



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0007747
(43) 공개일자 2020년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/52 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61K 47/38 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/52 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0084795

(22) 출원일자 2019년07월12일

심사청구일자 2019년07월12일

(30) 우선권주장

1020180081265 2018년07월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인

순천향대학교 산학협력단

충청남도 아산시 신창면 순천향로 22, 순천향대학교내

(72) 발명자

이병택

충남 천안시 서북구 봉서산1길 35 파크밸리 아파트 106동 1702호

누옌호민트랑

충남 천안시 동남구 순천향 6길 31 향설의학관 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진동

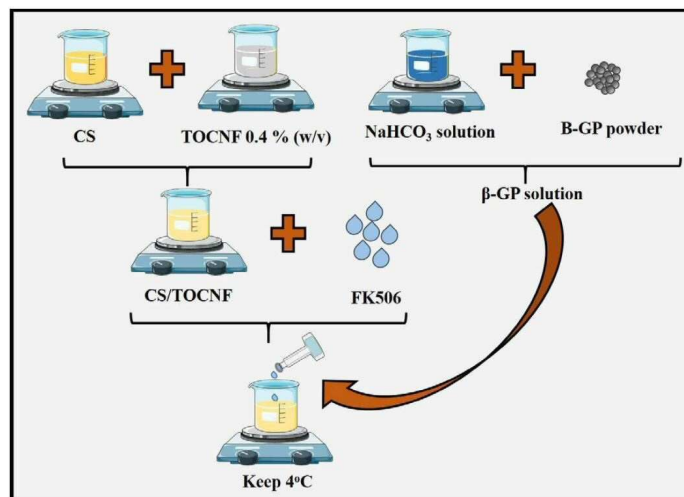
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따른 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은, fk506, 키토산, 겔화제, 및 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유를 포함한다. 본 발명에 의한 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법을 이용하면 NaHCO_3 의 함량이 높으므로 졸/겔 전이 속도는 상승하고 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 속도를 저하시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, fk506의 낮은 농도인 5 nM에서도 생체 외(2D 배양)에서 전조골 세포인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화를 유도하는 효과가 있어, CS/TOCNF하이드로겔에 도입할 수 있으며, 생체 내 골 결손 부위에 fk506을 포함하는 CS/TOCNF하이드로겔을 도입하여 골 재생을 유도할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/38 (2013.01)
A61K 9/0024 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 2400/06 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)

안드류 파달힌

충남 천안시 동남구 순천향 6길 31 향설의학관 20
2호

(72) 발명자

셀린아부에바

충남 천안시 동남구 순천향 6길 31 향설의학관 20
2호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015R1A2A1A10053272
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원(도약연구:전략)
연구과제명	인체 골격 결함 예방 및 치료를 위한 생체세라믹 주입기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	순천향대학교(천안)
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

fk506, 키토산, 겔화제, 및 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유를 포함하는, 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 2

제1항에서,

상기 겔화제는,

0.1~1.0 M 중탄산나트륨(NaHCO_3) 및 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate)를 포함하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 3

제1항에서,

상기 하이드로겔은, 생체 내에서(In vivo) 겔화되는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 4

제2항에서,

상기 하이드로겔은 상기 중탄산나트륨의 함량이 증가하면 졸에서 겔로 변환되는 속도가 증가되는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 5

제2항에서,

상기 하이드로겔은 상기 중탄산나트륨의 함량과 하이드로겔의 분해 속도가 반비례하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 6

제1항에서,

상기 하이드로겔은 2D 배양시 전조골 세포에서 조골세포의 분화를 강화하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 7

제2항에서,

상기 겔화제는 0.5 M 농도의 중탄산나트륨을 포함하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 8

제1항에서,

상기 fk506은 골 생성 분화능을 촉진시키고, 감염을 방지하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 9

제1항에서,

상기 중탄산나트륨은, 하이드로겔의 분해 시간 및 약물 방출 시간을 지연시키는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔.

청구항 10

(a) 키토산을 락트산 수용액에 투입하여 키토산 용액을 제조하는 단계,

(b) 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber) 용액을 제조하는 단계,

(c) 상기 키토산 용액과 상기 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(TOCNF) 용액을 혼합하여 1차 혼합액을 제조하는 단계,

(d) fk506 용액을 제조한 후 상기 1차 혼합액에 혼합하여 2차 혼합액을 제조하는 단계,

(e) 겔화제를 제조하는 단계, 그리고

(f) 상기 2차 혼합액에 겔화제를 적하하는 단계를 포함하는, 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법.

청구항 11

제10항에서,

상기 (c) 단계는,

상기 TOCNF 용액과 상기 키토산 용액을 1:2~4 부피비(v/v)로 혼합하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법.

청구항 12

제10항에서,

상기 (e) 단계는,

0.1~1 M 농도의 중탄산나트륨(NaHCO_3) 수용액에 60 %(w/v)의 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate) 파우더를 용해하여 제조하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법.

청구항 13

제10항에서,

상기 fk506 용액은 에탄올에 fk506 분말을 용해한 것임을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법.

