



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0062427
(43) 공개일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 3/075 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) C08K 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08J 3/075 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0063967(분할)
(22) 출원일자 2017년05월24일
심사청구일자 2017년05월24일
(62) 원출원 특허 10-2015-0124684
원출원일자 2015년09월03일
심사청구일자 2015년09월03일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이덕원
서울특별시 강동구 동남로 892 강동경희대학교병원 4층 치과병원 구강악안면외과
김은철
서울특별시 강남구 영동대로128길 15 홍실아파트 1-802호(삼성동)
(74) 대리인
고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽

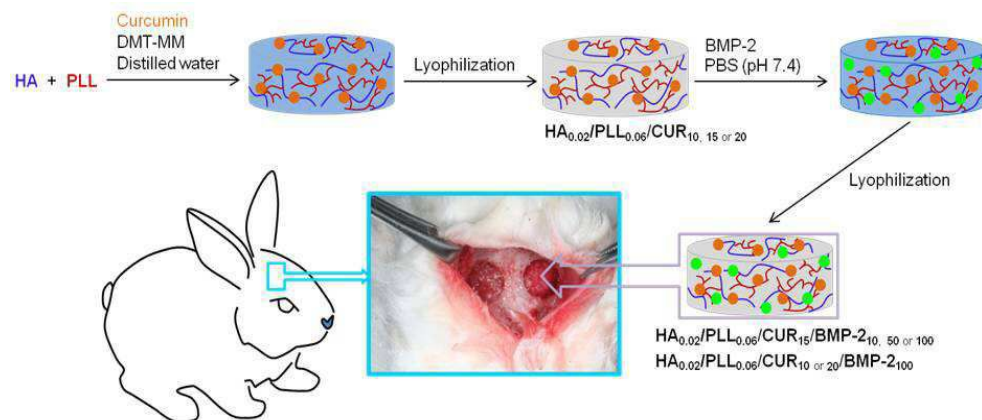
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물

(57) 요약

본 발명은 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택된 생체적합성 고분자를 가교제로 가교시켜 형성한 히알루론산 기반 하이드로겔을 제공한다. 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 골 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔로 골 형성 성장 인자, 커큐민(curcumin)과 같은 골 형성 관련 물질을 캡슐화하는 경우 골 형성 관련 물질을 장기간 지속적으로 방출할 수 있다. 또한, 히알루론산 기반 하이드로겔에 캡슐화된 골 형성 성장 인자 및 커큐민(curcumin)의 양을 조절하면 골 조직 재생 활성을 극대화할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 골 형성 관련 물질의 지속적인 방출을 위한 운반체 또는 골 조직 재생을 위한 생체 친화적 스캐폴드로 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C08J 3/24 (2013.01)

C08K 5/0025 (2013.01)

C08J 2207/10 (2013.01)

C08L 2203/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051383

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 치아와 치주질환 병리기전 규명 및 제어기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 조합에서 선택된 생체적합성 고분자를 가교제로 가교시켜 형성한 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 캡슐화된 골 형성 관련 물질을 포함하는 하이드로겔 조성물로서,

상기 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 히알루론산 염(hyaluronic acid salt)의 중량평균분자량(Mw)은 1,000,000 내지 2,000,000의 범위를 갖고,

상기 가교제는 30,000 내지 70,000의 중량평균분자량(Mw)을 갖는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 30,000 내지 70,000의 중량평균분자량(Mw)을 갖는 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 조합에서 선택되고,

상기 생체적합성 고분자 대 가교제의 몰비(molar ratio)는 1:3 내지 1:6이고,

상기 생체적합성 고분자 대 가교제의 중량비는 1:0.1 내지 1:0.2이고,

상기 골 형성 관련 물질은 골 형성 성장 인자 및 커큐민(curcumin)의 조합으로 구성되고,

상기 골 형성 성장 인자의 함량은 하이드로겔 100 mg 당 10~60 나노그램(ng) 이고,

상기 커큐민(curcumin)의 함량은 하이드로겔 100 mg 당 5~10 μ g 이고,

상기 골 형성 성장 인자 대 커큐민(curcumin)의 중량비는 1:100 내지 1:1000의 범위에서 선택되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히알루론산 기반 하이드로겔 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 골 형성 능력이 우수한 히알루론산 기반 하이드로겔 및 이를 포함하는 골 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심각한 골 손상의 주요 치료 방법으로는 손상된 골의 고정과 환자(자가 이식, autograft) 또는 기증자(동종 이식 및 이종 이식, allograft and xenograft)에게서 유래된 골의 직접 사용이 있다. 그러나, 골의 공급이 수요를 충족할 수 없고 이종 이식은 면역 거부 반응 및 동물 유래 바이러스에 의한 교차 감염을 일으킬 수 있기 때문에 이들 방법 중 일부는 제한적이다. 또한, 해로운 부작용이 없이 골 형성을 가속시킬 뿐만 아니라 골 파괴를 억제하는 약물의 사용에 대한 연구 결과는 없다. 1990년부터, 골 재생을 위한 조직공학적 접근은 위에서 언급한 한계를 극복할 수 있다는 점에서 관심의 대상이 되어왔다.

[0003] 골 조직 재생을 위한 생체 재료 지지체(Scaffold)는 골 결손 부위를 지지하고, 골 결손 부위 주위의 자가 조직으로부터 자가 골 재생을 유도할 수 있다. 금속, 세라믹, 폴리머 등이 생체 재료 지지체로 사용될 수 있지만, 금속과 세라믹의 사용은 이들의 낮은 생분해성과 관련된 불완전한 골조직 재생 때문에 제한적이다. 폴리머는 분해 효소와 화학 조성의 조절을 통해 쉽게 생분해성을 제어할 수 있기 때문에 금속과 세라믹의 대안이 될 수 있다. 을 대체할 수 있다.

[0004] 특히, 천연/합성 고분자 하이드로겔(hydrogel)은 약물, 세포 및 성장 인자들을 쉽게 캡슐화(encapsulation)할 수 있기 때문에 유용한 조직 재생 지지체로서 많은 관심을 받아왔다. 고분자 하이드로겔은 현재 연골, 피부, 혈관과 같은 연조직의 재생을 위한 생체 재료 지지체로 사용되고 있고, 경조직 재생을 위한 용도로도 사용량이 증가하고 있다.

[0005] 다양한 하이드로겔 중 천연 고분자 하이드로겔은 생체적합성, 생분해성, 상업적 입수 용이성 측면에서 유리하다. 예를 들어, 선형 다당류인 천연 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)으로부터 제작된 지지체는 창상 치

유와 세포 분화에 이용되고 있다[G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, and P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol. Lett. 29, 17 (2007).; P. Olczyk, Hyaluronan: structure, metabolism, functions, and role in wound healing. Postepy. Hig. Med. Dosw. 62, 651 (2008).; L. Zou, X. Zou, L. Chen, H. Li, T. Mygind, M. Kassem, and C. Bunger, Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro. J. Orthopaed. Res. 26, 713 (2008).]. 몇몇 최근의 연구는 골 조직 재생 지지체로서 히알루론산 하이드로겔의 사용을 검토하였으나, 조직 공학 응용을 위한 세포 부착 특성을 향상시키기 위해 젤라틴 나노 입자의 캡슐화와 같은 히알루론산 하이드로겔의 추가적인 변형이 필요하다[A. K. Jha, X. Xu, R. L. Duncan, and X. Jia, Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks. Biomaterials 32, 2466 (2011).].

[0006] 골 조직 재생용 히알루론산 기반 하이드로겔과 관련하여 대한민국 등록특허공보 제10-0824726호에는 아크릴화된 히알루론산 유도체 또는 이의 염을 기초로 하는 하이드로겔 또는 상기 하이드로겔을 포함하는 조성물로 코팅된 임플란트가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1240133호에는 히알루론산과 알지네이트를 수산화나트륨 수용액에 녹이는 용해단계; 상기 용해된 히알루론산-알지네이트 용액에 예폭시계 가교제를 첨가한 후 균질화하는 균질화단계; 상기 균질화된 히알루론산-알지네이트 용액을 하이드로겔(hydrogel)화 시키는 하이드로겔화단계; 상기 하이드로겔화된 히알루론산-알지네이트 하이드로겔을 염화칼슘 수용액으로 세척하는 세척단계; 상기 세척된 히알루론산-알지네이트 하이드로겔을 염화칼슘 수용액에서 팽창시켜 상호관입고분자망목 구조를 형성하고 팽창시켜 다공성을 획득하는 네트워크 형성 및 팽창단계; 상기 팽창된 히알루론산-알지네이트 하이드로겔에 남아있는 염화칼슘을 증류수로 제거하는 단계; 및 상기 히알루론산-알지네이트 하이드로겔을 동결건조시켜 다공성 히알루론산 지지체를 수득하는 동결건조단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 상호 관입 고분자 망목 구조의 세포전달용 지지체의 제조방법이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 추가적인 변형을 통해 골 형성 능력이 향상된 히알루론산 기반 하이드로겔 및 이의 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 발명자들은 히알루론산나트륨(HA)을 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)로 가교시켜 하이드로겔을 제조하고, 이의 골 형성 능력을 평가하였다. 또한, 본 발명의 발명자들은 폴리-L-라이신으로 가교결합된 히알루론산 기반 하이드로겔에 커큐민(CUR) 또는/및 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 첨가하여 캡슐화하고, 커큐민(CUR) 또는/및 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 방출 거동 및 골 조직 재생 능력을 평가하였다. 그 결과, 폴리-L-라이신으로 가교된 히알루론산 하이드로겔은 자체적으로 골 형성 능력을 가지고 있고, CUR와 BMP-2의 결합에 적합한 운반체이며, 커큐민(CUR) 또는/및 BMP-2(bone morphogenic protein-2)가 캡슐화된 형태로 존재하는 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)은 골 조직 재생을 위한 잠재적 생체 재료 지지체(Scaffold)로 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 히알루론산 기반 하이드로겔

[0011] 본 발명의 일 측면은 히알루론산 기반 하이드로겔을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택된 생체적합성 고분자를 가교제로 가교시켜 형성한 것이다.

[0012] 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 또는 히알루론산 테트라부틸암모늄에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있고, 하이드로겔 제조의 편의성을 고려할 때 히알루론산 나트륨인 것이 바람직하다. 또한, 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 히알루론산 염(hyaluronic acid salt)의 분자량(Mw)은 1,000,000 내지 5,000,000의 범위에서 선택될 수 있고, 가교제와의 반응성, 하이드로겔 제조의 용이성, 하이드로겔의 물성 등을 고려할 때 1,000,000 내지 3,000,000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하고, 1,000,000 내지 2,000,000의 범위에서 선택되는 것이 더 바람직하다.

직하다.

[0013] 상기 가교제는 폴리라이신(polylysine), 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택된다. 또한, 상기 가교제는 생체적합성 고분자와의 반응성, 하이드로겔의 물성, 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 20,000 내지 100,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 20,000 내지 100,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하고, 30,000 내지 70,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 30,000 내지 70,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 폴리라이신 염(polysine salt)은 폴리라이신 산 부가염(예를 들어 폴리라이신 하이드로할라이드)에서 선택될 수 있고, 하이드로겔의 제조 용이성을 고려할 때 폴리-L-라이신 하이드로브로마이드(poly-L-lysine hydrobromide) 또는 폴리-L-라이신 하이드로클로라이드(poly-L-lysine hydrobromide)에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것이 바람직하고, 폴리-L-라이신 하이드로브로마이드(poly-L-lysine hydrobromide)인 것이 더 바람직하다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔에서, 히알루론산에 존재하는 카르복실기는 폴리라이신에 존재하는 아민기와 축합반응하여 아마이드 결합을 형성하고, 이를 통해 히알루론산들이 폴리라이신에 의해 가교된다.

[0014] 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔에서 생체적합성 고분자 대 가교제의 몰비(molar ratio)는 하이드로겔의 원활한 형성, 약물 운반체나 골 조직 재생을 위한 스캐폴드로서 요구되는 하이드로겔의 다양한 물성 또는 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 1:2 내지 1:9인 것이 바람직하고, 1:2.5 내지 1:7.5인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔에서 생체적합성 고분자 대 가교제의 중량비는 하이드로겔의 원활한 형성, 약물 운반체나 골 조직 재생을 위한 스캐폴드로서 요구되는 하이드로겔의 다양한 물성 또는 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 1:0.06 내지 1:0.3인 것이 바람직하고, 1:0.08 내지 1:0.25인 것이 더 바람직하다.

