



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년04월06일  
 (11) 등록번호 10-1132732  
 (24) 등록일자 2012년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61L 27/40** (2006.01) **A61L 27/00** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2008-0118115  
 (22) 출원일자 2008년11월26일  
 심사청구일자 2008년11월26일  
 (65) 공개번호 10-2010-0059367  
 (43) 공개일자 2010년06월04일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US20070212387 A1\*  
 KR100654329 B1  
 KR1020010091721 A  
 US4947840 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**한국과학기술연구원**  
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)  
 (72) 발명자  
**한동근**  
 서울 노원구 상계10동 694 임광아파트 1-701  
**박귀덕**  
 서울특별시 노원구 노원로 62, 303동 1201호 (공릉동, 효성 화운트빌)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**한라특허법인**

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 문동현

**(54) 발명의 명칭 인 시튜 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체 및 이의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 각각 고분자 지지체 내부에 포함되고 그의 표면에 결합되어 있는 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다공성 생분해 고분자 지지체는 그의 표면뿐만 아니라 내부에 세포의 증식이나 분화를 유도할 수 있는 생리활성물질을 함유하고 있어 세포친화성, 생체적합성, 세포분화능 등이 우수하기 때문에 연골이나 뼈와 같은 근골격계 조직재생 시 고분자 지지체에 줄기세포를 체외 배양하여 세포/고분자 구조물 형태로 이식할 필요가 없이 바로 고분자 지지체와 줄기세포를 이식하여 생체 조직 내에서 줄기세포로부터 직접 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있다는 장점을 갖는다. 따라서 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 줄기세포로부터 근골격계 조직을 조직공학적으로 재생하는데 유용할 뿐만 아니라 다른 조직이나 장기를 재생하는데도 효과적으로 확대 적용될 수 있다.

(72) 발명자

**김재진**

서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 한양아파트  
71-201 (압구정동)

**배순연**

서울특별시 성북구 화랑로22가길 6-3 (석관동)

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

- 1) 생분해성 고분자, 탄산염과 유기산의 비등성 혼합물 및 생리활성물질을 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조한 후 이로부터 용매를 증발시켜 내부에 상기 생리활성물질을 함유하는 고분자 시편을 획득하는 단계;
- 2) 상기 고분자 시편을 알코올 수용액에 담가 발포시킨 후 건조시켜 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하는 단계;
- 3) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체를 반응성 기체로 플라즈마 처리한 후 표면에 카르복실기 함유 친수성 단량체를 그래프트(graft) 중합시켜 소수성 표면을 친수성으로 개질하는 단계;
- 4) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 카르복실기를 활성화시킨 후 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시키는 단계;
- 5) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린에 생리활성물질을 결합시키는 단계를 포함하는, 서로 다른 종류의 세포친화성 및 세포분화능이 우수한 생리활성물질이 각각 고분자 지지체의 내부에 포함되고 그의 표면에 결합되어 있어 인 시튜(*in situ*)에서 근골격계의 조직재생을 유도할 수 있는 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 고분자 용액의 총 중량을 기준으로 4.5 내지 14.9 중량%의 생분해성 고분자, 80 내지 90.4 중량%의 비등성 혼합물, 및 0.0001 내지 5 중량%의 생리활성물질을 5 내지 15.4 중량%의 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 생분해성 고분자가 분자량이 5,000 내지 2,000,000 범위인 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르, 및 이들의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 탄산염이 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 탄산수소암모늄, 탄산암모늄, 탄산수소칼륨, 탄산칼륨 및 탄산칼슘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 유기산이 구연산(citric acid), 주석산(tartaric acid), 석신산(succinic acid), 말레산(maleic acid), 푸마르산(fumaric acid), 말론산(malonic acid), 말산(malic acid), 글루콘산(gluconic acid), 점액산(mucic acid) 및 아미노산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 비등성 혼합물이 탄산염과 유기산이 1:1 내지 1:3의 범위로 혼합된 것임을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 생리활성물질이 덱사메타손(dexamethasone), 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate), 아스코르베이트-2-포스페이트(ascorbate-2-phosphate), 아스코베이트(ascobate), 탈염 골 기질(demineralized bone matrix, DBM), 하이드록시아파타이트(HAP), 아스코르브산(ascorbic acid), 1,25-다이하이드록시비타민 D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), 트라이칼슘포스페이트 (TCP), 콜라겐, 부갑상선 호르몬(PTH), PTH 1-34 펩타이드, 레티노산-감수성 단백질(CD-RAP), Arg-Gly-Asp(RGD), Arg-Glu-Asp-Val(REDV), Leu-Asp-Val(LDV), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR), Pro-Asp-Ser-Gly-Arg(PDSGR), Ile-Lys-Val-Ala-Val(IKVAV), Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ala (RNIAEIIKDA), 전환 성장인자(TGF- $\beta$ ), 인슐린-유사 성장인자(IGF), 표피세포 성장인자(EGF), 신경세포 성장인자(NGF), 혈관내피세포 성장인자(VEGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 간세포 성장인자(HGF), 및 혈소판-유래 성장인자(PDGF)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 용매가 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매 단독이거나, 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매와 생분해성 고분자를 용해시킬 수는 없지만 상기 용매와는 섞일 수 있는 비용매와의 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 용매가 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 다이클로로메탄, 아세톤, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서,

상기 비용매가 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

단계 2)에서 알코올 수용액이 에탄올, 메탄올, 아이소프로판올 및 이들의 혼합물 중의 어느 하나와 물이 50:50 내지 70:30의 부피비로 혼합된 것임을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서,

단계 1)에서 고분자 용액을 -196℃ 내지 상온에서 1 내지 24시간 동안 방치하여 용매를 증발시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서,

단계 2)에서 제조된 다공성 생분해 고분자 지지체가 단일기공 구조 또는 이중기공 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서,

단계 3)에서 반응성 기체가 헬륨(He), 아르곤(Ar), 질소(N<sub>2</sub>), 산소(O<sub>2</sub>), 수소(H<sub>2</sub>), 이산화탄소(CO<sub>2</sub>), 일산화탄소

(CO), 암모니아(NH<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>O 및 이들의 혼합물로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서,

단계 3)에서 플라즈마 처리가 10 내지 300 mtorr 범위의 압력 하에서 10 내지 100 W/cm<sup>2</sup>의 출력으로 30 내지 300 초간 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서,

단계 3)에서 다공성 생분해 고분자 지지체에 카르복실기 함유 친수성 단량체가 100:1 내지 500:1의 몰비로 중합되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서,

단계 3)에서 카르복실기 함유 친수성 단량체가 아크릴산(acrylic acid), 메타크릴산(methacrylic acid), 말레산(maleic acid), 이타콘산(itaconic acid) 및 아코니트산(aconitic acid)으로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서,

단계 4)에서 다공성 생분해 고분자 지지체를 커플링제의 존재 하에서 완충용액에 4 내지 37℃에서 30분 내지 24시간 동안 침지시켜 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 그래프트된 카르복실기를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

