

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2019/203385 A1

2019 년 10 월 24 일 (24.10.2019) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61F 2/30 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/005245

(22) 국제출원일: 2018 년 5 월 8 일 (08.05.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0044095 2018 년 4 월 16 일 (16.04.2018) KR

(71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)
[KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 박종오 (PARK, Jong Oh); 10210 경기도 고양시 일산서구 가좌2로 53, 604동 1802호, Gyeonggi-do

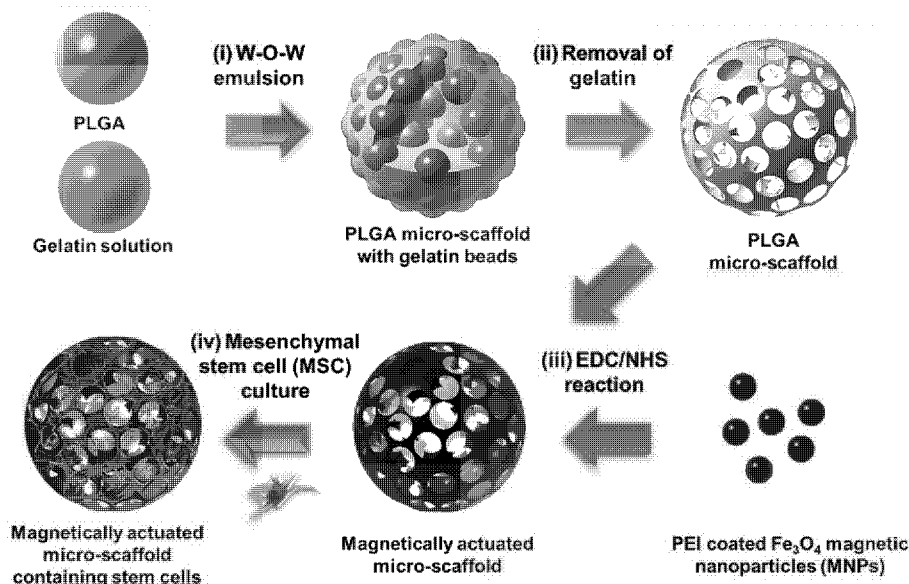
(KR). 최은표 (CHOI, Eunpyo); 61086 광주시 북구 첨단연신로 217, 103동 301호, Gwangju (KR). 김창세 (KIM, Chang-Sei); 61186 광주시 북구 용봉로 33, Gwangju (KR). 고광준 (GO, Gwangjun); 62285 광주시 광산구 산월로 80, 1302동 205호, Gwangju (KR). 유아미 (YOO, Ami); 61713 광주시 남구 서문대로622번길 7, 307동 1202호, Gwangju (KR). 김진 (ZHEN, Jin); 100080 북경시 5 이허위안 로드, 하이덴 쿤유, Beijing (CN).

(74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yun Ho); 06651 서울시 서초구 사임당로 28, 2층 나이스빌딩 올민국제특허법률사무소, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

(54) Title: MINIMALLY-INVASIVE MAGNETICALLY ACTUATED MICRO-SCAFFOLD FOR OSTEOCHONDRAL REGENERATION

(54) 발명의 명칭: 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체



(57) Abstract: The present invention relates to a minimally-invasive magnetically actuated micro-scaffold for cartilage regeneration, and more particularly, provides a cartilage regeneration composition comprising: a cartilage regeneration micro-scaffold in which magnetic particles and cartilage regeneration cells are loaded inside or on the surface of a three-dimensional porous microstructure, the porous microstructure consisting of biodegradable polymers and having a diameter of 200 to 300 μm ; and a bone regeneration micro-scaffold in which magnetic particles and bone regeneration cells are loaded inside or on the surface of a three-dimensional porous microstructure, the porous microstructure consisting of biodegradable polymers and having a diameter of 700 to 900 μm .

(57) 요약서: 본 발명은 최소 침습 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체에 관한 것으로 더 상세하게는 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 200 내지 300 μm 인 3 차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 연골 재생용 세포가 적재된 연골 재생용 마이크로지지체; 및 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 700 내지 900 μm 인 3 차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 골 재생용 세포가 적재된 골 재생용 마이크로지지체를 포함하는, 연골 재생용 조성물을 제공한다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/203385 A1



PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, 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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체 기술분야

- [1] 본 발명은 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체에 관한 것으로서, 더 상세하게는 손상된 골연골 부위에 순차적으로 타겟팅이 가능한 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세계적으로 고령화 사회 진입에 따라 골관절염(Osteoarthritis)의 발병이 증가하고 있으며, 세계보건기구(WHO)는 70세가 넘는 전 세계 사람들 중 40%가 골관절염으로부터 고통 받고 있다고 보고했다. 또한, 세계보건기구는 무릎과 고관절에서의 골관절염이 세계적으로 많이 앓는 11번째 질병이며, 꾸준히 증가하는 추세라고 발표하였다. 이러한 골관절염은 주로 무릎, 고관절과 같은 관절에서 발병하며, 관절 연골의 소실이나 퇴행성 변화의 영향으로 국소적인 염증과 통증이 수반된다. 특히, 골관절염 발병 중기 단계 이후에는 관절 연골 손상 또는 소실로 인해 진통소염제, 히알루론산 치료제, 물리치료와 같은 보존적 치료가 불가능하다. 따라서 관절 연골 치료를 위해 미세골절술, 자기 유래 연골세포 치료, 줄기세포 치료와 같은 수술이 필요하다. 최근, 연골세포 및 줄기세포 이식술 혹은 미세골절술에서 지지체(scaffold) 이용을 위한 연구가 활발하게 진행 중에 있는데 이러한 지지체는 생체 적합 및 생체 분해 성질을 지닌 천연 폴리머나 합성 폴리머로 이루어져 있기 때문에, 지지체는 손상된 관절 연골에 이식된 후, 수개월 내에 분해된다. 또한, 상기 지지체는 이식되고자 하는 부위에 따라 크기, 다공비율 및 생분해 기간이 결정된다. 예를 들어, 지지체의 크기는 크게 밀리미터 이상과 마이크로 크기의 지지체로 구분될 수 있다. 이러한 수 밀리미터-수 센티미터 크기를 지닌 지지체의 경우, 지지체를 이식하기 위해 넓은 부위의 절개를 요하는 수술과 지지체의 이탈 방지를 위한 고정(i.e. suture, fibrin glue)이 필요하다. 또한, 상대적으로 큰 크기의 지지체의 경우 영양분 및 산소 공급 부족 때문에 지지체 내 중심에서 세포 괴사가 발생될 수 있다. 반면에 마이크로 크기를 지닌 지지체는 밀리미터 크기 이상의 지지체가 갖는 문제점을 해결 가능하며, 관절 내 주사를 통해 주입 혹은 최소 절개를 통한 수술을 통해 이식될 수 있다. 이와 관련하여 대한민국 등록특허 제2011-0097662호는 관절연골 재생용 지지체 및 이의 제조방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 그러나 상기 선행기술의 경우, 능동구동이 없어 병변 부위로 타겟팅이 되지 않기 때문에 주입 혹은 이식 후 관절 윤활액(synovial fluid) 내에 퍼질 가능성이 있어 지지체는 이탈 방지를 위한 고정이 필요하다.

- [4] 본 발명은 손상된 골연골 부위에 순차적으로 타겟팅이 가능하여 신속하고 효율적으로 치료할 수 있는 최소 침습 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명의 일 관점에 따르면, 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 200 내지 300 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 연골 재생용 세포가 적재된 연골 재생용 마이크로지지체; 및 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 700 내지 900 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 골 재생용 세포가 적재된 골 재생용 마이크로지지체를 포함하는, 연골 재생용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [6] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 동일한 자기장 세기 하에 손상된 골연골 부위에 순차적으로 타겟팅이 가능하여 관절연골과 연골하골을 동시에 치료할 수 있는 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체의 생산효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [7] 도 1은 본 발명의 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체의 제조과정을 개략적으로 나타내는 개요도이다. (i) W-O-W 에멀전, (ii) 젤라틴 제거, (iii) 아미노 결합 형성, 제조 후, MSCs를 자기 구동 마이크로지지체에서 배양하였음, 및 (iv) MSC 배양.
- [8] 도 2는 본 발명의 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체의 크기 및 내부 공극 크기를 조절하여 제조하는 과정을 개략적으로 도시하는 개요도이다.
- [9] 도 3은 계면활성제 흐름속도를 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다.
- [10] 도 4은 고분자 질량을 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다.
- [11] 도 5는 젤라틴 수용액의 양을 조절하여 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다.
- [12] 도 6은 젤라틴 수용액의 농도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다.
- [13] 도 7은 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다.
- [14] 도 8은 아민(amine-) 기능화된 MNPs를 갖는 PLGA 마이크로지지체에 대한 SEM 이미지(a) 및 에너지 분산 X-선 분광법(EDX) 맵을 나타내는 사진이다(b).

- [15] 도 9는 본 발명에 따른 골 및 연골 재생용 마이크로지지체를 이용한 골연골 재생 치료과정을 나타내는 개념도이다.
- [16] 도 10은 본 발명에 따른 골연골 재생을 위한 자기 구동 마이크로지지체의 구성을 개략적으로 나타내고 있는 개요도이다.
- [17] 도 11는 본 발명에 따른 제작된 골 및 연골 재생용 마이크로지지체의 광학이미지 사진이다.
- [18] 도 12는 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체를 이용하여 연골 조직 분화능을 분석한 그래프이다.
- [19] 도 13은 본 발명에 따른 제작된 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체를 이용한 타겟팅 실험 과정을 나타내는 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] **용어의 정의:**

- [21] 본 문서에서 사용되는 용어 "자기장(magnetic field)"는 자장 또는 자계라고도 하며 자기력선(lines of magnetic force)이 펼쳐진 공간 즉 전류나 자석의 주위, 지구의 표면 등과 같이 자기작용이 영향을 미치는 공간을 말한다.
- [22] 본 문서에서 사용되는 용어 "골관절염(osteoarthritis)"은 퇴행성 관절염 또는 퇴행성 관절 질환으로 불리며 국소적인 관절에 점진적인 관절 연골의 소실 및 그와 관련된 이차적인 변화와 증상을 동반하는 질환이다. 관절을 보호하고 있는 연골의 점진적인 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나서 염증과 통증이 생기는 질환으로, 관절의 염증성 질환 중 가장 높은 빈도를 보인다.
- [23] 본 문서에서 사용되는 용어 "히알린 연골(hyaline cartilage)"은 초자연골이라고도 하며 가장 일반적인 연골조직이고 관절면을 뒤덮는 관절연골, 골단연골, 늑연골, 비연골이나 기도를 만드는 연골의 대부분은 이 조직이다. 또 뼈의 연결가운데 이 사이를 초자연골에 의해서 결합하는 유아의 두개저 등, 연골성 연결의 예 등은 성장하면 뼈로 치환된다.
- [24] 본 문서에서 사용되는 용어 "섬유성 연골(fibrocartilage)"은 염색표본에 있어서 연골세포의 사이에 있는 또는 존재하는 세포간질에 교직성으로 뻗는 굵은 교원섬유를 명료하게 구분할 수가 있는 연골을 섬유연골이라고 한다. 연골세포는 풍부한 세포간질중에 단독 또는 2~3개의 소군을 이루고 드문드문 산재한다. 연골세포의 둘레에 좁은 연골기질의 층이 형성되어 있다. 이 연골은 추간원판이나 치골간연골판에 존재한다.

