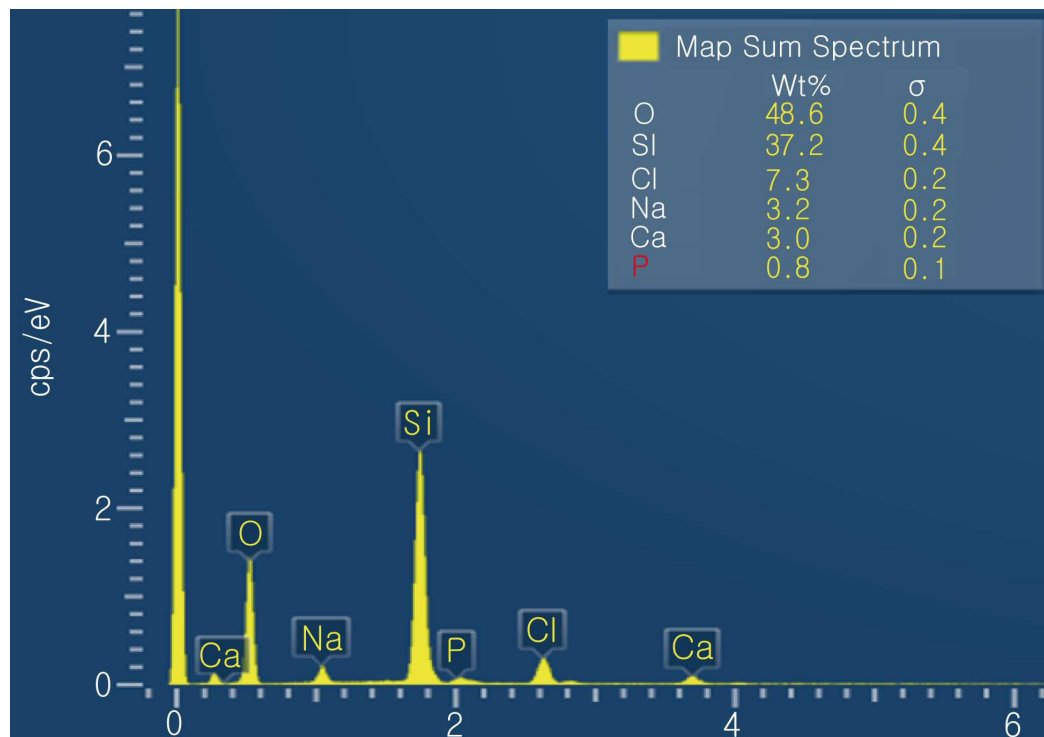
도면7i



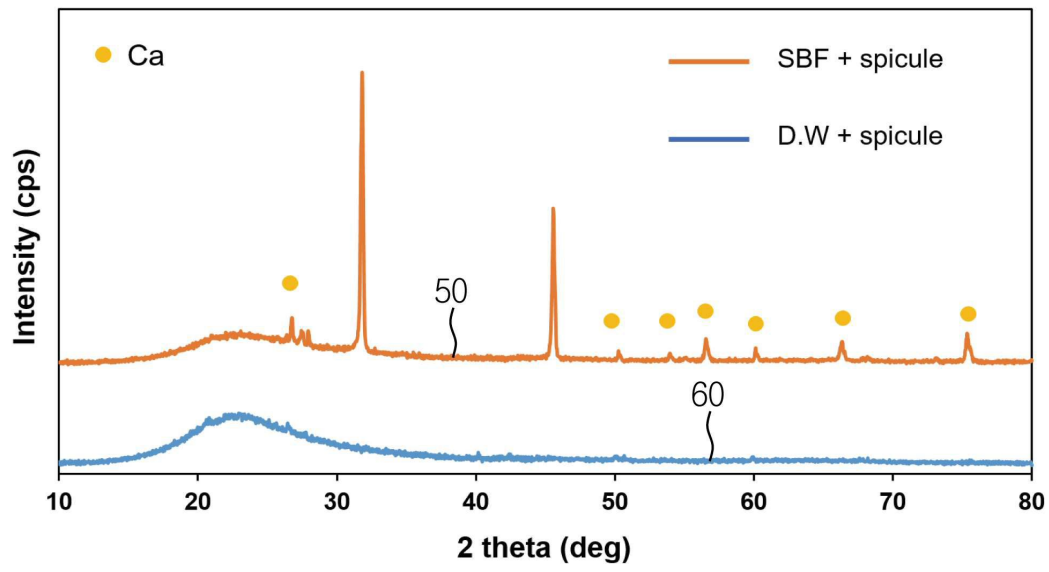
도면8a



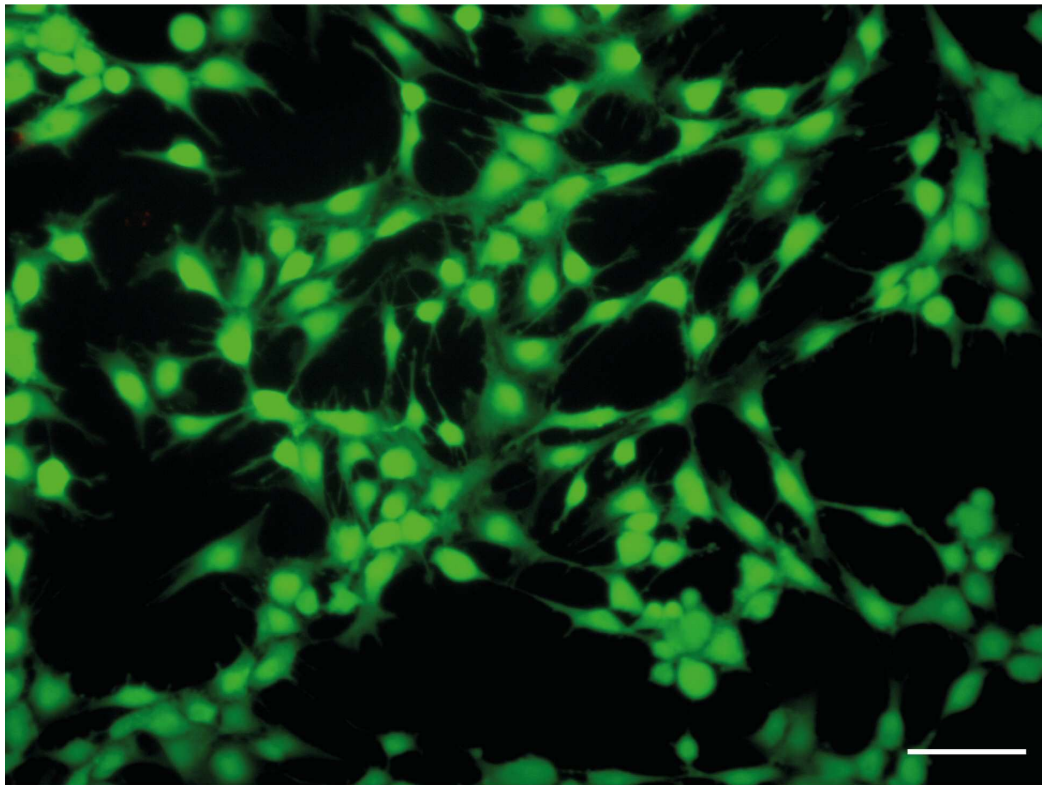
도면8b



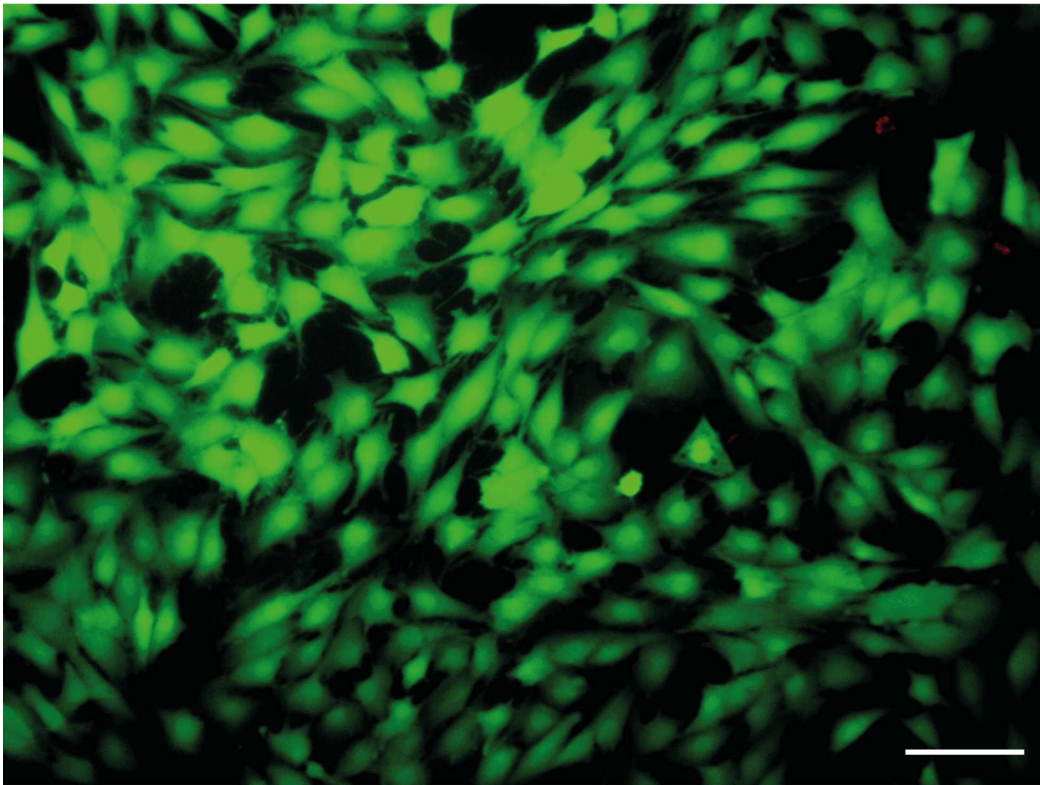
