



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월02일
(11) 등록번호 10-1436740
(24) 등록일자 2014년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0057418
(22) 출원일자 2013년05월21일
심사청구일자 2013년05월21일
(56) 선행기술조사문헌
Song, J. H. et al., Journal of Biomedical Materials Research Part A (2008) Vol.84, pp.875-884
Ren, L. et al., Journal of Non-Crystalline Solids (2001) Vol.285, pp.116-122
Rabbany, S. Y. et al., Cell Transplantation (2010) Vol.19, pp.399-408
Ren, L. et al., Biomaterials (2002) Vol.19, pp.4765-4773

- (73) 특허권자
단국대학교 산학협력단
경기 용인시 수지구 죽전로 152, 내 (죽전동, 단국대학교)
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김해원
충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트)
다쉬남, 한드마
충남 천안시 동남구 단대로 119, 약학관 516호 (안서동, 단국대학교천안캠퍼스)
장준혁
인천 연수구 한나루로105번길 68, 404동 902호 (옥련동, 현대4차아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

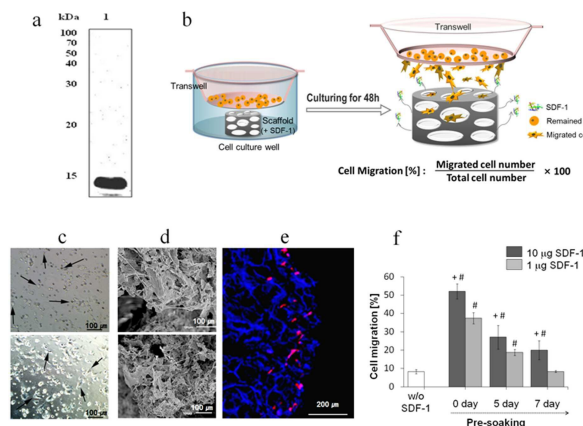
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 SDF-1을 포함하는 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드

(57) 요약

본 발명은 내부에 SDF-1을 포함하는 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드 및 그 제조방법에 대한 것이다. 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 젤라틴과 실록산의 혼합으로 인해 수분 흡수량이 뛰어나며, 체내에서 분해되지 않고 안정하며 기계적 강도가 우수하다. 본 발명 하이브리드 스캐폴드는 내부에 SDF-1을 포함하고 있어, 체내에서 우수한 화학적 물리적 안정성을 유지함과 동시에 SDF-1을 천천히 방출하므로 조직 재생에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090093829

부처명 교육과학기술부

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 젤라틴 용액에, 3-(글리시독시프로필)트리메톡시실란 및 테트라메톡시실란을 첨가하여 졸을 제조하는 단계;
 - 2) 상기 단계 1)의 졸에 산성 용액을 첨가하여 겔화시키는 단계;
 - 3) 상기 단계 2)의 겔을 동결건조하여 다공성 스캐폴드를 제조하는 단계, 및
 - 4) 상기 단계 3)의 다공성 스캐폴드를 SDF-1(stromal derived factor-1)을 포함하는 용액에 침지시켜 상기 다공성 스캐폴드 내부에 SDF-1을 포함시키는 단계;
- 를 포함하는 하이브리드 스캐폴드의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 젤라틴 용액은 물에 젤라틴이 1 중량% 내지 10 중량% 용해된 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 1)에서 제조된 졸의 Si 함량은 졸 전체 중량을 기준으로 하여 2 내지 10 중량% 인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 산성용액은 염산, 인산 및 아세트산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 4)의 SDF-1을 포함하는 용액은, α -MEM(α -Minimum Essential Medium, 알파-최소필수배지), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 돌베코 변형 이글 배지), PBS(Phosphate Buffered saline, 인산염 완충 식염수), HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, 행크 평형 염 용액), 생리식염수 및 증류수로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매에, SDF-1이 10 μ g/ml 내지 100 μ g/ml 용해된 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 하이브리드 스캐폴드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 하이브리드 스캐폴드는 30 μ m 내지 50 μ m의 크기의 기공을 갖는 것을 특징으로 하는 하이브리드 스캐폴드.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 하이브리드 스캐폴드는 85~95%의 공극률을 갖는 것을 특징으로 하는 하이브리드 스캐폴드.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 하이브리드 스캐폴드는 10 KPa 내지 100 KPa의 저장 탄성률, 10 KPa 내지 90 KPa의 손실 탄성률을 갖는 것을 특징으로 하는 하이브리드 스캐폴드.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 하이브리드 스캐폴드는 내부에 SDF-1을 1 μ g 내지 100 μ g 포함하는 것을 특징으로 하는 하이브리드 스캐폴드.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 내부에 SDF-1을 포함하는 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드 및 그 제조방법에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 조직 공학 스캐폴드는 세포의 부착, 증식 및 분화를 위한 3차원 기재로 널리 사용된다. 스캐폴드는 특정 신호전달 분자(signaling molecules)를 포함하고 있으며, 상기 분자를 적절한 분량으로 적절한 시점에 전달해주어, 줄기세포의 표현형을 조절한다. 예를 들어, 단기간에 혈관 신생을 촉진시키는 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 또는 장기간에 걸쳐 중간엽 줄기세포의 골아 세포로의 분화를 증가시키는 뼈 형성단백질(bone morphogenetic protein, BMP-2)과 같은 특정 성장 인자를 포함하는 경우, 뼈 재생이 촉진될 수 있다. 또한 재생 과정에서, 다수의 세포들이 스캐폴드 또는 결함 위치(defect site)에 동원(recruit)되고 혼합되는 것이 바람직하다. 따라서 스캐폴드 내로 세포의 혼합 과정 중, 초기의 세포 동원을 향상시키기 위하여 통상 케모킨으로 불리는 주화성 신호전달 분자(chemotactic signaling molecules)를 이용한다.

[0003] chemokine stromal derived factor-1(SDF-1)은 MSCs에 주화성이며, 세포 운동성과 관련된 유전자의 발현을 촉진하기 때문에 주목받고 있다. 이는 또한 결함 위치에 내피전구세포(endothelial precursors)를 동원하여 세포 재생을 증가시키며, MSCs를 스캐폴드 내부로 유도한다. 따라서 이식 후 세포를 모집할 수 있는 능력을 갖는 스캐폴드는, 일정 시간 동안 신호 전달 분자를 방출할 수 있도록 설계되어야 한다. 골 형성을 위한 적절한 환경의 제공과 함께, 세포 부착이나 성장과 관련된 다른 부가적인 인자 역시 요구된다. 따라서, 높은 생체 적합성 및 생분해성을 가지는 천연 고분자, 예를 들어 젤라틴, 콜라겐, 키토산 등이 뼈 조직 재생에 있어서 널리 사용되어 왔다.