상기 완충용액이 2-몰포리노에탄설폰산(2-morpholinoethane sulfonic acid, MES), 프로판설폰산(propanesulfonic acid, MOPS), 트라이에틸렌아민(triethylene amine) 및 2-아미노-2-하이드록시메틸-1,3-프로판에디올(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Tris)로 구성된 균으로부터 선택되고, 커플링제가 1-에틸렌-3-(3-다이메틸아미노-프로필)카르보다이이미드(1-ethylene-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide, EDC), N-하이드록시석시니미드(N-hydroxyl-succinimide, NHC), N,N-다이사이클로헥실카보다이이미드(N,N-dicyclohexylcarbodiimide, DCC), 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스피닉 클로라이드(bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride, BOP-Cl), 다이석시니미딜 카보네이트(disuccinimidyl carbonate, DSC), N,N-다이아이소프로필카보이미드(N,N-diisopropylcarboimide, DIPC), 및 4-p-아지도살리실아미드-부틸아민(4-(p-azidosalicylamido)-butylamine, ASBA)로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서,

단계 4)에서 다공성 생분해 고분자 지지체에 헤파린이 100:1 내지 500:1의 몰비로 고정되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서,

단계 5)에서 헤파린이 고정된 다공성 생분해 고분자 지지체를 생리활성물질이 용해된 완충용액에 4 내지 30℃에서 1 내지 24시간 동안 침지시켜 상기 헤파린에 생리활성물질을 결합시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서,

단계 5)에서 헤파린이 고정된 다공성 생분해 고분자 지지체 1 g에 생리활성물질이 0.01 내지 50 나노몰(nmol)의 양으로 결합되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서,

단계 5)에서 생리활성물질이 덱사메타손(dexamethasone), 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate), 아스코르베이트-2-포스페이트(ascorbate-2-phosphate), 아스코베이트(ascobate), 탈염 골 기질(demineralized bone matrix, DBM), 하이드록시아파타이트(HAP), 아스코르브산(ascorbic acid), 1,25-다이하이드록시비타민 D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), 트라이칼슘포스페이트 (TCP), 콜라겐, 부갑상선 호르몬(PTH), PTH 1-34 펩타이드, 레티노산-감수성 단백질(CD-RAP), 전환 성장인자(TGF- $\beta$ ), 인슐린-유사 성장인자(IGF), 표피세포 성장인자(EGF), 신경세포 성장인자(NGF), 혈관내피세포 성장인자(VEGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 간세포 성장인자(HGF), 및 혈소판-유래 성장인자(PDGF)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서,

단계 5)에서 사용된 생리활성물질이 단계 1)에서 사용된 생리활성물질과 서로 다른 종류인 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서,

단계 5)에서 생리활성물질이 리간드 펩타이드인 경우, 단계 4)에서 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시키는 과정을 생략하고 리간드 펩타이드를 단계 4)에서 활성화된 카르복실기에 직접 결합시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서,

상기 리간드 펩타이드가 Arg-Gly-Asp(RGD), Arg-Glu-Asp-Val(REDV), Leu-Asp-Val(LDV), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR), Pro-Asp-Ser-Gly-Arg(PDSGR), Ile-Lys-Val-Ala-Val(IKVAV), 및 Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ala (RNIAEIIKDA)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 27**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 각각 고분자 지지체 내부에 포함되고 그의 표면에 결합되어 있는 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 조직공학(tissue engineering)이란 과학의 발달과 함께 등장한 새로운 분야의 하나로서 생명과학과 공학, 의학 등의 기본개념과 과학기술을 통합 응용하는 다학제간 학문으로 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고 더 나아가 손상된 조직이나 장기를 정상적인 조직으로 대체하거나 재생시키기 위해 체내에 이식이 가능한

인공조직을 만들어 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용학문이다.

- [0003] 대표적인 조직공학 기법을 요약하면 다음과 같다. 우선, 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 후 분리된 세포를 배양을 통해 필요한 양만큼 증식시킨다. 증식된 세포를 다공성 생분해 고분자 지지체에 심어 일정기간 동안 체외 배양하여 얻어지는 하이브리드형 세포/고분자 구조물을 다시 인체 내에 이식한다. 이식된 세포들은 대부분의 조직이나 장기에서 신생 혈관이 형성될 때까지는 체액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받다가 체내에 혈관이 자라서 들어와 혈액의 공급이 이루어지면 세포들이 증식, 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 고분자 지지체는 그동안 분해되어 없어지게 되는 기법을 응용하는 것이다.
- [0004] 이러한 조직공학 연구를 위해서는 우선 생체 조직과 유사한 생분해성 고분자 지지체를 제조하는 일이 중요하다. 인체 조직의 재생을 위해 사용되는 지지체 재료의 주된 요건은 조직세포가 재료 표면에 유착하여 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 세포친화성의 역할을 충분히 해내야 하고 이식된 세포와 숙주 세포 사이에 위치하는 중간 장벽으로서의 역할도 할 수 있어야 한다는 것이다. 이는 이식 후 혈액 응고나 염증 반응이 일어나지 않는 무독성의 생체적합성을 가져야 함을 의미한다.
- [0005] 또한, 새로운 조직이 형성되면서 분해되어, 궁극적으로 신체에 외래 물질을 남기지 않는 생분해성 폴리머가 지지체 형성용 물질(scaffolding material)로서 매력적인 후보이다. 현재 널리 사용되고 있는 생분해성 고분자로는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르 및 이들의 공중합체 등이 있다. 그러나 현재까지는 PGA, PLA, PLGA 등만이 미국 식품의약청(FDA)으로부터 인체에 사용 가능한 생분해성 고분자로 승인되어 인체 조직의 체내 재생을 위한 다공성 생분해 고분자 지지체 재료로서 사용되고 있다.
- [0006] 이러한 생분해성 고분자를 이용하여 다공성 지지체를 제조하기 위한 방법으로는 염 침출(salt leaching), 가스를 이용한 거품형성(gas foaming), 동결 유탁(emulsion freeze-drying), 3차원 프린팅, 상 분리(phase separation) 등과 같은 기법들이 개발되었다. 염 침출과 상 분리를 병행하는 방법은 먼저 생분해성 고분자를 녹일 수 있는 적당한 용매와 고분자는 녹이지 않고 상기 용매와만 섞일 수 있는 비용매를 사용하여 용매/비용매 혼합용매를 만든 다음 생분해성 고분자를 이 혼합용매에 용해시키고, 여기에 다공성 생성을 위한 비등성 혼합물을 첨가하여 고분자 혼합용액을 제조한다. 이러한 방법으로 제조되는 다공성 생분해 고분자 지지체는 표면적과 다공도가 높고 기공 크기의 조절이 용이할 뿐만 아니라 기공간 열린(open) 구조를 가지며, 특히 표면의 기공 막힘 현상을 해결할 수 있어 보다 쉽게 세포를 지지체 내부로 유도할 수 있는 장점이 있다. 그러나 체내에 이식하였을 경우 조직재생을 유도하는 생리활성물질의 부재로 줄기세포에서 특정 세포로의 분화에 어려움을 가지고 있다.
- [0007] 최근에 줄기세포의 세포분화능을 향상시키기 위하여 고분자 지지체 내에 성장인자나 리간드 펩타이드와 같은 생리활성물질을 포함시키는 다양한 연구들이 시도되었는데, 예를 들면 성장인자를 이용하여 세포를 활성화시키는 방법(T. Motoki 등, *Cell and Tissue Research* 285: 205, 1996), 거품형성/염 침출을 이용하여 성장인자를 방출하는 방법(J.J. Yoon 등, *Biomaterials* 24: 2323, 2003), 성장인자를 함유한 다공성 젤라틴 미립구를 이용하여 골 조직을 형성하는 방법(Z.S. Patel 등, *Bone* 43: 931, 2008) 등이 보고되었다.
- [0008] 그러나 상기 방법들은 비교적 복잡한 제조과정을 거쳐야 하고, 고분자 열분해 등을 통해 표면을 개질할 때 분자량이 낮은 고분자의 경우 다공성 생분해 고분자 지지체의 변형이 유발되기도 하며, 세포의 증식이나 분화를 유도할 수 있는 기능에 있어서 특정 조직으로의 분화능 및 조직재생 시 세포친화성이 저하되는 문제점을 가지고 있다.
- [0009] 본 발명자들은 이러한 문제점을 인식하고 고분자 지지체의 표면에 리간드 펩타이드 또는 성장인자를 결합시켜 세포친화성을 향상시킨 다공성 고분자 지지체를 개발한 바 있다(대한민국 특허등록 제10-654329호). 표면에 결합된 생리활성물질로 인해 다공성 고분자 지지체의 세포친화성이 향상되긴 하였지만, 상기 다공성 고분자 지지체는 단일 종류의 생리활성물질이 고분자 지지체의 표면에만 결합되어 있기 때문에 체외에서 일정기간 동안 추가적인 생리활성물질이 함유된 분화액에서 줄기세포와 함께 분화를 유도한 후 어느 정도 분화가 이루어진 상태에서 세포/고분자 구조물 형태로 체내에 이식해야만 한다. 즉, 상기 다공성 고분자 지지체는 줄기세포로부터 원하는 조직이나 장기의 분화에 따른 재생을 직접 생체 내에서 유도할 수 없다는 문제점을 가지고 있다.
- [0010] 이에 본 발명자들은 다공성 생분해 고분자 지지체를 이용하여 생체 내에서 근골격계 조직재생을 효과적으로 유도할 수 있는 방법에 대해 연구를 계속한 결과, 고분자 지지체의 표면에 세포분화능 및 세포친화성을 향상시킬 수 있는 생리활성물질을 결합시킬 뿐만 아니라 그의 내부에도 상기한 생리활성물질을 포함시켜 줄기세포와의 체