도면9



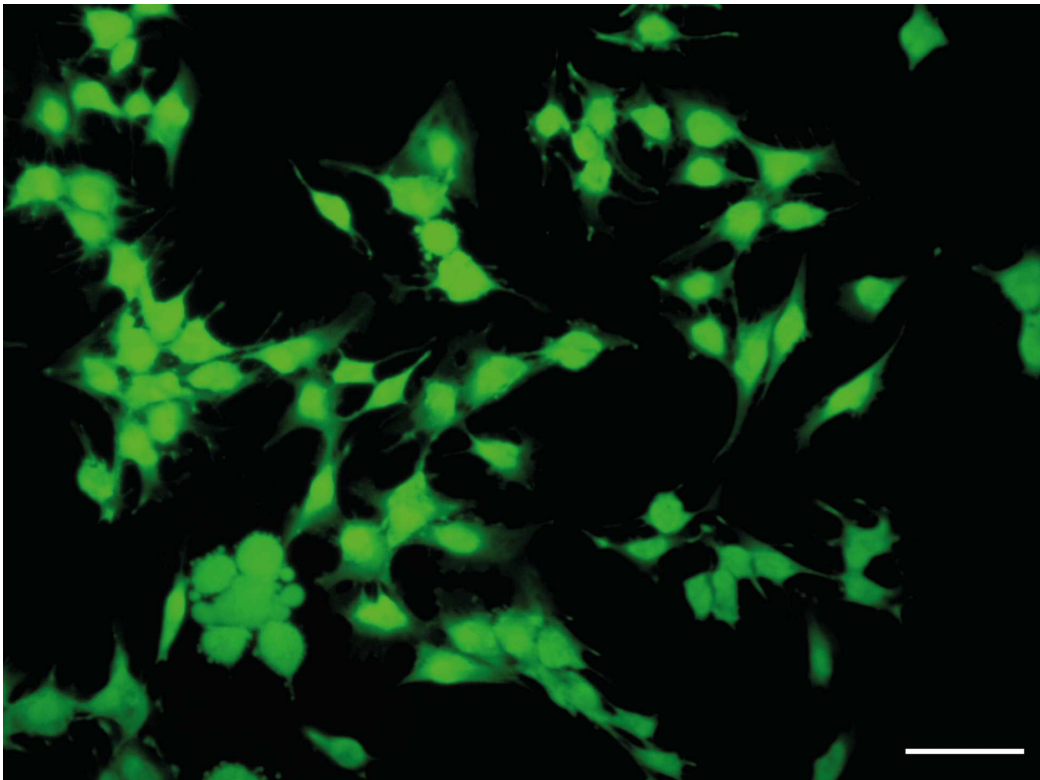
도면10a



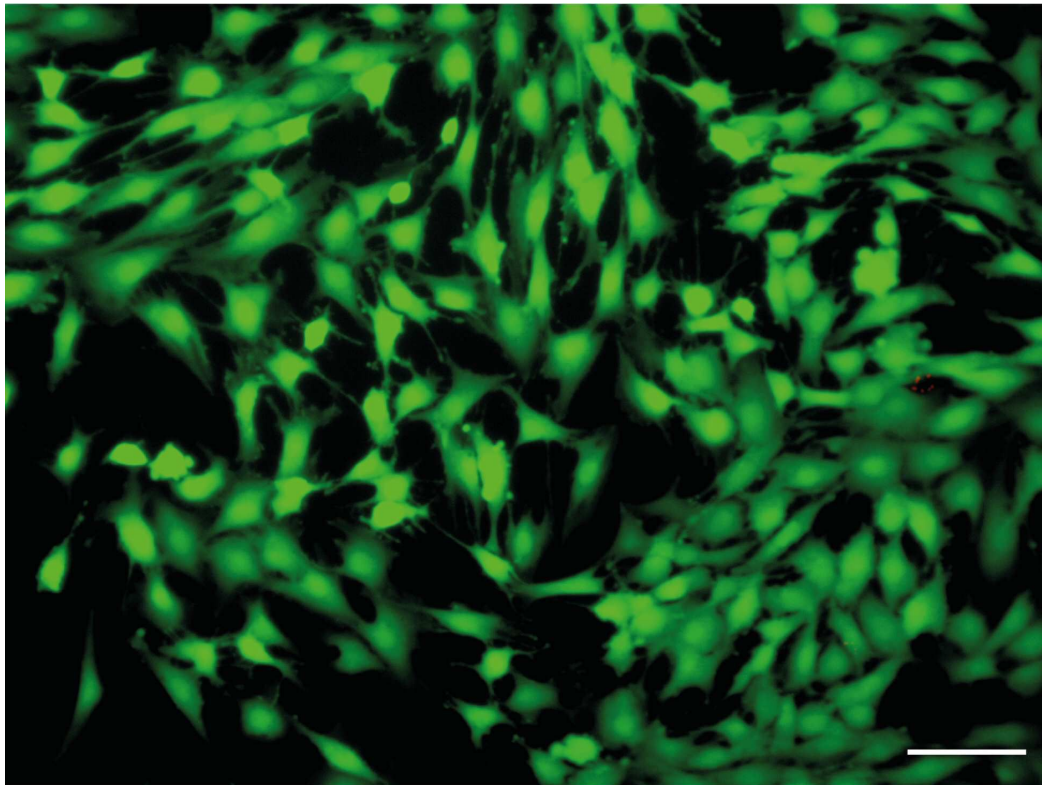
도면10b



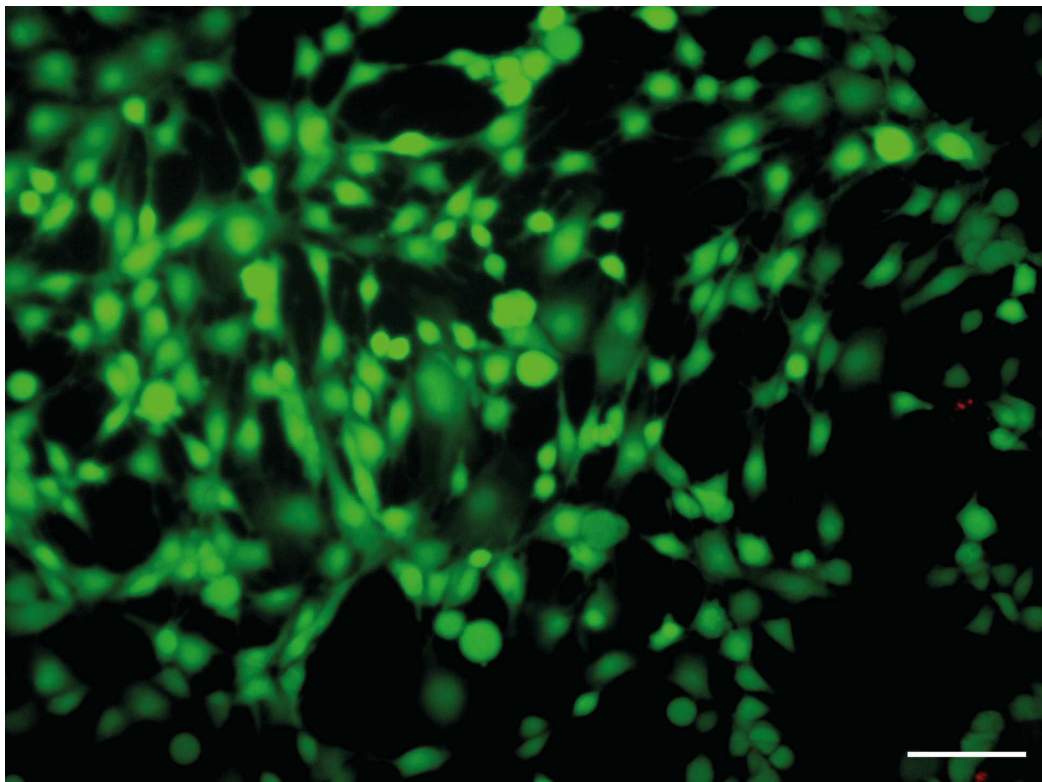
도면10c



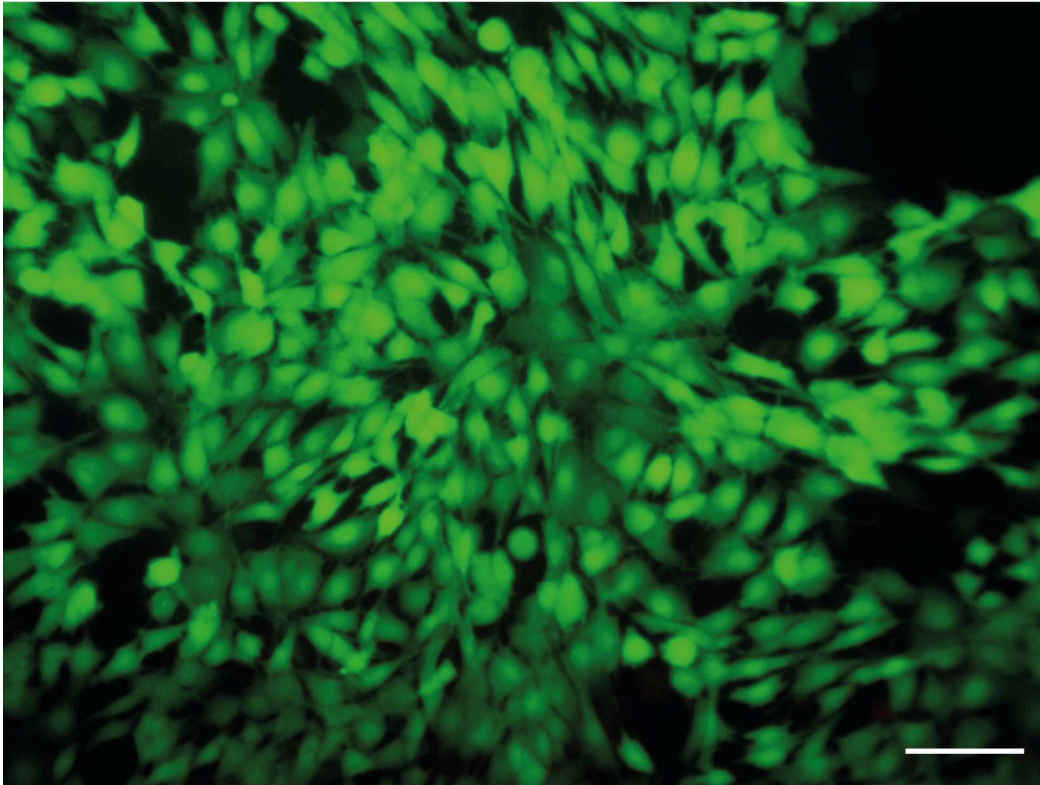