[25] **발명의 상세한 설명:**

- [26] 본 발명의 일 관점에 따르면, 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 200 내지 300 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 연골 재생용 세포가 적재된 연골 재생용 마이크로지지체; 및 생분해성 고분자로

구성되고 직경이 700 내지 900 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 골 재생용 세포가 적재된 골 재생용 마이크로지지체를 포함하는, 연골 재생용 조성물이 제공된다.

- [27] 상기 연골 재생용 조성물에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌 글리콜, PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)], PLA(poly(lactic acid)), PGA(polyglycolic acid), PHA(polyhydroxyalkanoate), PCL(polycaprolactone), 또는 콜라겐일 수 있고 상기 연골 재생용 마이크로지지체의 내부공극의 크기는 45 내지 115 μm 일 수 있으며 상기 골 재생용 마이크로지지체의 내부공극의 크기는 85 내지 130 μm 일 수 있다.
- [28] 상기 연골 재생용 조성물에 있어서, 상기 자성 입자는 마그네타이트(magnetite) 또는 마그헤마이트(maghemite)일 수 있고 상기 연골 재생용 세포는 줄기세포, 또는 연골세포일 수 있으며 상기 골 재생용 세포는 줄기세포 또는 조골세포일 수 있다.
- [29] 상기 연골 재생용 조성물에 있어서, 연골 재생용 약물을 추가로 포함할 수 있고 상기 연골 재생용 약물은 세포분화 성장인자 또는 항생제일 수 있으며 상기 세포분화 성장인자는 TGF- β 또는 BMPs일 수 있다.
- [30] 일반적으로 골관절염 치료에 있어서 지지체를 이용한 세포 이식술과 미세골절술에서는 성숙한 관절연골이 적은 혈관과 신경 분포를 지니고 있기 때문에 관절연골 재생을 위해 관절연골 손상 부위만을 치료하지 않는다. 또한 손상된 관절연골은 충분한 영양분을 얻는데 어려움이 있기 때문에 손상된 관절연골 부위만 재생하는 방법은 정상적인 히알린 연골(hyaline cartilage)이 아닌 섬유성 연골(fibrocartilage)의 형성을 유발할 수 있다. 이에 본 발명자들은 이를 극복하고자 예의노력한 결과 자성 입자(magnetic particles) 담지량 조절을 통해 관절 윤활액 내 주입 후 동일한 자기장 세기 하에 손상된 골연골 부위로 순차적으로 타겟팅됨으로써, 최소 침습적인 방법인 관절연골과 연골하골(subchondral bone)을 포함하는 골연골을 동시에 효과적으로 재생치료할 수 있는 골 및 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체를 개발하였다. 이는 골과 골의 계면은 연골과 골 혹은 연골과 연골의 계면보다 빠르게 서로 이어지기 때문에 관절연골은 빠르게 재생된 연골하골로부터 충분한 영양분을 얻을 수 있게 되며 이는 히알린 연골로 재생될 수 있도록 도와준다. 여기서 이용되는 대부분의 지지체는 골연골 재생을 위해 다공비율 및 크기 등이 대개 일정하다(도 1).
- [31] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 여러 실시예들을 상세히 설명하기로 한다.
- [32] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려 이들 실시예들은 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고,

당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다. 또한, 도면에서 각 층의 두께나 크기는 설명의 편의 및 명확성을 위하여 과장된 것이다.

- [33] 명세서 전체에 걸쳐서, 막, 영역 또는 기판과 같은 하나의 구성요소가 다른 구성요소 "상에", "연결되어", "적층되어" 또는 "커플링되어" 위치한다고 언급할 때는, 상기 하나의 구성요소가 직접적으로 다른 구성요소 "상에", "연결되어", "적층되어" 또는 "커플링되어" 접촉하거나, 그 사이에 개재되는 또 다른 구성요소들이 존재할 수 있다고 해석될 수 있다. 반면에, 하나의 구성요소가 다른 구성요소 "직접적으로 상에", "직접 연결되어", 또는 "직접 커플링되어" 위치한다고 언급할 때는, 그 사이에 개재되는 다른 구성요소들이 존재하지 않는다고 해석된다. 균일한 부호는 균일한 요소를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [34] 본 명세서에서 제 1, 제 2 등의 용어가 다양한 부재, 부품, 영역, 층들 및/또는 부분들을 설명하기 위하여 사용되지만, 이들 부재, 부품, 영역, 층들 및/또는 부분들은 이들 용어에 의해 한정되어서는 안됨은 자명하다. 이들 용어는 하나의 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분을 다른 영역, 층 또는 부분과 구별하기 위하여만 사용된다. 따라서, 이하 상술할 제 1 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분은 본 발명의 가르침으로부터 벗어나지 않고서도 제 2 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분을 지칭할 수 있다.
- [35] 또한, "상의" 또는 "위의" 및 "하의" 또는 "아래의"와 같은 상대적인 용어들은 도면들에서 도해되는 것처럼 다른 요소들에 대한 어떤 요소들의 관계를 기술하기 위해 여기에서 사용될 수 있다. 상대적 용어들은 도면들에서 묘사되는 방향에 무게추가하여 소자의 다른 방향들을 포함하는 것을 의도한다고 이해될 수 있다. 예를 들어, 도면들에서 소자가 뒤집어 진다면(turned over), 다른 요소들의 상부의 면 상에 존재하는 것으로 묘사되는 요소들은 상기 다른 요소들의 하부의 면 상에 방향을 가지게 된다. 그러므로, 예로써 든 "상의"라는 용어는, 도면의 특정한 방향에 의존하여 "하의" 및 "상의" 방향 모두를 포함할 수 있다. 소자가 다른 방향으로 향한다면(다른 방향에 대하여 90도 회전), 본 명세서에 사용되는 상대적인 설명들은 이에 따라 해석될 수 있다.
- [36] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [37] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동

마이크로지지체의 제조과정을 개략적으로 나타내는 개요도이다. 우선 PLGA와 젤라틴 용액을 W-O-W 에멀전 형태화하여 PLGA 마이크로 스캐폴드 내에 젤라틴 구슬이 분산된 형태가 되도록 한 후(i), 탈이온수를 이용하여 젤라틴을 용해시켜 제거하여 PLGA-마이크로 스캐폴드를 제조하고(ii), PEI 코팅된 Fe_3O_4 자성 나노입자를 EDC/NHS 반응을 통해 상기 PLGA-마이크로 스캐폴드 표면 및 내부 공극에 결합시키고(iii), 연골 또는 골 재생을 위한 배양 세포(예: 중간엽 줄기세포)를 상기 자성 나노입자가 부착된 PLGA-마이크로 스캐폴드에 부착시킴으로써(iv) 최종적으로 치료용 세포가 부착된 자기구동 마이크로 스캐폴드가 제조된다.

- [38] 도 2는 본 발명의 최소 침습 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체의 크기 및 내부 공극 크기를 조절하여 제조하는 과정을 개략적으로 도시하는 개요도이다. 도 2에서 나타난 바와 같이, 고분자-젤라틴 수용액의 교반속도 및 온도를 조절하면서 교반하다가 계면활성제를 유량펌프를 이용하여 별도의 유체관으로 주입하다가 십자형 커넥터를 통해 혼합이 되도록 한 후 교반 중인 다공성 마이크로구조체 수집 수조에 적가함으로써 고체화 및 젤라틴 용해를 하게 된다. 이 때 다공성 마이크로구조체 수집 수조의 교반 및 온도 역시 일정한 수준으로 조절 및 유지가 된다.
- [39] 도 3은 계면활성제 흐름속도를 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다. 도 3의 하단은 상단에 나타난 마이크로 스캐폴드를 확대한 사진으로 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 마이크로 스캐폴드가 구형이면서도 내부에 공극이 형성된 다공성 구조임을 잘 나타내고 있다.
- [40] 도 4는 고분자 질량을 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다. 도 4에서 나타난 바와 같이, 고분자의 질량이 증가할 수록 마이크로 스캐폴드의 크기는 커지고 공극은 더 작아지는 것으로 나타났다.
- [41] 도 5는 젤라틴 수용액의 양을 조절하여 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다. 도 5에서 나타난 바와 같이, 젤라틴 수용액의 양을 증가시킬 경우 스캐폴드 및 공극의 크기가 증가하는 것으로 나타났다.
- [42] 도 6은 젤라틴 수용액의 농도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다. 도 6에서 확인되는 바와 같이, 젤라틴 수용액의 농도를 증가시킬 경우 마이크로 스캐폴드 자체의 크기는 큰 변화가 없었으나, 공극의 크기는 감소하는 것으로 나타났다.
- [43] 도 7은 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다. PLGA/젤라틴 수용액의 유체 온도 및 수집 수조의 온도를 표 5와 같이 조절한 결과 스캐폴드 크기는 큰 변화가 없었으나, 유체온도를 상온으로 하고

수집 수조의 온도를 5°C로 냉각할 경우 공극의 크기가 커지는 경향이 나타났고, 반대로 유체 온도를 낮추고 수집수조의 온도를 높일 경우 공극의 크기는 다소 작아지는 것으로 확인되었다. 유체온도와 수집온도를 똑같이 5°C로 유지할 경우 공극의 크기는 가장 작은 것으로 확인되었다.

[44] 도 8은 아민기(amine group)로 기능화된 MNPs를 갖는 PLGA 마이크로지지체에 대한 SEM 이미지(a) 및 에너지 분산 X-선 분광법(EDX) 맵을 나타내는 사진이다(b). 도 8a에서 확인되는 바와 같이, MNPs를 부착시킨 PLGA 마이크로구조체는 외경 및 기공의 직경에 유의한 변화가 없었으며, 도 8b에서 확인되는 바와 같이, MNP가 마이크로구조체 표면에 정상적으로 부착되어 있음을 확인할 수 있었다.

