(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 7 월 2 일 (02.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/138562 A1

(51) 국제특허분류:
A61F 2/08 (2006.01) *A61L 27/14* (2006.01)
A61F 2/00 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/016868

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 28 일 (28.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

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

(72) 발명자: 김장호 (**KIM, Jang Ho**); 61085 광주시 북구 첨단연신로 166, 101동 1602호, Gwangju (KR). 김명선 (**KIM, Myung Sun**); 61706 광주시 남구 용대로53번길 9, 111동 1245호 (봉선동), Gwangju (KR).

(74) 대리인: 두호특허법인 (**DOOHO IP LAW FIRM**); 06628 서울시 서초구 강남대로51길 1, 7층 (서초동, 대현블루타워), 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, KR, 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, 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.

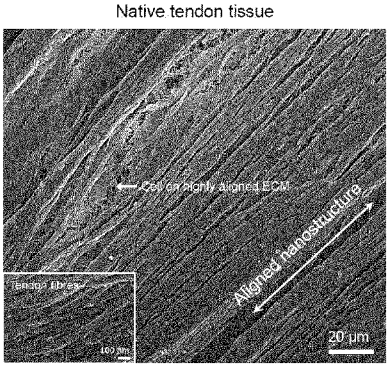
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

WO 2020/138562 A1

(54) Title: SCAFFOLD FOR ROTATOR CUFF TEAR TREATMENT

(54) 발명의 명칭: 회전 근개 파열 치료용 스캐폴드



(57) Abstract: A scaffold, of the present invention, is a scaffold comprising a nanostripe pattern which is produced in consideration of a highly organized nanostructure of a natural tendon ECM, the scaffold having excellent flexibility and mechanical strength so as to be applied for the regeneration of torn rotator cuff tissue, enabling the excellent regenerative capacity of the torn site, and enabling the sensitive controlling and improvement of the shape, adhesion, proliferation and differentiation of tendon cells.

(57) 요약서: 본 발명의 스캐폴드는 자연적인 힘줄 ECM 의 고도로 조직화된 나노구조로부터 착안하여 제작된 나노 스트라이프 패턴을 포함하는 스캐폴드로서, 이는 파열된 회전 근개 조직의 재생에 적용되기에 훌륭한 유연성과 기계적 강도를 갖고, 파열 부위의 재생능력이 우수하며, 힘줄 세포의 형태, 부착, 증식 및 분화를 민감하게 조절하고 향상시킬 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 회전 근개 파열 치료용 스캐폴드

기술분야

[1] 본 발명은 급성 또는 만성 회전 근개 파열 치료에 효과적인 나노 패터닝된 스캐폴드에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 회전근개(Rotator Cuff)란 어깨 관절 주위를 덮고 있는 4개의 근육인 극상근(Supraspinatus), 극하근(Infraspinatus), 견갑하근(Subscapularis) 및 소원근(teres minor)을 가리킨다. 이 4개의 근육은 어깨 관절의 회전운동 및 안정성을 유지해주는 역할을 한다. 그런데 이들 4개의 근육 가운데 하나 또는 그 이상이 파열되어 팔과 어깨에 통증을 발생시키는 질환이 바로 '회전 근개 파열'이다. 회전 근개의 손상은 어깨 관절에 발생하는 만성 통증의 가장 흔한 원인이다.

[4] 회전 근개 파열의 가장 흔한 증상은 어깨의 통증이며 근력약화, 어깨 결림, 삐걱거리는 소리 등이 동반된다. 어깨의 통증은 팔의 위쪽 삼각근(deltoid muscle) 부분에 나타나는 경우가 많으며 흔히 팔을 위로 들어올릴 때 통증이 심해진다. 몸을 바로 세우면 통증이 감소하고 누운 자세에서는 통증이 심해져 통증이 있는 쪽으로 돌아누워서 잠을 잘 수 없으므로 수면장애를 호소하기도 한다.

[5] 어깨의 관절 운동 제한은 뚜렷하지 않으나 운동 제한이 있을 경우, 어깨의 수동적 관절운동은 정상이지만 능동적 관절운동은 제한된다. 또한 환자가 팔을 들어올릴 때 어깨 꼭대기에서 삐걱거리는 느낌을 느낄 수 있다. 또한 회전근개가 완전히 파열되었을 경우 환자는 팔을 들어서 지면과 평행이 되도록 하는 자세를 유지하지 못한다. 한편 어깨의 통증을 호소하는 환자들 가운데 대부분은 회전근개 파열과 오십견으로 불리는 동결견을 혼동하는 경우가 많다.

