(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0079791
(43) 공개일자 2013년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/40* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0000495
(22) 출원일자 2012년01월03일
심사청구일자 2012년01월03일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직동 1017 쌍용예가아파트 125-1402호
자야찬드란 벵카테산
부산광역시 남구 대연3동 부경대학교 대연캠퍼스
(74) 대리인
위병갑

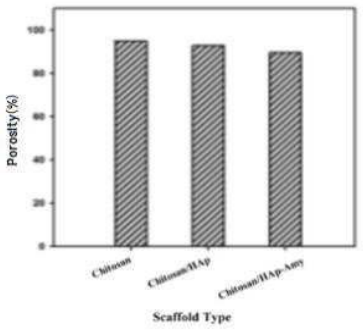
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **조직공학용 다공성 스캐폴드 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 우수한 생체적합성, 세포적합성, 생분해성을 갖는 자가골 대체를 위한 다공성 인공 이식재에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 키토산/수산화아파타이트-아밀로펙틴(Chitosan/Hap-AP)로 이루어진 조직공학용 다공성 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조직공학용 다공성 스캐폴드는 키토산, 수산화 아파타이드 및 아밀로펙틴 사이에 형성된 가교 결합을 통해 상호 결합 다공성 구조를 갖고, 이로 인해 세포 증식과 세포 전파가 매우 뛰어나며, 우수한 열안정성과 기계적 강도의 향상을 확보할 수 있는 유리한 효과가 있다. 또한, 우수한 생체적합성, 생분해성을 나타내어 인체에 해가 없어 생체의료분야에서 자가골 대체용 인공 이식재로 널리 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M2010-03
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	해양생물유래 향장소재의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화
주관기관	부경대학교
연구기간	2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

키토산(Chitosan), 수산화아파타이트(Hydroxyapatite) 및 아밀로펙틴(Amylopectin)이 3차원적으로 상호 결합되어 다공성 구조로 형성되는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 키토산의 분자량은 200 ~ 350 KDa이고, 탈아세틸화도가 85 ~ 95% 인 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 수산화아파타이트는 눈다랑어 뼈에서 분리된 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드의 기공율이 85 ~ 95%인 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드의 공극의 크기는 60 ~ 500㎛인 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 키토산 100중량부에 대해 수한산화아파타이트 50 ~ 100 중량부, 아밀로펙틴 50 ~ 100 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드.

청구항 7

a) 키토산을 아세트산 용액에 용해시키는 단계;

b) 상기 키토산 용액에 수산화아파타이트를 첨가하는 단계;

c) 상기 b)단계에서 형성된 용액에 아밀로펙틴을 첨가하는 단계; 및

d) 상기 c)단계에서 형성된 용액을 동결 건조시켜 스캐폴드를 제조하는 단계를 포함하는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 동결 건조는 24 ~ 48시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 a)단계 이후에 키토산 용액을 0.5 ~ 2시간 동안 초음파 처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 d)단계 이후에 동결 건조되어 형성된 스캐폴드를 중성의 pH가 되도록 염기성 용액에 담그는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 우수한 생체적합성, 세포적합성, 생분해성을 갖는 자가골 대체를 위한 다공성 인공 이식재로 활용가능한 조직공학용 다공성 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조직공학(tissue engineering)은 생명과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고, 나아가서 생체조직의 대용품을 만들어 다시 체내에 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용학문이다. 이러한 조직공학은 사람이나 동물의 조직을 채취하고 그 조직으로부터 세포를 분리시킨 후 지지체(스캐폴드)에 배양하여 세포-지지체 복합체를 제조한 후, 제조된 세포-지지체 복합체를 다시 인체나 동물 내에 이식하는 것을 기본원리로 한다.

[0003] 조직공학 기술은 인공피부, 인공뼈, 인공연골, 인공각막, 인공혈관 및 인공근육 등 인체의 거의 모든 장기에 적용되고 있는데, 이러한 생체조직 및 장기의 재생을 최적화하기 위해서는 기본적으로 생체조직과 유사한 지지체가 제공되어야 한다. 이상적인 지지체의 기본 요건은 크게 무독성, 기계적 물성 그리고 다공성을 들 수 있다.

[0004] 무독성은 세포-지지체 복합체를 생체조직 내 이식 후 혈액응고나 염증반응이 일어나지 않는 것을 말하며, 지지체의 기계적 물성은 세포의 성장을 충분히 지지할 수 있는 강도 등을 말하며, 지지체의 다공성은 지지체에 세포의 접착이 잘 일어날 뿐만 아니라 세포와 세포 사이에 충분한 공간이 확보되어 체액의 확산에 의해 산소나 영양분의 공급이 잘 일어나고 또 신생 혈관 형성도 원활히 이루어져서 성공적으로 세포가 성장, 분화할 수 있는 구조를 말한다. 기본적으로 세포는 2차원적인 배양이 이루어지는데 이를 조직이나 장기의 형태로 배양하기 위해서는 3차원의 지지체가 필요하다. 이러한 지지체는 수많은 기공을 가지고 있어 세포들이 내 외부에 부착할 수 있어야 하며 세포의 성장에 필요한 양분을 공급받고 노폐물을 배출하기 위해 열린 구조를 가져야 한다. 즉 다공성의 3차원 지지체가 필요한 것이다.

[0005] 따라서 상기 기본적 요건을 만족하는 지지체로는 동물 체내의 세포외 기질과 유사한 것이 적합하며, 상기 세포외 기질과 같은 다공성을 가진 지지체를 제조하는 방법이 연구되어 왔다. 대표적인 방법으로 입자 침출법(particulate leaching), 유화동결 건조법(emulsion freeze-drying), 고압기체 팽창법(high pressure gas expansion), 상분리법(phase separation), 전기방사법(electrospining)이 있다.

[0006] 한편, 스캐폴드는 생체적합성이 있어야 하며, 세포는 조직 또는 기관의 등가물을 형성하기 위하여 스캐폴드 상에 부착되고 증식할 수 있어야 한다. 따라서, 상기 스캐폴드는 시험관내 또는 생체내에서 세포 성장을 위한 기질로서 고려될 수 있다.

[0007] 이러한 특성을 갖는 지지체를 제조하기 위해 생분해성 고분자 물질을 사용하는데, 이러한 물리적 요건을 충족하면서 널리 사용되는 생분해성 고분자로는 콜라겐, 젤라틴, 히아루론산(hyaluronic acid), 키토산, 라미닌, 케라틴, 알지네이트(alginate), 피브로넥틴(fibronetin), 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안히드라이드(polyanhydride), 폴리오르쏘에스테르(polyorthoester), 폴리우레탄(polyurethane)의 합성재료, 피브린 및 피브리노겐, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴 술페이트, 폴리사카라이드 등이 현재 널리 사용되고 있다.

[0008] 한편, 전술한 다공성 구조를 가지는 생분해성 고분자로 이루어진 스캐폴드에 이식되는 조직세포는 계속적인 성장에 의하여 일련의 조직을 형성하게 되는데, 일반적인 생체조직의 재생은 재생하고자 하는 생체조직 형태로 스캐폴드 모양을 제조한 후, 상기 스캐폴드 내부에 조직세포를 이식하고, 이식된 조직세포를 성장시키는 방법을 이용하고 있다.

[0009] 관련된 선행문헌으로는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법에 관한 한국공개특허공보 제2010-0087317호 및

조직공학, 세포 배양 및 세포 운반용 다공성 스캐폴드의 제조방법에 관한 한국 공개특허공보 제2010-0080924호가 있다.