[0016] 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법

[0017] 본 발명의 일 측면은 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법은 생체적합성 고분자 및 카르복실기 활성화제의 혼합 수용액에 가교제 수용액을 첨가하고 가교반응시켜 하이드로겔을 형성하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법은 가교반응 산물을 투석하여 불순물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법은 불순물이 제거된 가교반응 산물을 동결건조하여 최종 하이드로겔을 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법에서 생체적합성 고분자 및 가교제의 종류와 사용량은 히알루론산 기반 하이드로겔에서 전술한 내용과 동일하므로 설명을 생략한다.

[0018] 상기 카르복실기 활성화제는 1,3,5-트리아진(1,3,5-triazine) 고리를 함유하는 화합물로서, 히알루론산에 존재하는 카르복실기를 반응성 중간체인 에스테르기로 전환시키는 역할을 한다. 이러한 카르복실기 활성화제의 종류로는 시아누릭 클로라이드(Cyanuric chloride), 2-클로로-4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진(2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine), 2-클로로-4,6-다이페닐-1,3,5-트리아진(2-chloro-4,6-diphenyl-1,3,5-triazine), 2-클로로-4-메톡시-6-페닐-1,3,5-트리아진(2-chloro-4-methoxy-6-phenyl-1,3,5-triazine), 2-클로로-4-페닐-6-메톡시-1,3,5-트리아진(2-chloro-4-phenyl-6-methoxy-1,3,5-triazine), 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM] 등이 있고, 카르복실기 활성화 수준을 고려할 때 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM]인 것이 바람직하다.

[0020] 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물

[0021] 본 발명의 일 측면은 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물은 생체적합성 고분자를 가교제로 가교시켜 형성한 히알루론산 기반 하이드로겔 및 골 형성 관련 물질을 포함한다.

[0022] 상기 히알루론산 기반 하이드로겔을 구성하는 생체적합성 고분자는 히알루론산(hyaluronic acid), 히알루론산 염(hyaluronic acid salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택된다. 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 염은 히알루

론산 나트륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 또는 히알루론산 테트라부틸암모늄에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있고, 하이드로겔 제조의 편의성을 고려할 때 히알루론산 나트륨인 것이 바람직하다. 또한, 상기 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 히알루론산 염(hyaluronic acid salt)의 분자량(Mw)은 1,000,000 내지 5,000,000의 범위에서 선택될 수 있고, 가교제와의 반응성, 하이드로겔 제조의 용이성, 하이드로겔의 물성 등을 고려할 때 1,000,000 내지 3,000,000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하고, 1,000,000 내지 2,000,000의 범위에서 선택되는 것이 더 바람직하다.

[0023] 상기 히알루론산 기반 하이드로겔을 구성하는 가교제는 폴리라이신(polylysine), 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택된다. 또한, 상기 가교제는 생체적합성 고분자와의 반응성, 하이드로겔의 물성, 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 20,000 내지 100,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 20,000 내지 100,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하고, 30,000 내지 70,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 30,000 내지 70,000의 분자량(Mw)을 갖는 폴리라이신 염(polysine salt) 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 폴리라이신 염(polysine salt)은 폴리라이신 산 부가염(예를 들어 폴리라이신 하이드로할라이드)에서 선택될 수 있고, 하이드로겔의 제조 용이성을 고려할 때 폴리-L-라이신 하이드로브로마이드(poly-L-lysine hydrobromide) 또는 폴리-L-라이신 하이드로클로라이드(poly-L-lysine hydrobromide)에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것이 바람직하고, 폴리-L-라이신 하이드로브로마이드(poly-L-lysine hydrobromide)인 것이 더 바람직하다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔에서, 히알루론산에 존재하는 카르복실기는 폴리라이신에 존재하는 아민기와 축합반응하여 아마이드 결합을 형성하고, 이를 통해 히알루론산들이 폴리라이신에 의해 가교된다.

[0024] 또한, 상기 히알루론산 기반 하이드로겔에서 생체적합성 고분자 대 가교제의 몰비(molar ratio)는 하이드로겔의 원활한 형성, 약물 운반체나 골 조직 재생을 위한 스캐폴드로서 요구되는 하이드로겔의 다양한 물성 또는 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 1:2 내지 1:9인 것이 바람직하고, 1:2.5 내지 1:7.5인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 히알루론산 기반 하이드로겔에서 생체적합성 고분자 대 가교제의 중량비는 하이드로겔의 원활한 형성, 약물 운반체나 골 조직 재생을 위한 스캐폴드로서 요구되는 하이드로겔의 다양한 물성 또는 하이드로겔의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 1:0.06 내지 1: 0.3인 것이 바람직하고, 1:0.08 내지 1:0.25인 것이 더 바람직하다.

[0025] 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물을 구성하는 골 형성 관련 물질은 골 형성 성장 인자 또는 커큐민(curcumin)에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 이들의 혼합물에 해당하는 골 형성 성장 인자와 커큐민의 조합에서 선택된다. 또한, 상기 골 형성 관련 물질은 하이드로겔 내에 균일하게 분포되며, 바람직하게는 하이드로겔에 의해 캡슐화된다. 또한, 상기 골 형성 성장 인자는 골 형성을 촉진하는 것으로 알려진 단백질이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 BMP-1(bone morphogenic protein-1), BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, BMP-10, BMP-15, 혈소판유래증식인자(Platelet derived growth factor; PDGF), 형질전환성장인자베타(Transforming growth factor beta; TGF-beta), 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 인슐린유사성장인자-1(Insulin like growth factor 1; IGF-1) 및 락토페린(lactoferrin)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 골 형성 촉진 활성 및 커큐민과의 상승 효과 등을 고려할 때 BMP-2인 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서 상기 골 형성 성장 인자(예를 들어 BMP-2)의 함량은 하이드로겔 조성물의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 하이드로겔 100 mg 당 3~60 나노그램(ng) 인 것이 바람직하고 10~50 나노그램(ng) 인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물에서 상기 커큐민(curcumin)의 함량은 골 형성 성장 인자와의 상승 효과 내지 하이드로겔 조성물의 골 세포 증식 활성 등을 고려할 때 하이드로겔 100 mg 당 1~15 μ g인 것이 바람직하고, 5~10 μ g인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 하이드로겔 조성물이 골 형성 성장 인자와 커큐민을 모두 포함하는 경우, 골 형성 성장 인자 대 커큐민(curcumin)의 중량비는 골 형성 성장 인자와 커큐민의 상승 효과를 고려할 때 1:50 내지 1:3000의 범위에서 선택되는 것이 바람직하고 1:100 내지 1: 1000의 범위에서 선택되는 것이 더 바람직하다.

[0028] 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법

[0029] 본 발명의 일 측면은 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 생체적합성 고분자 및 카르복실기 활성화제의 혼합 수용액에 가

교제 수용액과 커큐민(curcumin) 용액을 첨가하고 가교반응시켜 커큐민 함유 하이드로겔 조성물을 형성하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 가교반응 산물을 증발시켜 휘발성 용매를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 휘발성 용매가 제거된 가교반응 산물을 동결건조하여 최종 하이드로겔 조성물을 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 생체적합성 고분자 및 카르복실기 활성화제의 혼합 수용액에 가교제 수용액을 첨가하고 가교반응시켜 하이드로겔을 형성하는 단계; 가교반응 산물을 투석하여 불순물을 제거하는 단계; 가교반응 산물을 동결건조하여 최종 하이드로겔을 수득하는 단계; 및 상기 최종 하이드로겔에 골 형성 성장 인자 용액을 균일하게 첨가하고 동결건조하여 골 형성 성장 인자 함유 하이드로겔 조성물을 형성하는 단계를 포함한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 예에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법은 생체적합성 고분자 및 카르복실기 활성화제의 혼합 수용액에 가교제 수용액과 커큐민(curcumin) 용액을 첨가하고 가교반응시켜 커큐민 함유 하이드로겔 조성물을 형성하는 단계; 가교반응 산물을 증발시켜 휘발성 용매를 제거하는 단계; 휘발성 용매가 제거된 가교반응 산물을 동결건조하는 단계; 및 상기 동결건조된 가교반응 산물에 골 형성 성장 인자 용액을 균일하게 첨가하고 동결건조하여 커큐민 및 골 형성 성장 인자 함유 하이드로겔 조성물을 형성하는 단계를 포함한다.

[0032] 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 생체적합성 고분자, 가교제, 골 형성 성장 인자의 종류와 생체적합성 고분자, 가교제, 골 형성 성장 인자 및 커큐민의 사용량은 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물에서 전술한 내용과 동일하므로 설명을 생략한다. 또한, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 카르복실기 활성화제도 히알루론산 기반 하이드로겔의 제조방법에서 전술한 내용과 동일하므로 설명을 생략한다. 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 커큐민 용액은 커큐민을 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올, 바람직하게는 메탄올에 용해시켜 제조한 것이다. 이때, 커큐민 용액의 커큐민 농도는 5~20 μM 인 것이 바람직하고 골 형성 성장 인자(예를 들어, BMP-2)와의 상승 효과를 고려할 때 8~18 μM 인 것이 더 바람직하다. 커큐민 용액의 사용량은 300~800 μl 수준이다. 또한, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물의 제조방법에서 골 형성 성장 인자 용액은 골 형성 성장 인자(예를 들어 BMP-2)를 인산완충식염수와 같은 중성 버퍼에 용해시켜 제조한 것이다. 이때, 골 형성 성장 인자(예를 들어 BMP-2) 용액의 골 형성 성장 인자(예를 들어 BMP-2) 농도는 10~200 ng/ml 인 것이 바람직하고 하이드로겔 조성물의 골 조직 재생 활성 등을 고려할 때 50~150 ng/ml 인 것이 더 바람직하다. 골 형성 성장 인자(예를 들어 BMP-2) 용액의 사용량은 50~150 μl 수준이다.

[0034] 골 조직 재생용 스캐폴드

[0035] 본 발명의 일 측면은 두개골 결손 등과 같이 골 손상 내지 골 손실이 발생하였을 때 골 결손 부위에 식립되어 골 결손 부위를 지지하고, 골 결손 부위 주위의 자가 조직으로부터 자가 골 재생을 유도할 수 있는 골 조직 재생용 스캐폴드(Scaffold)를 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 골 조직 재생용 스캐폴드(Scaffold)는 전술한 히알루론산 기반 하이드로겔 또는 전술한 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물을 포함하거나 이들 중 어느 하나로 구성될 수 있다. 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 그 자체로 골 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔 조성물에서 골 형성 성장 인자, 커큐민(curcumin)과 같은 골 형성 관련 물질은 히알루론산 기반 하이드로겔에 의해 캡슐화된 형태로 존재하기 때문에 장기간 지속적으로 방출되며, 골 조직 재생에 효과적이다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 골 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔로 골 형성 성장 인자, 커큐민(curcumin)과 같은 골 형성 관련 물질을 캡슐화하는 경우 골 형성 관련 물질을 장기간 지속적으로 방출할 수 있다. 또한, 히알루론산 기반 하이드로겔에 캡슐화된 골 형성 성장 인자 및 커큐민(curcumin)의 양을 조절하면 골 조직 재생 활성을 극대화할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 히알루론산 기반 하이드로겔은 골 형성 관련 물질의 지속적인 방출을 위한 운반체 또는 골 조직 재생을 위한 생체 친화적 스캐폴드로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037]

도 1은 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 합성 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔의 미세구조를 표면 위치 및 벌크(bulk) 위치에서 관찰한 사진이고,

도 3은 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 미세구조를 표면 위치 및 벌크(bulk) 위치에서 관찰한 사진이다.

도 4는 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 화학적 조성을 FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy)로 측정한 결과이다.

도 5는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 및 이의 대조군(control)으로 사용된 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)의 DSC(Differential scanning calorimeter) 곡선이다.

도 6은 2개의 액체인 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)와 DMEM 배지(2% HEPES, 10% FBS 및 1% PS를 포함) 하에서 실험한 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 평형팽창비율(ESR) 측정 결과를 나타낸다.

도 7은 최초 하이드로겔이 형성된 순간부터 28일까지 실험한 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 인 비트로(in vitro) 분해 거동을 나타낸 것이다.

도 8은 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 유변학적 변화에 대해 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)의 양이 미치는 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 상에 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 세포 증식 결과를 대조군(control)으로 사용된 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)에서의 결과와 비교한 것이다.