[6] 회전 근개 파열은 보통 만성적인 통증을 유발한다. 50세 이상의 연령층에서 퇴행성 변화에 따라 자연적으로 파열되는 경우가 흔하나 최근에는 스포츠 활동인구가 증가함에 따라 스포츠 외상으로 인한 파열도 종종 발생하고 있다. 회전 근개 파열을 유발하는 요인은 퇴행성 변화, 선천적 이상 및 발육 부전, 회전 근개의 혈액 순환 장애, 어깨의 지나친 사용 등으로 매우 다양하다.

[7] 최근의 연구에 따르면 회전 근개 손상은 단일한 원인이 아닌 다양한 원인 따른 복합적 작용에 의해 발생한다. 주된 원인으로는 퇴행성 건염이나 혈관의 감소로 힘줄의 구조가 약화된 상태에서 가벼운 외상이나 사소한 움직임에 의해 회전근개 파열이 일어나거나 교통사고 등의 직접적이고 심각한 외상에 의해서 발생하기도 한다. 한편 지나친 신전 상태에서의 외력을 받거나 운동선수 등이

어깨를 과도하게 사용하여 연부조직이 스트레스를 받을 경우에도 회전근개 파열이 일어날 수 있다고 보고되고 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명은 급성 또는 만성 회전 근개 파열 치료에 효과적인 나노 패터닝된 스캐폴드를 제공함에 그 목적이 있다.

[10]

과제 해결 수단

[11] 1. 복수개의 릿지(ridge)와 그루브(groove)를 포함하는 나노 스트라이프 패턴;을 포함하는 회전 근개 파열 치료용 스캐폴드.

[12] 2. 위 1에 있어서, 상기 릿지 또는 그루브의 폭은 서로 독립적으로 100 내지 1000 nm인 스캐폴드.

[13] 3. 위 2에 있어서, 상기 릿지와 그루브의 폭의 비는 1: 0.5 내지 1.5인 스캐폴드.

[14] 4. 위 1에 있어서, 그루브로부터의 릿지의 높이가 100 내지 1000 nm인 스캐폴드.

[15] 5. 위 1에 있어서, 상기 스캐폴드는 두께가 10 내지 100 μm인 스캐폴드.

[16] 6. 위 1에 있어서, 상기 스캐폴드는 스트라이프 패턴 방향으로 0.5 내지 2.0 mm 신장시켰을 때, 평균 6 N/mm^2 이상의 기계 응력(mechanical stress)을 나타내는 스캐폴드.

[17] 7. 위 1에 있어서, 상기 회전 근개 파열은 급성 파열 또는 만성 파열인 스캐폴드.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 나노 패터닝된 스캐폴드는 급성 또는 만성 회전 근개 파열 치료에 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 토끼의 고유 회전 근개 힘줄 조직의 SEM 사진이다.

[22] 도 2, 3은 스핀 코팅과 모세 관력 리소그래피를 사용하여 스캐폴드를 제조하는 과정의 모식도이다.

[23] 도 4는 나노 패터닝된 스캐폴드의 횡단면 및 표면 형태의 SEM 이미지이다.

[24] 도 5는 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드의 에서지 분산 X선 분석(Energy dispersive X-ray analysis) 결과이다.

[25] 도 6은 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드의 FT-IR 분석 스펙트럼이다.

[26] 도 7은 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드의 응력-변형 정도를 나타낸 것이다.

[27] 도 8은 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드의 단일 세포 수준에서의 SEM 이미지, 다중 세포 수준에서의 F-actin(적색)- 및 DAPI(청색)- 염색된 힘줄 세포의 면역 형광 이미지이다.

[28] 도 9는 평평한 또는 나노 패턴 지형상의 세포 부착(6시간) 및 증식(3일)을 나타낸 것이다.

[29] 도 10은 나노 패터닝된 스캐폴드 상의 골형성에 의한 힘줄 세포의 광물화를 나타낸 것이다.

[30] 도 11은 21일 동안 스캐폴드 상에 배양한 힘줄세포에서 콜라겐 유형 I, 콜라겐 유형 III, 오스테오칼신(OCN) 및 피브로넥틴 발현의 웨스턴 블롯 분석결과이다.

[31] 도 12는 PDMS 슬랩(폭: 800 nm) 및 상처 치유 과정(Wound healing process)을 이용한 *in vitro* 상의 상처 치유 실험 절차 및 결과이다.

[32] 도 13은 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드 상의 힘줄세포에 의해 덮인 영역을 정량화한 것이다.

[33] 도 14는 스캐폴드의 지형적 특성에 따른 세포의 이동 속도를 나타낸 것이다.

[34] 도 15, 16은 PCL 매트릭스 기반 나노 패터닝된 스캐폴드의 이식 및 회전 근개 수술과정을 나타낸 것이다.

[35] 도 17, 18은 회복 6주 후 극상근 힘줄 상의 스캐폴드 이식 부위의 대표 조직학적 이미지이다.

[36] 도 19는 회전 근개 파열 후, 0, 2, 4, 6, 8, 12주째의 만성 회전 근개 힘줄의 대표 조직학적 이미지이다.