[45] 도 9는 본 발명의 최소 침습 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체를 이용한 골연골 재생치료를 나타내는 개념도이다. 상술한 바와 같이, 본 발명의 자기 구동 마이크로지지체는 자성 입자(magnetic particles) 담지량 조절을 통해 제작된 골 및 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체로 관절 윤활액 내 주입 후 동일한 자기장 세기 하에 손상된 골연골 부위로 순차적으로 타겟팅되므로 최소 침습적인 방법이며 효과적으로 골연골 재생치료를 제공할 수 있다. 또한, 도시한 바와 같이, 본 발명의 최소 침습 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 골연골의 재생 및 순차적 타겟팅에 적합한 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체 및 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체로 구성된다. 골연골 재생을 위한 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 동일한 자기장 세기 하에서 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체보다 골연골의 골 부위로 우선적으로 타겟팅되도록 제조된다. 상기 연골 재생을 위한 자기 구동 마이크로지지체는 관절 내 윤활액으로 동시에 주입되며, 외부에서 동일한 자기장 세기 하에서 골과 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 각각의 마이크로지지체 내 자성 입자 담지량의 차이에 의해 순차적으로 손상된 골과 연골 부위로 타겟팅된다. 이때 상기 자성입자는 마그네타이트(magnetite) 또는 마그헤마이트(maghemite)일 수 있고 상기 자기장은 연자석(soft magnet), 영구자석, 또는 전자석에 의한 것일 수 있으며 상기 영구자석은 페라이트(ferrite), 네오뮴(neodymium), 알리코, 사마륨코발트(samarium cobalt) 또는 고무자석(rubber magnet)일 수 있다. 이때 상기 자기 구동 마이크로지지체의 자기력은 마이크로지지체의 부피에 따라 결정되며, 이는 자기력이 부피에 비례하여 증가하기 때문이다. 따라서 직경이 200 내지 300 μm 와 700 내지 900 μm 의 크기를 지닌 각각의 연골 및 골 재생용 마이크로지지체는 서로 다른 자기력을 지니며, 큰 부피를 지닌 골 재생용 마이크로지지체가 연골 재생용 마이크로지지체보다 큰 자기력을 지닌다.

[46] 도 10은 본 발명의 골연골 재생을 위한 자기 구동 마이크로지지체에 구성을 개략적으로 나타내고 있는 개요도이다. 도시한 바와 같이, 자기 구동 마이크로지지체는 생체적합 및 생체분해 고분자(biodegradable polymer)로

이루어진 3차원 다공성 구형 마이크로구조체와 자성 입자(Magnetic particle)로 구성된다. 이때 상기 자성 입자는 상기 3차원 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 존재할 수 있고 내부 및 표면에 동시에 존재할 수 있다. 또한, 자기 구동 마이크로지지체에는 약물 및 연골 재생용 세포를 상기 자성 입자와 함께 담지할 수 있고 약물 및 골 재생용 세포를 동시에 자성 입자와 함께 담지할 수 있다. 이때 상기 약물은 세포분화 성장인자(TGF- β 또는 BMPs) 혹은 염증제거를 위한 항생제 일 수 있고 상기 연골 재생용 세포는 줄기세포 또는 연골세포일 수 있고 상기 골 재생용 세포는 줄기세포 또는 조골세포일 수 있다. 또한, 상기 생분해성 고분자는 기 생분해성 고분자는 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌 글리콜, PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)], PLA(poly(lactic acid)), PGA(polyglycolic acid), PHA(polyhydroxyalkanoate), PCL(polycaprolactone), 또는 콜라겐일 수 있다.

- [47] 도 11은 손상된 골연골 부위의 골과 연골을 재생하기 위해 제작된 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체 및 연골세포 재생용 자기 구동 마이크로지지체의 형태를 나타내고 있는 사진이다. 상기 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 동일한 자기장 세기 하에서 골연골의 골 부위로 우선적으로 타겟팅되기 위해 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체보다 많은 자성 입자를 담지할 수 있도록 큰 부피(지름 500 μm)와 넓은 표면적을 갖는다. 또한, 동일한 자기장 세기 하에서 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체 다음으로 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체가 타겟팅되기 위해 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 골 재생용 자기 구동 마이크로지지체보다 적은 자성 입자를 포함할 수 있도록 상대적으로 작은 부피(지름 260 μm)와 좁은 표면적을 갖는다. 따라서 자성 입자 담지량의 차이에 의해 각각의 골 및 연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 동일한 자기장 세기 하에 골연골 손상 부위로 순차적으로 타겟팅되고 효율적인 골연골 재생효과를 기대할 수 있다.

- [48] 도 12는 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체를 이용하여 연골 조직 분화능을 분석한 그래프이다. 도 12에서 확인되는 바와 같이, PLAG 마이크로구조체 제조시 유체의 온도 및 수집 수조의 온도 조건을 조절함에 따라 연골세포 분화의 정도가 달라지는 것으로 확인되었다. 특히 유체 온도를 5°C로 하고, 수집수조의 온도를 22°C 공극의 크기를 중간 정도로 한 경우에 제2형 콜라겐의 발현정도가 가장 높은 것으로 확인되었다.

- [49] 도 13은 본 발명에 따른 제작된 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체를 이용한 타겟팅 실험 과정을 나타내는 사진이다. 도 13에 나타난 바와 같이, 동일한 자기장 세기 하에서 골 재생용 마이크로지지체는 연골 재생용 마이크로지지체보다 먼저 영구자석이 위치한 챔버(chamber)의 벽으로 이동하는 것을 관찰하였다. 이를 통해 본 발명의 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체가 손상된 골연골 부위로 순차적으로 타겟팅됨을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 골연골 재생용 자기 구동

마이크로지지체가 골연골 재생치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [50] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [51] **실시예 1: 마이크로지지체의 제조**
- [52] 본 발명의 마이크로지지체는 PLGA(poly lactic-co-glycolic acid) 다공성 몸체와 표면에 부착된 Fe_3O_4 MNPs(magnetic nanoparticles)로 구성된 자기 구동 마이크로지지체는 에멀전 주형(emulsion templating) 방법과 아미노 결합(amino bond) 형성을 이용한 단백질 커플링(protein coupling)에 의해 제조되었다(도 1). 본 발명의 마이크로지지체의 상세한 제조 공정은 첫째, 젤라틴 비드(gelatin beads)가 결합된 PLGA 마이크로지지체는 유체 장치(fluidic device)를 갖는 더블 에멀전(double emulsion)으로 수득하였다. W-O-W 물방울 형성 후, PLGA 마이크로지지체 내의 젤라틴 비드를 제거하였다(도 2).
- [53] 구체적으로, 유체 장치는 PVC 튜브(1/32 in i.d. × 3/32 in o.d. 혹은 1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 21G 혹은 17G 니들 및 시린지 펌프로 구성되어 있는데 양방향 흐름 채널(two-way flow channels) 장치는 상기 PVC 튜브에 니들을 삽입하여 제작하였다. 먼저, W-O 에멀전(emulsion)을 위해, PLGA 용액 및 젤라틴 용액을 준비한 후, 1 ml 디클로로메탄(DCM)/Span80(100:1, v/v) 용액에서 PLGA를 용해하였고 W-O 에멀전은 PLGA 용액에서 2500 rpm으로 2분 30초 동안 젤라틴 용액을 혼합하여 제조하였다. W-O 에멀전은 23G 혹은 26G 니들 주사기에 붓고 이를 유체장치의 PVC 튜브를 통하여 연속적으로 분당 3 ml을 통과시키는 유량(flow rate)을 가진 PVA 1%로 형성된 유체장치의 21G 니들의 중앙에 삽입하였다. 그 후, 유체 채널에서 형성된 W-O-W 방울(droplets)은 유체 장치의 21G 니들을 따라 유입되었고 냉수조(ice bath)의 500 ml 비커가 위치한 탈 이온수(deionized water)로 수집되었다. 이어서 상기 수집된 방울내의 디클로로메탄은 6시간 동안 부드럽게 교반하면서 증발시켰고 방울의 젤라틴 제거를 위해, 37°C, 500 ml 비커의 탈 이온수(deionized water)에 침지하였으며 4시간동안 부드럽게 교반하였다. 마지막으로 상기 방울을 탈 이온수로 3회 세척한 후, 젤라틴이 침출된 PLGA 마이크로지지체를 25 ml 바이알의 탈 이온수에 보관하였다.
- [54] 상기 과정에서, 표면 개방성(surface openness), 내부 공극의 상호 연결성(interconnectivity), 다공성 및 크기 균일성(size uniformity)과 같은 다공성 지지체의 다양한 요인이 줄기세포 증식 및 분화에 영향을 줄 수 있다. 따라서,

여러 실험 조건에 따라 상기 PLGA 마이크로지지체의 크기, 공극 크기 그리고 상호 연결된 공극 크기를 전자 현미경(SEM)을 이용하여 분석하였다.

[55] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 여러 실시예들을 상세히 설명하기로 한다.

[56] 도 3은 계면활성제 흐름속도를 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진이다. 마이크로지지체의 크기는 계면활성제의 흐름속도 및 고분자 질량에 의해 결정되고 마이크로지지체의 내부 공극의 크기는 젤라틴 수용액의 양, 농도 및 고체화 시 수집 수조 내 유체 온도에 의해 조절이 가능하다. 마이크로지지체의 제조를 위해 PVC 튜브(1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 17G 니들, 23G 니들 주사기, 고분자(PLGA)의 질량을 70 mg, 1% pva(polyvinyl alcohol)에 5% 젤라틴 수용액 750 μ l를 사용하였고 PLGA/젤라틴 수용액의 유체 속도는 0.05 ml/min를 적용하였으며 1% pva 수용액의 유체속도는 5.0 ml/min(a) 또는 2.5 ml/min(b)으로 조절하였다. 도면에 도시한 바와 같이 계면활성제 흐름속도에 따라 마이크로지지체의 크기가 다르게 제조되는 것을 관찰하였다. 이때, 상기 제조된 마이크로지지체에 관한 크기 및 공극 크기 그리고 상호 연결된 공극 크기를 하기 표 1에 표시하였다.

