(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 12 월 12 일 (12.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/183976 A1

(51) 국제특허분류:
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
A61L 27/14 (2006.01) *C08L 101/16* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005094

(22) 국제출원일: 2013 년 6 월 10 일 (10.06.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0061818 2012 년 6 월 8 일 (08.06.2012) KR

(71) 출원인: **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이승진 (LEE, Seung Jin)**; 150-937 서울시 영등포구 여의도동 43-4 롯데캐슬아이비 102 동 2804 호, Seoul (KR). **심인경 (SHIM, In Kyung)**; 121-190 서울시 마포구 창전동 서강해모로아파트 103 동 202 호, Seoul (KR). **양영일 (YANG, Young Il)**; 608-040 부산시 남구 문현동 189-59, Busan (KR). **장양수 (JANG, Yang Soo)**; 137-826 서울시 서초구 방배본동 방배대림아크로리버 101 동 701 호, Seoul (KR). **정미라 (JUNG, Mi Ra)**; 122-940 서울시 은평구 증산동 204-40 대도빌라 201 호, Seoul (KR). **정혜진 (CHUNG, Hye Jin)**; 121-846 서울시 마포구 성산 1 동 210-26 503 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 135-973 서울시 강남구 테헤란로 87 길 36, 6 층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), Seoul (KR).

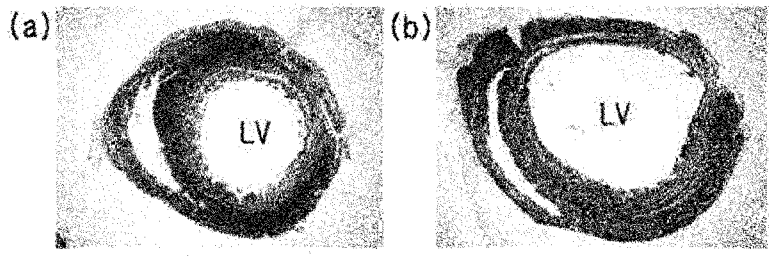
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PATCH FOR TISSUE REGENERATION, COMPRISING FIBROUS POROUS THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD

(54) **발명의 명칭** : 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 조직 재생용 패치



AA ... Cardiac stem cell-seeded patch
BB ... Patch without cardiac stem cells

(57) **Abstract**: The present invention relates to a patch for tissue regeneration and a preparation method therefore, the patch for tissue regeneration comprising: a fibrous porous three-dimensional scaffold; and a cell, a drug, a bioactive material or a combination thereof provided on the surface of or contained inside the scaffold. According to the present invention, the patch for tissue regeneration has elasticity and flexibility due to the shape of fluff in which biodegradable polymer fibers capable of being distanced from each other are tangled, and thus the volume or thickness thereof can be increased or decreased according to the transplanted environment. In addition, since the size and thickness of pores can be expanded, a space sufficient for the proliferation and movement of cells is secured. Therefore, if the patch of the present invention is adhered to a damaged tissue remarkable tissue regeneration effects are displayed, and thus the patch can be useful in the tissue regeneration therapeutics field.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/183976 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 섬유형 다공성 삼차원 지지체; 및 상기 지지체 표면 또는 내부에 함유되어 있는 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합;을 구비한, 조직 재생용 패치 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조직 재생용 패치는 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털 형태의 특성으로 인하여, 이식되는 환경에 따라 부피 또는 두께가 확장 또는 축소될 수 있는 신축성 및 유연성을 가지고 있으며, 공극의 크기 및 두께를 부풀릴 수 있어 세포가 증식하고 이동할 수 있는 충분한 공간이 확보되는 특징이 있다. 이에, 본 발명의 패치를 손상된 조직에 부착할 경우, 우수한 조직 재생 효과가 나타나는 바, 조직 재생 치료 분야에서 유용하게 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 조직 재생용 패치

기술분야

[1] 본 발명은 섬유형 다공성 삼차원 지지체; 및 상기 지지체 표면 또는 내부에 함유되어 있는 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 구비한, 조직 재생용 패치 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 사고나 질병에 의한 조직 및 장기 손상의 완벽한 회복을 위하여, 해당 조직과 장기를 자기신체의 일부 혹은 타 조직을 이용하여 그 기능을 복원시키는 것이 필요하다. 하지만 수요에 비하여 턱없이 부족한 공급 상의 문제와 면역 거부반응, 질환의 오염, 사회적 문제 등을 야기하여 적용에 많은 제약이 따르고 있다.

[3] 특히 심장의 경우 한번 손상을 입으면 회복이 불가능한 조직으로 알려져 있었다. 최근 정상심장에서도 심근세포의 교체로서 심근세포의 분열과 소실이 느리기는 하지만 일어나고 있음이 보고되고 있으나, 기존의 내과 치료법으로는 손상 받은 심근세포의 수를 늘릴 수 있는 방법이 없다. 더욱이 중증 말기 심부전 환자의 경우는 이미 심장의 기능을 회복시킬 수 없기 때문에 심장이식술(heart transplant)이나 심실 보조 장치(ventricular assist device)를 사용하는 방법밖에 없다. 이에, 손상 조직의 회복을 위하여 세포를 이용한 세포이식 치료제가 대안으로 떠오르고 있다.

[4]

[5] 세포 이식 치료제를 사용하여 세포 이식에 성공하기 위해서는 이식 후 세포의 생착률을 극대화하는 것이 중요하다. 이미 분화가 완료된 세포보다는 최종 분화까지 진행되지 않아 분열 능력을 갖고 있는 세포가 이식 후 생착력, 적응력이 좋다고 알려져 있다. 또한, 심근 세포의 경우는 주변 조직과의 전기적 신호전달을 통해 일관성 있게 움직이는 특징을 갖고 있어, 심근에 세포를 이식하고 심기능 개선을 유도하기 위해서는 이식된 세포가 기존의 조직과 잘 융합하여 동일한 신호전달 체계로 움직이는 것이 필요하다.

[6] 세포이식에 사용되는 세포는 성체줄기세포로부터 분리된 근모세포(myoblasts), 심근세포(cardiomyocytes), 내피세포(endothelial cells), 섬유아 세포(fibroblasts), 또는 심혈관 형성을 유도하는 줄기세포 등이다.

[7] 근육 아세포(skeletal myoblast) 또는 근육세포(skeletal myocyte)를 이용하여 죽은 심장조직을 대체하고자 하는 연구들이 진행 중에 있다. 이는 환자의 근육 조직을 일부 채취하여 근육 아세포를 분리하고 증식시켜 심장에 이식하는 것인데, 이들 세포는 세포간 갭정션(intercellular gap junction)을 형성하지

못하므로 부정맥을 유발할 위험을 갖는다.

[8] 최근 줄기세포의 연구가 활성화되면서, 손상된 조직의 치료를 위해 미분화 상태의 줄기세포를 심근 손상 부위에 이식한 결과 심장기능이 개선되는 것이 보고되고 있다. 심장 재생이 가능한 세포군 개발의 목적으로 심근경색 이후 치료를 위해 자가 골수 유래 세포를 이용하는 것을 테스트하는 임상 시험이 진행중이다(Perin et al., Circulation 107:2294, 2003; Strauer et al., Circulation 106:1913, 2002; Zeiher et al.,Circulation 106:3009, 2002; Tse et al., Lancet 361:47, 2003; Stamm et al., Lancet 3661:45, 2003). 상기 시험에서는 세포가 심장 조직의 혈액 관류를 개선하는 정화 기능을 가질 수 있다고 가정하였다.

[9] 또한, 심장 치료를 위해 자가 골격근 근모세포의 사용을 테스트하기 위한 임상 시험도 진행중이다(Menasche et al., J. Am. Coll.Cardiol. 41:1078, 2003; Pagani et al., J. Am. Coll. Cardiol. 41:879, 2003; Hagege et al., Lancet361:491, 2003). 그러나, 줄무늬근 세포의 수축이 심박동과 적당하게 함께 기능할 수 있는지는 분명하지 않다.

[10]

[11] 상기와 같은 줄기세포를 투여하는 방법으로는 심장병 환자의 심장내 주입(intramyocardial delivery)과 외과 시술적으로 심근에 직접 주사하는 방법, 카테터를 이용해 관동맥 등으로 주입하는 방법과 정맥혈관주사 같이 전신 투여하는 방법 등이 있다. 하지만 주입된 세포의 생착률(bioretention)은 매우 낮은 상황이며, 보고에 의하면 심장의 특수성으로 인해 주입된 심근세포의 약 10% 정도만이 심근조직 재생에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 따라서 지속적인 심근조직 재생을 위해서는 환자에게 심근세포의 주입빈도를 높일 수밖에 없으며 환자의 고통도 커지는 상황에 처하게 된다. 또한 실제 이식되는 세포의 수가 매우 적어 이식 시 고농도의 세포 수를 사용해야 하는 문제점이 있으며, 고농도의 세포를 이식하여도 이식된 부위에서 분화할 때까지 세포가 머물러 있기에 열악한 환경 조건이므로 기대이상의 치료 효과를 보기에 한계가 있다.

[12]

[13] 이에 심장 조직에 이식할 때, 세포 시트의 형태로 이식되는 것이 고려되고 있다. 세포시트는 단일 세포(single cell)층을 의미하는 것으로서, 신생아의 심근 세포를 단층의 시트로 만들고 이 시트를 시험관내에서 최대 3층으로 중첩시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(비특허 문헌 11: FASEB J. 2006 Apr; 20(6): 708-10). 최근 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) (PIAAm)를 시판되는 폴리스티렌 배양접시 표면에 전자선을 사용하여 도포한 온도 감응성 배양접시를 사용함으로써, 각종 세포시트를 제작하는 것에 성공하였다. 또한, 세포시트를 적층화함으로써 이식편으로서 이용 가능한 심근조직 덩어리를 개발한 것이 이미 보고되어 있다(일본 공개특허공보 제2003-38170호, 국제 공개공보 제01/068799호, Shimizu et. Al. : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell

sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surface: CircRes. 2002; 90: e40-e48). 이렇게 제조된 심근조직 덩어리는 생체 외(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 정상 심근조직과 동일한 전기활동을 하는 것이 확인되어 있다.

[14] 그런데 상기 온도 감응성 배양접시를 사용한 세포시트의 제작법은, 본 특수 배양접시에서의 배양에 최적상태가 되도록 엄격한 방법으로 초대 배양했을 때에는 비교적 안정적으로 세포시트를 제작하는 것이 가능하지만, 각 시설에서 관례적으로 실시되어 온 방법을 그대로 적용하였을 때에는 세포의 시트화는 곤란하였다. 또한, 세포시트를 적층하는 방법을 이용함으로써 세포가 눌리는 현상이 발생하여 세포 생존율이 낮은 문제와, 산소 투과성의 한계로 인해 혈관의 신생 없이는 세포 시트를 그 이상의 두께로 만들 수 없는 문제점이 있다. 또한, 심장의 환부 조직의 크기에 맞게 임의의 세포 시트를 제조하는 것은 아직 불가능한 실정이다.

[15] 따라서 세포를 다량으로 이식하고 산소투과성을 개선하기 위하여 지지체를 사용하여 세포를 이식하는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 지지체의 성질은 심장과 같은 장기에 세포를 전달하기 위해 우선 세포를 파종하고 배양할 터전으로서 충분한 기능, 그리고 어느 정도의 기계적 강도를 갖는 것이 중요하다. 즉, 배양 시에 세포를 균일한 분포상태로 안정되게 보유・생착시키고, 양호한 증식 생존성을 확보할 수 있는 것이 필요하며, 부가하여 배양 후 환부에 이식 시 봉합 등의 고정 처리가 가능해야 한다. 또한, 심장의 박동(beating)에 따른 압축을 견디는 기계적 강도를 가진 지지체를 이용하는 것이 필요하다.

[16] 지지체를 이용한 세포이식 기술은 많이 보고되고 있다. 세포를 고분자물질에 혼합하여, 지지체 형태로 세포의 생착을 높이려는 시도의 일환으로 Leor 등은 심근 조직 재생을 위해 사용될 수 있는 고분자 지지체가 가져야 할 물성으로써 비독성, 생분해성, 생활성(bioactive), 유연성 등을 제시하였으며 (Pharmacology & Therapeutics. 2005;105:151-163), Cannizzaro 등은 폴리에틸렌글리콜 공중합체에 세포점착을 유도하는 RGD 펩티드 시퀀스를 도입하여 폴리에틸렌글리콜 공중합체에 대한 내피세포의 점착성을 증대시킴으로써 심근조직 재생을 도우려는 시도를 보고하였다(Biotechnol Bioeng. 1998;58:529-535).

[17] 또한, Piao 등은 실험쥐에 심근경색(myocardial infaction, MI)을 유도한 후 생체적합성을 보유한 글리콜리드와 카프로락톤계의 공중합체상에서 골수유래세포를 배양한 후, 골수유래세포를 함유하는 고분자 중합체를 심근경색부위에 이식하여 향상된 심장기능을 얻음을 보고하였다(Biomaterials.2007;28:641-649).

[18] 그러나, 상기 연구는 고분자 중합체 및 고분자 지지체의 초기 단계를 기술한 것으로 심화된 연구가 필요하다. 상기 연구에서 사용되었던 지지체들은 열린 구조를 위한 공극을 갖지 못하는 등 단층의 멤브레인(membrane) 형태로서, 2차원의 메트릭스 지지체를 사용하여 세포 생존율에 문제가 있으며, 신체 내 장기에 부착하기 위해 수술적인 방법을 사용하였을 경우 찢어지는 등

조작(handling)에 문제가 있다. 또한, 심장과 같은 경우 고밀도의 세포가 이식되어야하기 때문에 지지체의 공극이 크고 공극률이 90% 이상이 되어야 하므로 적용하는데 문제가 있었다.

[19] 특히 Piao 등이 실험에 사용한 지지체는 스폰지 타입(sponge type)의 지지체로서, 공극률이 작으며 지지체 내부까지 세포 이식이 어려운 문제가 있었다. 또한, 이는 형태가 일정하기 때문에 심장과 같은 장기의 곡면 표면을 갖는 재료에 직접 적용하기 어려운 문제가 있다.

[20]

[21] 이에 본 발명자들은 종래 사용되던 방법인 2차원적인 세포 배양 결과물을 이식하는 방법 대신 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털 형태의 삼차원 지지체를 이용하여 일정한 두께 및 공극률을 보유하는 패치를 제조하고 이에 세포 또는 약물을 함유토록 한 후 심장에 직접 부착한 결과, 조작의 어려움 없이 조직에 직접적인 부착이 가능하며, 지지체의 신축성으로 인하여 부착된 조직의 팽창 또는 수축, 세포의 증식 및 이동에 연동하여 가역적으로 팽창 또는 수축이 가능함을 확인하였다. 또한, 염증성 세포의 침윤을 막고, 주변 조직과의 적합성이 있는 생체 본래의 조직에 가까운 성질을 가질 뿐만 아니라, 조직 재생 효과가 유의하게 개선되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[22] 본 발명의 목적은 손상된 조직의 치료를 위하여, 손상된 조직으로의 세포, 약물, 또는 생리활성물질의 전달 성공률이 높고, 부착된 조직의 팽창 또는 수축에 연동하여 가역적으로 1차원적, 2차원적, 또는 3차원적으로 팽창 또는 수축이 가능한 신축성이 우수하며, 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합이 허혈 부위로 이동함으로써 손상된 조직의 혈관생성을 증가시키며 조직 재생을 촉진시키는, 조직 재생용 패치를 제공하는데 있다.

[23] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조직 재생용 패치를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[24]

과제 해결 수단

[25] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 삼차원 지지체; 및 상기 지지체 표면 또는 내부에 함유되어 있는 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합;을 구비한, 조직 재생용 패치를 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 (a) 생분해성 고분자를 단독 또는 혼합하여 유기 용매에 용해시켜 방사액을 제조하는 단계; (b) 상기 방사액을 방사기를 이용하여 방사함과 동시에 상기 유기용매를 휘발시켜 생분해성 고분자 섬유들이 서로

이격 가능하면서 서로 얽힌 지지체를 제조하는 단계; (c) 상기 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태의 지지체를 제공하는 단계; (d) 상기 지지체에 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 도입시키는 단계를 포함하는, 조직 재생용 패치의 제조방법을 제공한다.

[27]

[28] 기존의 조직 재생을 위한 지지체는 열린 구조를 위한 공극을 갖지 못하는 단층의 멤브레인 형태 또는 얇은 층의 신축성이 없는 형태를 가져 조직으로의 이식시 찢어지거나 장기의 곡면 표면에 손쉽게 밀착되어 부착될 수 없었다. 또한, 공극률이 작으며 지지체 내부까지 세포 이식이 어려운 문제가 있었다.

[29] 이러한 배경하에, 본 발명에서는 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 삼차원 지지체를 제조하였다. 또한, 상기와 같은 구조 및 형태적인 특성으로 인해, 본 발명의 패치에 포함되는 지지체는 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀릴 수 있다.

[30] 본 발명의 일 실시예에서는 전기 방사를 통해 제조된 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털 형태의 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피와 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀린 결과, 지지체의 두께가 1cm 이상으로도 부풀려질 수 있음을 확인하여, 본 발명의 지지체는 주변 환경에 따라 유연하게 가역적으로 팽창 또는 수축이 가능할 수 있음을 확인하였다(실시예 1).

[31] 즉, 본 발명의 조직 재생용 패치가 심장과 같은 조직에 이식되었을 경우, 본 발명의 패치는 심장의 박동(beating)에 따른 압축을 견디는 기계적 강도를 가지면서, 심장의 수축과 팽창에 따라 패치도 연동적으로 수축 또는 팽창할 수 있는, 요컨대, 지지체가 이식된 환경에 따라 부피 또는 두께가 조절될 수 있는 신축성을 가짐을 알 수 있다.

[32] 또한, 본 발명의 조직 재생용 패치는 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀릴 수 있는 솜털 형태를 가지므로, 패치에 시딩된 세포가 눌리지 않고, 증식 및 허혈부위로 이동할 수 있는 공간이 확보되고, 공극의 직경을 확장할 수 있어 산소 투과성이 확보될 수 있다.

[33] 본 발명의 일 실시예에서는 심장 줄기세포 및/또는 성장인자가 포함된 조직 재생용 패치를 손상된 동물의 심근 조직에 이식한 결과, 패치 내에 함유된 줄기세포가 장기간 패치 내에 생존해 있으면서 증식하고, 심근 안쪽으로 이동하고, 심근 세포로 분화됨으로 확인하였다. 또한, 이에 따라 허혈 부위 및 이식 조직에서 혈관이 생성되고, 좌심실 전벽 두께가 증가하고, 우수한 심근 재생이 나타나는 것을 확인하였다.

[34] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 삼차원 다공성 지지체를 사용하여 줄기세포를 이식한 경우, 줄기세포를 손상된 부위에 직접 이식한 경우와 피브린

겔을 사용하여 줄기세포를 이식한 경우에 비해 이식된 부위에서는 세포의 생존률 및 유지율이 현저히 높음을 확인할 수 있었다.

[35] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 삼차원 다공성 지지체에 유전자를 안정적으로 로딩할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 국소적으로 유전자를 조절 방출할 수 있음을 확인하였다.

[36] 따라서, 본 발명의 조직 재생용 패치는 목적 조직에 직접 부착될 수 있으며, 심장의 특수성으로 인해 주입된 세포의 생존률 및 심근 조직 재생에 영향을 미치는 세포의 수가 낮은 문제점을 해결하여 손상된 부위에서 높은 비율로 줄기세포를 생착 및 유지시킬 수 있으며, 손상된 조직 부위에서 혈관 생성을 증가시켜 조직 재생을 촉진시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[37]

[38] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[39]

[40] 하나의 양태로서, 본 발명은 조직 재생용 패치를 제공한다.

[41] 본 발명의 조직 재생용 패치는 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 삼차원 지지체; 및 상기 지지체 표면 또는 내부에 함유되어 있는 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[42] 상기 삼차원 지지체는 고분자 섬유들이 서로 붙지 않고 각각 분리될 수 있으며, 이러한 고분자 섬유들이 서로 얽혀 섬유간에 공극이 생기며, 섬유들이 2차원적으로 서로 붙어 있지 않은 솜털 형태를 가진다. 구체적으로 도면 2의 사진에 나타난 바와 같으며, 상기 지지체는 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 지지체의 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태로 제조될 수 있다.

[43] 구체적으로, 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 특성으로 인해, 부착된 조직의 팽창 또는 수축에 연동하여 가역적으로 1차원적, 2차원적 또는 3차원적으로 팽창 또는 수축이 가능하다. 예를 들어, 심장 조직에 이식될 경우, 심장의 박동 또는 심장의 모양에 따라 본 발명의 지지체는 가역적으로 팽창 또는 수축될 수 있다. 또한, 삼차원 지지체 내 도입된 세포가 증식됨에 따라서도 지지체의 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극 크기가 조절될 수 있다.

[44] 또한, 종래 삼차원 지지체들의 경우 스폰지 형태로 제조되는바, 손상된 조직에 부착시 원상태로 회복되는 성질로 인하여 부착력이 저하되었으나, 본 발명에 따른 패치는 다공성 삼차원 지지체의 형태로서 손상된 부위에 대한 부착력이 우수하고, 지지체의 우수한 신축성으로 인하여 이식되는 조직에 모양 또는 장기의 곡면 표면에도 직접 부착이 가능하다.

[45] 본 발명의 조직 재생용 패치에 있어서, 본 발명의 패치는 산소 투과성, 세포의 증식 및 이동 공간의 확보, 조직의 특이성을 고려하여 두께가 적절히 설정될 수

있으며, 환부를 보호하기 위해 필요한 사이즈로 제작될 수 있다.

[46] 이에 제한되는 것은 아니나, 패치의 두께는 50 ㎛ 이상 1.5 ㎝ 이하인 것이 바람직하며, 심장에 적용할 경우에는 바람직하게는, 0.5 내지 3.5 mm 두께, 보다 바람직하게는 1 내지 3 mm 두께이다. 상기 패치의 두께는 제조시 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피를 확장하여 조절하는 것이 바람직하다. 방사기를 통해 최초로 제조된 지지체에 물리적인 힘을 가해 전체 부피를 2배 이상 확장하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 전체 부피를 2 내지 15배 확장하는 것이다.

[47] 본 발명의 일 실시예에서는 물리적 확장으로 너무 두껍게 부풀린 지지체의 경우 세포가 들어가지 않은 부분이 발생하는바, 이식될 조직에 특성에 맞게 패치의 두께를 조절하는 것이 바람직하다.

[48]

[49] 상기 패치를 이루는 지지체의 공극의 크기와 분포는 세포 성장을 결정짓는 매우 중요한 요소이며, 서로 연결된(inter-connecting) 구조이어야 영양액이 지지체 내부까지 고르게 침투하여 세포가 잘 성장한다. 상기 패치는 공극의 직경이 50 ㎛ 이상 300 ㎛ 이하인 것이 바람직하며, 100 ㎛인 것이 가장 바람직하다. 이는 세포의 침투, 영양분과 노폐물의 배출이 원활히 이뤄질 수 있는 크기로 이식된 세포의 성장을 돕고, 이식 후 혈관이 쉽게 자라 들어올 수 있는 구조로서, 공극의 직경 확장을 위해 일 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가할 수 있다. 또한, 이러한 공극의 확장으로 인해, 본 발명의 지지체는 30 내지 90%의 공극률을 보유할 수 있으며, 바람직하게는 50 내지 90%의 공극률을 보유하여 3차원 지지체를 유지함으로써 조직 재생용 세포의 성장을 향상시킬 수 있다.

