(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0055435
(43) 공개일자 2019년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/18* (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01) *A61L 27/24* (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01) *A61L 27/36* (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0152150
(22) 출원일자 2017년11월15일
심사청구일자 2017년11월15일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
정원교
부산광역시 남구 분포로 111, 128동 2101호(용호동, 엘지메트로시티
고석천
제주특별자치도 제주시 선덕로3길 12(연동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이준성

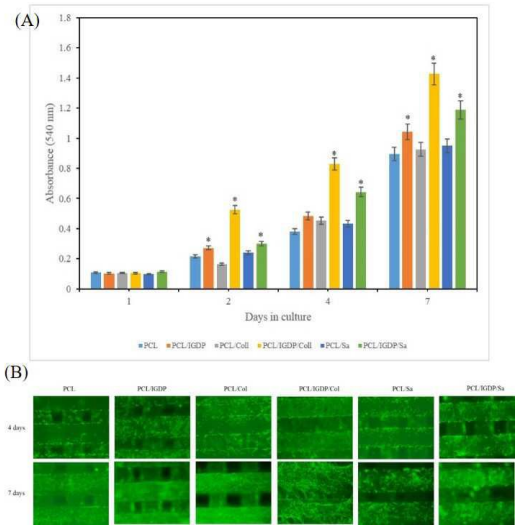
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **해양 생물 유래 물질을 포함하는 골조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 해양 생물 유래 물질, 구체적으로는 어류 유래 콜라겐 또는 알긴산, 및 전복 내장 가수 분해물을 포함하는 골 조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/24 (2013.01)
A61L 27/34 (2013.01)
A61L 27/3629 (2013.01)
A61L 27/3847 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
(72) 발명자
응구엔반띤
부산광역시 남구 용소로21번길 21-6(대연동)

오건우
부산광역시 남구 용소로64번길 64-8, 103호(대연동, 그린빌 원룸)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120320
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발
기 여 율 2/5
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2012.08.24 ~ 2017.08.23
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20150220
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업
연구과제명 해양융복합 바이오닉스 소재 상용화 기술 개발
기 여 율 3/5
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2015.04.21 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

생분해성 고분자 지지체;

전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층; 및

어류 유래 콜라겐 또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 포함하는 골 조직 재생용 지지체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리(ε-카프로락톤), 폴리락틱산, 폴리글리콜산, 폴리락틱산-글리콜산 공중합체, 폴리디옥사논, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체, 폴리(γ-에틸 글루타메이트), 폴리안하이드라이드 공중합체, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 전복 내장 가수분해물은 전복 내장 단백질을 펩신, 트립신, 키모트립신, 판크레아틴, 알칼레이즈, 플라보자임, 파파인 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 가수 분해 효소로 처리하여 얻어지는 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 4

상기 전복 내장 가수분해물은 분자량이 1 내지 10 KDa의 단백질인 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 어류는 연어목 연어과, 농어목 다랑이과, 농어목 고등어과, 농어목 전갱이과, 농어목 시크리드과, 대구목, 가자미목으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 알긴산은 해조류에서 유래한 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 알긴산은 알긴산나트륨인 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 8

1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자 지지체의 기공 크기는 400 내지 500 ㎛이며, 3차원 격자 형태인 것인 골 조직 재생용 지지체.

청구항 9

생분해성 고분자 지지체를 제작하는 단계;

상기 지지체의 표면에 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층 코팅층을 형성시키는 단계; 및

어류 유래 콜라겐 또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계를 포함하는 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 생분해성 고분자 지지체를 제작하는 단계는 생분해성 고분자로 이루어진 가닥이 3차원 격자 형태를 나타내도록 제작하는 것인 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리(ε-카프로락톤), 폴리락틱산, 폴리글리콜산, 폴리락틱산-글리콜산 공중합체, 폴리디옥사논, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체, 폴리(γ-에틸 글루타메이트), 폴리안하이드라이드 공중합체, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계는 상기 전복 내장 가수분해물이 함유된 용액에 상기 제작된 생분해성 고분자 지지체를 침지시키는 것에 의해 수행되는 것인 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 전복 내장 가수분해물은 전복 내장 단백질을 펩신, 트립신, 키모트립신, 판크레아틴, 알칼레이즈, 플라보자임, 파파인 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 가수 분해 효소로 처리하여 얻어지는 것인 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

청구항 14

제 9항에 있어서, 상기 어류 유래 콜라겐 또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계는 상기 어류 유래 콜라겐 또는 알긴산을 함유하는 용액에 상기 상기 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층이 형성된 생분해성 고분자 지지체를 침지시키는 것에 의해 수행되는 것인 골 조직 재생용 지지체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양 생물 유래 물질을 포함하는 골 조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 어류 유래 콜라겐 또는 알긴산, 및 전복 내장 가수 분해물을 포함하는 골 조직 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 과학의 발전과 그에 따른 인간 수명의 증가는 다양한 질병, 고령화 및 각종 사고로 인한 장기 손상 등의 문제를 증가시키게 되었다. 그에 따라 조직을 재생시키는 조직공학에 대한 관심은 나날이 뜨거워지고 있는 실정이다. 조직공학이란 생명과학과 공학을 접목시켜 생체조직의 구조와 기능을 복원, 재생 및 대체하여 정상기능을 하도록 해주는 학문이다. 여러 조직 중에서 뼈는 인체를 지탱하며 동작을 수행하는 기계적 기능 이외에도 체내의 칼슘 이온 농도를 조절하는데 칼슘의 저장고 역할을 하며 골수에서 인체에 필요한 적혈구 및 백혈구를 생산하는 중요한 생리적 기능도 보유하는 중요한 조직이다. 뼈는 노화 및 다른 생리적인 이유로 손상되거나 여러 가지 사고로 손상될 수 있다. 현재 뼈의 손상은 주로 기계적 물리적인 방법으로 치료한다. 사고, 질병, 전염 등으로 야기된 구강외과 또는 정형 외과적 수술에 있어서 뼈 손실에 대한 뼈의 재생 및 치료는 가장 중요한 목표이다.

[0003] 조직공학에 적용하기 위한 지지체는 최적화된 조직 형성을 위해 세포 친화력, 영양분과 산소가 투과하기 위한 적절한 공극률, 세포 부착 및 분화를 촉진시키기 위한 계면 활성 등의 핵심적인 조건을 만족해야 한다. 특히 골 조직 재생용 지지체의 경우 골형성 유도(osteoinduction), 주변세포의 이동 및 결합, 체내 분해성, 기계적 하중 지지, 골 환경 유사성 등이 충족되어야 한다. 그러나 현재 사용되고 있는 골 조직 재생용 지지체들은 각각 어느 정도의 한계를 지니고 있다. 구체적으로 PLGA 계열의 생분해성 합성 고분자는 우수한 생체적합성과 체내에서 자연스럽게 분해되는 성질이 있어 조직공학 분야에서 지지체를 만드는데 다양하게 사용되는 소재이나, 낮은 생체활성, 높은 소수성, 생체 단백질 및 세포에 대한 낮은 친화력을 가지기 때문에, 여전히 조직 공학에 적합하도록 최적화될 필요가 있다. 또한 이러한 조직재생을 위해 대부분 생체 친화적인 물질을 사용하고 있지만, 그럼에도 불구하고 몸속에 삽입되었을 경우 염증반응이나 면역반응 등의 안전성의 문제가 대두되고 있다. 아울러, 손상부위에 삽입되었을 경우 회복속도의 조절 문제 및 조직 재생 완료 후에 상처가 남는 등의 문제점이 존재한다.

[0004] 이에 본 발명자들은 해양 유래 생리활성 물질 및 천연고분자 물질들을 융합시킨 골 조직 재생용 지지체가 골 조직 재생을 위한 세포 분화 및 항상성에 최적의 환경을 제공할 수 있는 동시에, 몸 속에 삽입되었을 경우 염증반응이나 면역반응 등 안전성의 문제점들을 해결할 수 있는 것을 확인하고서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 체내에서 안전성을 갖는 동시에 골 조직 재생을 위한 세포 생성에 최적화된 3차원 골 조직 재생용 지지체를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 골 조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양태는 생분해성 고분자 지지체; 전복 내장 가수 분해물을 함유하는 코팅층; 및 어류 유래 콜라겐 및/또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 포함하는 골 조직 재생용 지지체를 제공한다.

[0008] 본 명세서에서 사용된, 용어, "골 재생"은 손상된 골 조직을 골 세포가 증식하거나 또는 골아세포가 골 세포로 분화하는 등의 과정을 거쳐 골 손상을 치료, 완화, 개선시키는 모든 현상을 의미할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 상기 골 재생은 특히 골 분화 촉진에 의한 것일 수 있다.

[0009] 용어 "골 재생용 지지체"는 생체 내에서 손상된 뼈 조직의 일부를 대체하며, 뼈의 기능을 보완 또는 대체할 수 있는 구조물을 의미한다. 상기 골 조직 재생용 지지체는 예를 들면 뼈의 복원을 위해 관련 세포가 부착되어 증식 또는 분화될 수 있도록 지지역할을 수행할 수 있다. 상기 골 재생용 지지체는 그 형태와 상관없이 이식의 대상이 되는 골 손상 부위의 형태와 반드시 일치할 필요는 없고, 유사한 형태로 성형이 가공한 정도의 상태이면 족하다. 그러나, 필요에 따라서는 이식 대상의 골 손상 부위의 형태를 미리 파악하여 이에 맞는 모양을 제조할 수도 있으며, 다양한 상황에 일반적으로 적용될 수 있도록 특정 구조로 미리 형상화시킨 것일 수도 있다.