[57] [표1]

유체 속도에 따른 마이크로지지체의 특성 비교

실험조건	스캐폴드 크기(μ m)	공극 크기(μ m)	상호 연결된 공극 크기(μ m)
5.0 ml/min	701.95±18.46	114.88±18.02	42.79±14.77
2.5 ml/min	918.38±41.41	128.94±23.01	67.38±20.54

[58] 또한, 도 4는 고분자 질량을 조절하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진으로 마이크로지지체의 제조를 위해 PVC 튜브(1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 17G 니들, 23G 니들 주사기, 1% pva에 5% 젤라틴 수용액 750 μ l를 사용하였고 PLGA/젤라틴 수용액의 유체 속도는 0.05 ml/min를 적용하였으며 1% pva 수용액의 유체속도는 2.5 ml/min(b)으로 제조하였으나 고분자(PLGA)의 질량만을 달리하여 제조하였다. 그 결과, 고분자(PLGA)의 질량 70 mg(a) 및 65 mg(b)의 조절에 따라 마이크로지지체의 크기가 다르게 제조되는 것을 관찰하였다. 이때, 제조된 마이크로지지체에 관한 크기 및 공극 크기 그리고 상호 연결된 공극 크기를 하기 표 2에 표시하였다.

[59] [표2]

고분자 질량에 따른 마이크로지지체의 특성 비교

실험조건	스캐폴드 크기(μ m)	공극 크기(μ m)	상호 연결된 공극 크기(μ m)
70 mg	918.38±41.41	128.94±23.01	67.38±20.54
65 mg	796.29±34.79	129.61±29.38	76.32±20.29

- [60] 아울러, 한편, 본 발명자들은 젤라틴 수용액 농도 및 고체화 시 수집 수조 내 유체 온도를 조절함에 따라 마이크로 구조체의 내부 공극 크기를 조절하여 제조하였다. 도 5는 젤라틴 수용액의 양을 조절하여 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진으로 마이크로지지체의 제조를 위해 PVC 튜브(1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 17G 니들, 23G 니들 주사기, 고분자(PLGA)의 질량을 70 mg, 1% pva(polyvinyl alcohol)에 5% 젤라틴 수용액 550 μl (a) 또는 750 μl (b)를 사용하였고 PLGA/젤라틴 수용액의 유체 속도는 0.05 ml/min를 적용하였으며 1% pva 수용액의 유체속도는 2.5 ml/min(b)으로 제조한 결과 마이크로지지체의 내부 공극 크기가 다르게 제조되는 것을 관찰하였다. 이때, 제조된 마이크로지지체에 관한 크기 및 공극 크기 그리고 상호 연결된 공극 크기를 하기 표 3에 표시하였다.

[61] [표3]

젤라틴 수용액 양에 따른 마이크로지지체 특성의 비교

실험조건	스캐폴드 크기(μm)	공극 크기(μm)	상호 연결된 공극 크기(μm)
750 μl	918.38±41.41	128.94±23.01	67.38±20.54
550 μl	880.64±52.55	110.25±18.61	58.77±8.37

- [62] 도 6은 젤라틴 수용액의 농도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진으로 마이크로지지체의 제조를 위해 PVC 튜브(1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 17G 니들, 23G 니들 주사기, 고분자(PLGA)의 질량을 70 mg, 1% pva(polyvinyl alcohol)에 10%(a), 7.5%(b), 5%(c) 젤라틴 수용액 750 μl 를 사용하였고 PLGA/젤라틴 수용액의 유체 속도는 0.05 ml/min를 적용하였으며 1% pva 수용액의 유체속도는 5.0 ml/min(b)으로 제조한 결과 마이크로지지체의 내부 공극 크기가 다르게 제조되는 것을 관찰하였다. 이때, 제조된 마이크로지지체에 관한 크기 및 공극 크기 그리고 상호 연결된 공극 크기를 하기 표 4에 표시하였다.

[63] [표4]

젤라틴 수용액 농도에 따른 마이크로지지체의 특성 비교

실험조건	스캐폴드 크기(μm)	공극 크기(μm)	상호 연결된 공극 크기(μm)
10%	703.17±40.45	85.75±12.71	36.14±7.64
7.5%	699.29±28.80	98.97±9.63	39.50±11.53
5%	701.95±18.46	114.88±18.02	42.79±14.77

- [64] 도 7은 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체의 형태를 나타내는 전자 현미경 사진으로 마이크로지지체의 제조를 위해 PVC 튜브(1/16 in i.d. × 1/8 in o.d.), 21G 니들, 26G 니들 주사기, 고분자(PLGA)의 질량을 70 mg, 1% pva(polyvinyl alcohol)에 6%

젤라틴 수용액 750 μl 를 사용하였고 PLGA/젤라틴 수용액의 유체 속도는 0.05 ml/min, 1% pva 수용액의 유체속도는 2.0 ml/min(b) 및 수집 수조 내 유체온도는 5°C~5°C(a), 5°C~22°C(b), 22°C~5°C(c) 으로 제조한 결과 마이크로지지체의 내부 공극 크기가 다르게 제조되는 것을 관찰하였다. 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체에 관한 크기 및 공극 크기 그리고 세포 담지 양을 하기 표 5 및 표 6에 표시하였다. 이때, 상기 각각의 마이크로지지체 내 줄기세포 담지 양은 제조된 마이크로지지체에 중간엽줄기세포 1.5×10^6 cells/mL을 넣어 48, 72시간 배양 후 마이크로지지체 개당 세포양은 alamarBlue™ Cell Viability Reagent (ThermoFisher)를 사용하여 측정하였다.

[65] [표5]

유체 및 수집수조 온도에 따른 마이크로지지체의 특성 비교

실험조건	스캐폴드 크기(μm)	공극 크기(μm)	상호 연결된 공극 크기(μm)
5°C~5°C	306.73 $\pm$ 20.14	47.96 $\pm$ 9.41	21.79 $\pm$ 5.44
5°C~22°C	281.94 $\pm$ 27.85	66.05 $\pm$ 7.44	25.31 $\pm$ 6.03
22°C~5°C	290.56 $\pm$ 31.11	117.46 $\pm$ 19.04	52.69 $\pm$ 12.75

[66] [표6]

유체 및 수집수조 온도에 따른 스캐폴드 당 부착 세포의 수의 비교

실험조건	48시간 후 세포 양	72시간 후 세포 양
5°C~5°C	2000 세포/스캐폴드	5000 세포/스캐폴드
5°C~22°C	2500 세포/스캐폴드	7000 세포/스캐폴드
22°C~5°C	4000 세포/스캐폴드	7500 세포/스캐폴드

[67] 실시예 2: 자기 구동 마이크로지지체의 제조

[68] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 PLGA 마이크로지지체에 자기 구동을 부여하기 위해 나노 크기의 Fe_3O_4 코어 및 PEI로 코팅된 표면으로 구성된 아민(amine-) 기능화된 MNPs를 PLGA 마이크로지지체 표면에 단백질 결합시켜 화학적으로 결합시켰다(도 2).

[69] 구체적으로, 마이크로지지체는 33°C에서 1.5 mM NHS(N-hydroxysuccinimide) 및 EDC(1-Ethyl-(dimethylaminopropyl)carbodiimide)가 첨가된 5 ml MES(0.1 M) 용액에 침지하였고 마이크로-스캐폴드를 포함하는 용액은 PLGA 마이크로지지체의 표면에서 카복실기(carboxyl groups)를 활성화하기 위해 6시간동안 기계적으로 교반하였다. 마이크로지지체 표면의 활성화 후에 5 ml MES(0.1 M)에서 변형된 자성입자(25 mg/ml)를 상기 용액에 첨가하였고 33°C에서 12시간 동안 교반하였다. 그 후, 상기 용액은 무반응(unreactive) MNPs를 제거하기 위해 여과하였고 필터에서 고정화된 마이크로지지체의

자성입자를 수집하였고 탈이온수로 3회 세척하였다.

- [70] 그 결과, PLGA 마이크로지지체 및 MNP-부착 PLGA 마이크로지지체의 SEM 이미지에서, 미세 기공 및 MNPs의 존재하였고 자기 구동 마이크로지지체의 EDX 맵을 통해 C, O 및 Fe 신호에 따라 PLGA 및 MNP의 존재를 확인하였다(도 8b). MNP가 PLGA 마이크로지지체의 표면상에 얇게 분포하였기 때문에, PLGA 마이크로지지체와 비교하여, MNP가 부착된 마이크로지지체의 외경 및 기공 직경에는 유의한 변화가 없었다.

[71] **실험예 1: 분화능 실험**

- [72] 본 발명자들은 고체화 시, 수집 수조 내 유체온도를 조절함에 따라 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체를 이용하여 연골 조직 분화능 실험을 3주 동안 수행하였다. 각 주마다 연골 분화 조직의 RNA는 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(TAKARA)를 이용하여 추출한 후, RNA는 PrimeScript™ RT Master Mix (TAKARA)를 이용하여 cDNA로 합성하였고, 실험 방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 수행하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 연골 조직 분화 초기 단계의 발현 인자인 SOX9과 연골 조직 분화 성숙 단계의 발현 인자인 type I collagen 및 type II collagen의 발현 수준을 상대적 중합효소연쇄반응을 이용하여 연골 조직의 분화능을 측정하였다. 내부 공극의 크기를 달리하여 제조된 마이크로지지체를 이용한 연골 조직 분화능을 측정하기 위하여 유전자 특이적인 프라이머 쌍 3개를 사용하여 다음과 같은 과정으로 상대적 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 반응 용액은 2 μ l 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus(Solis BioDyne), 1 μ l SOX9, COL1, COL 프라이머 쌍(10 pmol, Bioneer), 6 μ l RNase-Free water, 그리고 300-500 ng cDNA 주형을 혼합하여 총 10 μ l로 조성하였다. 중합효소연쇄반응은 95°C, 15 분간 1회; 95°C, 20초 변성- 60°C, 20초 어닐링- 72°C, 20초 확장을 40회 반복; 95°C, 10초간 반응시킨 후, 65°C에서부터 95°C까지 5초간 0.5°C씩 상승시켜 melt curve analysis를 실행하였다. 내부 공극의 크기에 따른 연골 조직의 분화능은 GAPDH 유전자 특이 프라이머 쌍을 이용하여 측정값을 평준화하였다.

- [73] 그 결과, 마이크로지지체 제조 시 수집 수조 내 유체온도 5°C~5°C와 비교하여 5°C~22°C 조건으로 제조한 마이크로지지체의 분화능이 가장 높게 나타났다(도 12).