도 10은 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔로 CUR과 BMP-2를 캡슐화하는 과정을 나타낸 것이다.

도 11은 HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔로부터 커큐민(Curcumin, CUR)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동을 나타낸 것이고, 도 12는 HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔로부터 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동을 나타낸 것이다.

도 13은 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 1일, 3일 및 7일 동안 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 세포 증식 속도를 대조군으로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔을 사용하여 나타낸 것이다.

도 14는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 1일, 3일 및 7일 동안 각각 배양된 MG-63 세포의 ALP(Alkaline phosphatase) 활성 정도를 나타낸 것이다.

도 15는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 1일, 3일 및 7일 동안 각각 배양된 MG-63 세포의 칼슘 침착 정도를 나타낸 것이다.

도 16은 식립(implantation) 6주 후, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀

하이드로겔, $HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR_{15}/BMP-2_{100}$ 하이드로겔, $HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR_{10}/BMP-2_{100}$ 하이드로겔 및 $HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR_{20}/BMP-2_{100}$ 하이드로겔로 각각 채워진 토끼 두개골 원형 골 결손 부위(직경 8 mm)의 micro-CT 관상면(coronal images, middle slices)이고, 도 17은 골 광물질 밀도(bone mineral density, BMD)를 나타낸 것이고, 도 18은 골 부피/조직 부피(bone volume/tissue volume, BV/TV)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

1. 실험 재료

히알루론산나트륨(Sodium hyaluronate, HA; Mw : 1,500 kDa)은 Lifecore Biomedical, LLC(Chaska, MN, USA)에서 구입하였다. 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(Poly-L-lysine-hydrobromide, PLL · HBr; Mw : 30~70 kDa)와 커큐민(Curcumin, CUR)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 4-(4,6-다이메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM]은 Wako Pure Chemical Industries(Osaka, Japan)로부터 공급되었다. BMP-2(bone morphogenic protein-2)는 Korea Bone Bank(Seoul, Republic of Korea)에서 얻었다. 인간 골육종 세포주(Human osteosarcoma cell line) MG-63은 Korean Cell Bank에서 구입하였다. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지는 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 공급되었다. 세포 카운팅 키트-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)은 Dojindo(Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4)는 Welgene(Daegu, Republic of Korea)에서 구입하였다. 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)은 Lonza(USA)로부터 공급받았다. 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin, PS)와 HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]는 Invitrogen(Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입하였다.

2. 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 합성

히알루론산나트륨(HA) 0.02 μ mol(30 mg)과 DMT-MM 0.08 mmol(22 mg)을 증류수 2mL에 용해시킨 용액을 각각에 서로 다른 농도의 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr) 수용액 1mL를 천천히 첨가하고 하이드로겔이 형성될 때까지 계속 저어주었다. 하기 표 1은 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 합성시 사용한 히알루론산나트륨(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)의 6가지 몰비(molar ratio) 및 기타 정보를 나타낸 것이다. $HA_{0.02}/PLL_{0.06}$ 하이드로겔과 $HA_{0.02}/PLL_{0.12}$ 하이드로겔의 겔화 시간을 관찰하였다. $HA_{0.02}/PLL_{0.06}$ 하이드로겔 반응 산물과 $HA_{0.02}/PLL_{0.12}$ 하이드로겔 반응 산물을 증류수를 가지고 투석백(cut-off, 20 kDa)으로 3일 동안 투석하여 DMT-MM 및 염을 제거하였다. 정제된 $HA_{0.02}/PLL_{0.06}$ 하이드로겔과 $HA_{0.02}/PLL_{0.12}$ 하이드로겔을 -90℃에서 7일 동안 동결건조한 후 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

표 1

HA/PLL 하이드로겔 종류	HA 사용량 (μ mol/mg)	PLL · HBr 사용량 (μ mol/mg)	DMT-MM 사용량 (μ mol/mg)	물 사용량(mL)	겔화 시간(min)	하이드로겔 형성 여부
$HA_{0.02}/PLL_{0.06}$	0.02/30	0.06/3.1	80/22	3	48	○ ^a
$HA_{0.02}/PLL_{0.12}$	0.02/30	0.12/6.0	80/22	3	67	○ ^b
$HA_{0.02}/PLL_{0.21}$	0.02/30	0.21/10.5	80/22	3	-	×
$HA_{0.02}/PLL_{0.32}$	0.02/30	0.32/16.0	80/22	3	-	×
$HA_{0.02}/PLL_{0.63}$	0.02/30	0.63/31.5	80/22	3	-	×
$HA_{0.02}/PLL_{1.1}$	0.02/30	1.1/55	80/22	3	-	×

[0047]

* a : 하이드로겔이 형성됨

[0048]

* b : 하이드로겔이 형성되지 않음

[0050]

히알루론산나트륨(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)의 6가지 몰비(molar ratio)에 대해 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 형성 여부를 확인하는 실험을 하였다. 히알루론산나트륨(HA)의 고정된 양($0.02 \mu\text{mol}$, 30 mg)에 대해 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)의 첨가량이 $0.12 \mu\text{mol}$ (6.0 mg) 이하일 때 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)이 형성되었다. 반면, 히알루론산나트륨(HA)의 고정된 양($0.02 \mu\text{mol}$, 30 mg)에 대해 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)의 첨가량이 $0.21 \mu\text{mol}$ (10.5 mg) 이상인 경우 덩어리 형태의 하이드로겔이 형성되지 않고 조각으로 부서졌다. 도 1은 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 합성 과정을 개략적으로 나타낸 것이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔과 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔은 히알루론산나트륨(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr) 간의 축합반응을 통해 형성된 아마이드 결합(amide bond)에 의해 합성되었고, 이러한 사실은 FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy) 측정 결과에 의해 정성적으로 검사되었다.

[0052]

3. 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)의 물리적, 화학적, 열적 특성

[0053]

히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel) 합성과정 이후, $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔과 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔은 미세구조, 화학적 조성, 열적 특성, 평형팽창비율(Equilibrium swelling ratio, ESR) 및 인 비트로(in vitro) 상에서의 분해 거동을 분석하기 위해 -90°C 에서 7일 동안 동결건조 하였다.

[0054]

미세구조는 200 배율에서 Phenom tabletop microscope(pw-100-001, USA)를 이용하여 관찰되었다. 도 2는 동결건조된 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔의 미세구조를 표면 위치 및 벌크(bulk) 위치에서 관찰한 사진이고, 도 3은 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔의 미세구조를 표면 위치 및 벌크(bulk) 위치에서 관찰한 사진이다. 도 2 및 도 3에서 보이는 바와 같이 2가지 하이드로겔은 모두 층 구조(lamellar structure)의 거친 표면을 가지는 것으로 나타난 반면, 그들의 벌크 부피는 상호 연결된 다공성 구조를 보였다. 벌크 위치에서 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔의 평균 기공 직경은 약 $650 \mu\text{m}$ 이었고, $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔의 평균 기공 직경은 약 $560 \mu\text{m}$ 이었다. 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)의 더 높은 가교결합 밀도는 더 단단한 네트워크 구조를 형성하고, 그로 인해 더 작은 기공 직경이 형성되었다.

[0055]

화학적 조성은 FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy; JASCO FTR/IR 4000, Japan) 측정에 의해 검사되었다. FTIR 측정은 16 cm^{-1} 의 해상도에서 64회 스캔하여 수행되었고, 450 cm^{-1} 에서 4000 cm^{-1} 사이에서 관찰되었다. 도 4는 동결건조된 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔과 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔의 화학적 조성을 FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy)로 측정한 결과이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 2개의 하이드로겔은 모두 C-O-C stretching(894.9 cm^{-1} 및 1037.8 cm^{-1}), amide II NH(1618.7 cm^{-1}), amide I C=O(1683.1 cm^{-1}), CH stretching(약 3000 cm^{-1}), NH stretching 및 OH stretching (3371.4 cm^{-1})에 의해 특징지어진다. C-O-C와 OH를 제외한 다른 밴드들은 히알루론산(HA)과 폴리-L-라이신(PLL)에 존재하는 반면, 제외된 밴드들은 히알루론산(HA)에만 존재하는데, 이러한 사실은 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔과 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔이 히알루론산나트륨(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr)로 구성되어 있음을 나타낸다.

[0056]

열적 특성은 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 가열속도에서 DSC(Differential scanning calorimeter; TA Instruments, New Castle, DE, USA)을 사용하여 검사되었고, -10°C 부터 300°C 사이에서 관찰되었다. 도 5는 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔과 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔 및 이의 대조군(control)으로 사용된 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)의 DSC(Differential scanning calorimeter) 곡선이다. 본 연구 결과에서 $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.06}$ 하이드로겔, $\text{HA}_{0.02}/\text{PLL}_{0.12}$ 하이드로겔 및 대조군(control)의 유리전이온도는 각각 68.2°C , 75.0°C , 63.8°C 이었다. 히알루론산나트륨

(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)은 각각 약 60 ℃ 및 178 ℃의 유리전이온도를 갖는다. 이러한 사실에 기초하여, 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)의 양은 유리전이온도의 증가에 중요한 역할을 한다.

[0057] 평형팽창비율(ESR)의 측정을 위해, 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 무게를 측정한 후, 팽창이 평형상태에 도달할 때까지 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4)와 DMEM 배지(2% HEPES, 10% FBS 및 1% PS를 포함) 각각에 하이드로겔을 37℃에서 적어도 12시간 동안 담구었다. 평형팽창비율(ESR)은 아래의 수식을 이용하여 계산되었다.

[0058] $ESR = (W_s - W_d)/W_d$

[0059] 상기 수식에서, W_s는 하이드로겔의 팽창 평형 상태에서의 무게를 나타내고, W_d는 하이드로겔의 건조 상태에서의 무게를 나타낸다.

[0060] 도 6은 2개의 액체인 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)와 DMEM 배지(2% HEPES, 10% FBS 및 1% PS를 포함) 하에서 실험한 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 평형팽창비율(ESR) 측정 결과를 나타낸다. 도 6에서 보이는 바와 같이 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔은 적어도 12시간 동안 액침된 후에 2개의 액체 모두에서 팽창 평형 상태에 도달하였다. HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 팽창비율은 DMEM 배지 보다 인산완충식염수(PBS)에서 약간 더 높았는데, 이러한 차이는 통계학적으로 유의하지는 않았다. HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔이 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 보다 약간 더 높은 팽창비율을 보였는데, 이는 후자의 하이드로겔이 전자의 하이드로겔 보다 더 높은 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr) 가교결합 밀도를 유지하기 때문이다.

[0061] 인 비트로(in vitro) 분해 거동은 37℃에서 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4) 안에서의 배양시간 함수로서 하이드로겔의 초기 무게(W₀)에 대한 무게 감소를 계산하여 검사되었다. 미리 설정한 시간 간격(1일, 2일, 4일, 7일, 10일, 15일, 21일 및 28일)에서 하이드로겔이 PBS로부터 제거되었고, 무게(W_t)가 측정되었다. 무게 감소 비율은 아래의 수식을 이용하여 계산되었다.

[0062] $\text{무게 감소 비율}(\%) = \{(W_0 - W_t)/W_0\} \times 100$

[0063] 도 7은 최초 하이드로겔이 형성된 순간부터 28일까지 실험한 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 인 비트로(in vitro) 분해 거동을 나타낸 것이다. 도 7에서 보이는 바와 같이 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔은 더 낮은 가교결합 밀도 때문에 28일까지 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 보다 약간 더 높은 무게 감소를 보였고, 이러한 결과는 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)의 양이 인 비트로(in vitro) 분해 거동에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 28일 동안 배양한 후에, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 남아있는 무게를 백분율(%)로 표시하면, 각각 62.1±2.5% 및 72.4±3.5% 이었다.

[0064] 또한, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 형성 후, 이들의 유변학적 특성은 27 μm의 플레이트(plate)간 거리와 0.1 내지 100 rad/s의 주파수 하에 상온에서 AR 2000ex Rheometer(TA Instruments)를 이용하여 검사되었다. 도 8은 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 유변학적 변화에 대해 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)의 양이 미치는 결과를 나타낸 것이다. 도 8에서 보이는 바와 같이 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 탄성 저장률(Elastic storage modulus, G')은 모든 주파수 구간에서 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 보다 더 높았다. 게다가, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 탄성 저장률(Elastic storage modulus, G') 차이는 주파수가 증가함에 따라 점진적으로 증가하였다. 그러나, HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 점성 소실률(Viscous loss storage modulus, G'')은 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 보다 약 2배 정도 더 낮았다.

