



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0062666
(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3852 (2013.01)
A61L 27/222 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0147867
(22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김덕우
서울특별시 양천구 목동동로 130, 1410동 704호 (신정동, 목동신시가지아파트14단지)
(74) 대리인
특허법인태백

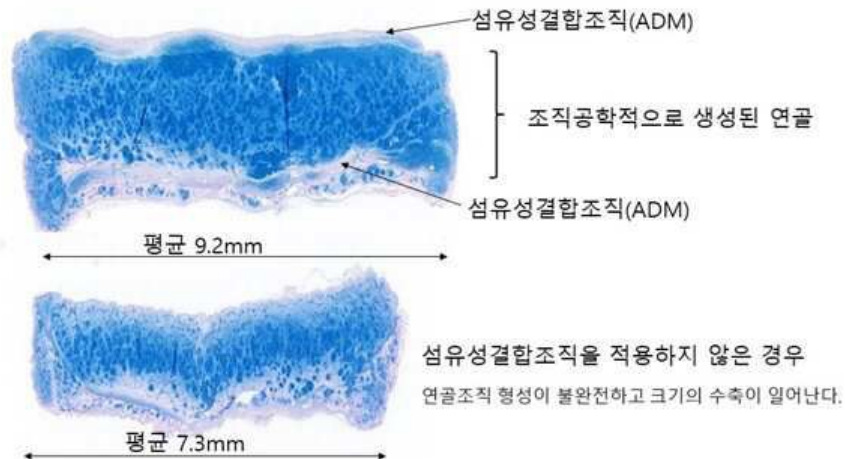
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 섬유성결합조직을 이용한 샌드위치 형태의 연골막 대체재

(57) 요약

본 발명은 섬유성결합조직을 이용한 샌드위치 형태의 연골막 대체재에 관한 것으로, 연골 바깥쪽에 섬유성결합조직을 붙여서 샌드위치 형태로 제조하는 연골막 대체재에 대한 것이다. 조직공학적으로 연골을 형성함에 있어서, 섬유성결합조직을 연골 외층에 적용함으로써 생체 내에서 연골형성의 안정성을 도모하고 변형을 방지하며, 강도를 증가시켜 인체에 적용 가능한 연골을 생성할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61L 27/3817 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

A61L 2430/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164121
과제번호	2020R1A2C1009216
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	인체 연골세포와 지방줄기세포를 이용한 판상형 연골 조직 생성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

분리된 연골세포를 배양하는 단계;

상기 배양된 연골세포 및 스캐폴드 용액을 혼합하는 단계; 및

상단의 섬유성결합조직층 및 하단의 섬유성결합조직층 사이에 상기 연골세포 및 스캐폴드 혼합액을 부어서 경화시키는 단계를 포함하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스캐폴드 용액은 젤라틴 용액인 것을 특징으로 하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 섬유성결합조직층은 무세포진피기질층(acellular dermal matrix; ADM)인 것을 특징으로 하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법.

청구항 4

상단의 섬유성결합조직층, 중간 연골세포-스캐폴드 혼합층 및 하단의 섬유성결합조직층으로 이루어진 샌드위치 형태의 연골막 대체재.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 스캐폴드는 젤라틴인 것을 특징으로 하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 섬유성결합조직층은 무세포진피기질층(acellular dermal matrix; ADM)인 것을 특징으로 하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유성결합조직을 이용한 샌드위치 형태의 연골막 대체재에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연골(cartilage)이란 연골세포와 그것을 둘러싸고 있는 다량의 기질로 이루어진 조직으로서, 칼슘을 주성분으로 한 뼈인 경골(또는 골조직)과 대응되는 개념이다. 연골의 작용에는 관절의 골단을 덮는 관절연골에서 볼 수 있는 것처럼 골단의 마찰을 방지하는 이외에 기관, 컷바퀴와 같이 탄력을 유지하거나, 늑연골, 치골결합 연골과 같이 압력에 대한 저항력을 주는 것 등을 들 수 있다. 연골은 무신경, 무혈관, 무임파성이며, 한번 손상되면 원래대로 복구되지 않는다. 예를 들어 무릎, 고관절 및 척관절과 같은 관절 내의 연골의 경우 충격의 흡수나 퇴행성 관절염 등에 따른 마모에 의하여 손상될 수 있으며, 이러한 경우 손상된 연골은 자연적으로 복구되지 않는다. 따라서 연골이 마모되거나 손상되는 경우 인공 연골부재나 체내에서 채취한 연골이나 인공적으로 배양한 연골을 이용하여 마모 또는 손상된 연골을 대체하여야 한다.