[37] 도 20, 21은 만성 손상이 4주간 방치된 토끼를 사용하여, 회복 6주 후 극상근 힘줄 상에 스캐폴드 삽입 부위를 관찰한 대표 조직학적 이미지이다.

[38] 도 22는 회전 근개 힘줄 섹션에서 나노 패터닝된 스캐폴드를 사용하여 회복된 근육 조직은 스캐폴드 미처리군 및 평평한 스캐폴드 처리군과 대비하여 감소된 지방 비율을 보임을 나타낸다.

[39]

발명의 실시를 위한 형태

[40] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[41]

[42] 본 발명은 복수개의 릿지(ridge)와 그루브(groove)를 포함하는 나노 스트라이프 패턴;을 포함하는 회전 근개 파열 치료용 스캐폴드를 제공한다.

[43] 상기 스캐폴드는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리(락틱-co-글리코릭산)(poly(lactic-*co*-glycolic acid)), 폴리락틱산(Polylactic acid), 폴리글리콜릭산(Polyglycolic acid), 키토산 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 생체적합성 고분자 물질로 이루어진 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 모세 관력을 이용한 리소그래피로의 성형이 보다 우수하다는 점에서 폴리카프로락톤(PCL)으로 이루어진 것일 수 있으나, 회전 근개 파열 부위에의

이식에 있어서 생체 적합성이 우수하여 이물 반응을 감소시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[44] 상기 패턴은 모세 관력 리소그래피에 의해 형성된 패턴일 수 있으나, 힘줄 ECM 환경을 유사하게 모사해낼 수 있는 방법이라면 당업계에 주지된 방법을 자유로이 택할 수 있고, 이러한 방법으로 형성된 패턴은 힘줄 세포 및 관련 인자들을 효과적으로 성장시킬 수 있는 기반이 된다.

[45] 상기 릿지와 그루브는 각각 상기 스트라이프 패턴의 마루와 골을 의미하는 것으로서, 릿지간 또는 그루브간 소정 간격으로 이격되어 스트라이프 패턴을 형성하는 것일 수 있다.

[46] 상기 릿지 또는 그루브의 폭은 1 내지 1500 nm, 10 내지 1500 nm, 20 내지 1400 nm, 30 내지 1400 nm, 40 내지 1300 nm, 50 내지 1300 nm, 60 내지 1200 nm, 70 내지 1100 nm, 80 내지 1100 nm, 90 내지 1000 nm, 100 내지 1000 nm 또는 600 내지 1000 nm일 수 있고, 힘줄 세포를 효과적으로 방향성있게 성장시키고, 콜라겐과 같은 성장 인자들의 효과적인 발현을 위한 힘줄 ECM 환경을 모사한다는 측면에서 바람직하게는 100 내지 1000 nm일 수 있다.

[47] 상기 릿지와 그루브의 폭의 비는 1: 0.2 내지 1.8, 1: 0.3 내지 1.7, 1: 0.4 내지 1.6, 1: 0.5 내지 1.5 또는 1: 0.8 내지 1.2일 수 있고, 스캐폴드 표면의 릿지와 그루브의 규칙적인 정렬 측면에서 바람직하게는 1: 0.5 내지 1.5일 수 있다.

[48] 상기 그루브로부터 릿지까지의 높이는 상기 스트라이프 패턴의 깊이를 의미하는 것일 수 있고, 이는 1 내지 1500 nm, 10 내지 1450 nm, 20 내지 1400 nm, 30 내지 1350 nm, 40 내지 1300 nm, 50 내지 1250 nm, 60 내지 1200 nm, 70 내지 1150 nm, 80 내지 1100 nm, 90 내지 1050 nm, 100 내지 1000 nm 또는 300 내지 700 nm일 수 있으나, 회전 근개 파열 치료를 위해 자연적인 힘줄 ECM을 보다 효과적으로 모사한다는 측면에서 바람직하게는 100 내지 1000 nm일 수 있다.

[49] 상기 스캐폴드는 1 내지 150 μm, 2 내지 145 μm, 3 내지 140 μm, 4 내지 135 μm, 5 내지 130 μm, 6 내지 125 μm, 7 내지 120 μm, 8 내지 115 μm, 9 내지 110 μm, 9 내지 105 μm, 10 내지 100 μm 또는 20 내지 40 μm일 수 있고, 체내에 이식되기에 적합한 정도의 얇은 두께와, 회전 근개 부위 근육의 기계적 저항을 견뎌내기에 적합한 정도의 적정 두께를 유지한다는 측면에서 바람직하게는 10 내지 100 μm일 수 있다.