[50] 상기 지지체의 형상 및 면적에 대해서는 특별히 한정은 없고, 손상된 부위를 덮기 위한 충분한 사이즈의 것으로 제조될 수 있다.

[51]

[52] 또한, 본 발명의 삼차원 지지체는 배향성을 가질 수 있다.

[53] 심장 근육은 방향성을 갖고 있고, 압력을 견뎌야 하기 때문에 일정한 방향으로 배향된 네트워크 형태의 패치가 필요한 상태이다.

[54] 이에 본 발명에서는 전기 방사로 지지체를 제조할 시 일반적인 스테인레스스틸 판의 컬렉터 대신에 원통형 드럼의 컬렉터로 교체하고 회전 속도를 1000 rpm 이상으로 하여 한 방향으로 배향된 네트워크 형태의 패치를 제조하였다.

[55] 상기 배향성을 갖는다는 것은 섬유길이 방향의 분포도가 무작위적이지 아니하고 일정한 방향이 부여된 것으로서, 도면 4에 나타난 바와 같다.

[56] 본 발명의 일 실시예에서는 배향성을 갖는 다공성 섬유형 삼차원 지지체를 제조하고 이에 줄기세포 또는/및 성장인자 약물을 포함시킨 결과, 세포가 방향성을 가지면서 증식이 향상되며, 심근 섬유 본래의 모양과 유사한 형태로 증식함을 확인할 수 있었다. 또한, 성장인자가 섬유 내에 고르게 분포되어

있으며, 지속적인 약물 방출이 가능함을 확인할 수 있었다.

[57]

[58] 본 발명의 손상된 조직 재생용 패치는, 손상된 조직이 존재하여 세포전달이 요구되는 대부분의 장기에 직접 부착하여 조직 재생이 가능하며, 패치 형태로 부착 가능한 장기이면 어느 장기이든 가능하다. 특히, 손상된 조직이 존재하는 심장, 간, 피부, 골, 신경, 또는 췌장에 부착하여 손상된 조직을 재생시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59] 예를 들어, 심장 줄기세포가 함유된 패치를 심장에 부착시킬 경우 심장 줄기세포는 심근세포로 분화되며 이식 세포는 심근세포가 손상된 주변 심근경색 부위 등 주변 심장조직으로 이동하여 손상된 조직을 재생 가능하다.

[60]

[61] 본 발명의 손상된 조직 재생용 패치에 있어서, 상기 지지체에 함유되어 있는 세포는 줄기세포인 것이 바람직하다.

[62] 성체 줄기세포는 지방 유래 줄기세포, 제대혈 유래 줄기세포 및 골수 유래 줄기세포 등을 사용할 수 있다. 특히 손상된 심장조직의 재생을 위해 심장세포로 분화가 잘 되고 심장 재생 효과가 있으며, 심장 조직 내로 이동이 가능한 심장 줄기세포를 사용하는 것이 바람직하다. 또한 본 발명에서는 쥐 심장의 심근 줄기세포를 이용하고 있으나, 이에 한정되지 않고, 인간, 래트(rat), 마우스(mouse), 원숭이 등을 포함하는 모든 종류의 포유류 종에서 채취한 줄기세포에 유사하게 적용된다. 줄기세포를 함유한 패치를 손상된 조직에 이식하면, 줄기세포가 해당 조직의 세포로 분화됨을 확인할 수 있다. 특히 심장 줄기세포를 사용한 경우 심장 특이적 마커를 이용하여 분화 가능하다. 이 마커들은 MHC(myosin heavy chain), cTnI(cardiac troponin I), cTnT(cardiac troponin T), α-cardiac actin, α-actinin 그리고 MLC2(myosin light chain) 등을 포함하며 이들만으로 제한되지는 않는다. 이런 세포의 표현형으로는 리듬감 있는 수축, 심장과 연관된 마커의 발현으로 평가될 수 있다.

[63] 또한, 본 발명의 손상된 조직 재생용 패치에 있어서, 손상 조직의 빠른 회복을 위하여 패치 내에 약물을 적용할 수 있다. 상기 약물은 조직 재생에 관여하는 유전자, 줄기세포의 성능을 개선시키는 유전자 또는 재생 단백질을 사용할 수 있다.

[64] 특히, 상기 재생 단백질은 혈관 내피 성장 인자인(VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 뉴로필린 , (FGF)-1, FGF-2 (bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, 안지오포이에틴 1, 안지오포이에틴 2, 에리쓰로포이에틴, BMP-2, BMP-4, BMP-7, TGF-베타 , IGF-1, 오스테오폰틴, 플레이오트로핀, 액티빈, 엔도쎌린-1으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 혈관 내피 성장 인자는 독립적으로 또는 서로 조합되어 작용할 수 있는데, 조합 시 혈관신생인자는 상승적으로 작용하여 별도의 개개 인자의 효과의 총합보다 효과가 크다.

[65] 본 발명의 일 실시예에서는 약물의 하나로서, 혈관 내피 성장인자인 VEGF를 지지체 내에 포함시킨 후, 이들의 방출 속도를 확인한 결과, 시간에 따라 서서히 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 줄기세포와 혈관 내피 성장인자를 함께 지지체에 포함시켜 손상된 조직에 이식한 경우, 혈관 내피 성장인자만을 함유한 지지체에 비해 조직 재생 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[66] 이와 같이 약물을 지지체 내에 포함시켜 약물 전달이 가능한 바, 조직 재생 효과를 극대화시킬 수 있으며, 특히 재생 기간 동안 서서히 방출시킴으로써 효과를 높일 수 있다.

[67] 상기 세포 또는 줄기세포는 지지체 표면 또는/및 내부에 포함시킬 수 있다.

[68]

[69] 본 발명의 손상된 조직 재생용 패치에 있어서, 상기 생분해성 고분자 재질의 삼차원 지지체는 가공성, 멸균성, 감염성의 점에서 가수분해에 의해 분해할수 있는 합성 폴리머로 제조되는 것이 바람직하고, 특히 α 및 β-히드록시카르복실산의 가수분해성 폴리머로 제조되는게 바람직하다.

[70] 이에, 상기 생분해성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리엘-락트산(PLLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 폴리(카프로락톤), 디올/디애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄 등의 생분해성 지방족 폴리에스테르, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트) 및 폴리(하이드록시 발러레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 합성 고분자를 사용하는 것이 바람직하고, 분자량이 10만 내지 35만 kD의 폴리락트산(PLA)을 사용하는 것이 더욱 바람직하고, 폴리엘-락트산(PLLA)을 사용하는 것이 가장 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[71]

[72] 다른 양태로서, 본 발명은 조직 재생용 패치의 제조방법을 제공한다.

[73] 구체적으로, (a) 생분해성 고분자를 단독 또는 혼합하여 유기 용매에 용해시켜 방사액을 제조하는 단계; (b) 상기 방사액을 방사기를 이용하여 방사함과 동시에 상기 유기용매를 휘발시켜 생분해성 고분자 섬유들이 서로 이격 가능하면서 서로 얽힌 지지체를 제조하는 단계; (c) 상기 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태의 지지체를 제공하는 단계; 및 (d) 상기 지지체에 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 도입시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[74]

[75] 상기 단계 (a)에서, 고분자 용액인 방사액을 제조하기 위해 사용되는 유기용매로는 낮은 비등점을 갖는 휘발성 유기용매이기만 하면 어느 것이라도 사용가능하며, 클로로포름, 디클로로메탄, 디메칠 포름 아미드, 디옥산, 아세톤,

테트라 하이드로퓨란, 트리플루오르에낱, 1,1,1,3,3,3,-헥사플루오르 이소프필 프로판올 또는 이들의 조합을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 휘발성이 높은 디클로로메탄과 용해도가 매우 낮은 아세톤의 공용매가 적당하다.

[76] 상기 단계 (b)는, 상기 방사액을 방사기를 이용하여 지지체를 제조하는 단계이다. 상기 방사기는 전기 방사기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 전기방사기를 이용하여 섬유를 제조할 경우, 방사과정은 다음과 같을 수 있다. 전압 발생장치에서 일정 전류를 흘려서 노즐과 컬렉터 사이에 전기장을 형성한 후 방사액 저장소에 충전된 고분자 용액을 전기장의 힘과 펌프의 압력에 의하여 방사한다. 전기 방사기의 조건은 방사거리 10~20 cm 이며 전압 10~20 kv, 방출속도 0.05~0.15 ml/min 이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[78] 고분자 용액 방사시 컬렉터 상에 집적될 때 용매가 전부 휘발되고, 정전기적 반발력이 작용하면서 고분자 섬유들이 서로 이격 가능하면서 서로 얽힌 형태로 집적되어 세미 마이크로 ~ 나노 크기의 다양한 직경을 갖는 섬유를 제조할 수 있고, 방사된 형태는 섬유가 얽힌 그물 형태로 적당한 공극을 함유한다.

[79] 상기 단계 (c)는 상기 방사기를 이용하여 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태의 지지체를 제공하는 단계이다.

[80] 또한, 추가적으로 일반적인 스테인레스스틸 판의 컬렉터 대신에 원통형 드럼의 컬렉터로 교체하고 회전 속도를 1000 rpm 이상으로 하여 한 방향으로 배향성을 갖는 솜털 형태의 지지체를 제조할 수 있다.

[81] 상기 물리적인 힘을 가해 전체 부피와 섬유들 사이의 공극을 부풀려, 상기 지지체는 두께가 50 ㎛ 이상 1.5 ㎝ 이하로 확장된 솜털 형태를 갖는 것이 바람직하다. 또한, 방사법으로 제조된 최초의 지지체의 부피에 대해서 약 2배 이상 확장시키는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 부피를 약 2배 내지 15배 확장하는 것이다.

[82] 상기 단계 (d)는, 상기 단계 (c)의 지지체에 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 도입시키는 단계로서 사용 가능한 세포로는 조직 재생을 유도할 수 있는 줄기세포, 분화유도 가능한 세포 등이 있으며 약물로는 조직 재생에 관여하는 유전자, 줄기세포의 성능을 개선시키는 유전자, 재생 단백질 등이 있다.

[83] 상기 패치를 제조하는 과정에서 고분자 용액에 수상의 약물용액을 에멀젼 방법으로 혼합하고 혼합용액을 방사하여 적층시킴으로써 약물 함임 패치를 제조할 수있다. 본 발명에 따른 에멀젼 단계에서 생분해성 고분자 용액에 분산되는 약물은 당업계에서 알려져있는 계면활성제, 예를 들면 스판 80등을 사용하여 생분해성 고분자 용액에 치료학적 유효량으로 유화시켜 유중 수형 에멀젼 형태로 균일하게 분산시킬 수 있다.

[84] 약물이 시딩된 패치를 손상된 조직에 이식하고 수성환경에 노출되면 함유하고 있는 단백질을 방출하게 된다. 방출 초기에는 패치로부터 확산되어 방출 되고,

지지체 자체의 분해가 시작되면 그 손실된 틈으로부터 방출량이 증가된다. 방출 속도와 양상은 단백질의 농도, 유/수 비율, 적용부위 등에 따라 다양하게 조절될 수 있다.

[85] 이와 같이 방사법으로 제조된 본 발명의 패치는 세포의 보유, 생육성이 뛰어나고, 또한, 이 지지체를 이용해서 조직 유래의 세포 또는 전구세포를 인공 환경 내 및(또는) 생체 내에서 배양함으로써, 생체이식 시에 염증성 세포의 침윤을 막고, 주변조직과의 적합성이 있는 생체 본래의 조직에 가까운 성질을 가지는 3차원 세포 결합체를 제작하는 것이 가능해진다.

발명의 효과

[86] 본 발명에 따른 조직 재생용 패치는 주사방법, 단일 세포(single cell) 및 2차원적 지지체 형태로 세포를 적용하는 방법에 비하여 조작(handling)이 쉽고, 이식 후 세포 생존 잔류성이 높아 세포이식이 필요한 질환 부위에서 세포 치료제의 치료 효능을 제고할 수 있다.

[87] 또한, 본 발명에 따른 조직 재생용 패치는 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털 형태의 특성으로 인하여, 이식되는 환경에 따라 부피 또는 두께가 확장 또는 축소될 수 있는 신축성 및 유연성을 가지고 있으며, 공극의 크기 및 두께를 부풀릴 수 있어 시딩되는 세포가 눌리지 않고, 세포가 증식하고 이동할 수 있는 충분한 공간이 확보되며 산소 투과성이 확보되어 세포의 증식, 이동, 및 혈관 생성이 촉진될 수 있다.

[88] 따라서 손상된 조직의 치료를 위하여 세포, 생리활성물질, 또는 약물이 함유된 생분해성 고분자 재질의 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 손상된 조직이 존재하는 장기에 직접 부착한 경우, 세포 전달 성공률을 높이고 세포가 허혈 부위로 이동함으로써 손상된 조직의 혈관생성을 증가시키며 조직 재생을 촉진시키는 효과가 있다.

[89]

도면의 간단한 설명

[90] 도 1은 실시예 1에 의해 제조된 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치의 (a) 실사이미지와 (b) 시차주사현미경 사진이다.

[91] 도 2는 전기방사를 통해 제조된 지지체에 물리적 힘을 가하여 공극과 지지체량 당 용적을 넓힌 상태로 지지체의 두께가 1 ㎝ 이상 부풀려질 수 있음을 나타낸 사진이다.

[92] 도 3은 전기방사를 통해 제조된 지지체에 물리적 힘을 가하여 공극과 지지체량 당 용적을 점차적으로 넓혀, 지지체의 가역적 신축성을 확인한 것이다. 한편, 가장 오른쪽에 있는 지지체는 2차원 막구조의 지지체로서, 본 발명의 3차원적 지지체와 구조 및 섬유간 공극, 공극률에서 확연히 차이가 남을 보여준다.

[93] 도 4는 배향성을 갖도록 제조된 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치의 시차주사현미경 사진이다.

[94] 도 5는 (a) 실시예 1에 따라 제조된 랜덤하게 방사된 비배향성 패치에 심장 줄기세포가 부착된 시차주사현미경 사진, (b) 실시예 2에 따라 제조된 배향성을 갖는 패치에 심장 줄기세포가 부착된 시차주사현미경 사진이다.

[95] 도 6은 배향성을 갖는 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치에 세포를 이식하고, 48시간 후 H&E 염색하여 (a) 가로 절단면을 현미경으로 관찰한 사진, (b) 단면을 현미경으로 관찰한 사진이다.

[96] 도 7은 실시예 3의 성장인자가 함유된 배향성이 있는 삼차원 지지체에 성장인자의 분포도를 형광 시약을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[97] 도 8은 실시예 3의 성장인자가 함유된 배향성이 있는 삼차원 지지체로부터 방출되는 VEGF 약물의 누적 방출량을 그래프로 나타낸 것이다.

[98] 도 9는 실험예 3에 따라 1일, 4일, 7일 및 14일에 측정된 세포 수를 나타낸 것이다.

[99] 도 10은 실시예 1의 삼차원 지지체와 실시예 2의 배향성을 가지는 삼차원 지지체에서 시딩된 세포의 증식 양상을 나타낸 것이다. 2열의 그림이 실시예 1의 방향성이 없는 삼차원 지지체에서 세포의 증식 양상을 나타낸 것이고, 4열의 그림이 배향성을 갖는 삼차원 지지체에서 세포의 증식 양상을 나타낸 것이다. 그 결과, 배향성을 갖는 삼차원 지지체에서 세포가 심근 섬유 본래의 모양과 유사한 형태고 증식됨을 알 수 있다.

[100] 도 11은 실험예 4에 따라 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 (a) 증식배지 조성과 (b) 분화배지 조성에서 체외에서 2주간 배양하여 H&E, αSA, MHC, TnT 면역 염색 사진이다.

[101] 도 12의 (a)와 (b)는 실험예 5에 따라 정상 심장 조직의 외심막 표면에 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식하고 4일 후의 조직을 H&E로 염색한 현미경 사진이다.

[102] 도 13은 (a) 심근경색 부분에 비교예 1의 줄기세포가 시딩되지 않은 패치를 이식한 직후의 사진, (b) 14일 후의 조직사진, (c) 심근경색 부분에 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 직후의 사진과 (d) 14일 후 조직사진이다.

[103] 도 14는 실험예 7에 따라 14일 후 얻어진 조직을 H&E로 염색한 사진으로서, (a) 심장 줄기세포가 시딩된 실시예 1의 패치를 이식한 사진, (b) 심장 줄기세포가 없는 비교예 1의 패치를 이식한 사진이다.

[104] 도 15는 실험예 7에 따라 14일 후 얻어진 조직을 (a) αSA 면역 염색한 조직 사진, (b) 핵을 DAPI 염색한 사진, (c) (a) 와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[105] 도 16은 실험예 7에 따라 14일 후 얻어진 조직을 (a) TnT 면역 염색한 조직 사진, (b) 핵을 DAPI 염색한 사진과 (c) (a) 와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[106] 도 17은 실험예 7에 따라 14일 후 얻어진 조직에 대해 (a) SMA 면역 염색시킨 소동맥/정맥 사진, (b) 핵을 DAPI 염색한 사진, (c) (a) 와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[107] 도 18은 실험예 7에 따라 14일 후 얻어진 조직에 대해 (a) CD34 면역 염색시킨 모세혈관 사진, (b) 핵을 DAPI 염색한 사진, (c) (a) 와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[108] 도 19는 실험예 7에 따라 이식 14일 후 패치와 심장 조직의 전체적인 저배율 사진으로서 (a) 이식된 DiI-표지 심장 줄기세포가 붉은색 형광으로 나타난 사진, (b) 핵의 DAPI 염색한 사진, (c) (a) 와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[109] 도 20은 심근 경색 쥐의 심근층에서 이식된 심장 줄기 세포의 위치를 보여주는 심근조직의 고배율 현미경 사진으로서, 위쪽은 부착한 패치부분이며 아래로 내려갈수록 심근 안쪽을 나타내어 (a)의 붉은색 형광은 DiI-표지 심장 줄기세포를 나타내고, (b)의 파란색 형광은 DAPI로 표지된 핵을 나타내며, (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 사진이다.

[110] 도 21은 실험예 8에 따라 28일 후 얻어진 조직을 H&E로 염색한 사진으로서 (a) 심장 줄기세포가 시딩된 실시예 1의 패치를 이식한 사진, (b) 심장 줄기세포가 없는 비교예 1의 패치를 이식한 사진이다.

[111] 도 22는 실험예 8에 따라 28일 후 얻어진 조직의 조직학적 분석으로서 실시예 1의 패치를 이식한 경우와 줄기세포가 없는 비교예 1의 패치를 이식한 경우의 (a) 섬유화 면적 측정 결과, (b) 심장 두께 측정 결과이다.

[112] 도 23은 삼차원 지지체에 물리적 확장을 추가로 가해 너무 두껍게 부풀린 경우의 세포의 이동 및 침투 결과를 나타낸 것이다. 좌측의 그림은 적절한 두께로 부풀려 성공적으로 세포 증식이 내부까지 이루어진 경우이고, 우측의 그림은 지지체 내부까지 세포가 들어가지 못한 부분(흰색)이 발생했음을 나타낸다.

[113] 도 24는 지지체, 성장인자가 함유된 지지체, 성장인자 및 심장 줄기세포가 함유된 지지체 각각을 심근 조직에 이식한 후, 심근으로의 재생 효과를 조직 염색을 통해 비교한 것이다.

[114] 도 25는 지지체, 성장인자가 함유된 지지체, 성장인자 및 심장 줄기세포가 함유된 지지체 각각을 심근 조직에 이식한 후, 혈관 신생 증가 효과를 SMA 양성 혈관 형성 분석(positive vessel formation analysis)를 통해 비교한 것이다.

[115] 도 26은, 심장 줄기세포가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체(PLLA) 및 심장 줄기세포 및 VEGF가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체(PLLA/VEGF)의 주사전자현미경 사진이다. (a) 및 (d)는 배양 후 1일, (b) 및 (e)는 배양 후 5일, (c) 및 (f)는 배양 후 7일에 해당하는 날의 사진이다.

[116] 도 27은, 심장 줄기세포가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 및 심장 줄기세포 및 VEGF가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체의 배양 후 1, 5, 및 7일에 증식 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[117] 도 28은, 심장 줄기세포 및 성장인자가 시딩되지 않은 실시예 2의 패치(PLLA), VEGF가 로딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치(PLLA/VEGF) 및 심장 줄기세포 및 VEGF가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치(PLLA/VEGF/rCSC)를 이식한 경우의 (a)

섬유화 면적 측정 결과, (b) 심장 두께 측정 결과이다.

[118] 도 29는, 심장 줄기세포 및 성장인자가 시딩되지 않은 실시예 2의 패치(PLLA), VEGF가 로딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치(PLLA/VEGF) 및 심장 줄기세포 및 VEGF가 시딩된, 실시예 2의 PLLA 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치(PLLA/VEGF/rCSC)를 이식한 경우의 (a) EF(ejection fraction), 및 (b) FS(fractional shortening)를 측정한 결과이다.

[119] 도 30은 손상된 심장에 줄기세포를 직접 이식한 군, 줄기세포를 함유하는 피브린 겔을 이식한 군, 줄기세포를 함유하는 본 발명의 삼차원 지지체를 이식한 군의 이식된 조직 부위에서의 세포 생존율 및 보유율을 나타낸 것이다.

[120] 도 31은, 배향성을 가지는 본 발명의 삼차원 지지체에 유전자 전달을위한 플라스미드 DNA(pDNA)를 로딩한 것을 SEM으로 촬영한 것이다. (a) 배향성을 가지는 본 발명의 삼차원 지지체의 SEM 사진, (b) 트랜스펙션을 위한 pDNA 콤플렉스로 코팅된 패치, (c) 시딩 후 24시간 후에 랫트 심장 줄기세포가 부착된 패치의 SEM 이미지, (d) 형광 현미경으로 관찰한 스캐폴드의 표면을 관찰한 이미지.

[121] 도 32는, 플라스미드 DNA를 트랜스펙션한 후 랫트 심장 줄기세포에서의 인간 VEGF 발현을 관찰한 공초점 이미지이다.

[122] 도 33은, 패치에 로딩된 DNA의 방출을 확인한 도이다.

[123] 도 34는, 랫트 심장 줄기세포에 트랜스펙션된 hVEGF 유전자의 이후 단백질로의 발현 정도를 나타내는 도이다. 심장 줄기세포가 시딩된 PLLA/PLGA 패치(대조군), pVEGF 콤플렉스가 트랜스펙션된 심장 줄기세포가 시딩된 PLLA/PLGA 패치(Bolus delivery) 및 심장줄기세포가 시딩된, PLLA/PLGA/VEGF 패치 군(Sustained release)을 각각 나타낸다.

[124]

발명의 실시를 위한 형태

[125] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[126]

[127] **실시예 1: 줄기세포가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치 제조 1**

[128]

[129] **1) 서로 이격 가능한 섬유들이 서로 얽힌 솜털 형태의 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 패치 제조**

[130]

[131] 폴리엘-락트산(PLLA)을 디클로로메탄/아세톤(아세톤 부피가 전체 용액의 10%~40%, 정확히 실험한 부피는 20%)의 용매에 녹여 고분자의 농도가 14~20%(정확히 실험한 농도 15%)가 되도록 용액을 제조하였다.