[0066] 4. 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)에서 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 증식

[0067] 골아(骨芽)성 MG-63 세포를 1×10^5 세포/웰 의 밀도로 24-웰 플레이트 안의 동결건조된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 상에 뿌리고 10% FBS와 1% PS 가 보충된 DMEM 배지를 첨가한 후에 1일, 3일 및 7일 동안 배양하였다. 미리 정한 시간 간격에서, CCK-8를 이용하여 세포 증식을 평가하였고, 대조군으로 사용한 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)의 값과 비교하였다. 흡광도는 450 nm 파장에서 마이크로플레이트 리더(microplate reader; BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 도 9는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 상에 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 세포 증식 결과를 대조군(control)으로 사용된 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)에서의 결과와 비교한 것이다. 도 9에서 보이는 바와 같이 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔은 7일 동안 배양 시 다른 하이드로겔에 비해 더 높은 인 비트로(in vitro) 세포 증식을 보였다. 3일 동안 배양한 후, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔과 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔에서의 세포 증식 속도는 대조군에서보다 현저히 높았다. 7일 동안 배양하였을 때, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔에서 배양된 MG-63 세포는 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔에서 배양된 세포보다 더 높은 인 비트로(in vitro) 세포 증식을 보였다.

[0069] 5. 다양한 양의 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 함유하는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔의 제조

[0070] HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 에서의 MG-63 세포 증식이 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 에서보다 높기 때문에 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 캡슐화하기 위한 하이드로겔로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔을 선택하였다. 도 10은 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔로 CUR과 BMP-2를 캡슐화하는 과정을 나타낸 것이다. 증류수 2ml에 히알루론산나트륨(HA) 0.02 μ mol(30 mg)과 DMT-MM 0.08 mmol(22 mg)을 용해시킨 용액들 각각에 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL · HBr) 수용액 1ml[PLL · HBr 로 환산할 때, 0.06 μ mol(3.1 mg)에 해당함]와 메탄올 500 μ l에 3가지 물 농도(10 μ M, 15 μ M 및 20 μ M)로 녹인 CUR 용액을 첨가하고 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀ 하이드로겔이 형성될 때까지 계속 저어주었다. 형성된 하이드로겔을 상온에서 유지시켜 메탄올을 증발시켰다. 하이드로겔을 -90℃에서 7일 동안 동결건조한 후, 인산완충염수(Phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4) 100 μ l에 3가지 농도(10 ng/ml, 50 ng/ml 및 100 ng/ml)로 녹인 BMP-2 용액을 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀ 하이드로겔 속으로 조심스럽게 넣었다. 이후, 이들을 3일 동안 동결건조하여 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 최종적으로 제조한 후, 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다. 또한, 추가적인 대조군으로 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 위에서 언급한 프로토콜에 따라 준비하였다. 하기 표 2는 다양한 양의 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 함유시켜 제조한 7가지의 HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔 정보를 나타낸 것이다.

표 2

HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔 종류	Curcumin 사용 농도 (μ M)	BMP-2 사용 농도 (ng/ml)
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₁₅	15	-
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /BMP-2 ₁₀₀	-	100
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₁₅ /BMP-2 ₁₀	15	10
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₁₅ /BMP-2 ₅₀	15	50
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₁₅ /BMP-2 ₁₀₀	15	100

HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₁₀ /BMP-2 ₁₀₀	10	100
HA _{0.02} /PLL _{0.06} /CUR ₂₀ /BMP-2 ₁₀₀	20	100

[0073] 6. HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔로부터 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동

[0074] HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔로부터 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동을 시험하기 위해, 표본들을 3 ml의 인산완충식염수(PBS)가 채워져 있는 15-ml 원뿔형 튜브(Conical tube; Falcon, USA)에 담구고, 37℃의 배양기 안에서 100 rpm의 속도로 계속 해서 진탕시켰다. 이후, 미리 설정한 시간 간격(1hr, 2hr, 6hr, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일)에서, 각각의 상층액 2 ml를 수집한 후 새로운 인산완충식염수(PBS) 2 ml로 대체하였다. 방출된 커큐민(Curcumin, CUR)의 흡광도는 자외선-가시광선(Ultraviolet-Visible, UV-Vis) 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 최대 파장 491.2 nm($\lambda_{\max}$ = 491.2 nm)에서 측정하였다. 방출된 BMP-2(bone morphogenic protein-2)는 495 nm 파장에서 마이크로플레이트 리더(microplate reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 도 11은 HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔로부터 커큐민(Curcumin, CUR)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동을 나타낸 것이고, 도 12는 HA/PLL/CUR/BMP-2 하이드로겔로부터 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 인 비트로(In Vitro) 방출 거동을 나타낸 것이다. 도 11 및 도 12에서 보이는 바와 같이 하이드로겔에 함유된 CUR과 BMP-2의 양이 감소하면 CUR과 BMP-2의 방출 거동은 증가하였고, 이로부터 하이드로겔에 함유된 CUR과 BMP-2의 양이 방출 거동에 큰 영향을 주는 것을 알수 있다. CUR과 BMP-2의 초기 버스트(initial bursts)는 6시간 이내에 발생 하였고, CUR과 BMP-2의 양이 증가할수록 방출 백분율도 증가하였다. CUR과 BMP-2의 방출은 각각 7일과 28일 동안 지속되었다.

[0076] 7. 다양한 양의 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 함유하는 하이드로겔에서 배양 된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 증식

[0077] HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 증식 속도를 앞의 "4. 히알루론산/폴리-L-라이신 하이드로겔(HA/PLL Hydrogel)에서 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 증식"에서 기술한 프로토콜에 의해 평가하였다. 도 13은 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 1일, 3일 및 7일 동안 배양된 MG-63 세포의 인 비트로(in vitro) 세포 증식 속도를 대조군으로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔을 사용하여 나타낸 것이다. 도 13에서 X축의 "a", "b", "c", "d", "e", "f" 및 "g"는 각각 순서대로 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 나타낸다. 도 13에서 보이는 바와 같이 세포 증식은 모든 하이드로겔에서 배양 7일 동안 점진적으로 증가하였다. 배양 3일 및 7일에는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔에서 MG-63 세포가 가장 효과적으로 증식하였다. HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 제외한 모든 하이드로겔에서 배양 3일 후에 80%보다 큰 세포 증식을 보였다.

[0079] 8. 다양한 양의 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 함유하는 하이드로젤의 ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착(Calcium deposition)

[0080] MG-63 세포를 1×10^5 세포/웰 의 밀도로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 각각에서 7일, 14일 및 21일 동안 배양한 후, PBS로 3회 세척하고, Vibra Cell™(Sonics & Materials, Inc., Danbury, CT, USA)을 이용하여 lysis buffer solution(0.1% Triton X-100, Sigma) 3 ml와 함께 초음파 처리하였다. 이후, 상층액을 수거하고, 6 μ l의 상층액을 1 M Tris-HCl(Sigma, pH 9.0) 100 μ l, 5 mM MgCl₂ 20 μ l, 5 mM para-nitrophenyl phosphate(PNPP) 20 μ l를 포함하는 0.02% lysis buffer 54 μ l와 혼합하여 효소 반응을 수행하였다. 혼합물을 37°C에서 30분 동안 배양한 후 1 N NaOH 수용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. ALP(Alkaline phosphatase) 존재하에서의 p-nitrophenol 생성 수준을 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 405 nm에서 용액의 흡광도를 관찰하여 측정하였다. 측정 결과는 "unit/minutes/mg protein"으로 표현되었다.

[0081] MG-63 세포를 1×10^5 세포/웰 의 밀도로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 각각에서 7일, 14일 및 21일 동안 배양한 후 새로운 PBS(pH 7.4)로 행구고 -20°C에서 1시간 동안 70% ethanol로 고정하였다. 이후, 고정된 하이드로젤을 2% Alizarin red S staining solution(10% ammonium hydroxide에 의해 pH가 4.2로 조정됨)로 20분 동안 염색하고, 새로운 PBS(pH 7.4)로 세척함adjusted to pH 4.2 with 10% ammonium hydroxide)으로 염색되었고, 새로운 PBS로 행구었다. 행구어진 표본들을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여낸 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 칼슘 침착을 결정하였다.

[0082] 도 14는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤에서 1일, 3일 및 7일 동안 각각 배양된 MG-63 세포의 ALP(Alkaline phosphatase) 활성 정도를 나타낸 것이다. 도 15는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤에서 1일, 3일 및 7일 동안 각각 배양된 MG-63 세포의 칼슘 침착 정도를 나타낸 것이다. 도 14 및 도 15에서 X축의 "a", "b", "c", "d", "e", "f" "g" 및 "h"는 각각 순서대로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤을 나타낸다. 도 14에서 보이는 바와 같이 배양 14일 동안 각각의 ALP(Alkaline phosphatase) 활성은 증가하였고, 그 후로 감소하였다. 도 15에서 보이는 바와 같이 배양 21일 동안 칼슘 침착은 점진적으로 증가하였다. 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 양은 ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착에 큰 영향을 주었다. 특히, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤은 14일 및 21일 배양시 다른 하이드로젤보다 약간 높은 ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착을 보였다.

[0084] 9. 다양한 양의 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 함유하는 하이드로젤의 마이크로-CT(Micro-CT) 분석

[0085] HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로젤, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로젤,

HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 각각을 2마리 수컷 New Zealand 토끼(약 2.5 kg)의 두개골에 있는 8개의 원형 골 결손 부위(직경 8 mm)에 적용하였다. 하나의 원형 골 결손은 대조군으로서 비어있는 채로 남겨두었다. 토끼에 100g당 0.04 ml 용량의 Zoletil(Virbac Laboratories, Carros, France)을 근육주사 하여 토끼를 마취시켰다. 피부 및 토끼 두개골 주위의 골막을 절개한 후, 너척수막을 손상시키지 않고 trephine bar를 이용하여 원형 골 결손 부위를 만들었다. 하이드로겔들을 각각 원형의 골 결손 부위에 적용하고, 골막과 피부를 4-0 catgut과 4-0 silk를 이용하여 봉합하였다. 수술 이후, 감염을 피하기 위해 토끼에게 5일간 gentamicin(Dogshin Pharmacy Co., Korea) 1 ml를 주사하였다. 6주 후에, 토끼를 희생시키고 두개골을 수거한 후, 각각의 원형 골 결손 부위의 골 치유 정도를 micro-CT(SkyScan 1076, Kontich, Belgium) 분석으로 평가하였다. micro-CT 이미지는 100 kV 전압과 100 μ A 전류의 X-ray로 스캔되었다. 이미지는 360°에 걸쳐 0.6° 단위로 획득하였다. 각 프레임은 460 밀리초 동안 노출되었다. 스캔된 이미지는 SkyScan™ CT-analyzer software를 이용하여 분석하였다. 공기(-1000 HU) 및 물(0 HU)은 Hounsfield unit으로 획득된 영상의 값을 보정하는데에 이용되었다. 도 16은 식립(implantation) 6주 후, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔로 각각 채워진 토끼 두개골 원형 골 결손 부위(직경 8 mm)의 micro-CT 관상면(coronal images, middle slices)이고, 도 17은 골 광물질 밀도(bone mineral density, BMD)를 나타낸 것이고, 도 18은 골 부피/조직 부피(bone volume/tissue volume, BV/TV)를 나타낸 것이다. 도 16 내지 도 18에서 "a", "b", "c", "d", "e", "f" "g" 및 "h"는 각각 순서대로 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 나타낸다. 관상면(coronal images)은 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔이 다른 하이드로겔 또는 대조군("Blank"로 표시됨)보다 새로운 골 재생을 더 잘 유도함을 나타낸다. 새로운 골 재생 정도를 정량적으로 검사하기 위해, 우리는 BMD와 BV/TV를 계산하였다. BMD와 BV/TV 결과는 ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착 결과에 부합하였다. 커큐민(Curcumin, CUR)과 BMP-2(bone morphogenic protein-2)의 양은 BMD와 BV/TV 값에 큰 영향을 주었다. 우리는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔이 다른 하이드로겔보다 새로운 골 재생에 더욱 효과적임을 확인하였다.