청구항 14

제10항에서,

상기 (f)단계는,

상기 2차 혼합액에 상기 겔화제를 1~3:1 부피비(v/v)로 적하하는 것을 특징으로 하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 fk506을 포함하는 골 치료용 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 동적 조직이면서 고도의 혈관 조직인 골은 운동을 돕고 연조직을 보호하는 프레임워크를 제공하고, 칼슘과 인산염 등 광물을 저장하며, 골수를 숨기는(harboring) 것과 같이 인체에서 중요한 역할을 한다. 또한, 다른 조직과 달리 골은 파골 세포에 의한 골 재흡수와 골아 세포에 의한 골 형성간의 자체 균형능으로 인해 자체적으로 재생 및 복구 가능하다. 그러나, 이러한 재구성(remodeling)은 골 결손이 대규모인 경우에 항상 효과적인 것은 아니며, 신생 골을 강화 및 경화하기 위해서 골절 부위에 충분한 혈액과 적절한 칼슘과 인을 공급하는 것이 필요하다. 따라서, 중대한 골 결손에 적합한 임상 치료법을 찾는 것이 매우 절실하다.
- [0003] 골 이식은 골 수복(bone repair) 촉진에 일반적으로 사용되는 임상 골 결손 치료 방법 중 하나이다. 골 형성, 골 전도 및 골 유도의 장점에 따라, 자가 이식(골 이식물은 환자로부터 획득), 동종 이식 또는 이종 이식(골 이식물은 공여체 또는 동물로부터 획득)을 포함하는 골 이식물을 신체 부위에 이식하여 결손 부위를 폐쇄하고 치료를 촉진하는 것이 바람직하다. 그럼에도 불구하고, 수술에 골 이식물을 이용하는 것은 완벽한 치료법이라 할 수 없다. 골 이식은 이차 수술 가능성이 높으며, 질병이 전이될 위험이 있고, 외부 물질 반응과 숙주 거부, 이용 가능한 골 공급원을 찾기 어렵고, 결손 공동에 적합한 형태와 깊이로 형성하기 어렵기 때문에 여전히 연구 중에 있다. 따라서, 최근 수십 년간 골 이식을 대체할 수 있는 신규 생체 재료가 개발되어왔다. 이러한 생체 재료는 비독성, 생체적합성, 생분해성, 세포 및 혈관 침투에 충분한 공극성, 강한 기계적 특성, 세포 발달, 골 형성, 골 전도 및 골 유도를 위한 환경을 조성할 수 있는 구조 등의 요소에 의거하여 설계되었다.
- [0004] 하이드로겔은 조직 재생 분야에 이상적인 잠재적인 생체 재료이다. 이는 천연 세포의 기질을 모방하고 네트워크 내 세포 또는 성장 인자를 포획하여 외상 위치에서 세포 침투, 성장 및 분화를 촉진할 수 있는 팽창성(swelling) 3차원(3D) 구조 네트워크이다. 하이드로겔 중에서 주입형(injectable, 주사형) 하이드로겔은 용이하게 충전 가능하고, 불규칙한 형태의 결손에 적합하며 비침습적인 방법으로 온화한 조건에서 겔을 그 위치에 형성할 수 있어, 미리 형성된(pre-formed) 하이드로겔 보다 장점이 우수한 스마트 하이드로겔로 알려졌다. 또한, 온도에 특히 민감한 주입용 하이드로겔의 경우 상온 또는 저온에서 자유롭게 주입할 수 있고 유해물이나 상 전이를 보호하는 특정 첨가제(UV, pH 조절제 또는 산화제)를 첨가하지 않고도 체온에서 겔로 변환될 수 있으므로 골 결손 치료 용도에 가장 적합한 물질이다.
- [0005] 그러나, 이전 연구에서 본 발명자에 의해 개발된 CS/TOCNF 하이드로겔은 키토산 하이드로겔 시스템과 비교하여 독성이 적고 겔화 특성이 향상된 주입성 열감응성 하이드로겔 시스템으로 설계되었다. 이러한 시스템은 키토산 하이드로겔 보다 MC3T3-E1과 생체 적합성이 뛰어나므로 임상 생의학 분야, 특히 골 치료 분야에 적합했다. 그러나, 기계적 강도는 매우 약했고, 겔화가 느린 단점이 있었다. 또한, 생체에 적합하나, 약물, 성장 인자 또는 세포 치료를 촉진시키는 인자를 보유하지 않았다. 따라서, 이 시스템을 다른 하이드로겔을 포함한 세포, 약물 또는 성장 인자와 비교하면 치료 속도가 느린 단점이 있었다. 또한, 이의 분해 속도는 1개월로 매우 빠르며, 골 복원에 충분한 시간을 제공하지 못했다. 예에, 강도, 빠른 겔화, 빠른 골 형성, 늦은 분해 속도 등 바람직한 특성을 가진 시스템의 개발이 필요하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) KR 10-181537 B1 (2018.01.05. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 fk506, 키토산, 겔화제, 및 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유를 포함하는, 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔을 제공한다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 (a) 키토산을 락트산 수용액에 투입하여 키토산 용액을 제조하는 단계, (b) 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber) 용액을 제조하는 단계, (c) 상기 키토산 용액과 상기 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(TOCCNF) 용액을 혼합하여 1차 혼합액을 제조하는 단계, (d) fk506 용액을 제조한 후 상기 1차 혼합액에 혼합하여 2차 혼합액을 제조하는 단계, (e) 겔화제를 제조하는 단계, 그리고 (f)

상기 2차 혼합액에 겔화제를 적하하는 단계를 포함하는, 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 실시예에 따른 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은, fk506, 키토산, 겔화제, 및 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유를 포함한다.
- [0010] 상기 겔화제는, 0.1~1.0 M 중탄산나트륨(NaHCO_3) 및 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate)를 포함할 수 있다.
- [0011] 상기 하이드로겔은, 생체 내에서(In vivo) 겔화된 수 있다.
- [0012] 상기 하이드로겔은 상기 중탄산나트륨의 함량이 증가하면 졸에서 겔로 변환되는 속도가 증가된다.
- [0013] 상기 하이드로겔은 상기 중탄산나트륨의 함량과 하이드로겔의 분해 속도가 반비례한다.
- [0014] 상기 하이드로겔은 2D 배양시 전조골 세포에서 조골세포의 분화를 강화한다.
- [0015] 상기 겔화제는 0.5 M 농도의 중탄산나트륨을 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 fk506은 골 생성 분화능을 촉진시키고, 감염을 방지한다.
- [0017] 상기 중탄산나트륨은, 하이드로겔의 분해 시간 및 약물 방출 시간을 지연시킨다.
- [0018] 본 발명의 다른 실시예에 따른 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법은 (a) 키토산을 락트산 수용액에 투입하여 키토산 용액을 제조하는 단계, (b) 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber) 용액을 제조하는 단계, (c) 상기 키토산 용액과 상기 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(TOCNF) 용액을 혼합하여 1차 혼합액을 제조하는 단계, (d) fk506 용액을 제조한 후 상기 1차 혼합액에 혼합하여 2차 혼합액을 제조하는 단계, (e) 겔화제를 제조하는 단계, 그리고 (f) 상기 2차 혼합액에 겔화제를 적하하는 단계를 포함한다.
- [0019] 상기 (c) 단계는, 상기 TOCNF 용액과 상기 키토산 용액을 1:2~4 부피비(v/v)로 혼합할 수 있다.
- [0020] 상기 (e) 단계는, 0.1~1 M 농도의 중탄산나트륨(NaHCO_3) 수용액에 60 %(w/v)의 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate) 파우더를 용해하여 제조할 수 있다.
- [0021] 상기 fk506 용액은 에탄올에 fk506 분말을 용해할 수 있다.
- [0022] 상기 (f)단계는, 상기 2차 혼합액에 상기 겔화제를 1~3:1 부피비(v/v)로 적하할 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 의한 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법을 이용하면 NaHCO_3 의 함량이 높으므로 졸/겔 전이 속도는 상승하고 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 속도를 저하시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, fk506의 낮은 농도인 5 nM에서도 생체 외(2D 배양)에서 전조골 세포인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화를 유도하는 효과가 있어, CS/TOCNF하이드로겔에 도입할 수 있으며, 생체 내 골 결손 부위에 fk506을 포함하는 CS/TOCNF하이드로겔을 도입하여 골 재생을 유도할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 fk506을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔을 제조과정을 나타낸 것이다.
- 도 2A 내지 2D는 겔화제에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 37 °C에서의 겔화시간, 점도, 유동 거동을 나타낸 것이다.
- 도 3은 겔화제에 포함된 중탄산나트륨의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 푸리에 변화 적외선(FT-IR) 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 4A 및 4B는 겔화제에 포함된 중탄산나트륨(0M, 0.1M, 0.25M, 0.5M)의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔을 리소자임 효소(1 mg/ml)를 함유한 PBS에 침지된 경우에 분석한 프로파일로 잔존량과 광학사진을 나타낸 것이다.