도면10d



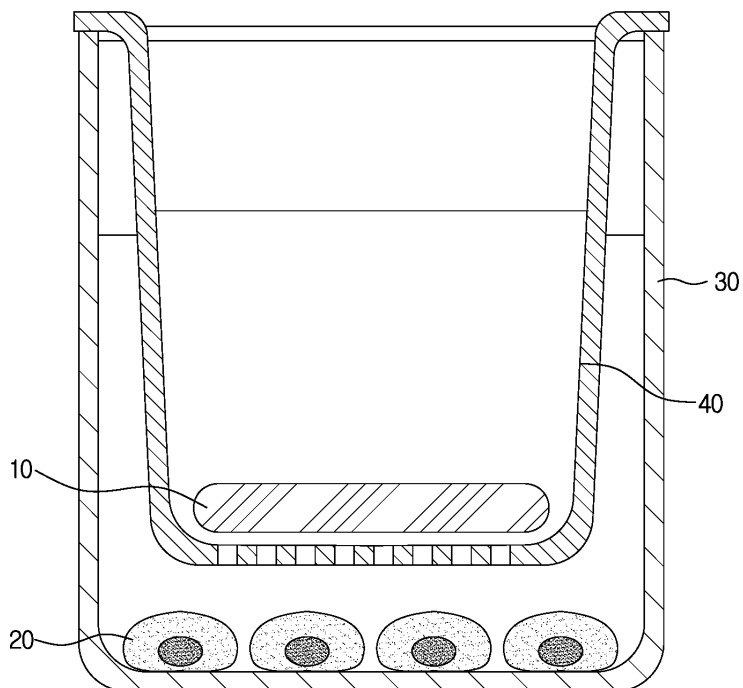
도면10e



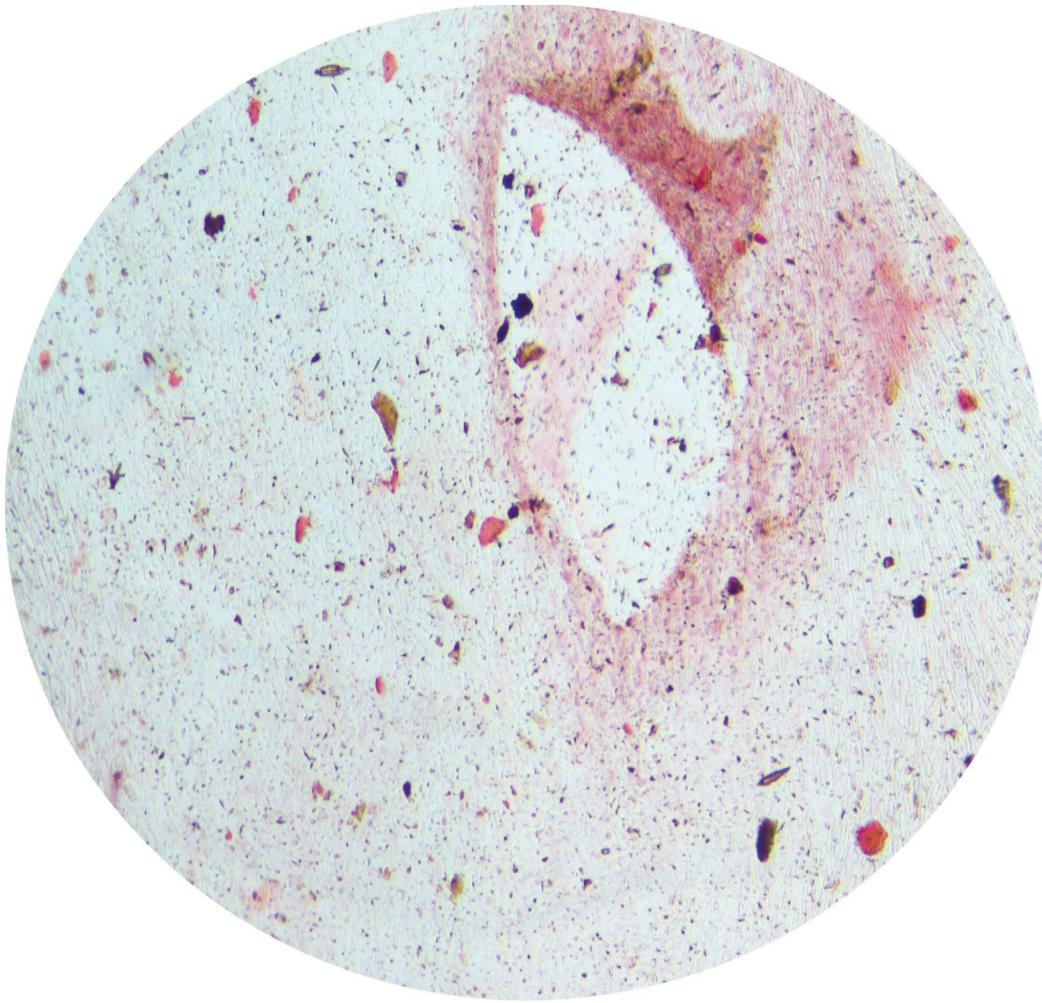
도면10f



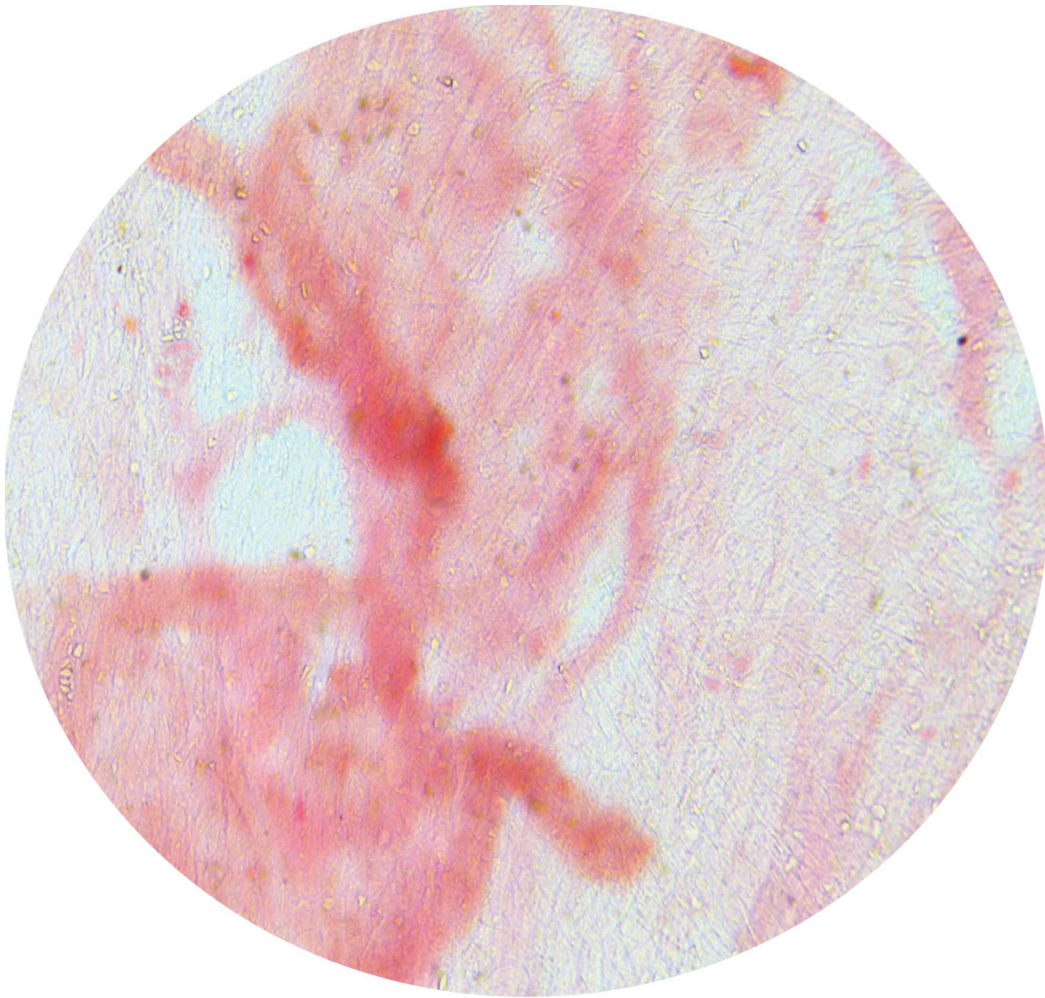
도면11



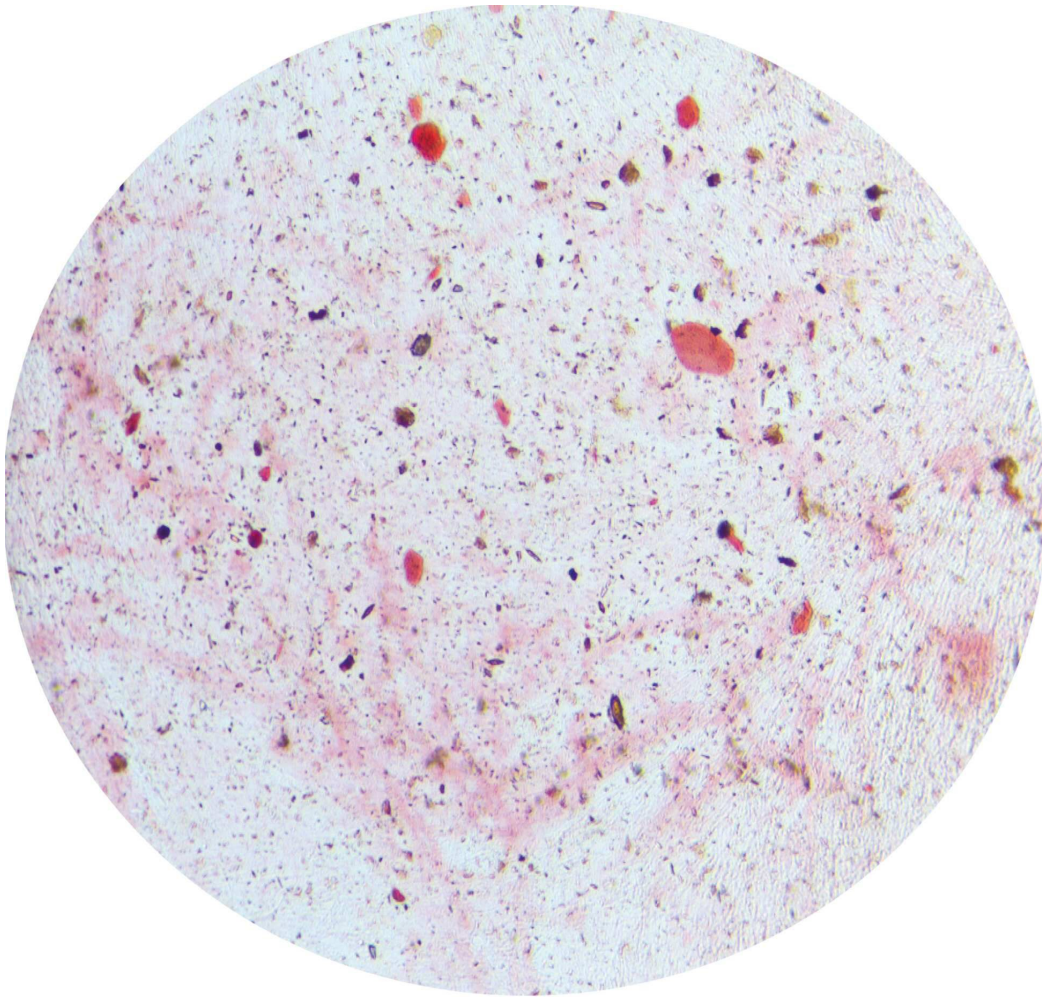