[0010] 용어 "생분해성 고분자 지지체"는 생분해성 고분자로 이루어진 구조물을 의미한다. 상기 생분해성 고분자 지지체는 본 발명의 골 조직 재생용 지지체의 기초가 되는 구조물로서 생분해성 고분자 지지체의 형태에 의해 본 발명의 지지체 형태가 결정될 수 있다.

[0011] 상기 생분해성 고분자는 폴리(ε-카프로락톤), 폴리락틱산, 폴리글리콜산, 폴리락틱산-글리콜산 공중합체, 폴리디옥사논, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체, 폴리(γ-에틸 글루타메이트), 폴리안하이드라이드 공중합체, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 지지체는 생분해성 고분자 소재를 사용함으로써, 지지체가 기능과 역할을 충분히 수행할 때까지 유지된 후 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있다. 본 발명의 지지체에 이용되는 생분해성 고분자의 중량 평균 분자량은 1,000 내지 1,000,000 g/mol일 수 있다. 또한 구체적으로 상기 고분자의 중량 평균 분자량은 1,000 내지 900,000 g/mol, 1,000 내지 800,000 g/mol, 1,000 내지 700,000 g/mol, 1,000 내지 600,000 g/mol, 1,000 내지 500,000 g/mol, 1,000 내지 400,000 g/mol, 1,000 내지 300,000 g/mol, 또는 1,000 내지 200,000 g/mol일 수 있다. 상기 중량 평균 분자량의 범위 밖에서는 조직 재생용 지지체로서 물성이 적절하지 않으며, 특히 상기 중량 분자량 범위 이하일 경우, 조직재생의 기능을 충분히 수행하기 전에 분해될 수 있다. 상기 생분해성 고분자는 바람직하게 폴리(ε-카프플로락톤), 폴리락틱산 또는 폴리글리콜산일 수 있으며, 보다 바람직하게 폴리(ε-카프플로락톤)일 수 있다. 상기 폴리(ε-카프플로락톤)은 생체적합성 및 생분해성 특성을 가지며, 다른 고분자보다 인장강도가 좋아 골 조직 재생용 지지체에 사용하기에 더욱 적합하다.

[0012] 상기 생분해성 고분자 지지체는 바람직하게 3차원 격자 형태를 가질 수 있다. 상기 3차원 격자 형태는 구체적으로 생분해성 고분자로 이루어진 실 모양의 가닥들이 각 층에서 평행하게 배열되고, 각 층의 고분자 가닥 배열은 인접한 다른 층과 직각을 이루며 평행하게 배열됨으로써 생성되는 것일 수 있다 (도 1 참조). 상기 생분해성 고분자 가닥은 그 직경이 바람직하게 300 내지 500 ㎛, 350 내지 500 ㎛, 300 내지 450 ㎛, 또는 350 내지 450 ㎛일 수 있다. 본 명세서에서 용어 "직경"이란, 섬유의 중심을 지나는 단축의 길이를 의미한다. 조직 재생용 지지체에 요구되는 최소한의 기계적 물성을 확보하면서, 골 조직 재생을 위한 세포와 3차원(입체)적으로 결합하는데 적합하도록 하기 위하여, 본 발명에서 이용하는 고분자 가닥의 직경은 상기 범위 내에서 포함되는 것이 바람직하다. 상기 생분해성 고분자 지지체는 기공 크기가 바람직하게 400 내지 500 ㎛, 또는 450 내지 500 ㎛일 수 있다.

[0013] 용어 "전복 내장 가수분해물"은 전복 내장을 효소로 분해하여 수득한 물질을 의미한다. 상기 전복 내장 가수분해물은 전복 내장 단백질을 펩신, 트립신, 키모트립신, 판크레아틴, 알칼레이즈, 플라보자임, 파파인 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 가수 분해 효소로 처리하여 얻어지는 것일 수 있다. 상기 단백질 가수 분해 효소는 바람직하게 펩신, 트립신, 및/또는 키모트립신일 수 있다. 상기 전복 내장 단백질에 대한 효소의 처리 비는 약 1:100의 비율일 수 있다. 상기 효소 처리에 의해 전복 내장 단백질은 짧은 길이의 펩타이드 형태로 존재할 수 있다. 상기 전복 내장 가수분해물은 바람직하게 전복 내장을 단백질 가수 분해 효소로 처리한 후 한외여과막(ultrafiltration membrane)으로 분획한 분획물일 수 있다. 상기 전복 내장 가수분해물은 보다 바람직하게 1 내지 10 KDa의 분자량, 보다 바람직하게 1KDa 초과 10KDa 미만의 분자량을 갖는 펩타이드로 이루어질 수 있다.

[0014] 용어 "어류 유래 콜라겐"은 어류로부터 수득된 콜라겐을 의미한다. 상기 어류 유래 콜라겐은 바람직하게 어류의 피부로부터 얻어질 수 있다. 상기 어류는 예를 들면, 연어목 연어과, 농어목 다랑이과, 농어목 고등어과, 농어목 전갱이과, 농어목 시크리드과, 대구목, 가자미목으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게, 상기 어류는 넙치, 명태, 또는 가자미일 수 있다.

[0015] 상기 알긴산(또는 알지네이트)은 바람직하게 해조류로부터 수득되는 것일 수 있다. 상기 알긴산은 바람직하게 염의 형태로 존재할 수 있으며, 보다 바람직하게 알긴산나트륨일 수 있다.

[0016] 본 발명의 골 조직 재생용 지지체는 상기 생분해성 고분자 지지체의 표면에 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층, 및 어류 유래 콜라겐 및/또는 알긴산을 함유하는 코팅층이 형성된 것을 특징으로 한다. 따라서 본 발명의 지지체는 생분해성 고분자 지지체의 표면에 보다 세포 친화적 환경을 제공할 수 있는 해양 생물 유래의 천연 생리활성 물질이 결합되고, 그 결과 골 재생을 위한 세포의 부착, 증식 또는 분화가 효과적으로 촉진된다.

[0017] 본 발명의 골 조직 재생용 지지체는 보다 바람직하게 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층, 및 어류 유래 콜라겐을 함유하는 코팅층을 포함하는 것일 수 있다. 일 실시예에서 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층 및 넙치 유래 콜라겐을 함유하는 코팅층을 포함하는 지지체가 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층 및 알긴산나트륨을 함유하는 코팅층을 포함하는 지지체보다 인 비보 실험에서 높은 골아세포 분화 효능이 있음을 확인하였다.

[0018] 상기 골 조직 재생용 지지체는 골 재생을 위한 생리활성인자를 더 포함할 수 있다. 용어 "생리활성인자"는 생체의 기능을 증진시키거나 혹은 억제시키는 물질을 의미하며, 비타민, 호르몬, 효소, 신경전달물질 등을 지칭할 수 있다. 상기 골 재생을 위한 생리활성인자는 예를 들면, 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 형질전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 및 표피 성장인자 (epidermal growth factor; EGF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게 골형성 단백질, 및/또는 형질전환 성장인자일 수 있다.

[0019] 본 발명의 골 조직 재생용 지지체는 구체적으로 골 재생 또는 연골 재생에 사용하기 위한 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 골 전도성 지지체 또는 연골 재생용 지지체로서 이용될 수 있다. 용어 "골 전도성(Osteoconduction)"은 주위 골조직으로부터 골아세포나 골 전구세포가 이식골 부위로 이동, 무기질 침착에 의해 골이 형성되는 것으로 주변에 골조직이나 분화된 중간엽세포가 있어야만 일어난다. 용어 "골 전도성 지지체"는 지지체의 표면 상에서 또는 그의 기공, 채널 또는 다른 내부 공극 내에서, 원시 세포, 미분화 세포 및 전능성 세포 등이 골 형성 세포 계통이 되도록 자극되어, 새로운 골 성장을 가능하게 하는 환경을 제공하는 지지체를 의미한다. 일 실시예에서, 본 발명의 지지체가 중간엽줄기세포의 골세포로의 분화에 좋은 미세환경을 제공하는 것을 확인할 수 있었다.