[0003] 조직공학적으로 연골조직을 만드는 시도가 많이 있으나, 안정적인 연골조직의 생성에는 아직 해결해야 할 문제가 많다. 연골 조직공학에 사용하는 스캐폴드로서 가장 효율이 좋은 것은 하이드로겔(hydrogel)인데 내구성이 좋지 못하여 변형이 일어나는 문제를 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 KR 10-2014-0104252 A (2014.08.28 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 섬유성결합조직을 이용한 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법 및 샌드위치 형태의 연골막 대체재를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 분리된 연골세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 연골세포 및 스캐폴드 용액을 혼합하는 단계; 및 상단의 섬유성결합조직층 및 하단의 섬유성결합조직층 사이에 상기 연골세포 및 스캐폴드 혼합액을 부어서 경화시키는 단계를 포함하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상단의 섬유성결합조직층, 중간 연골세포-스캐폴드 혼합층 및 하단의 섬유성결합조직층으로 이루어진 샌드위치 형태의 연골막 대체재를 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 섬유성결합조직을 이용한 샌드위치 형태의 연골막 대체재에 관한 것으로서, 연골 바깥쪽에 섬유성결합조직을 붙여서 샌드위치 형태로 제조하는 연골막 대체재에 대한 것이다. 조직공학적으로 연골을 형성함에 있어서, 섬유성결합조직을 연골 외층에 적용함으로써 생체 내에서 연골형성의 안정성을 도모하고 변형을 방지하며, 강도를 증가시켜 인체에 적용 가능한 연골을 생성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명에 따른 샌드위치 형태의 연골세포-스캐폴드-ADM(acellular dermal matrix) 복합체를 나타낸다.

도 2는 ADM을 적용한 경우 및 ADM을 적용하지 않은 경우에 생성된 연골에 대해 나타낸다.

도 3은 ADM을 적용하여 형성된 연골조직의 경우, 연골의 주요 구성 성분인 glycosaminoglycan과 type II collagen 함량이 월등히 높은 것으로 확인된 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 분리된 연골세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 연골세포 및 스캐폴드 용액을 혼합하는 단계; 및 상단의 섬유성결합조직층 및 하단의 섬유성결합조직층 사이에 상기 연골세포 및 스캐폴드 혼합액을 부어서 경화시키는 단계를 포함하는 샌드위치 형태의 연골막 대체재 제조방법을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 상기 스캐폴드 용액은 젤라틴 용액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 바람직하게는, 상기 섬유성결합조직층은 무세포진피기질층(acellular dermal matrix; ADM)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어 "스캐폴드"는 생체내에서 손상된 장기나 조직의 일부를 대체하며 이들의 기능을 보완 또는 대체할 수 있는 구조체를 의미하며, 스캐폴드가 기능과 역할을 충분히 수행할 때까지 유지된 후 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있는 생분해성 고분자 소재로 제조되는 것이 바람직하다.

[0014] 또한, 본 발명은 상단의 섬유성결합조직층, 중간 연골세포-스캐폴드 혼합층 및 하단의 섬유성결합조직층으로 이루어진 샌드위치 형태의 연골막 대체재를 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 스캐폴드 용액은 젤라틴 용액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 바람직하게는, 상기 섬유성결합조직층은 무세포진피기질층(acellular dermal matrix; ADM)일 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

<실험예>

하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

1. 인간 연골세포의 분리

인체의 제3늑연골을 환자에게서 채취한다. 채취한 늑연골을 PBS로 세척후 2mm 크기의 조각으로 잘게 자른다. 연골조직을 0.2% Pronase (Roche, Indianapolis, IN)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, Logan, UT, USA)에 넣어 37도에서 1시간 배양한다. 연골조직을 0.2% collagenase II를 함유한 DMEM 용액에 넣어 소화시킨다. 효소에 의해 소화된 연골조직을 1500RPM에서 10분간 원심분리하여 펠렛(pellet)을 얻는다. 펠렛을 다시 DMEM 용액으로 부유시키고 70 μ m 메쉬를 통과시켜 세포분획을 얻는다. 세포분획을 하룻밤 배양하고 부착된 세포를 모아서 2세대 계대 배양한다.

2. 연골세포-스캐폴드-ADM(acellular dermal matrix) 복합체 형성

연골세포 (3×10^6 cells)를 광결합성 젤라틴용액(Gelomics, Kelvin Grove, Australia)과 혼합한다. ADM (10mm $\times$ 10mm, 300 μ 두께) 조각을 직육면체 주형(10 mm $\times$ 10mm $\times$ 5mm) 바닥에 위치시키고 젤라틴-연골세포 혼합액을 붓는다. 다른 한 장의 ADM을 젤라틴 위에 올리고 photocrosslinker(Gelomics, Kelvin Grove, Australia)에 넣어 경화시킨다. 완성된 복합체는 ADM 사이에 세포-스캐폴드가 삽입된 형태의 샌드위치 모양이 된다(도 1). 비교분석을 위해서 ADM을 적용하지 않은 형태의 구조물도 제작한다.