[0010] 그러나, 전술한 방법은 영양분 및 산소가 스캐폴드의 내부 안쪽으로 용이하게 전달되지 못하고, 세포조직의 성장이 균일하지 않으며, 설령 스캐폴드의 두께가 매우 얇다 하여도 그 중심부까지 조직세포가 성장하는 것이 어렵다는 문제점 등이 있다. 따라서, 조직공학 또는 배양에 유용한 다공성 스캐폴드에 대해 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 동결건조 방법을 이용하여 제조한 키토산/수산화아파타이트-아밀로펙틴으로 구성된 스캐폴드가 우수한 생체적합성, 생분해성, 열안정성, 높은 강도 등의 특성을 나타낸다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 키토산/수산화아파타이트-아밀로펙틴(Chitosan/Hap-AP)으로 이루어진 조직공학용 다공성 스캐폴드를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 동결건조 방법을 이용한 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 키토산, 수산화아파타이트 및 아밀로펙틴이 3차원적으로 상호 결합되어 다공성 구조로 형성되는 조직공학용 다공성 스캐폴드를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키토산의 분자량은 200 ~ 350 KDa이고, 탈아세틸화도가 85 ~ 95%인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 수산화아파타이트는 눈다랑어 뼈에서 분리된 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스캐폴드의 기공율이 85 ~ 95%일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스캐폴드의 공극의 크기는 60 ~ 500㎛일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키토산 100 중량부에 대해 수산화아파타이트 50 ~ 100 중량부, 아밀로펙틴 50 ~ 100 중량부로 첨가할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 a) 키토산을 아세트산 용액에 용해시키는 단계; b) 상기 키토산 용액에 수산화아파타이트를 첨가하는 단계; c) 상기 b)단계에서 형성된 용액에 아밀로펙틴을 첨가하는 단계; 및 d) 상기 c)단계에서 형성된 용액을 동결 건조시켜 스캐폴드를 제조하는 단계;를 포함하는 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 동결 건조는 24 ~ 48시간 동안 수행할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 a)단계 이후에 키토산 용액을 0.5 ~ 2시간 동안 초음파 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 d)단계 이후에 동결 건조되어 형성된 스캐폴드를 중성의 pH가 되도록 염기성 용액에 담그는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 조직공학용 다공성 스캐폴드는 키토산, 수산화 아파타이드 및 아밀로펙틴 사이에 형성된 가교결합을 통해 상호 결합 다공성 구조를 갖고, 이로 인해 세포 증식과 세포 전파가 매우 뛰어나며, 우수한 열안정성과 기계적 강도의 향상을 확보할 수 있는 유리한 효과가 있다. 또한, 우수한 생체적합성, 생분해성을 나타내어 인체에 해가 없어 생체의료분야에서 자가골 대체용 인공 이식재로 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 키토산, 키토산/HAp 및 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 기공율을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 키토산, 키토산/HAp 및 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 물 흡수 및 보존 능력을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 키토산, 수산화아파타이드, 아밀로 펙틴 및 이들의 복합 스캐폴드의 열안정성 확인을 위한 TGA 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 키토산, 수산화아파타이드, 아밀로 펙틴 및 이들의 복합 스캐폴드 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 키토산, 수산화아파타이드, 아밀로 펙틴 및 이들의 복합 스캐폴드의 XRD 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 (Ⅰ) 스캐폴드의 광학 현미경 이미지, (Ⅱ) 스캐폴드 상에서 MTT 처리된 세포의 광학 현미경 이미지, (Ⅲ) 스캐폴드 상에서 Hoechst 33342 염색된 세포의 광학 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 (Ⅰ) 키토산, 수산화아파타이드 및 아밀로 펙틴의 SEM 이미지, (Ⅱ) 준비된 각각의 스캐폴드의 SEM 이미지, (Ⅲ) 스케폴드 상에서 성장한 MG-63 세포주의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 MTT 분석법으로 스캐폴드 상에서 MG-63 세포주의 분화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 스캐폴드 상에서 알칼리성 인산가수분해효소 및 타입-I 콜라겐의 발현 정도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 자가골 대체를 위한 다공성 인공 이식재에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 키토산/수산화아파타이트-아밀로펙틴(Chitosan/HAp-AP)로 이루어진 조직공학용 다공성 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0027] “조직공학”은 일반적으로 이식에 적합한 지지체 상에 또는 내에 세포를 파종하여 조직 또는 기관의 등가물을 제조하는 것으로서 정의된다. 일반적으로, 대부분의 조직들은 계층적인 여러 가지 세포로 구성되어있으며, 분리시켰을 때 많은 세포들이 작은 규모에서 본래의 형태를 다시 형성할 수 있지만 그 세포들은 큰 형태를 이루기 위해 보조 지지체를 필요로 한다. 이러한 보조 지지체는 생체 내에서나 외에서나 세포를 모아 점착시킬 수 있어야하고 조직으로 발전시키기 위한 잠재적 장소가 되어야하며 점착된 세포들과 주변의 숙주 세포들이 새로운 조직을 형성할 수 있도록 해주어야 하는 특성을 충분히 발휘할 수 있어야 한다.

[0028] “스캐폴드(Scaffold)”는 조직 세포의 체외 배양과 체내 이식이 가능하도록 만들어진 물리적 지지체 및 점착 기질을 칭하는 것으로, 이러한 스캐폴드는 인체조직 재생을 위한 세포 이식에 사용되고 있으며, 또한 세포의 대량배양 및 증식에 있어서 그 중요성은 매우 높다. 그 이유는 줄기세포 또는 생검으로부터 얻은 세포들이 환자들에게 보다 효과적으로 사용되기 위해서는 체외에서 가능한 많은 수의 세포가 얻어져야 함은 물론 새로운 자기유래의 조직으로 분화가 이루어져야 하는데, 스캐폴드의 사용은 이들을 가능하게 할 수 있는 유일한 방법이기 때문이다.

[0029] 인체 조직의 재생을 위해 사용되는 스캐폴드 재료의 주된 요건으로는 조직세포가 재료 표면에 유착하여 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 기질 또는 틀의 역할을 충분히 해내야 하고, 이식된 세포와 숙주 세포 사이에 위치하는 벽으로서의 역할도 담당해야 하는데, 이는 이식 후 혈액응고나 염증반응이 일어나지 않는 무독성의 생체적합성이 있어야 함을 의미한다. 또한, 이식된 세포가 충분히 조직으로서 본연의 기능과 역할을 수행하게 되면 원하는 시간에 따라 생체 내에서 완전히 분해되어 사라질 수 있는 생분해성을 지녀야 한다.

[0030] 이상적인 생체적합성 스캐폴드의 속성에는 시험관내 또는 생체내에서 세포 성장을 지지하는 능력, 다양한 범위의 세포 유형 또는 계통의 성장을 지지하는 능력, 요구되는 유연성 또는 경직성의 다양한 수준을 갖는 능력, 다양한 수준의 생분해성을 갖는 능력, 2차 손상을 유발하지 않고 생체내에서 목적하는 부위로 도입되는 능력, 및 원하는 작용 부위로 약물, 세포 및/또는 생활성 물질의 운반을 위한 저장소 또는 담체로서 제공되는 능력이 포함되어야 한다. 또한, 뼈 조직 공학을 위한 스캐폴드는 세포 부착, 증식, 조직 성장 및 적절한 영양분 공급을 수행할 수 있는 생물학적 환경을 조성하기 위해 높은 다공성과 상호 연결된 기공 구조가 필수적이다.