[0021] 다른 양태는 생분해성 고분자 지지체를 제작하는 단계; 상기 지지체의 표면에 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계; 및 어류 유래 콜라겐 및/또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계를 포함하는 골 조직 재생용 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0022] 상기 방법에서, 상기 생분해성 고분자 지지체를 제작하는 단계는 생분해성 고분자로 이루어진 가닥이 3차원 격자 형태를 나타내도록 제작하는 것일 수 있다. 상기 3차원 격자 형태는 구체적으로 생분해성 고분자로 이루어진 실 모양의 가닥들이 각 층에서 평행하게 배열되고, 각 층의 고분자 가닥 배열은 인접한 다른 층과 직각을 이루며 평행하게 배열됨으로써 생성되는 것일 수 있다(도 1 참조). 상기 생분해성 고분자 지지체는 바람직하게 3D

프린팅 기술에 의해 제조될 수 있다. 용어, "3D 프린팅"이란 쾌속조형기술(RP, Rapid Prototype)과 같은 의미로 통용되는 용어로, 3차원 영상자료의 2차원 단면화를 통해서 재료를 체계적으로 한 층씩 적층함으로써 실제 3차원 모델을 빠른 시간 안에 제작할 수 있는 기술을 일컫는다. 상기 생분해성 고분자 가닥은 그 직경이 바람직하게 300 내지 500 ㎛, 350 내지 500 ㎛, 300 내지 450 ㎛, 또는 350 내지 450 ㎛일 수 있다. 상기 생분해성 고분자 지지체는 기공 크기가 바람직하게 400 내지 500 ㎛, 또는 450 내지 500 ㎛일 수 있다.

[0023] 상기 생분해성 고분자는 폴리(ε-카프플로락톤), 폴리락틱산, 폴리글리콜산, 폴리락틱산-글리콜산 공중합체, 폴리디옥사논, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시부티릭산-하이드록시발러릭산 공중합체, 폴리(γ-에틸글루타메이트), 폴리안하이드라이드 공중합체, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또한 바람직하게 폴리(ε-카프플로락톤), 폴리락틱산 또는 폴리글리콜산일 수 있으며, 보다 바람직하게 폴리(ε-카프플로락톤)일 수 있다.

[0024] 상기 방법에서, 상기 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계는 상기 전복 내장 가수분해물이 함유된 용액에 상기 제작된 생분해성 고분자 지지체를 침지시킴으로써 수행될 수 있다.

[0025] 상기 전복 내장 가수분해물은 전복 내장 단백질을 펩신, 트립신, 키모트립신, 판크레아틴, 알칼레이즈, 플라보자임, 파파인 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 가수 분해 효소로 처리하여 얻어지는 것일 수 있으며, 바람직하게 펩신, 트립신, 및/또는 키모트립신 처리에 의해 얻어지는 것일 수 있다. 또한 상기 전복 내장 가수분해물은 상기 지지체에서 설명한 바와 같다.

[0026] 상기 방법에서, 상기 어류 유래 콜라겐 및/또는 알긴산을 함유하는 코팅층을 형성시키는 단계는 상기 어류 유래 콜라겐, 알긴산, 또는 콜라겐 및 알긴산의 조합을 함유하는 용액에 상기 전복 내장 가수분해물을 함유하는 코팅층이 형성된 생분해성 고분자 지지체를 침지시킴으로써 수행될 수 있다. 또한 상기 어류 유래 콜라겐 및 상기 알긴산은 상기 지지체에서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 골 조직 재생용 지지체는 생분해성 폴리머 지지체에 해양 생물 유래 천연 생리활성 물질을 포함하고 있는 코팅층을 도입함으로써, 생체적합성이 우수하고 적절한 기계적 강도를 가지고 있으며, 골 조직 재생을 위한 세포의 부착, 증식 및 분화에 유리하다. 따라서 골 조직을 위한 이식물 및 골 재생을 위한 소재로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 3D 프린팅을 이용하여 제작된 PCL 지지체의 제작 모식도이다.

도 2(A)는 넙치 피부로부터 추출된 콜라겐의 (A) SDS-PAGE 패턴(β-사슬; α1-사슬; α2-사슬)이다. 도 2(B)는 MTT 어세이로 측정된, IGDP 농도에 따른 MSC 세포 생존력 결과를 보여주는 그래프이다. 도 2(C)는 MSC 세포에서 IGDP 농도에 따른 알카라인 포스파타제 (ALP) 활성 효과를 보여주는 그래프이다.

도 3은 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 FTIR 스펙트럼 결과이다.

도 4는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에 대한 SEM 이미지(A) 및 공극률(B)을 보여준다.

도 5(A)는 각 지지체 표면에서 시간에 따른(1초, 2초, 3초, 및 20분) 물방울 형태를 나타낸다. 도 5(B)는 각 지지체의 물방울의 접촉각을 나타낸다. 도 5(C)는 각 지지체의 단백질 흡착 정도를 보여준다. 도 5(D)는 응력 변형 곡선을 보여준다.

도 6(A)는 다른 배양 기간(1, 2, 및 7일) 동안 상이한 지지체에서 배양된 MSC 증식 결과를 보여주는 그래프이다 ($n = 4$, $*P < 0.05$ (PCL 지지체에서 배양된 MSC 세포와 비교함). 도 6(B)는 각각의 지지체에서 MSC를 4일 및 7일 배양한 후 플루오레세인 디아세테이트 (FDA)로 염색한 결과를 나타낸다.

도 7(A)는 각각의 지지체에서 배양된 MSC 세포의 ALP 활성 결과를 나타낸다. 도 7(B)는 알리자린 레드 S 염색을 통해 확인한 각각의 지지체에서 배양된 MSC 세포의 칼슘 침착 결과를 보여준다. 도 7(C)는 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 측정된 흡광도를 통해 분석된 각 지지체에서 배양된 MSC 세포의 미네랄화를 확인한 결과를 나타낸다 ($n = 4$, $*p < 0.05$).

도 8은 각 지지체에 분주된 MSC의 골형성 분화 관련 유전자를 RT-PCR로 분석한 결과를 보여준다. GADPH 가 대조

군으로 사용되었다.

도 9(A)는 대조군(PCL), PCL/IGDP, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체가 함유된 경골 결손의 새로운 조직의 형성을 보여주는 μ-CT 이미지이다. 도 9(B)는 지지체 이식 후 2주 및 6주차에 0.48 mm^2 면적 대비 재생된 연조직 및 경조직을 보여준다. (*p < 0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0031] **제조예 1. 골 조직 재생용 지지체 제작**

[0032] **1.1. 전복 내장 소화 가수분해물 펩타이드, 어류 유래 콜라겐 용액 및 알긴산나트륨 용액 준비**

[0033] 전복(abalone *Haliotis discus hannai*)은 세척하고 내장을 분리하여 동결건조시킨 후 사용하였다. 전복 유래 내장 위장관 소화 가수분해물 펩타이드(intestine gastro-intestinal digests peptide, IGDP)의 제조물을 1M HCl 및 10M NaOH를 이용하여 pH 2.2가 되도록 하였다. 펩신 (EC 3.4.23.1)을 1/100 (w/w)의 효소와 기질 비로 첨가한 다음, 37℃에서 2시간 동안 교반시켰다. 내장 가수분해물의 조건을 얻도록 pH를 6.5로 설정하였다. 트립신 (EC 3.4.21.4) 및 α-키모트립신 (EC 3.4.21.1)을 1/100 (w/w)의 효소와 기질의 비로 보충한 후, 37℃에서 2시간 동안 교반시켰다. IGDP를 4℃에서 15분 동안 원심분리하고, 상등액을 동결건조시켜 분말을 얻었다(5.65 g). 그 결과로 얻은 IGDP를 1 kDa < IGDP < 10 kDa의 분자량 컷오프의 범위를 갖는 2개의 상이한 한외여과 (ultrafiltration, UF) 멤브레인으로 분리시킨 후, 동결건조시켰다.

[0034] 어류 유래 콜라겐 용액 제조를 위해, 넙치(*Paralichthys olivaceus*) (한국, 제주, 동문 수산시장에서 구입)의 피부로부터 콜라겐(Col)을 추출하였다. 추출된 콜라겐을 0.5M 아세트산에 4℃에서 24시간 동안 희석시켰다 (0.5 %).

[0035] 알긴산나트륨(Sa)은 갈조류 유래 알긴산나트륨(A0682, 시그마 알드리치, 미국)을 사용하였다. 증류수에 알긴산나트륨 (2% w/v)을 50℃에서 6시간 동안 용해시킨 다음 실온으로 옮겼다.

[0036] **1.2. PCL 3차원 지지체 제작**

[0037] 핫 멜트, 압력 펌프 TCD-200, 노즐, 및 x-y-z 스테이지를 갖는 3D 프린터 IEI 시스템(Iwashita Engineering, Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 지지체를 제작하였다. PCL(폴리카프로락톤)을 철 실린더에 위치시키고 핫-멜트를 110℃로 처리하였고, 프린터를 0.6 mm/sec의 선형 속도로 작동시켰다. PCL을 펠릿 형태로 이용하였으며, 13.5 mm의 길이로 프린팅하였다. PCL을 핫-멜팅시키고 500kPa의 공기압을 가한 다음 3D 가닥으로 압출하고, 이것이 8층이 될 때까지 층별로 플롯팅하였다.(도 1 참조). 노즐 크기는 400 ㎛이고 기공의 크기는 400 - 500 ㎛이었다.

[0038] 제작된 PCL 지지체 표면을 24시간 동안 NaOH (3M, 37℃)로 처리 후, 1M HCl에 담근 다음 증류수로 세척하였다. PCL/IGDP, PCL/Col 및 PCL/IGDP/Col 지지체를 50 mM EDC/NHS 용액으로 24시간 동안 가교시킨 후, 98 wt% 에탄올과 증류수로 3회 세척한 다음, -80℃에서 동결건조시켰다. PCL/Sa 및 PCL/IGDP/Sa 지지체는 4℃에서 0.5M $CaCl_2$에 24시간 동안 담근 다음 에탄올로 세척하고, -80℃에서 동결건조시켰다.