[50] 상기 스캐폴드는 표면에 나노 스트라이프 패턴이 형성된 스캐폴드로서, 상기 스트라이프 패턴 방향으로 0.5 내지 2.0 mm 신장시켰을 때, 평균 6 N/mm^2 이상의 강한 기계 응력(mechanical stress)을 나타내는 것일 수 있다. 이는 나노 스트라이프 패턴이 형성되지 않은 평평한 스캐폴드의 동일 조건에서의 기계 응력이 평균 6 N/mm^2를 넘지 못하는 것에 비해, 상대적으로 강한 기계 응력을 나타내어, 회전 근개 파열 부위에 이식되어도 파손되지 않는 우수한 물리적 강도를 지닐 수 있다.

[51] 상기 스캐폴드는 회전 근개 파열 치료용도로서, 상기 파열은 급성 파열과 만성

파열을 포함하는 것일 수 있으나, 그 파열의 원인을 불문하고 힘줄 세포 및 관련 인자들의 효과적인 성장을 통해 치료될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[52]

[53] 본 발명의 스캐폴드는 자연적인 힘줄 ECM의 고도로 조직화된 나노 구조로부터 착안하여 제작된 나노 스트라이프 패턴을 포함하는 스캐폴드로서, 이는 파열된 회전 근개 조직의 재생에 적용되기에 훌륭한 유연성과 기계적 강도를 갖고, 파열 부위의 재생능력이 우수하며, 힘줄 세포의 형태, 부착, 증식 및 분화를 민감하게 조절하고 향상시킬 수 있다.

[54]

[55] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[56]

[57] **실시예 1. 실험방법**

[58] **1. 생체 외 토끼의 힘줄 조직의 제조 및 관찰**

[59] 힘줄 조직은 오른쪽 극상근(supraspinatus) 힘줄을 절제한 절개 토끼 모델에 대한 수술로부터 얻었다. 힘줄 조직을 4℃에서 2% 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde), 0.1M 소듐 카코딜레이트(Sodium cacodylate) 및 3mM 염화칼슘(pH 7.4)를 함유하는 용액에서 고정시킨 후, PBS로 3회 수세하였다. 표본을 1% 오스뮴 테트록사이드(Osmium tetroxide)로 관류시키고(perfused), 30분 동안 조직 회전기(tissue rotator)에 두었다. 이후, 샘플을 PBS로 3회 수세하였고, 조직을 연속적으로 50%, 70%, 90%, 95% 및 100% 아세톤에서 탈수시켰다. 각 표본을 헥사메틸디실라잔(Hexamethyldisilazane, HMDS)으로 처리하고, 공기 건조시켰으며, 백금으로의 스퍼터 코팅(sputter coating)을 위한 스텁(stub) 상에 두었다. 이후, 조직을 FT-SEM(ZEISS GeminiSEM 500, Germany)으로 관찰하였다.

[60]

[61] **2. 나노 패터닝된 PUA mother 몰드 및 PDMS 몰드**

[62] 기존의 광리소그래피(photolithography)와 반응성 이온 식각(reactive ion etching)을 이용하여 나노 크기의 선형 그루브와 릿지(ridge, 800nm)가 식각된 실리콘 마스터 몰드(silicon master mold) 위에 자외선 경화형 PUA(UV-curable PUA, Changsung Sheet., Korea) 전구체 용액을 광 개시제로 적하(droplet)하였다. 이후, 몰드를 모세관력을 이용하여 투명 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필름으로 균일하게 덮었다. 마스터 몰드를 60초 동안 UV광(λ= 352 nm, 40 w)에 노출시킨 후, 경화된 나노 패터닝된 PUA 레플리카(replica)를 핀셋을 이용하여 마스터 몰드로부터 벗겨냈으며, 밤새 자외선에 다시 노출시켜 잔류 반응성 아크릴레이트 그룹(residual reactive acrylate groups)을 완전히 제거하였다.

[63] 첫째로, 나노 패터닝된 PUA 겉몰드(mother mold, 800nm 릿지와 그루브)는 나노지형(nanotopography)의 표면이 위로 향하도록 하여 페트리 접시에

부착되었다. PDMS(Polydimethyl siloxane) 예비 중합체(pre-polymer, Sylgard 184 Silicon elastomer, Dow corning, USA)를 15% 경화제와 혼합하고, 페트리 접시 안의 PUA 겉몰드 상에 충분한 두께(~1cm)로 부어 넣은 후, 70℃에서 적더온 6시간 이상 방치하여 어떠한 잔류물질이 없도록 하였다. 이후, 경화된 나노 패터닝된 PDMS 몰드(800nm 릿지와 그루브)는 페트리 접시 내 PUA 겉몰드로부터 벗겨졌다. 대조군으로서 평평하게 패턴화된(flat patterned) PCL 패치를 제조하기 위해, 평평한 실리콘 웨이퍼(wafer)를 이의 평평한 표면이 위로 향하도록 하여 페트리 접시에 부착시켰다. 이후, 나노 패터닝된 PDMS 몰드의 제조 프로토콜과 같이, PDMS 예비 중합체(Sylgard 184 Silicon elastomer, Dow corning, USA)를 15% 경화제와 혼합하고, 충분한 두께(~1cm)로 페트리 접시 내 평평한 Si 웨이퍼 상에 부은 후, 70℃에서 적어도 6시간 이상 열처리하여 어떠한 잔류물질이 없도록 하였다. 경화된 평평하게 패턴화된 PDMS 몰드(800 nm 릿지와 그루브)를 페트리 접시 내 평평한 PUA 겉몰드로부터 벗겨냈다.