10. 토의(Discussion)

자연/합성 하이드로겔 시스템은 새로운 골 재생을 조절하기 위한 지지체(Scaffold)로 사용되어 왔고, 골 재생과 관련된 다양한 약물과 성장 인자를 담을 수 있다. 본 연구에서, 우리는 CUR과 BMP-2를 포함하는 지지체(Scaffold)로 HA/PLL 하이드로겔을 설계하고 제조하였다. CUR과 BMP-2 모두 골 형성과 강한 연관성을 가진다[Q. Gu, Y. Cai, C. Huang, Q. Shi, and H. Yang, Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. Pharmacogn. Mag. 8, 202 (2012).; S. E. Kim, S. H. Song, Y. P. Yun, B. J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H. J. Moon, and Y. D. Kwon, The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. Biomaterials 32, 366 (2011).]. 더불어, 우리는 가교결합제로 사용되는 PLL·HBr의 양이 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 내지 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 겔화 시간, 평형팽창비율(ESR), 분해 거동 및 유변학적 특성을 조절하는데에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다(표 1, 도 6 내지 도 8 참조). 가교제 중에서, 더 길거나 더 짧은 폴리머 사슬을 가진 가교제는 각각 더 길거나 더 짧은 완화 시간을 초래하였다. 또한, 느슨하게 가교된 하이드로겔 내의 폴리머 사슬은 촘촘하게 가교된 하이드로겔의 폴리머 사슬보다 더 높은 분자운동 주기를 유도한다[M. J. Moura, M. M. Figueiredo, and M. H. Gil, Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. Biomacromolecules 8, 3823 (2007).]. HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔 내의 히알루론산나트륨(HA)이 자유롭게 움직이기 위해서는 더 높은 진동수를 필요로 하고, 이는 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔의 탄성저장률(G')의 점진적인 증가를 유도하며, 그로 인해 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔이 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔보다 더

높은 탄성과 더 낮은 점성을 가진다는 것을 우리의 연구 결과로부터 알 수 있다(도 8 참조).

- [0089] 폴리라이신(Polylysine)은 비수용체 매개 세포 결합 매커니즘(non-receptor-mediated cell-binding mechanism)에 의한 세포 부착에 현저하고 긍정적인 영향을 갖는다. 비수용체 매개 세포 결합 매커니즘(non-receptor-mediated cell-binding mechanism)에서 폴리라이신의 양전하는 정전기적 상호작용을 통해 음전하를 가진 세포막에 부착한다[E. Yavin, and Z. Yavin, Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. J. Cell Biol. 62, 540 (1974).]. 또한, 폴리라이신은 매개 단백질의 흡착을 가속화함으로써 간접적으로 세포부착을 강화시킬 수 있다[D. Heggins, and G. Banker. Culturing nerve cells in primary dissociated cell cultures, Edited Banker G., and Goslin K., Cambridge: MIT press (1998), pp. 37-78.]. 수용체 매개 세포 부착이 없을 때, 더 낮은 가교 밀도를 갖는 하이드로겔은 더 낮은 탄성 계수와 더 많은 양의 결합수를 보이며, 이로 인해 강한 세포 부착, 성장 및 증식을 유도한다. 높은 결합수는 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM) 단백질의 흡착을 돕고, 세포 침윤, 성장 및 증식을 유도한다[A. Guiseppi-Elie, C. Dong, and C. Z. Dinu, Crosslink density of a biomimetic poly(HEMA)-based hydrogel influences growth and proliferation of attachment dependent RMS 13 cells. J. Mater. Chem. 22, 19529 (2012).]. HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔은 PLL의 더 낮은 가교 밀도 때문에 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔보다 더 높은 결합수를 가지고, MG-63 세포의 부착 및 증식을 유도한다(도 9 참조).
- [0090] MG-63 세포의 증식은 세포 분화와 밀접하게 연관되어 있기 때문에[M. S. Bae, J. E. Kim, J. B. Lee, D. N. Heo, D. H. Yang, J. H. Kim, K. R. Kwon, J. B. Bang, H. Bae, and I. K. Kwon, ZrO₂ surface chemically coated with hyaluronic acid hydrogel loading GDF-5 for osteogenesis in dentistry. Carbohydr. Polym. 92, 167 (2013).], 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo) 실험뿐만 아니라 CUR과 BMP-2의 방출 실험을 위해 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔이 선택되었다.
- [0091] BMP-2의 분자량(26,000 g/mol)의 분자량은 커큐민(curcumin)의 분자량(368.38 g/mol)보다 약 71배 더 크고, 이는 BMP-2의 장기간 지속 방출을 용이하게 한다. 우리는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔이 CUR과 BMP-2의 지속적인 방출을 위한 효과적인 운반체로 쓰일 수 있다는 사실을 확인하였다(도 11 및 도 12 참조).
- [0092] HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔에 100 ng/ml 농도의 BMP-2를 결합시킨 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔은 MG-63 세포의 증식을 향상시키는 반면, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔에 15 μM 초과 농도의 CUR을 결합시킨 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔은 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔과 비교하였을 때 배양 7일 동안 MG-63 세포의 증식을 저해하였다. 20 μM 이상 농도의 CUR을 사용하는 경우 인간 골아(骨芽)성 MG-63 세포 활성도가 세포사멸을 유도하는 CUR에 의해 80% 아래로 감소하였고[J. M. Moran, R. Roncero-Martin, F. J. Rodriguez-Velasco, J. F. Calderon-Garcia, P. Rey-Sanchez, V. Vera, M. L. Canal-Macias, and J. D. Pedrera-Zamorano, Effect of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: implications of nitric oxide. Int. J. Mol. Sci. 13, 16104 (2012).], BMP-2는 그 양이 증가함에 따라 세포 활성도를 증가시켰다[S. E. Kim, S. H. Song, Y. P. Yun, B. J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H. J. Moon, and Y. D. Kwon, The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. Biomaterials 32, 366 (2011).]. 우리는 세포 증식이 CUR과 BMP-2의 양에 의존한다는 것을 확인하였다(도 13 참조). 본 연구에서 15 μM 초과 농도의 CUR을 결합시키는 것이 MG-63 세포의 증식에 부정적인 영향을 주지만, BMP-2의 첨가 후에 증식은 증가하였다. 우리는 80% 초과인 세포 증식을 보이는 하이드로겔이 MG-63 세포로부터 새로운 골 재생을 가속화하기 위한 잠재적 지지체(Scaffold)로 사용될 수 있음을 제안한다.
- [0093] 골아 세포의 분화는 증식, 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)의 성숙 및 광물화와 같은 3단계로 진행된다. 이 과정동안 골아 세포는 분화와 관련된 여러 가지 유전자를 발현시킨다. ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착(Calcium deposition)은 각각 골아 세포의 초기 및 후기 마커이다[S. F. Lamolle, M. Monjo, M. Rubert, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, and J. E. Ellingsen, The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. Biomaterials 30, 736 (2009).]. BMP-2는 MG-63 세포의 증식 및 분화에 관련이 있는 반면, CUR은 세포의 증식이나 분화를 가속화하거나 억제한다[G. S. Stein, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, and M. Montecino, Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. Physiol. Rev. 76, 593 (1996).]. ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착(Calcium deposition)은 CUR과 BMP-2의 양에 의해 결정

되는데(도 14 및 도 15 참조), 이러한 결과는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔이 새로운 골 재생을 가속화하기 위한 잠재적 지지체(Scaffold)로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0094] 마이크로-CT(Micro-CT) 분석은 골 미세구조를 관찰하고, 골 광물질 밀도(bone mineral density, BMD)를 계산하는데에 사용될 수 있다. BMP-2와 비교할 때, 골 재생에 대한 CUR의 효과에 관한 연구는 거의 없다. CUR이 투여된 쥐의 경우, 대퇴골과 근위 경골의 골 광물질 밀도(BMD)가 강화된다고 보고된바 있다[M. W. Yang, T. H. Wang, P. P. Yang, L. W. Chu, J. Yu, Z. D. Gao, Y. Z. Li, and B. L. Guo, Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice. *Phytomedicine* 18, 205 (2011).; W. K. Kim, K. Ke, O. J. Sul, H. J. Kim, S. H. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, S. Y. Kim, H. T. Chung, and H. S. Choi, Curcumin protects against ovariectomy-induced bone loss and decreases osteoclastogenesis. *J. Cell Biochem.* 112, 3159 (2011).]. 우리는 토끼의 원형 두개골 결합 부위(직경 8mm)의 BMD 향상에 대한 CUR와 BMP-2의 상승 효과를 조사하였다. BMD는 CUR과 BMP-2의 양에 영향을 받았다. HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔로 처리된 토끼는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔로 처리된 토끼보다 더 높은 BMD를 보였고, 이러한 결과는 BMD가 CUR과 BMP-2의 양 조절에 의해 강화되었음을 의미한다.

[0095] 본 연구에서는 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔에 CUR와 BMP-2의 적당한 양을 결합시켰을 때의 새로운 골 재생에 대한 상승 효과를 검사하였다. 이러한 결과에 기초하였을 때, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔은 CUR와 BMP-2의 결합에 적합한 운반체이고, 15 μM 농도의 CUR과 50 내지 100 ng/ml 농도의 BMP-2가 결합된 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔 또는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔이 최적의 골 형성 효과를 보였다.

[0097] 11. 결론(Conclusion)

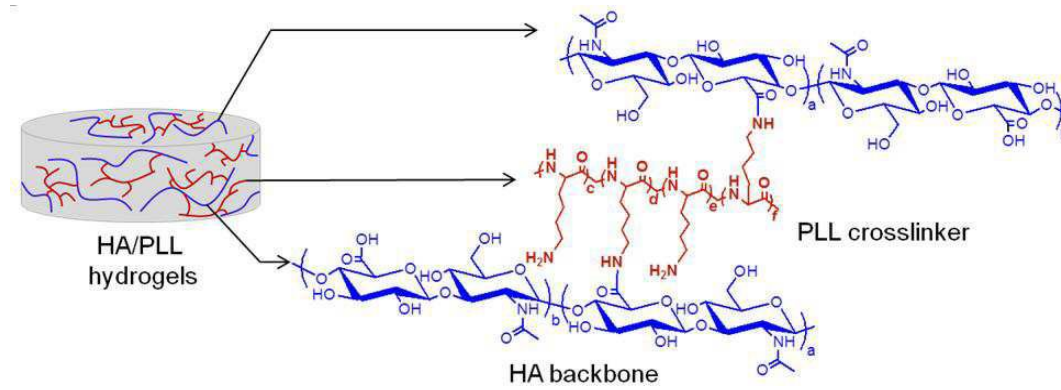
[0098] 우리는 골 재생 지지체(Scaffold)로 사용하기 위해 히알루론산나트륨(HA)과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr) 간의 축합반응 및 아미이드 결합에 의해 형성된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔을 설계하고 제조하였고, 상기 하이드로겔에 CUR 및 BMP-2를 첨가하였다. 상기 하이드로겔의 물리적, 화학적, 열적 특성을 겔화 시간, FTIR, DSC, ESR, 분해 거동 및 유변학적 성질에 기초하여 조사하였고, 그 결과 폴리-L-라이신-하이드로브로마이드(PLL·HBr)의 양이 이러한 성질들에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 인 비트로(in vitro) 세포 증식 실험을 통해, HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔에 배양된 MG-63 세포가 대조군으로 사용된 광경화 2-아미노에틸 메타크릴레이트-히알루론산 하이드로겔(Photo-cured 2-aminoethyl methacrylate-hyaluronic acid hydrogel, AEMA-HA Hydrogel)에 배양된 MG-63 세포보다 더 우수한 증식을 보였다. 또한, 세포 증식은 HA_{0.02}/PLL_{0.12} 하이드로겔을 사용하는 경우보다 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔을 사용할 때 더 우수하였다. HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₅₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔 및 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔로부터 CUR 및 BMP-2의 인 비트로(in vitro) 방출 실험 결과, CUR 및 BMP-2는 각각 7일 및 20일 동안 지속적인 방출 거동을 보였다. 비로 20 μM 이상 농도의 CUR이 사용된 HA_{0.02}/PLL_{0.06} 하이드로겔은 세포 증식에 해로울지라도, 우리는 BMP-2의 양이 증가함에 따라 세포 증식도 점진적으로 증가함을 확인하였다. 배양 3일 후에, HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₂₀/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔을 제외한 모든 하이드로겔에서 80% 초과인 세포 증식율을 보였다. 인 비트로(in vitro) ALP(Alkaline phosphatase) 활성과 칼슘 침착(Calcium deposition), 그리고 인 비보(in vivo) 마이크로-CT(Micro-CT) 실험으로부터 CUR 및 BMP-2의 양에 따라 시너지 효과가 일어남을 알 수 있었고, 이러한 결과는 HA_{0.02}/PLL_{0.06}/CUR₁₅/BMP-2₁₀₀ 하이드로겔이 골 조직 재생을 위한 잠재적 생체 재료 지지체(Scaffold)로 사용될 수 있는 가능성이 가장 높음을 시사한다.