[0039] **1.3. PCL 지지체 코팅**

[0040] PCL 지지체 표면 개선을 위해 먼저 3M NaOH를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 반응시켜 카르복실기를 생성시키고, 이후 1M HCl과 증류수를 이용하여 잔존하는 NaOH를 제거하였다. 표면이 개선된 PCL 지지체에 50 mM EDC/NHS 용액을 이용하여 24시간 동안 IGDP 또는 콜라겐을 가교결합시켜 PCL/IGDP 또는 PCL/Col 지지체를 제작하였다. 또한 PCL/IGDP 지지체를 콜라겐 존재 하에 50 mM EDC/NHS 용액으로 24시간 동안 가교결합시켜 PCL/IGDP/Col 지지체를 제작하였다. PCL/IGDP/Sa 지지체는 PCL/IGDP 지지체를 이용하여 0.5M 칼슘 클로라이드를 이용하여 알지네이트를 가교결합시켜 제작하였으며, PCL/Sa 지지체는 표면 개선된 PCL 지지체에 0.5M 칼슘 클로라이드를 이용하여 알지네이트를 가교결합시켜 제작하였다. 제작된 지지체는 95 wt% 에탄올과 증류수로 3회 세척하여 잔존하는 물질들을 제거한 후, 동결건조시켰다.

[0042] **실시예 1. 어류 콜라겐의 특성 규명 및 세포 생존력 및 ALP 에 대한 IGDP의 효과 확인**

[0043] 넙치 피부로부터 산성 용액으로 추출한 콜라겐을 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 도 2A에서 확인할 수 있는 바와 같이, 콜라겐은 약 130kDa 분자량(MW)을 갖는 α1 및 α2-사슬을 함유하였으며, 또한 약 270kDa의 분자량을 갖는 β-사슬을 함유하였다. 추출된 넙치 콜라겐의 단백질 패턴은 양(*Ovis aries*) 유래 콜라겐에 대해 기술된 것과 유사하였다(Fauzi MB, Lokanathan Y et al. 2016). 넙치 피부 유래 콜라겐의 추출물은 돼지 피부 유래 Ty-I 콜라겐 (Sigma, St. Louis, MO, USA)의 분자량과 유사하였다.

[0044] 전복 유래 내장 가수분해물 펩타이드(IGDP)를 Nguyen VT, Qian ZJ et al.(2012)에 기재된 방법(약간 변형함)에 따라 제조하였다. 제조된 IGDP의 세포 독성 및 ALP 활성은 MSC 세포를 이용하여 확인하였다. ALP는 조골세포 분화 초기에 발현하는 대표적인 효소로, 골 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. MTT 측정을 통하여 세포 독성을 알아본 결과, IGDP는 MSC 세포에서 독성을 나타내지 않았으며, IGDP 처리시 5일차에 MSC 세포의 증식을 유도하는 것을 알 수 있었다. 또한, IGDP에 의해 ALP활성이 유도되는 것을 확인할 수 있었다(도 2B 및 C). 도 2B 및 C에서 나타난 바와 같이, IGDP 처리는 농도의존적으로 ALP 활성을 유의하게 증가시켰다. 최대 효과는 500 ㎍/ml의 IGDP에서 관찰되었는데, 배양 5일 후 대조군에 비해 ALP 활성이 273.21% 증가하였다. 이러한 관찰은 IGDP가 조골세포 분화를 자극한다는 것을 시사한다. 따라서, 하나의 지지체 (길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)에 0.5 ± 0.038 mg/ml 농도의 IGDP를 사용하여 지지체를 제작하였다.

[0046] **실시예 2. 지지체의 푸리에 변환 적외분광(FTIR) 분석**

[0047] 각 지지체의 특정 화학적 작용기의 존재를 확인하기 위해, 4000-650 cm^{-1} 스펙트라 범위의 FTIR-Perkin-Elmer Spectrum GX (Washington DC, USA)를 이용하여 FTIR 스펙트럼 분석을 수행하였다. KBr 방법에 의한 지지체의 적외선 결과는 다음과 같다.

[0048] PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 FTIR 스펙트럼 결과를 도 3에 나타냈다. PCL 스펙트럼은 2926 - 2949 cm^{-1} 및 2852 - 2865 cm^{-1} 에서 중요한 peak를 나타냈으며, 이는 각각 비대칭 및 대칭 CH_2 신축에 의한 것이다. 1719 - 1721 cm^{-1}의 강한 밴드는 카르보닐 (C=O) 신축 신호를 나타내며, 1295 cm^{-1} 및 1239 cm^{-1}의 peak는 결정질 상의 C-O 및 C-C 신축 및 비대칭 COC 신축 진동에 관한 것이다. 1164 cm^{-1}의 다른 유의한 peak는 대칭 COC 신축에 해당한다. amide A 밴드 위치는 3386 cm^{-1}이며, 그 영역에서 N-H 및 O-H 그룹의 신축 진동이 나타난다. amide B 밴드는 CH_2 비대칭적 신축의 특성으로 인해 2949 cm^{-1}에서 발견되었다. 1635 cm^{-1} (C=O 신축/ COO^-와의 수소결합), 1539 cm^{-1} (CN 신축과 커플링되는 NH 굽힘), 및 1239 cm^{-1} (CN 신축 진동 및 amide N-H 평면내 ㄱ굽힘 진동)에서의 흡수 peak는 IGDP 및 콜라겐 내의 amide I, amide II, 및 amide 의 특징적 밴드로 인한 것이다. PCL/Sa 및 PCL/IGDP/Sa 지지체는 (S=O) 그룹에 해당하는 1239 cm^{-1}의 특징적 밴드를 나타냈다. 3340 cm^{-1}에서의 peak는 PCL, IGDP 및 알긴산나트륨의 -OH 작용기에 해당한다. 알긴산나트륨 (Sa)의 FTIR 스펙트럼은 O-H 및 C-H 그룹에 기인한 3260-3380 cm^{-1} 및 2926-2949 cm^{-1}에서 특징적 peak를 보여주었다. 1541 및 1419 cm^{-1}의 peak는 각각 C-O 및 COOH 작용기에 의한 것이다. PCL, PCL/Sa 및 PCL/Sa 지지체의 스펙트럼은 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 이는 PCL/IGDP 지지체와 알긴산나트륨이 반응하였기 때문인 것으로 생각된다. IGDP, 알긴산나트륨(Sa) 및 콜라겐(Col)을 함유하는, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa의 1400 - 1669 cm^{-1} peak는 PCL의 특징적 peak 보다 높았다. 반면, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa의 스펙트럼은 순수한 물질의 스펙트럼과 유사하였으며, PCL과 IGDP, Sa 및 Col의 화학적 상호작용에 기인한 PCL의 전형적 흡수 밴드를 나타내었다.

[0050] **실시예 3. 지지체의 주사전자 현미경(SEM) 이미지 및 다공성 분석**

[0051] PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 표면 및 다공성을 확인하기 위해 SEM 분석을 수행하였다. 각 지지체의 평균 층간 크기는 19 ± 15 ㎛ 내지 250 ± 21 ㎛ 범위로 유사했다. 또한,

각 지지체의 기공 크기 및 버팀대(strut)의 직경은 각각 약 421 ± 29 내지 463 ± 24 ㎛ 및 355 ± 12 내지 394 ± 21 ㎛로 확인되었다 (표 1 및 도 4A).

표 1

[0052] 각 지지체의 버팀대 직경, 층간 간격, 기공 크기

	PCL	PCL/IGDP	PCL/Col	PCL/IGDP/Col	PCL/Sa	PCL/IGDP/Sa
버팀대 직경 (㎛)	353 ± 16	394 ± 21	388 ± 13	365 ± 17	355 ± 12	385 ± 21
층간 간격 (㎛)	236 ± 18	237 ± 14	221 ± 20	250 ± 19	237 ± 11	219 ± 15
기공 크기 (㎛)	454 ± 21	421 ± 29	425 ± 10	449 ± 19	463 ± 24	437 ± 25

[0053] 또한, 동일한 크기(길이 13.5 × 넓이 13.5mm 두께 2.3 mm)를 갖는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 공극률을 에탄올 방법에 의해 측정하였다. 각 지지체를 알려진 부피(T_1)의 에탄올을 갖는 실린더에 10분 동안 위치시키고, 연속된 감압-가압 사이클로 지지체의 기공으로 액체를 침투하게 하였다. 액체-침지된 지지체 제거 전 및 후의 에탄올 부피(각각 T_2 및 T_3)를 측정하여, 하기 식을 이용하여 공극률을 계산하였다.