[74] **실험예 2: 타겟팅 실험**

- [75] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 자기 구동 마이크로지지체의 표적능을 확인하기 위하여 타겟팅 실험을 수행하였다. 구체적으로 타겟팅 실험은 관절과 유사한 실험환경을 갖추기 위해 상온의 점도가 활액과 유사한 글리세린(70 wt%)용액이 담긴 챔버(chamber)와 955 kA/m의 자화값(magnetization value)을 가진 2개 원통형 네오디뮴 자석(직경 10 mm X 높이 20 mm)와 4개의 원통형 네오디뮴 자석(직경 2 mm X 높이 2 mm)으로 구성된 영구자석을 이용하였고 상기 챔버에 약 70개의 골 및 연골 재생용 자기

구동 마이크로지지체를 시간 간격을 두고 3차례 주입한 후 상기 영구자석을 설치한 위치로 이동하는 표적능을 관찰하였다.

- [76] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 동일한 자기장 세기 하에서 골 재생용 마이크로지지체는 연골 재생용 마이크로지지체보다 먼저 영구자석이 위치한 챔버(chamber)의 벽으로 이동하는 것을 관찰하였다. 이는 본 발명의 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체가 손상된 골연골 부위로 순차적으로 타겟팅되어 최소 침습적인 방법으로 골연골 재생치료를 효과적으로 수행할 수 있음을 시사한다.

- [77] 결론적으로 본 발명의 최소 침습 골연골 재생을 위한 자기 구동 마이크로지지체는 자성 입자(magnetic particles) 담지량 조절을 통해 관절 내 윤활액 주입 후 동일한 자기장 세기 하에 손상된 골연골 부위에 순차적으로 타겟팅이 가능하여 마이크로 크기를 지닌 지지체는 밀리미터 크기 이상의 지지체가 갖는 문제점을 해결 가능하고, 관절 내 주사를 통해 주입 혹은 최소 절개를 통한 수술을 통해 이식되어 효과적인 골연골 재생 치료에 활용할 수 있다.

- [78] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

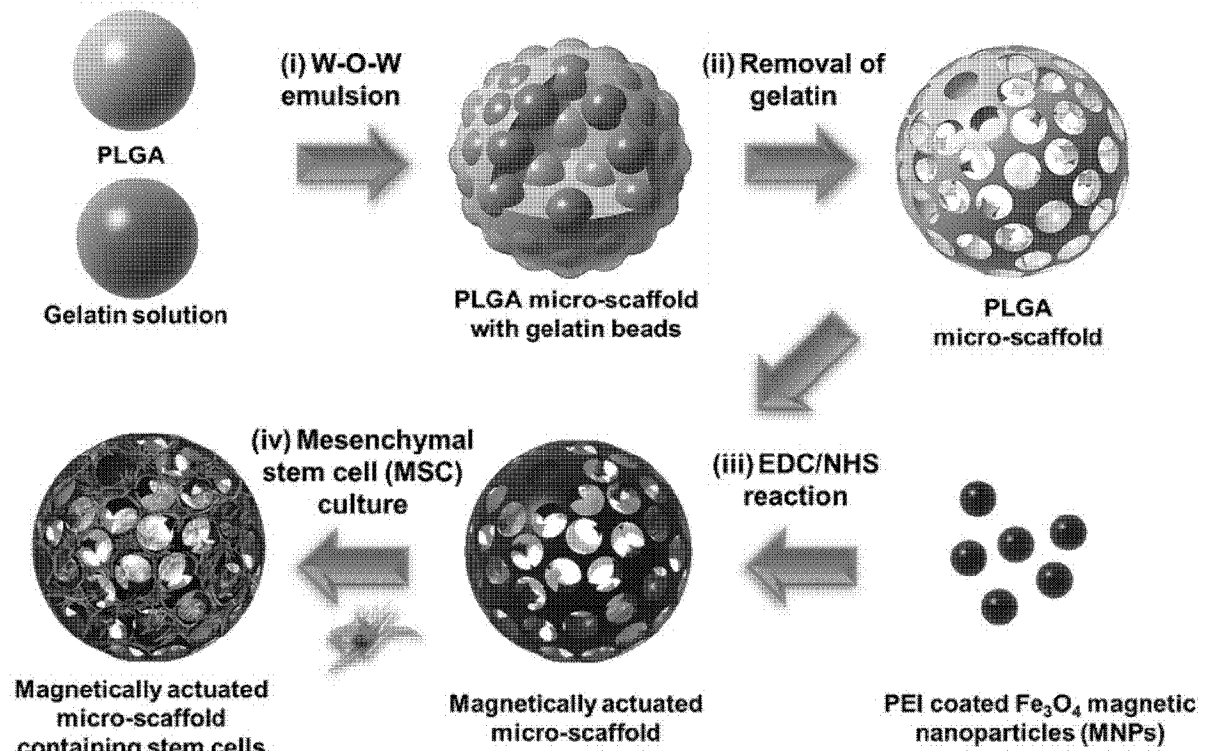
산업상 이용가능성

- [79] 본 발명의 일 실시예에 따른 골연골 재생용 자기 구동 마이크로지지체는 의학 분야 특히, 골관절염 등의 골연골 재생이 필요한 정형외과 분야에 있어서, 매우 유용하게 사용될 수 있다.

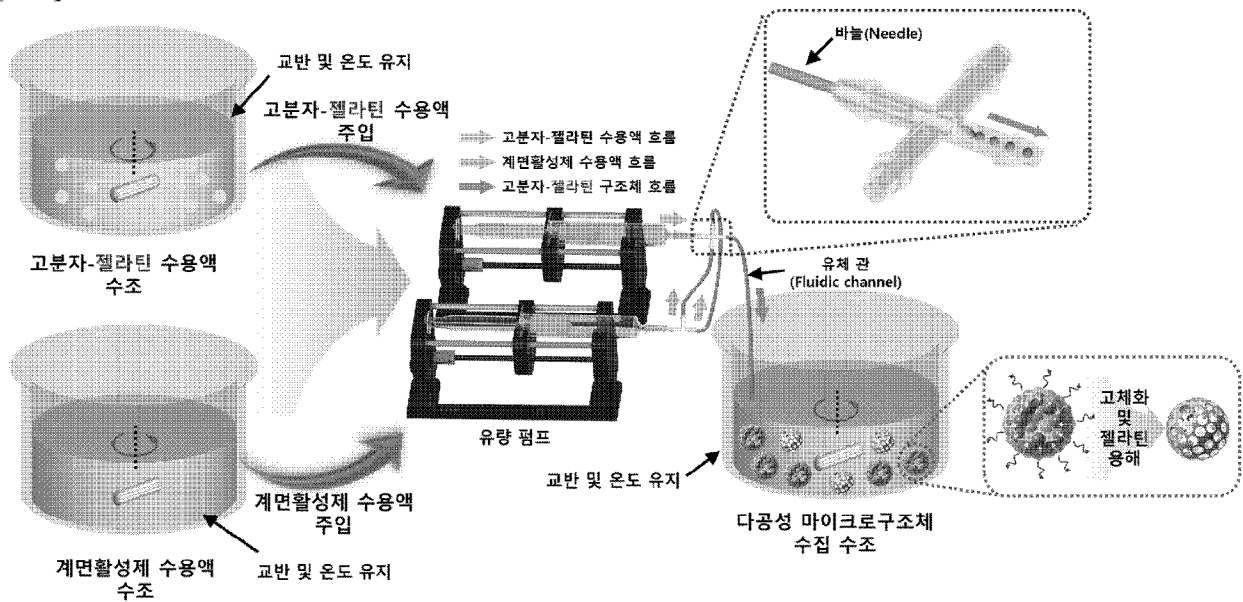
청구범위

- [청구항 1] 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 200 내지 300 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 연골 재생용 세포가 적재된 연골 재생용 마이크로지지체; 및 생분해성 고분자로 구성되고 직경이 700 내지 900 μm 인 3차원 형태의 다공성 마이크로구조체의 내부 또는 표면에 자성 입자 및 골 재생용 세포가 적재된 골 재생용 마이크로지지체를 포함하는, 연골 재생용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 생분해성 고분자는 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌 글리콜, PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)], PLA(poly(lactic acid)), PGA(polyglycolic acid), PHA(polyhydroxyalkanoate), PCL(polycaprolactone), 또는 콜라겐인, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 연골 재생용 마이크로지지체의 내부공극의 크기는 45 내지 115 μm 인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 골 재생용 마이크로지지체의 내부공극의 크기는 85 내지 130 μm 인, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 자성 입자는 마그네타이트(magnetite) 또는 마그헤마이트(maghemite)인, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 연골 재생용 세포는 줄기세포, 또는 연골세포인, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 골 재생용 세포는 줄기세포 또는 조골세포인, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
연골 재생용 약물을 추가로 포함하는, 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 연골 재생용 약물은 세포분화 성장인자 혹은 항생제인, 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 세포분화 성장인자는 TGF- β 또는 BMPs인, 조성물.

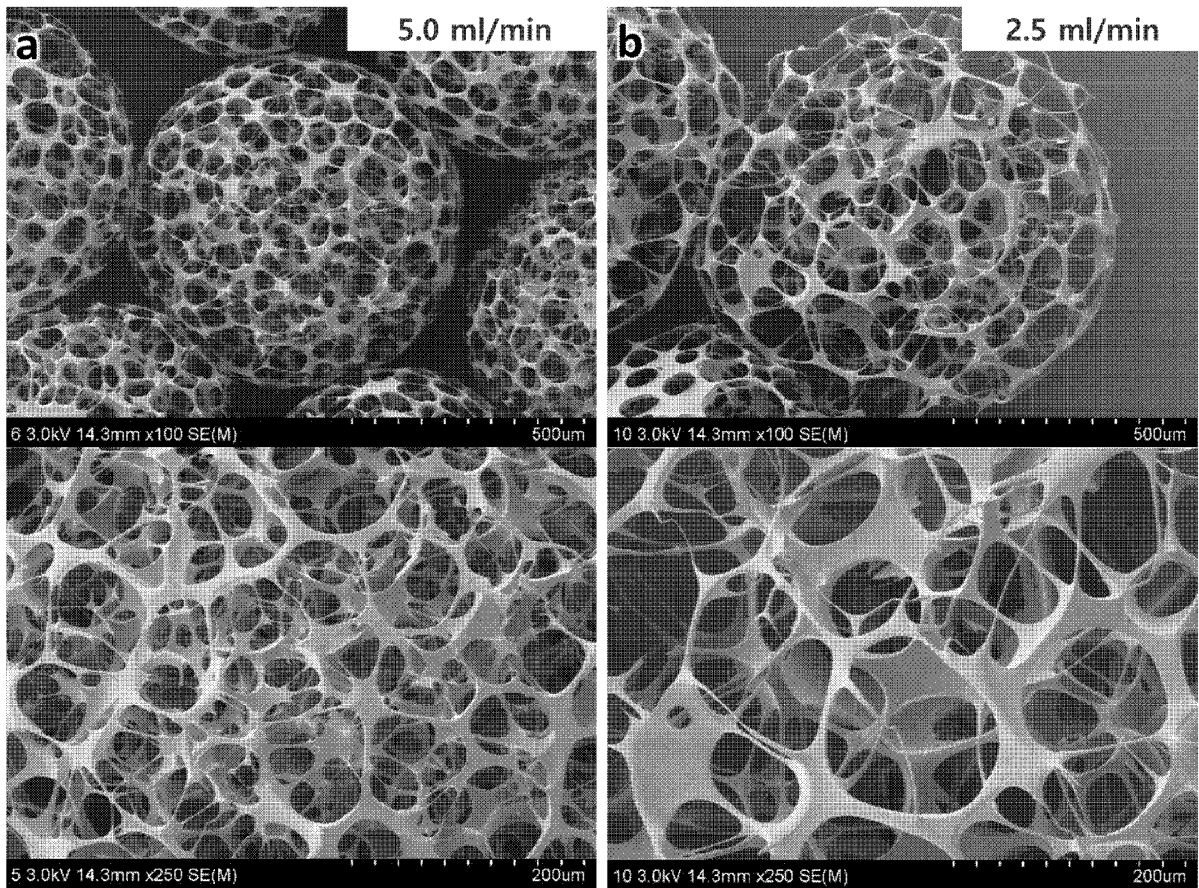
[도1]