[0031] 이러한 요구를 가장 잘 충족하는 것으로 생분해성 고분자를 들 수 있다. 생분해성 고분자는 정해진 크기나 모양으로 조직을 재생할 수 있는 능력이 있고, 생체 내에서나 생체 외에서 세포의 점착과 확장을 위한 임시적인 장소를 제공해주기에 세포증식 및 세포분화를 위한 합성 세포외 기질로 사용하기에 좋은 물질이다.

[0032] 본 발명에서는 위에서 설명한 뼈의 세포외 매트릭스의 모든 특성을 갖는 신규한 스캐폴드를 제조하기 위한 재료로 키토산(Chitosan), 수산화아파타이트(Hydroxyapatite, 이하 'HAp'라고 함), 아밀로펙틴(Amylopectin, 이하 'AP'라 함)을 사용하고, 동결 건조 방법을 적용하여 복잡한 공정 없이 간단하게 신규한 키토산/HAp-AP 조성의 복합 스캐폴드를 제조하였다는 점에 특징이 있다.

[0033] 따라서, 본 발명은 키토산, 수산화아파타이트 및 아밀로펙틴이 3차원적으로 상호 결합되어 다공성 구조로 형성되는 조직공학용 다공성 스캐폴드를 제공한다.

[0034] 본 발명에서 스캐폴드의 제조에 사용된 재료들은 모두 생체적합성(biocompatibility), 생분해성(biodegradability) 및 생물학적 활성(bioactivity)과 같은 뼈의 세포외 기질의 모든 성질과 유사하게 작용한다. 이러한 특성들은 이식된 뼈 조직의 성능에 중요한 역할을 하는데, 생체적합성과 생분해성을 갖는 고분자 기반의 스캐폴드는 더 이상 필요로 하지 않을 때까지 그 기계적 특성을 유지한 후 신체에 모두 흡수된다.

[0035] 본 발명에 따른 키토산/HAp-AP 복합 스캐폴드는 스캐폴드를 구성하는 재료들, 즉 키토산, HAp 및 AP가 화학적으로 상호작용하여 3차원적으로 상호 결합된 다공성 구조를 가지고 있어 기계적 스트레스를 견딜 수 있도록 견고하게 설계될 수 있으므로 더욱 견고하고 안정한 특성을 나타내며, 스캐폴드의 강도를 강화시킬 수 있다. 그리고 높은 다공성을 나타내어 세포 부착과 성장에 적합한 표면을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명에 따른 키토산/HAp-AP 복합 스캐폴드는 키토산 고분자 기반의 스캐폴드에 HAp와 AP를 첨가함으로써 생분해를 조절할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실실시예에 따르면, 동결 건조 방법을 이용하여 제조한 키토산/HAp-AP 복합 스캐폴드의 주요 특성을 살펴본 결과, 액체 변위법으로 다공성을 확인한 결과 기공율은 89% 이상으로 나타났으며(도 1 참조), 열무게 분석은 복합 스캐폴드가 높은 온도에서 안정하다는 것을 보여준다(도 3 참조). 또한, FT-IR 분광법으로 확인한 결과 키토산/HAp-AP 스캐폴드는 키토산, HAp, AP 사이에 가교 결합(cross linking)을 갖는 것으로 나타났다(도 4 참조). 스캐폴드의 열안정성, 다공성 및 세포 증식을 비교하면 또한, MG-63 세포주에서 스캐폴드의 in vitro 세포독성 분석 실험에서는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다(도 8 참조). 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 본 발명의 키토산/HAp-AP 스캐폴드는 우수한 열안정성, 상호 결합 다공성 구조, 조절 가능한 생분해, 강화된 세포 증식과 같은 특성을 기반으로 뼈 조직 공학 분야에서 잠재적으로 중요하게 적용할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 키토산은 중간 분자량, 바람직하게는 200 ~ 350 KDa의 분자량을 갖는 것을 사용할 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 310 KDa를 갖는 키토산을 사용하였다. 또한, 탈아세틸화(Deacetylation) 정도는 85 ~ 95% 범위에 있는 것을 사용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 탈하세틸화 정도가 90%인 것을 사용하였다.

[0039] 또한, 수산화아파타이트는 뼈에서 분리되거나 인공적으로 합성된 물질을 사용할 수 있으며, 본 발명의 일례에 따르면 눈다랑어 뼈에서 분리된 것을 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 키토산과 수산화아파타이트, 아밀로펙틴의 혼합 비율은 키토산 100중량부에 대해 수산화아파타이트 50 ~ 100 중량부, 아밀로펙틴 50 ~ 100 중량부 로 혼합할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 다공성 키토산/HAp-AP 스캐폴드는 기공이 망목상으로 형성되는데, AP를 첨가함으로 인해 기공 사이즈가 증가한다. 기공의 크기는 60 ~ 500㎛인 것이 바람직하며, 이러한 기공의 구조 및 크기는 세포가 스캐폴드 내부로 효과적으로 성장할 수 있도록 세포 성장과 영양분 공급에 유용한 역할을 한다. 즉, 조직 부피의 보존, 세포 증식, 유전자와 단백질의 전달 등을 통해 조직 재생에서 상당히 중요하다.

[0042] 스캐폴드의 기공율은 수산화아파타이트와 아밀로펙틴이 첨가됨에 따라 감소하게 되며, 원하는 이식재로써의 기능을 구현하기 위해 기공율은 85 ~ 95%인 것이 바람직하다. 왜냐하면 기공율이 85% 미만인 경우에는 기공의 크기가 작고 불균일하여 서로 연결된 기공 망목 구조를 거의 만들 수 없어 바람직하지 못하고, 기공율이 95%를 초과하는 경우에는 지지체에 너무 많은 부분을 기공이 차지하게 되어 강도가 약해지므로 바람직하지 못하기 때문이다. 따라서 90% 정도의 기공율이 가장 바람직하다.

[0043] 한편, 본 발명은 조직공학용 다공성 스캐폴드의 제조방법을 제공하며, 이러한 다공성 스캐폴드의 제조방법은 a) 키토산을 아세트산 용액에 용해시키는 단계; b) 상기 키토산 용액에 수산화아파타이트를 첨가하는 단계; c) 상기 b)단계에서 형성된 용액에 아밀로펙틴을 첨가하는 단계; 및 d) 상기 c)단계에서 형성된 용액을 동결 건조시

켜 스캐폴드를 제조하는 단계를 포함한다.

[0044] 먼저 키토산을 아세트산 용액에 용해시키는데, 교반하여 용해시키는 과정에서 발생하는 공기방울을 제거하기 위해 초음파 처리를 더 수행할 수 있다. 이때, 초음파 처리는 0.5 ~ 2시간 동안 수행할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 30분 동안 수행하였다.

[0045] 이렇게 형성된 키토산 용액에 수산화아파타이트를 첨가하고, 아밀로펙틴을 첨가한다.

[0046] 다음으로, 형성된 용액을 동결 건조시켜 스캐폴드를 제조하는데, 동결 건조는 -80℃ 정도에서 시작하여 24 ~ 48시간 동안 동결시키고 스캐폴드를 형성하기 위해 동결건조기에서 동결건조하였다. 본 발명의 일실시예에서는 -80℃에서 48시간 동안 동결건조하였다.

[0047] 마지막으로 동결건조하여 제조한 스캐폴드를 중성의 pH가 되도록 염기성 용액에 담그고, 세척 및 건조시키면 본 발명의 키토산/HAp-AP 스캐폴드가 제조된다.