도 5는 배양 1일, 3일, 5일 및 7일 후 전조골세포 MC3T3-E1의 증식에 미치는 fk506(5 nM, 15 nM, 25 nM, 50 nM 및 100 nM)의 효과를 MTT 분석한 것이다.

도 6은 겔화제 중 0.5M 중탄산나트륨을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔의 fk506의 누적 방출 속도를 UV 분광법으로 나타낸 것이다.

도 7은 임계 크기(Critical-sized)의 쥐 두개골 결손부에 fk506이 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔을 이식한 모습을 나타낸 것이다.

도 8은 동물 모델에 fk506이 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔 이식 한 후 3주, 6 주 후의 마손 트리크롬 (Masson's Trichrome)으로 염색 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하 본 발명에 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 일 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 우선, 도면들 중, 동일한 구성요소 또는 부품들은 가능한 동일한 참조부호를 나타내고 있음에 유의하여야 한다. 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명은 본 발명의 요지를 모호하지 않게 하기 위하여 생략한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 약, 실질적으로 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0028] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따른 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은, fk506, 키토산, 겔화제, 및 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유를 포함한다.
- [0030] 상기 타크로리무스(Tacrolimus, fk506)은 골 생성 분화능을 촉진시키고, 감염을 방지한다.
- [0031] 상기 타크로리무스(Tacrolimus, fk506)은 심장이나 심장 이식 후 동종 이식 거부를 방지하고 장기 이식 환자의 생존율을 높일 수 있는 면역증강제이다. 또한, 골 생성 분화능을 갖고 생체 및 생체 외 골 형성을 촉진할 수 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유하이드로겔은 골 형성을 촉진하여 골 치료 기간을 단축시킬 뿐만 아니라 체내에서 골 형성시 감염을 방지할 수 있는 효과가 있다.
- [0033] 나노셀룰로오스는 생체물질 후보이다. 나노셀룰로오스는 조직 강화 반월판(tissue engineered meniscus), 혈관, 인대 및 힘줄 대체물과 같은 스캐폴드 같은 재생 의학과 상처 치유 응용 분야에서 이용될 수 있는데, 이는 나노셀룰로오스의 상당한 물리적 특성과 특수 표면 화학과 생분해성, 생체적합성 그리고 낮은 독성과 같은 우수한 생물학적 특성 때문이다.
- [0034] 셀룰로오스 나노섬유를 만들기 위해서는 목재의 셀룰로오스 섬유를 분리시키는 것이 필요하다. 셀룰로오스 섬유는 섬유와 섬유가 강하게 결합되어 있기 때문에 높은 효율로 분리하는 것이 곤란했으나, 기능성 촉매인 2,2,6,6-테트라메틸-피페리딘-1-옥실(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl, TEMPO)를 이용해 산화시키면 셀룰로오스 섬유가 균일한 셀룰로오스 나노섬유가 될 수 있다. 이러한 TEMPO-산화 셀룰로오스 나노섬유(TEMPO-oxidized cellulose nanofibril, TOCNF)는 목질 바이오매스 유래로 생분해성을 가진다. 또한, 결정성이 높고 내열성이 뛰어나며, 높은 투명성을 가지는 등 다양한 뛰어난 성질을 가지고 있기 때문에, 고분자 복합재료, 의공학 소재 및 멤브레인에 이용이 가능하다.
- [0035] 나노셀룰로오스의 TEMPO 매개 산화에 의해 얻은 Tempo-산화 셀룰로오스 나노섬유는 새로운 유력한 생체 기반 나노 물질이다. TOCNF는 세포 성장과 분화가 가능한 3D 환경을 형성하기 위해 하이드로겔을 형성할 수 있는 높은 결정성과 수용성을 갖는다.
- [0036] 상기 겔화제는, 0.1~1.0 M 중탄산나트륨(NaHCO_3) 및 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate)를 포함할 수 있다.

- [0037] 구체적으로 상기 겔화제는 0.5 M 농도의 중탄산나트륨을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 β -글리세로포스페이트는 일반적인 겔화제로 사용될 수 있는 물질이다. 그러나, β -글리세로포스페이트를 단독으로 사용할 경우 겔화가 느린 단점이 있으며, 종래의 β -글리세로포스페이트를 단독으로 사용하는 하이드로겔의 경우 겔화가 느린 단점으로 인하여 결손부위에서 이탈하거나 조기 용해되는 단점이 있다.
- [0039] 상기 중탄산나트륨은 세포 활성화에 영향을 주지 않으면서 겔을 강화하고 겔화를 촉진하는 약염기이다.
- [0040] 또한, 상기 중탄산나트륨을 포함하는 겔화제는 하이드로겔의 분해 시간 및 약물 방출 시간을 지연시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따른 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은 상기 겔화제에 포함된 중탄산나트륨의 함량이 증가할수록 졸에서 겔로 변화하는 속도를 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은 30℃~37℃에서는 겔(gel)의 형태를 지닐 수 있으며, 보다 구체적으로 37℃에서 겔의 형태를 지닐 수 있다. 즉, 생체 내에서(In vivo) 겔화될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔은 상기 중탄산나트륨의 함량과 하이드로겔의 분해 속도가 반비례한다.
- [0044] 즉, 겔화제가 포함하는 중탄산나트륨의 증가가 증가하면 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 속도의 감소하고 상기 CS/TOCNF 하이드로겔이 골을 치유할 수 있는 시간이 증가한다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서 fk506 또는 fk506을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔은 2D 배양시 시험관에서 전조골 세포에서 조골세포의 분화를 강화하는 것을 확인하였다.
- [0046] 상기 fk506에 대해서는 앞서 설명하였기에 이에 대한 설명은 생략한다.
- [0048] 본 발명의 다른 실시예에 따른 골치료를 위한 fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔의 제조방법은 (a) 키토산을 락트산 수용액에 투입하여 키토산 용액을 제조하는 단계, (b) 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber) 용액을 제조하는 단계, (c) 상기 키토산 용액과 상기 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(TOCNF) 용액을 혼합하여 1차 혼합액을 제조하는 단계, (d) fk506 용액을 제조한 후 상기 1차 혼합액에 혼합하여 2차 혼합액을 제조하는 단계, (e) 겔화제를 제조하는 단계, 그리고 (f) 상기 2차 혼합액에 겔화제를 적하(Drop by drop)하는 단계를 포함한다.
- [0049] 상기 (a) 단계는 키토산을 락트산 수용액에 투입하여 키토산 용액을 제조하는 단계이다.
- [0050] 구체적으로 상기 (a) 단계는 1% (v/v) 락트산 수용액에 키토산을 용해하여 3% (w/v) 키토산 (CS) 용액을 제조할 수 있다.
- [0051] 상기 (b) 단계는 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber) 용액을 제조하는 단계이다.
- [0052] 구체적으로 상기 (b) 단계는 증류수에 2,2,6,6-테트라메틸-피페리딘-1-옥실(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl, TEMPO)-산화 셀룰로오스 나노섬유(TOCNF)의 균질 현탁액을 희석하고, 염산 수용액을 첨가하여 TEMPO-산화 셀룰로오스 나노섬유 (TOCNF)를 함유하는 0.4 % (v/v) TOCNF 용액을 제조할 수 있다.
- [0053] 상기 "적하"는 액체 등과 같은 것이 방울지게 떨어뜨리리는 것을 의미한다.
- [0054] 상기 "현탁액"은 액체에 고체 미세입자가 분산한 부유체를 서스펜션 또는 현탁액이라고 부른다.
- [0055] 상기 "균질"은 어떤 일정 상태에서 하나의 물질 내부에서 어느 부분을 취(取)해도, 다른 부분과 똑같은 물리적, 화학적 성질을 가지고 있는 것을 말하며 균일이라고도 한다.
- [0056] 상기 (c) 단계는 상기 키토산 용액과 상기 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(TOCNF) 용액을 혼합하여 1차 혼합액을 제조하는 단계이다.
- [0057] 구체적으로 상기 (c) 단계는 상기 TOCNF 용액과 상기 키토산 용액을 1:2~4 부피비(v/v)로 혼합할 수 있으며 바람직하게는 1:3 부피비로 혼합할 수 있다.