[132] Chungpa EMT사(한국)에서 제조한 전기방사기인 DH High Voltage Generator(모델명 CPS-40KO3VIT)를 이용하여, 0.06 ml/min의 용액 방출속도, 10 kv의 전압, 전기장의 거리는 15 cm의 조건으로 전기방사 하였다. 스테인레스스틸 판 컬렉터 상에 섬유가 집적되기 전에 용매가 전부 휘발되도록 15~25 ℃, 습도 10~40 %의 조건에서 전기방사법을 수행하여, 생분해성 고분자 섬유들이 서로 이격 가능하면서 서로 얽힌 네트워크 형태의 지지체를 제조하였다. 상기 지지체의 섬유 굵기는 직경 약 7 ㎛이고, 지지체의 두께는 약 300 ㎛이었다. 이후 상기 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태의 지지체를 제조하였다. 지지체에 물리적인 힘을 가함에 따라 제조된 상기 솜털 형태의 지지체는 50-300 ㎛의 공극 직경, 50 내지 90%의 공극률을 보유하고, 두께가 1mm 이상이었다(도 1).

[133] 상기 솜털 형태의 지지체의 신축성을 확인하고자, 전기방사로 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 지지체의 전체 부피 및 섬유들 사이의 공극을 부풀린 후 지지체의 두께를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 조직 재생용 패치의 두께가 1cm 이상까지도 확장되는 것을 확인할 수 있었으며(도 2), 본 발명의 조직 재생용 패치는 2차원 막구조의 지지체와 구조 및 신축성 면에서 확연히 차이가 남을 확인할 수 있었다 (도 3).

[134] 즉, 본 발명의 지지체는 섬유간에 서로 이격 가능하고, 솜털 형태의 특성으로 인하여 세포의 증식 및 이동, 또는 부착된 조직의 팽창 또는 수축에 연동하여 가역적으로 팽창 또는 수축이 가능함을 알 수 있었다.

[135]

[136] **2) 심장 줄기세포의 시딩**

[137]

[138] 제작한 섬유 다공성 삼차원 지지체 패치에 심장 줄기세포를 시딩하기 위하여, 70% 에탄올로 소독한 후 버퍼로 세척과정을 거쳤다. 남아있는 수분을 모두 제거한 후 $1X10^6$ ~ $1X10^8$개(본 실시예에서는 $5X10^6$을 사용)의 심장 줄기세포가 부유된 배지를 지지체에 삽입 후 한 시간 이상 부착하였다. 이후 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건에서 48시간 동안 배양하여 세포 부착을 안정화 시켰다. 세포는 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 1% 페니실린, 10% 우태아 혈청, 10 ng/㎖ 인간 EGF를 첨가하여 제조한 배지를 각각 사용하여 5% CO_2 농도 하에서 37℃ 포화 습도에서 배양하였다.

[139]

[140] **실시예 2: 줄기세포가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치 제조 2**

[141]

[142] 컬렉터를 스테인레스스틸 판에서 원통형 드럼으로 교체하고 회전 속도를 2000 rpm으로 하여 한 방향으로 배향된 섬유형 네트워크 형태의 패치를 제조한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 줄기세포가 함유된 다공성 삼차원

지지체를 포함하는 패치 즉, 배향성을 갖는 패치를 제작하였다(도 4).

[143]

[144] **실시예 3: 줄기세포 또는/및 성장인자가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치 제조**

[145]

[146] 실시예 1 및 2에서 제조된 삼차원 지지체 패치에 혈관 내피 성장인자(VEGF)를 시딩하여, 줄기세포 및 성장인자가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 패치를 제조하였다.

[147] 또한, 줄기세포가 시딩되지 않은 실시예 1 및 2의 삼차원 지지체에 성장인자를 시딩하여, 성장인자가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 패치를 제조하였다.

[148]

[149] **실시예 4: 유전자가 함유된 섬유형 다공성 삼차원 지지체 패치의 제조**

[150]

[151] PLGA를 아세톤/에탄올 혼합 용매에 녹여 현탁액을 제조한 다음, 이 현탁액에 수성의 pVEGF/CPP 콤플렉스 또는 FITC를 유화시킨 다음, 이를 전기분사하여 실시예 2의 지지체 표면을 코팅하였고 동결건조하였다. 이때, pVEGF 콤플렉스의 양은 지지체(8*8) 당 3㎍으로 고정하였다.

[152]

[153] **실험예 1: 심장 줄기세포 부착 실험**

[154]

[155] 48시간 동안 세포부착을 안정화시킨 상기 실시예 1 및 실시예 2의 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 이용한 패치의 세포 부착 여부를 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[156]

[157] 부착되지 않은 세포를 세척하여 제거하고 2.5% 글루타르알데히드 용액으로 20분간 고정하였다. 고정 후 시료는 70%, 80%, 90% 및 100% 에탄올로 순차적으로 각각 10분간 탈수시키고 완전히 진공 건조하였다. 이후 시료를 금으로 코팅하였다.

[158] 이를 시차 주사현미경으로 관찰한 결과를 도 5에 나타내었다. 제조된 지지체에 세포가 잘 부착되어 있음을 알 수 있고, 실시예 2의 배향성을 갖는 지지체에 대해서는 배향성을 갖는 섬유를 따라 세포의 배향을 확인할 수 있었다(도 5의(b)).

[159]

[160] 또한, 세포가 고밀도로 시딩 되었음을 확인하기 위하여 48시간 동안 세포부착을 안정화시킨 후, 실시예 2에서 얻어진 삼차원 지지체-세포 집합체를 버퍼로 세척하고 3.7% 포름알데히드 용액으로 하루 고정하였다. 파라핀 포메 후 4 μm 두께의 슬라이드를 제작하고 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색하여

현미경으로 관찰 하였다(도 6).

[161] 가로 절단면의 사진에서 세포가 고밀도로 시딩된 것을 확인 할 수 있고(도 6의 (a)), 단면의 사진에서는 세포가 외부에 뿐만 아니라 내부에도 고밀도로 존재함을 알 수 있다(도 6의 (b)). 이는 본 발명의 조직 재생용 패치는 물리적 확장으로 공극의 크기를 확장시켜, 지지체의 공극의 크기가 크기 때문에 줄기세포가 지지체 내부로 침투하는 것이 수월하기 때문이다.

[162]

[163] **실험예 2: 성장인자의 분포도 및 방출량 확인**

[164]

[165] 실시예 3의 배향성이 있는 섬유형 다공성 삼차원 지지체에 성장인자가 고르게 분포되어 있는지를 형광시약으로 확인한 결과, 섬유 내에 VEGF가 고르게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(도 7).

[166] 또한, 상기 성장인자를 포함하는 지지체에서 성장인자의 방출 여부 및 방출 속도를 측정하였다. 지지체로부터 방출된 VEGF 약물의 누적 방출량을 측정한 결과, VEGF를 본 발명의 지지체에 시딩하면, VEGF가 지지체로부터 서방출되어 지속적으로 혈관생성 효과를 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었다(도 8). 즉, 성장인자를 포함하는 본 발명의 패치는 심근 경색 부위에서 국소적이고 지속적인 약물 방출이 가능함을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 줄기세포 및 성장인자를 포함하는 패치는 성장인자를 지속적으로 방출하여 계속적으로 줄기세포로의 성장인자를 도입시켜 조직 재생에 효과적임을 알 수 있었다.

[167]

[168] **실험예 3: 체외 세포 증식 관찰**

[169]

[170] 실시예 1 및 실시예 2에서 제조된 줄기 세포가 시딩된 섬유형 다공성 삼차원 지지체를 이용한 패치를 증식배지 조성 하에서 2주간 배양하면서 1일, 4일, 7일 및 14일 동안 정해진 날짜에 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 분석을 통하여 세포수를 측정하였다(도 9). 도 9에 나타낸 바와 같이, 랜덤하게 방사된 비배향성 패치(실시예 1)와 배향성 패치(실시예 2) 모두 세포증식능력이 뛰어남을 확인하였다.

[171]

[172] 실시예 1과 실시예 2의 다공성 삼차원 지지체의 증식 양상을 비교한 결과, 실시예 1의 지지체와 다르게, 방향성을 가지는 실시예 2의 섬유형 다공성 삼차원 조직 재생 유도체에 심근줄기세포를 배양한 경우에는 세포가 방향성을 가지면서 증식이 향상되었으며, 심근섬유 본래의 모양과 유사한 형태로 증식함을 확인할 수 있었다(도 10).

[173]

[174] **실험예 4: 체외 세포 분화 관찰**

[175]

[176] 실시예 1에서 제조된 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 증식배지 조성 및 심장세포 분화배지 조성에서 체외에서 2주간 배양하였다. 이후 심장세포로 분화를 관찰하기 위하여 파라핀으로 고정하고, 세로로 슬라이드를 제작하여 H&E로 염색하고 이미지를 얻었다(도 11).

[177] 특정 방향으로 세포의 배향성을 관찰 할 수 있었고, 해당 세포에서 심근세포 수축에 관여하는 근절(sarcomere) 단백질인 α-사르코어 엑티닌(α-sarcomeric actinin,aSA), 미오신 중사슬(myosin heavy chain, MHC) 및 트로포닌-T(troponin-T, TnT)의 발현을 확인할 수 있었다.

[178] 분화배지에서 배양한 패치에서의 분화정도가 높았고, 증식배지에서 배양한 경우도 심근 세포로의 분화가 확인되었다. 이는 심장에 존재하는 줄기세포를 사용함으로써 나타나는 결과라고 판단된다.

[179]

[180] **실험예 5: 정상 이식을 통한 조직 융합 및 염증반응 관찰**

[181]

[182] Sprague-Dawley rats (8-9주)를 이소퓨란(Isofurane)으로 마취하였다. 마취된 쥐는 양압 호흡법(ventilated under positive pressure)으로 호흡을 유지하였다.

[183] 줄기세포가 시딩된 다공성 삼차원 지지체를 이용한 패치의 안정성을 관찰하기 위하여 정상 심장조직의 외심막(epicardium) 표면에 실시예 1에서 제조된 패치를 이식하고 4일후 평가를 진행하였다. H&E 염색 후 조직과의 융합 정도 및 염증 반응 정도를 도 12에 나타내었다.

[184] 도 12의 영역 P(Periphery)에서 원으로 표시된 부분은 혈관을 나타내는데, 이로서 패치 내로 혈관의 성장이 이루어진 것을 알 수 있다. 즉, 패치와 심장조직의 융합이 잘 이루어진 것을 확인할 수 있다. 또한, 세포 분화와 관련하여 정상 심장조직과 패치의 경계면(도 12의 영역 I) 및 주변부(도 12의 영역 P)에서 조직 형성이 관찰되므로 심근 세포와도 융합된 것을 관찰할 수 있다.

[185]

[186] **실험예 6: 질병 모델의 제조**

[187]

[188] **(1) 질병모델(myocardial infarction, MI model)의 제조**

[189]

[190] Sprague-Dawley rats(8-9주)를 이소퓨란(Isofurane)으로 마취하였다. 마취된 쥐는 양압 호흡법(ventilated under positive pressure)으로 호흡을 유지하였다. 왼쪽 갈비뼈 두 번째와 세 번째 사이를 개흉술하였다. 심막을 잘라서 흉곽의 압력에 의해 심장이 외부로 나오게 한 후 좌측 관상 동맥(left coronary artery)을 7-0 플라스틱제 봉합사(prolene)로 묶어 결찰하고 심근경색을 유도하였다. 좌전하행지(Left Anterior Descending, LAD) 결찰(ligation)을 시행하고 허혈부위의 생성을 확인 후, 바로 10x10 mm 크기의 실시예 1 내지 3의 줄기세포 또는 줄기세포 및 성장인자가 시딩된 패치를 7-0 silk로 각각 외심막 표면(epicardial

surface)의 경색이 유도된 심근부분(infarcted myocardium zone)과 경색 경계 부분(infarction border zone)에 부착하였다.

[191]

[192] **(2) 질병모델(myocardial infarction, MI model)의 제조**

[193]

[194] 실시예 1 내지 3의 패치를 좌심실 전벽(anterior wall of left ventricle)에 이식 후, 28일 째 희생한 것을 제외하고는 상기 (1)과 동일하게 질병모델을 제조하였다.

[195]

[196] **실험예 7: 질병 모델에서 심장 줄기세포가 시딩된 다공성 삼차원 지지체를 이용한 패치 이식을 통한 심장 기능 개선 분석 1**

[197]

[198] (1) 상처가 난 바로 직후 실시예 1의 패치와 실시예 1의 패치에서 줄기세포를 시딩하지 않은 패치(비교예 1)를 좌심실 전벽(anterior wall of left ventricle)에 이식하였으며, 이식하고 14일째 희생하고 심장 조직을 10% 버퍼 포름알데하이드(buffered formaldehyde)로 고정하여 파라핀 섹션(paraffin sections)하여 관찰하였다.

[199] 도 13의 (a)는 심근경색 부분에 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 직후의 사진을 나타내었고 (b)는 14일 후 조직사진을 나타내었다. (c)는 심근경색 부분에 비교예 1의 줄기세포가 시딩되지 않은 패치를 이식한 직후의 사진을 나타내었고 (d)는 14일 후 조직사진을 나타내었다.

[200] 상기 제조한 조직을 슬라이드로 제작하여 H&E(hematoxylin and eosin)로 염색하였다(도 14). 관상동맥 결찰(Coronary artery ligation) 14일 후 심근 경색은 성공적으로 유도된 것을 확인하였으며 심근경색 결과 심근소실과 심장의 확장을 관찰할 수 있었다.

[201] 도 14에 나타낸 바와 같이 실시예 1 및 비교예 1의 패치는 좌심실 전벽(LV anterior wall)과 융합이 완벽히 이루어진 것을 알 수 있다. 또한, 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 경우(도 14의 (a)) 이식한 패치의 형태가 잘 유지되고, 심장의 좌심실 전벽 두께(LV anterior wall thickness)는 세포 없는 패치를 이식한 비교예 1의 심장보다 두꺼워져 있는 것을 확인할 수 있다. 또한 실시예 1의 패치를 이식한 심장은 이후 좌심실 팽창(LV dilatation)이 적었으며, 심근의 재생(하얀색 화살표 부위)이 저명하게 관찰되었다.

[202]

[203] (2) 상기 (1)에 따라 14일 후 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 조직을 심근특이 항체로 염색하고 플루오레신 아이소티오사이아네이트 결합된(fluorescein isothiocyanate-conjugated) 이차항체로 염색하였다. 이들은 심근세포 수축에 관여하는 근절(sarcomere) 단백질인 α-사르코어 엑티닌(α-sarcomeric actinin, aSA)과 트로포닌-T(troponin-T, TnT) 심근세포 마커를 나타낸다.

[204] 도 15 (a)는 aSA 면역 염색한 사진을 나타내었고 (b)는 DAPI로 표지된 모든 핵을 나타내었다. 도 15의 (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 결과로서 패치를 조직에 이식하고 14일 후 패치 내 줄기세포들이 aSA 심근세포로 분화한 것을 확인할 수 있다.

[205] 또한, 도 16 (a)는 TnT 면역 염색한 사진을 나타내었고 (b)는 DAPI로 표지된 모든 핵을 나타내었다. 도 16의 (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 결과로서 패치를 조직에 이식하고 14일 후 패치 내 줄기세포들이 TnT 심근세포로 분화한 것을 확인할 수 있다.

[206]

[207] (3) 평활근 알파 액틴(smooth muscle alpha actin, SMA)과 CD34 면역염색을 통해 이식 14일 후 실시예 1의 패치를 이식한 허헐 부위에서 혈관 생성이 증가한 것을 확인할 수 있다.

[208] 도 17 (a)는 SMA 면역 염색시킨 소동맥/정맥 사진이고(b)는 DAPI로 표지된 모든 핵을 나타내었다. 도 17의 (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 결과로 이식 조직인 패치 내에도 소동맥/정맥이 성장하여 형성된 것을 확인할 수 있다.

[209] 또한, 도 18 (a)는 모세혈관을 CD34 면역 염색 시킨 것이고 (b)는 DAPI로 표지된 모든 핵을 나타내었다. 도 18의 (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 결과로서 이식조직인 패치 내에도 모세혈관이 성장하여 형성된 것을 확인할 수 있다.

[210]

[211] (4) 이식 후 세포의 생존과 진행을 추적하기 위하여, 세포 수집 때 붉은색 형광 표지체인 DiI로 세포를 표지하였으며, 대략 10^6개의 세포를 패치에 이식하여 심장의 경색 부위에 이식하였다. 이식 후 줄기 세포의 생존 여부는 사후 DiI를 형광 현미경을 통하여 측정하였다. 도 19 및 20은 이식 14일 후 심근 경색 쥐의 심근층에서 이식된 심장 줄기세포의 위치를 보여주는 일련의 현미경 사진이다.

[212] 도 19는 이식 14일 후 패치와 심장 조직의 전체적인 저배율 사진으로서 도 19의 (a)는 이식된 DiI-표지 심장 줄기세포가 붉은색 형광으로 나타낸 사진이며 (b)는 핵의 DAPI 염색한 사진이다. (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 사진으로서 패치 내에 DiI 양성인 세포 집합체가 관찰된다. 이로서 줄기 세포가 장기간 패치 내에 생존해 있고, 이들이 심근 안쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있다.

[213] 또한, 도 20은 이식 14일 후 심근 경색 쥐의 심근층에서 이식된 심장 줄기세포의 위치를 보여주는 심근조직의 고배율 현미경 사진으로서, 위쪽은 부착한 패치부분이며 아래로 내려갈수록 심근 안쪽을 나타낸다. (a)의 붉은색 형광은 DiI-표지 심장 줄기세포를 나타내고 (b)의 파란색 형광은 DAPI로 표지된 핵을 나타내며, (c)는 (a)와 (b)를 중첩시킨 사진으로서, DiI로 표지된 줄기세포는 심근층 내부 부위와 심근 세포가 결여된 심근 경색 부위에서도 발견된 것을 확인하여 이식 세포가 주변 심장 조직으로 이동하는 것을 확인하였다.

[214]

[215] **실험예 8: 질병 모델에서 심장 줄기세포가 시딩된 다공성 삼차원 지지체를**

이용한 패치 이식을 통한 심장 기능 개선 분석 2

[216]

[217] (1) 상기 실험예 6 (2)의 동물모델에서 얻은 조직을 슬라이드로 제작하여 H&E(hematoxylin and eosin)로 염색하였다(도 19). 관상동맥 결찰(Coronary artery ligation) 28일 후 심근 경색은 성공적으로 유도된 것을 확인하였으며 심근경색 결과 심근소실과 심장의 확장을 관찰할 수 있었다.

[218] 도 21에 나타낸 바와 같이 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 경우 이식한 패치의 형태가 잘 유지되고, 심장의 좌심실 전벽 두께(LV anterior wall thickness)는 세포 없는 패치를 이식한 비교예 1의 심장보다 두꺼워져 있는 것을 확인할 수 있다. 또한 실시예 1의 패치를 이식한 심장은 이후 좌심실 팽창(LV dilatation)이 적었으며, 심근의 재생(화살표 부위)이 저명하게 관찰되었다(도 21).

[219]

[220] (2) 상기 (1)에 따라 패치 이식후 28일째에 실시예 1 및 비교예 1의 패치가 이식된 조직의 섬유화 면적 및 심장 두께를 측정하였다. 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 경우 섬유화 면적(fibrotic area)이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있다(도 22의 (a)). 또한, 실시예 1의 심장 줄기세포가 시딩된 패치를 이식한 경우 좌심실 전벽 두께(LV anterior wall thickness)는 세포 없는 패치를 이식한 비교예 1의 심장보다 두꺼워져 있는 것을 확인할 수 있다(도 22의 (b)).

[221]

[222] **실험예 9: 패치의 두께 및 밀도 차이에 따른 세포 이동 효과 확인**

[223]

[224] 배향성을 가지는 실시예 2에 따른 패치의 두께 및 밀도 차이에 따른 심근 재생 효과를 확인하였다.

[225] 실시예 2의 지지체에 물리적 힘을 추가로 가해 밀도가 약 5배 정도 감소된 지지체를 제조하였다. 구체적으로, 14.5 g/cm^{3}에서 2.7 g/cm^{3}으로 약 5배 정도 밀도를 감소시킨 지지체와 실시예 2에 따른 패치의 세포 이동 효과를 확인하였다.

[226] 상기 줄기세포가 시딩된 패치를 상기 실험예 4의 동물 모델의 손상된 심장에 이식하였다. 이식한 후 14일째에 심장 조직을 관찰한 결과, 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적 힘을 가하여 지지체의 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀리면 세포의 지지체 내부 및 조직으로의 이동 및 침투가 증가됨을 확인할 수 있었다(도 23). 그러나, 물리적 확장을 가해 너무 부풀린 지지체에 줄기세포를 시딩한 경우, 세포가 지지체 내부로 이동하지 못하였다. 도 23은 물리적 힘을 가해 지나치게 지지체를 부풀린 패치(도 23의 오른쪽 그림)를 이식한 경우, 지지체 내부 및 조직으로 세포가 들어가지 못한 부분(흰색)이 발생함을 나타낸 것이다.

[227] 따라서, 적절한 두께 및 부피를 가지도록 패치를 부풀리는 것이 바람직함을 알 수 있다.

[228]

[229] **실험예 10: 성장인자가 시딩된 패치의 심근 재생 및 혈관 생성 확인**

[230]

[231] 실시예 3에 따른 섬유형 다공성 지지체에 성장인자가 함유된 패치의 심근 재생능을 확인하였다. 구체적으로, 대조군으로서 손상된 심근 조직부분에 섬유형 다공성 삼차원 지지체만을 이식한 군, 섬유형 다공성 삼차원 지지체에 성장인자가 함유된 패치를 이식한 군, 섬유형 다공성 삼차원 지지체에 줄기세포 및 성장인자가 함유된 패치를 이식한 군으로 나누어 조직 염색을 통해 심근으로의 재생 및 혈관 생성 여부를 확인하였다.

[232] 그 결과, 성장인자인 VEGF를 함유하는 패치를 이식한 군 및 VEGF와 줄기세포를 함유하는 패치를 이식한 군에서, 지지체만을 이식한 군 대비 심근으로의 재생이 향상되고(도 24), 혈관 생성이 증가됨을 확인하였다(도 25). 또한, 줄기세포와 성장인자를 모두 포함한 패치에서 줄기세포만을 포함한 패치에 비해 심근으로의 재생 및 혈관 생성이 증가되었다.

[233]

[234] **실험예 11: 성장인자가 시딩된, 배향성을 가지는 다공성 삼차원 지지체를 포함하는 패치의 심근 재생 및 혈관 생성 확인**

[235]

[236] **(1) 심장 줄기세포가 시딩된 패치의 형태학적 관찰 및 증식율 확인**

[237]

[238] 실시예 2의 삼차원 지지체를 포함하는 패치, 및 실시예 2의 삼차원 지지체에 VEGF를 로딩한 지지체를 포함하는 패치를 증식 배지 조성 하에서 7일간 배양하면서 1일, 5일 및 7일에 해당하는 날에 이의 형태적 특성을 관찰하였고, 그 결과를 도 26에 나타내었다.