[0048] 본 발명의 방법은 임의의 적합한 방법을 이용하여 임의의 적절한 시점에 스캐폴드를 멸균하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 스캐폴드는 원하는 크기 및 형태를 갖기 위해 절단되고 형상화될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 키토산/HAp-AP 스캐폴드는 초기의 세포 부착 시, 복합 스캐폴드에서는 그들 자신의 높은 상호연결 다공성 구조 때문에 키토산 스캐폴드와 비교하여 세포 증식과 세포 전파가 매우 뛰어나다. 또한 우수한 열안정성과 기계적 강도의 향상을 확보할 수 있으며, 우수한 생체적합성, 생분해성을 나타내어 인체에 해가 없어 생체의료분야에서 자가골 대체용 인공 이식재로 널리 사용될 수 있는 장점이 있다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **<실시예 1>**

[0053] **본 발명에 따른 스캐폴드의 제조**

[0054] **<1-1> 재료**

[0055] 본 발명에서는 스캐폴드를 제조하기 위하여 키토산, 중성 HAp 및 AP를 사용하였다. 중간 분자량(~310 KDa, 탈아세틸화도 90%) 키토산은 Kitto life Co. Ltd(South Korea)에서 구입하여 사용하였다. HAp는 열소성법을 사용하여 눈다랑어(Thunnus obesus)의 뼈로부터 분리한 것을 사용하였으며, 아밀로펙틴은 Sigma chemical 사에서 구입하여 사용하였다.

[0056] 인간 골유사세포주(MG-63)는 ATCC(Manassas, VA, USA)로부터 얻었으며, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지는 Gibco BRL, Life Technology로부터 얻었다. MTT(3-(4, 5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)는 molecular probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, Bisbenzimide Hoechst 33342 stain은 SigmaAldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 글루타알데하이드(Glutaraldehyde) 25%는 Junsei Chemical사(Japan)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

[0057] **<1-2> 키토산 스캐폴드의 제조**

[0058] 먼저, 중간 분자량 키토산 2.5g을 2% 아세트산 용액 250ml에 용해시키고, 이 용액을 교반장치(RW 20.n Labortechik)를 사용하여 밤새 저어준 후, 공기방울을 제거하기 위하여 1시간 동안 초음파 처리하였다. 이 용액을 작은 패트리접시(35×10mm)에 옮기고 -80℃에서 48시간 동안 동결시킨 후 마지막으로 스캐폴드를 형성하기 위하여 동결 건조기에서 동결 건조하였다.

[0059] 이러한 스캐폴드를 10% 수산화나트륨 용액에 담그고 중성의 pH가 되도록 과량의 물로 세척한 후, 다음 실험 준

비를 위해 다시 동결 건조시켰다.

[0060] **<1-3> 키토산/HAp 스캐폴드의 제조**

[0061] 키토산/HAp 스캐폴드를 제조하기 위해, 중간 분자량 키토산 2.5g을 2% 아세트산 용액 250ml에 용해시키고, 이 용액을 밤새 저어준 후, 공기방울을 제거하기 위하여 1시간 동안 초음파 처리하였다. 눈다랑어 뼈에서 분리된 HAp 2.5g을 물 50ml에 분산시키고 dropper로 주의하여 키토산 용액으로 옮겼다. 이후의 나머지 과정은 키토산 스캐폴드를 제조하는 과정과 동일하게 진행하였다.

[0062] **<1-4> 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 제조**

[0063] 키토산/HAp-AP 스캐폴드를 제조하기 위해 AP 2.5g을 키토산/HAp 용액에 천천히 첨가하고, 혼합용액을 밤새 저어주었다. 이후의 나머지 과정은 키토산 스캐폴드를 제조하는 과정과 동일하게 진행하였다.

[0064] **<실시예 2>**

[0065] **스캐폴드의 육안적 관찰(gross examination)**

[0066] 동결 건조 방법을 이용하여 제조한 키토산과 이의 복합 스캐폴드를 시각적으로 관찰한 결과 뽀뽀하고 탄력있는 것으로 나타났다.

[0067] 또한, 모든 스캐폴드를 0.1M PBS 용액에 담근 경우, 키토산 스캐폴드는 키토산/HAp 및 키토산/HAp-Ap 스캐폴드와 비교하여 더 유연하고 빠르게 부풀어 오르는 것으로 관찰되었다. 이는 HAp 및 AP가 혼합(incorporation)됨에 따라 키토산 조직을 더 단단하게 만들기 때문이다.

[0068] 키토산과 키토산/HAp 스캐폴드는 무색인 반면, 키토산/HAp-AP는 흰색으로 나타났는데 이는 폴리머와 세라믹 매트릭스에서 AP가 분산되었기 때문이다.

[0069] **<실시예 3>**

[0070] **기공율 측정**

[0071] 기공율(porosity)은 뼈 조직 공학 스캐폴드에서 가장 중요한 파라미터이다. 다공성 스캐폴드 재료는 조직 부피의 보존, 임시 기계적 기능의 제공, 세포 부착과 증식, 및 유전자와 단백질의 전달에 의해 조직 재생에서 상당히 중요한 역할을 한다. 상기 <실시예 1>에서 제조된 스캐폴드의 총 기공율은 액체 변위법(liquid displacement method)을 이용하여 측정하였다.

[0072] 먼저 에탄올의 부피와 스캐폴드의 건조 중량을 측정하였다. 다음으로 스캐폴드가 알코올을 흡수하여 포화될 때까지 스캐폴드를 탈수 알콜에 48시간 동안 담근 후, 스캐폴드의 중량을 다시 측정하였다. 마지막으로 샘플의 기공율은 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

[0073] 기공율 = $(V_1-V_3)/V_2-V_3$

[0074] 상기 식에서, V_1은 최초에 알려진 스캐폴드의 중량,

[0075] V_2는 에탄올과 담지된(submerged) 스캐폴드의 중량 합계,

[0076] V_3는 스캐폴드를 제거한 후 에탄올 중량을 나타낸다.

[0077] 모든 스캐폴드에 대해 3개의 샘플을 분석하여 각 샘플의 기공율의 평균값을 얻었다.

[0078] 그 결과, 키토산 스캐폴드의 기공율은 94.87%로 나타났으며, 키토산/HAp 스캐폴드(92.87%), 키토산/HAp-AP 스캐폴드(89.54%)는 키토산과 비교하여 기공율이 더 낮게 나타났다(도 1 및 표 1 참조).

[0079] 키토산/HAp 스캐폴드 및 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 총 기공율은 키토산과 비교하여 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 스캐폴드 재료들 사이에서 발생하는 화학적 상호작용에서 기인한다. 이러한 화학적 상호작용은 키토산의 NH_2 그룹과 HAp의 -OH그룹 사이에서 발생하며 이는 복합 스캐폴드의 기공율을 감소시킨다. 또한, 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서 키토산/HAp 스캐폴드보다도 기공율이 더 감소하는 이유는 AP 내에 존재하는 분지된 폴리사카라이드 단위 때문이며, 이는 분자사이의 조절 화학적 상호작용의 결과로 볼 수 있다.