[0004] 그러나 높은 생분해성은 이식 후 단시간 내 생활성(bioactive) 인자를 빠르게 방출하는 이점이 있지만, 기질 동역학의 급격한 변화로 인해 세포 부착 및 확산이 급격히 감소하므로 새로운 뼈 형성을 지연시킨다. 천연 고분자에 무기 물질을 포함시키는 것은 분해 문제를 해결할 뿐만 아니라 기계적 성질 및 경조직의 생물학적 가능성(biological potential)을 증가시키기 위한 해결책으로 널리 알려져 왔다. 졸겔법은 천연 고분자 내로 무기 물질을 하이브리드화 시키기 위한 가장 효과적인 방법이다. 졸겔법은 온화한 반응 조건에서 반응가능하며, 제조 공정동안 스캐폴드 내부로 생물학적 인자를 안전하게 포함시킬 수 있다. 졸겔 접근법에서, 천연 고분자에 네트워킹 되는 실록산-기반 무기물 성분의 조성 범위가 연구되어 왔다. 이때 Si의 소스로는, 트리메틸 오소실리케이트, 테트라에틸 오소실리케이트(TEOS)와 같은 Si-알콕사이드, 또는 실란기를 포함하는 것들이 널리 사용되어 왔다.

[0005] 이에 본 발명자들은 수성 조건에서 안정하면서도 뼈 재생을 촉진시킬 수 있는 스캐폴드의 제조방법에 대하여 연구하던 중, Si 기반의 수성 용액에 젤라틴을 도입하여 졸겔법으로 스캐폴드를 제조하고, 스캐폴드 내부에 SDF-1

분자를 포함시키는 경우, 젤라틴과 실록산의 가교결합에 의해 스캐폴드의 안정성이 증가하고 수성 조건에서의 분해가 억제되며, 내부에 포함된 SDF-1에 의해 뼈 재생이 촉진됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은, 1) 젤라틴 용액에, 3-(글리시독시프로필)트리메톡시실란 및 테트라메톡시실란을 첨가하여 졸을 제조하는 단계, 2) 상기 단계 1)의 졸에 산성 용액을 첨가하여 겔화시키는 단계, 3) 상기 단계 2)의 겔을 냉각 및 동결건조하여 다공성 스캐폴드를 제조하는 단계, 및 4) 상기 단계 3)의 다공성 스캐폴드를 SDF-1을 포함하는 용액에 침지시켜 스캐폴드 내부에 SDF-1을 포함시키는 단계를 포함하는 하이브리드 스캐폴드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 상기 제조방법으로 제조된 하이브리드 스캐폴드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 1) 젤라틴 용액에, 3-(글리시독시프로필)트리메톡시실란 및 테트라메톡시실란을 첨가하여 졸을 제조하는 단계, 2) 상기 단계 1)의 졸에 산성 용액을 첨가하여 겔화시키는 단계, 3) 상기 단계 2)의 겔을 동결건조하여 다공성 스캐폴드를 제조하는 단계, 및 4) 상기 단계 3)의 다공성 스캐폴드를 SDF-1을 포함하는 용액에 침지시켜 스캐폴드 내부에 SDF-1을 포함시키는 단계를 포함하는 하이브리드 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은, 젤라틴과 실록산을 포함하는 졸을 이용하여 졸겔법으로 스캐폴드를 제조하고 내부에 SDF-1을 포함시키는 경우, 젤라틴과 실록산의 가교결합(Si-O-Si)에 의해 스캐폴드의 화학적, 기계적 안정성이 증가하고, 체내에서 급격한 분해없이 SDF-1을 서서히 방출시켜 조직 재생에 유용하게 사용할 수 있음을 발견한 것에 기초한다.

[0010] 통상 조직공학에 사용되는 스캐폴드는, 생체 적합성 및 생분해성을 가져야 하므로 젤라틴 등의 천연고분자가 주로 사용되었다. 그러나 상기 천연고분자로 이루어진 스캐폴드는 체내에서 구조를 오랫동안 유지하지 못하는 문제점이 있었다. 본 발명은 젤라틴 스캐폴드에 Si를 첨가하여, 물리적 및 화학적 안정성을 개선하였을 뿐만 아니라, 상기 하이브리드 스캐폴드 내부에 SDF-1을 포함시켜 SDF-1을 천천히 방출시킴으로써 조직 재생을 촉진하였다.

[0011] 본 발명의 단계 1)은 젤라틴 용액에, 3-(글리시독시프로필)트리메톡시실란 및 테트라메톡시실란을 첨가하여 졸을 제조하는 단계이다. 상기 단계 1)의 젤라틴 용액은 물에 젤라틴이 1 내지 10 중량% 용해되어 있는 용액일 수 있다.

[0012] 상기 단계 1)의 첨가는 젤라틴 용액을 1 내지 3시간 동안 격렬하게 교반하면서 이루어질 수 있다. 상기 단계 1)에서 제조된 졸의 Si 함량은 졸 전체 중량을 기준으로 하여 2 내지 10 중량% 일 수 있다.

[0013] 본 발명의 단계 2)는 단계 1)의 졸에 산성 용액을 첨가하여 겔화시키는 단계이다. 이때, 산성용액은 염산, 인산 및 아세트산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 1M의 염산 20 마이크로리터를 졸에 첨가하였다. 산성용액의 첨가 후, 겔화가 종결될 때까지 방치한다.

[0014] 상기 졸겔 반응은 3-(글리시독시프로필)트리메톡시실란(GPTMS) 분자에 존재하는 에폭시 링의 가수분해로부터 시작한다. 가수분해는 탄소에 고도로 친전자성인 작용기를 형성하고, 친전자성 작용기는 젤라틴의 친핵성 작용기(예: 아미노기)와 쉽게 반응한다. 실록산의 겔화(gelation)동안, GPTMS/젤라틴의 폴리축중합 반응이 일어나며, -O-Si-O- 네트워크가 형성되고 젤라틴은 스캐폴드에 공유결합으로 연결된다.