[239]

[240] 또한, 상기 정해진 날짜에 CCK-8 분석을 통하여 세포수를 측정하였고, 그 결과를 도 27에 나타내었다.

[241] 그 결과, 도 27에 나타낸 바와 같이, VEGF를 로딩한 패치의 심장 줄기세포 부착 및 증식율이 보다 우수함을 확인하였다.

[242]

[243] **(2) 성장인자 또는/및 줄기세포가 시딩된 배향성을 가지는 다공성 삼차원 지지체를 이용한 패치 이식을 통한 질병 모델의 심장 기능 개선 분석**

[244]

[245] 실험예 6 의 동물 모델에서, 패치 이식 후 28일째에 조직의 섬유화 면적 및 심장 두께를 측정하였다. 구체적으로, 대조군인 성장인자 및 줄기세포가 시딩되지 않은 실시예 2의 패치를 이식한 군(PLLA), 줄기세포가 시딩되지 않은 실시예 2의

삼차원 지지체에 VEGF를 로딩한 패치(PLLA/VEGF)를 이식한 군, 및 VEGF 및 심장 줄기세포를 시딩한 실시예 2의 패치(PLLA/VEGF/rCSCs)를 이식한 군에서의 효과를 확인하였고, 그 결과를 도 29에 나타내었다.

[246]

[247] 그 결과, 도 28에 나타낸 바와 같이, PLLA/VEGF 및 PLLA/VEGF/rCSCs 군 모두 대조군에 비하여 섬유화 면적이 적었으며, 좌심실 전벽 두께 역시 대조군에 비하여 두꺼워진 것을 확인할 수 있었다. 특히, VEGF 및 심장 줄기세포를 모두 포함하는 패치의 경우, 대조군에 비하여 섬유화 면적이 10% 더 작았으며, 좌심실 전벽 두께의 경우, 약 1.5배가량 더 두꺼운 결과를 나타내었다.

[248]

[249] **(3) 심장 초음파 실험을 통한 심장의 기능적 회복 확인**

[250]

[251] 대조군인 성장인자 및 줄기세포가 시딩되지 않은 실시예 2의 패치를 이식한 군(PLLA), 줄기세포가 시딩되지 않은 실시예 2의 삼차원 지지체에 VEGF를 로딩한 패치(PLLA/VEGF)를 이식한 군, 및 VEGF 및 심장 줄기세포를 시딩한 실시예 2의 패치(PLLA/VEGF/rCSCs)를 이식한 군의 좌심실 구혈율(EF, ejection fraction) 및 분획 단출율(FS, fractional shortening)을 측정하여, 본 발명의 패치를 이식한 군의 심장 기능이 개선되어 있는지 여부를 확인하였다.

[252]

[253] 그 결과, 도 29에 나타낸 바와 같이, PLLA/VEGF/rCSCs 군의 경우, EF 값이 정상 범위(56-78%)에 거의 가까운 결과를 나타내었으며, FS 값 역시 정상 범위(25-40%)에 거의 가까운 결과를 나타내었다.

[254]

[255] **실험예 12: 이식되는 세포의 생존력 및 유지 효과 확인**

[256]

[257] 동물 모델의 손상된 심근 부위에 심장 줄기세포를 직접 주입한 군, 심장 줄기세포가 함유된 피브린 겔(fibrin gel)을 이식시킨 군, 본 발명에 따른 섬유형 다공성 삼차원 지지체에 심장 줄기세포가 함유된 심장 패치를 이식시킨 군으로 나누어 이식되는 심장 줄기세포의 생존력 및 손상된 심근 조직 부위에서의 유지율을 확인하였다.

[258] 그 결과, 본 발명에 따른 심장 패치를 이식한 경우, 줄기세포를 직접 주입한 군에 비해 약 4배, 피브린 겔에 줄기세포를 도입하여 이식한 군에 비해 약 9배의 세포 생존력 및 유지효과가 증가됨을 확인할 수 있었다(도 30). 이로부터 본 발명에 따른 세포가 포함된 조직 재생용 패치는 손상된 조직 부위에서 생존력 및 유지 효과가 높아, 손상된 조직으로의 세포 전달이 매우 효과적인 바, 다른 조직 재생 방법에 비해 우수한 조직 재생 효과를 가져올 수 있음을 알 수 있다.

[259]

[260] **실험예 13: VEGF 유전자가 로딩된 패치의 방출 조절 확인**

[261]

[262] **(1) 트랜스펙션을 위한 pDNA 복합체로 코팅된 패치의 형태학적 관찰**

[263]

[264] 실시예 4의 패치에 트랙스펙션을 위한 pDNA 콤플렉스가 안정적으로 로딩되어 있는지 여부를 SEM 및 형광 현미경으로 확인하였다.

[265]

[266] 그 결과, 도 31에 나타낸 바와 같이, DNA 콤플렉스를 로딩하지 않은 지지체(A)와 달리, 실시예 4의 지지체에서는 pDNA 콤플렉스가 본 발명의 섬유형 다공성 삼차원 지지체에 안정적으로 코팅이 된 것을 확인할 수 있었다(B).

[267]

[268] 또한, 지지체에 로딩된 pDNA 콤플렉스가 세포 내에 트랙스펙션되어 세포 내에 발현되는지를 알아보기 위하여 하기의 실험을 진행하였다. 구체적으로, hVEGF165 단백질의 발현을 확인하기 위하여, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 진행하였다. 상기 pVEGF 콤플렉스의 트렌스펙션 여부 확인을 위하여, pVEGF 콤플렉스를 코딩시킨 지지체에, 지지체 당 $5X10^5$ 세포수로 랫트 심장 줄기세포를 시딩하고, 2시간 동안 인큐베이션 하여 세포 부착을 유도하였다. 이때, 모든 지지체는 14일간의 조사 기간 동안 2일 마다 새로운 배지를 공급하였다. 샘플의 세포 배양액의 2일, 7일 및 14일마다 수집하였고, 이를 -70℃에서 보관하여 사용하였다.

[269]

[270] 상기 VEGF 유전자가 심장 줄기 세포에 트랙스펙션되어 있는지 여부를 형광으로 확인한 결과, 심장 줄기세포에 hVEGF165가 안정적으로 트랜스펙션되어, 핵 내로 들어가 발현되었음을 알 수 있었다(도 32 상단).

[271]

[272] **(2) 방출 프로파일**

[273]

[274] pVEGF가 지지체로부터 방출되는 양상을 확인하기 위하여, pVEGF를 로딩한 지지체 3μg을 PBS(pH 7.4) 1mL, 37℃의 온도에서 14일간 인큐베이션하였다. 모든 샘플은 일정한 속도(30rpm)으로 교반하였다. 정해진 시간 간격(1시간, 6시간, 1일, 2일, 5일, 7일, 10일 및 14일)에서, 방출 배지(release medium)을 제거하고, 새롭게 갈아주었다. 제거된 배지는 원심분리한 다음, PicoGreen 시약을 형광 염료(invitrogen, Eugene, Oregon, USA)로서 사용하여 지지체로부터 방출된 pDNA의 양을 결정하였다. 방출된 pDNA의 비율은, 지지체에 로딩된 전체 pDNA의 질량과, 방출된 pDNA의 질량의 비율로서 계산하였다.

[275]

[276] 그 결과, 도 33에 나타낸 바와 같이, 1일 차에 20% 가량 초기 방출 후 1주간 60%까지 방출되는 결과를 나타내었고, 14일까지 최종 65% 가량의 DNA가

지지체로부터 방출되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 발명의 지지체를 통하여 국소적으로 유전자를 조절 방출할 수 있음을 나타내는 결과이다.

[277]

[278] **(3) 트랜스펙션된 심장 줄기세포에서의 VEGF 단백질의 지속적인 발현 확인**

[279]

[280] 배향성을 가지는 PLLA/PLGA 지지체에 pVEGF를 코팅한 후, 심장 줄기세포를 시딩한 군(Sustained release로 명명)에서, hVEGF 단백질이 지속적으로 발현되는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 진행하였다.

[281] 구체적으로, 상기 Sustained release 군과, 배향성을 가지는 PLLA/PLGA 지지체에 pVEGF가 트랜스펙션된 심장 줄기세포를 시딩한 군(Bolus delivery로 명명)의 hVEGF 단백질의 발현 정도를 서로 비교하였다. 이를 위하여, 랫트 심장 줄기세포에 Sustained release 군과 동량의 pVEGF 콤플렉스를 주입한 다음, hVEGF 단백질의 발현 정도를 ELISA 키트로 분석하였고, 그 결과를 도 34 및 표 1에 나타내었다.

[282] 표 1

[Table 1]

단위 (pg/mL)	Day 0~2	Day 2~7	Day 7~14
Control	356.25	325.25	358
Bolus	2901	1000	598
Sustained	3444.75	1456	1128.25

[283]

[284] 그 결과, 도 34 및 표 1에 나타낸 바와 같이, Sustained release 군의 지지체에 시딩된 세포가 발현하는 hVEGF 단백질은 14일간 높은 농도로 지속되는 결과를 나타내었다. 반면, Bolus delivery 군의 경우, Sustained release 군에 비하여 낮은 hVEGF 단백질의 발현을 나타내었다. 이러한 결과는, 본 발명의 섬유형 다공성 지지체에 코팅된 pVEGF 복합체의 지속성 방출을 통하여, 세포의 장기적인 트랜스펙션 및 트랙스펙션된 물질의 지속적 발현을 가져올 수 있음을 시사하는 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 삼차원 지지체; 및 상기 지지체 표면 또는 내부에 함유되어 있는 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합;을 구비한, 조직 재생용 패치.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체는, 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 특성으로 인해, 부착된 조직의 팽창 또는 수축에 연동하여 가역적으로 1차원적, 2차원적 또는 3차원적으로 팽창 또는 수축이 가능한 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 삼차원 지지체는 목적 조직에 직접 부착이 가능한 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체는, 서로 이격 가능한 생분해성 고분자 섬유들이 서로 얽힌 솜털(fluffy) 형태의 특성으로 인해, 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀릴 수 있는 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체 내 도입된 세포가 증식됨에 따라 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극 크기가 조절되는 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 패치의 두께는 50 ㎛ 이상 1.5 ㎝ 이하인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체는 공극의 직경이 50 ㎛ 이상 300 ㎛ 이하인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체는 50 내지 90%의 공극률을 보유하는 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 삼차원 지지체는 섬유길이 방향의 분포도가 무작위적이지 아니하고 일정한 배향성이 부여된 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 조직은 심장, 간, 피부, 골, 신경, 또는 췌장인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 패치의 두께는 0.5 내지 3.5 mm인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조직 재생용 패치.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 약물은 조직 재생에 관여하는 유전자,

줄기세포의 성능을 개선시키는 유전자 또는 재생 단백질인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 재생 단백질은 혈관 내피 성장 인자인 (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 뉴로필린, (FGF)-1, FGF-2 (bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, 안지오포이에틴 1, 안지오포이에틴 2, 에리쓰로포이에틴, BMP-2,BMP-4, BMP-7, TGF-베타, IGF-1, 오스테오폰틴, 플레이오트로핀, 액티빈, 엔도쎌린-1으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리엘-락트산(PLLA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 폴리(카프로락톤), 디올/디애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄 등의 생분해성 지방족 폴리에스테르와 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트) 및 폴리(하이드록시 발러레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 합성 고분자인 것인 조직 재생용 패치.

[청구항 16] (a) 생분해성 고분자를 단독 또는 혼합하여 유기 용매에 용해시켜 방사액을 제조하는 단계;

(b) 상기 방사액을 방사기를 이용하여 방사함과 동시에 상기 유기용매를 휘발시켜 생분해성 고분자 섬유들이 서로 이격 가능하면서 서로 얽힌 지지체를 제조하는 단계;

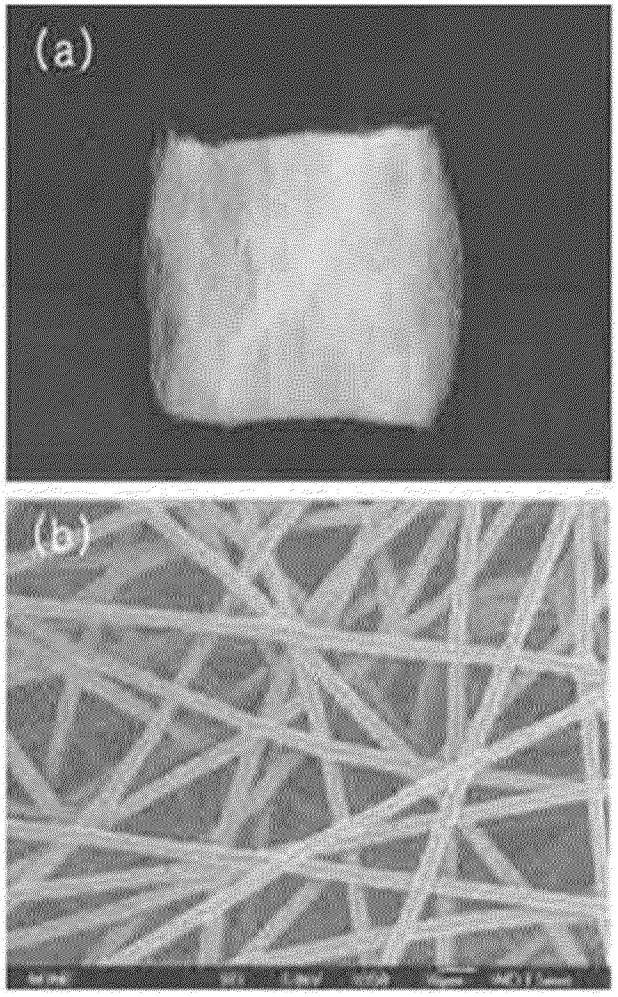
(c) 상기 제조된 지지체에 하나 이상의 양방향으로 물리적인 힘을 가해 전체 부피 및 서로 얽힌 고분자 섬유들 사이의 공극을 부풀려 솜털 형태의 지지체를 제공하는 단계; 및

(d) 상기 지지체에 세포, 약물, 생리활성물질 또는 이들의 조합을 도입시키는 단계를 포함하는, 조직 재생용 패치의 제조방법.

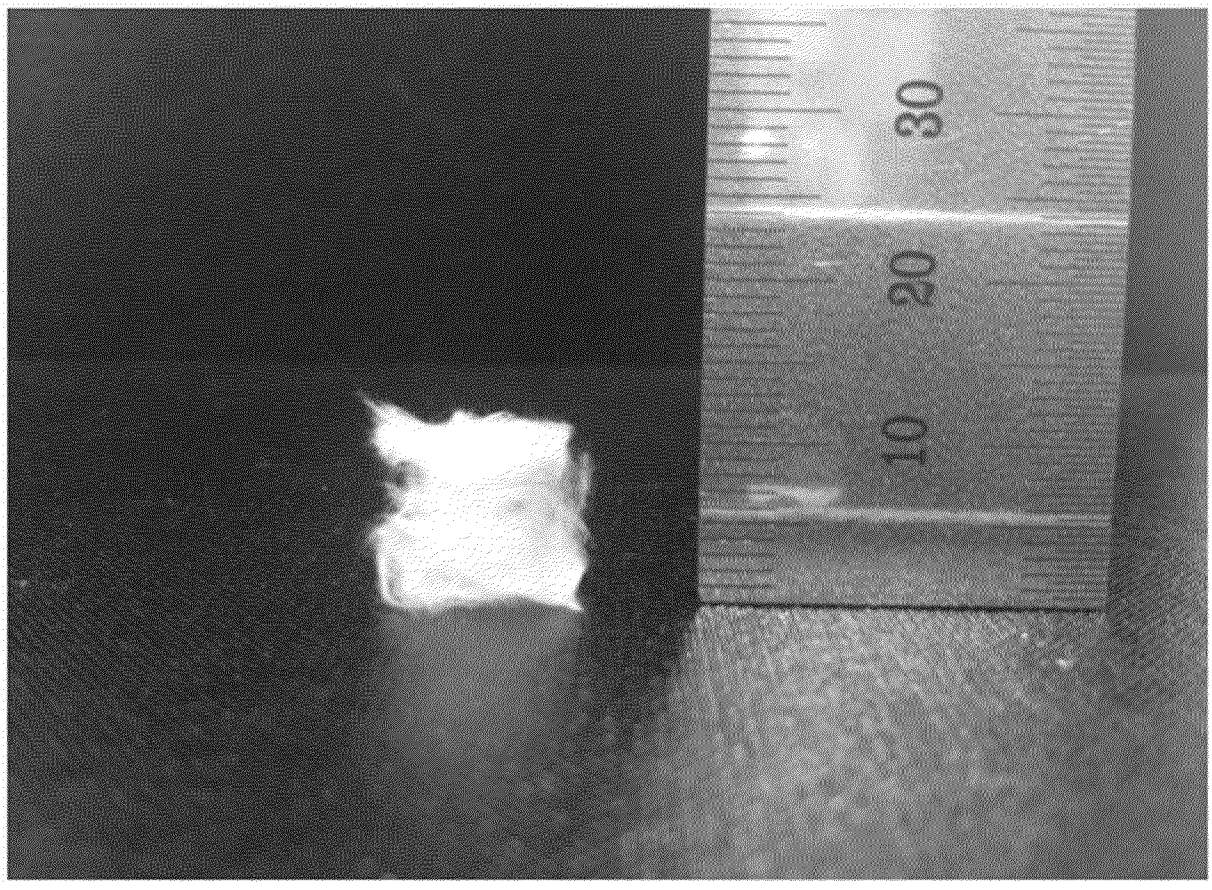
[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 방사기는 전기 방사기인 것인 제조방법.

[청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 지지체의 두께를 50 ㎛ 이상 1.5 ㎝ 이하로 확장시키는 것인 제조방법.

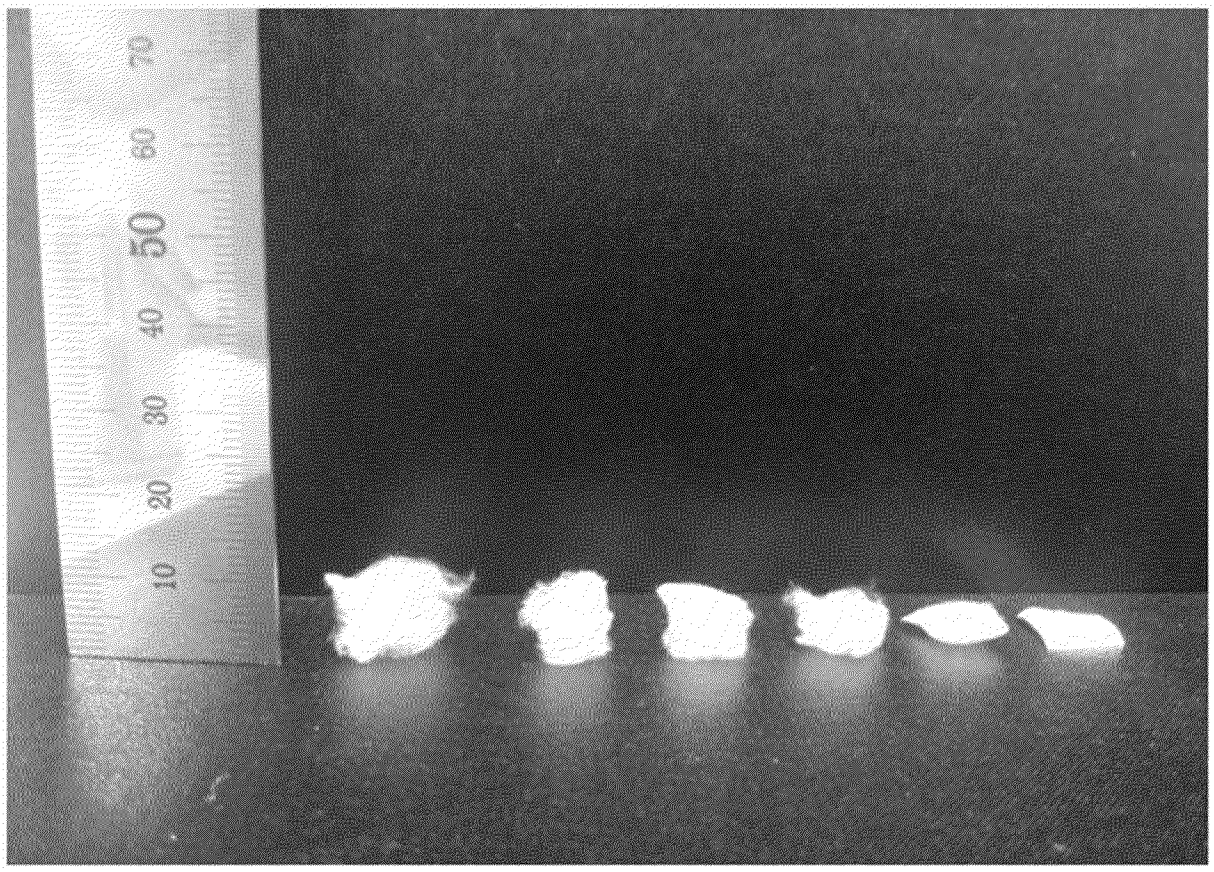
[Fig. 1]



[Fig. 2]



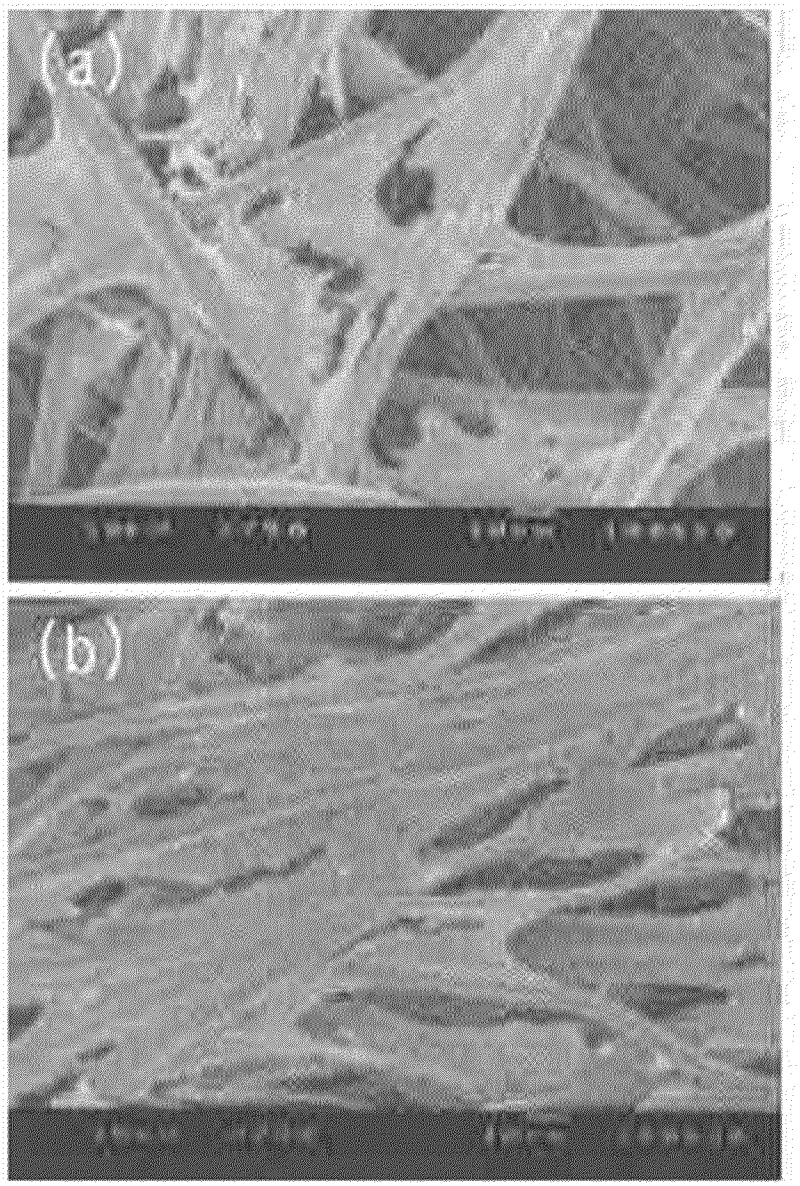
[Fig. 3]