[0100] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니

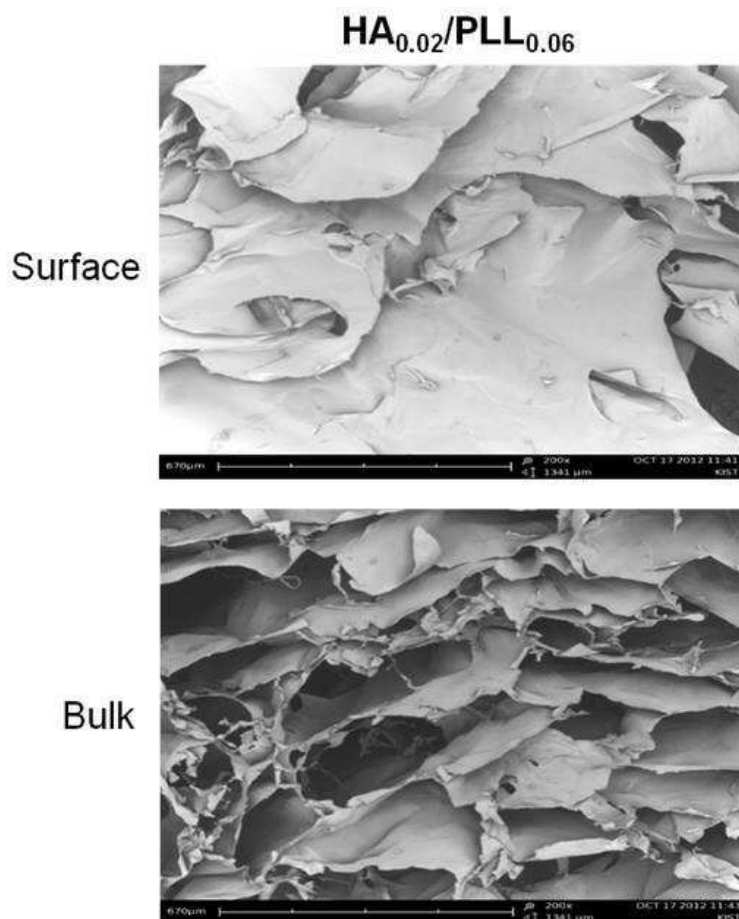
며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