3. In-vitro 배양

생성된 구조물을 연골형성 배양액(StemPro® chondrogenesis differentiation kit, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 넣고 37도 5% CO₂ 환경에서 3주간 배양한다. 배양액은 2~3일에 한번씩 교환한다.

4. 누드마우스에 이식

누드마우스를 마취하고 등 정중앙에 1cm 크기 피부 절개를 한다. ADM을 적용한 구조물과 적용하지 않은 구조물을 각각 좌측과 우측에 이식하고 피부를 봉합한다. 12주 후에 실험동물을 희생시키고 이식한 구조물을 꺼내어 분석한다.

5. 생성된 구조물의 분석

구조물을 절반으로 잘라 절반은 조직염색을 시행하고 절반은 세포외기질 분석을 시행하였다. 조직학적 분석은 H&E, alcian blue, Safranin O 염색을 시행하고 연골 형성 정도를 확인하고 및 생성된 연골의 크기를 측정하였다. 세포외기질으로 collagne type II 및 glycosaminoglycan 형성 정도를 ELISA 및 GAG assay kit을 사용하여 정량분석 하였다.

<실시예>

표 1에 나타낸 바와 같이, ADM을 적용한 경우 생성된 연골의 크기는 평균 9.2mm 였으며, 적용하지 않은 경우는 평균 7.4mm였다. 이는 통계적으로 유의미한 결과였다 ($p < 0.05$). 생성된 연골의 평균 두께는 ADM을 적용한 경우 1.35mm, 적용하지 않은 경우 1.39mm 였으나 통계적 의미는 없었다 ($p > 0.05$). 조직소견을 보면 ADM을 적용한 경우 각지고 직육면체 모양을 유지하는 반면에, ADM을 적용하지 않은 경우 모양의 변형이 심하고 수축하는 경향을 확인할 수 있었다. Alcian blue stain에서 연골기질 생성을 확인해 보면 ADM을 적용한 경우 스캐폴드가 모두 연골세포로 대체된 것을 확인할 수 있는 반면에 ADM을 적용하지 않은 경우는 일부분이 연골로 대체되지 않는 모습을 보이고 있었다(도 2).

표 1

생성된 연골 크기 분석			
	크기	두께	p vlaue
ADM을 적용한 경우	9.2mm	1.35mm	< 0.05

ADM을 적용하지 않은 경우	7.4mm	1.39mm	> 0.05
-----------------	-------	--------	--------

[0033] 또한, ADM을 적용하여 형성된 연골조직의 경우 연골의 주요 구성 성분인 glycosaminoglycan 과 type II collagen 함량이 월등히 높은 것으로 확인할 수 있다(도 3).

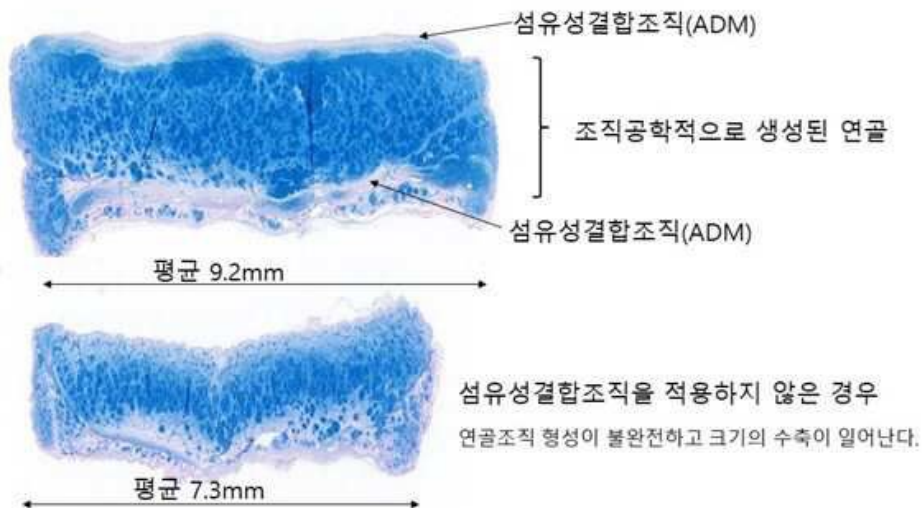
[0034] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