[0054] $$\text{공극률}\% = \frac{T_1 - T_3}{T_2 - T_3} \times 100\%$$

[0055] 그 결과, 각 지지체는 높은 공극률 및 넓은 표면적의 특성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4B에서 확인할 수 있는 바와 같이, IGDP, Col, 및 Sa의 추가가 공극률을 향상시키는 것을 확인하였다(PCL: 66.67±0.88 %; PCL/IGDP: 71.03±0.92 %; PCL/Col: 74.74±1.93 %; PCL/Sa: 73.81±1.21 %; PCL/IGDP/Col: 80.61±1.14 %; 및 PCL/IGDP/Sa: 78.52±1.37 %). 특히, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체는 높은 공극률을 가지고 있었다. 따라서, PCL/IGDP 지지체에서 알긴산나트륨 및 콜라겐등의 구성의 추가가 공극률에 긍정적인 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다.

[0057] **실시예 4. 지지체의 수분 흡수율 및 단백질 부착 정도 확인**

[0058] 지지체의 친소수성 정도를 조사하기 위해 물과의 접촉각을 측정하였다. 지지체의 수분 흡수율 측정을 위해, PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에 DMEM 한방울을 1ml의 팁으로 떨어뜨렸다. 이미지 분석 소프트웨어3D (ImageJ 1.49v, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 수분 흡수 이미지로부터 각 지지체의 평균 접촉각을 얻었다. 구체적으로 표면의 DMEM 방울과의 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 평균 접촉각(Θ_C)을 방울을 떨어뜨린 후, 1초, 2초, 3초 및 20분 후의 결과를 도 5A 및 도 5B에 나타냈다. 1초 및 20분 후, PCL의 물 접촉 각은 각각 Θ_C = 82.69 ± 1.21° 및 48.89 ± 1.25° 이었다. 이는 PCL 지지체가 소수성임을 나타낸다. 그러나, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 평균 접촉각은 각각 Θ_C = 32.25 ± 1.02° , 66.80 ± 1.11° , 34.18 ± 1.32° , 33.23 ± 0.98° 및 15.72 ± 0.85° 이었다. PCL/Sa 및 PCL/IGDP/Sa 경우는 각 지지체 상에 DMEM 방울을 위치시킨 후 직접 취해지며, 접촉각은 2초 후 0점 근처로 떨어졌다(도 5B). 반면, PCL/IGDP, PCL/Col 및 PCL/IGDP/Col 접촉각은 3초 후 0점 근처로 떨어졌다. IGDP는 화학적 구조에서 아민기와 카르복실기에 의해 친수성 성질을 가지며, DMEM에서 물과 수소 결합을 형성할 수 있다. 알지네이트는 카르복실 기를 함유하는 음이온성 폴리사카라이드이다. 이러한 결과는 IGDP, 콜라겐 또는 알긴산나트륨의 증가한 -COOH 및 -OH 그룹 때문에 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 Θ_C가 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col 및 PCL/Sa 보다 유의하게 감소하였다는 것을 보여준다.

[0059] 또한, PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에 흡착된 전체 단백질의 양을 BCA 어세이를 이용하여 평가하였다. 단백질 흡착능은 생물질 지지체의 중요한 특징이며, 지지체 표면에 흡착된 단백질은 세포 부착 및 생존을 조절할 수 있다 (Jaiswal AK, Chhabra H et al. 2013). 혈청 또는 세포에 의해 분비된 것은 신생-조직을 형성하기 위해 세포의 부착, 분화 및 이동을 중재하는 것으로 여겨진다. 그러므로, 단

백질 흡착은 조직 공학을 위한 지지체를 평가하고 연구하는데 중요한 요인이다. 구체적으로 동일한 크기(길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)를 갖는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체를 2.5 % FBS를 함유하는 0.1 M PBS (pH=7.4)에 침지시켜 BCA 방법을 이용하여 측정하였다. 단백질을 함유하는 배지에 침지시키기 전, 각 지지체를 70% 에탄올에서 30분 동안 침지시킨 후, PBS로 3회 세척하여 에탄올을 제거한 후, 30분 동안 UV 처리를 실시하였다. 지지체를 24-웰 배양 플레이트 안으로 넣은 다음 (각 웰에 1개의 지지체 함유) 2.5% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 갖는 1.5 ml PBS 용액을 각 웰에 첨가하였다. 침지 시간에 따라 각 웰에 첨가된 용액을 회수하였으며, BCA 측정 방법을 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. 흡착된 단백질의 양은 동일한 인큐베이션 조건 하의 대조군 FBS/PBS 용액(지지체 없음)의 단백질의 양에서 흡착 후의 FBS/PBS 용액에 남아 있는 단백질의 양을 빼는 것에 의해 측정하였다. PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 단백질 흡착을 측정한 결과를 도 5C에 나타냈다. 그 결과, 지지체의 단백질 흡착이 25시간(PCL/Col, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa) 및 30시간(PCL, PCL/IGDP 및 PCL/Sa)에서 최대 흡착 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 PCL/IGDP에 콜라겐 및 알긴산나트륨의 첨가는 단백질 흡착을 증가시킨다는 것을 알 수 있었고, PCL 지지체에 콜라겐, IGDP 및 알긴산나트륨의 첨가는 PCL에 비해 단백질 흡착을 유의하게 증가시킴을 알 수 있었다 (1.97배(PCL/Sa), 2.45배(PCL/IGDP), 2.57배(PCL/Col), 4.48배(PCL/IGDP/Col) 및 3.16배(PCL/IGDP/Sa)).

[0061] **실시예 5. 지지체의 세포 생존력 및 세포 부착 정도 확인**

[0062] PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체를 70% 에탄올이 첨가된 48-웰 플레이트에서 밤새 교반하였다. 플레이트를 PBS로 세척하여 에탄올을 제거하고, 30분 동안 UV로 처리한 다음, 세포 시딩 전에 37℃에서 DMEM (FBS 무첨가) 배지를 이용하여 침지시켰다. MSC 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양하였다. 세포 배양물을 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 지지체를 웰 플레이트에 넣고, DMEM 배지 내 $5x10^4$ 세포를 지지체에 분주하였다. 1, 2, 4 및 7일 차에, MTT 방법(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)을 이용하여 살아있는 세포를 카운팅하였다. 각 지지체에 세포 배양 후, 100㎕ DMEM 내 1mg/mL의 MTT 반응시약 200㎕를 각 웰에 첨가한 다음, 플레이트를 4시간 더 배양하였다. 37℃에서 배양하는 동안 살아있는 세포에서 미토콘드리얼 숙시네이트 디하이드로게나제가 MTT를 가시적인 포르마잔 크리스탈로 전환시킨다. 각 웰에서 용액을 제거한 후, 포르마잔 생성물을 용해시키기 위해 디메틸술폭사이드(DMSO)를 첨가하고, 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여, 대조군 세포의 흡광도와 비교하였다.

[0063] 배양 1, 2, 4, 및 7일 후의 PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 상에서의 세포 성장 및 증식 특성을 대조군인 PCL 지지체를 이용하여 확인한 결과, 배양 1일차에 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에 부착된 세포 생존력은 어떠한 유의적 차이도 나타내지 않았다(도 6A). 그러나 세포 배양 2일 후, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa가 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col 및 PCL/Sa에 비해 보다 높은 세포 증식을 보이는 것을 확인하였다. 배양 4일 및 7일 후, PCL/IGDP/Col은 다른 지지체에 비해 가장 높은 세포 증식을 나타냈으며, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 둘 다에서 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, 및 PCL/Sa 지지체 보다 더 많은 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다. 이는 콜라겐 및/또는 알긴산나트륨과 다른 물질의 조합이 높은 세포 부착 및 증식 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 따라서, PCL에 IGDP, 콜라겐 및 알긴산나트륨의 추가는 세포 생존력을 증진시킬 수 있으며, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체는 세포 접착 및 증식을 위해 적절한 표면을 제공할 수 있다.

[0064] 또한, FDA 염색을 통해 지지체 상의 세포 부착 및 증식도를 확인하였다. PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 (길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)에서 4일 및 7일 동안 배양된 세포의 증식을 평가하기 위해 FDA (Sigma-Aldrich, USA) 형광시약을 사용하였다. FDA의 용액 1ml을 각 웰의 지지체에 직접 가한 다음, 각각의 지지체를 암실에서 5분 동안 염색하였다. 그 후, PBS로 헹군 다음 세포의 형태를 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 배양 4일 및 7일 후, 지지체의 구조물은 거의 동일하게 유지되고 있었으며, 각 지지체마다 상이한 세포 부착 및 증식 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 상기 MTT 어세이의 정량 결과를 뒷받침한다. 도 6B는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 4일 및 7일 동안 배양된 MSC 세포의 염색 현미경 사진을 보여준다. MSC 세포는 FDA에 의해 녹색형광을 나타냄을 확인할 수 있었다. PCL/IGDP/Col 지지체에 부착된 살아있는 세포는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에 비해 더 높은 세포 밀도를 가지고 있었으며, 따라서 IGDP 및 콜라겐의 추가가 MSC 세포를 보다 잘 증식시킨다는

것을 확인할 수 있었다.