- [0058] 보다 구체적으로, 상기 3 % (v/v) 키토산 (CS) 용액과 상기 TOCNF 용액과 상기 키토산 용액을 1:3 부피비(v:v)로 실온에서 혼합하여 1차 혼합액(CS/TOCNF)을 제조한다.
- [0059] 상기 (d) 단계는 fk506 용액을 제조한 후 상기 1차 혼합액에 혼합하여 2차 혼합액을 제조하는 단계이다.
- [0060] 상기 fk506 용액은 에탄올에 fk506 분말을 용해하여 제조한다.
- [0061] 상기 제조된 fk506 용액을 1차 혼합액에 투입하여 2차 혼합액(fk506을 함유하는 CS/TOCNF)을 제조한다.
- [0062] 상기 fk506의 농도는 2차 혼합액에 대하여 45~55 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함유된다.
- [0063] 상기 (e) 단계는 겔화제를 제조하는 단계이다.
- [0064] 구체적으로, 상기 (e) 겔화제를 제조하는 단계는 0.1~1 M 농도의 중탄산나트륨(NaHCO_3) 수용액에 60 % (w/v)의 β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate) 파우더를 용해하여 제조할 수 있다.
- [0065] 상기 중탄산나트륨은 물에 용해하여 여과한 후, β -글리세로포스페이트를 다양한 농도의 중탄산나트륨 용액에 용해하여 제조한다.
- [0066] 상기 (f) 단계는 상기 2차 혼합액에 겔화제를 적하하여 fk506을 포함하는 CS/TOCNF하이드로겔을 제조하는 마지막 단계이다.
- [0067] 구체적으로 상기 2차 혼합액에 상기 겔화제를 1~3:1 부피비(v:v)로 적하하며 빙조(Ice bath)에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 연속 교반하여 fk506을 포함하는 CS/TOCNF하이드로겔을 제조한다.
- [0069] 전술한 바와 같이, fk506을 포함하는 키토산/템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유 하이드로겔 및 이의 제조방법을 이용하면 NaHCO_3 의 함량이 높으므로 졸/겔 전이 속도는 상승하고 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 속도를 저하시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, fk506의 낮은 농도인 5 nM에서도 생체 외(2D 배양)에서 전조골 세포인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화를 유도하는 효과가 있어, CS/TOCNF하이드로겔에 도입할 수 있으며, 생체 내 골 결손 부위에 fk506을 포함하는 CS/TOCNF하이드로겔을 도입하여 골재생용 용도로 사용할 수 있다.
- [0071] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0073] 실시예: 하이드로겔의 제조
- [0074] 구체적인 하이드로겔의 제조과정은 도 1과 같다.
- [0075] 3 % (w/v) 키토산(chitosan; CS) 용액과 0.4 % (w/v) 템포 산화 셀룰로오스 나노 섬유(Tempo-oxidized cellulose nanofiber; TOCNF) 용액을 3 : 1 부피비(CS : TOCNF, v/v)로 혼합하여 1차 혼합액(CS/TOCNF)을 제조한 후 냉각하였다.
- [0076] 다음으로, 에탄올에 fk506 분말을 용해하여 fk506 용액을 제조한 후 1차 혼합액에 투입하여 2차 혼합액을 제조하였다. 상기 2차 혼합액에 혼합되는 fk506 용액은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 사용하였다.
- [0077] 마지막으로, 상기 2차 혼합액과 겔화제(β -GP Solution)를 2:1의 비(혼합액:겔화제, v : v)로 적하하여 빙조(ice bath)에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 연속 교반하면서 하이드로겔을 제조하였다.
- [0078] 최종 하이드로겔은 사용 전에 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 정치하였다.
- [0079] 여기서, 상기 겔화제(β -GP Solution)는 물에 용해하여 여과한 0.1M ~ 1M 농도의 중탄산나트륨 수용액(NaHCO_3 Solution)에 60 % (w/v) β -글리세로포스페이트(β -Glycerophosphate; GP) 파우더를 투입하여 용해하여 제조하였다.
- [0081] [실험방법]