도면12a



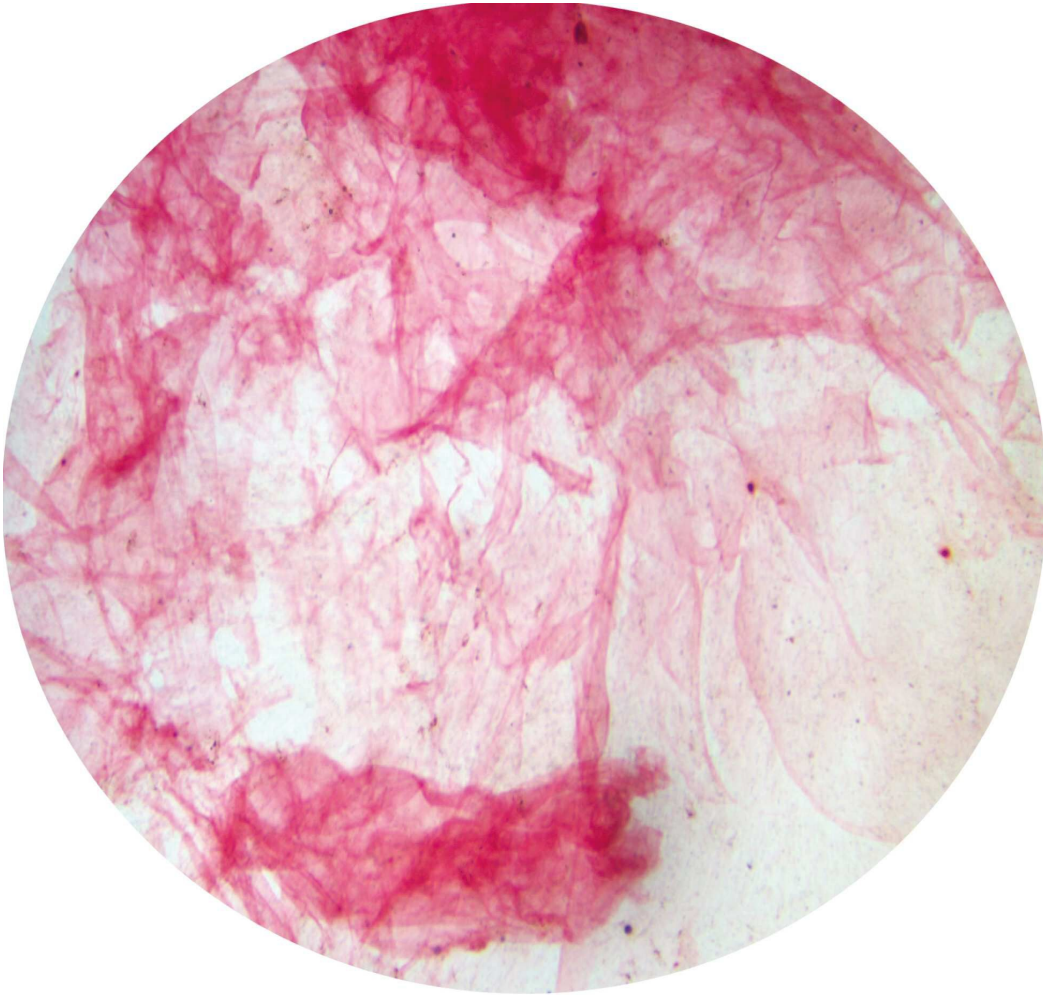
도면12b



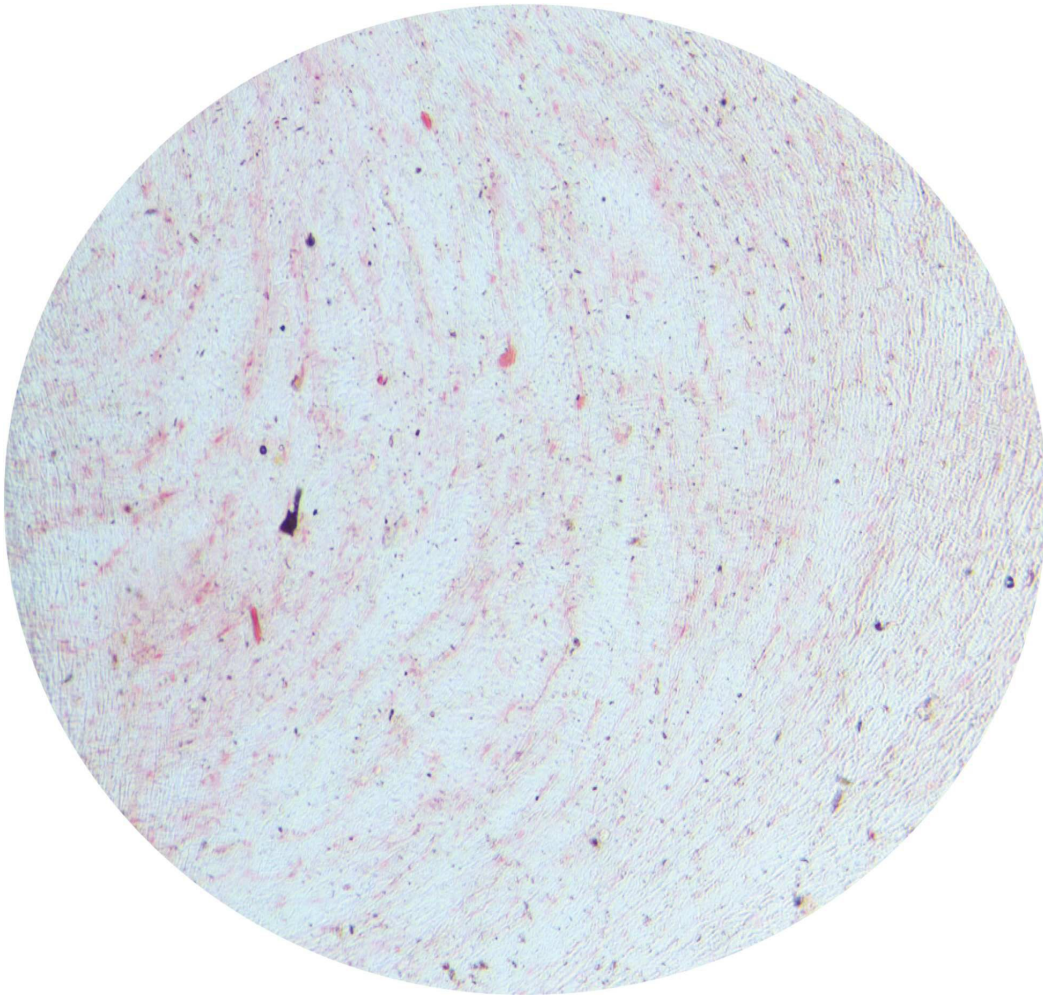
도면12c



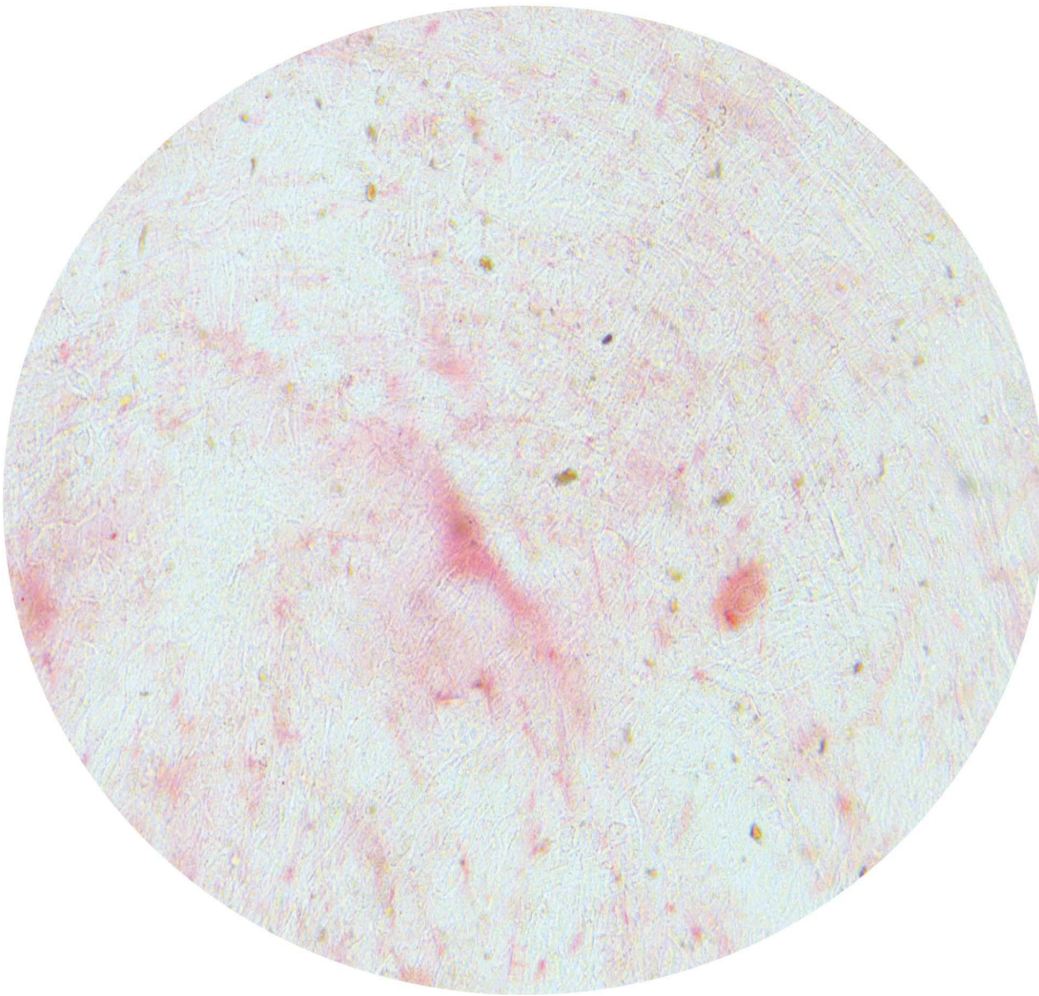
도면12d



