

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 10월 13일 (13.10.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/163612 A1

- (51) 국제특허분류:
A61L 27/46 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/011408
- (22) 국제출원일: 2015년 10월 28일 (28.10.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0050930 2015년 4월 10일 (10.04.2015) KR
- (71) 출원인: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
(DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS IN-
DUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDA-
TION) [KR/KR]; 31116 충청북도 천안시 동남구 단대
로 119, Chungcheongbuk-do (KR). 포항공과대학교 산
학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY
FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남
구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR). 주식회사 티앤
알 바이오랩 (T&R BIOFAB CO., LTD.) [KR/KR];
15073 경기도 시흥시 산기대학로 237, Gyeonggi-do
(KR).
- (72) 발명자: 양희석 (YANG, Hee Seok); 31161 충청남도 천
안시 서북구 봉서산 1길 35, 116동 1203호, Chun-

gcheongnam-do (KR). 조동우 (CHO, Dong Woo); 05065
서울시 광진구 아차산로 262, B동 1404호, Seoul (KR).
장진아 (JANG, Jin Ah); 37673 경상북도 포항시 남구
청암로 77, 제5공학관 427호 IMS 연구실, Gyeong-
sangbuk-do (KR). 김병수 (KIM, Byoung Soo); 37656 경
상북도 포항시 남구 연일읍 유강길 9번길 16, 206호,
Gyeongsangbuk-do (KR). 이민석 (LEE, Min Suk); 06344
서울시 강남구 개포로 110길 46, 30동 203호, Seoul
(KR). 나완근 (LA, Wan Geun); 31105 충청남도 천안시
서북구 두정상가 6길 6, 302호, Chungcheongnam-do
(KR).

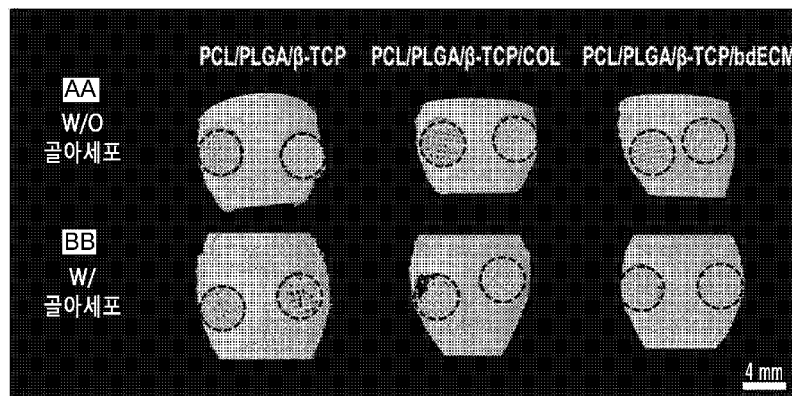
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천
로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul
(KR).

(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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BONE REGENERATING SCAFFOLD COATED WITH EXTRACELLULAR MATRIX

(54) 발명의 명칭: 세포 외 기질이 코팅된 골 재생용 지지체



AA ... W/O osteoblasts

BB ... W/ osteoblasts

(57) Abstract: The present invention relates to a bone regenerating scaffold comprising: a first layer comprising polycaprolactone (PCL), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and β -tricalcium phosphate (TCP); and a second layer comprising a demineralised and decellularised bone extracellular matrix (bdECM), wherein the second layer surrounds the first layer; and to a production method for same. The bone regenerating scaffold coated with extracellular matrix of the present invention allows scaffold production in a shape that accurately matches an affected area where bone damage has been incurred by means of a 3D printer, and, as compared with existing scaffolds, can be expected to have the advantage of relatively rapid bone regeneration through more rapid fusing to the affected area and better attachment, growth and bone differentiation of surrounding bone tissue cells. Also, because there is no need for steps such as cell transplantation, bone-damaged patients can be expected to recover relatively rapidly by implanting the scaffold within a short time.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/163612 A1



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, ST, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 포함하는 제 1 층; 및 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 제 2 층을 포함하며, 상기 제 2 층은 상기 제 1 층을 둘러싸는, 골 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포 외 기질이 코팅된 골 재생용 지지체는 3D 프린터를 통하여 골 손상이 일어난 환부와 정확히 일치하는 모양의 지지체 제작이 가능하며, 기존 지지체 보다 빠르게 환부와 결합하고 주변 골 조직 세포의 부착, 증식 및 골 분화가 향상되어 보다 빠른 골 재생 효과를 기대할 수 있다. 또한 세포 이식 등의 단계가 필요치 않으므로 골 손상 환자에게 빠른 시간 내에 지지체를 이식함으로써 보다 빠른 회복을 기대할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세포 외 기질이 코팅된 골 재생용 지지체

기술분야

- [1] 본 발명은 PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 포함하는 제1층; 및 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 제2층을 포함하며, 상기 제2층은 상기 제1층을 둘러싸는, 골 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 골 조직은 인체의 골격을 유지시키는 중요 조직으로 골 조직 재생을 위해서 다양한 재료와 형태의 골 조직 대체용, 재생용 골 이식재가 연구 개발되고 있다. 골 이식재의 경우 골 치유기전에 따라 골 형성 재료, 골 전도성 재료, 골 유도성 재료로 분류할 수 있으며, 골 이식(transplantation)이나 매식(implantation)에 사용되는 이식재에 따라 자가이식, 동종이식, 타종이식 등의 방법을 주로 사용하고 있다.
- [4] 이 중 면역반응을 최소화할 수 있는 방법은 자가이식으로서, 자가골을 이용하여 골 손상부위에 이식을 할 경우 면역반응이 최소화되어 안정적인 골 조직 재생이 가능한 장점이 있다. 그러나, 자가골의 채취로 인한 다른 부위의 2차 골 손실과 긴 회복기간 등의 불편을 가지고 있으며 채취할 수 있는 자가골의 양이 매우 한정되어 있다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 다른 사람의 골을 사용하는 타종이식이 있으나, 이는 자가골과 달리 많은 면역반응을 일으키고, 가격도 매우 비싸다는 단점이 있다. 따라서, 면역반응을 최소화하면서 많은 사람들에게 이용되기 위해 합성골을 제조하여 이식하고자 하는 골 조직 공학 연구가 많이 진행되고 있다.
- [5] 골 조직 공학에 적용하기 위한 지지체는 숙주 조직에 최적화된 조직 형성을 위해 핵심적인 몇 가지 조건을 만족해야 한다. 이 조건은 세포 친화력, 영양분과 산소가 투과하기 위한 적절한 공극률, 세포 부착 및 분화를 촉진시키기 위한 계면 활성 등을 포함한다. 또한, 이상적으로 지지체는 연속적으로 분해되어 숙주 세포에 의해 대체되어야 한다. PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)) 및 이의 공중합체와 같은 합성 분해성 플라스틱은 자연발생 물질에 비하여 정확한 가공이 가능하고, 보다 경제적이어서 임상적으로 널리 사용할 수 있다는 장점이 있다.
- [6] 특히, 3D 프린팅 기술이 개발됨에 따라 환자의 환부와 정확히 일치하는 임플란트를 제작할 수 있게 되었다. 또한, 이러한 3D 프린팅 기술은 반복 가능한 재현성을 가진다. 다만, 현재까지 알려진 임플란트 제작에 사용되는 생분해성

고분자는 주변 골 조직 유래 세포와의 융합이 잘 이루어지지 않고, 세포 부착성이 낮으며 줄기세포의 골 분화를 잘 유도하지 못하는 단점이 있다. 이는 고분자의 표면 특성에서 기인하는 것으로, 이로 인하여 환부 주변의 골 조직과의 융합이 바로 일어나지 않을 경우 생분해성 고분자는 분해되어 원래 의도했던 형태의 골 재생이 일어나지 않을 수 있다.

- [7] 한편, 본 발명자들은 종래 β -TCP와 PCL/PLGA 지지체를 혼합(PCL/PLGA/ β -TCP)하여 래빗 두개골 손상 모델에 적용한 결과 상기 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체가 골 재생에 다소 효과가 있음을 확인하였으나, 상기 지지체는 세포 부착률이 떨어지고 신생 골 형성 및 골 밀도에 있어서 만족할만한 효과를 얻지는 못하였다(Tissue Eng. Part A 2012, 19, 317).

[8]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 골 재생 효과가 우수한 지지체를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, PCL, PLGA 및 β -TCP를 포함하는 다공성 지지체(PCL/PLGA/ β -TCP)를 제조하는 한편, 실제 골조직에서 유래한 ECM을 추출하여 탈미네랄화된 골 기질(DBM)을 제조하고, 이식시 면역반응을 억제하기 위해 탈세포화 과정을 거친 뒤(bdECM, demineralized and decellularized bone extracellular matrix) 이를 상기 제조한 지지체에 코팅하였으며, 이에 따라 상기 bdECM이 코팅된 지지체가 골 세포의 부착 및 분화를 향상시켜 골 재생을 촉진하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 하나의 목적은 PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 포함하는 제1층; 및 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 제2층을 포함하며, 상기 제2층은 상기 제1층을 둘러싸는, 골 재생용 지지체를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 하나의 목적은 (a) PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)을 혼합하여 지지체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 지지체를 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)으로 코팅하는 단계를 포함하는 골 재생용 지지체 제조방법을 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

- [14] 본 발명의 세포 외 기질이 코팅된 골 재생용 지지체는 3D 프린터를 통하여 골 손상이 일어난 환부와 정확히 일치하는 모양의 지지체 제작이 가능하며, 기존

지지체보다 빠르게 환부와 결합하고 주변 골 조직 세포의 부착, 증식 및 골 분화가 향상되어 보다 빠른 골 재생 효과를 기대할 수 있다. 또한 세포 이식 등의 단계가 필요치 않으므로 골 손상 환자에게 빠른 시간 내에 지지체를 이식함으로써 보다 빠른 회복을 기대할 수 있다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 bdECM을 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

[17] 도 2는 전체적인 실험 과정을 개략적으로 도시한 것이다.

[18] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 3D 프린팅 기술로 제조한 지지체의 SEM 사진이다. (a) PCL/PLGA/ β -TCP 지지체, 및 (b) 콜라겐 또는 (c) bdECM을 코팅한 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체.

[19] 도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 지지체 위에서 골아세포의 부착, 형태 및 증식을 확인한 것이다. (a) 각 지지체에 부착된 세포의 배양 1일 또는 14일째의 SEM 사진, 및 (b) 각 지지체에서 세포의 생존 및 증식 경향.

[20] 도 5a 및 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 지지체에서 골아세포의 ALP 활성을 나타낸 것이다. (a) 배양 14일째에 지지체에서 골아세포의 ALP 발현 및 (b) ALP 활성의 정량분석.

[21] 도 6a 내지 6c는 본 발명의 일 실시예에 따라 지지체에서 골아세포의 골 미네랄화를 나타낸 것이다. (a) 21일째에 지지체에서 칼슘 축적 마커인 Alizarin Red S 염색, (b) 21일째에 축적된 Alizarin Red S 용액의 정량분석, 및 (c) 7, 14 및 21일째에 칼슘 함량. 도 6d는 골 분화 mRNA 발현(우측: OC, 좌측: COL1A1)을 qRT-PCR로 정량화한 것이다.

[22] 도 7a 및 7b는 본 발명의 일 실시예에 따라 지지체에서 생체 내 골 재생을 나타낸 것이다. 마우스 두개골 손상 모델에 각 지지체와 골아세포를 함께 또는 골아세포 없이 각 지지체를 단독으로 처리한 것이다. (a) micro-CT로 골 재생 평가. 마우스 두개골의 대표적 micro-CT 사진이다. 손상 부위를 PCL/PLGA/ β -TCP, PCL/PLGA/ β -TCP/Col, 또는 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM으로 처리하였다. 상단의 사진은 골아세포 없이 지지체만 처리한 것이며, 하단의 사진은 지지체와 함께 골아세포를 처리한 것이다. 스케일바 = 4 mm. (b) 신생 골로 채워진 손상 부위 부피를 micro-CT 분석 프로그램으로 측정하였다(n = 10, 그룹 당 손상 수). PCL/PLGA/TCP 그룹과 비교하여 *p<0.05, PCL/PLGA/TCP/Col 그룹과 비교하여 #p<0.05이다.

[23] 도 8a는 마우스 두개골 손상 부위에 Goldner's trichrome 염색한 것을 조직학적으로 분석하여 골 재생을 평가한 것이다. 화살표는 손상 부위 경계를 나타낸다. 스케일바 = 2 mm. 모든 사진은 40x 배율이다. 도 8b 및 8c는 조직형태계측학적 분석으로 신생 골 면적 및 골 밀도를 확인한 것이다(n = 10, 손상 수). PCL/PLGA/ β -TCP 그룹과 비교하여 *p<0.05, PCL/PLGA/ β -TCP/Col

그룹과 비교하여 # $p < 0.05$ 이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25]

본 발명은 하나의 양태로서 PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 포함하는 제1층; 및 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 제2층을 포함하며, 상기 제2층은 상기 제1층을 둘러싸는, 골 재생용 지지체를 제공한다.