표 1

[0080]

No.	스캐폴드 종류	총 기공율(%)	열분해점(℃)	생분해능(%)	기공 사이즈()
1	키토산	94.87	294.86	12	40~400
2	키토산/HAp	92.78	300.13	4	60~180
3	키토산/HAp-AP	89.54	312.49	6	80~500

[0081] **<실시예 4>**

[0082] **물의 흡수 및 보존 능력**

[0083] 스캐폴드의 물 흡수 및 보존 능력은 생리활성 액체의 흡수뿐만 아니라 스캐폴드를 통해 영양분과 대사물질의 전송을 위해 필수적이다. 스캐폴드의 물 흡수 및 보유 능력을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0084] 먼저, 건조된 스캐폴드의 무게를 측정하고(W_{dry}), 증류수에 24시간 동안 담갔다. 다음으로 24시간 후에 스캐폴드를 비커로부터 부드럽게 제거하고, 와이어 그물망 선반에 놔두었다. 과도한 물은 배수하고, 물의 흡수를 확인하기 위해 5분 후 스캐폴드의 무게를 측정하였다(W_{wet}). 물 보유 능력을 측정하기 위해, 젖은 스캐폴드를 바닥에 필터지를 포함하는 원심분리기 튜브로 이동시키고, 500rpm에서 3분 동안 원심분리한 후(Combi 514-Hanil Science industrial), 바로 무게를 측정하였다(W'_{wet}).

[0085] 평형상태에서 스캐폴드의 물 흡수(EA)와 물 보존(ER) 비율은 다음과 같은 방정식을 사용하여 계산하였다.

[0086] $EA = [W_{wet}-W_{dry}/W_{dry} \times 100$

[0087] $ER = [W'_{wet}-W_{dry}/W_{dry}] \times 100$

[0088] 그 결과, 키토산 스캐폴드의 물 흡수 및 물 보존 능력은 키토산/HAp 스캐폴드 및 키토산/HAp-AP 스캐폴드와 비교하여 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 순수한 키토산에 HAp 및 Ap를 첨가함으로써 물 흡수 정도를 감소시키는 것을 알 수 있었다. 또한, HAp의 함량이 증가함에 따라 물 흡수가 감소하는 것으로 나타났다.

[0089]

[0090] **<실시예 5>**

[0091] **in vitro 생분해(biodegradation) 시험**

[0092] 스캐폴드의 생분해를 확인하기 위하여 리소자임 효소와 0.1M 인산 버퍼용액(인산수소나트륨 1수염과 인산수소나트륨 2수염 및 pH 7.2 PBS)을 사용하여 측정하였다.

[0093] 스캐폴드 샘플을 PBS 10ml와 리소자임를 포함하는 falcon 튜브에 담그고 37.0±0.5℃에서 진동시켜 보관하였다. 7, 14 및 21일 동안 담근 후, 샘플을 회수하여 탈이온수로 세척하고, 동결 건조시킨 후 다시 무게를 특정하였다. 모든 스캐폴드에 대해 3가지의 유사한 샘플을 사용하였다.

[0094] 무게 손실(WL)은 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

[0095] $W_L = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\ \%$

[0096] 상기 식에서, W_0는 담그기 전의 샘플 무게를 나타내고, W_1은 담근 후의 샘플 무게를 나타낸다.

[0097] 그 결과, 키토산은 인간의 체액과 조직에서의 세포내 환경과 유사한 PBS 용액에 의해 분해되는 것으로

나타났다. 키토산 스캐폴드는 21d에서 원래 무게의 약 12% 정도로 분해되는 것으로 나타났으며, 키토산/HAp 스캐폴드는 4%, 키토산/HAp-AP 스캐폴드는 6% 정도로 분해되었다(표 1 참조).

[0098] 이러한 결과를 통해 HAp와 AP를 추가함으로써 스캐폴드의 생분해를 저하시킨다는 것을 알 수 있다.

[0099] **<실시예 6>**

[0100] **스캐폴드의 열안정성 분석**

[0101] 스캐폴드의 열안정성은 TGA 분석법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0102] TGA-DTG(Thermogravimetric and Derivative Thermogravimetric) 분석은 Pyris 1 TGA analyzer (Perkin-Elmer Inc., USA)를 사용하여 수행하였으며, 지속적으로 질소가 흐르는 10℃ min-1의 일정한 가열속도에서 스캔 범위는 50 ~ 800℃로 하였다.

[0103] 그 결과, TGA 및 DTG 곡선으로부터 키토산 스캐폴드의 중량감소가 294.86℃에서 관찰되었으며, 이는 글루코사민 일부분(moieties)에 대응한다.

[0104] 키토산/HAp 스캐폴드의 중량감소는 300.13℃, 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 중량감소는 321.49℃에서 관찰되었다. 키토산/HAp, 키토산/HAp-AP의 분해점이 차이가 나타나는 것은 키토산, HAP 및 AP 사이의 몇몇 공유 상호작용 때문이며, 이러한 결과들을 통해 AP를 추가함으로써 스캐폴드의 열 안정성을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

[0105] 또한, 키토산은 800℃에서 약 80% 정도로 분해되는 반면에, 키토산/HAp와 키토산/HAp-AP는 각각 약 55%, 60% 정도로 분해되는 것으로 나타났다. 높은 온도에서 키토산/HAp 및 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 분해가 제한되는 이유는 열에 안정한 HAp가 첨가되었기 때문이다. 이러한 결과를 통해 복합 스캐폴드는 높은 온도에서 매우 안정하다는 것을 확인하였다.

[0106] **<실시예 7>**

[0107] **FTIR에 의한 스캐폴드 분석**

[0108] 스캐폴드의 구성성분 사이의 분자 간 상호작용을 확인하기 위해, FTIR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 스펙트럼을 측정하였다. 스캐폴드의 신장(stretching) 주파수는 400 ~ 4000cm^{-1} 범위 내에서 Fourier Transform Infrared Spectroscopy(Perkin Elmer, USA)와 spectrum GX spectrometer를 사용하여 측정하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0109] 순수한 키토산의 IR 스펙트럼을 살펴보면, N-H의 신축 진동(stretching vibration)과 OH 신축 진동 결합에 대응하는 3430cm^{-1} 및 2924cm^{-1} 주위에서 특징적인 피크가 나타났으며, 아미드I 및 아미드II의 특징적인 피크는 각각 1647cm^{-1} 및 1606cm^{-1}에서 나타났다. 1409cm^{-1}에서 나타나는 sharp 피크는 CH_3 대칭 변형 모드(symmetrical deformation mode)를 나타내며, 1074cm^{-1} 및 1031cm^{-1}는 C-O 신축 진동 v(C-O-C)를 나타낸다.

[0110] HAp의 IR 스펙트럼은 자연적인 HAp의 특징적인 흡수 밴드를 나타내었다. HAp 스펙트럼에서 나타나는 많은 수의 밴드(3571, 1459, 1415, 1089, 1050, 962, 633, 603 및 571 cm^{-1})는 이전의 연구에서 보고된 HAp 레퍼런스 스펙트럼과 유사하게 나타났다.

[0111] AP의 IR 스펙트럼은 800cm^{-1}, 800 ~ 1500cm^{-1}(지문영역, fingerprint region), 2800 ~ 3000cm^{-1}(C-H 신축 영역), 3000 ~ 3600cm^{-1}(O-H 신축 영역)에서 피크가 나타났으며, 전분(starch)과 거의 유사한 밴드를 나타낸다.