- [0015] 테트라메톡시실란(TMOS)은 Si의 함량을 높이는데 기여할 뿐 아니라, 네트워크의 안정성을 증가시킨다. TMOS의 첨가에 의해 폴리축중합 반응후의 GPTMS/젤라틴 복합체에서 안정한 -Si-O-Si- 가 형성되게 된다. TMOS에는 친전자성 탄소가 없기 때문에, 친핵성 젤라틴은 TMOS 분자와 직접 반응하지는 않는다. 대신, GPTMS의 Si-O 기와 결합하게 되고, 그 결과 최종적으로 잘 정렬된 Si-O-Si 네트워크 구조를 이루게 되며, 젤라틴은 구조 사이에 고정(trap)된 형태를 이루게 된다.
- [0016] 본 발명의 단계 3)은 단계 2)의 겔을 동결건조 하여 다공성 스캐폴드를 제조하는 단계이다. 상기 동결건조의 과정 동안, 겔의 수분이 제거되어 다공성 스캐폴드가 완성된다. 단계 동결건조는 -20℃ 내지 -80℃에서, 1 내지 10시간 동안 이루어질 수 있다.
- [0017] 본 발명의 단계 4)는, 단계 3)의 다공성 스캐폴드를 SDF-1을 포함하는 용액에 침지시켜 스캐폴드 내부에 SDF-1을 포함시키는 단계이다. 상기 SDF-1을 포함하는 용액은, α-MEM(α-Minimum Essential Medium, 알파-최소필수배지), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 돌베코 변형 이글 배지), PBS(Phosphate Buffered saline, 인산염 완충 식염수), HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, 헝크 평형 염 용액), 생리식염수 및 증류수로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매에, SDF-1을 10 μg/ml 내지 100 μg/ml 용해시켜 제조할 수 있다.
- [0018] 본 발명 하이브리드 스캐폴드 내부에 포함된 SDF-1은 stromal derived factor-1로, 세포 재생과정에서 골전구(osteoprogenitor)와 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 동원한다. SDF-1은 스캐폴드 내부에 위치한 후, 천천히 지속적으로 방출된다. 본 발명에서 SDF-1은 스캐폴드 내부에 두 가지 방법으로 존재한다. 젤라틴-실록산 네트워크에 느슨히 결합된, 단지 기공 내 포집되기만 한 SDF-1은 급격히 방출된다. 그러나, 이온 결합을 통해 사슬(chain)에 강하게 결합된 SDF-1은 몇 주간 천천히 방출된다.
- [0019] 또한 본 발명은, 상기 제조방법으로 제조된 하이브리드 스캐폴드를 제공한다.
- [0020] 상기 제조방법으로 제조된 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는, 젤라틴과 실록산이 가교결합을 이루고 있으며 내부에 다수의 기공이 존재하고, 기공 내부에 SDF-1이 포함되어 있다. 본 발명의 스캐폴드는 고도로 다공성이며 기공의 크기는 Si의 함량에 따라 달라지는데, Si의 함량이 증가할수록 공극률과 기공크기는 감소한다.
- [0021] 본 발명의 스캐폴드는 30 μm 내지 50 μm의 크기의 기공을 가질 수 있다. 실리카 함량이 증가할수록 기공크기가 감소하여, 2.5중량%의 실리카를 포함한 스캐폴드는 기공 크기가 약 30 μm 이나, 10중량%의 실리카를 포함한 스캐폴드는 기공크기가 약 50 μm이다.
- [0022] 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 85~95%의 공극률을 가질 수 있다. 이러한 높은 공극률 때문에 본 발명의 스캐폴드는 수분 흡수 용량이 크다. 본 발명에서, 실리카의 함량이 커질수록 팽윤의 정도는 낮아진다. 즉 스캐폴드에 실리카가 많이 함유되어 있을수록, 실록산과 젤라틴간에 형성된 결합의 수가 증가하고, 강한 결합에 의해 수분 흡수 용량은 감소한다.
- [0023] 젤라틴으로만 이루어진 스캐폴드는 몇 분내에 물에 완전히 용해되고, 화학물질을 이용하여 일반적인 가교결합을 형성할 수 없다. 따라서, 조직 재생 중 세포의 내부성장 및 이동을 위해서는, 스캐폴드가 수분을 적절히 흡수하고 팽윤하는 것이 매우 중요하다. 본 발명의 경우 실록산으로 인해 하이브리드 스캐폴드에 가수분해 안정성이 부여되고, 체내에서 수분에 의해 쉽게 분해되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 실록산의 첨가에 의해 향상된 기계적 강도를 갖는다. 기계적 강도는 실록산의

첨가량이 증가할수록 증가한다. 일정 범위 진동수의 동적 모드에서, 실록산이 포함된 스캐폴드는 실제 뼈 조직과 비슷한 수준의 저장 및 손실 탄성률을 갖는다. 따라서, 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 조직 재생용으로 사용하기에 적합하다. 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 10 KPa 내지 100 KPa의 저장 탄성률, 10 KPa 내지 90 KPa의 손실 탄성률을 가질 수 있다.

[0025] 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 내부에 SDF-1을 1 μ g 내지 100 μ g 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명 하이브리드 스캐폴드는 SDF-1을 10 μ g 이상 포함할 수 있다. SDF-1의 포함량이 많을수록, 체내에서 지속적인 세포 이주를 촉진할 수 있다. SDF-1을 포함하지 않거나 1 μ g 미만으로 미량 포함한 경우, 체내에서 시간이 경과시 세포 이주를 촉진하기에 충분한 양의 주화성 신호를 유지하지 못하지만, 충분한 양의 SDF-1을 포함한 경우 세포 이주를 지속적으로 촉진할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 하이브리드 스캐폴드는 젤라틴과 실록산의 혼합으로 인해 수분 흡수량이 뛰어나며, 체내에서 분해되지 않고 안정하며 기계적 강도가 우수하다. 본 발명 하이브리드 스캐폴드는 내부에 SDF-1을 포함하고 있어, 체내에서 우수한 화학적 물리적 안정성을 유지함과 동시에 SDF-1을 천천히 방출하므로 조직 재생에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드의 Si 함량에 따른 SEM morphology 및 porosity를 나타낸 것이다(a: 2.5% Si, b: 5% Si, c: 10% Si)

도 2는 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드의 화학 결합 구조를 보여주는 FT-IR 스펙트럼이다.