- [0082] 1. 겔화 시간 측정
- [0083] 겔화제의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 겔화 시간을 측정하였다.
- [0084] 겔화제의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 겔화 시간의 측정은 바이알 반전 시험법(vial inversion test method, H. Y. Zhou et al., 2008)에 의해 수행되었다. 또한, 졸-겔 전이를 촉진하기 위해 1 ml CS/TOCNF 프리 겔(pre-gel) 용액이 담긴 바이알을 37 °C 수조에서 배양하였다. 바이알을 뒤집을 때 용액의 유동이 멈출 때까지 겔화제의 농도에 따른 겔화 시간을 기록하였다.
- [0086] 2. 점도 특성 분석 및 유동 거동 측정
- [0087] 브룩필드(Brookfield) 점도계((RVDV, USA)를 이용하여 액체 상태(4°C) 및 겔 상태(37°C)에서 겔화제의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 점도를 측정하였다.
- [0088] 7.1 ml의 하이드로겔을 원통형 용기에 넣고 스펀들을 21로 연속 교반하였다. 시료는 37° C의 온도에서 100 RPM으로 4° C에서 150 RPM으로 3분간 측정하였다. 점도는 30 초마다 측정하였다.
- [0090] 3. 푸리에 변환 적외선 분광법 (FT-IR) 분석
- [0091] 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)의 첨가 전후 CS/TOCNF 하이드로겔의 FT-IR 스펙트럼을 푸리에 변환 적외선 분광기(Fourier Transform Infrared Spectrometer) (Nicolet iS10-Smart iTR, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 4,000 ~ 700 cm⁻¹ 주파수 범위에서 측정하였다.
- [0093] 4. CS/TOCNF 하이드로겔의 분해
- [0094] 다양한 겔화제를 이용한 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해는 PBS/리소자임 용액 (1 mg/ml)에 37 °C에 침지한 후 8 주 간 연속 진탕하면서 하이드로겔의 형태, 크기 및 중량 변화를 통해 평가하였다.
- [0095] 일정 시간을 주기로 시료를 PBS/리소자임 용액에서 제거하고 무게를 측정하였다. 효소가 지속적으로 작용하고 시료가 건조되는 것을 방지하기 위해 PBS/리소자임 용액을 48 시간 마다 새 용액으로 교체하였다. 잔존하는 하이드로겔 질량 백분율은 하기 식에 따라 계산하였다.
- [0096] 하이드로겔 잔존 질량 (%) = (Wt/Wi) × 100 (%)
- [0097] 여기서, Wi는 PBS/리소자임 용액에 침지하기 전 각 시료의 초기 중량이고, Wt는 PBS/리소자임 용액에 침지 후 시간(t)에 따른 시료의 중량이다.
- [0099] 5. 시험관 내 세포의 배양
- [0100] 마우스 전조골세포인 MC3T3-E1 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA)는 10 % 태아 소혈청(FBS, Mediatech Inc, USA) 및 1 % 페니실린-스트렙토마이신(PS, Welgene, South Korea)을 첨가한 알파 최소 배지 (α-MEM, Welgene, South Korea)에서 배양하였다. MC3T3-E1 세포는 37 °C에서 5 % 이산화탄소(CO₂)의 가습 배양기에 정치하였다. 또한, MC3T3-E1 세포의 골 형성 분화 배지에 10 nM 텍사메사손(Sigma-Aldrich, South Korea), 50 µg/ml 아스코르브산 2-포스페이트 (Sigma-Aldrich, South Korea) 및 10 mM β-글리세롤포스페이트(Sigma-Aldrich, USA)를 보충하였으며, 배지는 2 일마다 교체하였다.
- [0102] 6. fk506의 생체적합성 시험
- [0103] MC3T3-E1 세포는 70-80 %의 합류도(confluence)에 이를 때까지 48-웰 배양 플레이트에 접종하였다. 그 후, 배지를 제거하고 배지에서 fk506 원액 (stock) (12 mM)을 희석하여 제조한 상이한 농도 (5 nM, 15 nM, 25 nM, 50 nM, 및 100 nM)의 fk506 용액으로 대체하였다. fk506이 없는 배지에 세포가 접종된 웰을 대조군으로 정하였다. 1일, 3일, 5일, 7일 배양 후 MTT 용액(PBS 중 5 mg/ml)을 웰마다 1:10 (v / v)의 비율로 첨가하고 37 °C에서

다시 배양하였다.

[0104] 배양 4 시간 후 웰 내부의 모든 용액을 제거하고 웰에 DMSO를 첨가하여 포르마잔염을 용해하였다. ELISA 판독기(Infinite F50, Tecan, Austria)를 사용하여 파장 595 nm에서 용액의 광학 밀도를 측정하여 세포 생존력을 측정하였다. 2 일마다 배지는 반으로 감소되었다.

[0106] 7. 시험관 내 fk506 방출

[0107] 겔화제 중 0.5 M 중탄산나트륨을 이용한 CS/TOCNF 하이드로겔(선택시료)로부터 fk506의 방출을 확인하였다. 겔 생성 후, fk506을 포함한 겔 1 ml를 PBS 1.5 ml에 침지하여 일정한 진탕 조건하에 37 °C에서 배양하였다. 일정 시간 마다 모든 추출 용액을 수집하고, 새로운 PBS로 교체하고, 방출된 fk506 함량을 측정 및 분석하였다. 자외선 흡광도는 220 nm의 파장에서 BioDrop(UK)으로 판독하였다. 추출액에 방출된 fk506의 양은 알려진 fk506 농도의 표준 검량선을 기준으로 결정되었다.

[0109] 8. 생체 내 연구

[0110] 순천향대학교 동물 윤리위원회의 승인을 받아 Sprague Dawley 수컷 쥐(200-250 g, 9주령) 18 마리를 키워 실험에 사용하였다. 쥐를 디에틸에테르(Daejung, South Korea)로 마취하고 평복(procumbent) 위치로 배치하였다. 쥐 머리의 수술 부위를 면도하고 위생 목적으로 70 % 알코올과 항균 목적으로 포비돈 요오드 용액으로 닦았다. 약 25 mm의 정중선 절개부를 형성하여 두개골을 노출하였다. 그 후, 골막을 뒤집어서 두개골의 정면 중앙에 트레핀 드릴을 통해 원형 전체 두께의 골 결손(직경 8 mm, 깊이 1 mm)을 형성하였다. 드릴링 시간 동안 식염수 공급이 연속적으로 이루어졌다. 결손은 다양한 군의 하이드로겔 (fk506이 포함되거나 포함되지 않음)을 주입하여 채웠으며, 결손 부위는 하이드로겔이 이식되지 않은 경우 대조군으로 간주된다. 그 후, 절개부를 봉합하고 포비돈 요오드로 닦았다. 이식 3 주 및 6 주 후 치유 과정을 관찰하였다.

[0112] [실험결과]

[0113] 실험예 1. NaHCO₃ 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 겔화 정도 및 유동거동 분석

[0114] 도 2A 내지 2D는 겔화제에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 37 °C에서의 겔화시간, 점도, 유동 거동을 나타낸 것이다.

[0115] CSF/TOCNF 하이드로겔의 겔화 시간에 중탄산나트륨(NaHCO₃) 농도가 미치는 영향을 생리 온도에서 관찰하였다.