[0112] 스캐폴드의 FTIR을 측정한 결과, 키토산/HAp 스캐폴드에서는 키토산과 HAp의 혼합 특징 피크가 관찰되었으며, 이는 HAp 입자가 키토산 고분자 매트릭스(matrix) 내에 높고 균일하게 분산되어 있는 것을 명확하게 나타낸다. 특징적인 피크는 571cm^{-1} 및 603cm^{-1}에서 관찰되며, 작은 전이(shifting)는 1047cm^{-1}, 1090cm^{-1} 및 1416cm^{-1}(HAp에 대응) 뿐만 아니라 2920cm^{-1}, 1644cm^{-1}, 1595cm^{-1}, 1145cm^{-1}(키토산 신축 주파수에 대응)에서 관찰되었다. 키토산/HAp에서 키토산의 신축 주파수는 감소하며, 이는 복합 스캐폴드에서 키토산과 HAp 입자의 칼슘 이온 사이에서

분자사이 및 co-ordination 화학적 상호작용이 가능하다는 것을 의미한다. 이러한 화학적 상호작용은 복합 스캐폴드를 더 강하고 안정하게 만들어주며, 복합 스캐폴드에서 키토산은 스캐폴드의 back bone으로 작용할 뿐만 아니라 스캐폴드의 강도를 유지하는 역할을 한다.

[0113] 한편, 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서 관찰되는 571cm^{-1}, 602cm^{-1}, 1049cm^{-1} 및 1085cm^{-1} 피크는 HAp 결정에서 기인하며, 1146cm^{-1}에서 관찰되는 화학적 신축 주파수의 감소는 키토산의 일부분(moieties)과 몇몇 화학적 상호작용에 따른 것이다. 또한 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서 HAp 결정의 최대 투과율(transmittance)이 관찰되는데, 이는 폴리사카라이드(키토산, AP)에서 세라믹 매트릭스의 높은 분산 때문이다. 이러한 결과들을 통해 키토산과 HAp 및 AP가 화학적으로 상호작용하는 것을 알 수 있었다.

[0114] **<실시예 8>**

[0115] **X-선 회절(XRD) 분석**

[0116] 스캐폴드의 위상(phase) 및 결정성(crystallinity)을 분석하기 위하여 X-ray diffractometer(PHILIPS X'Pert-MPD diffractometer, Netherland)를 사용하여 측정하였다.

[0117] 키토산, 중성 HAp, AP, 키토산/HAp 스캐폴드, 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 회절 패턴은 도 5에 나타내었다.

[0118] 그 결과, 키토산에서 3개의 주요 피크가 10.5, 20.0(최대 강도) 및 22.5에서 나타났다. HAp의 회절 패턴은 이전에 보고된 바와 같은 결과가 나타났다. 또한, AP에서는 폴리사카라이드의 비정질 특성 때문에 키토산 스캐폴드와 유사한 넓은 회절 밴드가 관찰되었는데, 17.2에서 최대강도의 회절 피크가 나타났으며, 몇몇의 다른 추가적인 피크를 제외하고는 15.2, 18.3, 23.0에서 나타났다. AP에서 이러한 회절 피크는 매우 넓으며 이는 AP가 높은 비정질 특성 및 낮은 결정성을 나타내는 것을 보여준다.

[0119] 또한, 키토산/HAp 스캐폴드와 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서 모두 키토산의 회절 피크는 20.0에서 나타났으며, 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서 높은 결정질 HAp의 회절 패턴에 대응되는 최대 회절 피크가 31.4에서 관찰되었다. 복합 스캐폴드에서 HAp의 결정성은 순수한 HAp와 비교하여 작게 나타나는데, 이는 스캐폴드를 제조하는 동안 HAp의 교반 때문에 결정성이 감소한기 때문인 것으로 사료된다.

[0120] **<실시예 9>**

[0121] **광학 현미경 분석**

[0122] 스캐폴드, MTT 처리된 세포 및 Hoechst 염색된 세포는 광학 현미경(CTR 6000; Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하여 이미지를 얻었다.

[0123] **<9-1> 광학현미경 관찰**

[0124] 키토산 매트릭스 내에서 HAp, AP의 분산은 광학 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과는 도 6(I)에 나타내었다.

[0125] 그 결과, 광학 현미경의 입사광은 높은 다공성을 갖는 키토산 매트릭스 내로 쉽게 관통되는 반면에, 키토산/HAp, 키토산/HAp-AP 스캐폴드에서는 입사광이 반사된다. 이는 HAp가 존재하기 때문이다. 또한, 고분자 및 세라믹 매트릭스 내에서 AP가 적절히 분산 및 분포되어 있는 것을 확인할 수 있으며, 이는 SEM 관찰 결과와 일치한다.

[0126] **<9-2> MTT 분석**

[0127] 사용한 재료들의 생체적합성을 확인하기 위해 MTT 분석법을 사용하여 세포독성을 측정하였으며, 그 결과를 도6(Ⅱ)에 나타내었다. 이러한 MTT 분석은 살아있는 세포에서 MTT 염을 포르마잔 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의(mitochondrial) 환원을 기초로 한다.

[0128] MTT 분석법은 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포르마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 환원은 미토콘드리아 환원효

소가 활성화되어 있는 경우에만 일어난다. MTT 포르마잔의 흡광도는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

[0129] 이러한 실험 결과로부터, 복합 스캐폴드에서 포르마잔 결정의 양이 키토산 스캐폴드와 비교하여 높게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 키토산/HAp-AP 스캐폴드 내에서 세포 증식(proliferation)을 유도하는 것을 의미한다.

[0130] **<9-3> Hoechst 염색법**

[0131] 복합 스캐폴드 상에서 세포 성장은 Hoechst 염색으로 확인하였으며, 그 결과는 도 6(Ⅲ)에 나타내었다.

[0132] Hoechst 염색 33342(bis-benzimide와 밀접하게 관련)는 핵과 미토콘드리아의 시각화를 위해 통상적으로 사용하는 형광 DNA 표지염색으로, 스캐폴드 상의 생존 세포를 찾기 위해 사용하였다.

[0133] 각 스캐폴드에 대하여 3개의 샘플을 24 웰 세포 배양 플레이트에 위치하고, MG-63 세포주(2×10^3 cells/well)를 한 방울씩 씨딩하였다. 또한 스캐폴드 상에 세포가 부착되도록 하기 위해 스캐폴드를 37℃에서 4시간 동안 배양하였으며, 그 후에 각 웰에 1.5 ml의 새로운 media를 첨가하였다. 배양한지 7일 후, 웰에서 media를 제거하고 스캐폴드는 세포와 함께 PBS 용액으로 2회 세척하고, -4℃에서 밤새 2.5% 글루타알데히드로 고정시켰다. 세포를 10 μg/ml 형광 DNA-표지 염료인 Bisbenzimide Hoechst 33342로 염색한 후, 37℃에서 20분 동안 배양하여 핵 응축/응집이 나타났다. Hoechst 염색된 세포는 시각적으로 관찰하고, 광학 현미경(CTR 6000; Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

[0134] 그 결과, 복합 스캐폴드(키토산/HAp, 키토산/HAp-AP)가 키토산 스캐폴드와 비교하여 더 높은 세포 밀도를 갖는다는 것을 명확하게 관찰할 수 있었다. 그러나 복합 스캐폴드 내에서 몇몇 세포사멸 세포가 관찰되며, 이는 세포의 높은 confluency 때문인 것으로 사료되었다.

[0135] **<실시예 10>**

[0136] **스캐폴드의 형태학적 분석**

[0137] 스캐폴드의 형태와 기공율을 확인하기 위해 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy, HITACHI S-2400, Japan)을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0138] 그 결과, 키토산은 높은 분자량과 중합된 조직 때문에 높은 밀도의 구조를 갖는 것으로 나타났으며, HAp와 AP에서 마이크로 및 나노 크기 재료의 조합이 관찰되었다(도 7(Ⅰ) 참조). 이러한 마이크로 및 나노 결정 구조는 거대(macro) 크기 재료로만 이루어진 것에 비해 스캐폴드의 효과적인 조절을 위해 매우 유용하다.