[26]

본 발명은 다른 하나의 양태로서, (a) PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)을 혼합하여 지지체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 지지체를 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)으로 코팅하는 단계를 포함하는 골 재생용 지지체 제조방법을 제공한다.

[27]

[28]

본 발명에서 사용되는 용어, "지지체(scaffold)"는, 생체 내에서 손상된 장기나 조직의 일부를 대체하며 이들의 기능을 보완 또는 대신할 수 있는 물질을 의미할 수 있다. 특히 상기 고분자 지지체는 생분해성 고분자 소재를 포함할 수 있으며, 이로 인해 지지체가 기능과 역할을 충분히 수행할 때까지 유지된 후 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있다. 본 발명에서는 상기 지지체의 고분자 소재로 PCL(polycaprolactone) 및 PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid))와 함께 바이오 세라믹 중 가장 광범위한 골 재구성 능력을 보이며 대상체 골 조직과 단단한 결합을 형성하여 골 생성이 일어나도록 하는 것으로 알려져 있는 β -TCP(tricalcium phosphate)를 혼합하여 사용하였다.

[29]

본 발명의 골 재생용 지지체의 구체적인 제조방법은 다음과 같다.

[30]

[31]

먼저 (a) 단계는 PCL, PLGA 및 β -TCP를 혼합하여 지지체(PCL/PLGA/ β -TCP)를 제조하는 단계로서, 상기 혼합 및 제조과정은 이에 제한되는 것은 아니나, 특히 3D 프린팅 기술을 이용하여 수행된 것일 수 있다.

[32]

본 발명에서 사용되는 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.

[33]

특히 상기 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체는 이에 제한되는 것은 아니나 PCL : PLGA : β -TCP를 1.5 내지 2.5 : 1.5 내지 2.5 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 포함하는 것일 수 있다.

[34]

본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 PCL, PLGA 및 β -TCP를 2 : 2 : 1의 중량비로 혼합하고 3D 프린터의 주사기로 옮겨 정밀 노즐을 통해 분사함으로써

PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 제조하였다(도 3a).

[35]

[36] 다음으로 (b) 단계는 상기 제조된 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 bdECM으로 코팅하는 단계이다. 상기 (b) 단계는 이에 제한되는 것은 아니나, 구체적으로 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 bdECM에 담그고 원심분리하는 제1단계; 상기 지지체를 bdECM에 잠기도록 유지시키는 제2단계; 및 상기 지지체를 건조시키는 제3단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 제2단계는 상기 지지체를 bdECM에 5 내지 30분 동안 잠기도록 유지시키는 것일 수 있다.

[37]

본 발명에서 용어, "bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)"은 개체에 이식시 면역반응을 감소시키기 위하여 DBM(demineralized bone matrix)을 탈세포화시킨 것으로, 탈세포화 과정은 트립신-EDTA를 이용하여 수행된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[38]

상기 DBM은 탈미네랄화 된 골 기질을 의미하는 것으로, 성장인자, 콜라겐 및 NCP(non-collagenous protein)를 포함하는 미세 환경을 재현하기 위해 개발된 것이다. 반투명하고 유연한 고무형태의 물질로서 골 성장을 촉진하는 골 형성 단백질(BMP, bone morphogenetic protein)이 내재되어 있다. 상기 단백질은 염산, 구연산 등 산에 의해서도 그 본연의 구조가 변형되지 않기 때문에 탈미네랄화 처리 후 남겨진 DBM은 BMP를 포함하여 효과적으로 골 재생을 촉진할 수 있다.

[39]

본 발명에서 용어, "탈미네랄화(demineralization)"는 칼슘 등의 무기질을 포함하는 생체 조직에서 킬레이트제 등을 사용하여 무기질을 추출하는 것을 의미하며, 뼈 조직으로부터 DBM을 분리해낸 후 남아있는 용액에는 인체뼈를 구성하고 있는 인산칼슘 등의 무기질 성분이 다량 포함되어 있다. 뼈 조직을 탈미네랄화하기 위해서 여러 가지 방법이 사용될 수 있는데, 염산, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 포름산(formic acid), 시트르산(citric acid), 아세트산(acetic acid), 질산(nitric acid), 아질산(nitrous acid) 등 다양한 산성 용액을 사용함으로써 가능하며, 특히 골 조각을 염산에서 교반하여 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[40]

상기 코팅은 (a) 단계에서 제조된 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 상기 제조된 bdECM에 담근 뒤 건조시키는 과정으로, 이러한 과정을 통해 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 포함하는 제1층을 bdECM을 포함하는 제2층이 둘러싸게 된다. 구체적으로 상기 지지체를 bdECM에 담그고 원심분리하여 공극 사이의 재료를 가라앉히는 과정을 거친 후 인큐베이션하고 건조시키는 과정을 포함할 수 있다.

[41]

특히, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 원심분리하여 공극 사이의 재료를 가라앉히는 과정은 1 내지 10°C에서 1000 내지 2000 rpm으로 30초 내지 5분간 원심분리하는 것일 수 있고, 이러한 과정은 1회 내지 5회 반복하여 수행될 수 있다. 또한, 상기 인큐베이션은 특히 30 내지 40°C에서 5분 내지 30분 인큐베이션하는 것일 수 있고, 상기 건조는 5분 내지 30분간 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 단계 (b)는 1회 내지 5회 반복하여 수행될 수

있다.

[42] 또한, 상기 단계 (b)의 bdECM을 포함하는 용액은 bdECM이 증류수에 5 내지 20 mg/ml로 용해된 것일 수 있다.

[43] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 bdECM을 증류수에 10 mg/ml로 용해시켜 코팅 용액을 제조하고, 3D 프린팅을 이용하여 제조한 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 상기 제조한 코팅 용액에 20 분간 담근 뒤 건조시켜, bdECM으로 코팅된 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체(PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM)를 제조하였다.

[44]

[45] 본 발명에서 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, 특히 상기 골 재생은 골 분화를 촉진하는 것에 의한 것일 수 있다.

[46] 본 발명에서 용어, "골 재생용 지지체"는 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 막의 구조 또는 띠의 구조 등으로 미리 형상화시킨 것일 수도 있다.

[47] 이를 위해서는 상기의 골 재생용 지지체의 성형성을 증가시키기 위한 다양한 재료가 더 첨가될 수 있다. 즉, 생체적합성이 뛰어난 선형의 소재, 튜브형의 소재, 입자형의 소재 및 부정형의 소재 등이 더 첨가되어 상기 골 재생용 지지체의 물리적 특성을 향상시킬 수 있다. 이러한 형태의 소재들은 콜라겐, 카르복시메틸셀룰로오스(CMC, carboxymethylcellulose) 또는 동물 유래 젤라틴 등의 소재로부터 선택될 수 있으며, 이식 대상에 면역반응을 유발하지 않는다면 특별한 제한은 없다.

[48]

[49] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 상기 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체를 SEM(scanning electron microscope)으로 관찰하여 기공 및 상호연결이 존재하도록 제조된 것을 확인하였으며(도 3), 코팅을 하지 않거나 콜라겐 코팅을 한 지지체에 비하여 세포 부착률이 우수함을 확인하였다(도 4).

[50] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는, 상기 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체에 골아세포를 접종하고 골 분화 배지에서 배양하였을 때, ALP 발현, 칼슘 축적, 및 OCN 및 COL1A1과 같은 골 분화 관련 mRNA의 발현이 증가된 것을 확인하여 골 분화 유도 기능이 우수함을 확인하였다(도 5 및 도 6).

[51] 나아가, 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는, 상기 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체를 골아세포와 함께 또는 지지체 단독으로 골 손상 마우스 모델에 이식하였을 때, 신생 골 부피 및 골 밀도가 증가하여 손상

부위가 회복되는 것을 확인함으로써(도 7 및 도 8), 본 발명의 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체가 골 재생용 조성물로서 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 이러한 효과는 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체 또는 PCL/PLGA/ β -TCP/Col 지지체에 비하여 현저히 우수한 것이다.

[52]

[53] 결론적으로 본 발명의 PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체는 DBM을 탈세포화시켜 제조한 bdECM으로 코팅한 것이며 골아세포와 함께 이식하지 않아도 골 재생 효과를 가지는바 이식시 면역반응과 같은 부작용의 우려가 없고, 골 세포 부착이 향상되고 골 분화를 촉진시킬 수 있어, 골 재생용 지지체로 우수한 효과가 있다.

[54]

발명의 실시를 위한 형태

[55] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[56]

[57] 실시예 1 : bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)의 제조

[58]

[59] 골 재생 효과가 우수한 지지체를 제조하기 위하여 지지체를 코팅하기 위한 용도로 사용될 bdECM을 제조하였다. 그 구체적인 제조과정은 하기와 같으며, 전체적인 과정은 도 1에 나타내었다.

[60]

[61] (1) 골 가공

[62] 12 내지 24 개월 된 송아지에서 경골(tibiae)을 분리하였다. 상기 골을 조각으로 나누고 해면질(cancellous)과 피질(cortical) 그룹으로 나눈 뒤, 상기 해면질 그룹을 사용하였다. 0.1%(w/v) 젠타마이신(Gentamicin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 PBS(phosphate-buffered saline)로 상기 해면질 조각의 잔 조직을 제거하고 세척하였다. 그 다음 상기 조각을 액체 질소에 얼리고 4 x 4 x 4 mm 이하의 절편으로 잘랐다. 상기 절편을 증류수로 세척하고, 액체 질소에 담그고 커피 밀(coffee mill, Kordia Co., Daegu, Gyeongbuk, Korea)에 두고 뺐었다.

[63]

[64] (2) 탈미네랄화 및 탈세포화

[65] 상온에서 24시간 동안 0.5 N HCl(25 ml/골 g)에서 골을 교반(300 rpm)하여 탈미네랄화 시켰다. 탈미네랄화 후, 결과물(이하 'bDBM'이라 함)을 진공상태로 필터하고 증류수로 행구었다. 그 다음 탈미네랄화된 분말에서 지질을 클로로포름(chloroform, Fisher Scientific, Loughborough, UK) 및 메탄올(Fisher

Scientific) 1 : 1 혼합용액에서 1시간 동안 추출하고 먼저 메탄올로, 그 다음에 증류수로 행구었다. 상기 bDBM을 순간 동결(snap frozen)시키고, 밤새 감압하에 동결 건조한 뒤 -20 °C에서 보관하였다.

- [66] 그 다음 상기 bDBM을 증류수로 행구고, 0.05 % 트립신(Sigma-Aldrich) 및 0.02 % EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma-Aldrich) 혼합 용액에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 계속적으로 교반하면서 탈세포화 시켰다. 잔여 세포 물질을 제거하기 위해 상기 결과물(이하 'bdECM'이라 함)을 1 % (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 PBS로 4°C에서 24시간 동안 계속적으로 교반하여 행구었다. 그 다음 순간 동결시키고, 밤새 감압하에 동결건조한 뒤 -20°C에서 보관하였다.

[67]

[68] 실시예 2 : bdECM으로 코팅된 지지체의 제조 및 특성 분석

[69]

- [70] 3D 프린팅 기술을 이용하여 PCL, PLGA, 및 β -TCP를 포함하는 지지체(PCL/PLGA/ β -TCP)를 제조하고, 이를 상기 제조한 bdECM으로 코팅하여 골 재생용 지지체(PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM)를 완성하였다. 완성된 지지체의 골 재생 효과를 확인하여 위하여 상기 지지체 단독(PCL/PLGA/ β -TCP) 또는 상기 지지체를 콜라겐(PCL/PLGA/ β -TCP/Col) 또는 bdECM(PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM)으로 코팅한 지지체의 생체 내 및 생체 외 골 재생 효과를 확인하였다(도 2). 구체적인 제조 과정은 하기와 같다.

[71]

[72] (1) 3D 프린팅 기술을 이용한 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체의 제조

- [73] PCL(MW 43,000-50,000; Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) 0.4 g 및 PLGA(MW 50,000-75,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.4 g을 130°C에서 10분간 유리 콘테이너에 두었다. 상기 과정으로 녹은 중합체들을 최종 농도 20 중량%가 되도록 β -TCP(Sigma-Aldrich) 분말 0.2 g과 혼합하였다. 상기 혼합물을 MHDS의 10 ml 주사기로 옮기고 650 kPa, 140 °C에서 정밀 노즐(precision nozzle)을 통해 분사하였다. 프린트된 스케폴드를 70% 에탄올에서 30분간 살균하고 코팅 단계에 앞서 밤새 UV에 노출시켰다.