의 배양을 하지 않고도 인 시튜(*in situ*)에서 줄기세포로부터 근골격계 조직재생을 효과적으로 유도할 수 있는 고기능성 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 근골격계 조직재생을 위해 고분자 지지체에 줄기세포를 파종하여 체외 배양을 수행한 후 세포/고분자 구조물 형태로 체내에 이식하는 것이 아니라 고분자 지지체와 줄기세포를 함께 이식하여 생체 조직 내에서 직접 인 시튜(*in situ*)로 줄기세포로부터 근골격계 조직재생을 유도할 수 있는 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 제공하는 것이다.

**과제 해결수단**

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생에 유용한 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조방법을 제공한다:

[0013] 1) 생분해성 고분자, 탄산염과 유기산의 비등성 혼합물 및 생리활성물질을 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조한 후 이로부터 용매를 증발시켜 내부에 상기 생리활성물질을 함유하는 고분자 시편을 획득하는 단계;

[0014] 2) 상기 고분자 시편을 알코올 수용액에 담가 발포시킨 후 건조시켜 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하는 단계;

[0015] 3) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체를 반응성 기체로 플라즈마 처리한 후 표면에 카르복실기 함유 친수성 단량체를 그래프트(graft) 중합시켜 소수성 표면을 친수성으로 개질하는 단계;

[0016] 4) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 카르복실기를 활성화시킨 후 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시키는 단계;

[0017] 5) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린에 생리활성물질을 결합시키는 단계.

[0018] 또한 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 각각 고분자 지지체 내부에 포함되고 그의 표면에 결합되어 있는 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 제공한다.

**효 과**

[0019] 본 발명에 따른 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 그의 표면과 내부에 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 각각 결합되어 있어 세포적합성, 세포친화성 뿐만 아니라 세포분화능이 우수하기 때문에, 근골격계 조직재생 시 고분자 지지체에 줄기세포를 파종하여 체외 배양한 후 세포/고분자 구조물 형태로 이식할 필요가 없이 바로 고분자 지지체와 줄기세포를 이식함으로써 생체 조직 내에서 줄기세포로부터 직접 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 줄기세포로부터 근골격계 조직을 조직공학적으로 재생하는데 유용할 뿐만 아니라 다른 조직이나 장기를 재생하는데도 효과적으로 확대 적용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0020] 본 발명에 따른 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조방법은 하기 단계를 포함한다:

[0021] 1) 생분해성 고분자, 탄산염과 유기산의 비등성 혼합물 및 생리활성물질을 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조한 후 이로부터 용매를 증발시켜 내부에 상기 생리활성물질을 함유하는 고분자 시편을 획득하는 단계;

[0022] 2) 상기 고분자 시편을 알코올 수용액에 담가 발포시킨 후 건조시켜 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하는 단계;

[0023] 3) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체를 반응성 기체로 플라즈마 처리한 후 표면에 카르복실기 함유 친수성 단량체를 그래프트(graft) 중합시켜 소수성 표면을 친수성으로 개질하는 단계;

[0024] 4) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 카르복실기를 활성화시킨 후 활성화된 카르복



실기에 히파린을 고정시키는 단계;