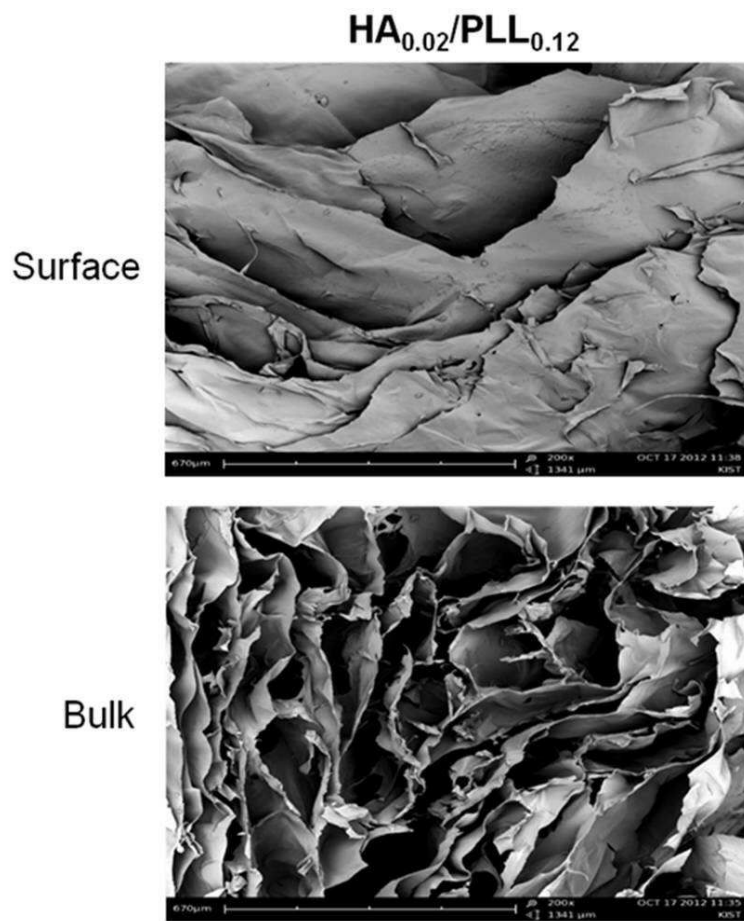
도면1



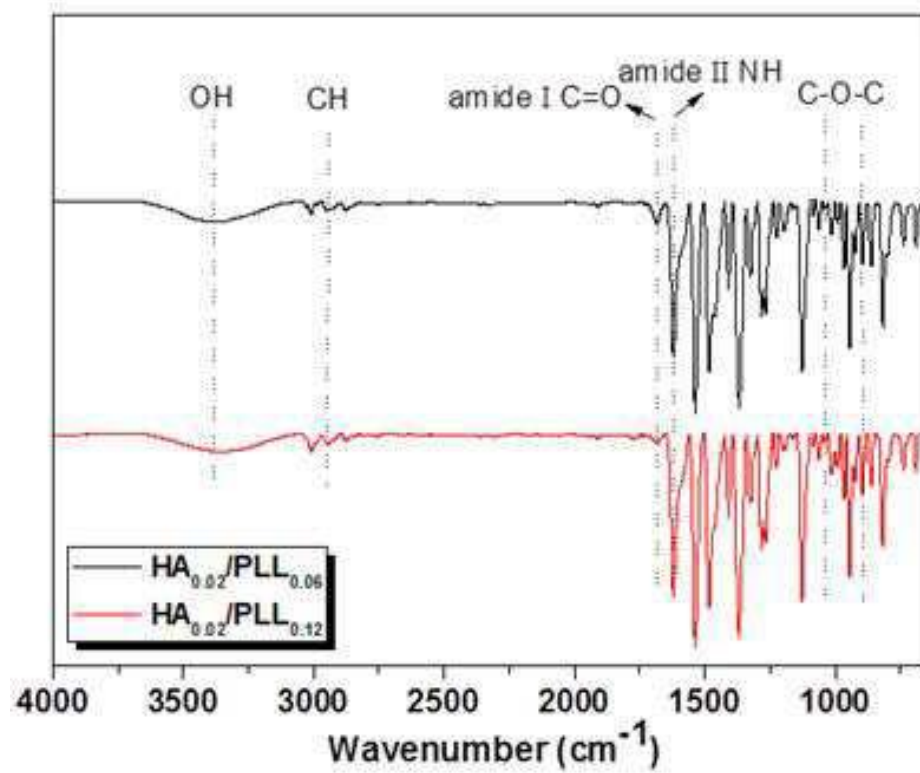
도면2



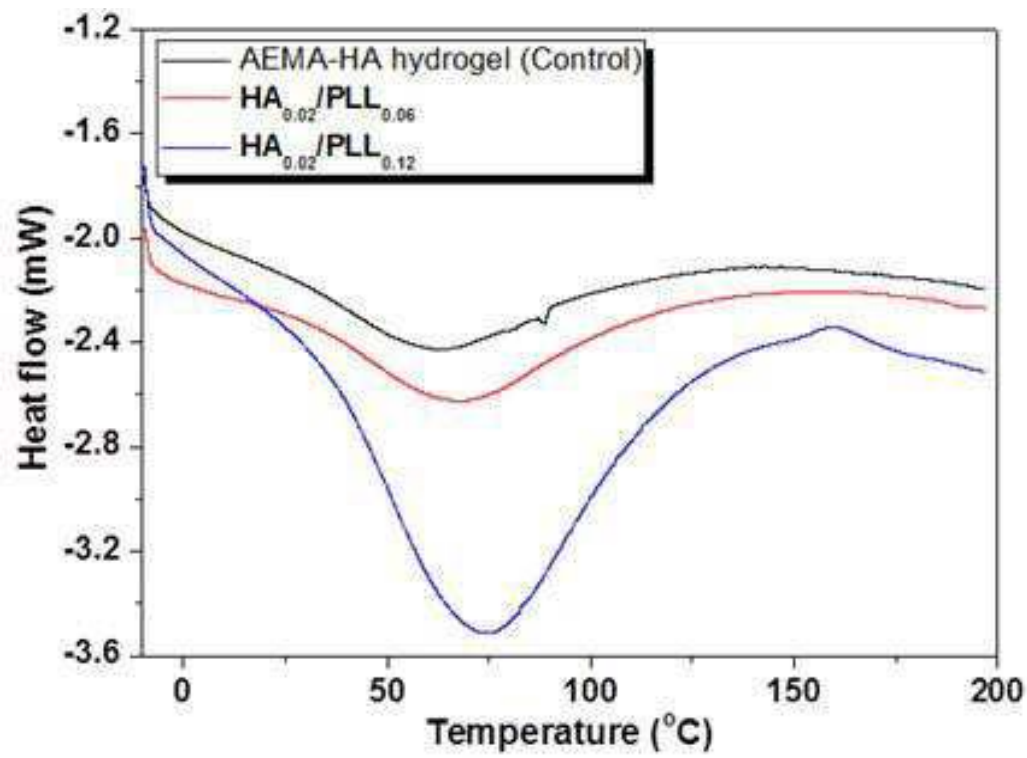
도면3



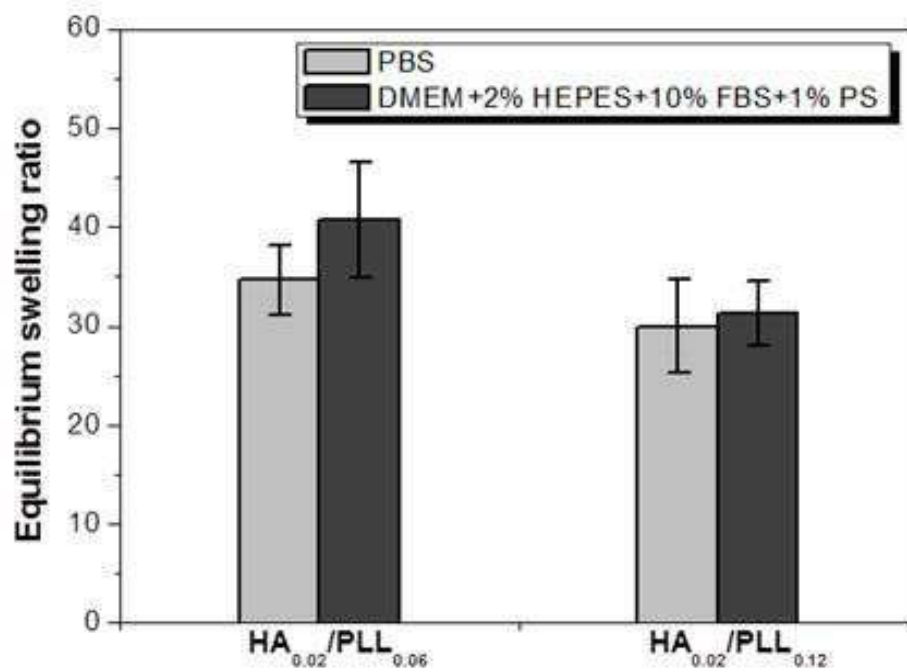
도면4



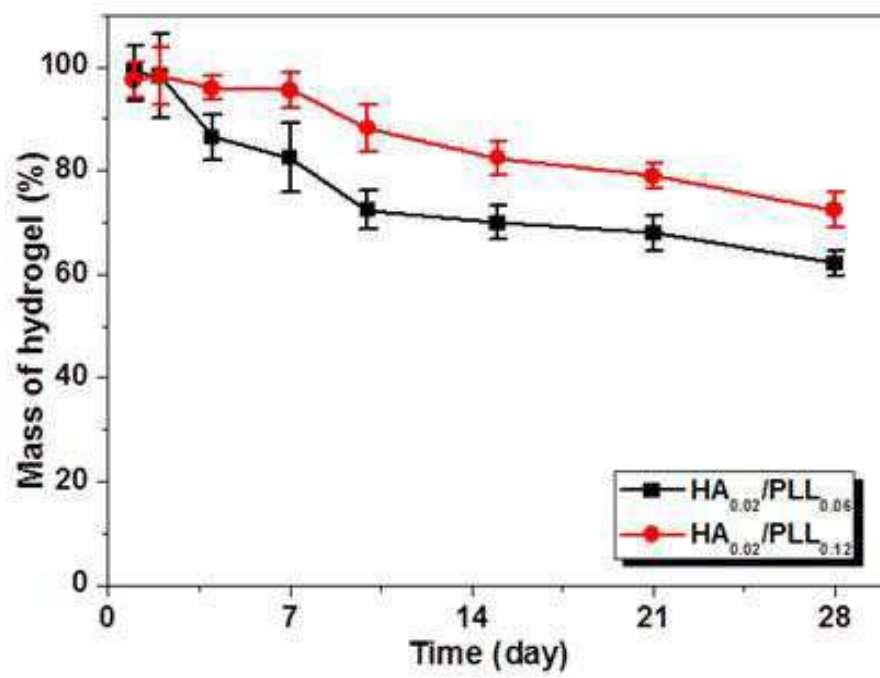
도면5



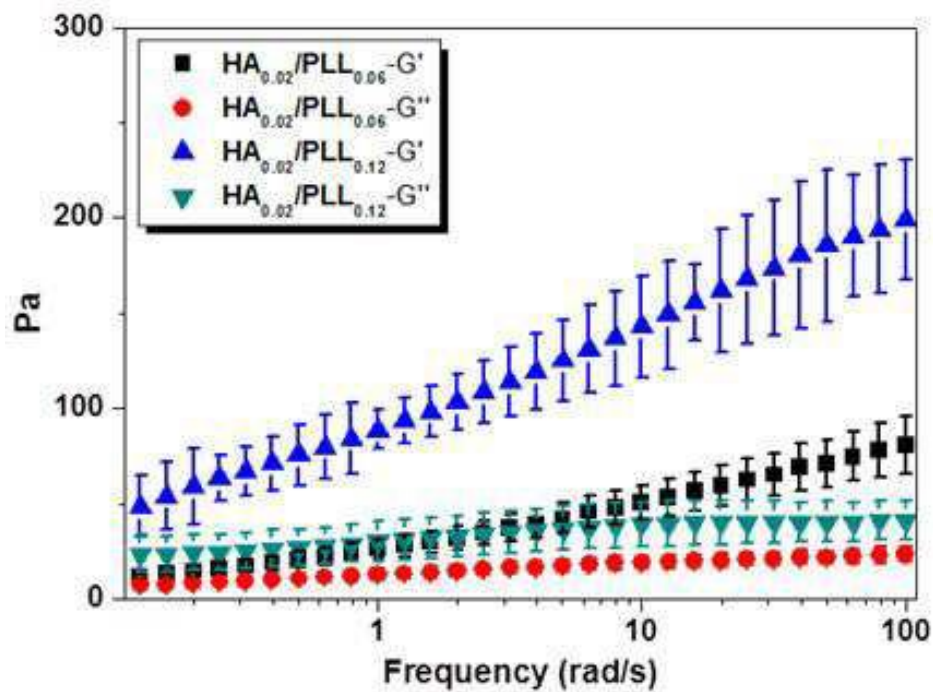
도면6



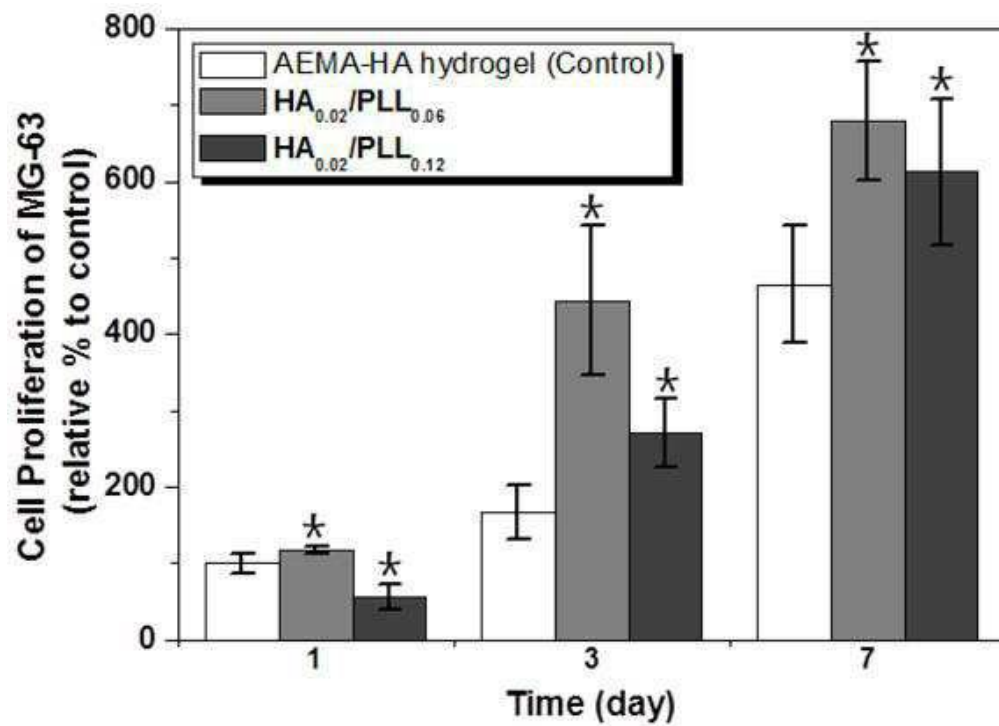
도면7



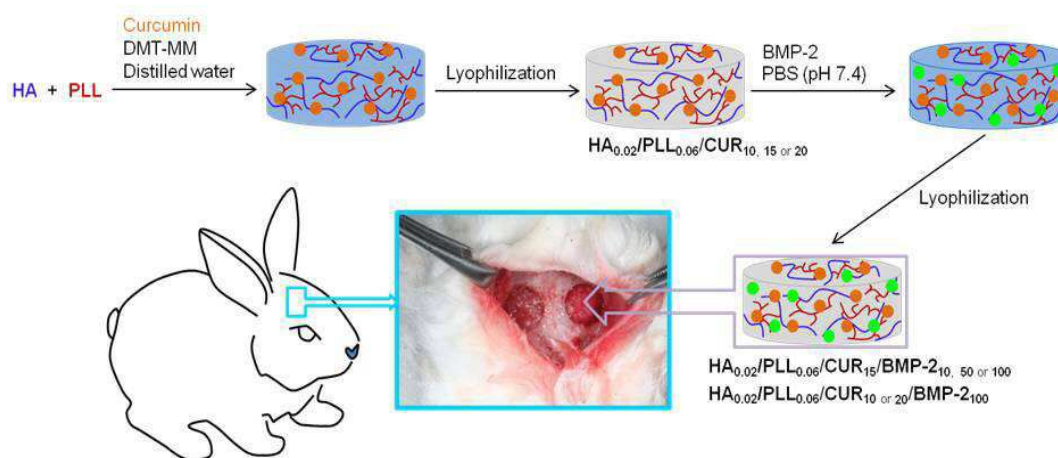