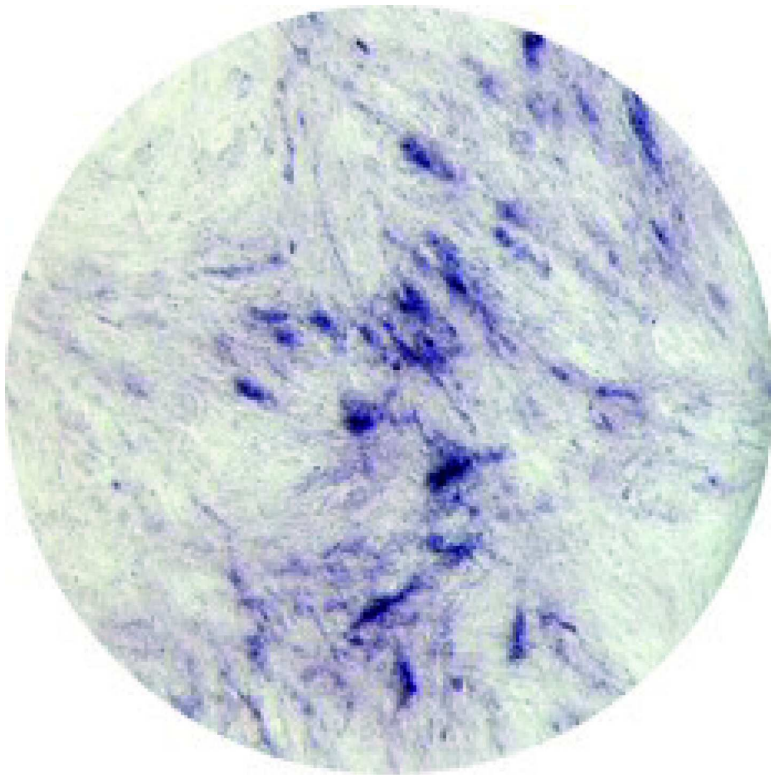
도면12e



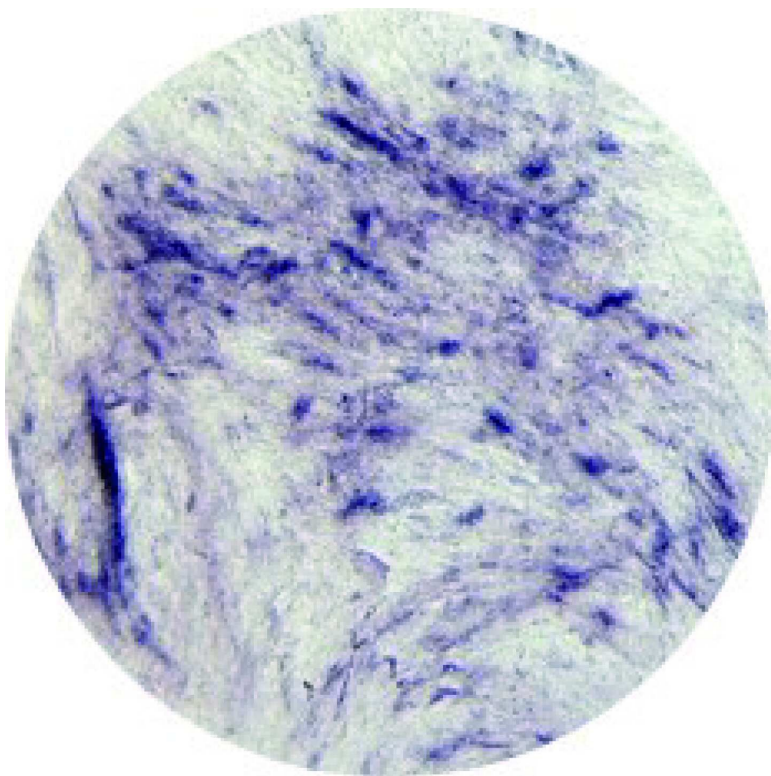
도면12f



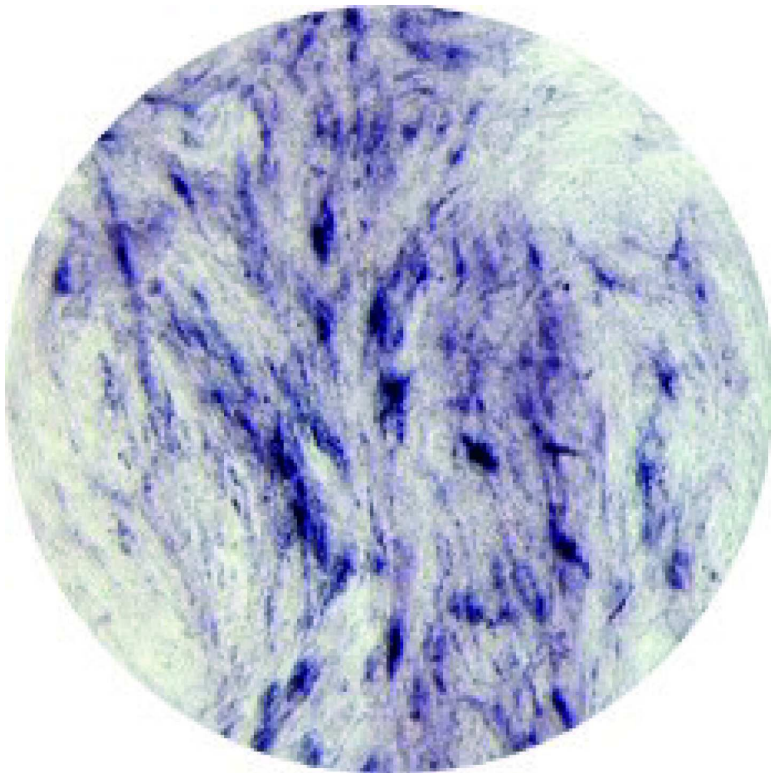
도면13a



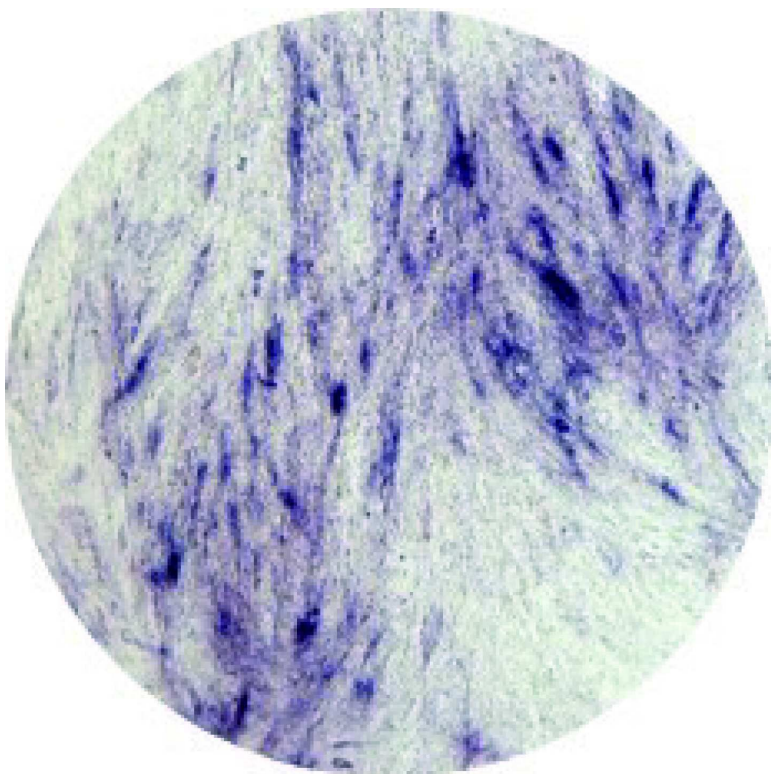
도면13b