- [0025] 5) 상기 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 고정된 히파린에 생리활성물질을 결합시키는 단계.
- [0026] 상기 방법에 의해 제조된 인 시튜(*in situ*) 조직재생용 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 근골격계 조직재생을 유도할 수 있도록 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 각각 고분자 지지체의 내부에 포함되고 그의 표면에 결합되어 있어 기존 고분자 지지체에 비해 현저히 향상된 세포친화성, 생체 적합성 및 세포분화능을 나타내기 때문에, 생체 조직 내에서 직접 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있다는 특징을 갖는다.
- [0027] 이하에서는 본 발명에 따른 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0028] 단계 1)은 다공성 고분자 지지체를 제조하는 단계로, 먼저 생분해성 고분자, 탄산염과 유기산의 비등성 혼합물 및 생리활성물질을 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조한다. 이때 고분자 용액은 고분자 용액의 총 중량을 기준으로 4.5 내지 15 중량%의 생분해성 고분자, 80 내지 95 중량%의 비등성 혼합물 및 0.0001 내지 5 중량%의 생리활성물질을 5 내지 50 중량%의 용매에 혼합하여 제조된다.
- [0029] 상기 단계 1)은 본 발명에 따른 제조방법의 특징적인 단계로서, 기존 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조 시에는 생분해성 고분자 및 비등성 혼합물만을 용매에 혼합하여 고분자 용액을 제조하였으나, 본 발명에서는 상기 성분들과 함께 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 생리활성물질을 첨가하여 최종적으로 수득되는 다공성 생분해 고분자 지지체의 내부에 상기 생리활성물질이 포함되게 함으로써 인 시튜(*in situ*)에서 근골격계 조직재생의 보다 효과적인 유도를 가능케 한다.
- [0030] 단계 1)에 사용될 수 있는 생분해성 고분자로는 생체 내에서 분해될 수 있는 고분자라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르, 이들의 유도체, 이들의 공중합체 등이 사용될 수 있다. 그 중에서도 미국 식품의약청(FDA)으로부터 인체에 사용 가능한 생분해성 고분자로 승인되어 사용되고 있는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산-글리콜산(PLGA) 공중합체 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 보다 바람직하다. 상기 생분해성 고분자는 중량 평균 분자량이 5,000 내지 2,000,000 범위인 것을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 단계 1)에서 기공 형성을 위해 사용되는 비등성 혼합물은 탄산염과 유기산이 1:1 내지 1:3의 범위로 혼합되어 있는 혼합물로서, 이들은 약학적으로 허용가능하고 인체에 무해한 물질임과 동시에 물에 쉽게 용해되고 일정한 입자 크기를 갖는다. 본 발명에 적합한 탄산염으로는 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 탄산수소암모늄, 탄산암모늄, 탄산수소칼륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘 등과 같이 이산화탄소를 발생하는 탄산염을 예로 들 수 있다. 또한 본 발명에 적합한 유기산으로는 구연산(citric acid), 주석산(tartaric acid), 석신산(succinic acid), 말레산(maleic acid), 푸마르산(fumaric acid), 말론산(malonic acid), 말산(malic acid), 글루콘산(gluconic acid), 점액산(mucic acid), 아미노산 등을 예로 들 수 있다. 이때 상기한 탄산염과 유기산의 비등성 혼합물의 입자 크기를 달리하는 경우, 이후의 단계에서 상기 고분자 용액을 발포하여 건조시키면 상대적으로 작은 직경의 기공과 상대적으로 큰 직경의 기공이 형성되어 있는 이중기공 구조를 갖는 다공성 생분해 고분자 지지체가 수득된다.
- [0032] 단계 1)에 적합한 생리활성물질로는 근골격계 조직재생을 유도할 수 있고 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 물질이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 덱사메타손(dexamethasone), 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate), 아스코르베이트-2-포스페이트(ascorbate-2-phosphate), 아스코베이트(ascobate), 탈염 골 기질(demineralized bone matrix, DBM), 하이드록시아파타이트(HAP), 아스코르브산(ascorbic acid), 1,25-다이하이드록시비타민 D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), 트라이칼슘포스페이트 (TCP), 콜라겐, 부갑상선 호르몬(PTH), PTH 1-34 펩타이드, 레티노산-감수성 단백질(CD-RAP) 등이 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 적합한 생리활성물질로 세포친화성 리간드 펩타이드 또는 생체 내에서 근골격계 세포로의 분화를 유도하는 성장인자를 포함할 수 있다. 이러한 리간드 펩타이드로는 Arg-Gly-Asp(RGD), Arg-Glu-Asp-Val(REDV), Leu-Asp-Val(LDV), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR), Pro-Asp-Ser-Gly-Arg(PDSGR), Ile-Lys-Val-Ala-Val(IKVAV), Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ala (RNIAEIIKDA) 등을 예로 들 수 있고, 이들 중에서 RGD와 PDSGR은 거의 모든 세포에 대한 점착성을 향상시키며, REDV와 LDV는 혈관내피세포의 증식을, YIGSR은 혈관세포의 증식을, IKVAV 및 RNIAEIIKDA는 신경세포의 증식을 각각 증가시킨다. 또한, 본 발명에 적합한 성장인자로는 전환 성장인자(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 표피세

포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 신경세포 성장인자(neuron growth factor, NGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 골 형태형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 성장 분화유발 인자(growth differentiation factor, GDF) 등을 예로 들 수 있다.

[0033] 단계 1)에 적합한 용매는 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매를 단독으로 사용하거나, 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매와 생분해성 고분자를 용해시킬 수는 없지만 상기 용매와는 섞일 수 있는 비용매와의 혼합물 형태로 사용할 수 있다. 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매를 단독으로 사용하는 경우에는, 제조된 고분자 용액을 발포하여 건조시키면 단일기공 구조를 갖는 다공성 생분해 고분자 지지체가 수득된다. 반면, 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매와 생분해성 고분자를 용해시킬 수는 없지만 상기 용매와는 섞일 수 있는 비용매와의 혼합물 형태로 사용하는 경우에는, 제조된 고분자 용액을 발포하여 건조시키면 이중기공 구조를 갖는 다공성 생분해 고분자 지지체가 수득된다. 상기한 바와 같이, 고분자 용액의 용매 선택을 달리하여 다공성 생분해 고분자 지지체의 기공 구조를 조절할 수 있다.

[0034] 본 발명에서 생분해성 고분자를 용해시킬 수 있는 용매로는 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 다이클로로메탄, 아세톤, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란, 이들의 혼합물 등이 사용될 수 있고, 생분해성 고분자를 용해시킬 수는 없지만 상기 용매와는 섞일 수 있는 비용매로는 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤, 이들의 혼합물 등을 예로 들 수 있다. 용매와 비용매의 혼합물이 사용되는 경우, 용매와 비용매의 혼합비는 부피비로 80:20 내지 95:5 범위인 것이 바람직하다.

[0035] 상기와 같이 제조된 고분자 용액을 -196℃ 내지 상온에서 1 내지 24시간 동안 방치하여 용매가 증발되도록 함으로써 내부에 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 생리활성물질을 함유하는 고분자 시편을 얻는다.

[0036] 단계 2)는 단계 1)에서 수득된 고분자 시편을 알코올 수용액에 담가 발포시킨 후 건조시켜 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하는 단계로, 이 단계에 적합한 알코올 수용액은 에탄올, 메탄올, 아이소프로판올, 이들의 혼합물 등의 알코올이 물과 50:50 내지 70:30의 부피비로 혼합된 것을 예로 들 수 있다. 단계 1)에서 수득된 고분자 시편을 상기한 바와 같은 알코올 수용액에 담그고, 예를 들면, 교반기로 교반하는 것과 같은 물리적인 방법을 병행하여 CO<sub>2</sub> 가스를 발생시켜 발포시킨 후 이를 꺼내어 건조시킴으로써 내부뿐만 아니라 그의 표면에도 상호연결성이 높은 기공 구조가 형성된 다공성 생분해 고분자 지지체가 제조된다. 단계 1)에서 고분자 용액의 제조 시 단일 용매의 사용, 용매와 비용매의 혼합 사용, 입자 크기가 다른 비등성 혼합물의 사용 등에 의해 이 단계에서 수득되는 다공성 생분해 고분자 지지체는 균일한 크기의 기공들이 고분자 지지체 전체에 분포되어 있는 단일기공 구조 또는 상대적으로 큰 크기의 기공들이 고분자 지지체 전체에 분포되어 있고 그 기공들을 연결하는 벽 부분에 상대적으로 작은 크기의 기공들이 분포되어 있는 이중기공 구조를 가질 수 있다.

[0037] 상기 단계 1) 및 2)의 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조과정은 염침출법, 상분리법, 냉동법, 유화냉동건조법 등과 같은 종래의 방법에 비하여 고분자 지지체를 보다 간단하게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 기공 크기의 조절이 용이하고, 표면적과 다공도가 높은 기공간 개방 구조를 형성시킬 수 있으며, 특히, 제조되는 지지체 표면의 기공 막힘 현상과 유해 물질의 분비 및 잔존 현상을 해결할 수 있어서 지지체의 효용성을 크게 높일 수 있다. 상기 단계 2)가 완결된 후에 얻어지는 다공성 생분해 고분자 지지체는 10 내지 500 μm 범위의 기공 크기, 100 내지 500 cm<sup>2</sup>/g의 높은 단위 부피당 표면적 및 90 내지 98%의 높은 다공도를 갖는다. 뿐만 아니라, 상기 다공성 생분해 고분자 지지체는 내부에 근골격계 조직재생을 유도할 수 있도록 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 생리활성물질을 포함하기 때문에, 고분자 지지체와 줄기세포를 체외 배양한 후 세포/고분자 구조물 형태로 이식하지 않고 바로 고분자 지지체와 줄기세포를 함께 체내에 이식하여도 조직 내에서 직접 줄기세포로부터 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있다는 장점을 갖는다.