[0139] 또한, 키토산, 키토산/HAp, 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 SEM 이미지는 도 7(Ⅱ), 스캐폴드 상에서 그들의 세포 성장을 도7(Ⅲ)에 나타내었다. 복합 스캐폴드는 거의 동등한 다공성 구조와 우수하게 상호 연결되어 3차원화된 구조를 나타내며, HAp 입자는 키토산 매트릭스에서 균일하게 분산되어 있는 것으로 나타났다. 상호 연결된 다공성 구조는 모든 복합 스캐폴드에서 관찰되었으며, 키토산 매트릭스 내에서 HAp 입자뿐만 아니라 AP의 균일한 분산이 관찰되었다. 이는 키토산 네트워크의 전하를 띄는 성질에서 기인한 것으로 사료되었다.

[0140] 한편, 키토산/HAp 스캐폴드와 키토산/HAp-AP 스캐폴드의 기공 사이즈는 각각 60~180, 80~500범위에서 다양하게 나타났다. 이러한 결과를 통해, 고분자 및 세라믹 매트릭스 내에 AP를 첨가하는 경우 키토산/HAp 스캐폴드에 비해 기공 사이즈가 증가시키는 것을 확인하였다. 기공 사이즈가 증가되면 세포 성장과 영양분 공급에 유용하다.

[0141] **<실시예 11>**

[0142] **in vitro 세포 분화 분석**

[0143] 스캐폴드의 세포 증식과 생체적합성은 MTT 분석법을 통해 조사하였으며, 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0144] 골유사 세포주 MG-63를 10% FBS, 2mM 글루타민 및 100/ml 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지에서 37℃ 및 5% CO_2 습식 공기 조건하에서 배양하였다. 스캐폴드에서 in vitro 세포 분화는 MTT 분석에 의해 연구하였다. MG-63 세포주와 세포 배양 플라스크($75cm^2$, 필터 캡)로부터 얻은 90% confluency는 cytocompatibility 및

복합 스캐폴드의 세포분화를 조사하는데 사용하였다.

[0145] 세포 씨딩(seeding) 전에, 스캐폴드는 24-웰 배양 플레이트에 넣고, 400매체(media)를 첨가하고 5% CO_2 및 95% 공기 분위기의 습식 배양기에서 37℃에서 4시간 동안 배양하였다.

[0146] 2×10^3 세포 100㎕를 스캐폴드 위에 한 방울씩 씨딩하였으며, 이로 인해 세포가 스캐폴드 전체에 분포하도록 할 수 있다. 따라서, 세포가 씨딩된 스캐폴드는 스캐폴드에 세포가 부착되도록 하기 위해 5% CO_2 조건의 습식 배양기에서 37℃에서 4시간 동안 배양하였다.

[0147] 배양 기간 동안 매일 새로운 배지로 교환하였다. 3가지 복제는 각각의 스캐폴드 타입 실험에 사용하였다. 또한, 스캐폴드에서 세포 생존력은 MTT 분석을 사용하여 측정하였다. 스캐폴드 상의 media는 매일 제거하고 400㎕ MTT(1mgml^1 medium)를 함유하는 신선한 배지를 사용하여 37℃에서 4시간 동안 암흑 상태에서 배양하였다. 비반응성 염료가 제거된 후, 색상을 띄는 용액에 DMSO 400㎕를 첨가하여 세포 용해 보라색 포르마잔 제품을 분해하였다. 이 용액의 흡광도는 540nm에서 분광광도계 및 aGENios microplate reader(Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 측정하였다.

[0148] 그 결과, in vitro에서 골유사세포(MG-63)를 가지고 확인한 결과 스캐폴드는 조직 내에서 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 또한, 초기의 세포 부착 시 복합 스캐폴드에서는 그들 자신의 높은 상호 연결 다공성 구조 때문에 키토산 스캐폴드와 비교하여 세포 증식과 세포 전파가 매우 뛰어나다는 사실을 알 수 있었다.

[0149] **<실시예 12>**

[0150] **<u>알칼리성 인산가수분해효소 및 타입-I 콜라겐 생산</u>**

[0151] 복합 스캐폴드에서 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)와 타입-I 콜라겐 생산을 확인하기 위하여 PCR 반응을 수행하였으며, 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[0152] 총 세포내 RNA(Total cellular RNA)는 트리졸 시약(Invitrogen Co., CA, and USA)을 사용하여 추출하였다. 간략하게, 총 RNA(2㎍)는 1X RT buffer, 1mM dNTPs, 500ng oligo(dT), 140U M-MLV reserve transcriptase 및 40U RNase inhibitor를 함유하는 master 혼합물에서 42℃에서 60분 및 72℃에서 5분 동안 automatic Whatman thermo cycler (Biometra, UK)를 사용하여 역전사시켰다.

[0153] 타겟 cDNA는 다음과 같은 프라이머를 사용하여 증폭하였다 : ALP 유전자(forward 5'-GACCCTTGACCCCCACAAT-3', reverse 5'- GCTCGTACTGCATGTCCCCT- 3'), 타입-I 콜라겐 유전자(forward 5'- CCCTGTCTGCTTCCTGTAAACT-3', reverse 5'-CATGTTCGGTTGGTCAAAGATA-3'), GAPDH 유전자(forward 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3', reverse 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3')

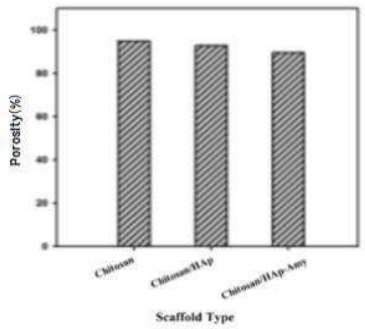
[0154] 증폭은 95℃에서 45초, 60℃에서 45초, 60℃에서 1분 및 72℃에서 45초 동안 수행하였다. 35 사이클 후에, PCR 생성물은 1.5% 아가로스 겔 상에서 100V로 15분 동안 전기영동하여 분리하였다. 다음에 겔을 1 mg/ml ethidium bromide (EtBr)으로 염색하고, Alpha Ease gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 광으로 시각화하였다.

[0155] 그 결과, 복합 스캐폴드에서 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)와 타입-I 콜라겐의 상당한 발현이 관찰되며, 이는 키토산/HAp 스캐폴드에서 아밀로펙틴의 효과가 나타나기 때문이다.