[74]

[75] (2) PCL/PLGA/ β -TCP 지지체에 코팅

- [76] 코팅 용액은 bdECM을 증류수에 10 mg/ml로 용해시켜 제조하였고, 대조군으로 아텔로콜라겐 용액(Koken, Shizuoka, Japan)을 10 mg/ml 농도로 제조하였다. 상기 제조된 코팅 용액으로 PCL/PLGA/TCP 지지체를 코팅하였다. 지지체의 기공 부분에 공극을 채우기 위해, 상기 지지체를 bdECM 용액에 침지하여 4 °C에서 1분간 1,500 rpm으로 원심분리하는 과정을 두 차례 실시하여 기공의 공극을 채웠다. 기공이 채워진 상기 지지체를 37°C에서 20분간 인큐베이션 한 뒤 멸균 조건에서 20분 동안 건조시켰다. 이러한 과정을 3회 반복하였다.

[77]

[78] (3) 제조된 지지체의 특성 분석

[79] 상기 제조된 지지체의 특성을 분석하기 위해 SEM(scanning electron microscope, JSM-5300, JEOL, Tokyo, Japan)으로 10 kV에서 지지체의 형태를 관찰하였다.

상기 지지체를 sputter-coater로 120초 동안 백금으로 코팅하고, PCL/PLGA/ β -TCP 지지체의 표면 형태를 PCL/PLGA 지지체와 비교하였다. 코팅을 하지 않은 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 모든 실험에서 대조군으로 사용하였다. 지지체에 bdECM 또는 콜라겐 코팅 정도를 질소(N), 산소(O), 및 탄소(C)에 대한 XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)의 스펙트럼으로 확인하였다(ESCALAB 220iXL; VG Scientific, East Grinstead, West Sussex, UK).

[80] SEM으로 지지체를 관찰한 결과, 상기 지지체는 직경 4 mm, 높이 1 mm이고, 줄 두께는 약 200 μ m, 기공 크기는 약 300 μ m이었다. PCL/PLGA/ β -TCP 지지체는 β -TCP 분말을 포함하기 때문에 거친 표면을 가지며(도 3a), 콜라겐 또는 bdECM이 코팅된 지지체는 기공을 막지 않고 매끈한 표면을 가지는 것을 확인하였다(도 3b 및 3c). 상기 지지체의 매끈한 표면은 콜라겐 및 bdECM이 성공적으로 코팅되었다는 것을 의미한다. 또한 상기 지지체들은 모두 상호 연결을 잘 유지하였는데, 이러한 상호 연결은 골수로부터 숙주 세포의 이동 및 주변의 골아세포가 이동할 수 있도록 하므로 골 재생에 있어 매우 중요하다.

[81] 한편, 지지체에 콜라겐 또는 bdECM이 코팅된 정도는 XPS 분석을 통해 정량화하고, 하기 표 1로 나타내었다.

[82]

[83] [표1]

원소	PCL/PLGA/ β -TCP	PCL/PLGA/ β -TCP/C ol	PCL/PLGA/ β -TCP/bd ECM
C	74.7%	63.6%	64.7%
N	0%	11.8%	10.6%
O	25.3%	24.6%	24.7%

[84]

[85] 실시예 3 : 지지체에 따른 세포 증식 효과 확인

[86]

[87] (1) 세포 배양

[88] 생체 외 세포 행동을 분석하기 위해, 분리된 초대 골아세포를 각 지지체에 1×10^4 세포 수로 접종하였다. 두개관(calvarial) 골아세포를 Sprague-Dawley 래트 태아(SLC, Tokyo, Japan)의 두개관으로부터 분리하였다. 세포 부착을 위해 하루 동안 세포를 접종한 지지체를 성장 배지에 담가 배양하였고, 그 다음 골아세포의 골 생성 기능을 유도하기 위해 배양 배지를 50 mM ascorbic

acid-2-phosphate(Sigma-Aldrich), 10 mM β -glycerophosphate(Sigma-Aldrich), 및 100 nM dexamethasone(Sigma-Aldrich)을 함유하는 complete α MEM으로 교체하였다. 상기 배지는 매일 교체하였다.

[89]

[90] (2) 골아세포 형태 관찰

[91]

[92] SEM 분석을 통해 골아세포를 접종한지 1일 또는 14일 된 지지체의 세포 형태를 관찰하였다. 지지체를 0.05M sodium cacodylate buffer(SC 완충액, pH 7.2; Sigma-Aldrich)에 2 % 파라포름알데히드 및 2 % 글루타르알데하이드를 함유하는 변형된 Karnovsky's 고정액으로 4°C에서 4시간 동안 고정시켰다. 상기 일차 고정된 지지체를 0.05 M SC 완충액으로 4°C에서 3회 세척하고, 1 % osmium tetroxid(Sigma-Aldrich)를 함유한 0.05 M SC 완충액에 4 °C에서 2시간 동안 담그었다. 그 다음 순차적으로 탈수시키고 헥사메틸디실라잔(hexamethyldisilazane, Sigma-Aldrich)으로 15분 동안 건조시켰다. 지지체 및 지지체 위의 세포 형태는 FE-SEM(JEOL)을 이용하여 15 kV에서 확인하였다. 모든 표본은 탄소 테이프에 올리고 sputter coater를 이용하여 60초 동안 백금으로 코팅하였다.

[93]

[94] (3) 세포 증식 분석

[95] Cell Count Kit-8(CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 지지체에서 골아세포 증식 분석을 수행하였다. 지지체를 성장 배지로 희석시킨 CCK-8 용액(1:10 비율)에 담그고 37 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 상기 용액을 추출하고, microplate reader(Asys UVM 340; Biochrom, Cambridge, UK)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 지지체를 PBS로 세척하고 새 배양 배지로 다시 인큐베이션하였다.

[96]

[97] 세포를 접종하고 지지체의 형태를 SEM으로 확인한 결과, 1일째에는 세포들이 지지체 위에 부착된 것을 확인하였고, 부착된 세포들은 시간이 지나면서(14일) 지지체의 기공을 통해 자라는 것을 확인할 수 있었다(도 4a). 특히, PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체의 세포들은 콜라겐 기질의 비등방성 형상에 가까운 더욱 정렬된 형태를 보였다. 상기와 같은 형태는 골 조직의 기계적 특성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

[98] 나아가, 세포 증식 분석에서 흡광도를 측정한 결과, 코팅을 하지 않은 지지체에 비해 콜라겐 또는 bdECM을 코팅한 지지체 위에서 골아세포가 더욱 잘 부착되는 것을 확인하였고, 이로부터 단백질을 코팅한 지지체가 세포 부착률을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 상기 세 그룹의 골아세포 증식률은 서로 유사한 경향을 보였다(도 4b).

[99] 상기 bdECM 코팅은 지지체의 기공 크기를 약 30% 감소시켰으나(도 3),

골아세포 부착을 더욱 증가시켰다. 이러한 결과는 지지체의 기공이 bdECM으로 가득 채워지지 않았다는 것을 의미하며, 따라서 골아세포는 지지체 내부로 이동할 수 있다. 한편, 콜라겐 코팅은 bdECM 코팅과 비교하여 낮은 세포 부착률을 보였는바, 상기 bdECM은 콜라겐 코팅보다 더 나은 환경을 제공할 수 있다.

[100] 결론적으로 상기 실험과정을 통해 본 발명의 bdECM을 코팅한 골 재생용 지지체가 실제 인체에 이식 되었을 경우에도 지지체의 공극을 따라서 주변 조직의 세포들이 효과적으로 증식할 수 있음을 알 수 있다.

[101]

[102] 실시예 4: 래트 유래 골아세포의 골 분화 향상 효과 확인

[103]

[104] (1) ALP 발현 확인

[105] 본 발명의 지지체가 골 분화를 향상시키는 효과가 있는지 확인하기 위하여, 래트 유래 골아세포를 지지체 위에서 배양하면서 골 분화 양상을 관찰하였다. 먼저 각 지지체에 접종된 세포에서 골아세포 활성의 생화학적 마커로 가장 널리 알려져 있는 ALP의 발현을 면역형광 염색 방법으로 확인하였다. 골 생성 배지에서 골아세포를 배양한 지지체를 PBS로 세척하고 14일째에 4 % 파라포름알데히드 용액으로 고정시켰다. 그 다음 비특이적 결합을 막기 위해 2 % BSA를 함유하는 PBS를 처리하고, 항-ALP 항체(1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 면역 염색한 뒤 Alex Fluor 488 염소 항-토끼 항체(1:100; Invitrogen)로 인큐베이션하였다. 모든 표본은 DAPI(1:100; Sigma-Aldrich)로 카운터 염색하였고 laser scanning confocal microscope(Olympus FluoView™ FV1000, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[106] 또한, ALP 활성은 14일째에 p-NPP(p-nitrophenyl phosphate, Sigma-Aldrich)로 정량화하였다. 지지체에 접종한 골아세포를 RIPA 용해 완충액(Millipore, billerica, MA, USA)으로 용해시키고, 용해물을 5 mM pNPP를 함유하는 ALP 기질 완충액으로 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. ALP의 효소 활성은 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

[107] 그 결과, 지지체 전체적으로 골아세포에 의해 발현되는 ALP 마커 발현이 확인되었는데, 이는 골아세포 활성이 지지체 위에서 매우 높다는 것을 의미한다(도 5a). 이 중 bdECM을 코팅한 지지체 위의 세포는 1일 째에 SEM 분석에서와 같이 정렬된 형태를 보였다. 정량적으로 측정된 ALP 활성은 bdECM을 코팅한 지지체로부터 분리된 용해물에서 가장 높은 활성을 가짐을 나타낸다(도 5b).

[108]

[109] (2) 칼슘 축적 확인

[110] 골 아세포를 지지체 위에서 골 분화 배지로 배양한 경우 골 미네랄화 정도를 칼슘 축적을 통해 확인하였다. 용해물에서 Ca^{2+} 농도는 Calcium Detection

Kit(Abcam, Cambridge, MA, UK)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 분광광도계로 측정하였다. 21일째에, 칼슘 축적을 염색하기 위해 세포를 접종한 지지체를 4 % 파라포름알데히드로 고정하였다. 그 다음 세포를 2 % Alizarin Red S(Sigma-Aldrich) 용액(pH 4.3)으로 상온에서 20분 동안 염색하였다. 칼슘 축적 지역은 디지털 현미경(Dino lite, New Taipei, Taiwan)으로 관찰하였고, 칼슘 축적량은 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich)를 이용하여 세포에서 Alizarin Red를 추출하여 정량화하였다. 상기 추출물을 microplate reader를 이용해 570 nm에서 측정하였다.

- [111] 그 결과 콜라겐 또는 bdECM을 코팅한 지지체 위의 골아세포가 21일 경과 후 육안으로 식별 가능한 수준의 칼슘 미네랄을 함유하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 다만, 콜라겐 코팅 지지체에 비해 bdECM 코팅 지지체에서 더 많은 칼슘 미네랄 양이 관찰되었다(도 6a). 비색분석(colorimetric analysis) 결과 역시 상기 염색 결과와 일치하였다(도 6b). 칼슘 함량은 bdECM을 코팅한 PCL/PLGA/TCP 지지체에서 다른 그룹에 비해 상당히 높은 칼슘 함량을 보였는데, 특히 시간이 지나면서 지속적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 6c).

[112]

- [113] (3) 골 분화 관련 mRNA 발현 확인

- [114] 배양된 골아세포의 골 분화 관련 mRNA 발현은 qRT-PCR을 통해 분석하였다. 분화 배지에서 배양 21일째에 제조사의 지침에 따라 RNAiso 시약(Takara, Japan)으로 세포에서 RNA를 분리하였다. RNA 농도는 Nanodrop(ThermoScientific, USA)을 이용하여 측정하였고, 역전사는 amfiRivert cDNA synthesis platinum master mix kit(GenDEPOT, USA)로 수행하였다. 유전자 발현은 LightCycler 480 Real-Time PCR 장비(Roche Biochemicals, IN, USA)를 이용하여 LightCycler SYBR Green I Master mix로 분석하였다. 프라이머 서열은 NCBI 및 PubMed 데이터베이스를 이용하여 제작하였고 서열번호를 하기 표 2에 나타내었다.

[115]

[116] [표2]

유전자	프라이머 서열
GAPDH	센스(Sense)안티 센스(Antisense) 5'- GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G -3' (서열번호 1) 5'- ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA -3' (서열번호 2)
OCN	센스(Sense)안티 센스(Antisense) 5'- GGT GCA GAC CTA GCA GAC ACC A -3' (서열번호 3) 5'- AGG TAG CGC CGG AGT CTA TTC A -3' (서열번호 4)
COL1A1	센스(Sense)안티 센스(Antisense) 5'- ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC -3' (서열번호 5) 5'- CAG GGA AGC CTC TTT CTC CT -3' (서열번호 6)

[117]

[118] 그 결과, 오스테오칼신(osteocalcin, OCN) 및 타입 I 콜라겐(COL1A1)을 포함하는 골 생성과 관련된 mRNA 발현도 bdECM을 코팅한 PCL/PLGA/TCP 지지체 그룹에서 더 높게 확인되었다. 이러한 결과는 또한 미네랄화 뿐만 아니라 조직 성숙에 있어서도 bdECM을 코팅한 지지체의 골 조직 재생 능력이 뛰어나다는 것을 시사한다(도 6d).