도 3은 Si 함량에 따른 본 발명 젤라틴-실록산 하이브리드 스캐폴드의 (a) 수분 흡수 용량, (b) PBS에서의 분해 정도를 나타낸 그래프이다(*표시는 현저한 차이를 의미, $p < 0.05$)

도 4는 본 발명 하이브리드 스캐폴드를 1.5 SBF에 침지시켰을때의 아파타이트 형성 능력을 나타낸 것으로, (a) BSG10을 1,3,7일간 침지시킨 후의 SEM morphology, (b) XRD 패턴(위에서부터 BSG2.5, BSG5, BSG10), (c) EDS 분석 결과(위에서부터 BSG2.5, BSG5, BSG10)이다.

도 5는 본 발명 하이브리드 스캐폴드의 기계적 특성을 분석한 결과로, (a) 일정 압력하에서 시간에 따른 strain, (b) 저장 탄성률, (c) 손실 탄성률을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명 각 스캐폴드에서 시간에 따른 Cytochrome C의 방출을 나타낸 것이다.

도 7의 (a)는 웨스턴 블랏에 의한 SDF-1의 재조합 확인, (b) SDF-1을 포함 BSG10 하이브리드 스캐폴드에 대한 세포 이동 시험 개략도, (c) 트랜스웰의 위쪽 표면에 남아있는 세포 morphology의 위상차 분석, (d) 스캐폴드로 이주한 세포의 SEM morphologies, (e) 스캐폴드로 이주한 세포에 대한 단면 형광 이미지, (f) 각 1 μ g, 10 μ g의 SDF-1을 포함하는 스캐폴드를 배지에 각각 5일 및 7일 미리 침지시킨 후의 세포 이주를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] **실시예 1: 하이브리드 스캐폴드의 제조**

[0030] 하이브리드 용액의 시약으로, 젤라틴(B 타입, bovine, Sigma), 3-(glycidoxypopyel) trimethoxysilane (GPTMS) (98%, Aldrich) 및 테트라메톡시실란(TMOS, Aldrich)을 사용하였다.

[0031] 젤라틴을 5 wt%의 농도로 물에 녹인 후, 1 내지 3시간 동안 격렬하게 교반하면서 GPTMS와 TMOS를 첨가하여 하

브리드 졸을 형성하였다. 포함된 Si의 비율은 각각 2.5, 5 및 10 중량 %이었으며, 각각 2,5BSG, 5BSG 및 10BSG로 명명하였다. 졸겔 반응의 촉매로서, 20 마이크로리터의 HCl(1M)을 슬러리에 첨가하고 겔화(gelation)가 종결되도록 밤새 방치하였다. 샘플을 -20℃에서 3시간 동안 냉각하고 24시간 동안 동결건조하여(Freeze-dryer, Ilshin lab Co., LTD) 슬러리의 물을 완전히 제거하고 다공성 스캐폴드를 완성하였다.

[0032] 실시예 2: 스캐폴드 특성 분석

[0033] 상기 실시예 1에서 제조한 스캐폴드를 금으로 코팅한 후, SEM(SEM; JSM6330F, JEOL)을 사용하여 모폴로지를 분석하였다. 샘플의 다공성은 에탄올의 흡수량으로 측정하였다. 샘플을 에탄올에 침지시킨 후, 증가한 무게를 측정하고, 측정된 무게를 차지하는 부피(다공성)로 변환하였다.

[0034] SEM에 의해 관찰된 하이브리드 스캐폴드의 다공성 구조를 도 1a(2,5BSG), 1b(5BSG), 1c(10BSG)에 나타내었다. 모든 스캐폴드에서 대다수의 기공들은 서로 연결되어 있었다. 2.5 및 5%의 BSG 스캐폴드는 약 50 μm 의 기공 크기를 갖는 유사한 다공성 구조를 보인 반면, 10% BSG는 다른 스캐폴드에 비해 작은 기공 사이즈인 30 μm 의 기공 크기를 보였다. 실록산의 양이 증가할수록 기공크기가 감소하였으나, 스캐폴드의 전체 공극률은 85~95% 범위에서 유사한 값을 나타내었다(도 1d).

[0035] 하이브리드 스캐폴드의 화학적 결합은 Fourier transform infrared spectroscopy(FT-IR: Perkin-Elmer)에 의해 분석하였다.

[0036] 1093 cm^{-1} 에서 Si-O-Si의 비대칭 스트레칭 진동 모드가 나타났고, Si-O-Si의 대칭 스트레칭은 798 cm^{-1} 에서 나타났다. Si-OH의 스트레칭 모드는 962 cm^{-1} 피크에서 나타났다. 3400 cm^{-1} 에서의 넓은 밴드는 OH의 스트레칭 진동을 의미한다. 2988 및 2912 cm^{-1} 에서의 피크는 C-H의 대칭 및 비대칭 스트레칭이며, 이는 초기 시약의 일부가 미반응 상태로 구조 내에 남아있다는 것을 의미한다. 반면, 젤라틴은 스펙트럼 내에서 분명하게 나타나는 세 개의 주요 피크를 보였다; 1250 cm^{-1} 에서 나타나는 아미드 III의 C-N 스트레칭 모드, 1690 cm^{-1} 에서 나타나는 아미드 I의 C=O 스트레칭 모드 및 1560 cm^{-1} 에서 나타나는 아미드 II의 N-H 변형.

[0037] 스캐폴드를 37℃에서 인산완충용액(PBS)에 각각 1,3,6,12 및 24시간 동안 침지시킨 후, 수분 흡수 시험을 수행하였다. 수분 흡수량은 $\Delta W_s (\%) = ((W_s - W_0)/W_0) \times 100$ 의 공식으로 계산하였으며, 이때 W_0 및 W_s 는 각각 시험 전 후의 샘플의 무게를 의미한다.

[0038] 상기 측정된 하이브리드 스캐폴드의 수분 흡수량은 도 3a에 나타내었다. 수분 흡수는 1분 이내에 급격히 발생하였으며, 그 후에는 천천히 증가하였다. 24시간 후, 수분 흡수량은 300%(10BSG), 500%(5BSG) 및 680%(2.5BSG)이었으며, 실록산의 함량이 증가할수록 수분 흡수 용량이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은, 하이브리드 스캐폴드의 젤라틴 성분이 높은 팽창 능력을 가지고 있기 때문으로 파악된다.