[64]

[65] **3. PCL 매트릭스 나노토포그래피 패치의 제조**

[66] 마그네틱 교반기(stirrer)를 사용하여 PCL 입자(Mw: 80,000; Sigma-Aldrich, USA)를 디클로로메탄(Dichloromethane)에 용해시켰고, 디클로로메탄 중 PCL이 18 wt%(wt/wt)가 되도록 PCL 용액을 제조하였다. 얇은 PCL 패치는 스킨 코팅기의 진공상의 1.5 mm 원형 유리 위에 부어진 PCL 용액의 스핀 코팅으로 제조되었다. 스킨 코팅의 조건은 다음과 같다: 회전 속도 3500rpm, 지속 시간 120초, 가속 시간 5초.

[67] 처음으로, 나노 패터닝된(nanopatterned) PCL 패치의 제조 및 대조군의 활용을 위해 스핀 코팅된 PCL 패치의 표면이 불규칙한 표면 조도를 갖기 때문에 평평하게 패터닝된 PCL 패치를 제조하였다. 제조된 얇은 PCL 패치를 PCL 층을 녹이기 위해, 뜨거운 플레이트 상의 실리콘 웨이퍼 기판상에, 80℃에서 60초 동안, 이의 표면이 위로 향하도록 놓았다. 평평한 또는 나노 패터닝된 PDMS(800 nm 릿지와 그루브) 몰드는 사전에 녹여진 PCL 층 상에 놓였고, 80℃ 가열조건에서 2분 동안 부드러운 손가락 압력(smooth finger force)을 가하여 PCL층에 엠보싱 처리했다. 열 임프린트 공정 후, 원형 유리 상의 PCL 층의 조립체 및 PDMS 몰드를 상온에서 30분 동안 냉각시켰고, 원형 유리 상의 PCL 층으로부터 벗겨내어 800 nm 릿지와 그루브를 갖는 나노 터닝된 PCL 패치를 얻었다. 나노 패터닝된 *in vivo* 연구 시의 삽입을 위해, 70% 에탄올로 수세하여 원형 유리로부터 분리되었다.

[68]

[69] **4. PCL 매트릭스 나노토포그래피의 형태학적 특성**

[70] PCL 매트릭스 나노 지형 패치 및 평평한 PCL 지형의 표면 및 단면의 FE-SEM 이미지는 JSM-7500F 현미경 (Oxford, UK)을 사용하여 관찰되었다(가속 전압 15.0 kV, 평균 작동 거리 8.8 mm). PCL 패치의 단면은 5분 동안 액체 질소를

사용하여 급속 동결로 패턴 방향을 따라 수직으로 절단하여 준비하였다. 최종적으로, 샘플은 이의 형태학적 관찰에 앞서, 백금으로 코팅되었다.

[71]

[72] **5. PCL 매트릭스 나노토포그래피의 화학적 특성**

[73] 평평한 또는 나노 패터닝된 PCL 패치의 화학적 특성을 분석하여 샘플의 화학적 변화를 확인하였다. 샘플의 원자 조성을 SEM(JSM-7500F + EDS, Oxford, UK)에 부착된 에너지 분산 분광기(Energy dispersive spectroscopy, EDS)로 분석하였다. 샘플의 위상(phase)은 50mA, 60kV에서 Cu kW를 사용하는 고해상도 XRD(X-ray diffraction, X'Pert PRO Multi-Purpose X-Ray Diffractometer, USA)로 분석하였다. 화학 결합 구조는 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy, Spectrum 400, USA).

[74]

[75] **6. PCL 매트릭스 나노토포그래피의 기계적 성질**

[76] 평평한 또는 나노 패터닝된 PCL 패치의 물리적 특성(i.e. 응력 및 신장력)은 크로스 헤드 속도 100 mm/min에서 MCT-1150 인장 시험기(tensile tester, A&D Company, Japan)를 사용하여 측정하였다. 나노 패턴화된 PCL 패치는 나노 지형의 정렬 방향을 따라 하중을 적용하여 분석되었다. 샘플은 이의 중심으로부터 0.25 mm 크로스 헤드 거리에서 측정되었다. 각 샘플에 대해 10개의 표본을 분석하였고, 파괴점(breaking point)에서의 최대 하중과 변위를 기록하였다.