[0116] 도 2A에 도시된 바와 같이, 겔화제의 NaHCO₃의 농도가 0 M 내지 1 M 범위로 증가할 때 하이드로겔의 겔화 시간은 130 초에서 25 초로 점차 감소하였다. 이는 겔화제에 포함된 NaHCO₃의 농도가 높을수록 겔화가 더 빠르게 진행된다는 것을 의미한다.

[0117] 겔화제에 NaHCO₃를 첨가하면 NaHCO₃ 함량이 증가함에 따라(0 M, 0.1 M, 0.25 M 및 0.5 M), 하이드로겔의 점도는 감소하는 경향을 나타낸다. 도 2B에 도시된 바와 같이 37 °C에서 하이드로겔의 점도는 0 M NaHCO₃의 경우 약 233 Pa.s이고, 0.1M 및 0.5M NaHCO₃의 경우 각각 149.6 Pa.s 및 181.9 Pa.s로 감소했다. 그러나, 0.25 M NaHCO₃의 경우 전하들간 반발력으로 인해 하이드로겔의 점도가 약 350 Pa.s를 나타낸다.

[0118] 또한, 37 °C에서의 CS/TOCNF 하이드로겔의 유동 거동을 도 2C 및 도 2D에 나타내었다. 도 2C 및 도 2D를 참조하면, 모든 CS/TOCNF 하이드로겔의 점도와 전단 응력은 전단 속도의 증가에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. 이는 CS/TOCNF 하이드로겔의 유동 거동은 주입에 의해 골 치료 용도에 적합한 전단 담화(shear thinning) 모델이라 할 수 있다. 대부분 주입가능한 하이드로겔이 점도가 낮아 주입이 용이하며(주사기를 통과하고), 생체 내 결손(Cavity)과 임의 형상의 공동을 채울 수 있는 자유 유동액(Free flowing solution) 전략에 따라 설계되었기 때문이다.

- [0120] 실험예 2. CS/TOCNF 하이드로겔의 FT-IR 스펙트럼 분석
- [0121] 도 3은 겔화제에 포함된 중탄산나트륨의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 푸리에 변화 적외선(FT-IR) 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [0122] 도 3을 참조하면, NaHCO_3 가 첨가된 겔화제를 포함하는 하이드로겔의 스펙트럼에서 새로운 피크는 보이지 않았고, NaHCO_3 첨가로 인해 하이드로겔의 화학적 구조가 변하지는 않는것이 확인되었다. 또한, 겔화제 내에 NaHCO_3 함량이 점차 증가함에 따라 O-H 및 N-H의 흡수 밴드가 저 파수(Wave-number)로 약간 이동하였다. 이는 하이드로겔 결합 형성 및 키토산 양전하(NH_3^+)가 중화됨을 의미한다. 이로 인해 키토산 분자간 정전기적 반발력과 입체 변형(strain)이 감소되어 아세틸기의 소수성 상호 작용이 향상되고 겔화가 촉진되는데 이는 NaHCO_3 함량이 증가함에 따라 겔화 시간이 단축되는 이유를 설명해준다.
- [0124] 실험예 3. NaHCO_3 함량에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 프로파일 분석
- [0125] 도 4A 및 4B는 겔화제에 포함된 중탄산나트륨(0M, 0.1M, 0.25M, 0.5M)의 농도에 따른 CS/TOCNF 하이드로겔을 리소자임 효소(1 mg/ml)를 함유한 PBS에 침지된 경우에 분석한 프로파일로 잔존량과 광학사진을 나타낸 것이다.
- [0126] CS/TOCNF 하이드로겔은 생체에서 분해가능하며 이들의 분해가능성은 겔화제의 NaHCO_3 함량의 변화에 따라 달라진다. CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 과정은 하이드로겔 질량 손실을 측정하고 하이드로겔 침식을 관찰하여 평가하였다.
- [0127] 도 4A 및 4B를 참조하면, 겔화제가 NaHCO_3 를 포함하지 않거나 소량(0.1 M 및 0.25 M)을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔의 질량이 6 주 후에 80 % 이상 크게 감소하는 것을 나타낸다. NaHCO_3 의 농도를 0.5 M로 높이면, 질량 손실은 감소하고 이의 형태는 거의 분해되고 일부 작은 부분만 남은 CS/TOCNF 하이드로겔과 비교할 때 크게 변하지 않았다. 그 결과로서, 농도 증가에 따른 겔화제에 포함된 NaHCO_3 는 특히 0.5 M NaHCO_3 인 CS/TOCNF 하이드로겔의 분해 속도의 감소를 초래하였고, 이러한 하이드로겔은 매우 안정하여 골 치유에 사용하기에 적합한 것이 입증되었다.
- [0129] 실험예 4. fk506 농도에 따른 in vitro 생체 적합성 분석
- [0130] 도 5는 배양 1일, 3일, 5일 및 7일 후 전조골세포 MC3T3-E1의 증식에 미치는 fk506(5 nM, 15 nM, 25 nM, 50 nM 및 100 nM)의 효과를 MTT 분석한 것이다.
- [0131] 세포의 활성에 fk506가 미치는 효과를 평가하기 위하여, 전조골 세포인 MC3T3-E1 세포를 상이한 농도(5 nM, 15 nM, 25 nM, 50 nM 및 100 nM)의 fk506를 함유하는 웰에 접종하고, 1일, 3일, 5일 및 7일간 배양기에서 MTT 분석을 수행하였다. 측정된 광학 밀도를 통해 생존 세포 수를 확인하였다. 도 5A 및 도 5B에 도시된 바와 같이, 모든 fk506 농도에서 3 일, 5 일 및 7 일 배양 후 생존 세포의 수는 증가하였는데, 이는 fk506은 독성이 없고 세포 증식을 방해하지 않는다는 것을 의미한다. 또한, 낮은 fk506 농도(5 nM, 15 nM 및 25 nM)에서의 광학 밀도는 대조군(배지로 처리된 세포)의 광학 밀도 보다 높았는데, 이는 fk506이 낮은 농도에서 세포 성장을 강화하는 것을 의미한다.
- [0133] 실험예 5. CS/TOCNF 하이드로겔의 fk506의 약물 방출 분석
- [0134] 도 6은 겔화제 중 0.5M 중탄산나트륨을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔의 fk506의 누적 방출 속도를 UV 분광법으로 나타낸 것이다.
- [0135] 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 fk506가 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔로부터의 fk506의 누적 방출 속도를 UV 분광법으로 측정하였다.
- [0136] 상기 fk506은 골생성 분화를 촉진하고 감염을 방지하기 위해 투입된 것이다.
- [0137] 도 6을 참조하면, fk506의 초기 방출량은 최초 1시간 후 원래의 양의 66.5%였고 다음 24시간 후에는 89.9%까지 증가하였다. 누적 방출 속도는 최초 몇 시간 초기 방출 후 1일까지 점진적으로 나타났다. 따라서, NaHCO_3 첨가

에 의해 fk506 방출 속도를 지연시켰다.