[0039] 분해 시험은 스캐폴드를 37℃에서 PBS에 침지시키는 방법으로, 28일 동안 수행하였다. 분해율은 $\Delta W_d (\%) = ((W_0 - W_d)/W_0) \times 100$ 의 식으로 계산하였으며, 이때 W_0 는 침지 전 건조 샘플의 무게, W_d 는 PBS 침지 후 각 시간에서의 건조 샘플의 무게를 나타낸다. 각 실험은 세 번씩 반복되었다.

[0040] 상기 측정된 분해율을 도 3b에 나타내었다. 실록산의 함량이 증가할수록 스캐폴드의 분해율은 감소하였다. 28일 후, 잔존 스캐폴드의 양은 2.5 BSG에서 ~25%, 10 BSG에서 ~50%로 나타남을 확인할 수 있었다.

[0041] 하이브리드 스캐폴드에 대한 인비트로(in vitro) 아파타이트 형성 능력은 각 샘플(직경 12mm, 두께 3 mm)을 1.5 배 농도의 stimulated body fluid(1.5xSBF) 50 ml에 37℃, 7일 동안 침지시켜 측정하였다. 미디움(medium)은 50 mM의 Tris와 45 nM의 HCl을 사용하여 pH 7.4로 완충시켰다. 각 시점에서 흡수시킨 스캐폴드를 꺼낸 후, 증류수로 부드럽게 행구고 동결건조 하였다. X-ray 회절(XRD, Philips MRD $\text{CuK}\alpha$, 40 kV, 20 mA), SEM 및 SEM에 부

착된 EDS(energy dispersive spectroscopy)를 이용하여 아파타이트 미네랄의 형성을 분석하였다.

[0042] 상기 분석 결과를 도 4에 나타내었다(위에서부터 각각 2.5BSG, 5BSG 및 10BSG). SEM 이미지는(도 4a) SBF의 배양 동안, 스캐폴드의 표면에 상당량의 아파타이트 나노결정이 형성되었음을 보여준다. XRD에 의한 상 분석은(도 4b) $2\theta \sim 32^\circ$ 에서 강한 피크를 나타내어, 결정화되지 않은 아파타이트가 형성되었음을 알 수 있다. 피크의 강도는 다음과 같은 순서로 높게 나타났다; 2.5 BSG > 5 BSG > 10 BSG.

[0043] 미네랄 상에 대한 EDS atomic composition은 도 4c에 나타내었다. Si의 감소 및 Ca, P가 증가와, Si를 포함하는 실록산-젤라틴 스캐폴드를 덮는 CaP 아파타이트 결정의 형성을 확인할 수 있었다.

[0044] 실시예 3: 기계적 특성

[0045] 상기 실시예 1에서 제조한 스캐폴드의 기계적 특성은 젖은 스캐폴드에 대한 정적 응력 측정을 통해 분석하였다. 원통형의 샘플(직경 12mm x 6 mm 두께)에 동적 기계 분석기(DMA; MetraVib, DMA25N)를 이용하여 압력을 가하고, 변형(strain)을 시간에 따라 기록하였다. 각 조건에서 4개의 샘플을 테스트하고, 얻어진 값의 평균을 도 5a에 나타내었다. 그 결과 실록산의 함량이 증가할수록 변형은 감소하였다.

[0046] 그 다음, 스캐폴드의 동적 기계 분석(dynamic mechanical analysis)을 평행 평판 배치(parallel plate configuration)에 대하여 수행하였다. 기계적 분광분석을 5% 증폭된 진폭으로, 37°C 에서 0.1 내지 10Hz 범위의 진동수를 갖는 동적 주파수 스위프(dynamic frequency sweep)를 이용하여 수행하였고, 점탄성의 선형 영역이 나타났다. Force는 0.001 내지 0.2 N으로 단계적으로 증가시켰고, 허용되는 최고 변형은 10%로 설정하였다. 각 샘플의 저장 탄성률(E') 및 손실 탄성률(E'')을 측정하고 이를 도 5b 및 도 5c에 나타내었다. 조성에 따라, 저장 탄성률은 10 KPa 내지 100 KPa의 범위, 손실 탄성률은 10 KPa 내지 90 KPa의 범위에 위치하였다. 실록산이 증가할수록, 두 가지 탄성률 모두 크게 증가하는 것으로 나타났다.

[0047] 실시예 4: 시토크롬 C 단백질 방출

[0048] 본 발명의 SDF-1과 유사한 크기 및 전하특성을 갖는 시토크롬 C(cyto C)를 이용하여, 본 발명 하이브리드 스캐폴드의 단백질 방출 특성을 확인하였다.

[0049] 각각의 스캐폴드를(5 mm 직경 $\times$ 10 mm 높이) 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하되 스캐폴드의 제조과정 동안 cyto C를 포함시켰다(GPTM 및 TMOS의 첨가 단계에서). 포함된 cyto C의 양은 각 스캐폴드 당 100 μg 이었다. 상기 cyto C가 탑재된 스캐폴드를 4주 동안 37°C 의 PBS 용액에 침지시켰다. 1시간, 2시간, 4시간 및 24 시간, 및 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 배지를 꺼내 분석하였다. 각 분석 시점에서, PBS는 채충전되었다. 방출되는 cyto C의 양은 408 nm 파장의 UV spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 상기 흡수 값은 0 내지 400 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 cyto C의 표준 커브의 농도로 변환되었다.

[0050] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 모든 스캐폴드가 유사한 방출 프로파일을 나타내었으며, 로딩된 단백질의 약 30~40%가 처음 2일 동안 방출되고, 그 후 모든 스캐폴드에서 지속적인 방출이 관찰되었다. 특히, 실록산의 함량이 증가할수록, 방출율은 감소하였다. 4주 후, 방출량은 10BSG에서 ~70%, 2.5BSG에서 ~90%로 나타났다.