[119]

[120] 상기 실험 결과를 종합하면 bdECM을 코팅한 PCL/PLGA/TCP 지지체에서 배양한 골아세포는 다른 그룹에 비해 상당히 향상된 생체 외 골 생성 활성을 보여준다는 것을 알 수 있으며, 이는 bdECM에 존재하는 생분자 때문일 수 있다. bdECM은 BMP-2(bone morphogenetic protein-2), BMP-7 및 다른 알려지지 않은 인자들과 같은 골분화성 생분자를 함유하고 있다. 이러한 골 유도 생분자는 골아세포의 골 분화와 미네랄화에 영향을 미친다. 또한, PCL/PLGA/TCP/bdECM에서 배양된 골아세포는 가장 높은 세포 부착률을 보였다. 이는 bdECM 생활성 인자에 의해 다양한 세포 부착 부위가 제공되었다는 것을 의미한다.

[121] 결론적으로, ALP 발현, Alizarin Red S 염색 및 OCN과 COL1A1의 qRT-PCR 결과를 통해 본 발명의 bdECM을 코팅한 골 재생용 지지체가 골 분화를 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

[122]

[123] 실시예 5 : 지지체의 생체 내 골 재생 효과 확인

[124]

[125] PCL/PLGA/ β -TCP/bdECM 지지체의 생체 내 골 재생 효과를 확인하기 위해

마우스 두개관 손상 모델을 사용하였으며, 상기 마우스에 골아세포와 함께 또는 골아세포 없이 각각의 지지체를 이식하여 생체 내 골 형성 효율을 확인하였다. 구체적인 실험 방법 및 내용은 하기와 같다.

[126]

[127] (1) 골 재생을 평가하기 위한 마우스 두개관 손상 모델

[128] Institute of Cancer Research(Koatech, Sungnam, Kyunggi-do, South Korea)로부터 얻은 6주령 마우스를 자일라진(xylazine, 20 mg/kg) 및 케타민(ketamine, 100 mg/kg)으로 마취시켰다. 마우스 머리 털을 밀고, 코뼈에서부터 목덜미 뒤쪽까지 두개골 중앙을 세로로 절개하고, 두정골(parietal bone) 표면을 노출시키기 위해 골막을 들어올렸다. surgical trephine burr(Ace Surgical Supply Co., Brockton, MA, USA) 및 low-speed micromoter를 이용하여, 두개골에 2개의 원형 골 손상(직경 4 mm)를 만들었다. 손상 크기는 마우스 두개골 손상 모델에 대하여 치명적인 크기로 하였다. 드릴 부위는 살린으로 세척하였고, 출혈 부위는 전기로 지졌다. 각 그룹 당 다섯 마리의 마우스(10 손상)를 사용하였다.

[129]

[130] (2) micro-CT 분석

[131] 이식 8주 후, 마우스를 CO₂로 안락사 시키고, 분석을 위해 두개골을 회수하였다. 골 형성은 micro-CT 스캔(그룹 당 n=7)으로 평가하였다. micro-CT 사진은 micro-CT 스캐너(SkyScan-1172, Skyscan, Kontich, Belgium)로 얻었다. 신생 골 부피는 CT 분석 프로그램(CT-An, Skyscan)을 이용하여 확인하였다.

[132]

[133] (3) 조직학적 분석

[134] micro-CT 촬영 후, 조직학적 및 조직형태계측학적(histomorphometric) 분석을 위해 검체를 제조하였다. 검체를 10 %(v/v) 완충 포르말린 용액에 담그고, 증가된 농도의 알콜 용액에서 탈수시키고, 자일렌(xylene)으로 투명하게 하고, 파라핀으로 포매시켰다. 마이크로커팅 및 그라인딩 기술을 이용하여 마우스 한 마리 당 각각 두 개의 검체로부터 하나의 시상 및 하나의 전면부 절편을 얻었다. 상기 절편을 Goldner's trichrome stain으로 염색하였다. 골 형성 지역은 Adobe Photoshop software(Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 새로 형성된 미네랄화된 뼈의 백분율을 계산함으로써 결정하였다. 손상 부위에서 골 형성 지역의 백분율은 (신생 골 지역/골 손상 지역) x 100으로 계산하였다. 골 밀도는 [신생 골 지역/(신생 골 지역 + 섬유 조직 지역 + 나머지 생물질 지역)] x 100으로 계산하였다.

[135]

[136] 그 결과, micro-CT(microcomputed topography) 사진을 통해 다른 지지체 이식과 비교하여 PCL/PLGA/TCP/bdECM 지지체 이식이 골 재생을 더욱 향상시킨다는 것알 수 있었다(도 7a). 또한, PCL/PLGA/TCP/bdECM 지지체는 다른 지지체에 비해 재생된 골 부피를 상당히 증가시켰다(도 7b). 특히 PCL/PLGA/TCP/bdECM

지지체는 골아세포가 없는 경우에도 골아세포가 있는 경우와 유사한 수준으로 골 재생을 향상시키고 재생된 골 부피를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 PCL/PLGA/TCP/bdECM 지지체는 골아세포 등 기타 세포와 혼합할 필요 없이 지지체 단독을 이식하는 것 만으로도 골 재생 효과를 가져올 수 있음을 의미한다.

[137]

[138] 나아가, Goldner's trichrome 염색을 이용한 조직학적 분석으로 PCL/PLGA/TCP/bdECM 이식이 골 재생 효율을 향상시켰다는 것을 다시 확인하였다(도 8a). PCL/PLGA/TCP/bdECM은 손상 부위에 새로이 형성된 골수를 포함하여 재생된 뼈를 성공적으로 채워주었다. 반면, PCL/PLGA/TCP 및 PCL/PLGA/TCP/Col 지지체의 이식은 손상 부위에서 오직 섬유 조직만을 보여주었다.

[139] 아울러, 골아세포와 함께 PCL/PLGA/TCP/Col 지지체를 이식한 경우 골아세포가 없는 경우에 비해 골 형성 면적 및 골 밀도를 상당히 향상시켰다(도 8b 및 8c). 또한, 골아세포와 함께 PCL/PLGA/TCP/bdECM을 이식한 경우는 PCL/PLGA/TCP/Col 지지체를 이식한 경우보다도 골 형성 면적 및 골 밀도가 더욱 향상되었다. 하지만, 골아세포와 함께 PCL/PLGA/TCP를 이식한 경우에는 골아세포가 없이 이식한 경우와 유사하게 오직 섬유 조직만 형성된 것을 확인하였다.

[140]

[141] 본 발명의 3D 프린팅 기술로 제조한 지지체는 골 손상 부위에 이식된 지지체 내로 환자 조직의 성장을 향상시킬 수 있는 미세 구조 및 상호 연결된 기공 구조를 조절할 수 있기 때문에, 다른 종류의 골 조직 공학에도 사용될 수 있다. 본 발명의 PCL/PLGA/TCP/bdECM은 MSC 및 골아세포와 같은 숙주의 세포가 내부에서 자라도록 할 수 있으며, 지지체 내부로 이동한 세포는 bdECM이 함유하는 생분자와 접촉하여 골로 분화될 수 있다.

[142] 합성 인공 물질로 만들어진 코팅되지 않은 3D 프린팅으로 제조한 지지체(PCL/PLGA/TCP)는 골 재생을 유도하는 골-특이적 생활성 신호가 결여되어 있다. 또한, 콜라겐을 코팅한 PCL/PLGA/TCP/Col 지지체는 골아세포가 없이 단독으로는 골 손상을 효과적으로 치료하지 못하였다. 이는 PCL/PLGA/TCP/bdECM과 비교하여 골 생성 생분자가 결여되어있기 때문이다. 콜라겐이 생체 외 세포 부착률 및 골 생성 활성이 떨어지는 것도 이러한 결과에 영향을 주었을 것이다. 한편, PCL/PLGA/TCP/bdECM은 골아세포가 있거나 없는 조건에서 별 다른 차이를 보이지 않았다. 이는 PCL/PLGA/TCP/Col과 비교하여 상당한 양의 숙주 세포가 이동했기 때문일 것이다. 따라서, PCL/PLGA/TCP/bdECM은 골 손상 치료에 있어서 체외 배양된 골아세포를 필요로 하지 않고, bdECM은 DBM을 탈세포화하여 제조한 것으로, 본 발명의 지지체는 세포 이식으로 야기되는 면역반응 등의 부작용을 감소시킬 수 있으며,

세포 배양에 들어가는 비용 및 시간도 줄일 수 있다.

[143] 결론적으로 본 발명의 bdECM을 코팅한 골 재생용 지지체는 골 세포 증식을 촉진하고, 골 분화를 향상시켜 우수한 골 재생 효과를 가지므로, 골 재생용 지지체로 사용될 수 있다.

[144]

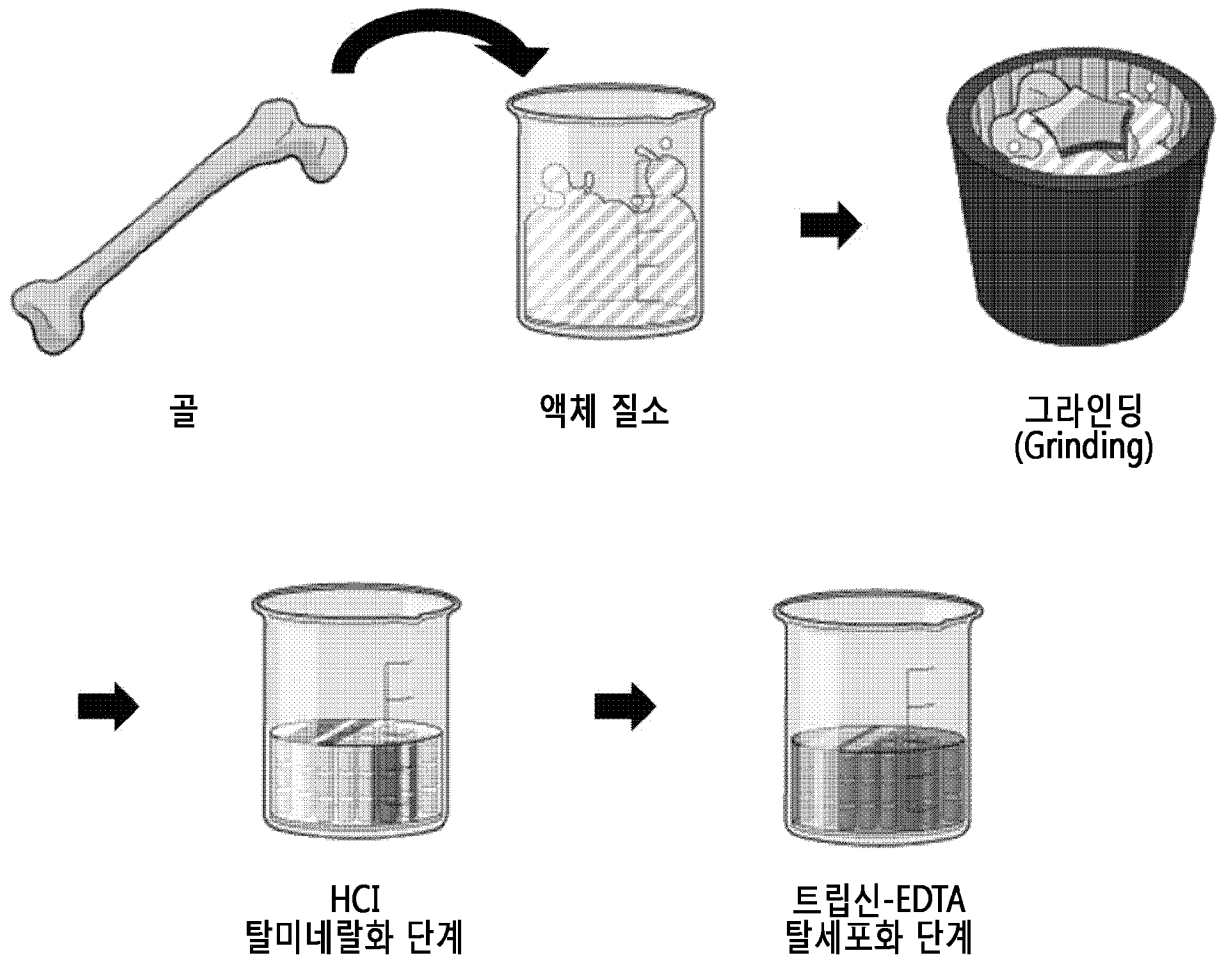
[145] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[146]