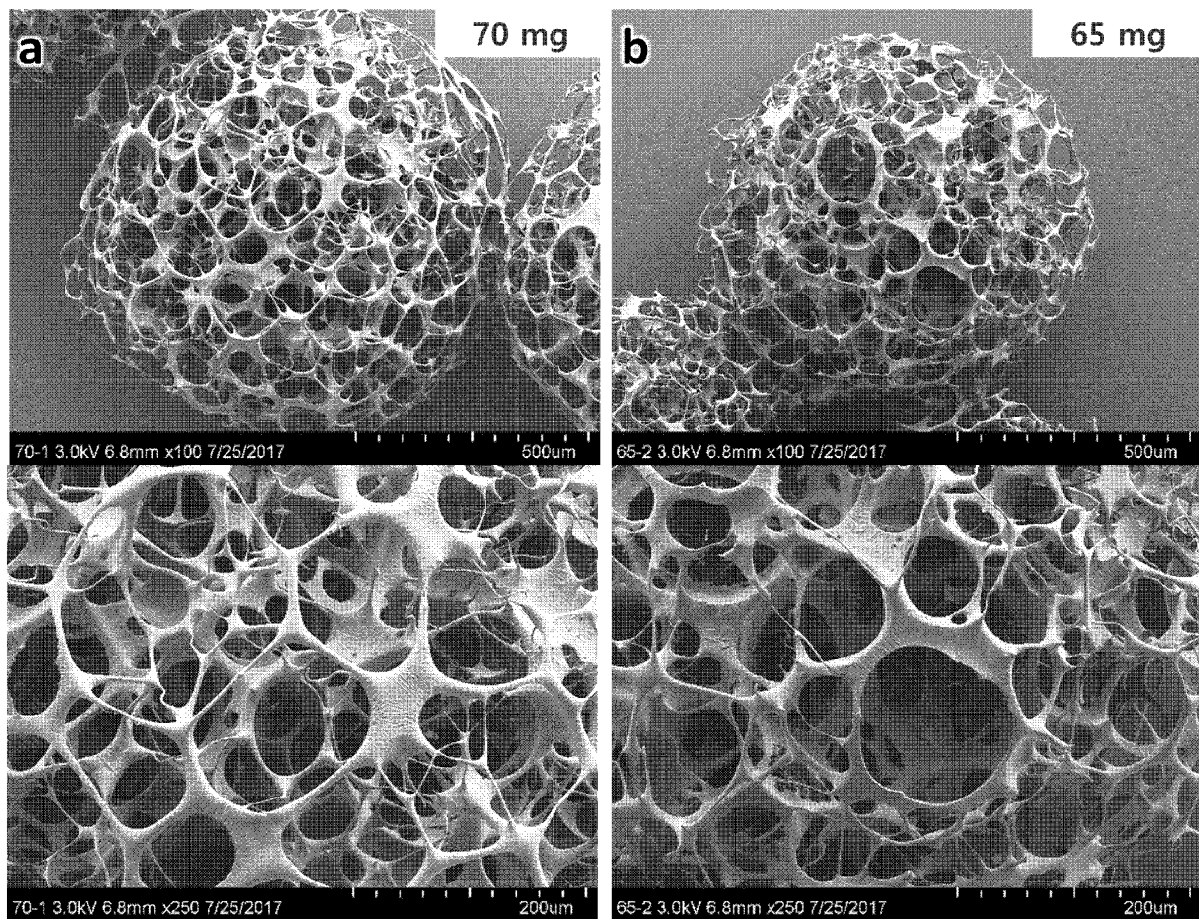
[도2]



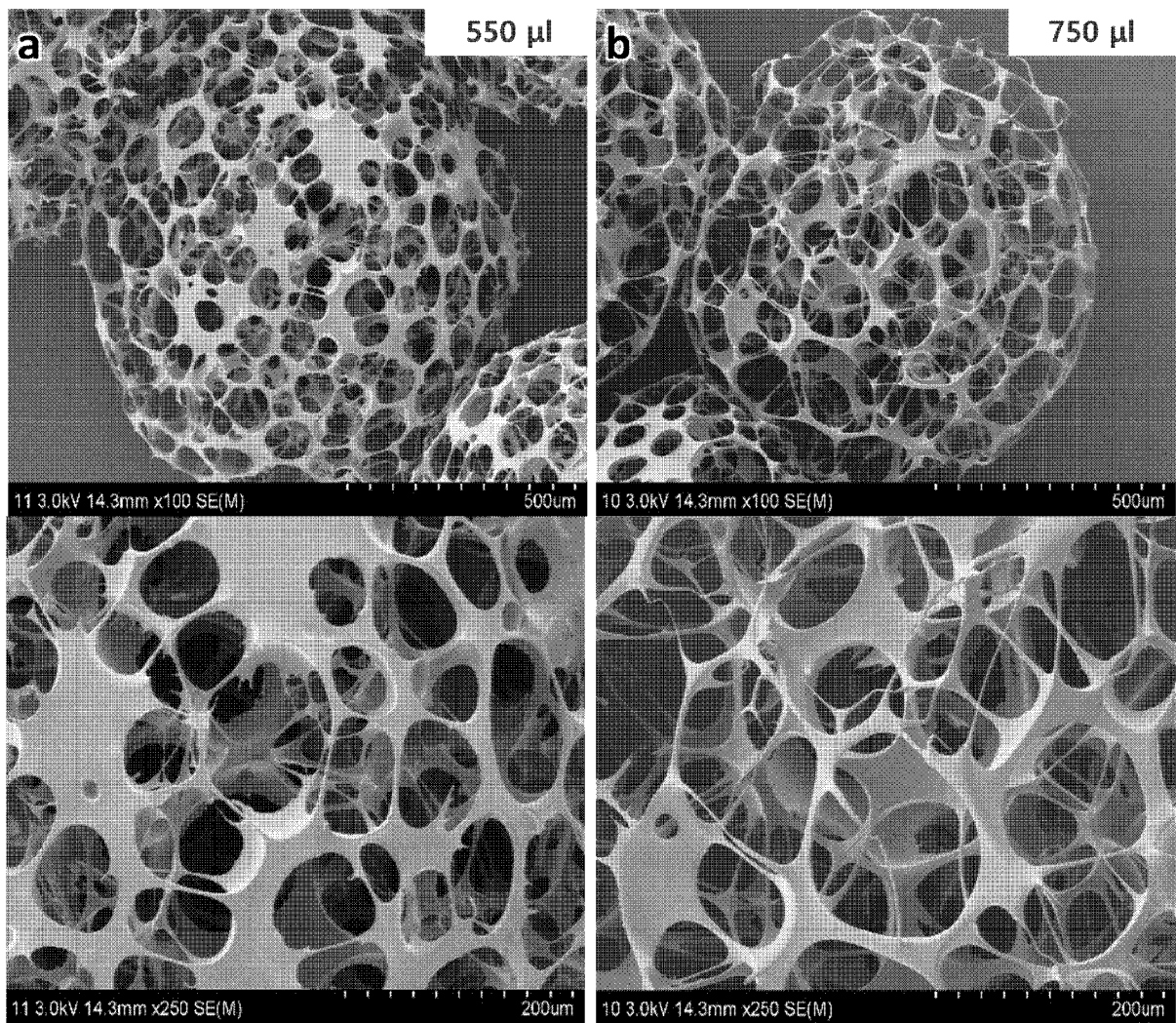
[도3]



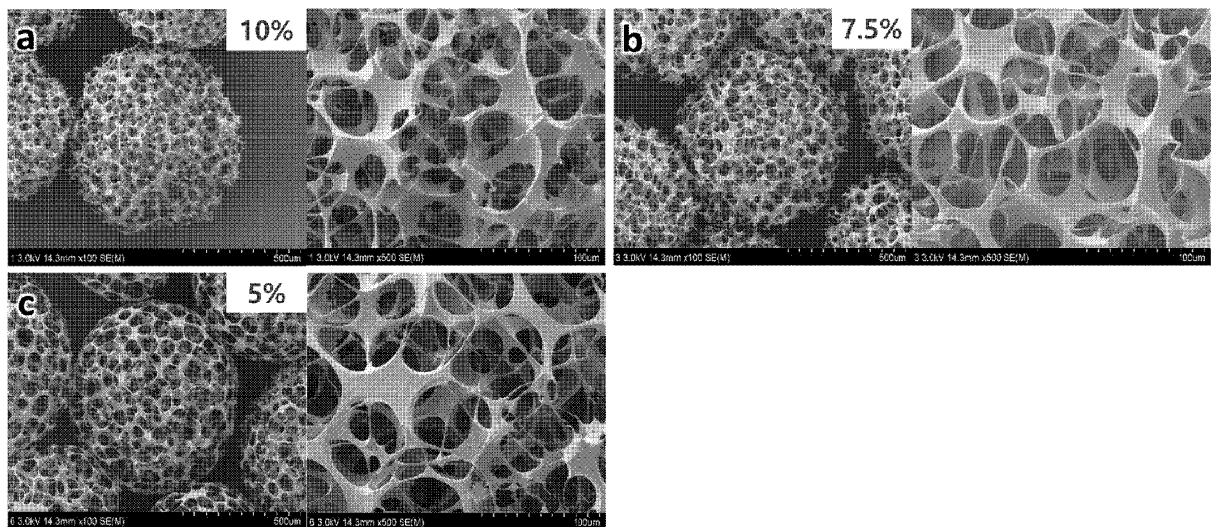
[도4]