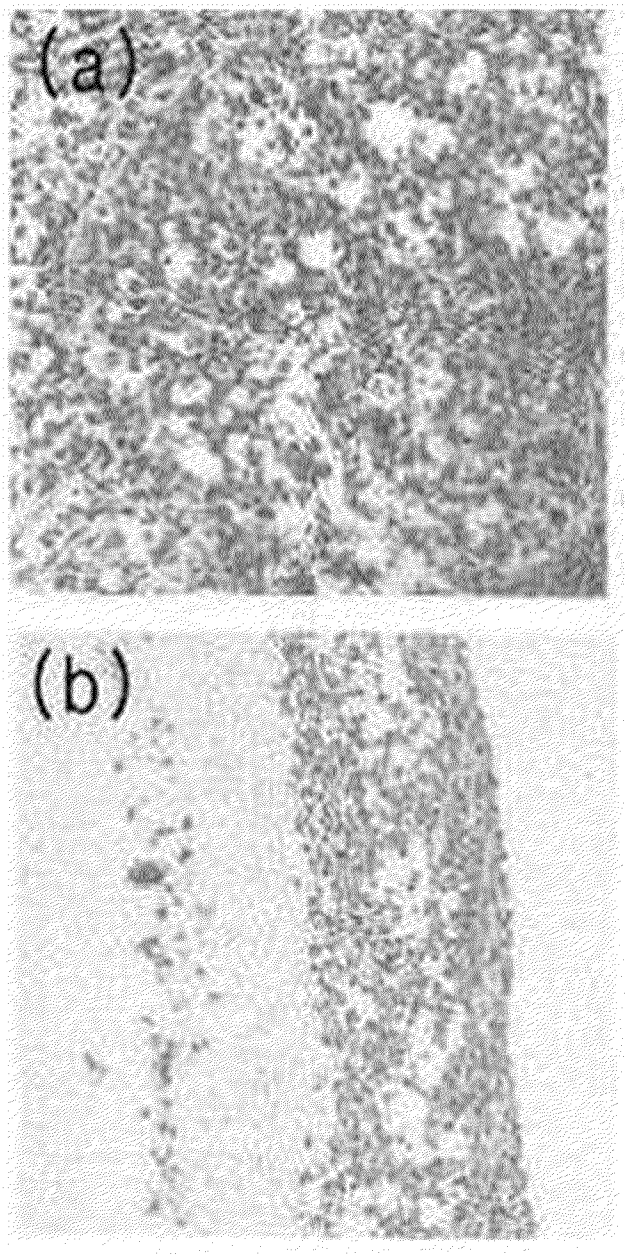
[Fig. 4]



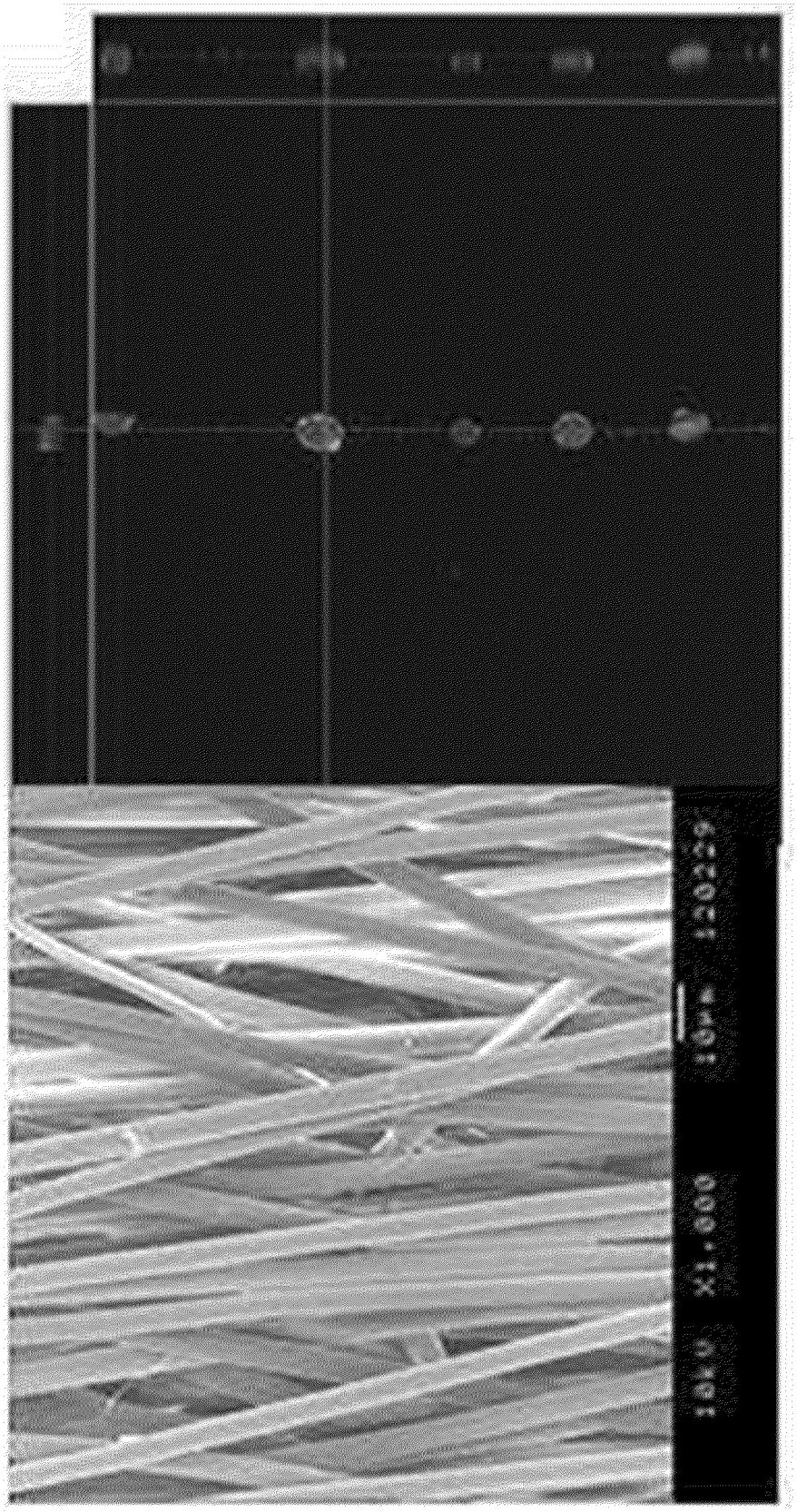
[Fig. 5]



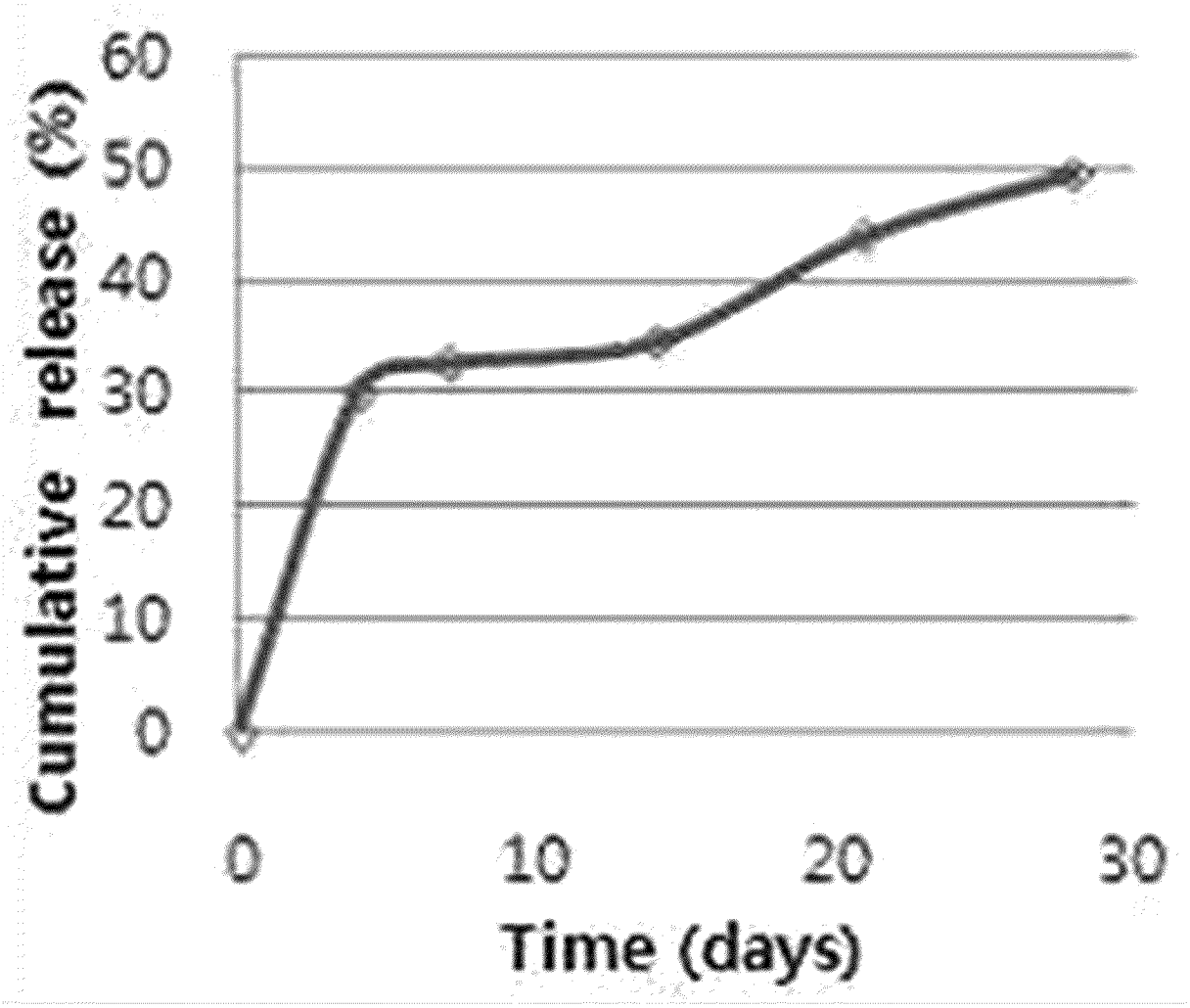
[Fig. 6]



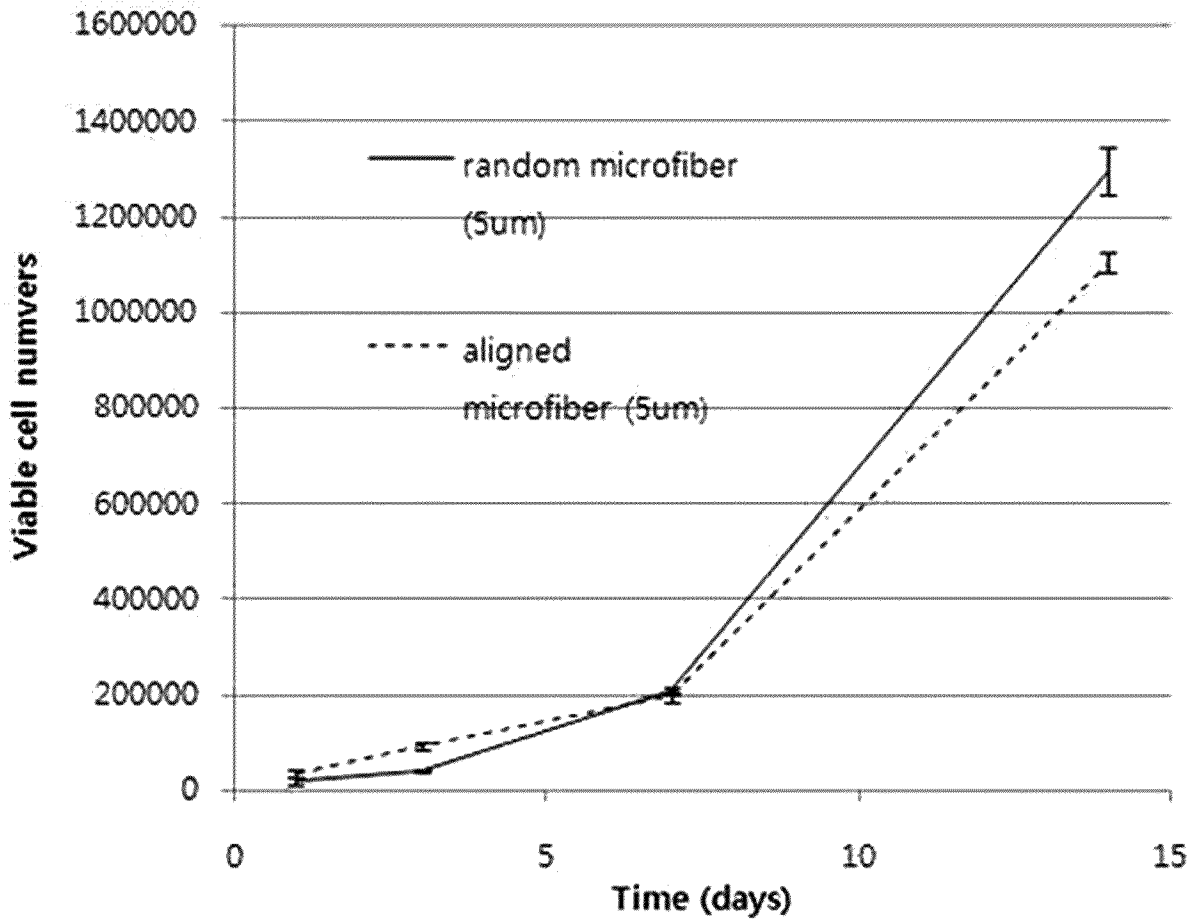
[Fig. 7]



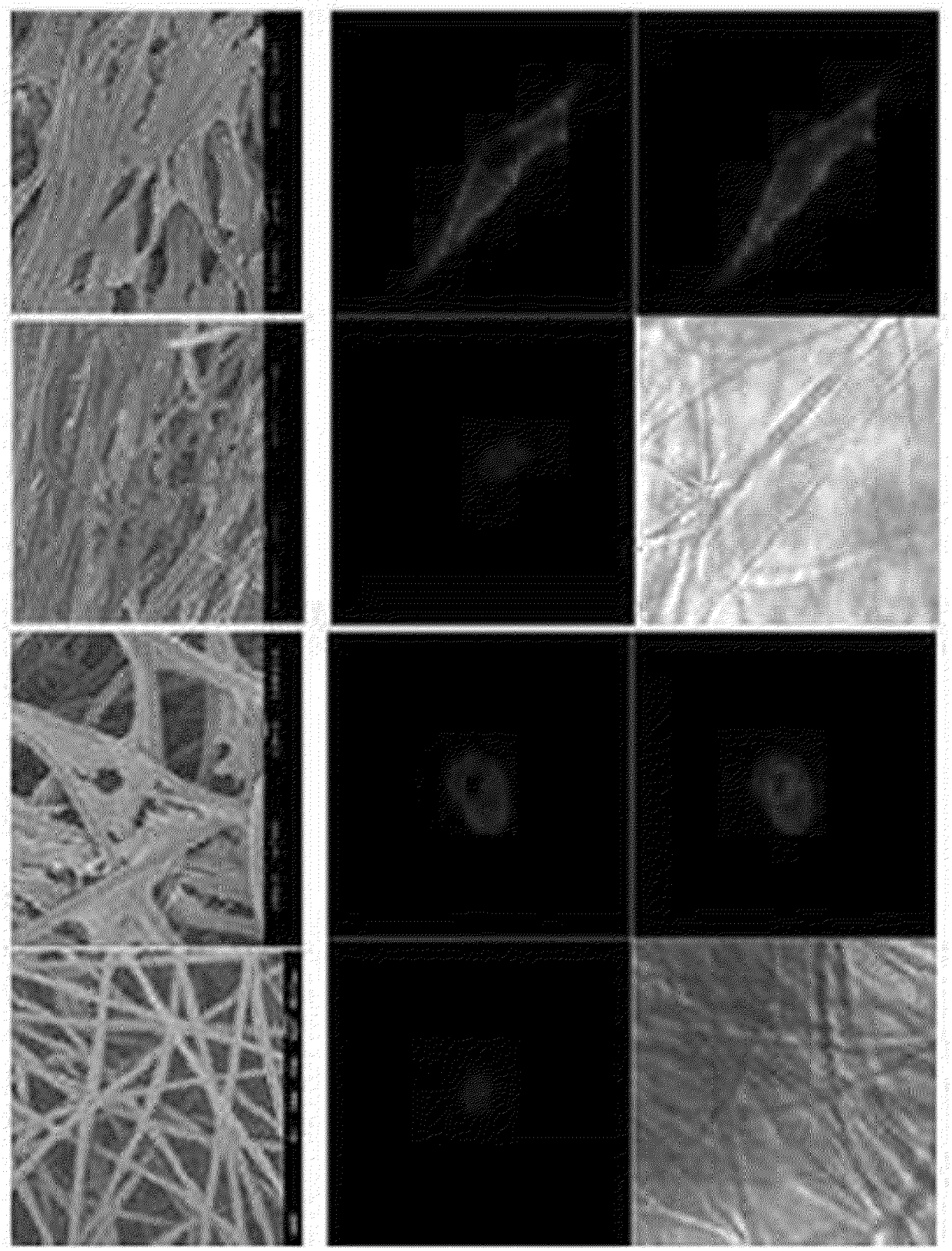
[Fig. 8]



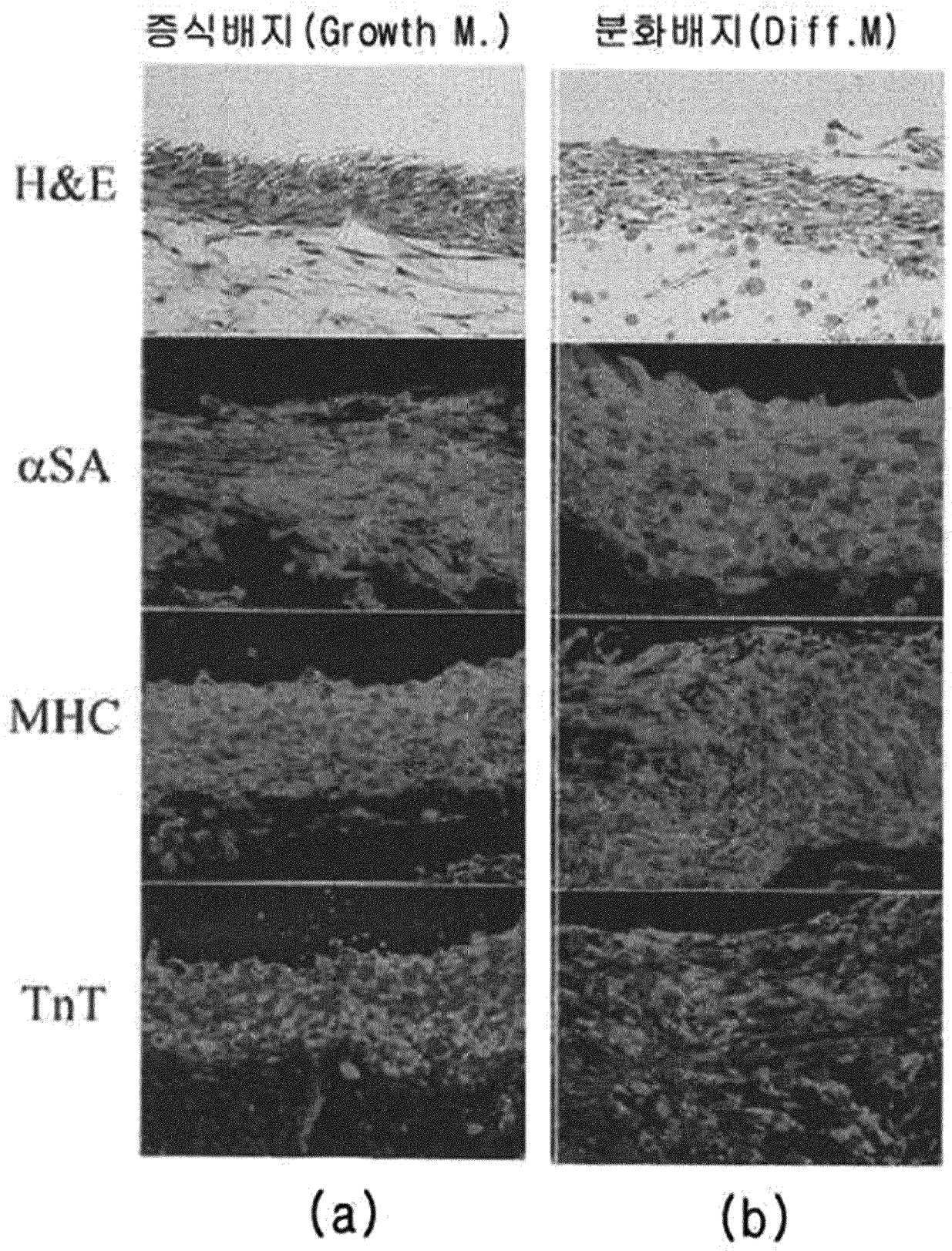
[Fig. 9]


1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Viable cell numvers
random microfiber (5um)
aligned microfiber (5um)
0
5
10
15
Time (days)