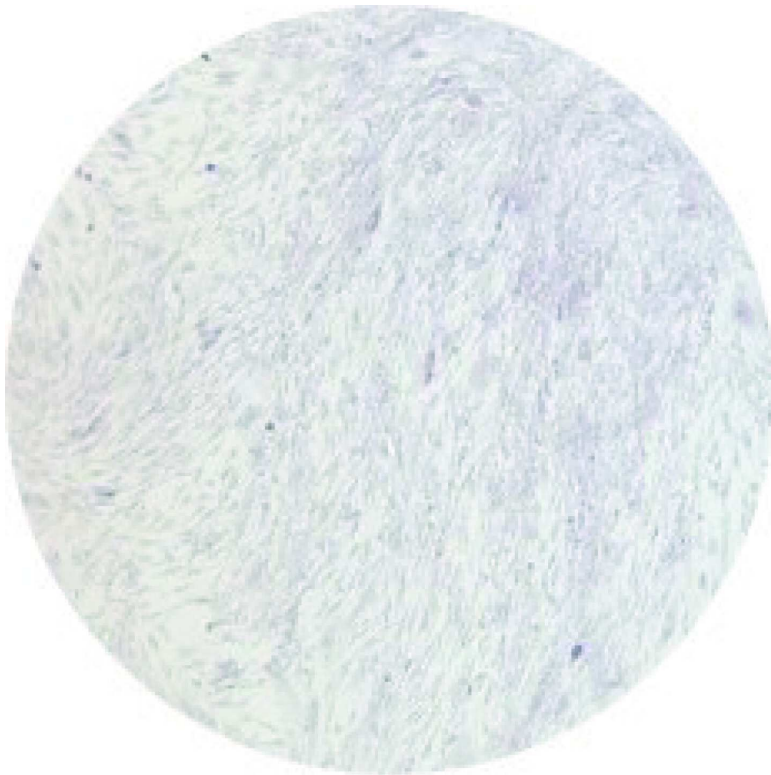
도면13c



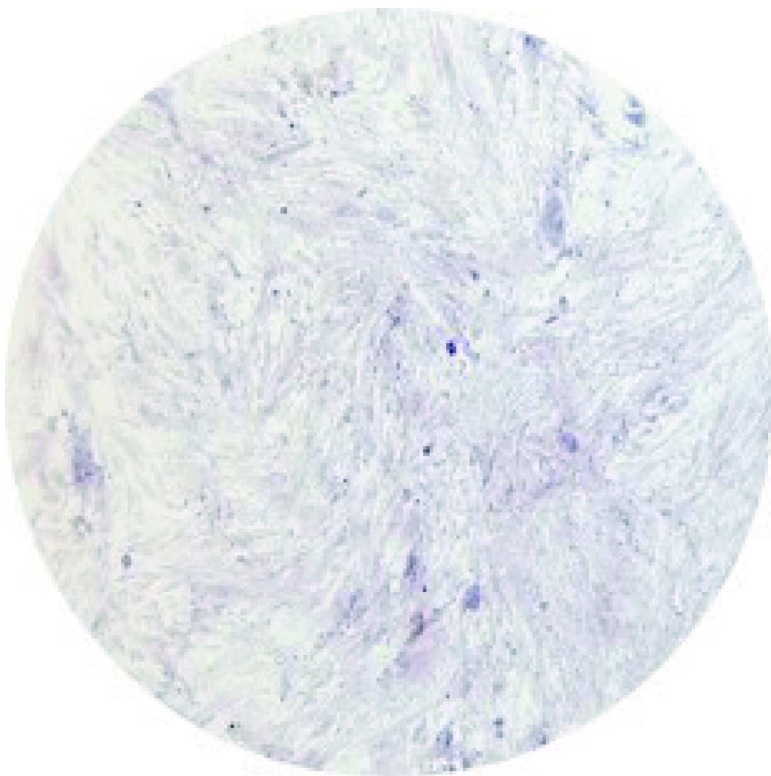
도면13d



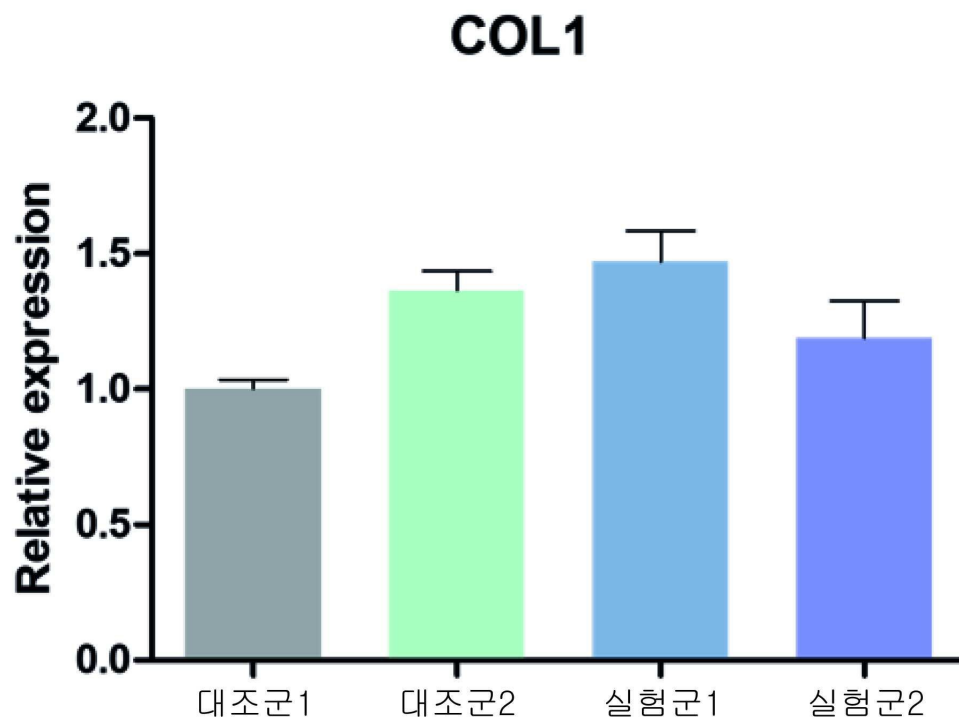
도면13e



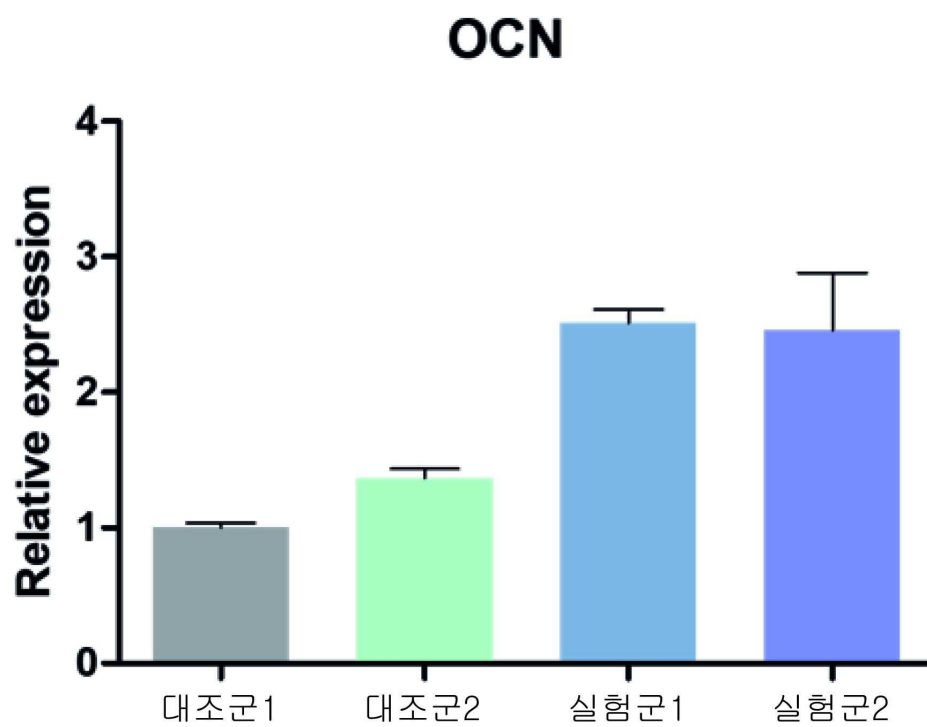