[0139] 실험예 6. 생체 내 골 재생 효과 분석

[0140] 골 재생을 촉진하기 위해 fk506을 포함하는 CS/TOCNF 하이드로겔을 골 결손부에 주입 및 충전하였다.

[0141] 도 7은 임계 크기의 쥐 두개골 결손부에 fk506이 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔을 이식한 모습을 나타낸 것이다.

[0142] 도 7에 도시된 바와 같이, 하이드로겔은 용액 상태로 주입했고, 체온에 접하면 신속하게 고체로 변형되었다. 하이드로겔의 신속한 겔화로 인해 주입 부위로부터 용액의 확산이 제한되는 효과가 있다.

[0143] 도 8은 동물 모델에 fk506이 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔을 이식 한 후 3주, 6 주 후의 마손 트리크롬(Masson's Trichrome)을 이용한 염색 결과를 나타낸 것이다(HB: 숙주 골, 화살표 : 신생골, S: sample).

[0144] 도 8을 참조하면, 저배율에서는 이식부의 관찰이 가능하고, 고배율에서는 결손부의 경계면이 관찰되었으며, 대조군(control) 그리고 CS/TOCNF 하이드로겔과 비교하여 fk506이 포함된 CS/TOCNF 하이드로겔에서는 기질세포형성과 이식재의 주변부에서 신생 골의 형성이(3 주 후) 확인되었으며, 이식 후 6주 후에도 하이드로겔이 남아 있는 것을 확인할 수 있다.

[0145] 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 fk506이 포함된 하이드로겔을 결손 부위에 이식하면 상기 fk506이 포함된 하이드로겔의 분해 속도를 저하시켜 장시간 동안 골 형성을 유도할 수 있는 효과가 있다는 것을 의미한다.

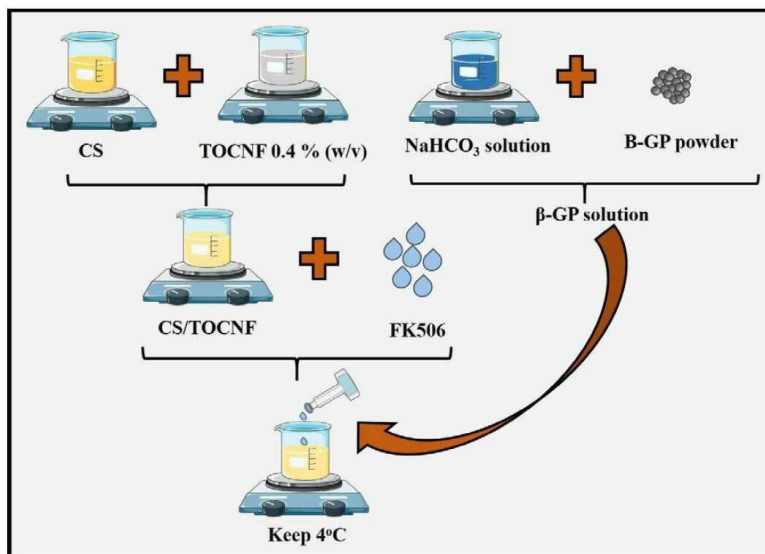
[0147] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