[0038] 단계 3)은 단계 2)에서 제조된 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면을 반응성 기체로 플라즈마 처리한 후 표면에 카르복실기 함유 친수성 단량체를 그래프트(graft) 중합시키는 단계이다. 이 단계에서 플라즈마 처리에 적합한 반응성 기체로는 헬륨(He), 아르곤(Ar), 질소(N<sub>2</sub>), 산소(O<sub>2</sub>), 수소(H<sub>2</sub>), 이산화탄소(CO<sub>2</sub>), 일산화탄소(CO), 암모니아(NH<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>O, 이들의 혼합물 등을 예로 들 수 있다. 이러한 반응성 기체를 이용하여 10 내지 300 mtorr 범위의 압력 하에서 10 내지 100 W/cm<sup>2</sup>의 출력으로 30 내지 300초간 플라즈마 처리를 수행한다. 이때 라디오 주파수(radio frequency, RF) 전원, MF 전원, 직류(direct current, DC) 전원, 마이크로파(microwave, MW) 전원 등의 플라즈마 전원 종류에 관계없이 모두 사용 가능하다. 이러한 플라즈마 표면 처리에 의해 다공성 생분해

고분자 지지체의 소수성 표면이 친수성으로 개질된다.

- [0039] 상기에서 친수성으로 개질된 다공성 생분해 고분자 지지체에 카르복실기(-COOH) 함유 친수성 단량체를 그래프트 중합시키는데, 이에 적합한 카르복실기 함유 친수성 단량체로는 아크릴산(acrylic acid), 메타크릴산(methacrylic acid), 말레산(maleic acid), 이타콘산(itaconic acid), 아코니트산(aconitic acid) 등을 예로 들 수 있다. 이때, 다공성 생분해 고분자 지지체에 카르복실기 함유 친수성 단량체를 100:1 내지 500:1의 몰비로 그래프트 중합시키는 것이 바람직하다. 다공성 생분해 고분자 지지체에 대한 카르복실기 함유 친수성 단량체의 몰비가 너무 낮으면 고분자 지지체의 내부까지 친수성 단량체가 중합되지 않을 수가 있는 반면, 이의 몰비가 너무 높으면 고분자 지지체의 표면에 적정 수준 이상의 카르복실기가 중합되는 문제점이 발생할 수 있다. 카르복실기 함유 친수성 단량체로서 아크릴산을 사용하는 경우에는 플라즈마 챔버 내에서 직접 그래프트 중합을 실시하는 것이 바람직하고, 그 밖의 카르복실기 함유 친수성 단량체를 사용하는 경우에는 플라즈마로 처리하여 먼저 라디칼을 형성시키고, 이를 공기 중에서 안정화한 다음 수용액 중에서 그래프트 중합을 실시하는 것이 바람직하다.
- [0040] 단계 4)에서는 먼저 단계 3)에서 표면에 카르복실기 함유 친수성 단량체가 그래프트 중합된 다공성 생분해 고분자 지지체를 커플링제의 존재 하에서 완충용액에 4 내지 37℃에서 30분 내지 24시간 동안 침지시켜 상기 카르복실기를 활성화시킨다. 상기 활성화 단계에 적합한 완충용액으로는 2-몰포리노에탄설폰산(2-morpholinoethane sulfonic acid, MES), 프로판설폰산(propanesulfonic acid, MOPS), 트라이에틸렌아민 (triethylene amine) 등을 예로 들 수 있고, 이에 적합한 커플링제로는 1-에틸렌-3-(3-다이메틸아미노-프로필)카르보다이이미드(1-ethylene-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide, EDC), N-하이드록실석시니미드(N-hydroxyl-succinimide, NHC), N,N-다이사이클로헥실카르보다이이미드(N,N-dicyclohexylcarbodiimide, DCC), 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스피닉 클로라이드(bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride, BOP-Cl), 다이석시니미딜 카보네이트(disuccinimidyl carbonate, DSC), N,N-다이아이소프로필카보이미드(N,N-diisopropylcarboimide, DIPC), 4-p-아지도살리실아미드-부틸아민(4-(p-azidosalicylamido)-butylamine, ASBA) 등을 예로 들 수 있다.
- [0041] 상기 과정에 의해 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 카르복실기가 활성화되면, 이 카르복실기와 헤파린의 아민기 사이에서 공유결합을 형성하여 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 헤파린을 고정시킨다. 상기에서 헤파린은 이후 단계에서 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 세포친화성을 향상시킬 수 있는 생리활성물질을 결합시키기 위한 링커(linker)로 사용된다. 헤파린을 사용하지 않고 생리활성물질을 직접 고분자 지지체 표면에 결합시키는 것보다 본 발명에서와 같이 헤파린을 통해 생리활성물질을 고분자 지지체 표면에 결합시키면, 링커로 사용된 헤파린에 의해 생리활성물질에 유동성이 부여되므로 고분자 지지체가 체내에 이식되었을 때 표면에 결합된 생리활성물질이 주변의 세포막 수용체와 보다 효과적으로 상호작용을 수행할 수 있다. 뿐만 아니라, 헤파린의 관능기를 이용하여 다양한 생리활성물질을 도입할 수 있다는 측면에서도 바람직하다.
- [0042] 상기에서 헤파린은 천연 헤파린, 재조합 헤파린 또는 헤파린 유도체일 수 있고, 다공성 생분해 고분자 지지체에 헤파린을 100:1 내지 500:1의 몰비로 고정시키는 것이 바람직하다. 다공성 생분해 고분자 지지체에 대한 헤파린의 몰비가 너무 낮으면 고분자 지지체 표면에 도입될 수 있는 생리활성물질의 양도 감소할 수 있는 반면, 이의 몰비가 너무 높으면 헤파린의 특성상 체내 혈액응고를 방해하여 다른 질병을 유발할 수 있다는 문제점이 있다.
- [0043] 단계 4)에서 활성화된 카르복실기를 통해 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 헤파린을 고정시키는 과정은 이후 단계 5)에서 상기 고분자 지지체의 표면에 생리활성물질로 리간드 펩타이드가 도입되는 경우에는 생략될 수 있다. 리간드 펩타이드는 헤파린을 링커로 사용하지 않아도 다공성 생분해 고분자 지지체 표면의 카르복실기와 직접 화학적 공유결합을 형성할 수 있기 때문에 상기와 같은 헤파린 고정화 과정을 거치지 않고 간단하게 다공성 고분자 지지체에 도입될 수 있다.
- [0044] 단계 5)는 단계 4)에서 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린을 링커로 이용하여 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 생리활성물질을 결합시키는 단계로, 표면에 헤파린이 고정된 다공성 생분해 고분자 지지체를 세포친화성을 향상시킬 수 있는 생리활성물질이 용해되어 있는 완충용액에 4 내지 30℃에서 1 내지 24시간 동안 침지시켜 수행된다. 이때 표면에 헤파린이 고정된 다공성 생분해 고분자 지지체 1 g에 대하여 0.01 내지 50 나노몰(nmol)의 양으로 생리활성물질을 결합시키는 것이 바람직하다. 다공성 생분해 고분자 지지체에 대한 생리활성물질의 몰비가 너무 낮거나 높으면 근골격계 조직재생을 유도하는데 문제점이 발생할 수 있다.