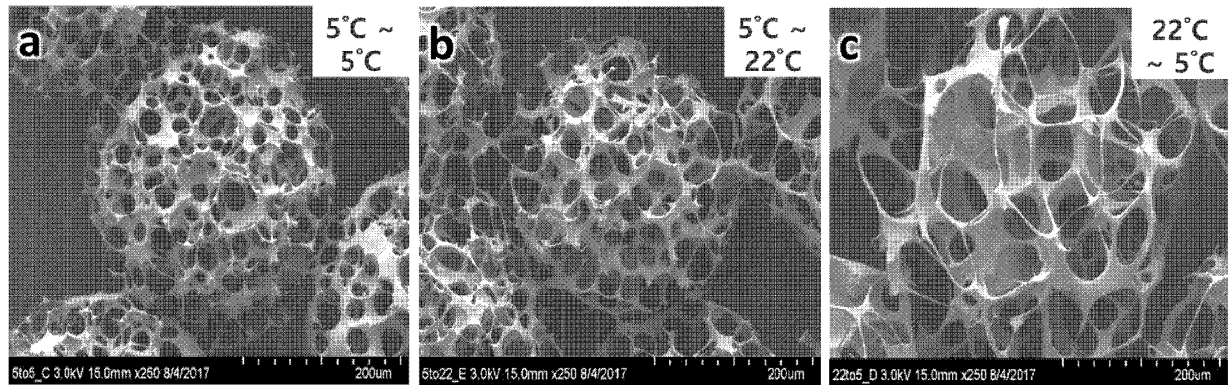
[도5]



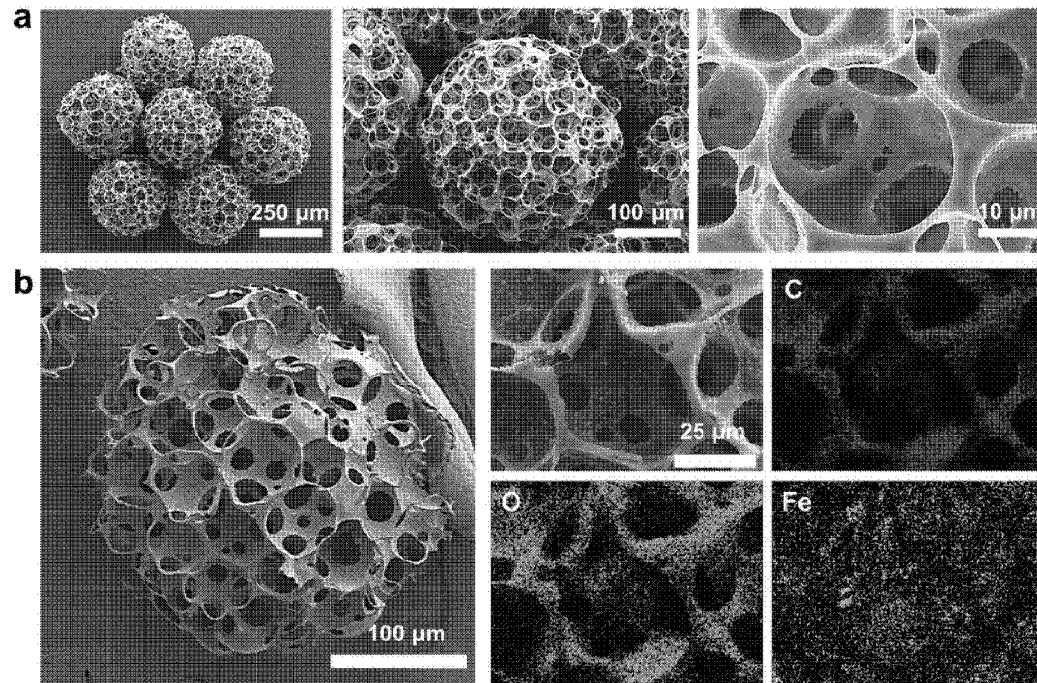
[도6]



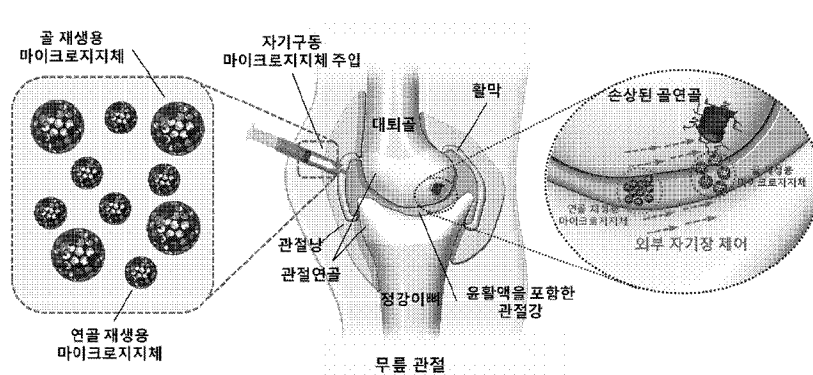
[도7]



[도8]

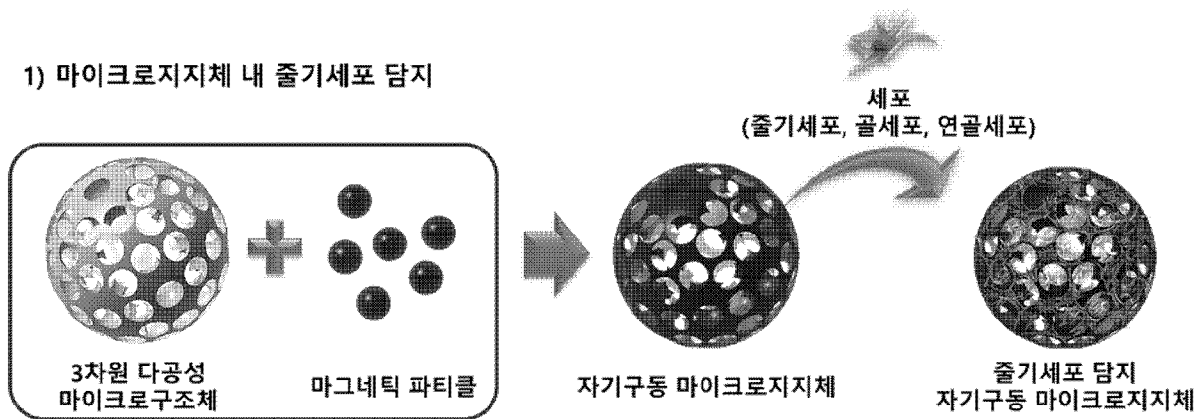


[도9]

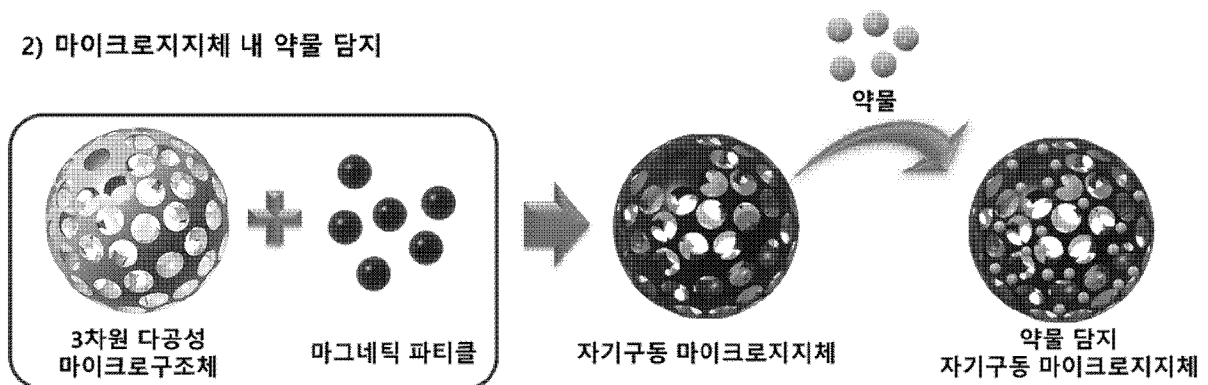


[도10]

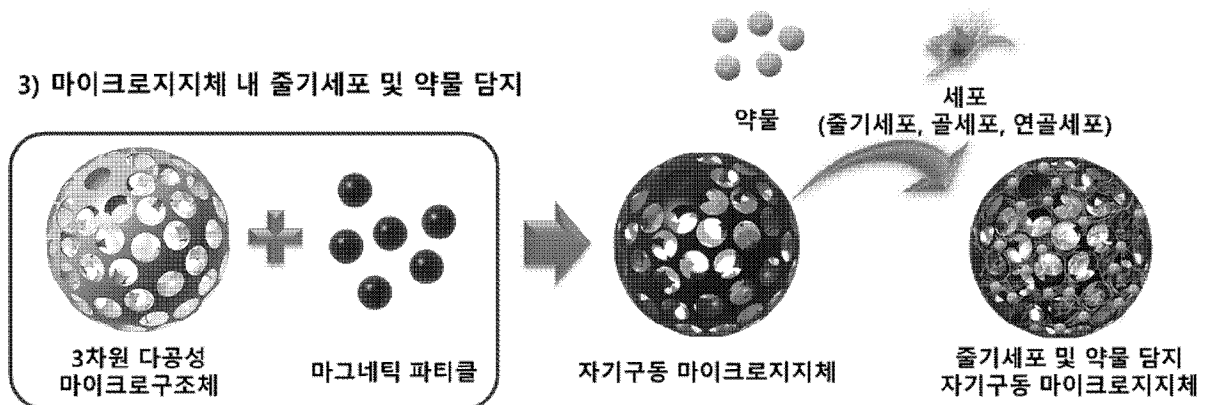
1) 마이크로지지체 내 줄기세포 담지



2) 마이크로지지체 내 약물 담지

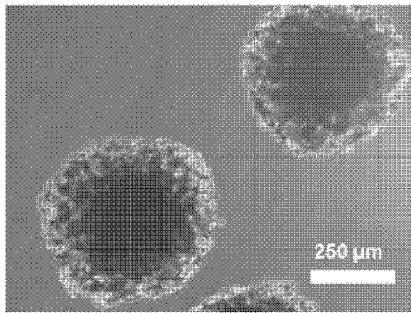


3) 마이크로지지체 내 줄기세포 및 약물 담지

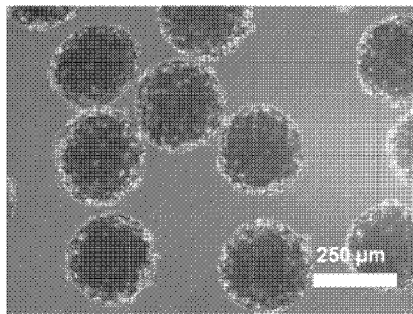


[도11]