[77]

[78] **7. 인간 힘줄 세포의 분리 및 배양**

[79] 전남대학교 병원과 전남대학교 의과대학에서 충분한 정보에 근거한 동의 하에, 관절경 회전 근개 봉합 중의 환자로부터 극상근 힘줄에서 힘줄 조직 샘플을 채취하였다. 힘줄 조직 샘플은 PBS로 수세하고, 작은 조각으로 자르고, DMEM에서 3 mg/ml 콜라게나아제(Sigma, USA)로 16시간 동안 37℃에서 소화시켰다. 효소 소화 후, 동량의 DMEM을 첨가하여 콜라게나아제를 급냉(quench)시키고, 세포 여과기(70 μm 크기)를 통해 여과하였다. 여과된 세포 현탁액을 1500rpm에서 5분간 원심분리하였다. 세포 펠릿을 재현탁하고, 10% 소 태아 혈청(FBS)과 1% 페니실린-스트렙토 마이신이 첨가된 DMEM 배지(DMEM 저포도당: Gibco)에서, 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다. 매 3일마다 배지를 교체하였고, 사용된 모든 세포는 3번 또는 4번 통로(passage)에 있었다.

[80]

[81] **8. 힘줄세포의 SEM 관찰**

[82] PCL 매트릭스 나노 지형에 부착된 힘줄세포(tenocyte)의 형태학적 특성은 FE-SEM(field-emission scanning electron microscope)에 의해 관찰되었다. 힘줄세포는 샘플당 4 X 10^4 세포 밀도로 접종(seed)되었다. 세포 접종 후 3일째, 샘플 표면에 부착된 세포를 0.05 M 소듐 카코딜레이트 완충액(Sigma-Aldrich) 내

2% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)와 2% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde, Sigma-Aldrich)로 구성된 modified Karnovsky 고정액으로, 4℃에서 4시간 동안 고정시켰다. 샘플을 0.05 M 소듐 카코딜레이트 완충액으로 10분간 3회 세척하고, 1% 오스뮴 테트록시드(osmium tetroxide, Sigma-Aldrich)로 실온에서 100분간 암실에서 고정시켰다. 이후, 샘플을 증류수로 세척하고, 단계적 농도(50, 70, 80, 90 및 100% v/v)의 에탄올로 탈수시켰다. 이후, 샘플을 헥사메틸디실라잔(hexamethyldisilazane, Sigma-Aldrich)으로 30분간 2번 처리하고, 암실에서 밤새 공기중에 건조시켰다. 마지막으로, 샘플을 FE-SEM(JSM-7500F, Oxford, UK)으로 세포 형태 관찰하기에 앞서, 백금으로 코팅하였다.

[83]

[84] **9. 면역형광 염색**

[85] 샘플상에 부착된 세포를 20분 동안 4% 파라포름알데히드 용액(paraformaldehyde solution, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)으로 고정시키고, 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, WI, Milwaukee, USA)으로 15분 동안 투과시켰으며, TRITC-결합된 팔로이딘(Millipore, Billerica, MA, USA)로 1시간 및 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Millipore, Billerica, MA, USA)로 5분 동안 염색하였다. 각 공정 후에, 샘플을 1 X PBS로 각각 5분 동안 3회 수세하였고, 형광 현미경(fluorescence microscope, Zeiss, Germany)을 사용하여 염색된 세포의 이미지를 촬영하였다.

[86]

[87] **10. 세포 부착 및 증식 분석**

[88] 힘줄세포(샘플당 1 x 10^4 세포)를 샘플에 접종하고, 6시간 동안 배양하며(세포부착), 3일 동안 세포증식시키고, 5일 동안 10% FBS (Corning, USA) 및 1% 항생제 (Corning, USA)를 포함하는 DMEM(Corning, USA)에서 가습된 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다. 스캐폴드 상의 세포 부착 및 증식의 정량분석은 WST-1 에세이 (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System, Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여 수행되었다. 상기 정량분석에 앞서, 세포 부착을 확인하는 측면에서, 스캐폴드에 부착되지 아니한 세포들을 제거하기 위해, 6시간 동안 배양 후 스캐폴드 상의 세포들을 PBS로 수세하였다.