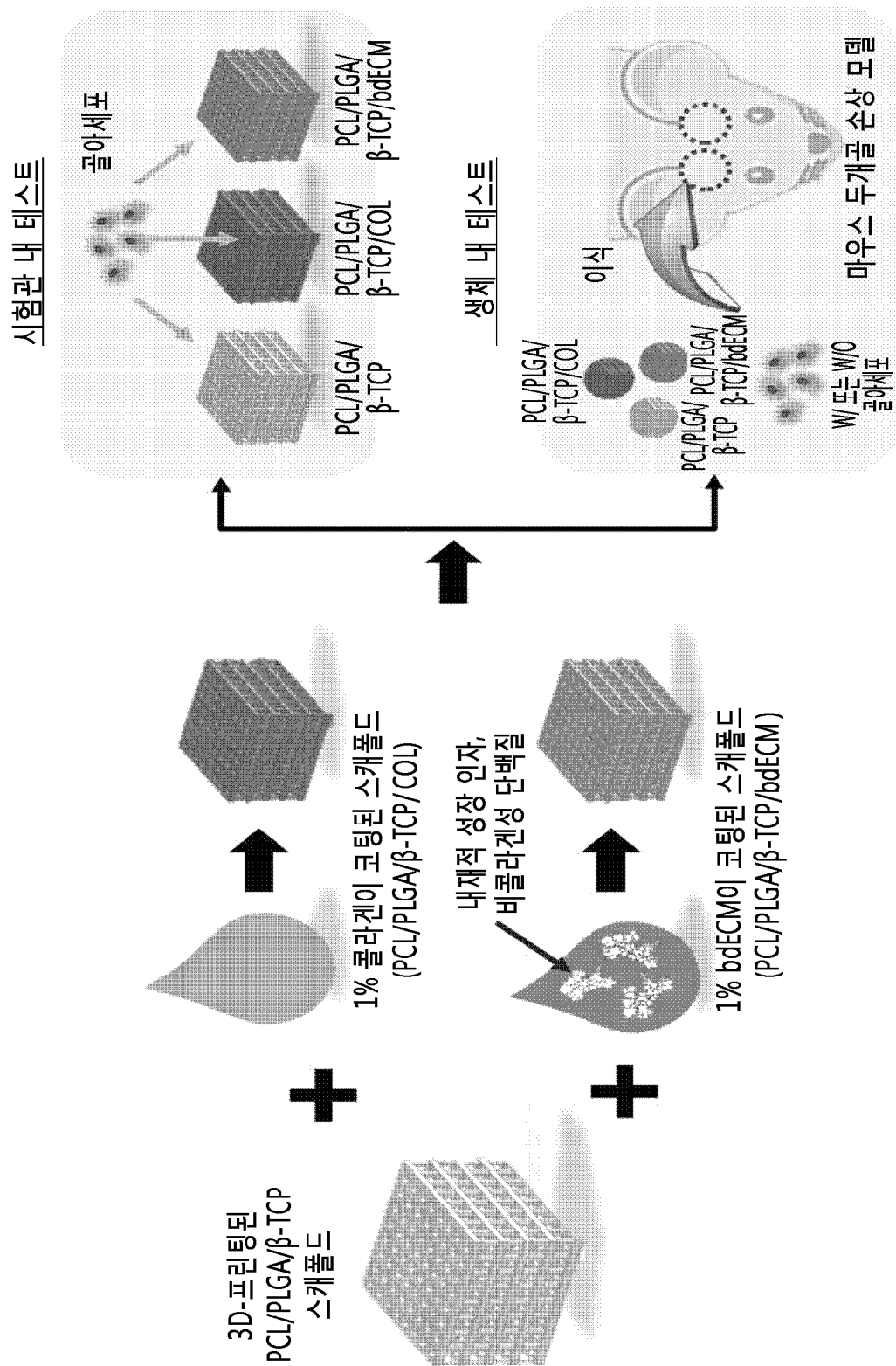
청구범위

- [청구항 1] PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 포함하는 제1층; 및 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 제2층을 포함하며, 상기 제2층은 상기 제1층을 둘러싸는, 골 재생용 지지체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1층은 PCL : PLGA : β -TCP를 1.5 내지 2.5 : 1.5 내지 2.5 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 포함하는 것인, 골 재생용 지지체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제2층은 증류수에 bdECM이 5 내지 20 mg/ml로 용해된 코팅 용액으로 제1층을 코팅하여 형성된 것인, 골 재생용 지지체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 골 재생은 골 분화 촉진에 의한 것인, 골 재생용 지지체.
- [청구항 5] (a) PCL(polycaprolactone), PLGA(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)), 및 β -TCP(tricalcium phosphate)를 혼합하여 지지체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 지지체를 bdECM(demineralized and decellularized bone extracellular matrix)을 포함하는 용액으로 코팅하는 단계를 포함하는 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 단계 (a)는 PCL : PLGA : β -TCP를 1.5 내지 2.5 : 1.5 내지 2.5 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합하는 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 단계 (b)는 PCL/PLGA/ β -TCP 지지체를 bdECM에 담그고 원심분리하는 제1단계; 상기 지지체를 bdECM에 잠기도록 유지시키는 제2단계; 및 상기 지지체를 건조시키는 제3단계를 포함하는 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 제2단계는 상기 지지체를 bdECM에 5 내지 30 분 동안 잠기도록 유지시키는 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 단계 (b)의 bdECM을 포함하는 용액은 bdECM이 증류수에 5 내지 20 mg/ml로 용해된 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 10] 제5항에 있어서, 상기 단계 (a)는 3D 프린터를 이용하여 수행되는 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.
- [청구항 11] 제5항에 있어서, 상기 골 재생은 골 분화 촉진에 의한 것인, 골 재생용 지지체 제조방법.

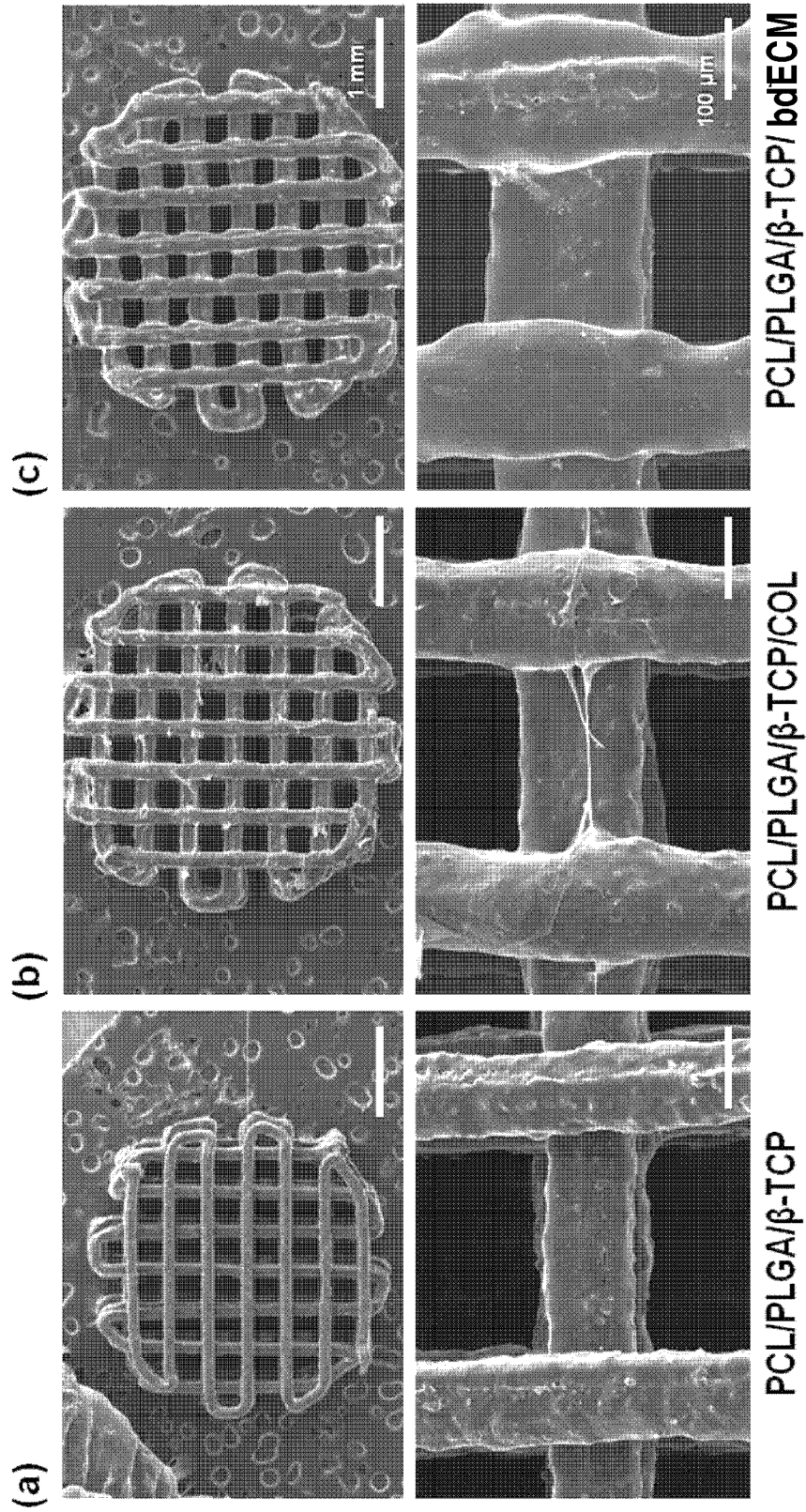
[도1]



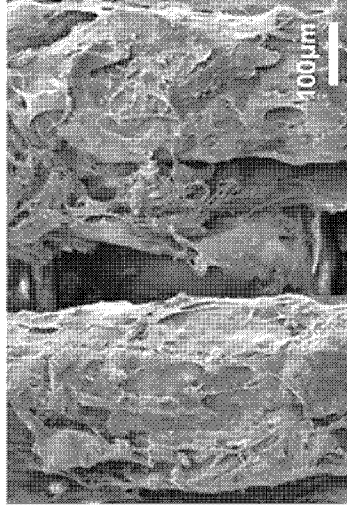
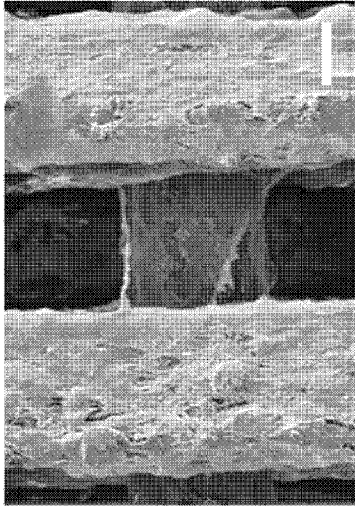
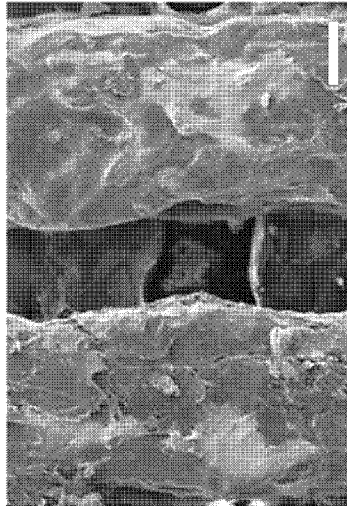
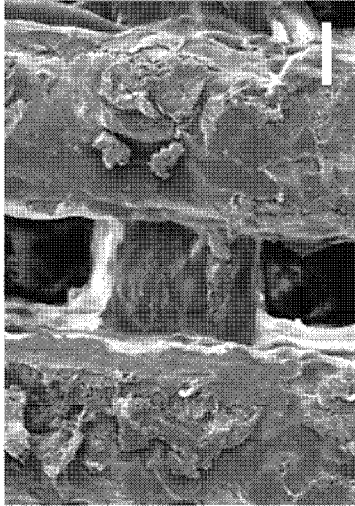
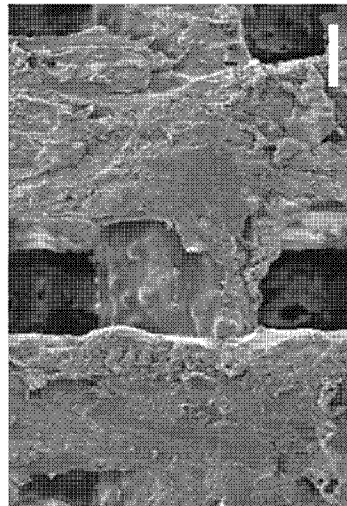
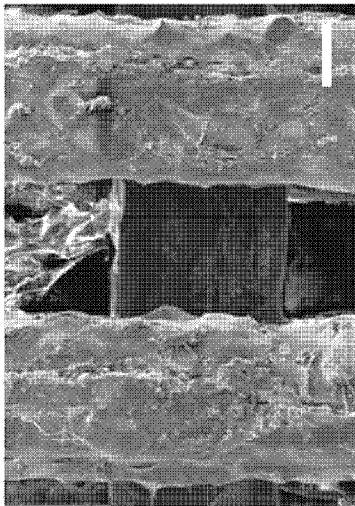
[도2]