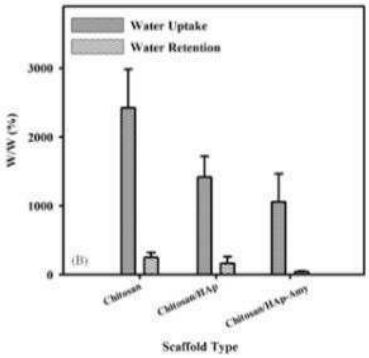
[0156] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

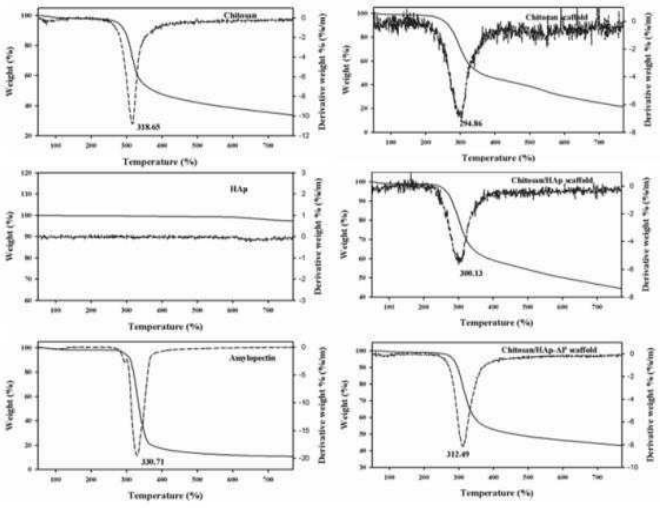
도면1



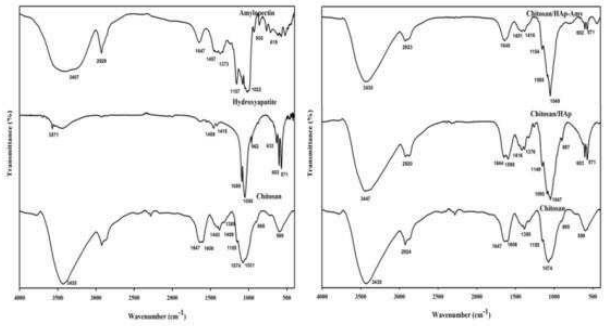
도면2



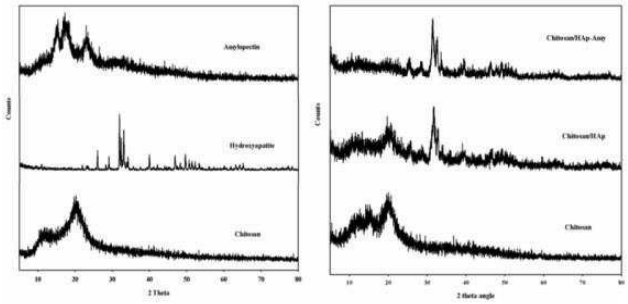
도면3



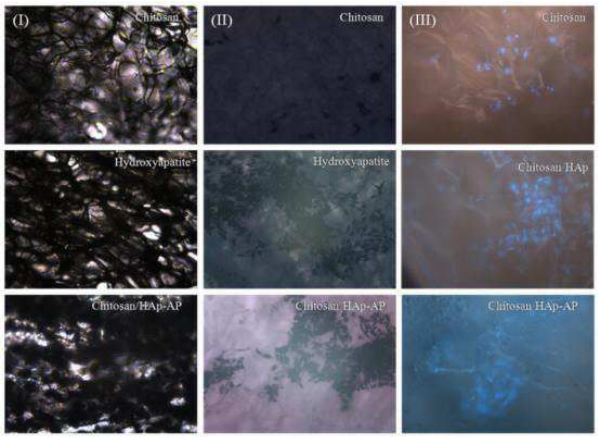
도면4


Amylopectin
Hydroxyapatite
Chitosan
Chitosan/HAp-Amy
Chitosan/HAp
Chitosan
Transmittance (%)
Wavenumber (cm-1)

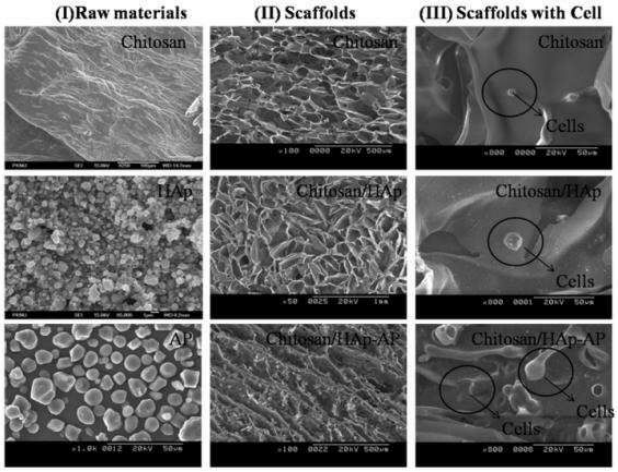
도면5


Amylopectin
Hydroxyapatite
Chitosan
Chitosan/HAp-Amy
Chitosan/HAp
Chitosan
Counts
2 Theta
2 theta angle

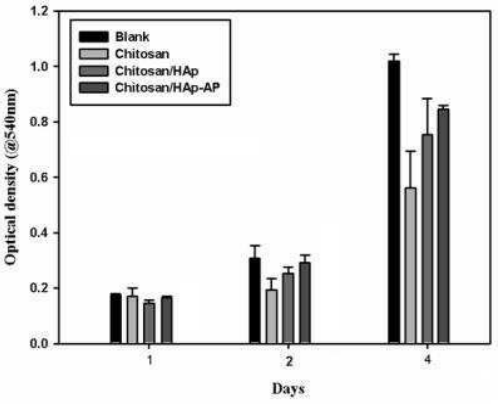
도면6


(I)
Chitosan
(II)
Chitosan
(III)
Chitosan
Hydroxyapatite
Hydroxyapatite
Chitosan HAp
Chitosan/HAp-AP
Chitosan HAp-AP
Chitosan HAp-AP

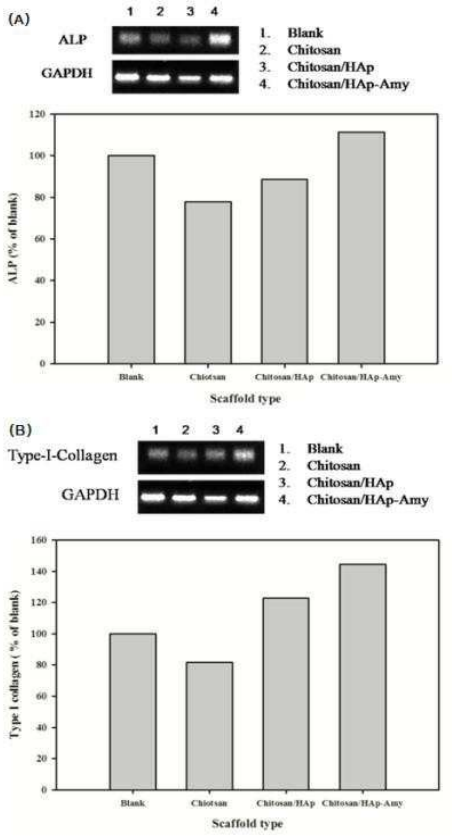
도면7


(I)Raw materials
(II) Scaffolds
(III) Scaffolds with Cell
Chitosan
Chitosan
Chitosan
Cells
HAp
Chitosan/HAp
Chitosan/HAp
Cells
AP
Chitosan/HAp-AP
Chitosan/HAp-AP
Cells
Cells

도면8


Blank
Chitosan
Chitosan/HAp
Chitosan/HAp-AP
Optical density (@540nm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
2
4
Days

도면9


(A)
1 2 3 4
ALP
GAPDH
1. Blank
2. Chitosan
3. Chitosan/HAp
4. Chitosan/HAp-Amy
ALP (% of blank)
Blank
Chitosan
Chitosan/HAp
Chitosan/HAp-Amy
Scaffold type
(B)
1 2 3 4
Type-I-Collagen
GAPDH
1. Blank
2. Chitosan
3. Chitosan/HAp
4. Chitosan/HAp-Amy
Type I collagen (% of blank)
Blank
Chitosan
Chitosan/HAp
Chitosan/HAp-Amy
Scaffold type