[89]

[90] **11. 웨스턴 블롯 분석**

[91] 총 세포 단백질은 Xpert 프로티나아제 억제제 칵테일(Xpert proteinase inhibitor cocktail, GenDEPOT, Huston, TX, USA)을 첨가한 RIPA 세포 용해 완충액(RIPA Cell Lysis buffer (GenDEPOT, Huston, TX, USA)으로 추출하였다. 세포 용해물을 얼음에서 30분 동안 배양한 후, 4℃에서 30분 동안 12,00rpm으로 원심분리 하였다. 단백질 농도는 bicinchonic acid 방법(BCA kit, Pierce, IL, USA)으로 측정하였다. BioRad MiniProtean (BioRad, CA, USA) 겔 장치를 사용하여 동량의

세포 용해물 단백질을 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 전기영동하고, 전기영동 겔 슬랩(slab)을 100V의 정전압에서, 1시간 동안 4℃ 전사 완충액(Transfer buffer, 30 mM Tris, 240 mM 글리신, 25% 메탄올)에서, PVDF 멤브레인 (Amersham Life Science, 영국)으로 전기 전이시켰다. 멤브레인은 TBS-T, pH 7.6 (150 mM NaCl 및 0.1% 트윈(Tween) 20을 갖는 100 mM Tris 완충액) 중의 5% 탈지 분유 파우더(skim milk powder)에서 블로킹되고, 블롯은 특정 1차 항체와 함께 배양되었다. I 형 콜라겐, III 형 콜라겐, 오스테오칼신(Osteocalcin), 피브로넥틴(Fibronectin) 및 β-액틴(β-actin)을 검출하기 위해 1 μg/ml (1: 1000 희석)의 블로킹 완충액에서 최종 농도로 단클론 항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 사용했다. 실온에서 1시간 동안 1: 2000으로 희석시킨 HRP-염소 항-마우스 면역 글로불린(HRP-goat anti-mouse immunoglobulin, Invitrogen, IL, USA)을 2차 항체로 사용하였고, 이후 멤브레인은 각 TBS-T 밴드 내에서 유사하게 5분 동안 5회 수세하였다. 각 밴드는 The Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, MA, UK)를 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블롯의 정량화는 NineAlliance (UVItec, Cambridge, UK) 소프트웨어를 사용하여 전체 단백질의 수준을 표준화하여 수행했다.

[92]

[93] **12. 골 형성 분화 분석**

[94] 힘줄 세포(샘플 당 4 X 10^4 세포 밀도)는 골 형성 분화 배지(osteogenic differentiation medium, 정상 배지 내 100 nM 덱사메타손(dexamethasone), 50 μg 아스코빅산(ascorbic acid), 100 mg 글리세롤 2-포스페이트(glycerol 2-phosphate)를 포함)에서 14일 동안 배양되었다. 샘플 표면의 힘줄 세포의 골 형성 분화를 확인하기 위해 Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) 염색법을 사용했다. 미네랄리제이션(mineralization) 정도는 Alizarin Red S로 표본 표면에서 배양한 힘줄 세포를 염색함으로써 측정되었다. 염색된 세포를 세틸피리디니늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride, Sigma-Aldrich)로 탈염색한 다음, 흡광도 판독기(iMarkTM Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad, Hercules)를 사용하여 595 nm에서 측정함으로써 힘줄 세포의 골 형성 분화를 정량화하였다.

[95]

[96] **13. Wound healing 분석**

[97] 얇은 PDMS 슬랩(slab)을 사용하여 표본에서 힘줄 세포의 이동 및 상처 치유 효과(Wound healing effect)를 조사하기 위한 무세포 영역을 생성하였다. 구체적으로, 200 μm 두께의 PDMS 시트를 2개의 손상되지 않은 날카로운 날을 사용하여, 폭 800 μm, 길이 20 mm의 슬랩으로 절단했다. PDMS 슬랩은 패턴 방향을 따라, 수직으로 나노 패터닝된 PCL 표면 상에 배치되었다. 힘줄 세포(샘플 당 1 X 10^5 세포 밀도)는 상처 생성 샘플(Wound generation sample)에서 배양되었다. 이후, PDMS 슬랩을 날카로운 집게로 수동으로 제거하고, 형광

현미경(fluorescence microscope, Zeiss, Germany)을 사용한 면역 형광 염색에 의해, 0, 12, 24, 36시간의 과정 동안의 세포의 상처 치유 시스템을 관찰하였다. 상처 치유 분석에서 세포가 차지하는 면적과 이동 속도 분석 데이터를 ImageJ를 사용하여 분석하였다.

[98]