도면13f



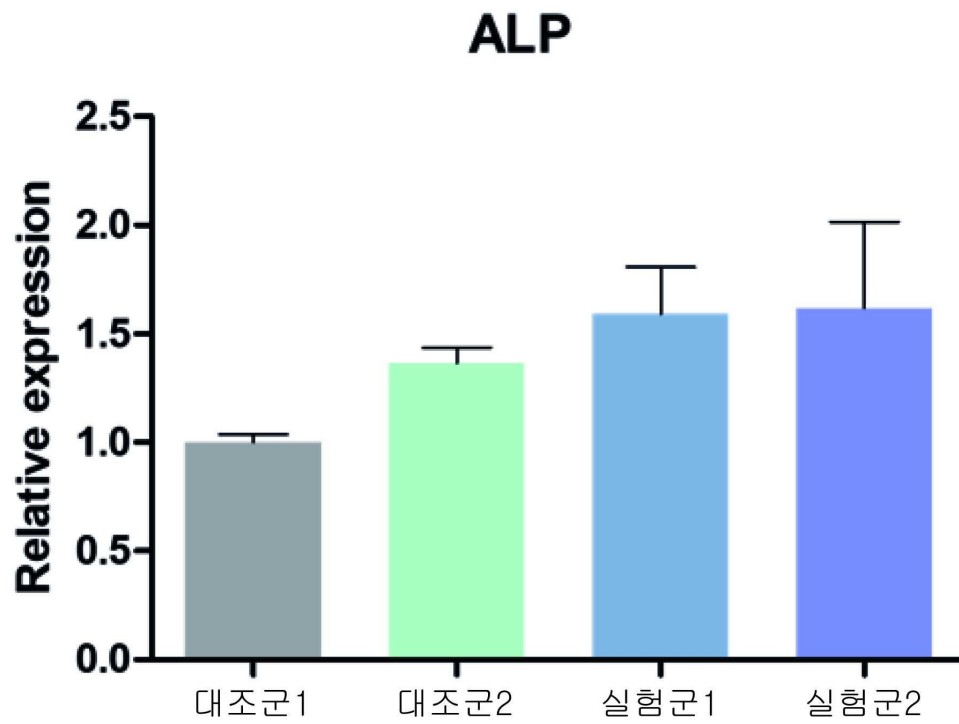
도면14a



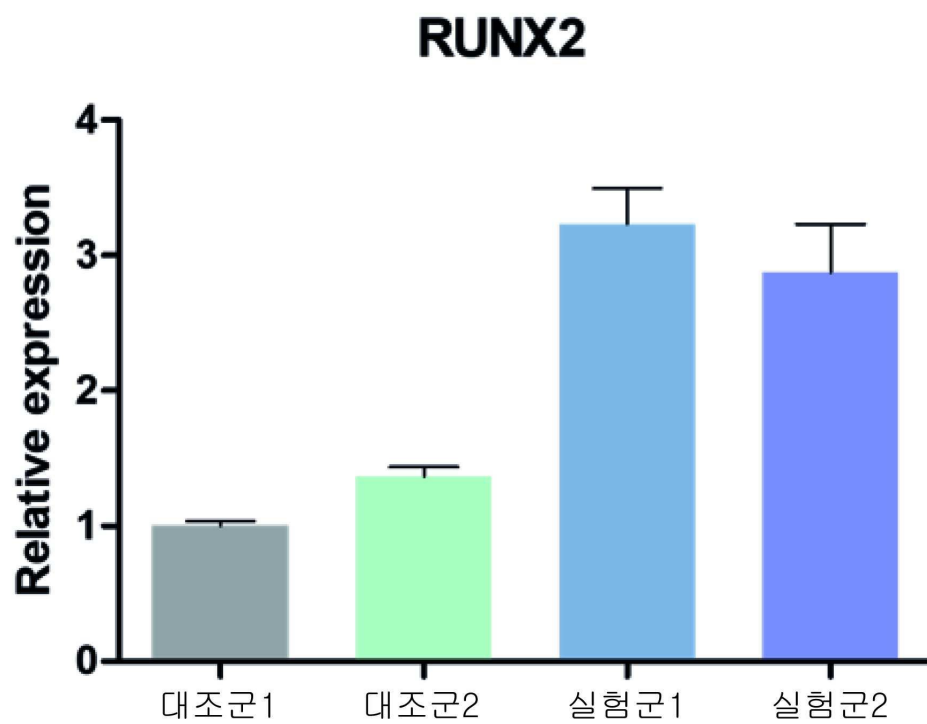
도면14b



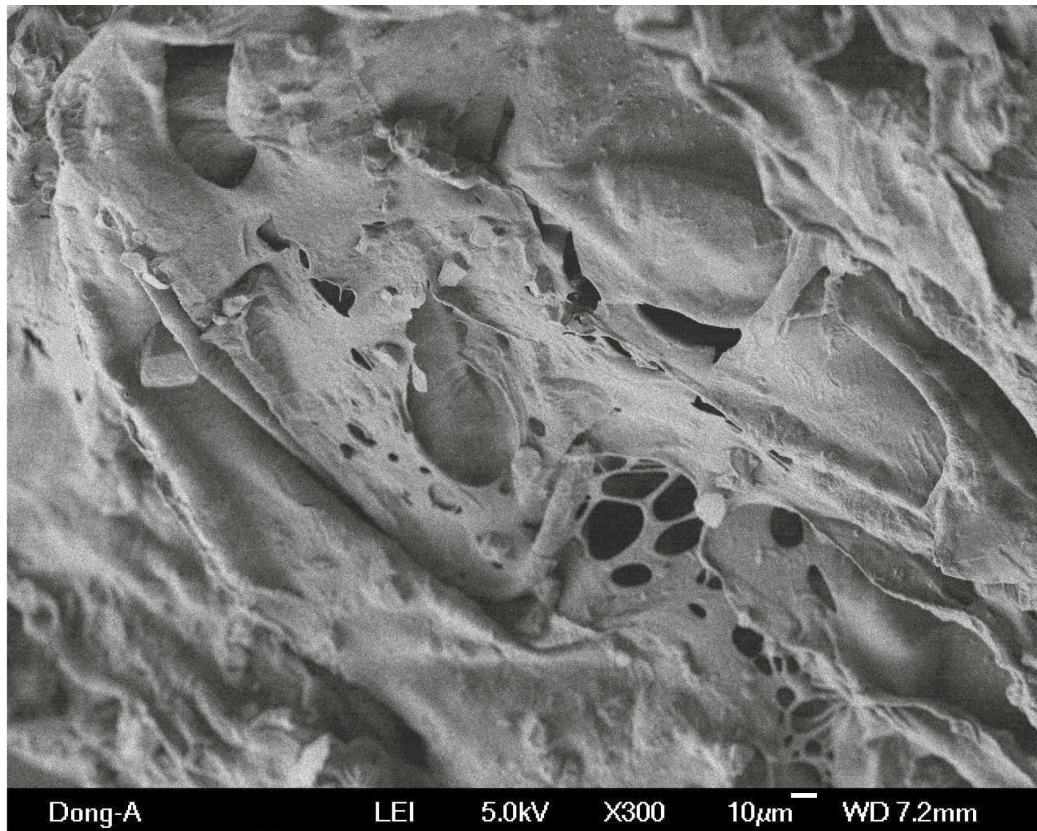
도면14c



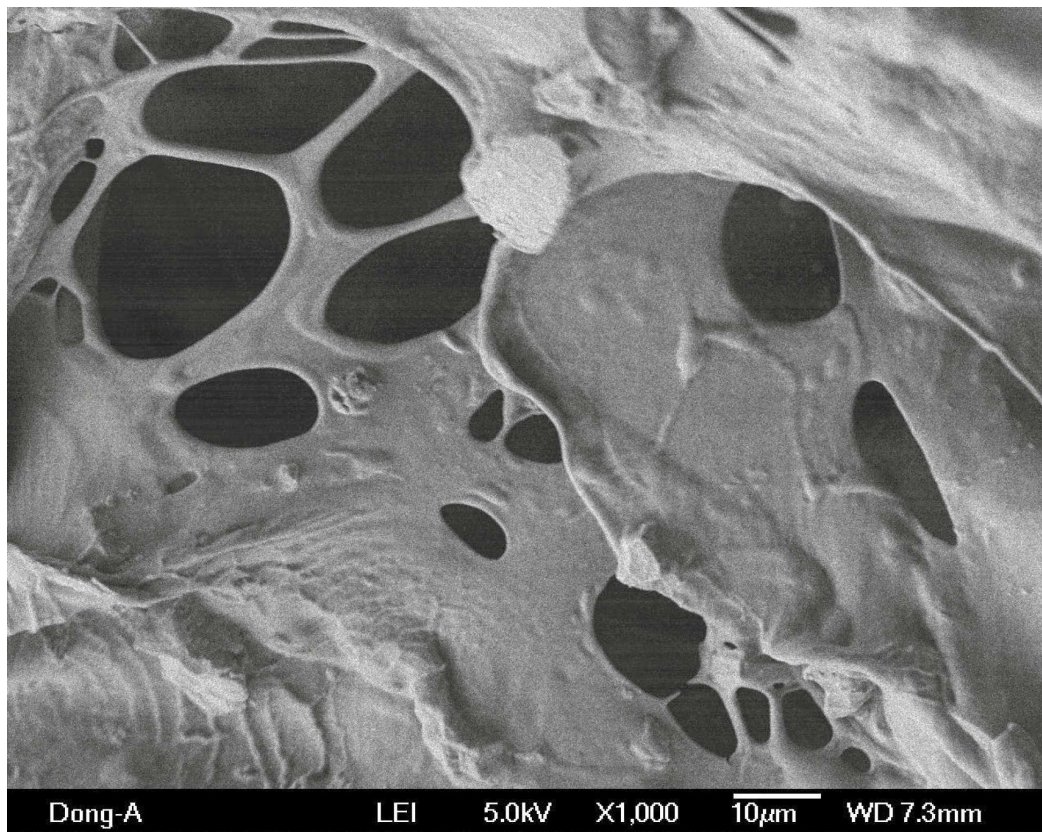