[0051] 실시예 5: 재조합 SDF-1의 제조 및 정제

[0052] cytokine stromal derived factor-1 (SDF-1) 은 하기와 같은 방법으로 얻었다. SDF-1의 인간 서열은, *Xho*I 위치에 대한 5'-AACCTCGAGAGCGATGGCAAACCGGTG-3' 서열을 가지는 정방향 프라이머(서열번호 1) 및 *Kpn*I 위치에 대한 5'-GTTGGTACCTTATTGTTCAGCGCT-3' 서열을 가지는 역방향 프라이머(서열번호 2)를 사용하여 SDF-1 인간 서열을 수득하였다. PCR은 5°C 에서 1분(annealing), 72°C 에서 1분(extentsion) 및 94°C 에서 1분(denaturation)씩 30 cycle 반복되었다. 그 후, PCR 산물을 *Xho*I와 *Kpn*I를 이용하여 절단하고, pBAD/HisA 벡터에 결합시켜 pBAD/HisA-SDF-1 구조체를 형성하였다. 형질 전환 후, 상위 10개의 세포를 LB-Amp 미디움에서 밤새 37°C 에서 성장시켰다. $A_{600} = 0.6$ 에 다다르면, 0.1%(w/v) L-arabinose를 이용하여 유도(induction)를 시작하였다. 20°C 에서 6시간 유도한 후, $6,000 \times g$ 에서 10분동안 원심분리하고, 행구고, 초음파처리하여 세포를 펠렛화 하였다. 냉동 원심분리기에서 $14,000 \times g$ 에서 30분 동안 원심분리하여, 용해성 추출물을 수득하고, 니켈-니트릴로트리아세트

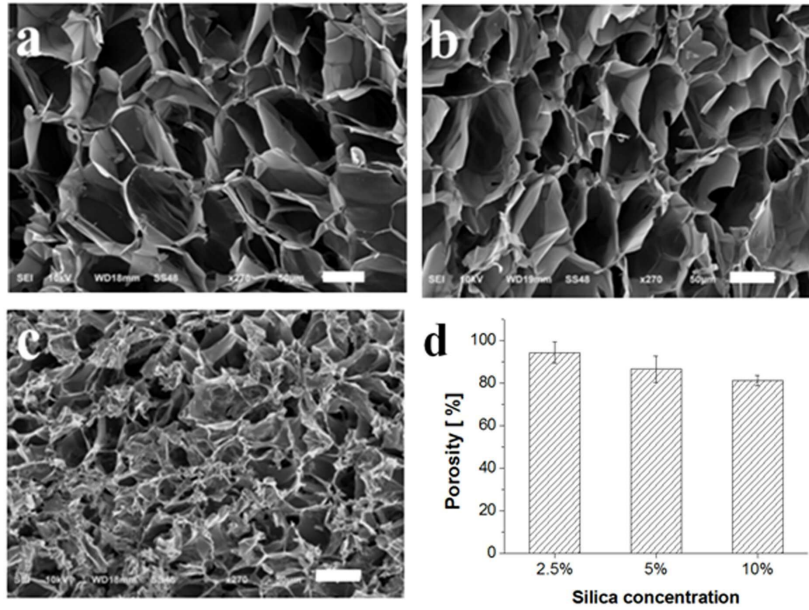
산 수지(Invitrogen, Carlsbad)와의 친화력으로 상등액을 정제하였다.

- [0053] 수득된 재조합 SDF-1의 웨스턴 블랏을 monoclonal anti-polyhistidine antibody((sc-8036, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz))의 peroxidase conjugate를 이용하여 수행하고, 재조합 SDF-1의 발현을 확인하였다. 이를 도 7a에 나타내었다.
- [0054] **실시예 6: 스캐폴드에 포함된 SDF-1의 세포이동 효과**
- [0055] 토끼의 골수로부터 유래하는 중간엽 줄기세포(MSCs)를 성인 토끼의 경골 및 대퇴골로부터(180-200 g), 기존에 알려진 방법을 사용하여 단국대학교 동물 윤리위원회의 가이드라인에 따라 채취하였다.
- [0056] 채취된 물질을 원심분리하고, 상등액을 모은 후 normal culture medium; 10%의 우태아혈청(FBS), 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 α -minimal essential medium (알파-최소필수배지, α -MEM)을 포함하는 배양 플라스크에 37℃의 온도, 5%의 CO₂를 포함하는 습한 공기하에 분산시켰다. 하루 동안 배양시킨 후, 배지를 새로 공급하고 세포가 군집을 이룰 때까지 배양시켰다. 계대 배양 및 정상 배양 조건을 유지시킨 후, 2-3 passage의 세포를 추가 시험에 사용하였다.
- [0057] SDF-1의 방출을 통해 스캐폴드 내부로 MSC를 동원하는 BSG10 스캐폴드의 능력을 측정하기 위해, 스캐폴드는 상기 실시예에 기재된 방법과 같이 제조하고, 각기 다른 양의 SDF-1을 포함시켰다(1 μ g, 10 μ g 및 대조군으로 0 μ g). 각각의 케이스에서, 맨 위에 트랜스웰 멤브레인(밀리포어, 8 μ m의 기공 사이즈)을 위치시킨 세 개의 스캐폴드를 24-well 플레이트에 유지시켰다. 각각의 트랜스웰 멤브레인, 세포를 4 $\times$ 10⁴로 씨딩하고, 이를 48시간 동안 트랜스웰의 미세기공을 통해 스캐폴드 내로 이동할 수 있도록 하였다. 상기 실험 방법을 도 7b에 나타내었다.
- [0058] 48 시간 후, 트랜스웰에 남아있는 세포를 트립신화하고, 트리판 블루로 스크리닝하고, 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 계측하였다. 이동한 세포의 비율을 하기와 같이 계산하였다.
- [0059]
$$((\text{씨딩된 세포의 전체 수} - \text{트랜스웰에 남아있는 세포의 수}) / \text{씨딩된 세포의 전체 수}) \times 100$$
- [0060] 그 결과 대조군(SDF-1을 포함하지 않는 스캐폴드)의 세포 이동이 10% 미만인 것에 반해, 1 μ g의 SDF-1을 포함하는 스캐폴드는 ~40%로 나타났고, 10 μ g의 SDF-1을 포함하는 스캐폴드는 ~50%로 나타났다(도 7c).
- [0061] 지속적 방출 및 세포 모집 능력을 평가하기 위하여, SDF-1을 5 내지 7일 동안 배양용 배지(culture media)에 첨가시키고, 상기 첨가된 스캐폴드를 걸쳐 웰(culture well)에 위치시킨 다음, 상기 기재된 과정에 따라 세포 투과 분석에 사용하였다.
- [0062] 스캐폴드로 이주하는 세포는 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscopy)을 이용하여 관찰하였다.
- [0063] 그 결과, 스캐폴드를 5 내지 7일 동안 미리 첨가시켰을 때, MSC 이동이 사라졌다. 특히, 낮은 농도의 SDF-1을 포함하고 있는 스캐폴드를 5일 동안 걸쳐 미디어에 미리 배양시켰을 때, 상기 스캐폴드는 시작 세포군(starting cell population)의 20%만 모집할 수 있었다. 또한 7일 동안 미리 배양시켰을 때, MSC 군의 10% 미만만 이주하였으며, 이는 SDF-1이 없는 대조군 스캐폴드와 유사한 수치였다. 10 μ g의 SDF-1을 포함하는 스캐폴드의 경우, 주화성 세포 이주는 모든 경우에 증가하였다. 가장 중요하게는 7일 저장 후에도, 상기 스캐폴드는 스캐폴드 내부로 세포 이주를 촉진하기에 충분한 양의 주화성 신호를 유지하였다. 이는 SDF-1이 존재하지 않는 경우에 비하여 2배 이상 큰 수치이다(도 7f)
- [0064] 위상차 영상(phase contrast imaging)을 이용하여 트랜스웰에 남아있는 세포의 수 및 모폴로지를 관찰하였다. 단면도에서, SDF-1 스캐폴드로 이주한 세포는 스캐폴드의 표면 근처(표면 아래 영역에서 200 μ m)에서 발견되었다(도 7e).
- [0065] SEM을 위한 샘플을 PBS(0.1M, pH 7.4)로 세척하고 2.5%의 글루타르알데히드를 이용하여 고정시켰다. 샘플을 단계적인 에탄올 용액(증류수 중 50, 70, 90, 96 및 100%)을 이용하여 탈수시키고, 헥사메틸디실라잔(HDMS, Fluka 52620)으로 처리한 후, 전자현미경을 위해 금으로 표면을 코팅시켰다. SDF-1이 없는 스캐폴드보다 SDF-1이 있는 스캐폴드에서 배양한 경우에, 세공을 통과하여 동그란 모양을 가지는(도 7c, 화살표로 나타냄) 세포가 더 많은