도면8



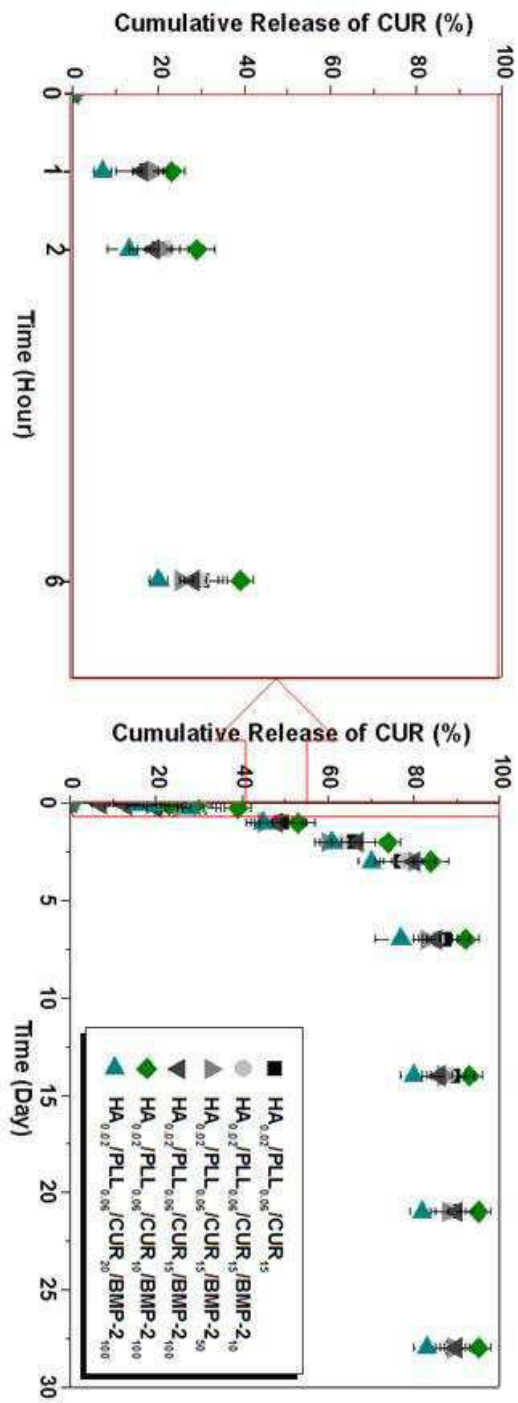
도면9



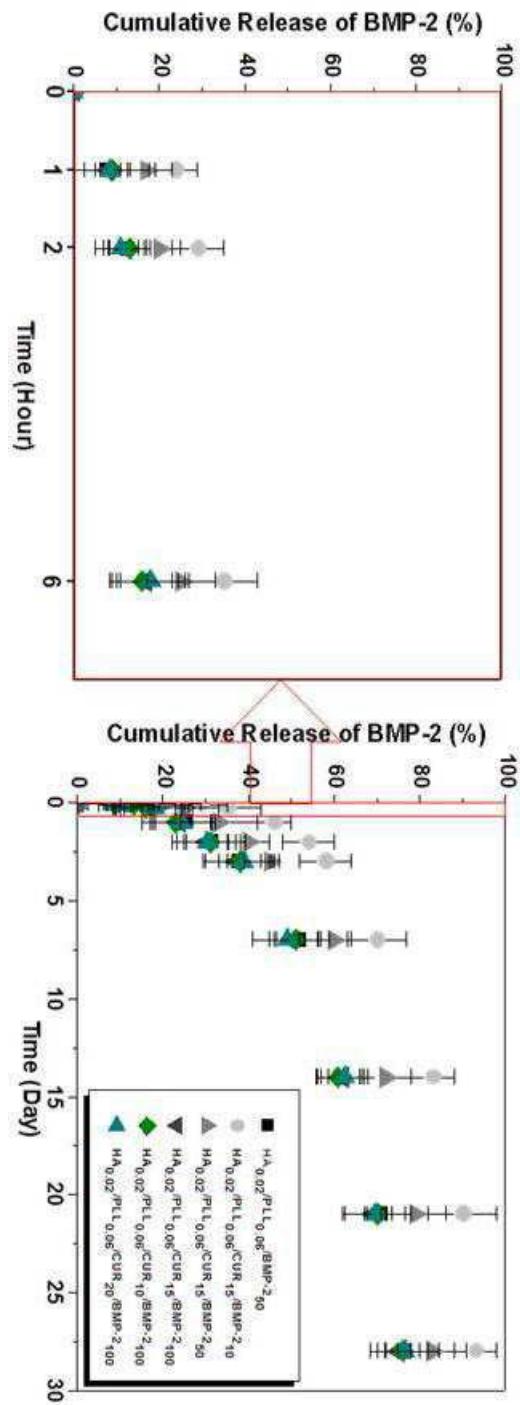
도면10



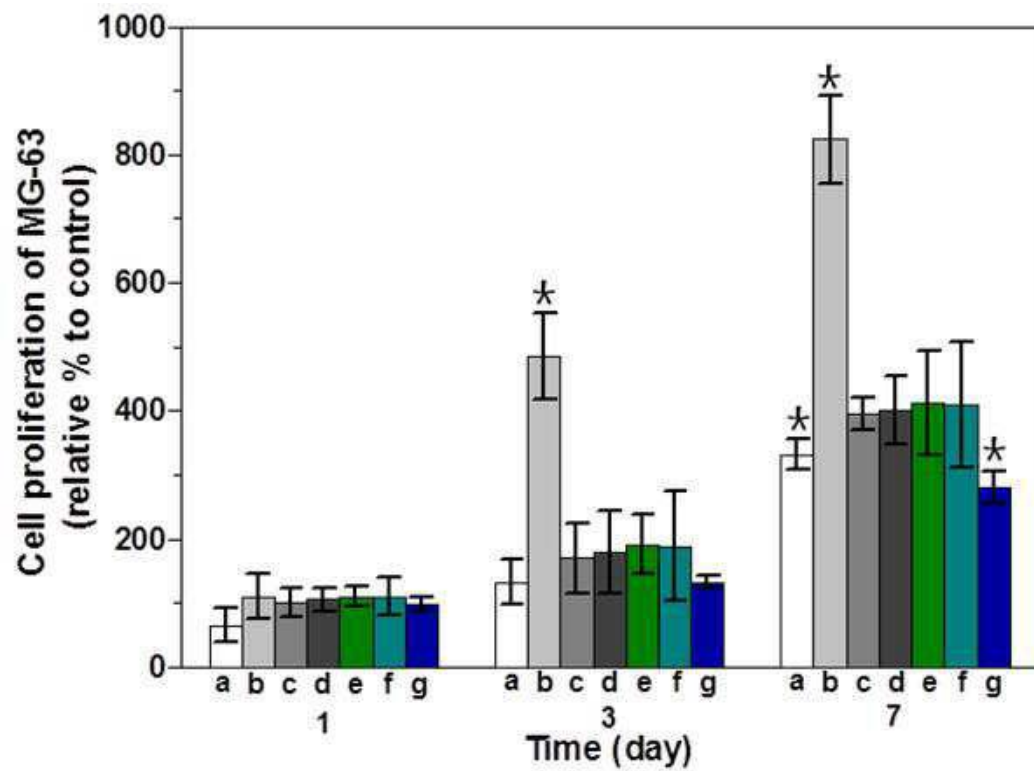
도면11



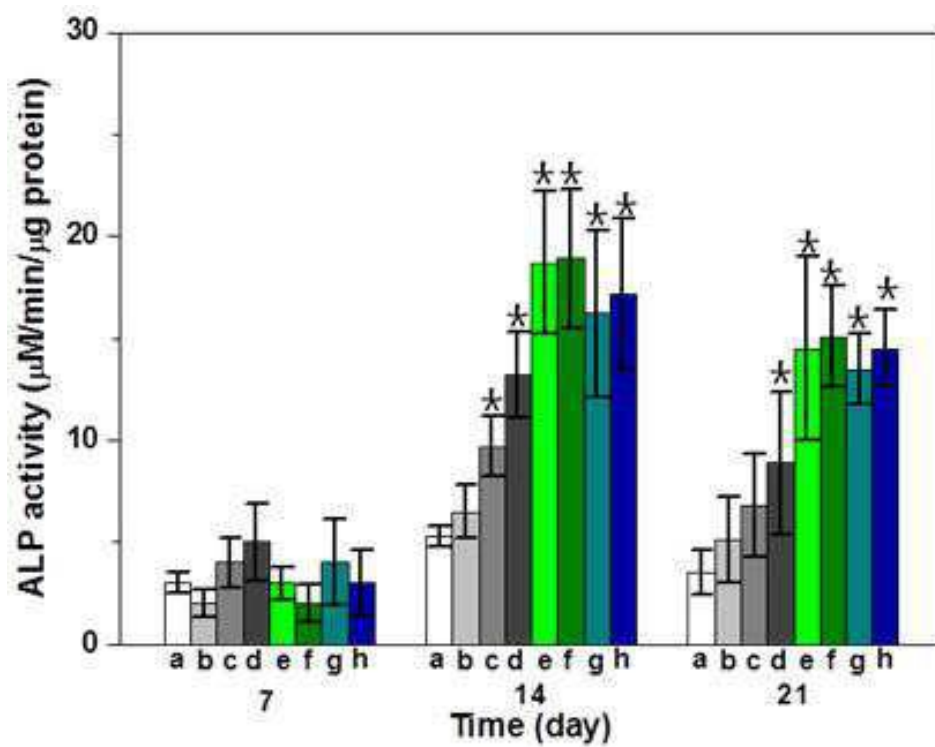
도면12



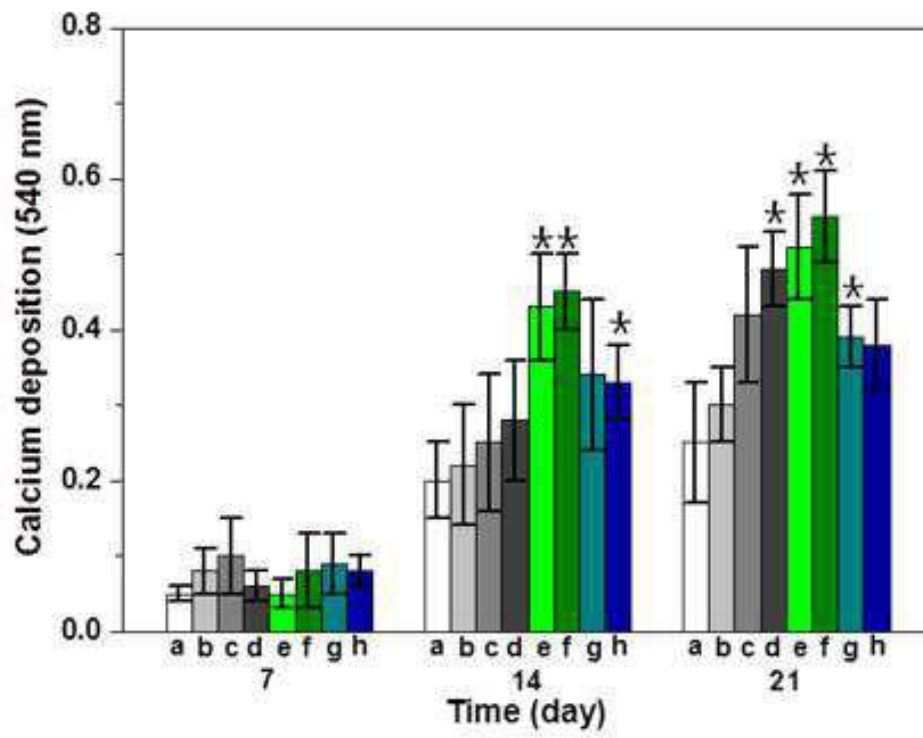
도면13



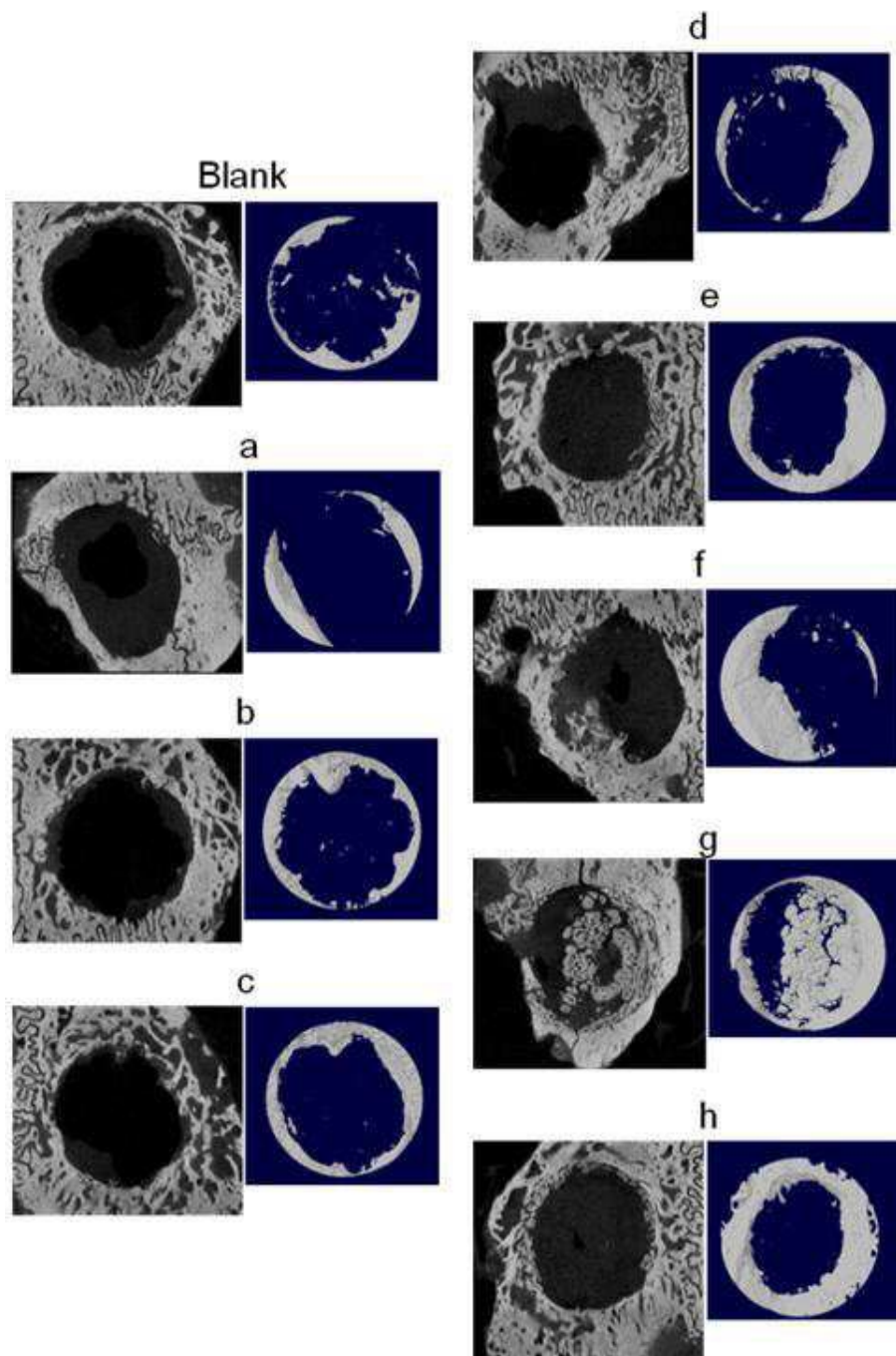
도면14



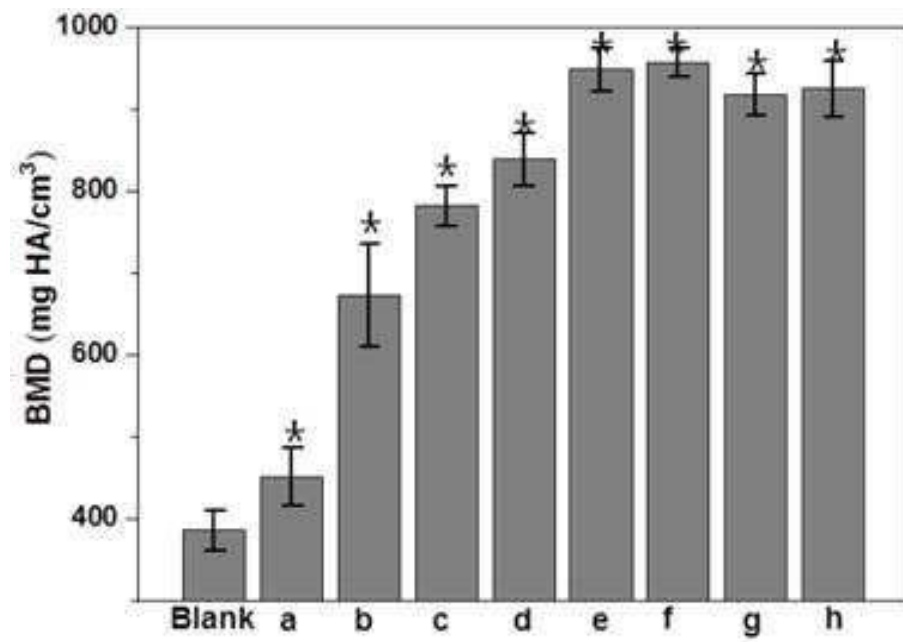
도면15



도면16



도면17



도면18