[0045] 이 단계에 적합한 생리활성물질로는 근골격계 조직재생을 유도할 수 있고 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 물질이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 덱사메타손(dexamethasone), 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate), 아스코르베이트-2-포스페이트(ascorbate-2-phosphate), 아스코베이트(ascorbate), 탈염 골 기질(demineralized bone matrix, DBM), 하이드록시아파타이트(HAP), 아스코르브산(ascorbic acid), 1,25-다이하이드록시비타민 D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), 트라이칼슘포스페이트 (TCP), 콜라겐, 부갑상선 호르몬(PTH), PTH 1-34 펩타이드, 레티노산-감수성 단백질(CD-RAP) 등이 사용될 수 있다. 또한 세포친화성 리간드 펩타이드 또는 생체 내에서 근골격계 세포로의 분화를 유도하는 성장인자가 생리활성물질로 사용될 수 있다. 이러한 리간드 펩타이드로 Arg-Gly-Asp(RGD), Arg-Glu-Asp-Val(REDV), Leu-Asp-Val(LDV), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR), Pro-Asp-Ser-Gly-Arg(PDSGR), Ile-Lys-Val-Ala-Val(IKVAV), Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ala (RNIAEIIKDA) 등을 예로 들 수 있고, 이들 중에서 RGD와 PDSGR은 거의 모든 세포에 대한 점착성을 향상시키며, REDV와 LDV는 혈관내피세포의 증식을, YIGSR은 혈관세포의 증식을, IKVAV 및 RNIAEIIKDA는 신경세포의 증식을 각각 증가시킨다. 또한, 본 발명에 적합한 성장인자로는 전환 성장인자(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 신경세포 성장인자(neuron growth factor, NGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 골 형태형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 성장 분화유발 인자(growth differentiation factor, GDF) 등을 예로 들 수 있다. 이 단계에서 고분자 지지체의 표면에 결합되는 생리활성물질은 단계 1)에서 고분자 지지체의 내부에 포함되는 생리활성물질과는 다른 종류인 것이 바람직하다.

[0046] 전술한 바와 같은 본 발명의 제조방법은, 1) 고분자 지지체를 제조하는 과정에서 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 생리활성물질을 첨가하여 그의 내부에 상기 생리활성물질이 포함된 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하고, 2) 제조된 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면에 관능기로 카르복실기를 도입하고, 3) 다공성 생분해 고분자 지지체 표면에 직접 펩타이드를 결합시키거나 생리활성물질의 효율적인 도입을 위하여 링커로서 헤파린을 상기 카르복실기에 고정시키고, 4) 상기 지지체 표면에 고정된 헤파린을 링커로 이용하여 세포분화능 및 세포친화성이 우수한 상기와 다른 생리활성물질을 결합시켜, 그의 내부 및 표면에 서로 다른 종류의 생리활성물질을 포함하여 근골격계 조직재생을 효과적으로 유도할 수 있는 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하는 것을 특징으로 한다.

[0047] 상기 방법에 의해 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 그의 내부 및 표면에 근골격계 조직재생을 유도할 수 있도록 세포분화능 및 생체친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질이 함유되어 있어 세포친화성, 생체적합성 뿐만 아니라 세포분화능이 우수하기 때문에, 생체 조직 내에서 직접 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있다. 생체 조직 내에서 인시튜(*in situ*) 조직재생이 가능하다는 것은, 종래의 고분자 지지체는 줄기세포를 파종한 후 체외에서 일정 기간 배양하여 고분자 지지체와 줄기세포의 복합 구조물을 형성한 후 이를 생체 내에 이식하여 근골격계 조직재생을 유도하는 것과는 달리, 번거로운 체외 배양 없이 고분자 지지체와 줄기세포를 직접 생체 내에 이식하여도 이식 부위에서 고분자 지지체 내부 및 표면에 존재하는 생리활성물질에 의해 줄기세포의 증식 및 분화가 효과적으로 이루어져 근골격계 조직재생을 유도할 수 있음을 의미한다. 이처럼 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 그의 내부에서 생리활성물질을 포함하여 생체 조직 내에서 직접 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 유도할 수 있는 고분자 지지체는 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 최초이다. 또한, 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 상기한 바와 같은 우수한 생체친화성, 생체적합성 및 세포분화능 뿐만 아니라 일정 범위의 기공 크기, 높은 단위 부피당 표면적 및 높은 다공도를 가지고 있어 줄기세포로부터 근골격계 조직을 조직공학적으로 재생하는데 유용할 뿐만 아니라 다른 조직이나 장기를 재생하는데도 효과적으로 확대 적용될 수 있다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0049] **실시예 1:**

[0050] 락트산(lactic acid)과 글리콜산(glycolic acid)을 50:50의 중량비로 함유하고 분자량이 약 110,000인 폴리락트-글리콜산 공중합체(PLGA)를 중량비 85:15의 다이옥산과 물의 혼합용액에 첨가한 후, 자석교반기를 이용하여

골고루 교반하여 완전히 용해시켜 균질한 PLGA 용액을 제조하였다. 10 내지 50  $\mu\text{m}$ 과 200 내지 300  $\mu\text{m}$  1:5 중량비의 탄산수소나트륨과 구연산이 3:1의 몰비로 혼합된 비등성 혼합물을 상기에서 제조된 PLGA 용액에 비등성 혼합물:PLGA 용액의 중량비가 20:1이 되도록 첨가하고, 생리활성물질인 텍사메타손을 상기 혼합용액에 0.5 중량%가 되도록 첨가한 후 균일하게 혼합하였다. 이 혼합용액을 원하는 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 그대로 약 30분간 방치하여 용매를 증발시킨 후 디스크 형태의 고분자 시편을 제조하였다. 이 디스크 형태의 고분자 시편을 물과 에탄올의 부피비가 50:50인 에탄올 수용액에 담그고 초기에 초음파 처리를 하면서 2시간 정도 발포시킨 후 이를 꺼내어 다시 24시간 동안 동결 건조시켜 이중기공이 형성된 다공성 생분해 고분자 지지체를 수득하였다. 이어서 고분자 지지체의 표면을 개질하기 위해, 먼저 아르곤 플라즈마를 처리하여 고분자 지지체의 표면을 활성화시킨 후 아크릴산을 플라즈마로 주입하여 표면에 그래프트 중합시켜 고분자 지지체의 소수성 표면을 친수성으로 개질시켰다. 상기와 같이 친수화된 고분자 지지체에 EDC(1-ethylene-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) 및 NHC(N-hydroxyl-succinimide)를 처리하여 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 아크릴산의 카르복실기를 활성화시킨 후 4°C에서 헤파린이 1 중량%로 함유된 MES 용액(pH 5.6)에 2시간 동안 침지시켜 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시켰다. 이 고분자 지지체를 꺼내어 다시 37°C에서 생리활성물질인 TGF- $\beta$ 1이 150 ng/ml로 함유된 PBS 용액(pH 7.4)에 2시간 동안 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린에 TGF- $\beta$ 1을 결합시켜 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0051] 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)으로 분석한 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 외부 표면과 내부 단면에서 다공성의 형태 및 분포가 거의 동일한 이중기공 구조를 가지며, 다공질의 크기는 작은 기공은 10 내지 50  $\mu\text{m}$ , 큰 기공은 200 내지 300  $\mu\text{m}$ 를 나타내었다. 또한 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 외부 표면의 막힘 현상이 관찰되지 않고 기공간 상호연결성이 높은 연속 오픈 구조를 가지고 있음을 확인하였다.