[0066] **실시예 6. 세포의 알카라인 포스파타제 활성 및 칼슘 함량 분석**

[0067] ALP 활성은 골아세포 표현형 측정을 위해 생화학적 마커에 의해 골아세포 분화 및 미네랄화를 측정하는데 중요한 요소로 잘 알려져 있다(Han P, Cheng P et al. 2015; Mohammadi Y, Soleimani M et al. 2007; Pan L, Pei X et al. 2012). 따라서, 세포의 ALP 활성 분석을 통해 지지체가 MSC 세포의 분화를 증진시키는지를 조사하였다. 세포를 시딩하기 전, 지지체를 밤새 70% 에탄올에서 인큐베이션한 후, 30분 동안 UV로 처리한 다음, 37℃에서 2시간 동안 DMEM 배지(FBS 무첨가)에서 인큐베이션하였다. MSC 세포(5x 10^5 cells/well)를 12-웰 플레이트 내 동일한 크기(길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)를 갖는 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 배양한 후, PBS로 3회 헹구었다. 세포를 각각의 지지체에서 2 및 7일 동안 배양한 후, 용해 버퍼[25 mM (Na_2CO_3, $NaHCO_3$), 0.1 % 트리톤 100X 함유]를 이용하여 세포를 용해시켜, 25 mM (Na_2CO_3, $NaHCO_3$)(1.5 mM $MgCl_2$ 및 1 X p-니트로페닐 포스페이트 디소듐(pNPP) 함유)를 함유하는 ALP 어세이 혼합물과 37℃, 1시간 30분 동안 반응시킨 후, 1 N NaOH로 반응을 정지시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0068] 그 결과, 인큐베이션 7일 동안 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 배양된 세포의 ALP 활성은 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, 및 PCL/Sa 지지체 보다 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 상에서 배양된 세포의 ALP의 활성은 7일 후에 세포 부착 및 증식의 증가와 함께 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서, PCL/IGDP에 콜라겐 및 알긴산나트륨의 도입이 ALP 활성 수준을 유의하게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 또한, MSC 세포의 칼슘 함량을 석회화 어세이를 통해 조사하였다. 칼슘 함량은 골아세포 분화 및 미네랄화의 중요한 지표이다 (Karadeniz F, Ahn BN et al. 2015). PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 28일 동안 배양된 MSC 세포에 침착된 칼슘의 함량을 조사하였으며, 대조군으로 PCL 지지체와 비교하였다. 구체적으로, 지지체를 70% 에탄올로 밤새 인큐베이션한 후, UV로 30분 동안 처리한 다음, 37℃에서 2시간 동안 DMEM 배지 (FBS 무첨가)로 인큐베이션하였다. 12-웰 플레이트 내 동일한 크기 (길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)를 갖는 각 지지체 상에 배양된 MSC 세포 (1x10^5 cells/well)를 PBS로 3회 헹구었다. 그 후 세포를 5% 혈청이 함유된 ODM 배지에서 28일 동안 각 상이한 지지체에서 배양한 다음, 차가운 70% 에탄올로 고정하고, 알리자린 레드로 염색하여 석회화를 측정하였다. 정량 후, 알리자린 레드로 염색된 세포를 (n > 3) 에틸피리듐 클로라이드로 탈색하고, 염색물을 96-웰 플레이트로 이전한 다음 562nm에서 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 배양 28일 후, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 표면에서 배양된 MSC 세포가 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col 및 PCL/Sa 표면의 세포 배양에 비해보다 높은 칼슘 함량을 나타냈다 (도 7B). 또한, PCL/IGDP/Col 지지체는 가장 많은 양의 칼슘 침착(PCL 지지체 대조군 대비 430.40%)을 보여주었다 (도 7C). 이러한 ALP 및 칼슘 침착의 결과는 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체가 세포 생존력, 골아세포 분화 및 미네랄화를 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0072] **실시예 7. 지지체의 골형성을 위한 분화 효과 확인**

[0073] 골형성의 강화는 골형성 마커의 유전자 발현에 의해 뼈의 강도를 위한 중요한 절차인데, 이는 Runx2 전사 인자의 활성에 의해 조절되고, OPN, 및 OSC와 같은 골 매트릭스 단백질의 증가된 발현에 의해 동반되며, 그리고 나서 미네랄화를 자극하고 골 형성을 이끈다 (Beederman M, Lamplot JD et al. 2013; Do AV, Khorsand B et al. 2015; Jeong YT, Baek SH et al. 2016). RT-PCR에 의해 일반적으로 이용되는 골 마커의 상대적 mRNA 발현 수준을 측정하여 지지체의 골형성 분화 특성을 분석하였다. 한 그룹 당 5개의 샘플 (길이 13.5 × 넓이 13.5 mm 두께 2.3 mm)을 사용하였다. 지지체를 12-웰 플레이트에 넣고, 70 % 에탄올로 밤새 인큐베이션 한 후, 30분 동안 UV로 처리한 다음, 37℃에서 2시간 동안 DMEM 배지(FBS 무첨가)로 인큐베이션하였다. 5 × 10^5 cells/well의 MSC를 DMEM 배양 배지 내 지지체 상에서 5% CO_2, 37℃ 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 2일 차에, 각 웰의 배양 배지를 ODM 배지로 교체하였으며, 배양 배지는 2일 마다 교체하였다. 배양 4, 7 및 14 일 후, 제조사의 지

시에 따라 TRIzol® 시약을 이용하여 골아세포의 총 RNA를 분리한 다음, 분화된 세포의 특이적 mRNA 발현을 체크하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 전체 RNA 1㎍을 Maxime PreMix 키트에서 19㎕의 총 부피에 도달하도록 디에틸 파이로카보네이트(DEPC)-처리된 물과 혼합하고, 30분 동안 45℃에서 역전사 반응시킨 다음, RTase의 불활성화를 94℃에서 5 분 동안 실시하였다. 표적 cDNA는 하기 프라이머를 사용하여 증폭시켰다:

[0074] · ALP: 5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3'(정방향) / 5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3'(역방향);

[0075] · OSC: 5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3'(정방향) / 5'-GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC-3'(역방향);

[0076] · OPN: 5'-GACCACATGGACCGACGATG-3'(정방향) / 5'-TGGAACTTGCTTGACTATCGA-3'(역방향);

[0077] · Runx2: 5'-TGGCGTCAAACAGCCTCTTC-3'(정방향) / 5'-TGGTGCTCGGATCCCAAA-3' (역방향); 및

[0078] · GAPDH: 5'-GCCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'(정방향) / 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'(역방향).

[0079] 마지막으로, 각 유전자의 상대적 mRNA 발현 수준을 GAPDH로 평균화하고, PCR 생성물을 1.2 % 아가로스 겔에 전기영동하였다.

[0080] 도 8은 PCL 및 PCL/IGDP, PCL/Col, PCL/Sa, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체에서 배양된 MSC의 ALP, OSC, Runx2 및 OPN의 mRNA 발현 수준을 보여준다. 배양 7일차(ALP) 및 14일차(OPN 및 OSC)에 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 둘 다에서 PCL, PCL/IGDP, PCL/Col, 및 PCL/Sa에 비해 유의하게 더 높은 ALP, OSC, 및 OPN 발현이 발견되었다. 또한, PCL/IGDP/Col 및PCL/IGDP/Sa 지지체는 배양 7일 차에 PCL 단독 보다 유의하게 더 높은 Runx2 발현을 나타냈다. 이는 PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체가 골 분화에 더 친화적이라는 것을 나타낸다.

[0082] **실시예 8. 지지체의 토끼 내 골 재생 효과 확인**

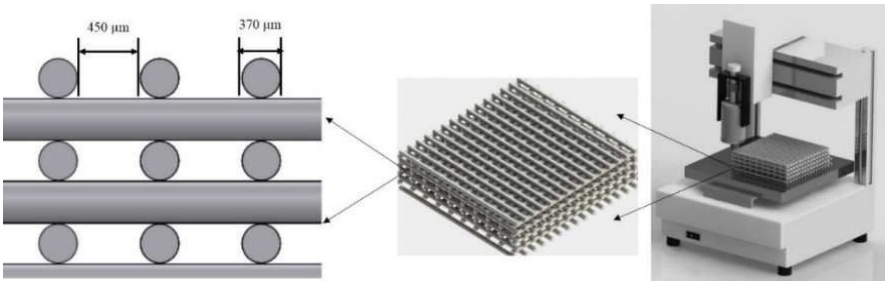
[0083] PCL, PCL/IGDP, PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체의 골유도능을 확인하기 위해 토끼의 경골에 각 지지체를 삽입하였다. 10주령 수컷 토끼를 골 재생 확인을 위해 실험에 사용하였으며, 이식 전 후 어떠한 염증 또는 면역 반응을 보이지 않았다. 동물을 실험 전 12 h 명/암 주기, 상대 습도 (40 - 70%) 및 온도 (20 - 24℃)-조절된 환경에 적응시켰다. 4개 그룹의 지지체(PCL, PCL/IGDP, PCL/IGDP/Col, 및 PCL/IGDP/Sa 지지체 (길이 6.0 mm × 넓이 2.0 mm 두께 2.0 mm))를 사용 전 멸균 처리하였다. 경골의 피부 털을 제거하고 그 부위를 수술을 위해 포비돈 및 70% 에탄올을 이용하여 무균 처리하였다. 케타민 (80 mg/kg) 및 자일라진(10 mg/kg)의 혼합물을 근육내 주사하여 마취를 유도하였다. 전체 외과 수술 과정 동안 일반적 마취 하에 동물을 유지시키고, 각 토끼 다리 경골 뼈 중앙에 직경 2.1 mm 골 손상을 만들었다. 총 4개의 샘플을 각 그룹의 결손 부위 안으로 삽입하였다. 지지체 삽입 후, 수술 부위를 봉합하고, 포비돈 요오드 용액을 처리하였다. 각 지지체가 삽입된 토끼 경골 결손부위의 골 형성을 확인하기 위해 X-레이 μ-CT 스캐닝 (NFR Polaris-G90, NanoFocusRay, Iksan, Korea)을 이용하여 평가하였다. 새 조직의 정도를 측정하기 위해 μ-CT 이미지를 이용하였으며, 새롭게 형성된 조직의 분포는 연조직(Min) 및 경조직(Max)에서 발견되는 것을 시사한다. 새로운 골 부피의 비율(RT)을 하기 식에 의해 계산하였다. 신규 형성 조직 면적 및 기존 조직 면적은 0.48 mm^2의 표면에 존재하며, 평균값은 연조직 및 경조직 영역 값에 해당하는 중간 계수이다.