부호의 설명

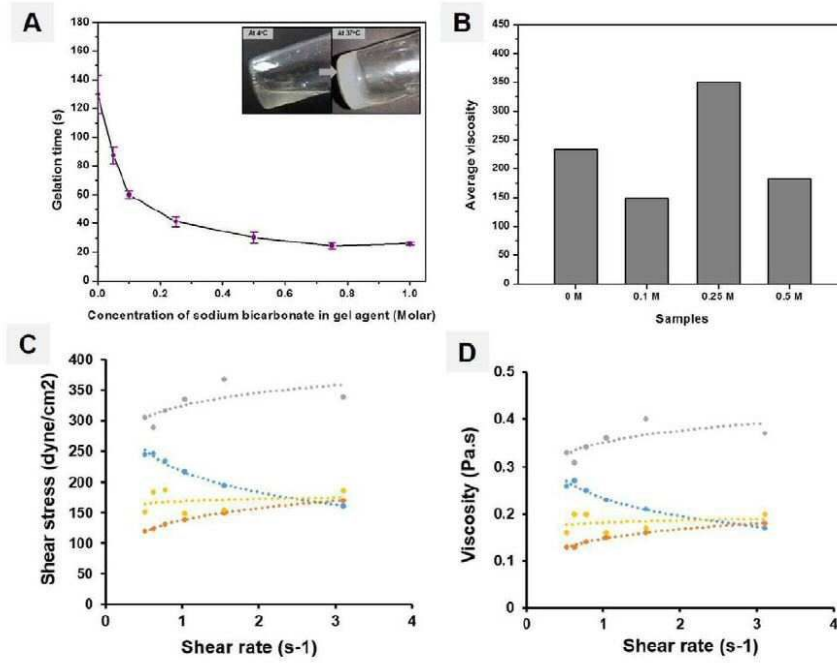
[0148] 도 1

도면

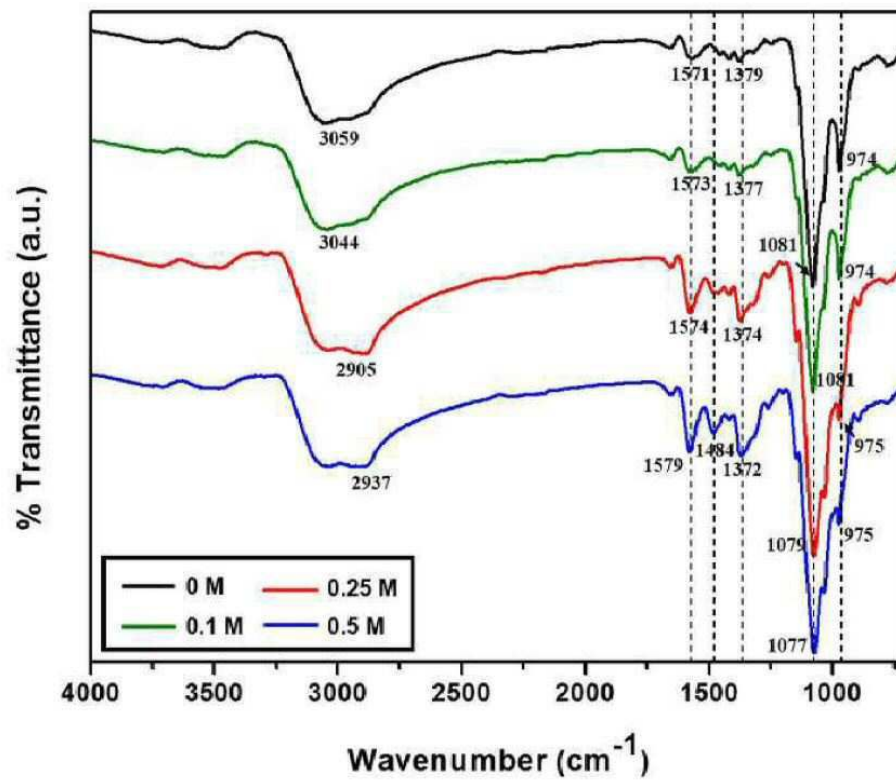
도면1



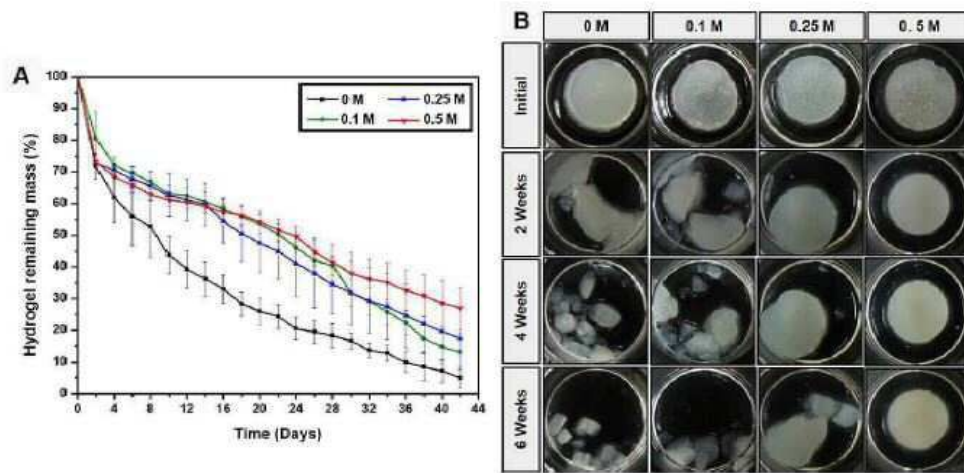
도면2



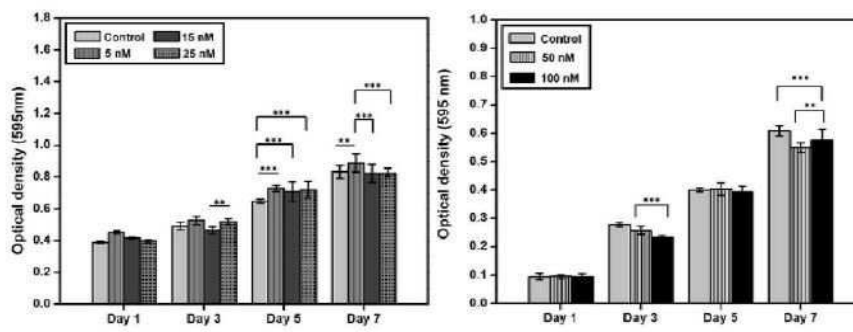
도면3



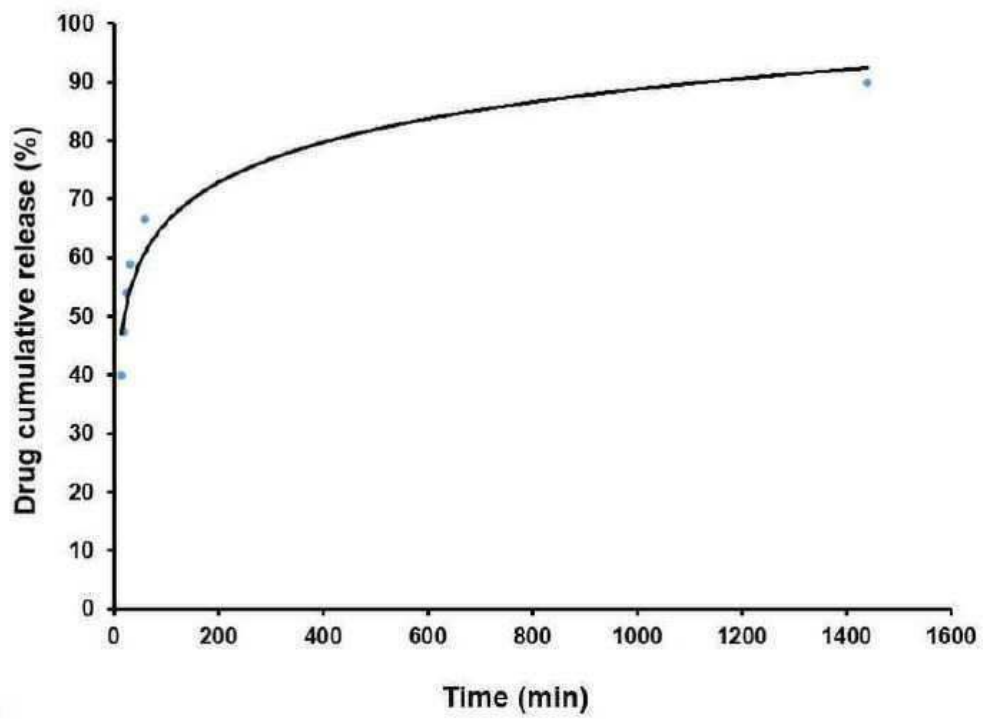
도면4



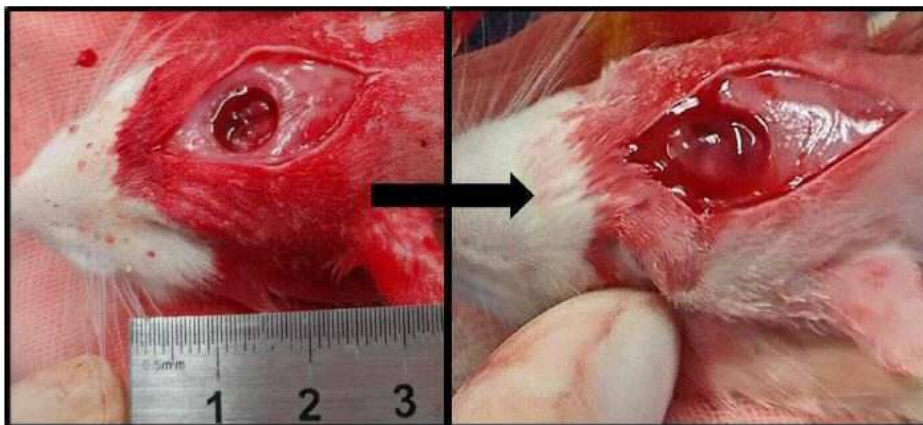
도면5



도면6



도면7



도면8