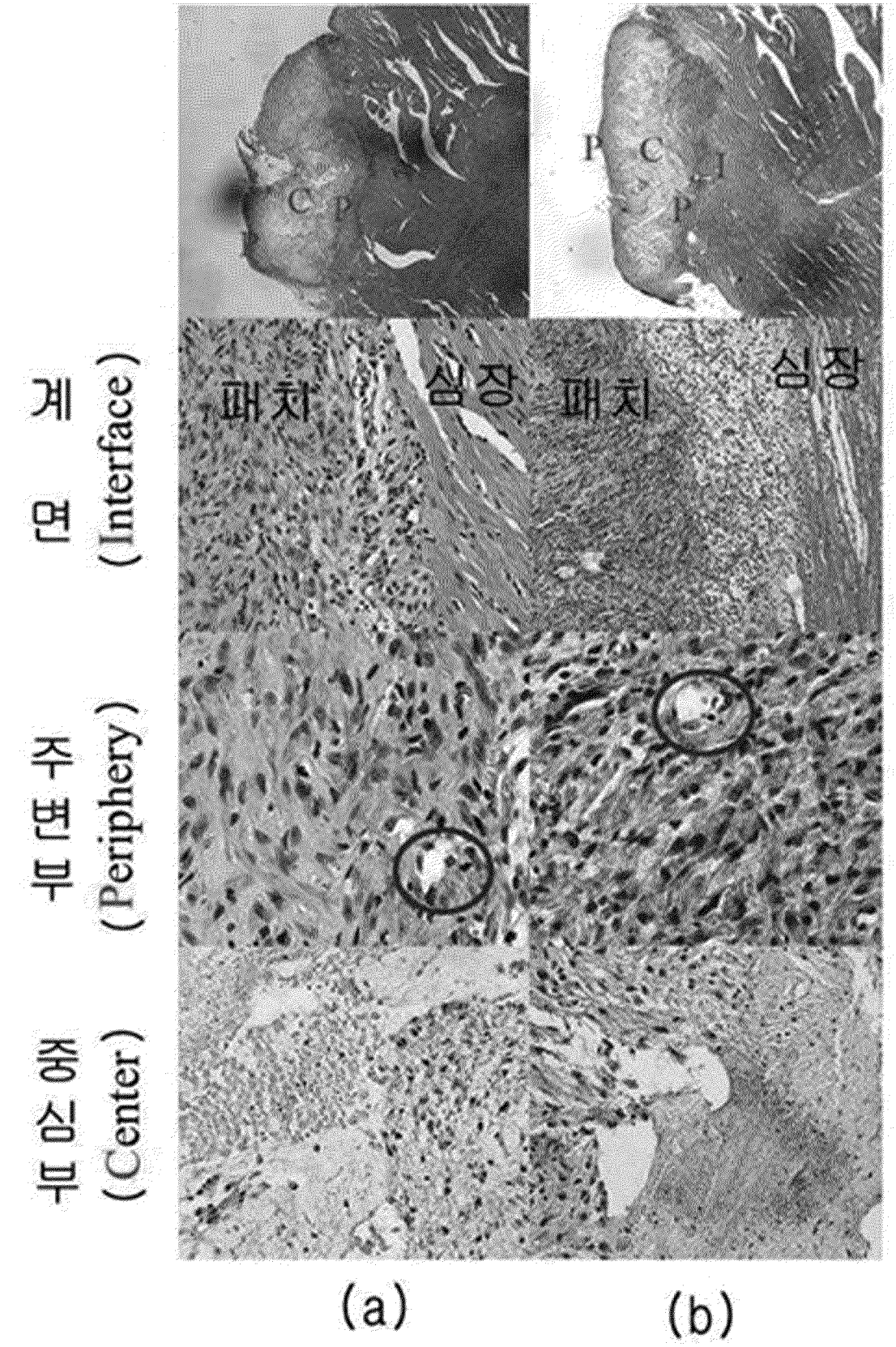
[Fig. 10]



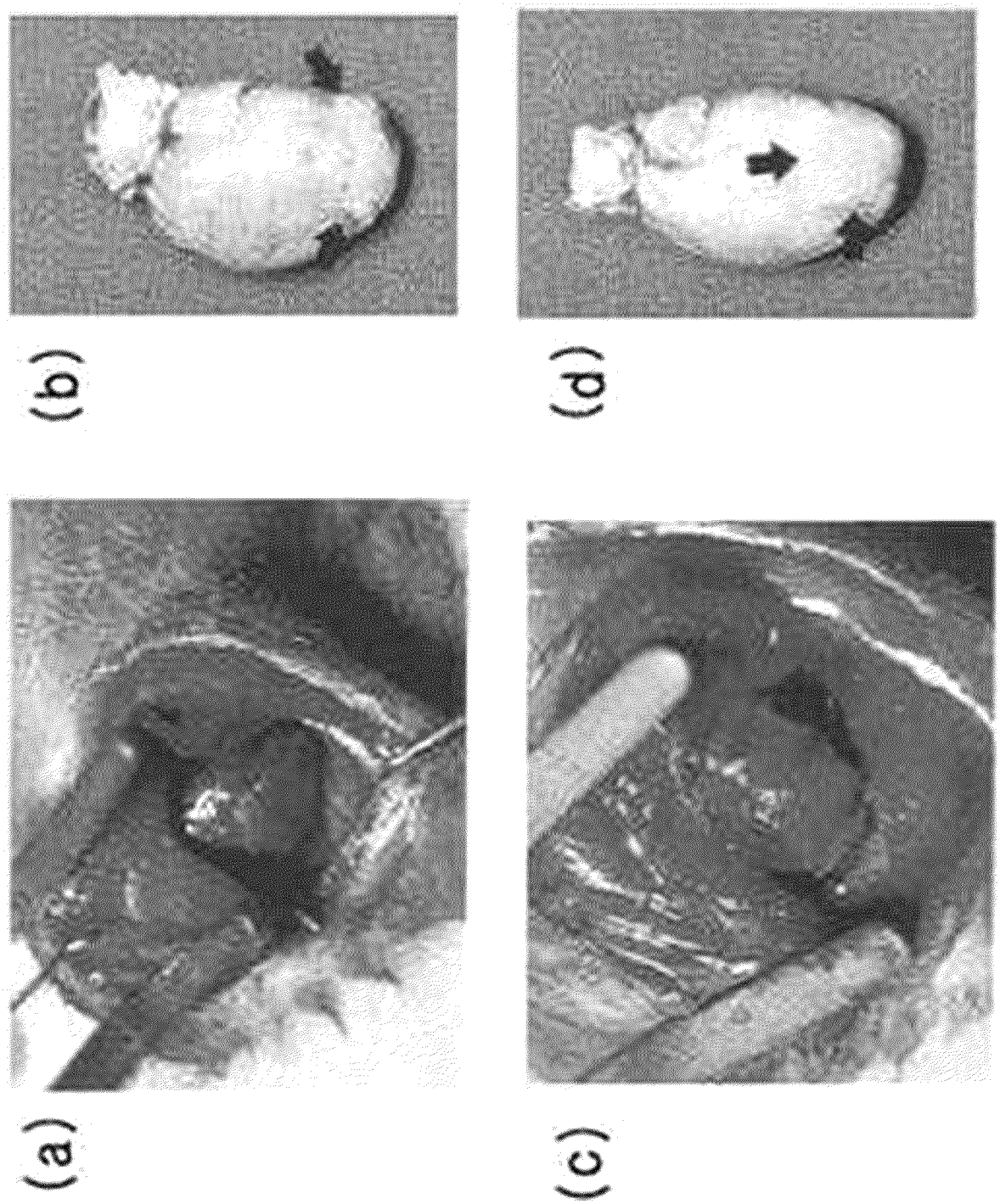
[Fig. 11]



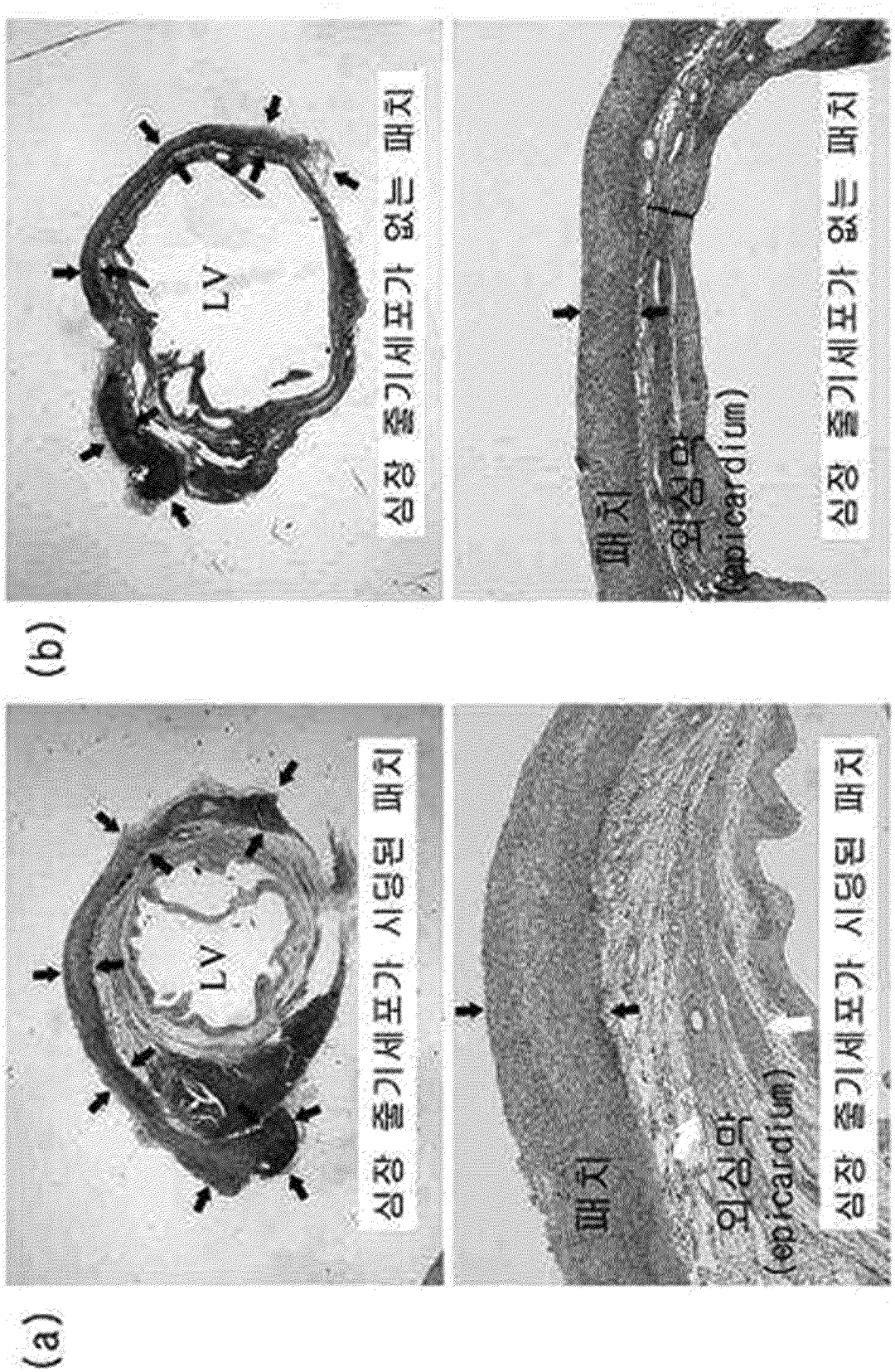
[Fig. 12]



[Fig. 13]



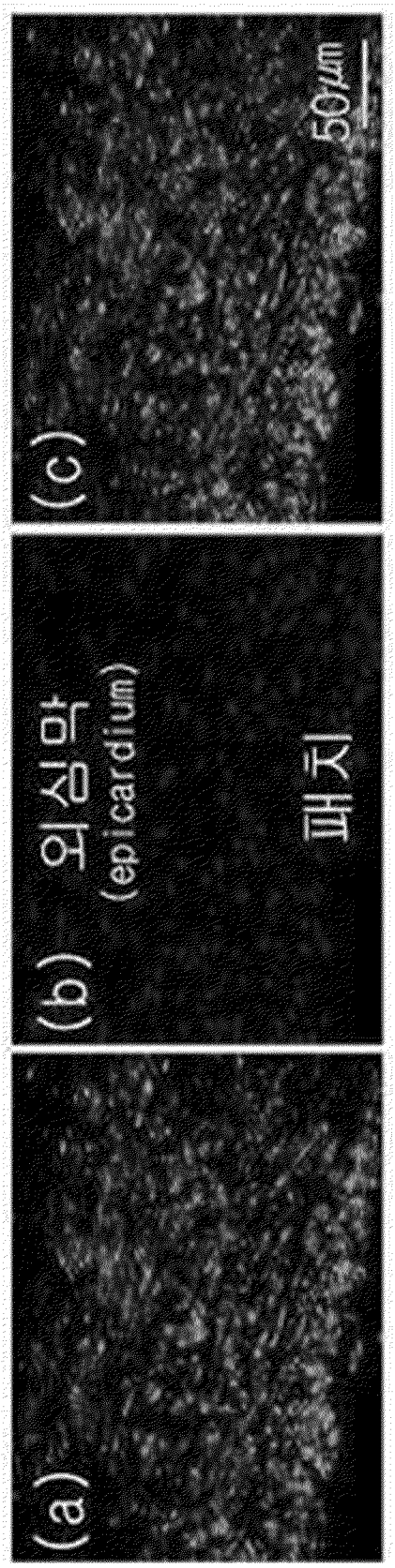
[Fig. 14]


(a)
(b)
LV
LV
심장 줄기세포가 시딩된 패치
심장 줄기세포가 없는 패치
패치
패치
외심막
(epicardium)
외심막
(epicardium)
심장 줄기세포가 시딩된 패치
심장 줄기세포가 없는 패치

[Fig. 15]



[Fig. 16]



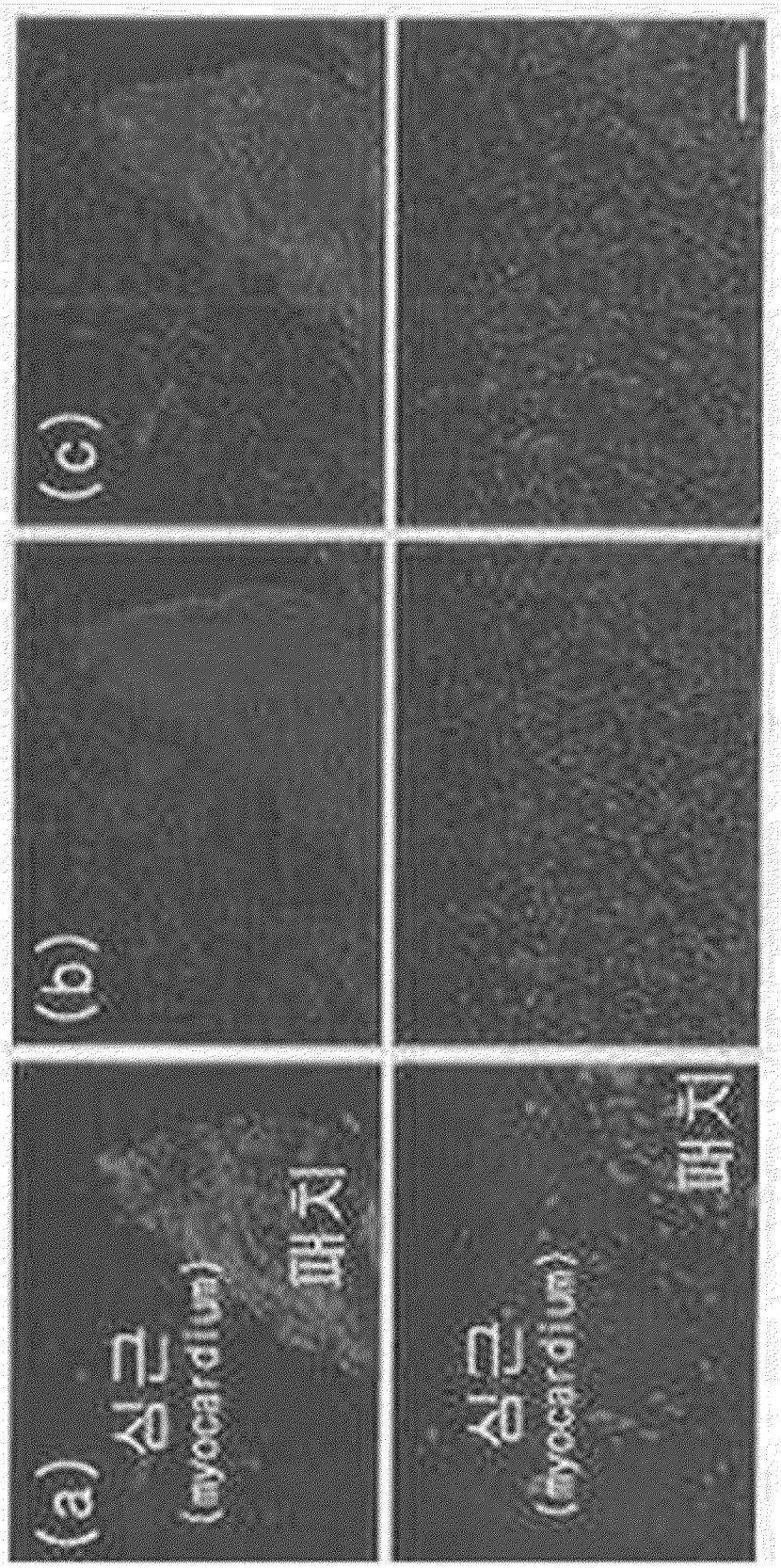
[Fig. 17]



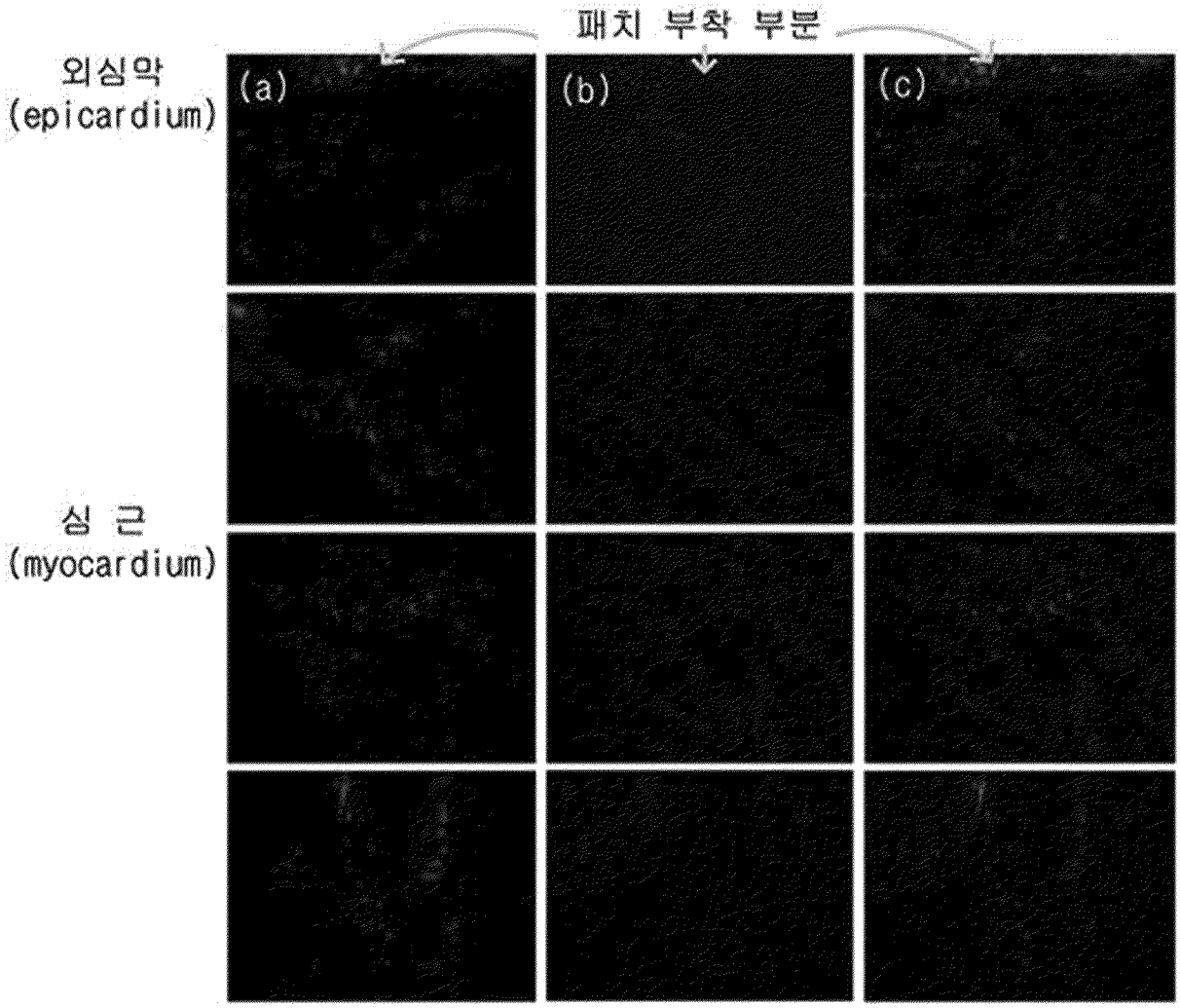
[Fig. 18]



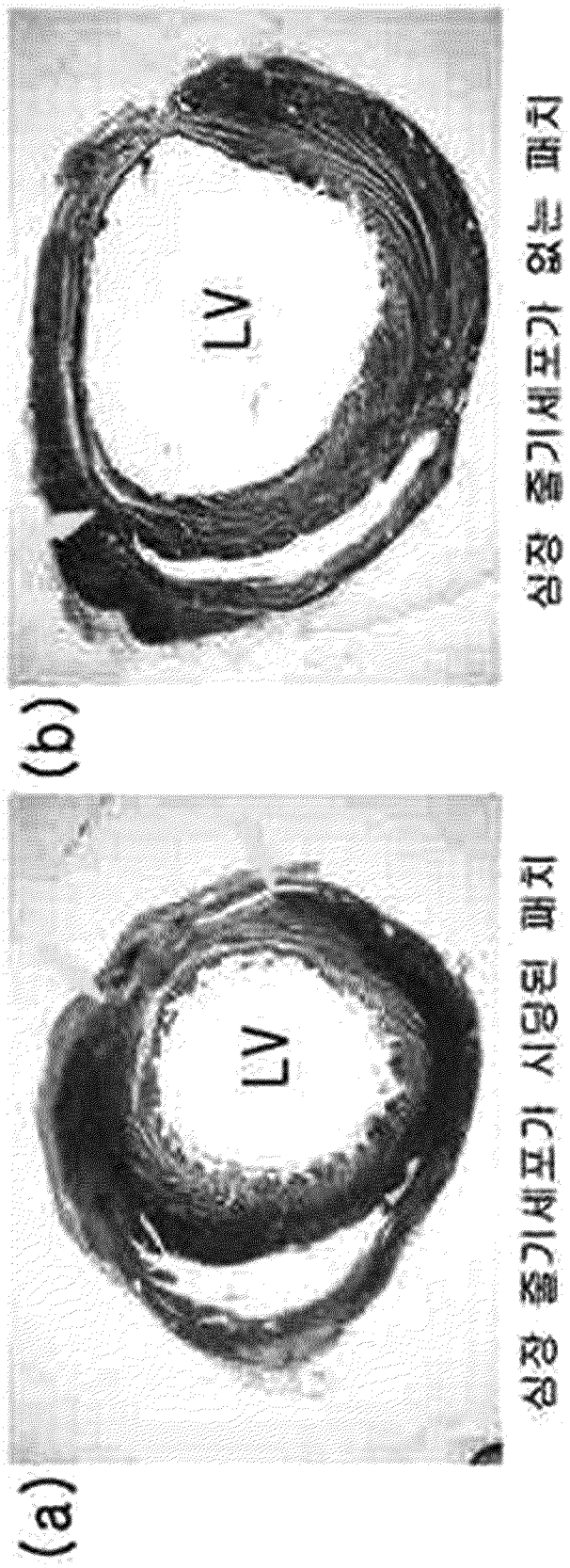
[Fig. 19]