[0084]
$$RT = \frac{\text{평균 신규형성 조직 면적}}{\text{평균 기존 조직 면적}}$$

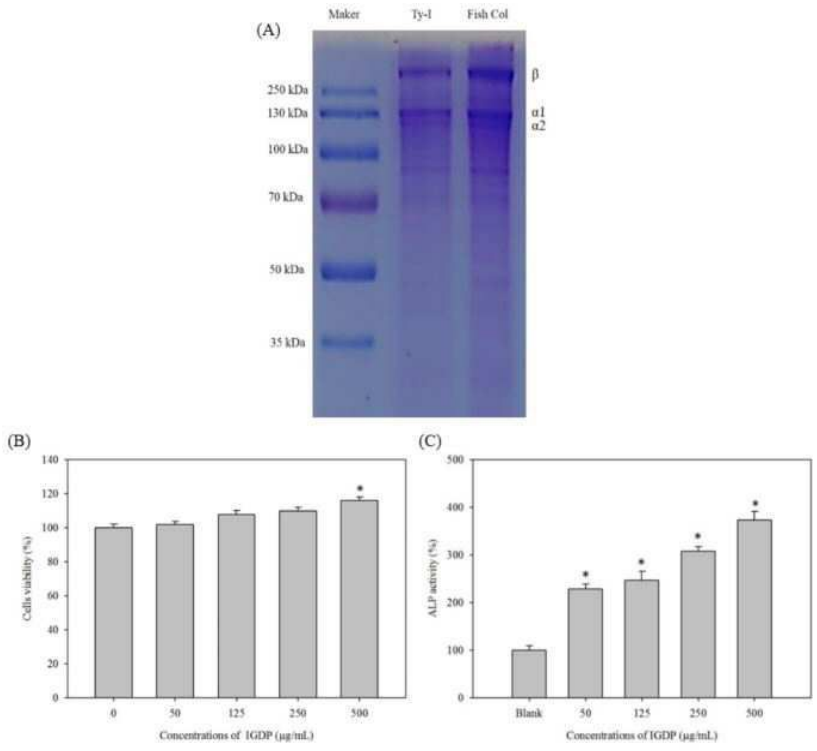
[0085] 대조군(PCL 지지체), PCL/IGDP, 및 PCL/IGDP/Sa에서 이식 2주 및 6주 후 중앙에 새로운 연조직 및 경조직을 명백하게 관찰할 수 있었다. PCL/IGDP/Col 및 PCL/IGDP/Sa 지지체로 이식된 결손 부위는 다른 이식물 보다 더 큰 새 조직을 형성하는 것을 보여주었고, PCL/IGDP/Col 지지체의 경조직은 전체 결손에서 가장 크게 발생하였다. PCL/IGDP/Col 지지체의 이식 6주 후 새로운 골 비율(1.0 (*p < 0.05)에서 새로운 골의 최대값 당 0.606)은 PCL(1.0 (*p < 0.05)에서 새로운 골의 최대값 당 0.244), PCL/IGDP(1.0 (*p < 0.05)에서 새로운 골의 최대값 당 0.426), 및 PCL/IGDP/Sa(1.0 (*p < 0.05)에서 새로운 골의 최대값 당 0.441) 지지체보다 더 잘 유도되었다.

도면

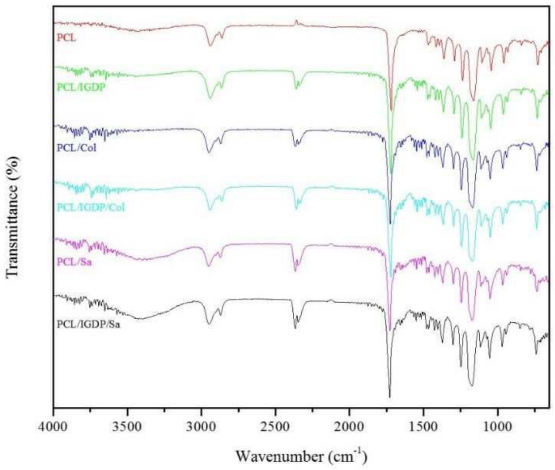
도면1


450 μm
370 μm

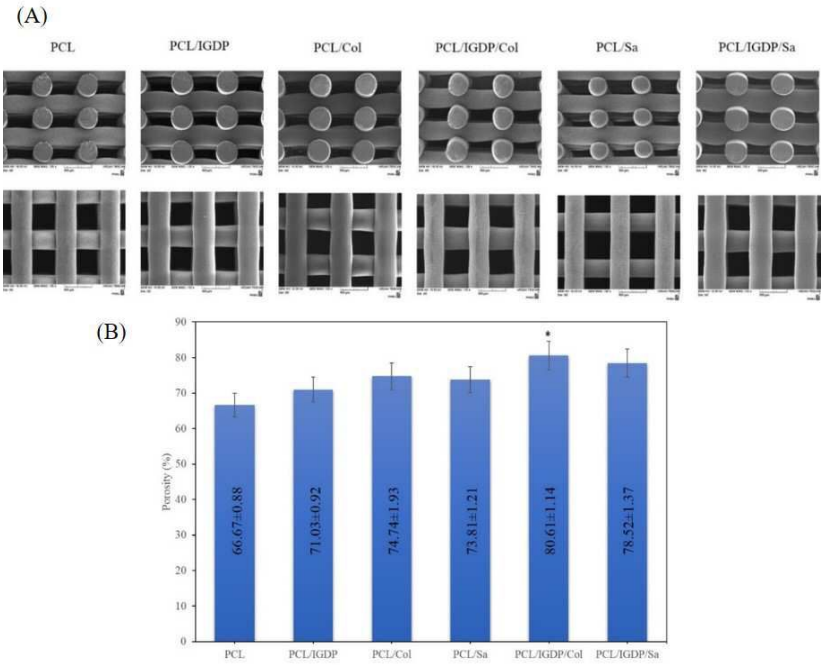
도면2


(A)
Maker
Ty-I
Fish Col
250 kDa
130 kDa
100 kDa
70 kDa
50 kDa
35 kDa
β
α1
α2
(B)
Cells viability (%)
Concentrations of IGDP (μg/mL)
(C)
ALP activity (%)
Blank
Concentrations of IGDP (μg/mL)

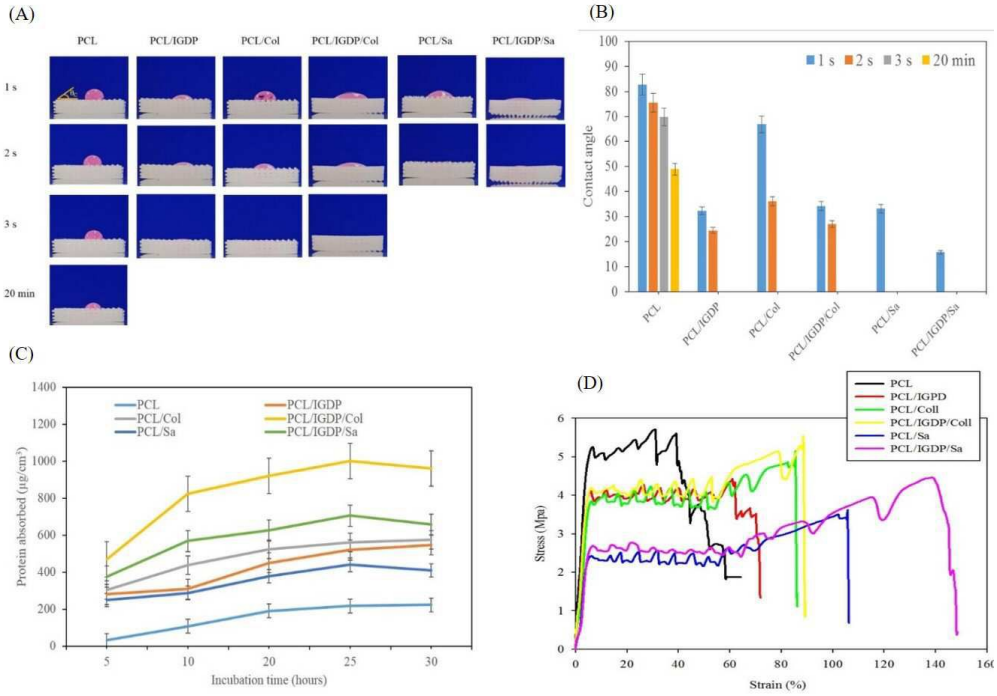
도면3


PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/IGDP/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Sa
Transmittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavenumber (cm-1)