[도3]



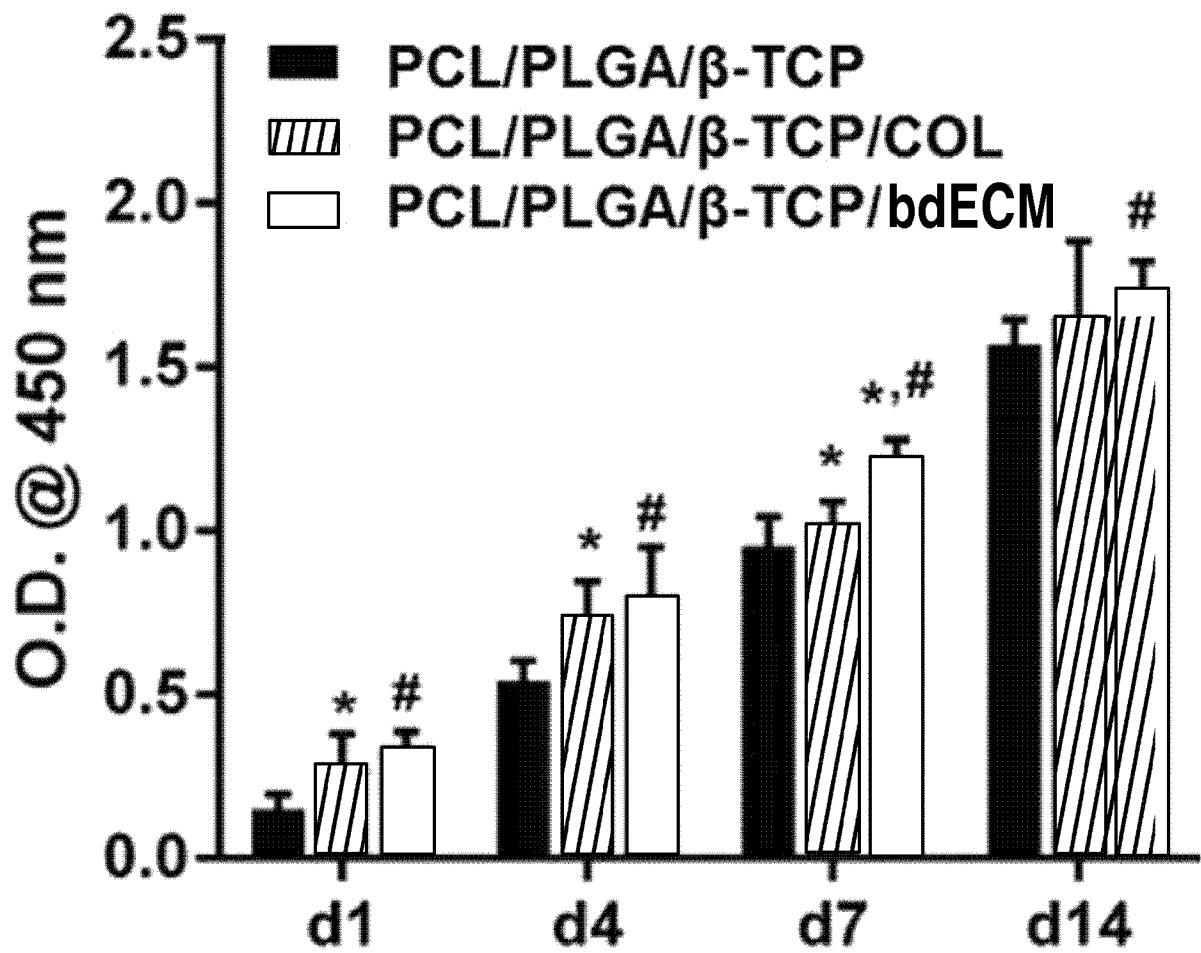
[도4a]

PCL/PLGA/ β -TCP/bdECMPCL/PLGA/ β -TCP/COLPCL/PLGA/ β -TCP

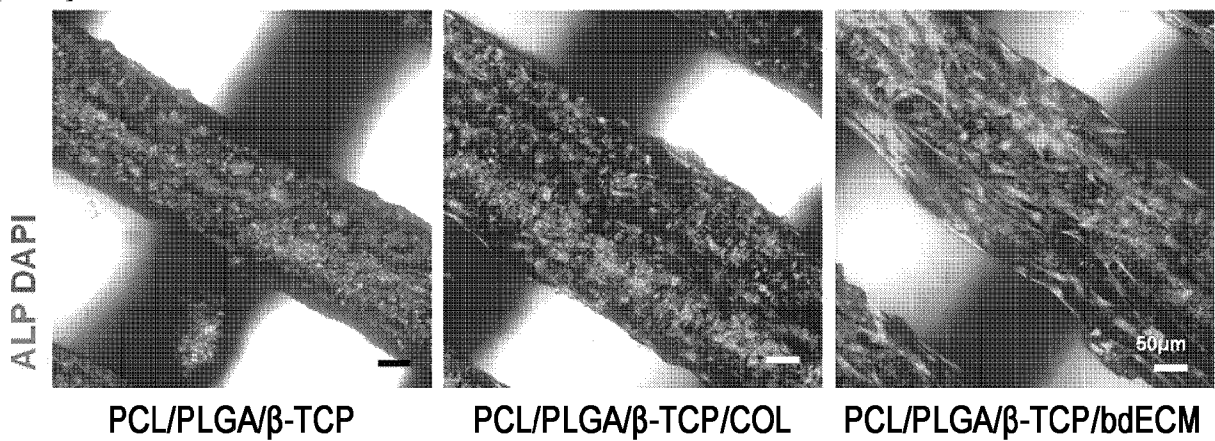
10μ

14μ

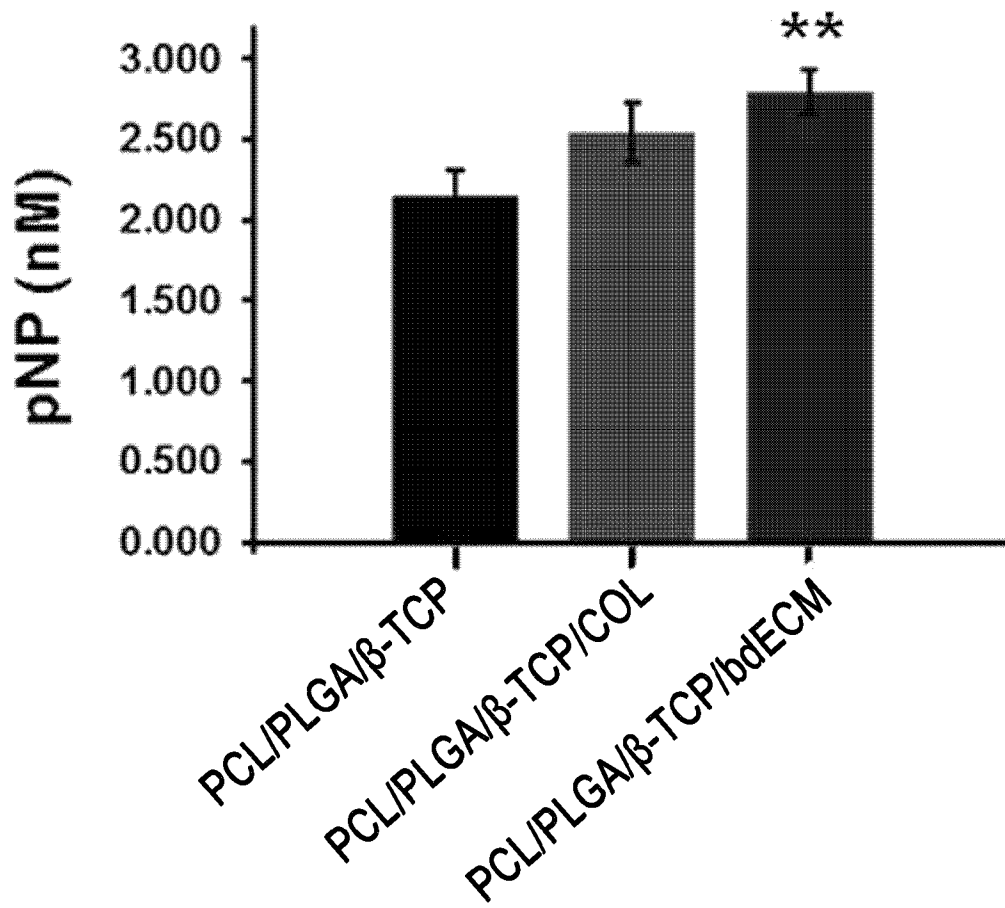
[도4b]



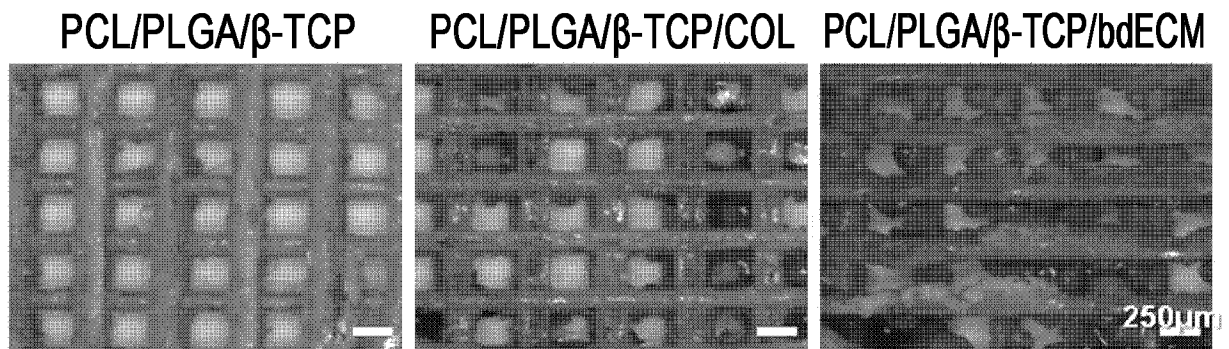
[도5a]



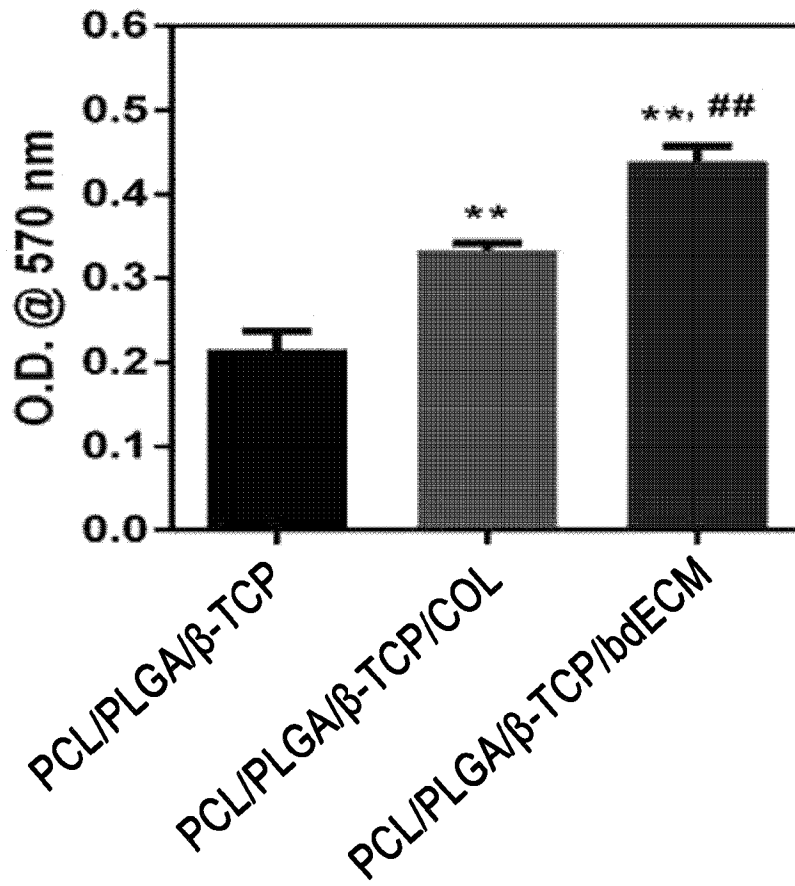
[도5b]