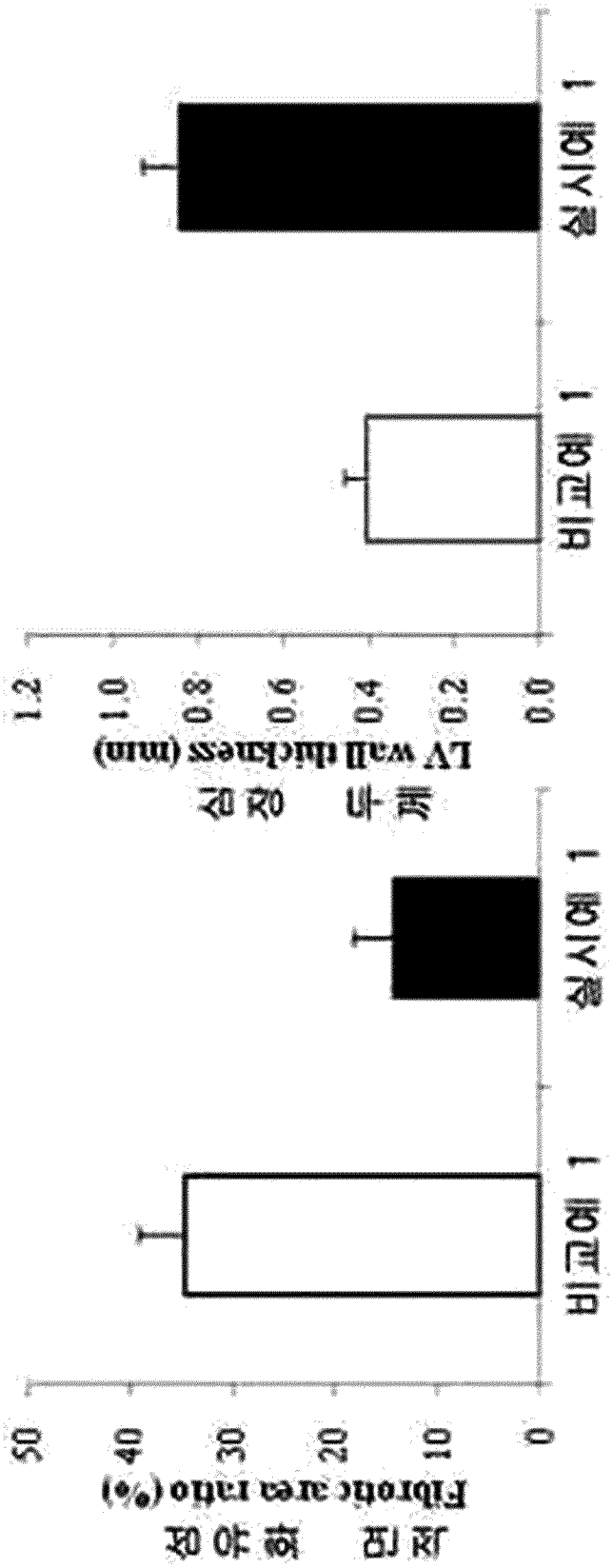
[Fig. 20]



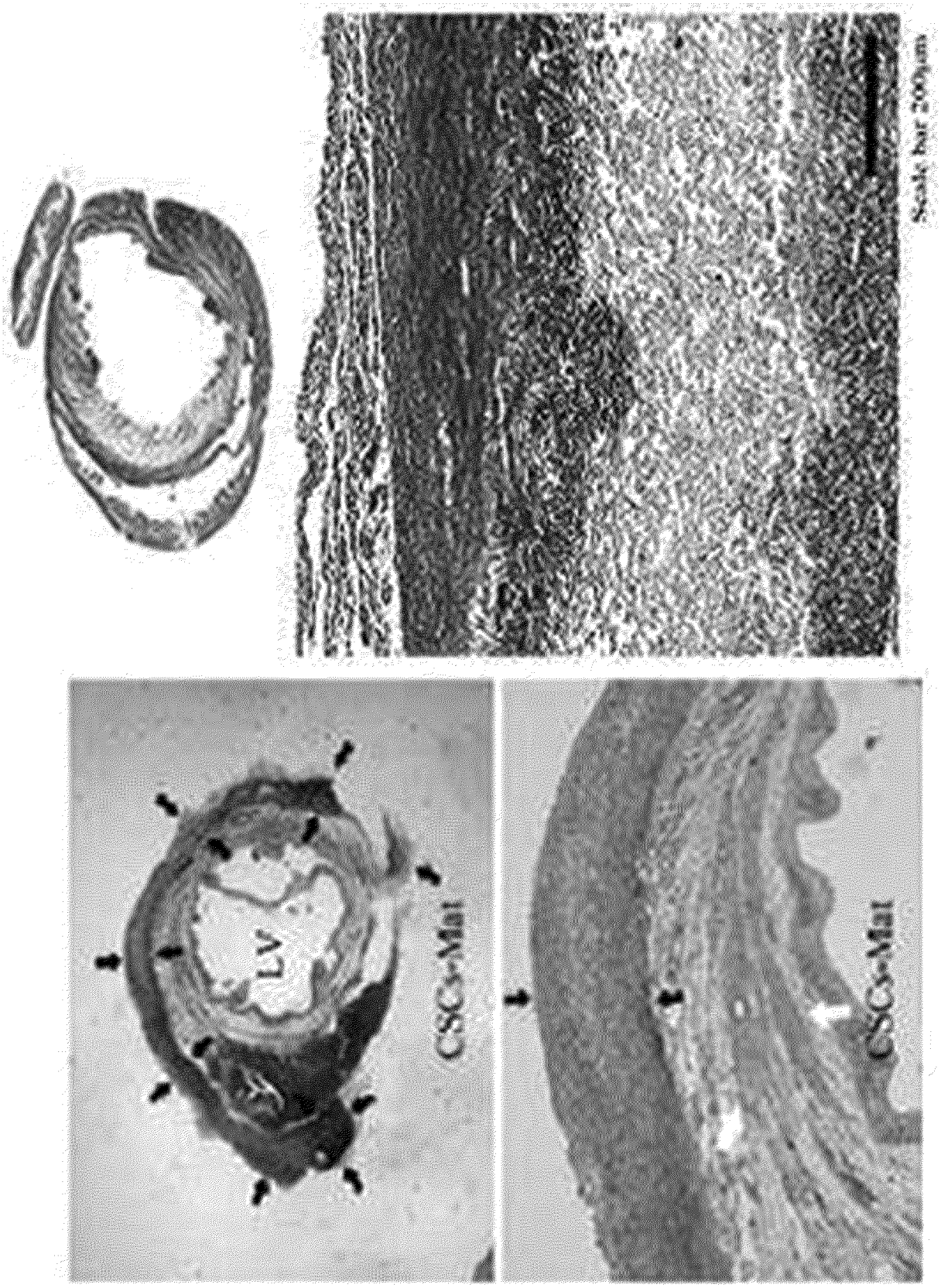
[Fig. 21]



[Fig. 22]


LV wall thickness (mm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
실시예 1
비교예 1
Fibrotic area ratio (%)
50
40
30
20
10
0
실시예 1
비교예 1

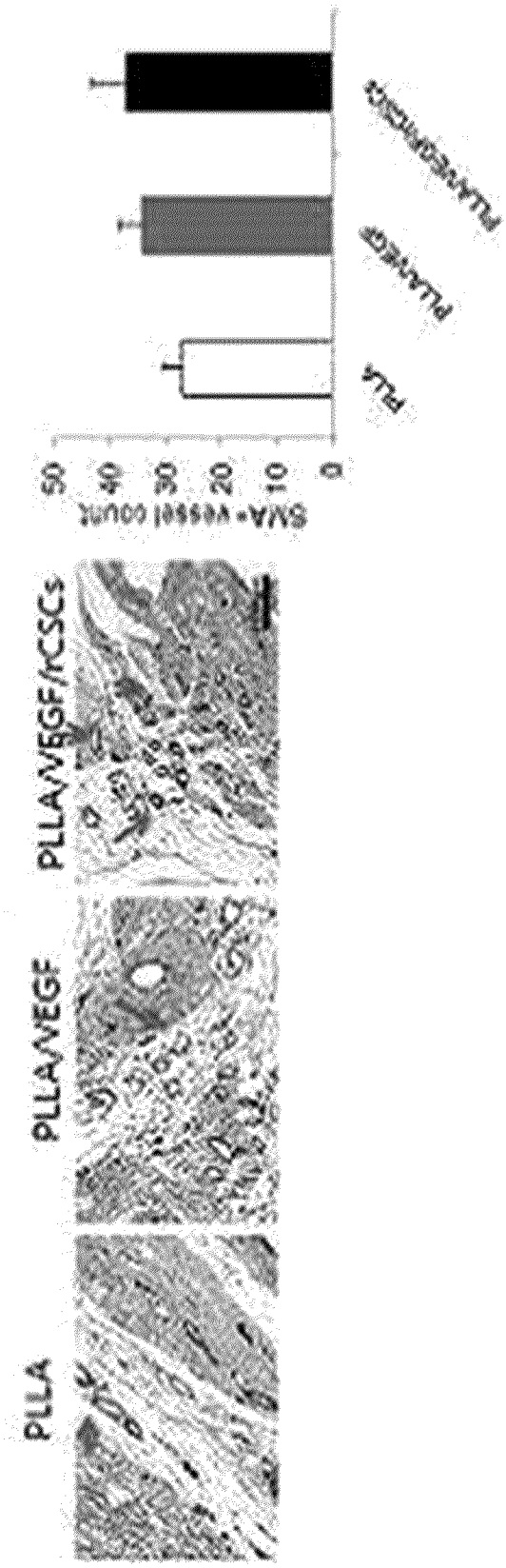
[Fig. 23]



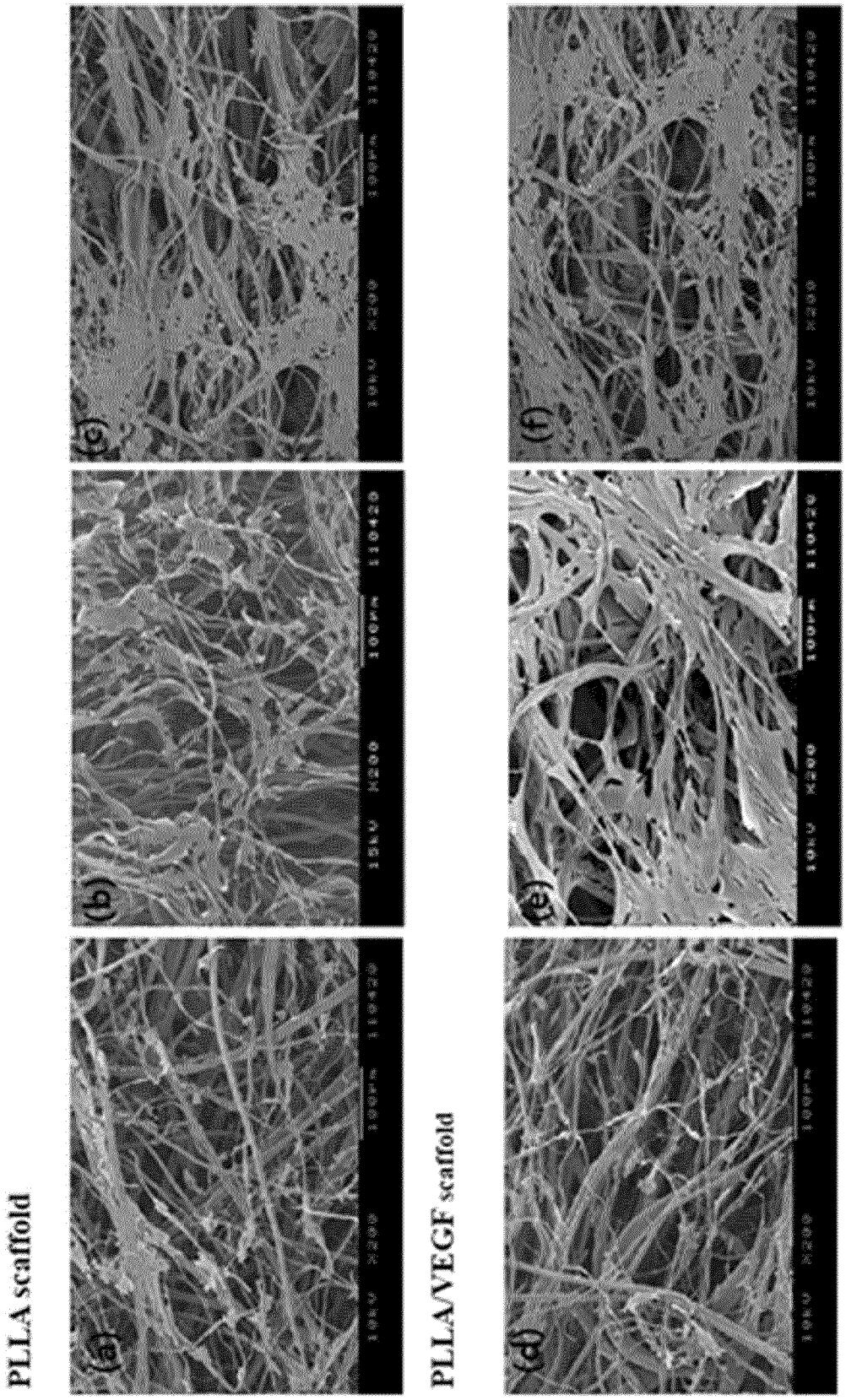
[Fig. 24]



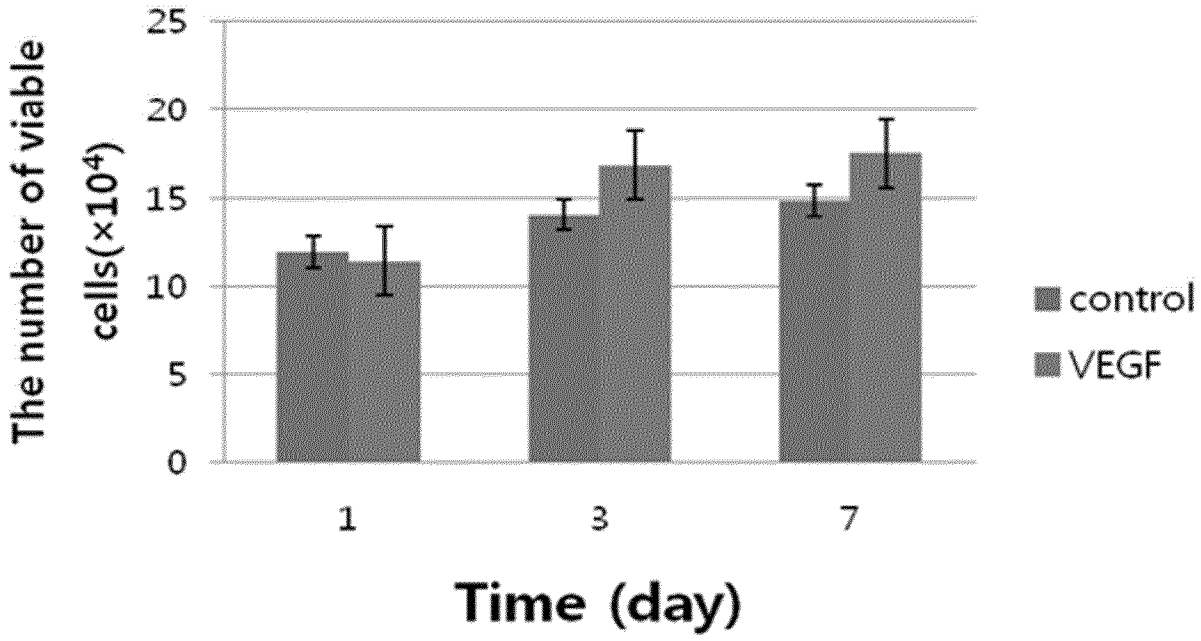
[Fig. 25]


PLLA/VEGF/rCSCs
PLLA/VEGF
PLLA
PLLA/VEGF/rCSCs
PLLA/VEGF
PLLA
SMA+ vessel count
50
40
30
20
10
0

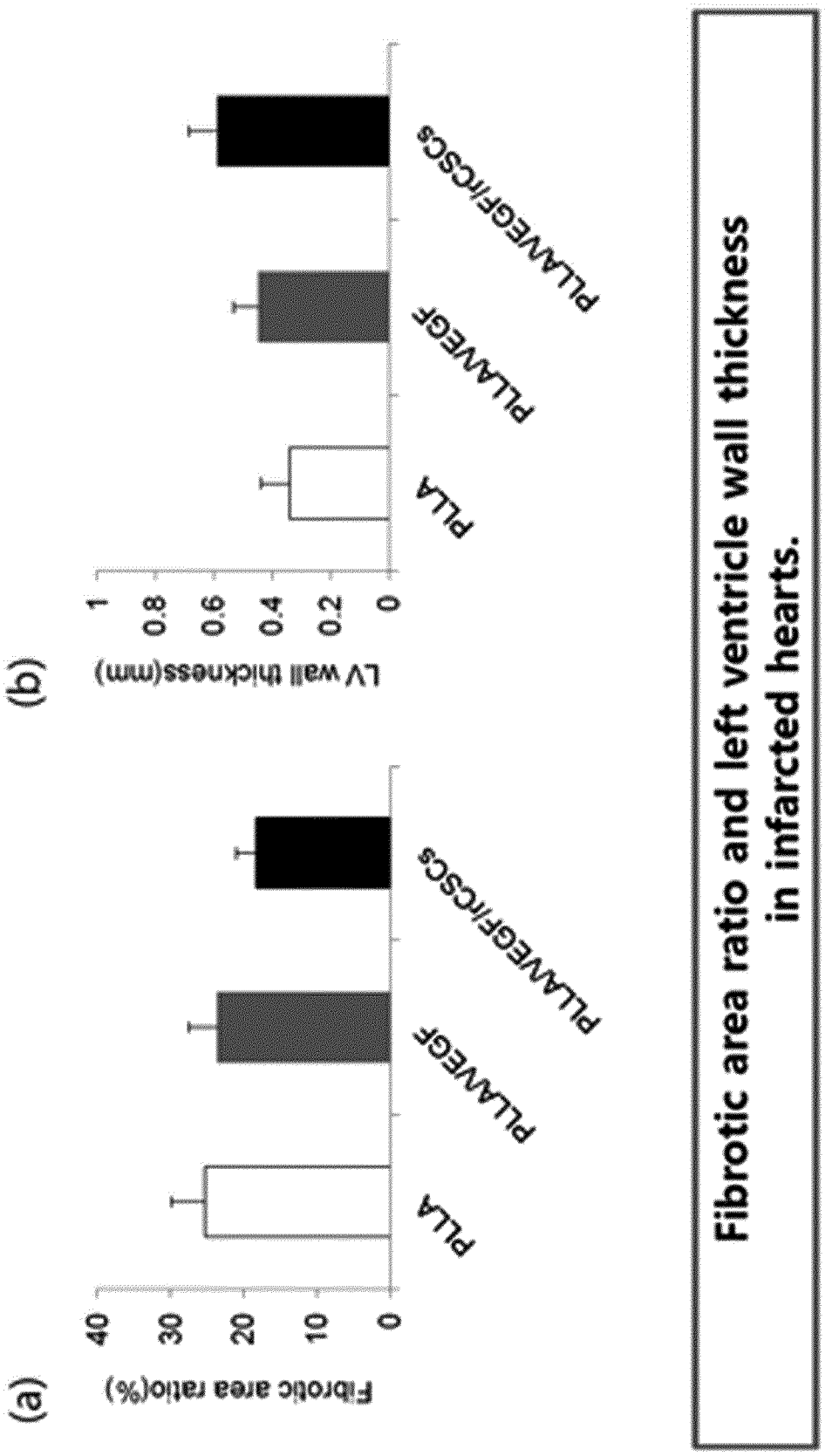
[Fig. 26]



[Fig. 27]

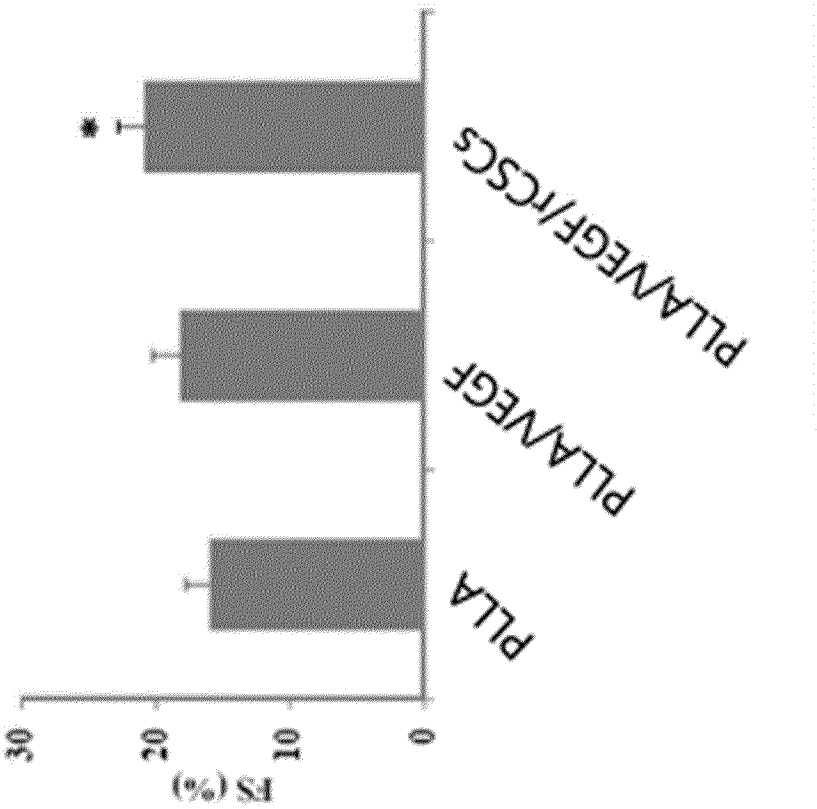

The number of viable cells(×10⁴)
25
20
15
10
5
0
1
3
7
Time (day)
control
VEGF

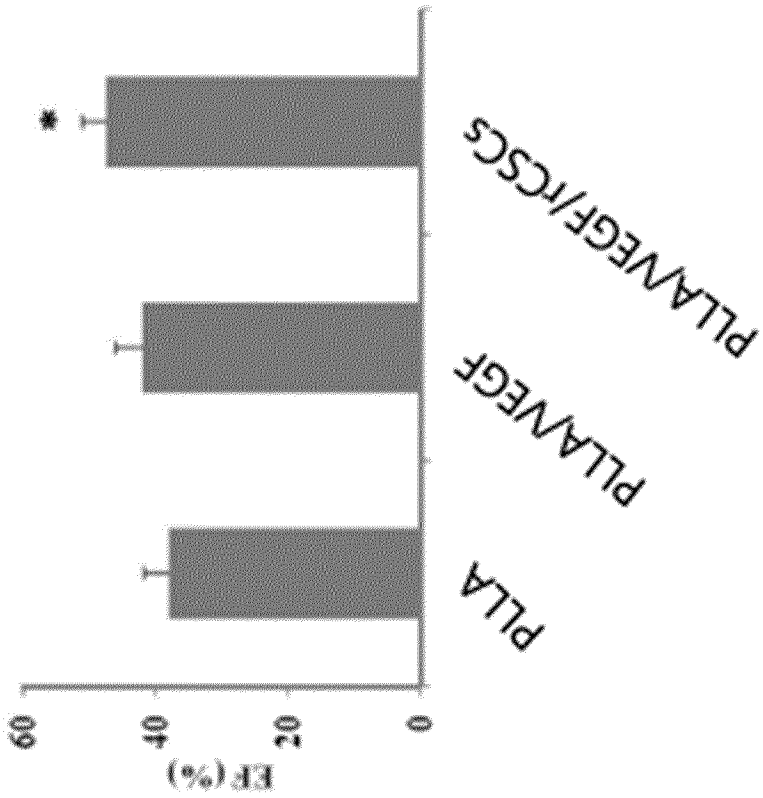
[Fig. 28]