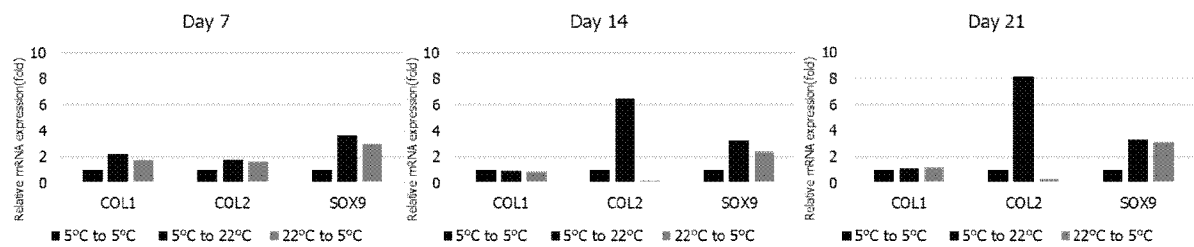
1) 골세포 재생용 자기구동 마이크로지지체



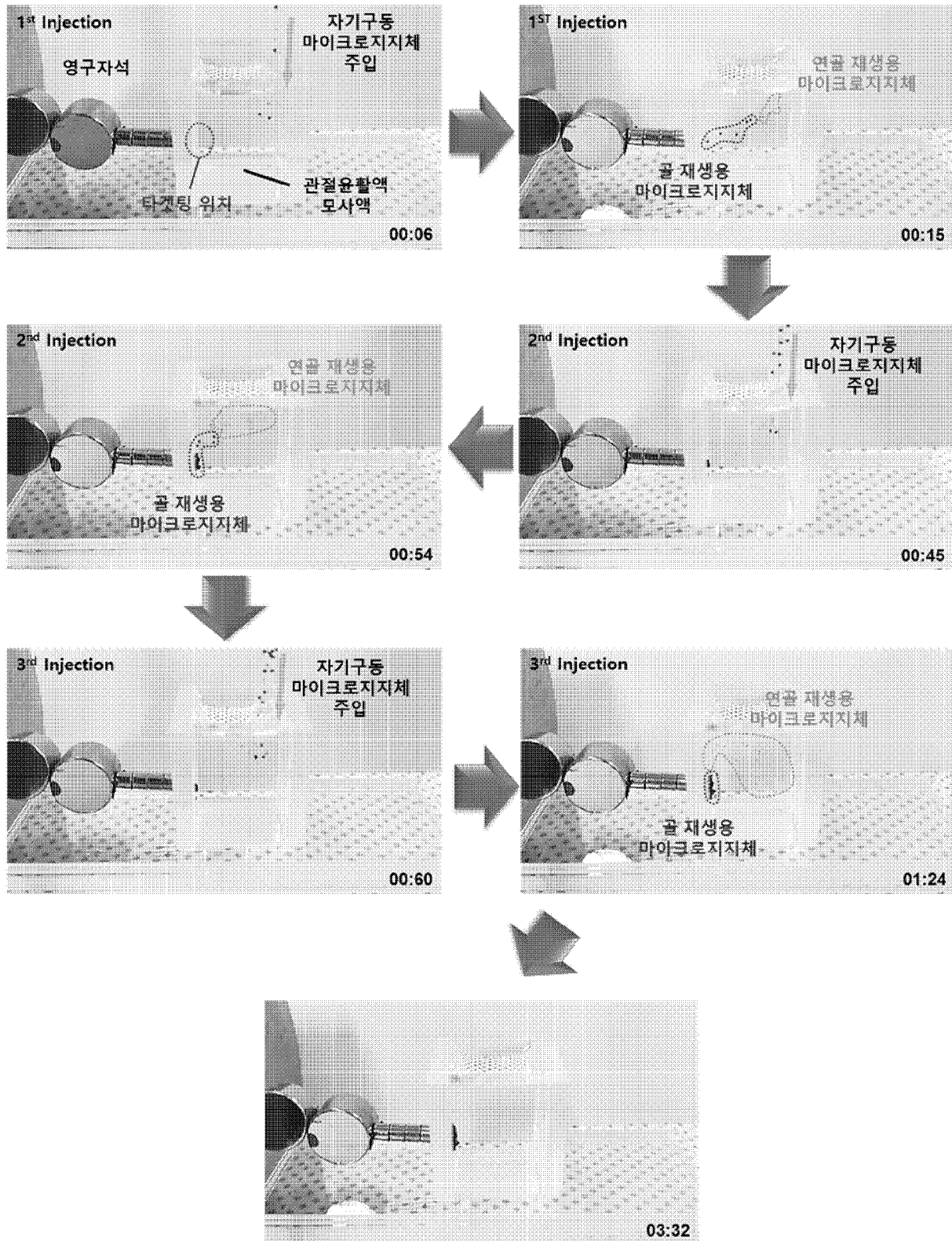
2) 연골세포 재생용 자기구동 마이크로지지체



[도12]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/005245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/36(2006.01)i, A61L 27/56(2006.01)i, A61F 2/30(2006.01)i, A61L 27/58(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61F 2/28(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 27/36; A61F 2/28; A61K 35/12; A61K 9/10; A61L 27/56; C12N 5/07; A61F 2/30; A61L 27/58; A61L 27/54; A61K 9/16; A61K 9/00

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: biodegradable polymer, targeting, magnetism, micro structure, porous, cartilage cell, bone cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-075547 A (JMS CO., LTD. et al.) 11 March 2004 See claims 1-3, 9, 10; paragraph [0010].	1-10
Y	KR 10-2007-0047849 A (EISAI CO., LTD. et al.) 07 May 2007 See claims 1-4; pages 3-8.; figure 3.	1-10
A	KR 10-1627043 B1 (DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 03 June 2016 See the entire document.	1-10
A	JON, D. et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery. Drug development research. 2006, vol. 67, pages 55-60 See the entire document.	1-10
A	MANGUAL, J. O. et al. In vitro study of magnetic nanoparticles as the implant for implant assisted magnetic drug targeting. Journal of magnetism and magnetic materials. 2011, vol. 323, pages 1903-1908 See the entire document.	1-10



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 APRIL 2019 (02.04.2019)

Date of mailing of the international search report

02 APRIL 2019 (02.04.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/005245

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2004-075547 A	11/03/2004	None	
KR 10-2007-0047849 A	07/05/2007	AT 491781 T	15/01/2011
		CN 101173250 A	07/05/2008
		CN 101173250 B	26/01/2011
		CN 1742080 A	01/03/2006
		CN 1742080 C	12/03/2008
		EP 1650293 A1	26/04/2006
		EP 1650293 B1	15/12/2010
		EP 2182053 A1	05/05/2010
		EP 2360240 A1	24/08/2011
		ES 2358176 T3	06/05/2011
		JP 2006-325600 A	07/12/2006
		JP 3889026 B2	07/03/2007
		JP 4195478 B2	10/12/2008
		KR 10-0743341 B1	26/07/2007
		KR 10-0799060 B1	29/01/2008
		KR 10-2005-0084315 A	26/08/2005
		US 2006-0264690 A1	23/11/2006
		US 2010-0132722 A1	03/06/2010
		US 7971592 B2	05/07/2011
		US 8701676 B2	22/04/2014
		WO 2005-001070 A1	06/01/2005
		WO 2005-001070 A1	27/07/2006
KR 10-1627043 B1	03/06/2016	KR 10-2016-0031682 A	23/03/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/36(2006.01)i, A61L 27/56(2006.01)i, A61F 2/30(2006.01)i, A61L 27/58(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61F 2/28(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/36; A61F 2/28; A61K 35/12; A61K 9/10; A61L 27/56; C12N 5/07; A61F 2/30; A61L 27/58; A61L 27/54; A61K 9/16; A61K 9/00

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: 생분해성 고분자, 타겟팅, 자성, 마이크로구조, 다공, 연골 세포, 골 세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	JP 2004-075547 A (JMS CO., LTD. 등) 2004.03.11 청구항 1-3, 9, 10; 단락 [0010] 참조.	1-10
Y	KR 10-2007-0047849 A (에자이 가부시키키가이샤 등) 2007.05.07 청구항 1-4; 페이지 3-8,; 도 3 참조.	1-10
A	KR 10-1627043 B1 (단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단) 2016.06.03 전체 문헌 참조.	1-10
A	JON, D. 등, Magnetic nanoparticles for drug delivery, Drug development research, 2006년, 67권, 페이지 55-60 전체 문헌 참조.	1-10
A	MANGUAL, J. O. 등, In vitro study of magnetic nanoparticles as the implant for implant assisted magnetic drug targeting, Journal of magnetism and magnetic materials, 2011년, 323권, 페이지 1903-1908 전체 문헌 참조.	1-10

☐ 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

2019년 04월 02일 (02.04.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 04월 02일 (02.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2004-075547 A	2004/03/11	없음	
KR 10-2007-0047849 A	2007/05/07	AT 491781 T CN 101173250 A CN 101173250 B CN 1742080 A CN 1742080 C EP 1650293 A1 EP 1650293 B1 EP 2182053 A1 EP 2360240 A1 ES 2358176 T3 JP 2006-325600 A JP 3889026 B2 JP 4195478 B2 KR 10-0743341 B1 KR 10-0799060 B1 KR 10-2005-0084315 A US 2006-0264690 A1 US 2010-0132722 A1 US 7971592 B2 US 8701676 B2 WO 2005-001070 A1 WO 2005-001070 A1	2011/01/15 2008/05/07 2011/01/26 2006/03/01 2008/03/12 2006/04/26 2010/12/15 2010/05/05 2011/08/24 2011/05/06 2006/12/07 2007/03/07 2008/12/10 2007/07/26 2008/01/29 2005/08/26 2006/11/23 2010/06/03 2011/07/05 2014/04/22 2005/01/06 2006/07/27
KR 10-1627043 B1	2016/06/03	KR 10-2016-0031682 A	2016/03/23