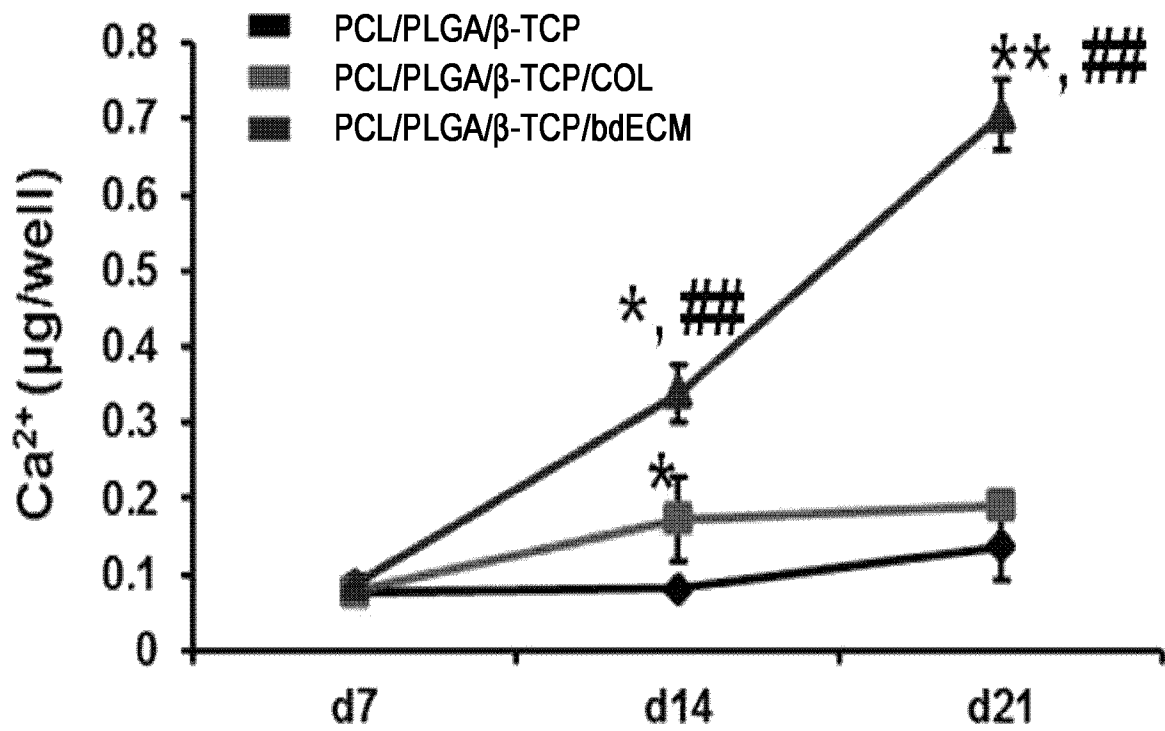
[도6a]



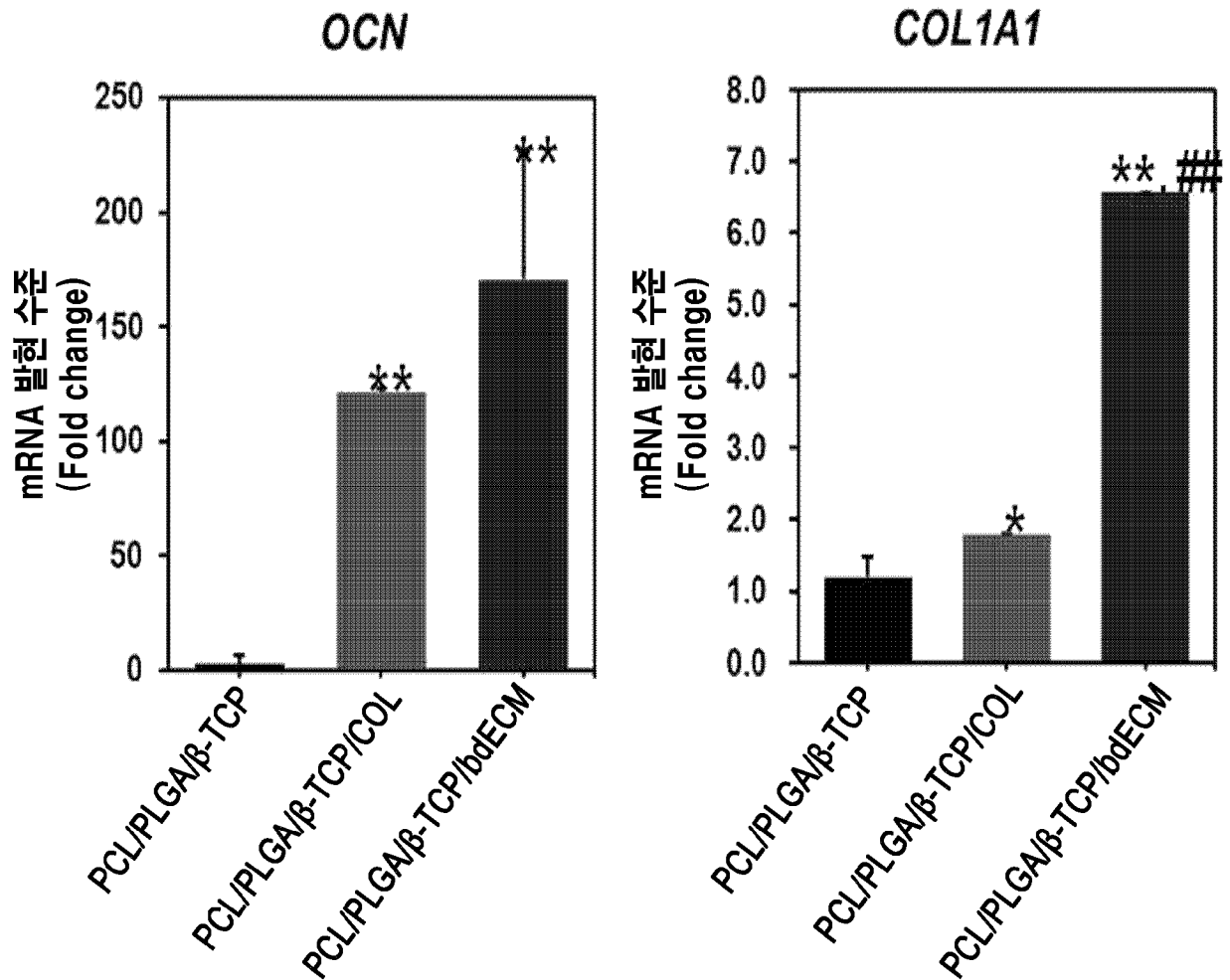
[도6b]



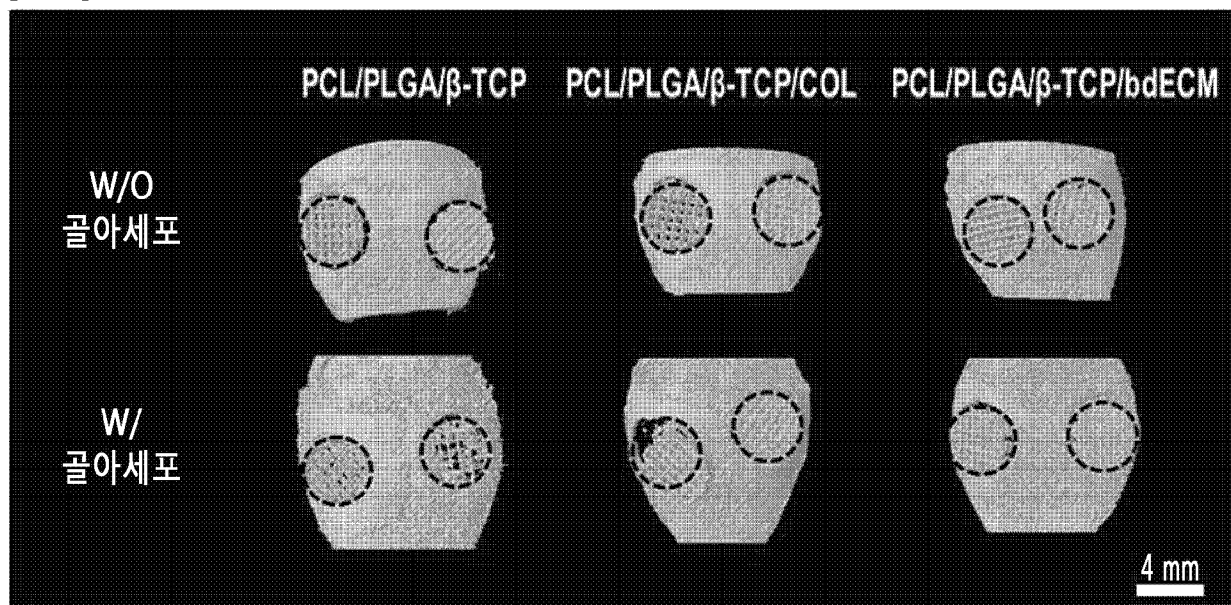
[도6c]



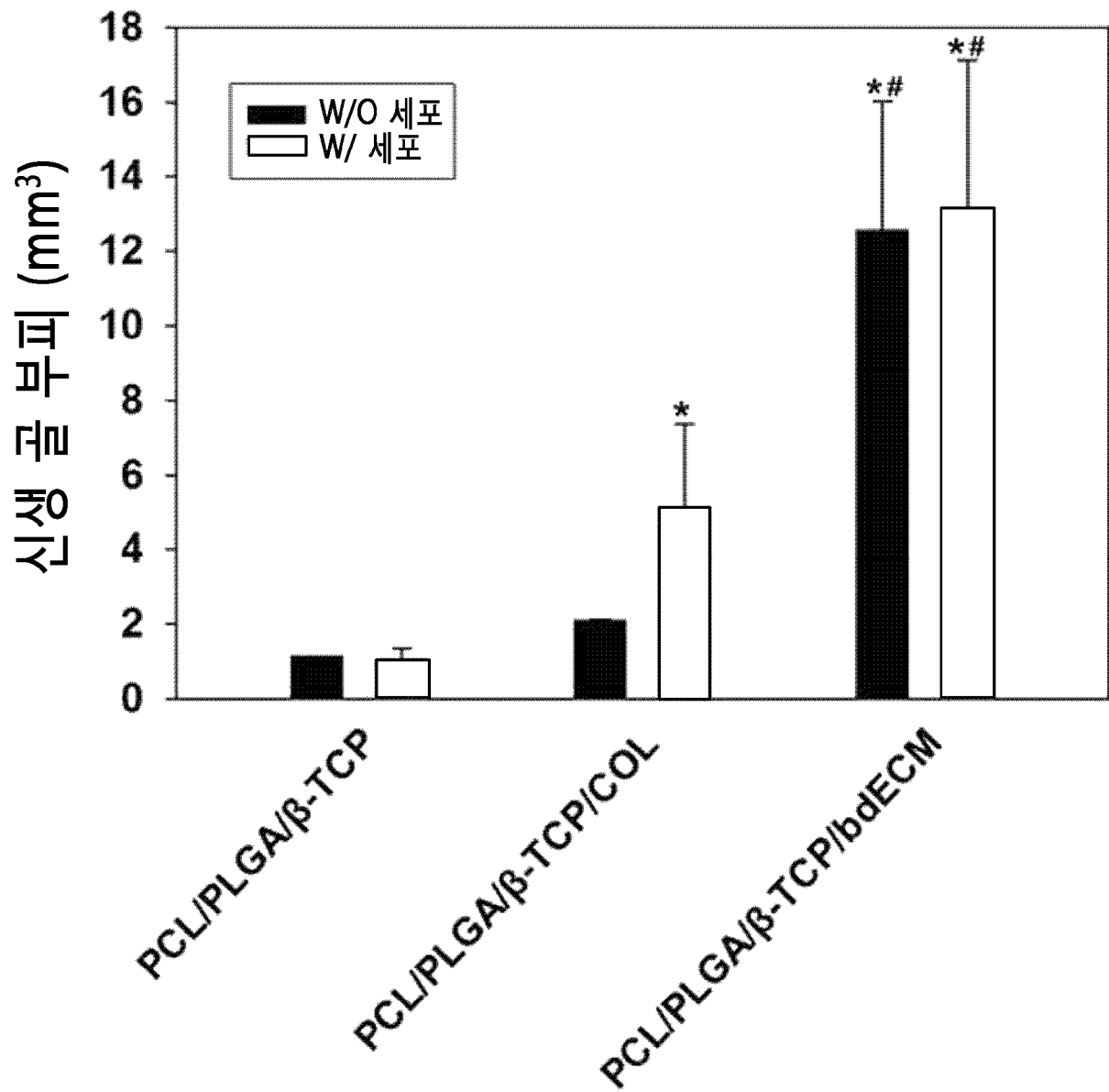
[도6d]