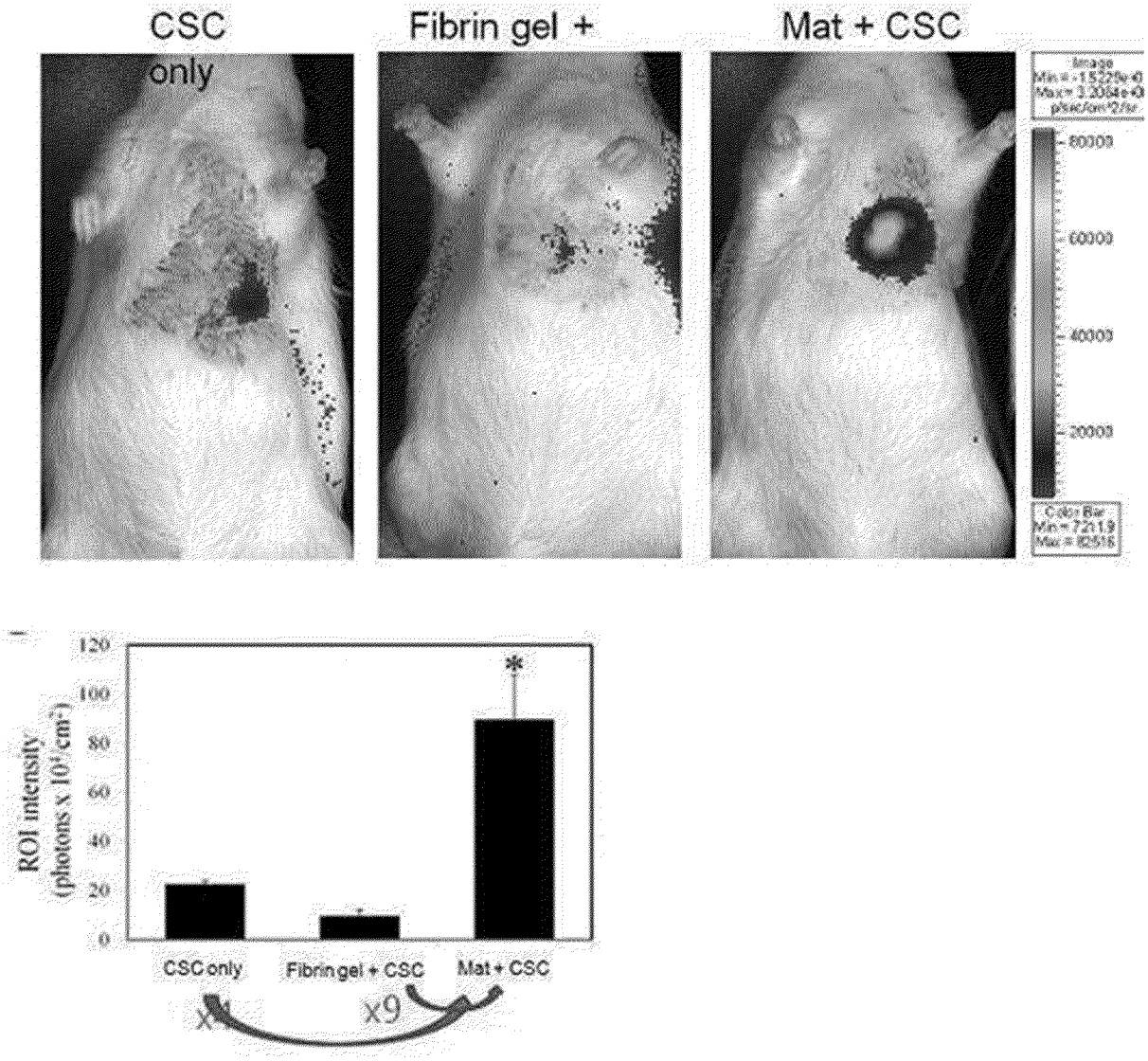
Fibrotic area ratio and left ventricle wall thickness in infarcted hearts.

[Fig. 29]

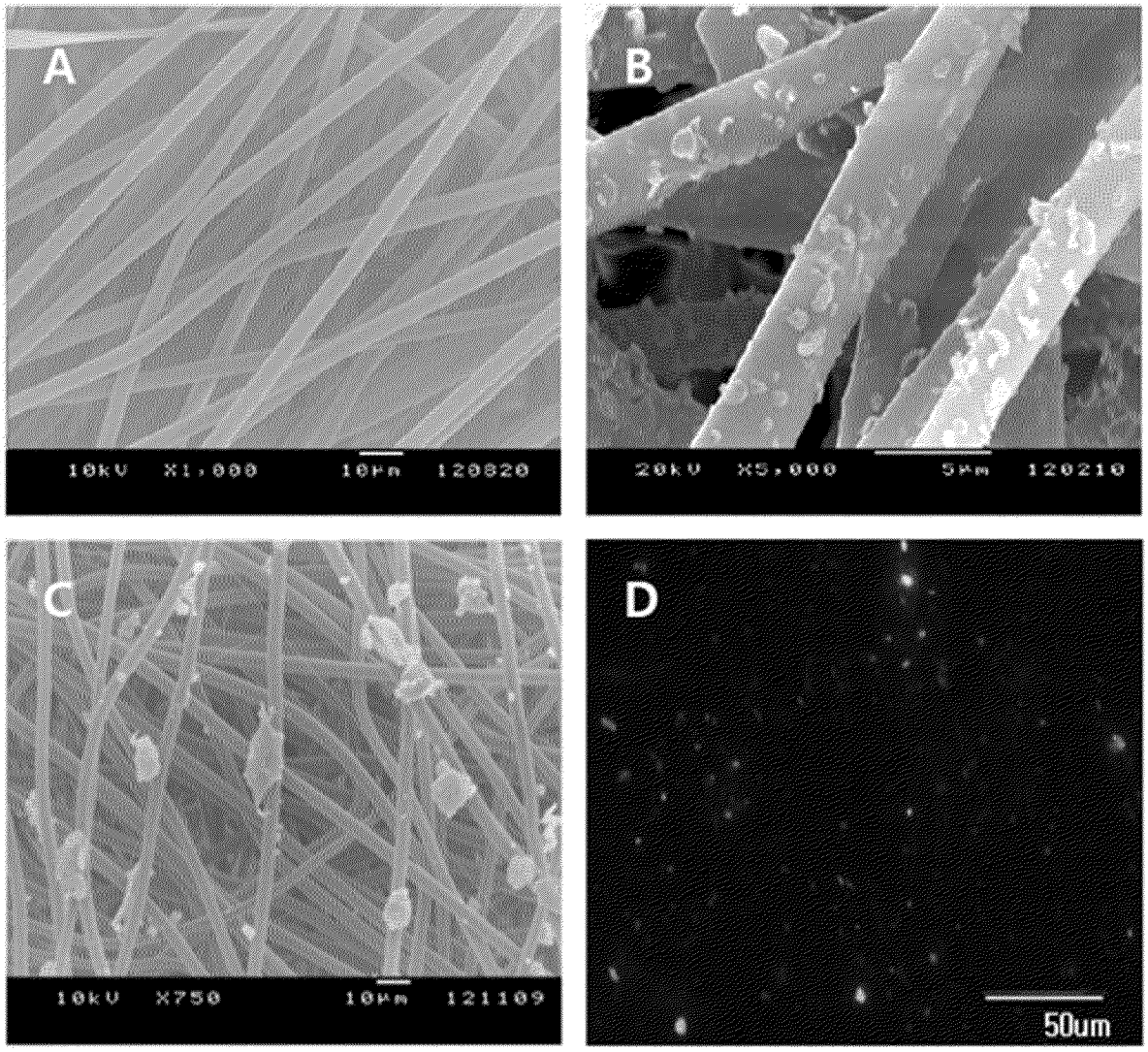

PLLA/VEGF/rCSCs
PLLA/VEGF
PLLA
*
0
10
20
30
FS (%)


PLLA/VEGF/rCSCs
PLLA/VEGF
PLLA
*
0
20
40
60
EF (%)

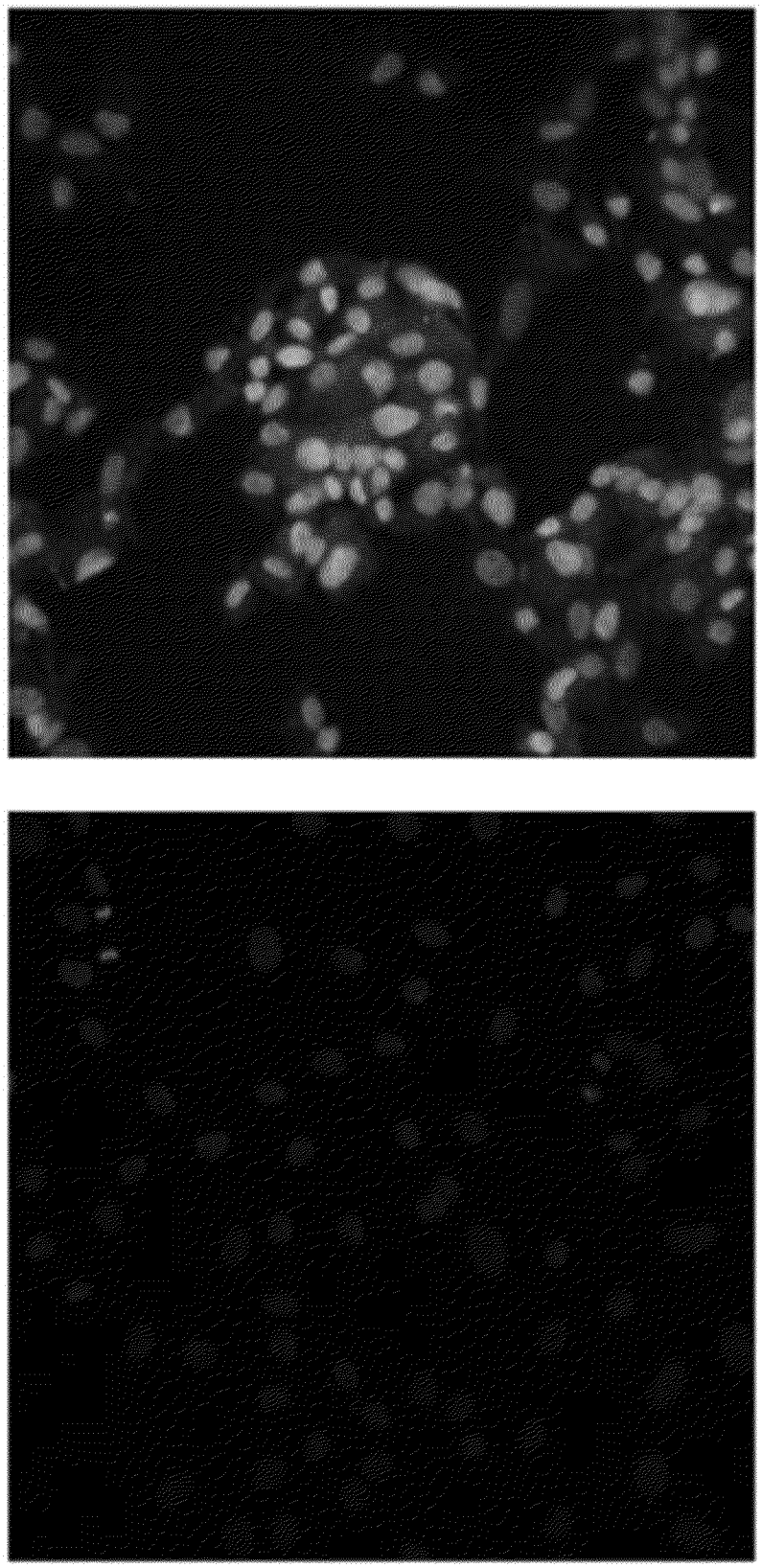
[Fig. 30]


CSC only
Fibrin gel +
Mat + CSC
Image
Min = 1.522e+0
Max = 3.206e+0
p/sec/cm^2/sr
80000
60000
40000
20000
Color Bar
Min = 7211.9
Max = 82516
ROI intensity (photons x 10^3/cm^2)
120
100
80
60
40
20
0
*
CSC only
Fibrin gel + CSC
Mat + CSC
x9

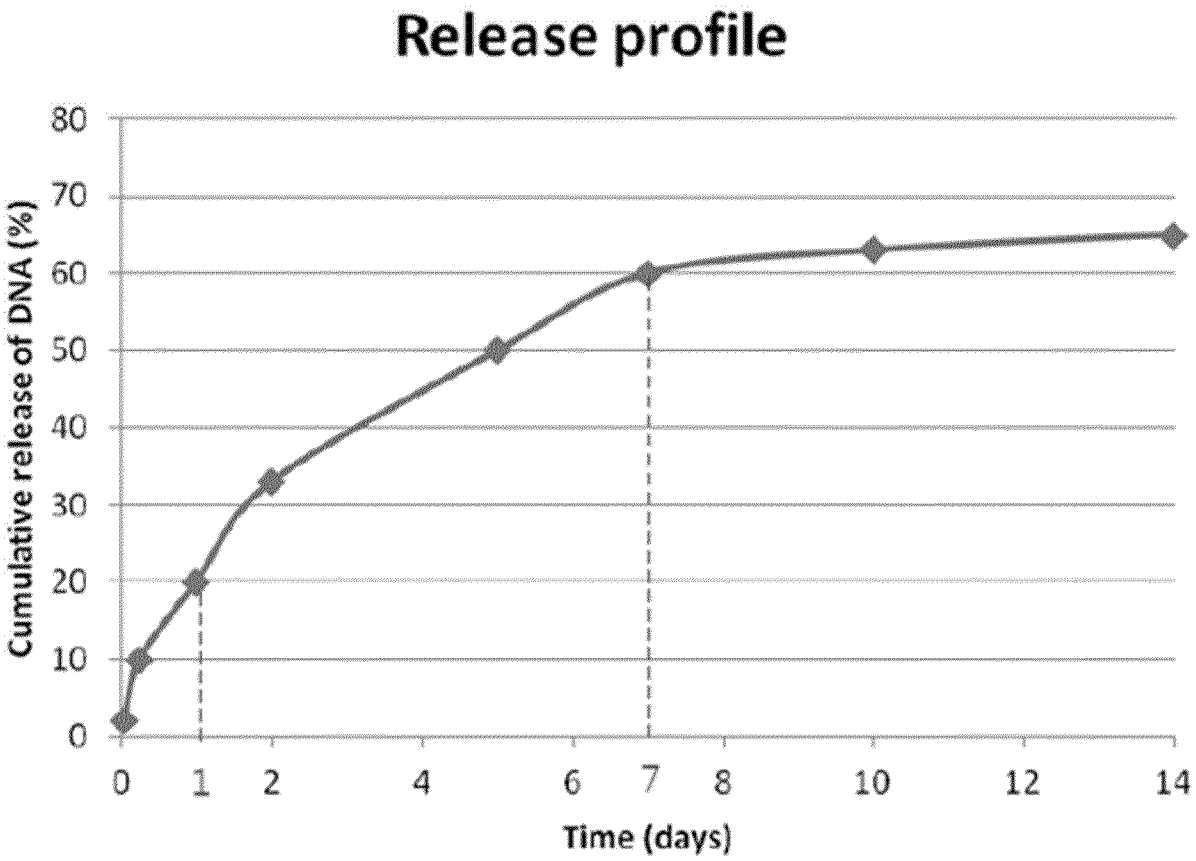
[Fig. 31]


A
10kV X1,000 10μm 120820
B
20kV X5,000 5μm 120210
C
10kV X750 10μm 121109
D
50um

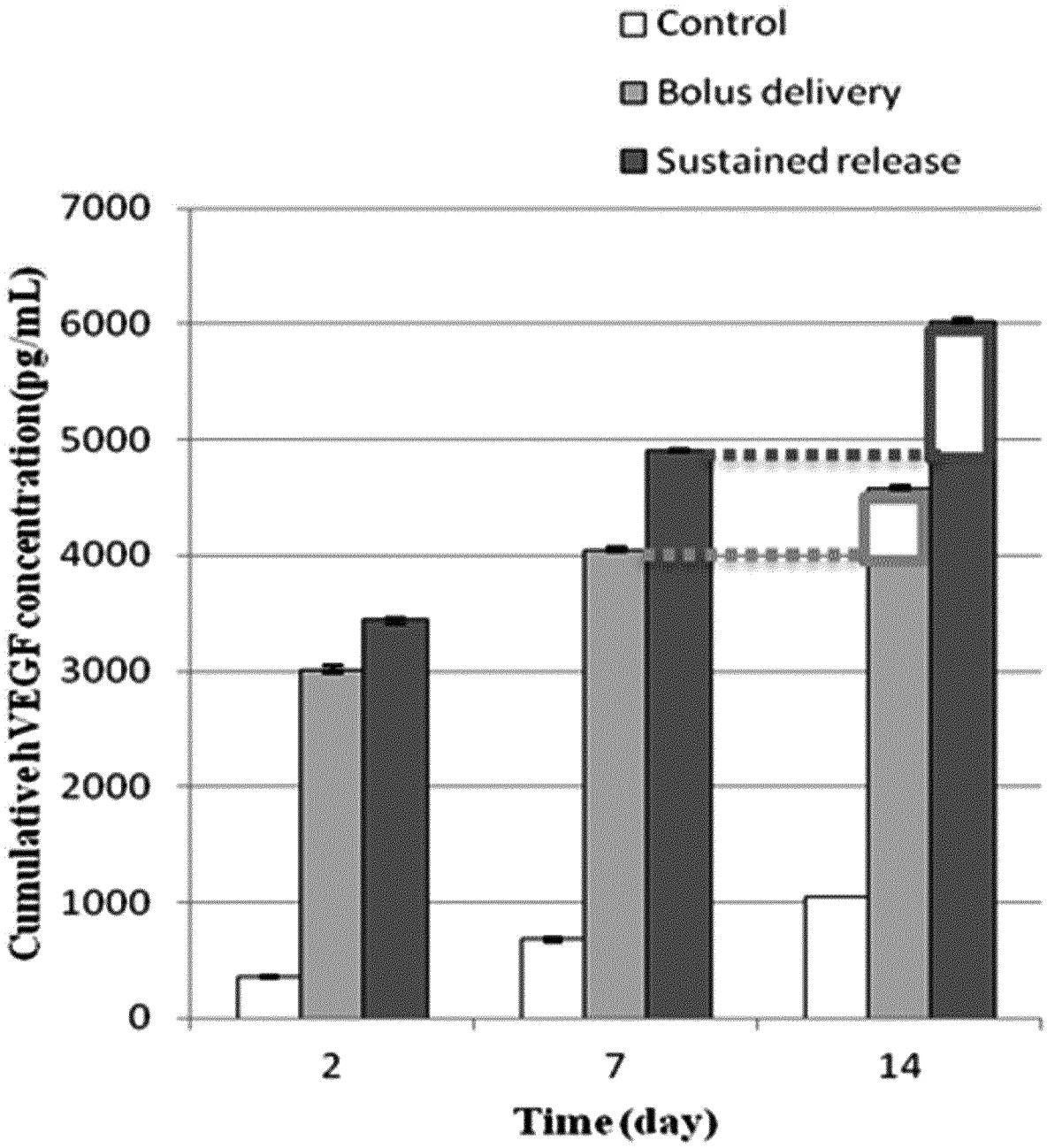
[Fig. 32]



[Fig. 33]


Release profile
Cumulative release of DNA (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
1
2
4
6
7
8
10
12
14
Time (days)

[Fig. 34]


Control
Bolus delivery
Sustained release
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Cumulative hVEGF concentration(pg/mL)
2
7
14
Time (day)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/005094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/56(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/38(2006.01)i, C08L 101/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/56; C12N 5/06; A61F 2/00; A61L 27/34; C08L 67/04; A61L 27/14; A61L 27/38; C08L 101/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: support, biodegradation, fluffy, air gap

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIM et al., "Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration" Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, vol. 9,B, issue 1, pp. 150-160 (19 August 2010) See abstract, pages 151-154, 157 and 158, figure 1.	1-18
A	US 6899873 B2 (MA et al.) 31 May 2005 See the entire document.	1-18
A	KR 10-2005-0040186 A (LEE, Seung Jin) 03 May 2005 See the entire document.	1-18
A	KR 10-0496354 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY OF TECHNOLOGY CENTER FOR INDUSTRY COLLABORATION) 20 June 2005 See the entire document.	1-18
A	YANG et al., "Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering" Biomaterials, vol. 25, no. 10, pp. 1891-1900 (May 2004) See the entire document.	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 AUGUST 2013 (06.08.2013)	**06 AUGUST 2013 (06.08.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

International application No.
PCT/KR2013/005094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 6899873 B2	31/05/2005	AU 2002-243663 A1	19/08/2002
		US 2002-150753 A1	17/10/2002
		WO 02-062968 A2	15/08/2002
		WO 02-062968 A3	05/12/2002
KR 10-2005-0040186 A	03/05/2005	NONE	
KR 10-0496354 B1	20/06/2005	AU 2003-218804 A1	08/10/2003
		US 2005-0165475 A1	28/07/2005
		WO 03-080142 A1	02/10/2003

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/005094

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/56(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/38(2006.01)i, C08L 101/16(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/56; C12N 5/06; A61F 2/00; A61L 27/34; C08L 67/04; A61L 27/14; A61L 27/38; C08L 101/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지지체, 생분해, 솜털, 공극

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHIM 외, 'Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration' Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, Vol.9,B, Issue 1, pp.150-160 (2010.8.19) 요약, 페이지 151-154, 157, 158, 도면 1 참조.	1-18
A	US 6899873 B2 (MA 외) 2005.5.31 전체 문헌 참조.	1-18
A	KR 10-2005-0040186 A (이승진) 2005.5.3 전체 문헌 참조.	1-18
A	KR 10-0496354 B1 (서울산업대학교 산학협력단) 2005.6.20 전체 문헌 참조.	1-18
A	YANG 외, 'Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering' Biomaterials, Vol.25, No.10, pp.1891-1900 (2004.5.) 전체 문헌 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 08월 06일 (06.08.2013)	2013년 08월 06일 (06.08.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/005094

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 6899873 B2	2005/05/31	AU 2002-243663 A1	2002/08/19
		US 2002-150753 A1	2002/10/17
		WO 02-062968 A2	2002/08/15
		WO 02-062968 A3	2002/12/05
KR 10-2005-0040186 A	2005/05/03	없음	
KR 10-0496354 B1	2005/06/20	AU 2003-218804 A1	2003/10/08
		US 2005-0165475 A1	2005/07/28
		WO 03-080142 A1	2003/10/02