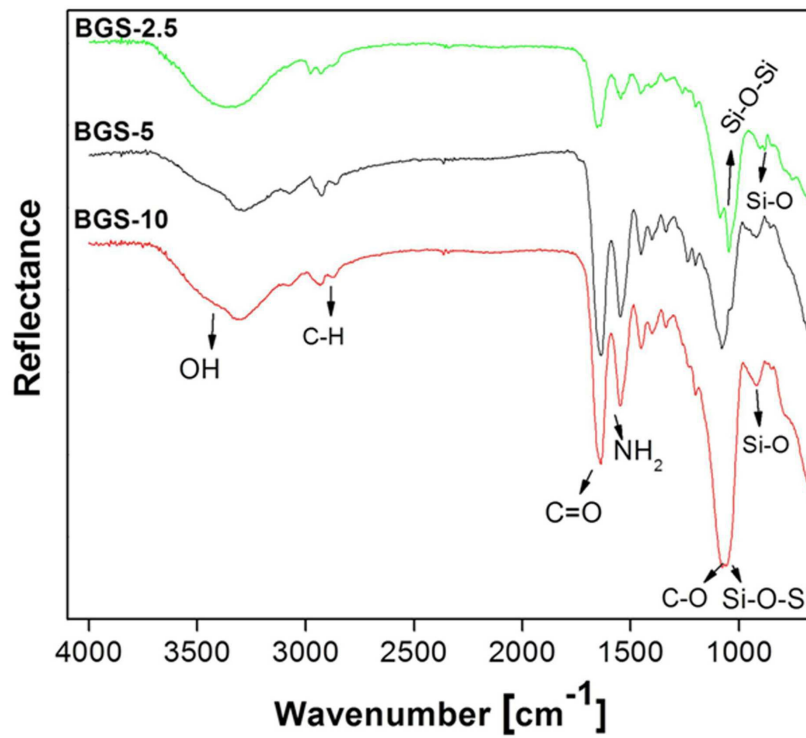
균집을 보였다. 트랜스웰의 기공을 통한 스캐폴드 내로의 세포 이주는 SDF-1이 없는 스캐폴드보다, SDF-1 스캐폴드에서 더 현저하게 나타났다.