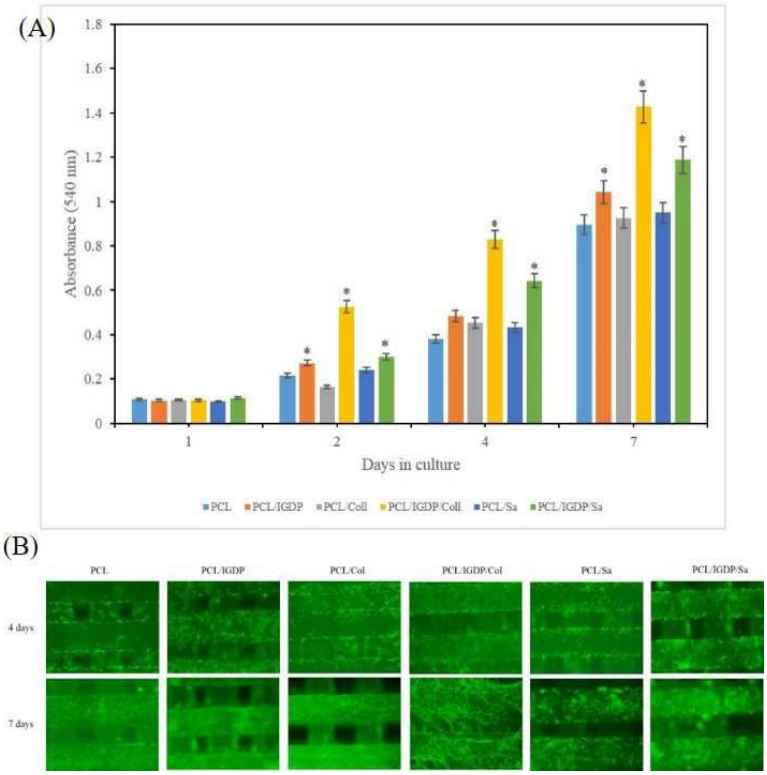
도면4


(A)
PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/IGDP/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Sa
(B)
Porosity (%)
66.67±0.88
71.03±0.92
74.74±1.93
73.81±1.21
80.61±1.14
78.52±1.37
PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Col
PCL/IGDP/Sa

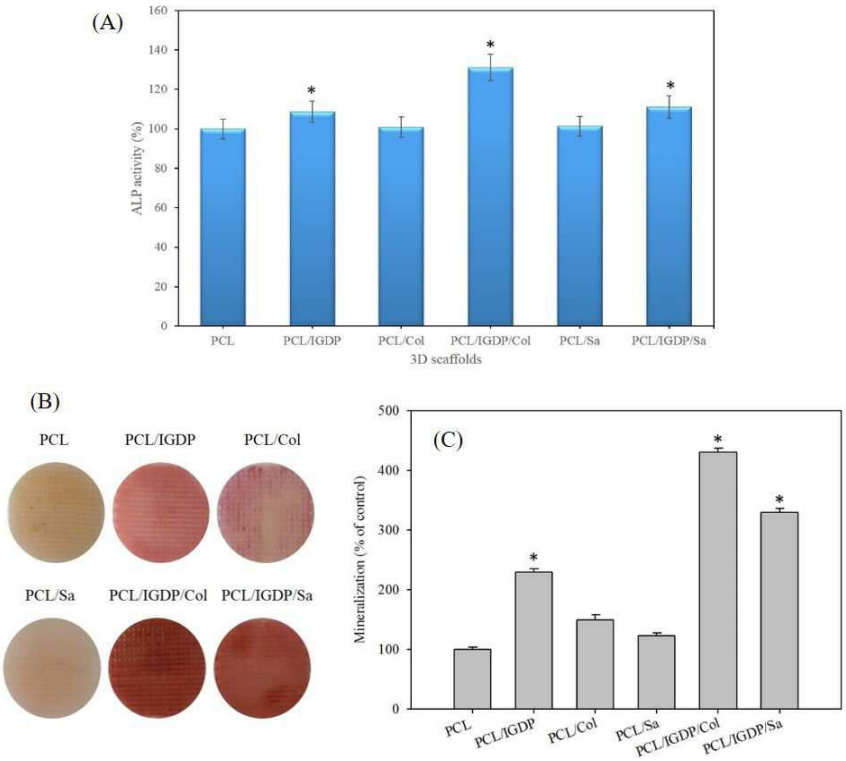
도면5


(A)
PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/IGDP/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Sa
1 s
2 s
3 s
20 min
(B)
1 s
2 s
3 s
20 min
Contact angle
(C)
Protein absorbed (μg/cm²)
Incubation time (hours)
(D)
Stress (Mpa)
Strain (%)

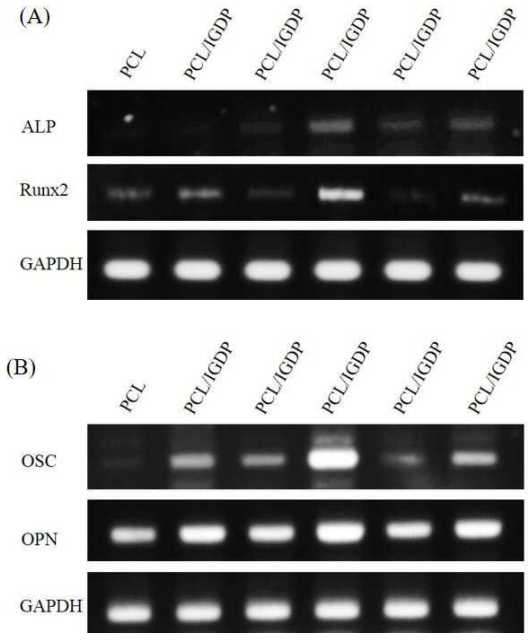
도면6


(A)
Absorbance (540 nm)
Days in culture
PCL
PCL/IGDP
PCL/Coll
PCL/IGDP/Coll
PCL/Sa
PCL/IGDP/Sa
(B)
4 days
7 days

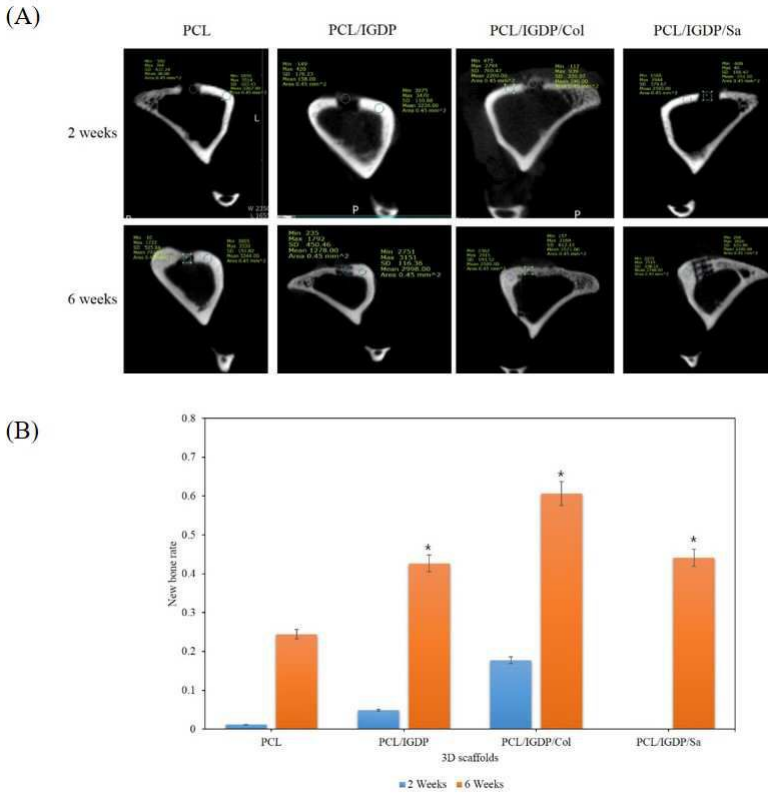
도면7


(A)
ALP activity (%)
PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/IGDP/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Sa
3D scaffolds
(B)
PCL
PCL/IGDP
PCL/Col
PCL/Sa
PCL/IGDP/Col
PCL/IGDP/Sa
(C)
Mineralization (% of control)

도면8


(A)
PCL
PCL/IGDP
ALP
Runx2
GAPDH
(B)
OSC
OPN
GAPDH

도면9


(A)
PCL
PCL/IGDP
PCL/IGDP/Col
PCL/IGDP/Sa
2 weeks
6 weeks
(B)
New bone rate
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
PCL
PCL/IGDP
PCL/IGDP/Col
PCL/IGDP/Sa
3D scaffolds
2 Weeks
6 Weeks