[0052] 전자분광 화학분석법(electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA) 및 에너지 분산형 분광기(energy dispersive spectrometer, EDAX) 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 이중기공 구조 내부에 텍사메타손이 잘 함유되어 있고, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석에 의해 상기 고분자 지지체의 표면에 성장인자인 TGF- $\beta$ 1이 결합되어 있음을 확인하였다.

[0053] 골수줄기세포를 이용하여 세포 분화거동을 조사한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 이중기공 구조 내부에 생리활성물질을 함유하고 있는 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 생리활성물질 미함유 고분자 지지체(비교예 1)와 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체(비교예 2)보다 우수한 연골 세포 분화거동을 나타내었다.

[0054] 또한 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 인 시튜(*in situ*) 조직재생 유도효과를 확인하기 위하여, 상기 고분자 지지체에 골수줄기세포를 접종한 후 바로 누드마우스의 피하조직에 이식하고 4주 후에 다시 고분자 지지체를 조직에서 적출하였다. 적출된 고분자 지지체를 SEM으로 관찰하여 본 발명에 따른 다공성 생분해 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 내부에까지 골수줄기세포로부터 분화된 세포가 고르게 분포하고 있음을 확인하였다. 또한 적출된 고분자 지지체 상에 줄기세포로부터 분화된 세포가 연골세포인지를 확인하기 위하여 연골세포 특이적인 유전자인 타입 II 콜라겐의 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 통해 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 그의 내부에 분화된 세포에서 연골세포 특이적인 유전자인 타입 II 콜라겐의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 세포분화능 및 생체친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질을 각각의 그의 표면 및 내부에 포함하고 있어 생체 조직 내에서 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 보다 효과적으로 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0055] 실시예 2:

[0056] 실시예 1과 동일한 방법으로 텍사메타손이 함유된 이중기공 구조를 갖는 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하여 플라즈마 처리 후 그의 표면에 아크릴산을 그래프트 중합시키고, 상기 아크릴산의 카르복실기를 활성화시킨 다음 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시켰다. 이어서 제조된 다공성 생분해 고분자 지지체를 37°C에서 골 형태형성 단백질의 일원인 BMP-2가 200 ng/ml로 함유된 PBS 용액(pH 7.4)에 2시간 동안 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린에 BMP-2를 결합시켜 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0057] SEM 분석 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 외부 표면과 내부 단면에서 다공성

의 형태 및 분포가 거의 동일한 이중기공 구조를 가지며, 다공질의 크기는 작은 기공은 10 내지 50  $\mu\text{m}$ , 큰 기공은 200 내지 300  $\mu\text{m}$ 를 나타내었다. ESCA 및 EDAX 분석과 ELISA 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 이중기공 구조 내부에 텍사메타손이 잘 함유되어 있고, 그의 표면에는 BMP-2가 결합되어 있음을 확인하였다. 지방줄기세포를 이용하여 세포 분화거동을 조사한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 이중기공 구조 내부에 생리활성물질을 함유하고 있는 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 생리활성물질 미함유 고분자 지지체(비교예 1)와 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체(비교예 2)보다 우수한 연골세포 분화거동을 나타내었다.

[0058] 또한 상기 실시예 1에서와 같이 본 발명에 따른 다공성 생분해 고분자 지지체에 지방줄기세포를 접종한 후 바로 누드마우스의 피하조직에 이식하여 4주간 세포분화를 유도한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 내부에까지 지방줄기세포로부터 분화된 세포가 고르게 분포되어 있으며, 이렇게 분화된 세포가 연골세포임을 확인하였다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 세포분화능 및 생체친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질을 각각의 그의 표면 및 내부에 포함하고 있어 생체 조직 내에서 근 골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 보다 효과적으로 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0059] **실시예 3:**

[0060] 분자량이 약 100,000인 폴리-L-락트산(PLLA)이 5 중량%의 농도로 메틸렌 클로라이드에 용해되어 있는 PLLA 용액에, 200 내지 300  $\mu\text{m}$  크기의 탄산나트륨과 주석산이 3:1 몰비로 혼합되어 있는 비등성 혼합물을 중량비가 5:1 (비등성 혼합물:PLLA 용액)이 되도록 첨가하고 베타-글리세로포스페이트를 1 중량%로 첨가한 후 균일하게 혼합하여 고분자 용액을 제조하였다. 상기 고분자 용액을 원하는 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 그대로 약 30분간 방치하여 용매를 증발시킨 후 디스크 형태의 고분자 시편을 제조하였다. 이 디스크 형태의 고분자 시편을 물과 에탄올의 부피비가 50:50인 에탄올 수용액에 넣고 초기에 초음파 처리를 하면서 2시간 정도 비등(발포) 과정을 거친 후 이를 꺼내어 40°C에서 2시간 동안 진공 건조시켜 단일기공 고분자 지지체를 얻었다. 이렇게 얻어진 고분자 지지체의 표면에 산소 플라즈마를 처리하여 활성화시킨 후, 메타크릴산을 그래프트 중합하여 고분자 지지체의 표면에 카르복실기를 도입하였다. 이어서 상기 고분자 지지체를 4°C에서 헤파린을 1 중량%로 함유된 MES 용액(pH 5.6)에 2시간 동안 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 메타크릴산의 카르복실기를 활성화시킴과 동시에 활성화된 카르복실기에 헤파린을 고정시켰다. 이 고분자 지지체를 꺼내어 다시 37°C에서 BMP-2가 200 ng/ml로 함유된 PBS 용액(pH 7.4)에 2일간 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 고정된 헤파린에 BMP-2를 결합시켜 지능형 단일기공 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0061] SEM 분석 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 다공질의 크기가 200 내지 300  $\mu\text{m}$ 의 단일기공으로 지지체 외부 표면의 막힘 현상이 관찰되지 않고 기공간 상호연결성이 높은 연속 기공구조를 가짐을 확인하였다. ESCA 및 EDAX 분석과 ELISA 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 단일기공 구조 내부에 베타-글리세로포스페이트가 잘 함유되어 있고, 그의 표면에는 BMP-2가 결합되어 있음을 확인하였다. 제대혈 줄기세포를 이용하여 세포 분화거동을 조사한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 단일기공 구조 내부에 생리활성물질을 함유하고 있는 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 생리활성물질 미함유 고분자 지지체(비교예 1)와 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체(비교예 2)보다 골세포 특이적인 유전자인 타입 I 콜라겐의 발현이 증가하는 우수한 골세포 분화거동을 나타내었다.

[0062] **실시예 4:**

[0063] 분자량이 약 100,000인 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤(PCL)이 10 중량%의 농도로 테트라하이드로퓨란에 용해되어 있는 PCL 용액에, 탄산수소암모늄과 석신산이 3:1의 몰비로 혼합되어 있는 2가지 크기(10 내지 50  $\mu\text{m}$  및 300 내지 400  $\mu\text{m}$ )의 비등성 혼합물을 중량비가 85:15(비등성 혼합물:PCL 용액)가 되도록 첨가하고 탈염 골 기질(DBM)을 1 중량%로 첨가한 후 균일하게 혼합하여 고분자 용액을 제조하였다. 상기 고분자 용액을 원하는 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 그대로 약 30분간 방치하여 용매를 증발시킨 후 디스크 형태의 고분자 시편을 제조하였다. 이후의 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하여 지능형 이중기공 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0064] SEM 분석 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 외부 표면과 내부 단면에서 다공성의 형태 및 분포가 거의 동일한 이중기공 구조를 가지며, 다공질의 크기는 작은 기공은 10 내지 50  $\mu\text{m}$ , 큰 기공은 200 내지 300  $\mu\text{m}$ 를 나타내었다. ESCA 및 EDAX 분석과 ELISA 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생

분해 고분자 지지체의 이중기공 구조 내부에 탈염 골 기질이 잘 함유되어 있고, 그의 표면에는 TGF-β1이 결합되어 있음을 확인하였다.