도면

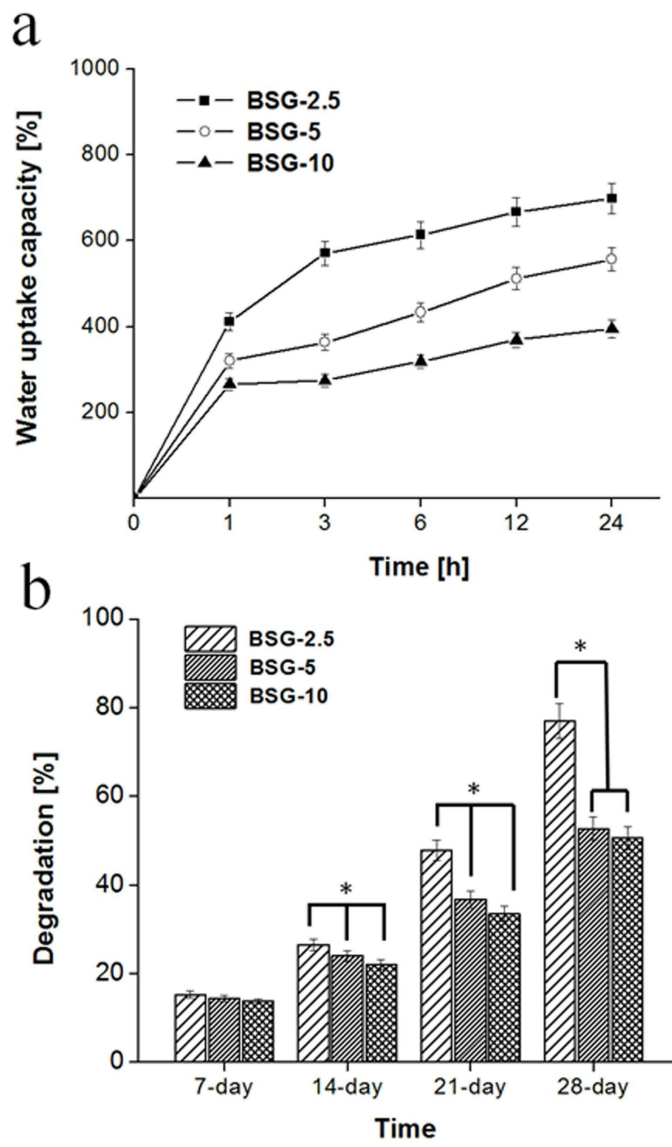
도면1



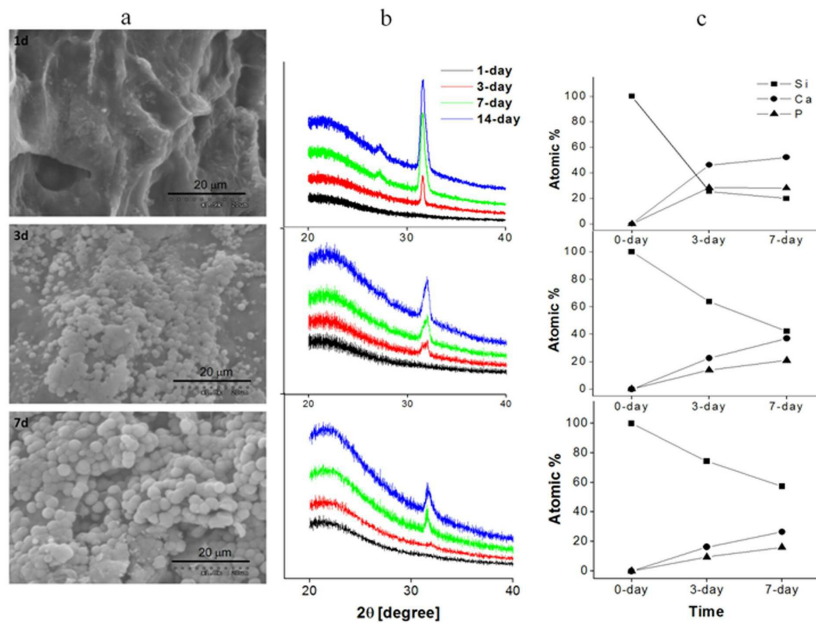
도면2



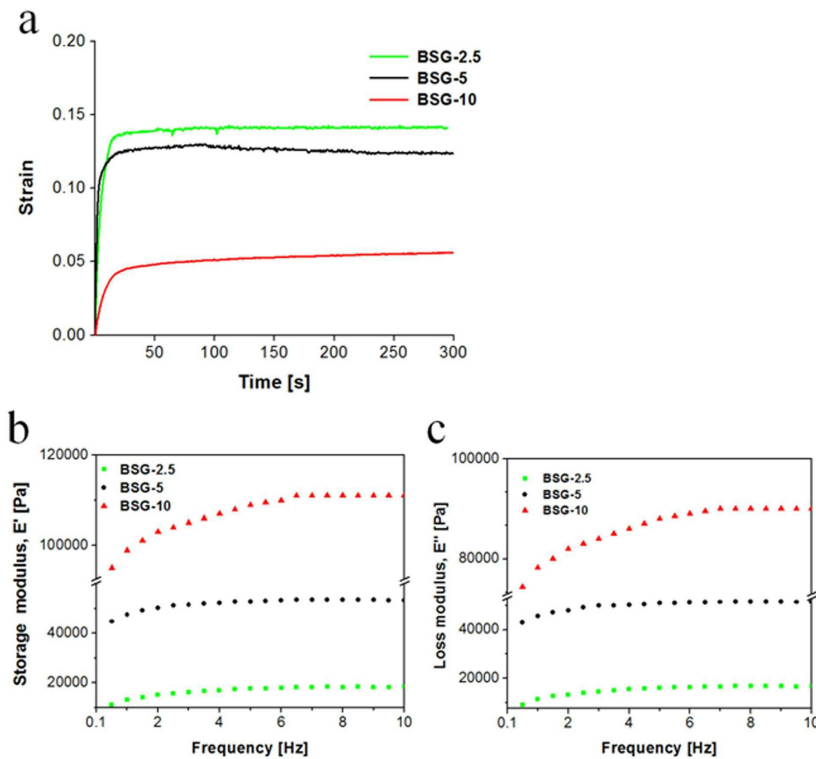
도면3



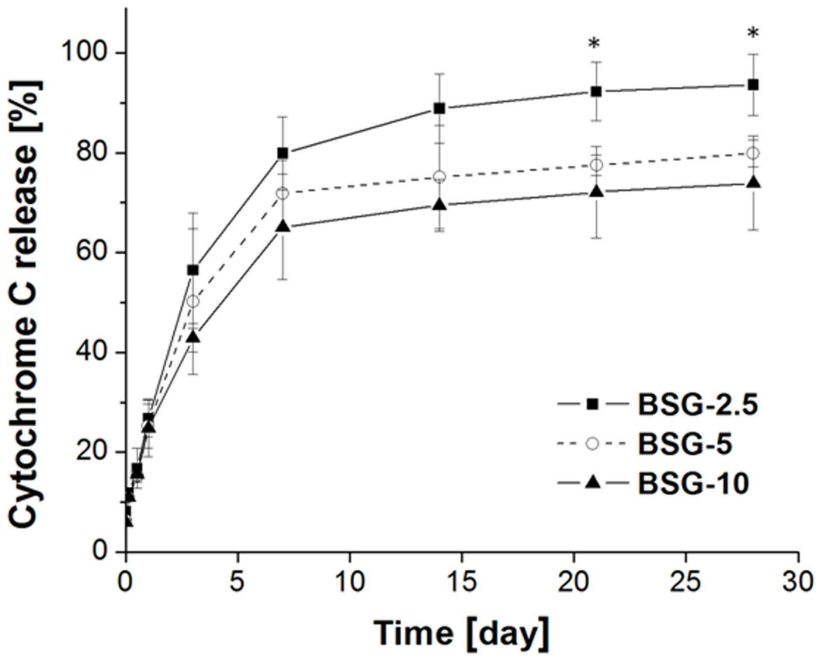
도면4



도면5



도면6



도면7