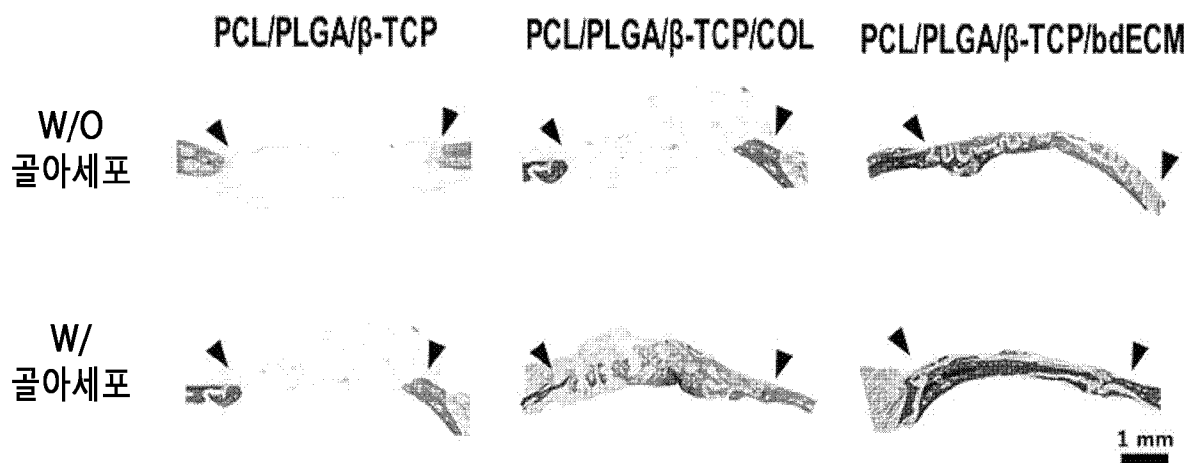
[도7a]



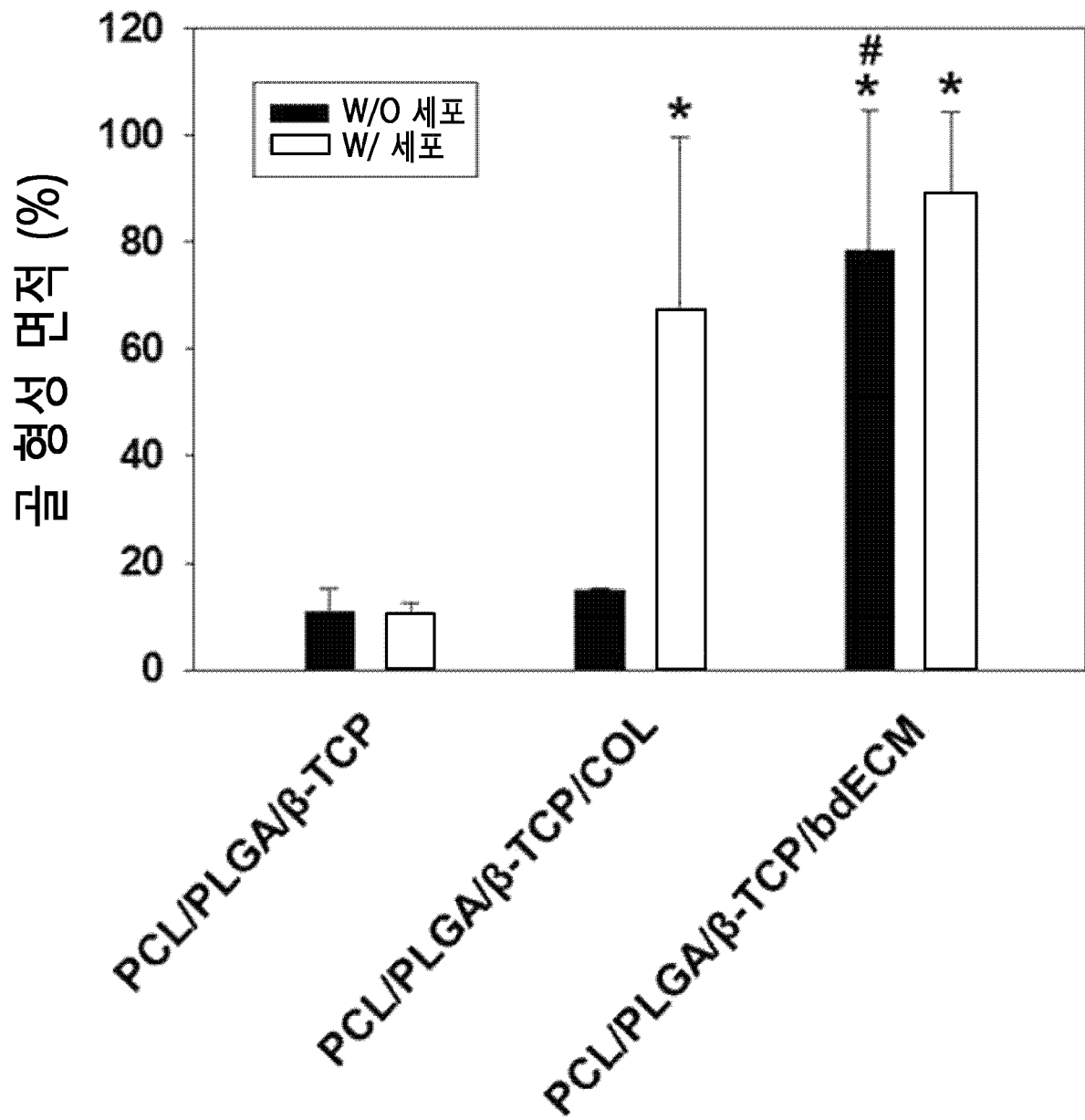
[도7b]



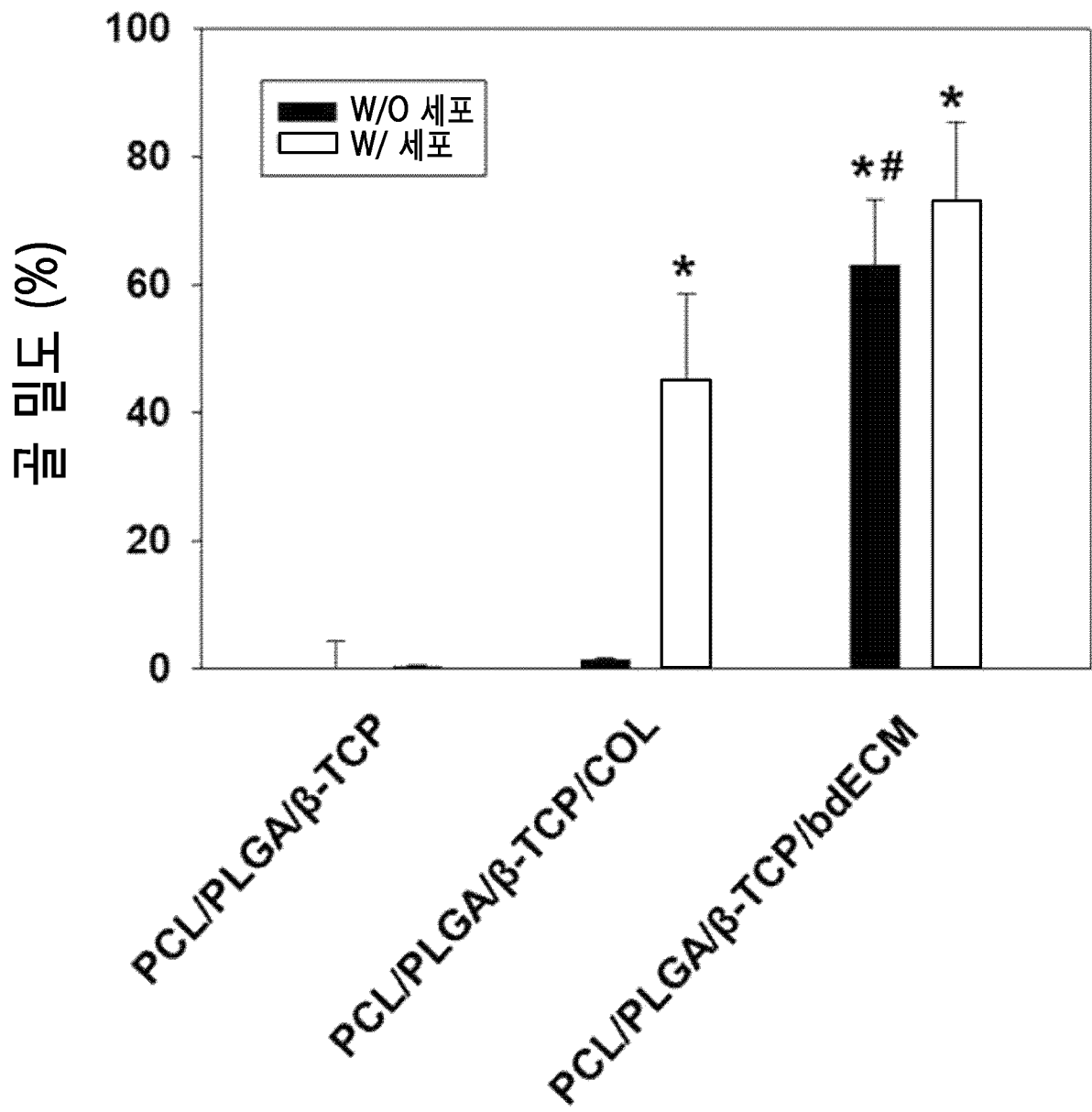
[도8a]



[도8b]



[도8c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/011408**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61L 27/46(2006.01)i, A61L 27/36(2006.01)i, A61L 27/54(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 27/46; C12N 5/071; A61L 27/36; A61L 27/54

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: PCL, PLGA, β -TCP, bDECm, decellularization, DBM, support, bone regeneration**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHIM, J. et al., Fabrication of Blended Polycaprolactone/Poly(lactic-co-glycolic acid)/ β -Tricalcium Phosphate Thin Membrane using Solid Freeform Fabrication Technology for Guided Bone Regeneration, Tissue Engineering: Part A, 2013, vol. 19, nos. 3-4, pages 317-328 See abstract; preparation of blended PCL/PLGA/ β -TCP; fabrication of PCL/PLGA/ β -TCP membranes using MHDS.	1-11
Y	SAWKINS, M. J. et al., Hydrogels derived from Demineralized and Decellularized Bone Extracellular Matrix, Acta Biomaterialia, 2013, vol. 9, no. 8, pages 7865-7873 See abstract; demineralization and decellularization; conclusion.	1-11
A	RENTSCH, C. et al., ECM Inspired Coating of Embroidered 3D Scaffolds Enhances Calvaria Bone Regeneration, BioMed Research International, June 2014, vol. 2014, Article ID 217078 See the entire document.	1-11
A	THIBAUT, R. A. et al., Scaffold/Extracellular Matrix Hybrid Constructs for Bone-Tissue Engineering, Advanced Healthcare Mater, 2013, vol. 2, no. 1, pages 13-24 See the entire document.	1-11



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

02 FEBRUARY 2016 (02.02.2016)

Date of mailing of the international search report

11 FEBRUARY 2016 (11.02.2016)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/011408

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0037324 A (BONECELL BIOTECH) 16 April 2013 See the entire document.	1-11
X	PATI, F. et al., Ornamenting 3D Printed Scaffolds with Cell-Laid Extracellular Matrix for Bone Tissue Regeneration, Biomaterials, October 2014 (Published online), vol. 37, pages 230-241 See abstract; materials and methods. ※ The above document is a document declaring non-prejudicial lack of novelty by the applicant.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/011408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0037324 A	16/04/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/46(2006.01)i, A61L 27/36(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/46; C12N 5/071; A61L 27/36; A61L 27/54

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: PCL, PLGA, β -TCP, bdECM, 탈세포화, DBM, 지지체, 골 재생

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	SHIM, J. 등, Fabrication of blended polycaprolactone/poly (lactic-co-glycolic acid)/ β -tricalcium phosphate thin membrane using solid freeform fabrication technology for guided bone regeneration, Tissue Engineering: Part A, 2013년, 19권, 3-4호, 페이지 317-328 Abstract; Preparation of blended PCL/PLGA/ β -TCP; Fabrication of PCL/PLGA/ β -TCP membranes using MHDS 참조.	1-11
Y	SAWKINS, M. J. 등, Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix, Acta Biomaterialia, 2013년, 9권, 8호, 페이지 7865-7873 Abstract; Demineralization and decellularization; Conclusion 참조.	1-11
A	RENTSCH, C. 등, ECM inspired coating of embroidered 3D scaffolds enhances calvaria bone regeneration, BioMed Research International, 2014년, 6월 2014권, Article ID 217078 전체 문서 참조.	1-11
A	THIBAUT, R. A. 등, Scaffold/Extracellular matrix hybrid constructs for bone-tissue engineering, Advanced Healthcare Mater, 2013년, 2권, 1호, 페이지 13-24 전체 문서 참조.	1-11

☒ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 02월 02일 (02.02.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 02월 11일 (11.02.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0037324 A (주식회사 본셀바이오텍) 2013.04.16 전체 문서 참조.	1-11
X	PATI, F. 등, Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration, Biomaterials, 2014년 10월 (온라인 공개), 37권, 페이지 230-241 Abstract; Materials and methods 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2013-0037324 A

2013/04/16

없음