[0065] 또한 상기 실시예 1에서와 같이 본 발명에 따른 다공성 생분해 고분자 지지체에 지방줄기세포를 접종한 후 바로 누드마우스의 피하조직에 이식하여 4주간 세포분화를 유도한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 내부에까지 지방줄기세포로부터 분화된 세포가 고르게 분포되어 있으며, 이렇게 분화된 세포가 연골세포임을 확인하였다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 세포분화능 및 생체친화성이 우수한 서로 다른 종류의 생리활성물질을 각각의 그의 표면 및 내부에 포함하고 있어 생체 조직 내에서 근골격계의 인 시튜(*in situ*) 조직재생을 보다 효과적으로 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0066] 실시예 5:

[0067] 분자량이 약 100,000인 폴리-ε-카프로락톤(PCL)이 10 중량%의 농도로 테트라하이드로퓨란에 용해되어 있는 PCL 용액에, 100 내지 300 μm 크기의 탄산수소칼륨과 푸마르산이 1:1의 몰비로 혼합되어 있는 비등성 혼합물을 중량비가 90:10(비등성 혼합물:PCL 용액)이 되도록 첨가하고 아스코르브산을 2 중량%로 첨가한 후 균일하게 혼합하여 고분자 용액을 제조하였다. 상기 고분자 용액을 원하는 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 그대로 약 30분간 방치하여 용매를 증발시킨 후 디스크 형태의 고분자 시편을 수득하였다. 이 고분자 시편을 물과 에탄올의 부피비가 5:95인 에탄올 수용액에 넣고 초기에 초음파 처리를 하면서 2시간 정도 비등(발포) 과정을 거친 후 이를 꺼내어 40℃에서 2시간 동안 진공 건조시켜 단일기공 고분자 지지체를 얻었다. 이후의 과정은 실시예 3과 동일하게 수행하여 지능형 단일기공 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0068] SEM 분석 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 다공질의 크기가 100 내지 300 μm의 단일기공으로 지지체 외부 표면의 막힘 현상이 관찰되지 않고 기공간 상호연결성이 높은 연속 기공구조를 가짐을 확인하였다. ESCA 및 EDAX 분석과 ELISA 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 단일기공 구조 내부에 아스코르브산이 잘 함유되어 있고, 그의 표면에는 BMP-2가 결합되어 있음을 확인하였다.

[0069] 또한 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체에 근육줄기세포를 접종한 후 바로 연골이 손상된 마우스의 무릎에 이식하여 8주간 세포분화를 유도한 결과, 생리활성물질 미함유 고분자 지지체(비교예 1)와 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체(비교예 2)가 이식된 경우보다 인 시튜(*in situ*) 조직재생 유도효과가 훨씬 우수함을 확인하였다.

[0070] 실시예 6:

[0071] 글리콜산과 ε-카프로락톤을 65:35 중량비로 함유하고 분자량이 약 220,000인 공중합체가 15 중량%의 농도로 클로로포름에 용해되어 있는 고분자 용액에, 100 내지 200 μm 크기의 탄산칼륨과 말레산이 2:1의 중량비로 혼합되어 있는 비등성 혼합물을 중량비가 95:5(비등성 혼합물:고분자 용액)가 되도록 첨가하고, 부갑상선 호르몬(PTH)을 0.5 중량%로 첨가한 후 균일하게 혼합하여 고분자 용액을 제조하였다. 상기 고분자 용액을 원하는 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 그대로 약 30분간 방치하여 용매를 증발시킨 후 디스크 형태의 고분자 시편을 제조하였다. 이 디스크 형태의 고분자 시편을 물과 에탄올의 부피비가 50:50인 에탄올 수용액에 넣고 초기에 초음파 처리를 하면서 2시간 정도 비등(발포) 과정을 거친 후 이를 꺼내어 40℃에서 2시간 동안 진공 건조시켜 단일기공 고분자 지지체를 얻었다. 이렇게 얻어진 고분자 지지체의 표면에 아르곤 플라즈마를 처리하여 활성화시킨 후, 아크릴산을 그래프트 중합하여 고분자 지지체의 표면에 카르복실기를 도입하였다. 이어서 상기 고분자 지지체를 4℃에서 커플링제로 EDC가 10 mg/ml 농도로 존재하는 MES 용액(pH 5.6)에 2시간 동안 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 그래프트 중합된 아크릴산의 카르복실기를 활성화시킨 후, 다시 37℃에서 리간드 펩타이드인 RGD가 10<sup>-3</sup> mole이 함유된 PBS 용액(pH 7.4)에 1시간 동안 침지시켜 고분자 지지체의 표면에 활성화된 카르복실기에 RGD를 결합시켜 지능형 단일기공 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0072] SEM 분석 결과, 상기와 같이 제조된 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체는 다공질의 크기가 100 내지 200 μm의 단일기공으로 지지체 외부 표면의 막힘 현상이 관찰되지 않고, 기공간 상호연결성이 높은 연속 기공구조를 가짐을 확인하였다. ESCA 및 EDAX 분석과 ELISA 분석에 의해 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체의 단일기공 구조 내부에 PTH가 잘 함유되어 있고, 그의 표면에는 RGD가 결합되어 있음을 확인하였다. 골수줄

기세포를 이용하여 세포 분화거동을 조사한 결과, 고분자 지지체의 표면뿐만 아니라 단일기공 구조 내부에 생리활성물질을 함유하고 있는 본 발명에 따른 지능형 다공성 생분해 고분자 지지체가 생리활성물질 미함유 고분자 지지체(비교예 1)와 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체(비교예 2)보다 우수한 골세포 분화 거동을 나타내었다.

[0073] **비교예 1:**

[0074] 다공성 생분해 고분자 지지체의 제조 시 생리활성물질로 텍사메타손과 TGF- $\beta$ 1을 사용하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 그의 표면뿐만 아니라 내부에 생리활성물질을 전혀 함유하지 않는 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0075] **비교예 2:**

[0076] 고분자 용액의 제조 시 생리활성물질로 텍사메타손을 사용하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 고분자 지지체의 표면에만 생리활성물질로 TGF- $\beta$ 1이 결합되어 있는 다공성 생분해 고분자 지지체를 제조하였다.

[0077] 상기 비교예 1 및 2에서 제조된 다공성 생분해 고분자 지지체를 대상으로 실시예 1과 동일하게 인 시튜(*in situ*) 조직재생 실험을 수행한 결과, 비교예 1의 생리활성물질 미함유 고분자 지지체가 이식된 경우에는 줄기세포로부터 연골이나 뼈세포로의 분화가 전혀 이루어지지 않았고, 비교예 2의 표면에만 생리활성물질이 결합되어 있는 고분자 지지체가 이식된 경우에는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화가 일부 관찰되었지만 인 시튜(*in situ*)에서 조직재생을 유도하기에는 매우 미미한 수준임을 확인하였다.

[0078] 이상으로 본 발명 내용의 특정 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.