도면14d



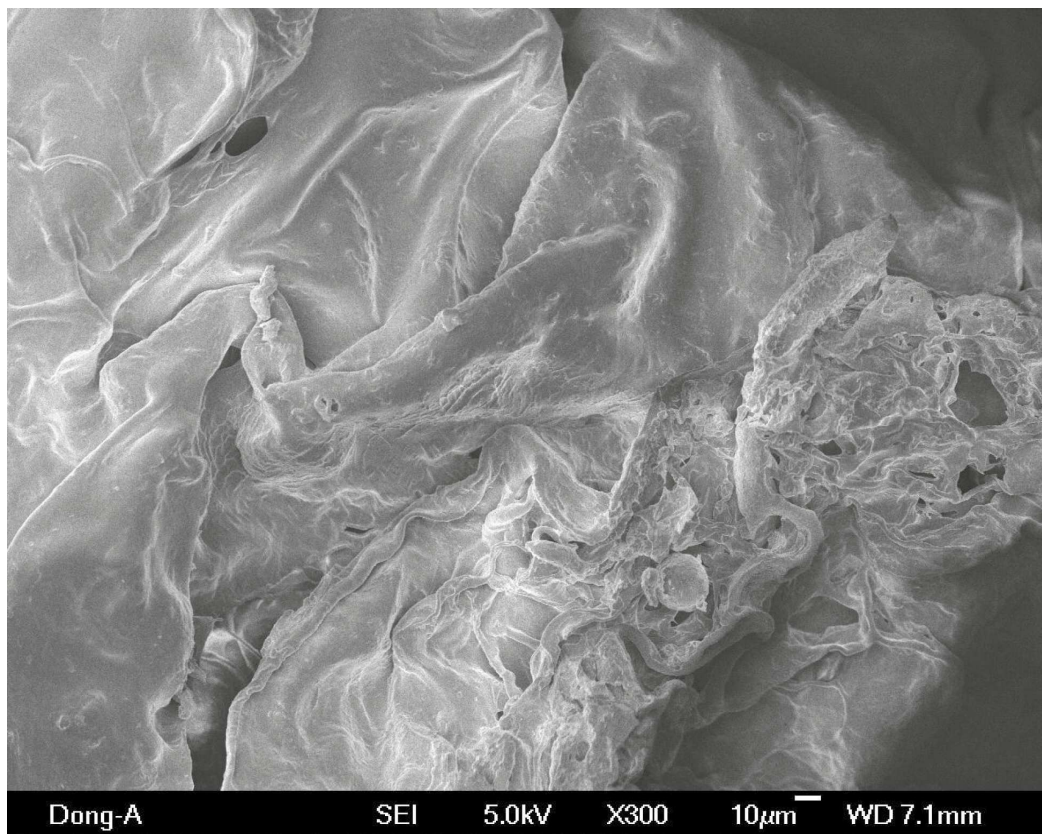
도면15a



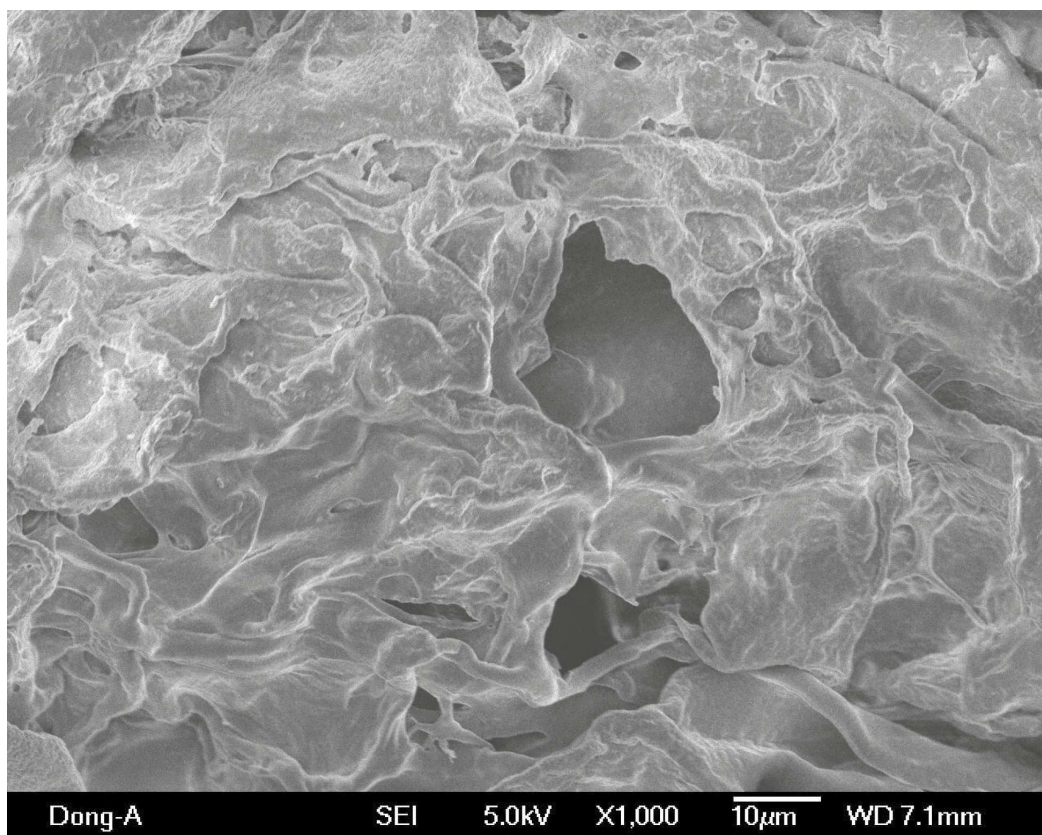
도면15b



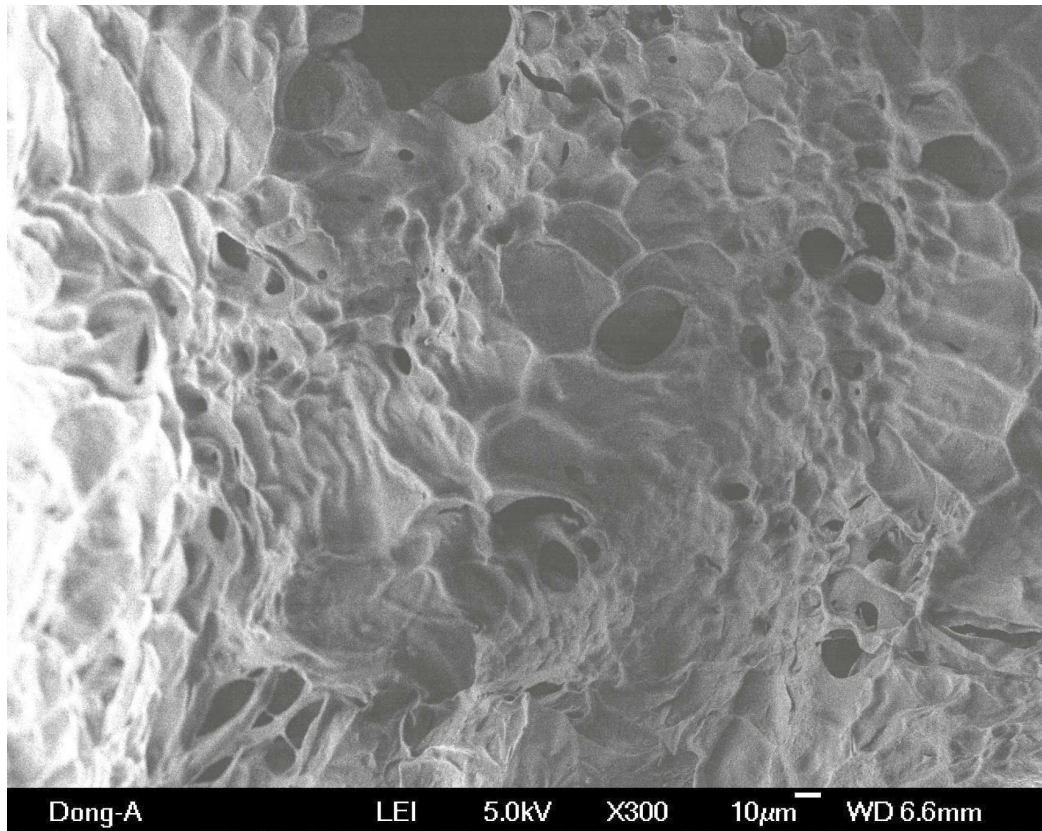
도면15c



도면15d



도면15e



도면15f