[99] **14. 급성 및 만성 동물 모델에 대한 in vivo 동물 실험**

[100] 동물 실험은 전남대학교 의과대학 윤리위원회와 전남대학교 병원(CNU IACUC-H-2016-33)의 승인을 받았다. 체중이 2.8 내지 3.2 kg인 21개의 White Rabbits New Zealand를 7마리씩 3개의 그룹으로 나누었다: 미처리군, 평평한 지형 PCL 스캐폴드 처리군, 나노 지형 PCL 스캐폴드 처리군. 토끼는 케타민(ketamine, Youhan Corporation, Seoul, Korea) 35 mg/kg과 자일라진 하이드로클로라이드(xylazine hydrochloride, Rompun, Bayer HealthCare, Korea) 5 mg/kg을 근육 내 주사하여 완전히 마취시켰다. 각 토끼의 양 어깨를 포비돈-아이오다인(povidone-iodine, Firson, Korea)으로 털어내고 소독하였고, 동물들은 외전 및 외회전으로 앞다리를 측부에 두었다. 견갑 상완골 관절에 3.0 cm 피부 절개가 이루어졌고, 피하 조직 해부, 어깨횡근 및 승모근의 수축은 극상근 힘줄(견갑골보다 상부에 위치함)을 노출시켰다. 10 mm 너비 이상인 상완골의 대결절에서 극상근 힘줄의 급격한 방출 후 주변 연조직에의 부착을 방지하기 위해, 6주 동안, 2차적 절차를 진행할 수 있을 때까지, 분리된 힘줄 스텀프(stump)를 10 mm 길이의 실리콘 펜로즈 드레인(외경 8 mm, Yushin Corp, Bucheon, Korea)으로 랩핑(wrapping)한다.

[101] 대조군의 경우, 유사한 생물학적 환경을 만들기 위해, 가짜 수술(Sham surgery)을 시행했다. 3-0 비크릴 봉합사(3-0 vicryl sutures, Ethicon, Johnson and Johnson, USA)를 사용하여 근막과 피하 조직을 단속봉합하고, 피부를 4-0 프롤렌 봉합사(4-0 prolene sutures)로 단속봉합했다.

[102] 모든 토끼는 수술 중 합병증 없이 상기 과정을 견뎌냈고, 수술 후 진통제와 항생제(enrofloxacin, 1 mg/ml, Bayer, Germany)를 근육 내 주사하였다. 어깨는 수술 후 고정되지 않았고, 토끼는 개별적으로 수용되었으며, 물과 음식을 자유롭게 이용할 수 있었다. 힘줄 절제술 시행 6주 후, 토끼는 외과적 파열 회복(repair)을 겪었고, 파열된 극상근 힘줄은 2.0 Ticron (Tyco, Waltham)으로, 대결절의 풋프린트(footprint)에서의 출혈을 일으킨 후, 골유합 방식으로 회복되었다. 두개의 뼈 터널(tunnel)이 외측 상완골 피질에 대한 풋프린트(footprint)의 관절 가장자리에 만들어졌다. 봉합사는 뼈 터널을 지나 극상근 힘줄을 풋프린트에 다시 붙였다. 평평한 지형 PCL 스캐폴드와 나노 패터닝된 PCL 스캐폴드는 근위 상완골의 측부에 있는 극상근 힘줄과 연조직의 원위부에 패치의 근위부를 스티칭(stitching)하여 회복 부위를 보강하기 위해 사용되었다.

[103]

[104] **15. 조직학적 관찰**

[105] 각 토끼의 양쪽 어깨의 극상근 힘줄이 부착된 상완골두의 대결절이 수확되었다. 시료를 중성 완충 10% 프로말린(pH 7.4)에 고정시키고, 탈회시킨 다음, 극상근 힘줄과 대결절을 포함하는 회복 부위에 파라핀 블록(paraffin block)을 만들었다. 절편(4 μm 두께)을 관상면에서 수확하고, H&E(hematoxylin and eosin), Masson's trichrome으로 염색하였다. 이후, 혈관, 세포질, 콜라겐 섬유 연속성, 방향, 밀도 및 힘줄-뼈 인터페이스의 성숙을 평가하였고, 또한, 힘줄-패치 인터페이스에서 패치 주위의 염증률을 평가했다. 이미지는 Aperio ImageScope (Leica, Ca, USA) 소프트웨어를 사용하여 캡쳐하고 획득했다.

[106]

[107] **16. 통계학적 분석**

[108] 모든 정량 결과는 평균±표준 편차(SD)로 표시되며, 통계 분석을 위해 unpaired Student t-test가 사용되었다.

[109]

[110] **실시예 2. 본 발명 스캐폴드의 제조**

[111] 해부학적으로, 회전근개는 4개의 힘줄 그룹으로 구성된다: 극상근(supraspinatus), 극하근(infraspinatus), 소원근(teres minor), 견갑하근(subscapularis). 힘줄 조직은 일반적으로 근육을 뼈에 연결하고 수축을 견딜 수 있는 섬유 결합 조직(fibrous connective tissue)이다. 정상 힘줄은 약 86%의 콜라겐(주로 유형 I, 소량의 유형 III)의 풍부한 매트릭스에서 잘 조직되고 고도로 정렬된 콜라겐 섬유로 구성된다. 이 섬유는 프로테오글리칸 46(proteoglycans 46)으로 가교결합된 밀집 패킹된 병렬적 배열에 존재한다. 힘줄에서 콜라겐 섬유는 길이가 약 10 mm이고, 지름이 약 1~20 μm인 번들(또는 덩어리)을 형성하며 조립된다. 이 섬유 번들은 최종적으로 20 내지 500 μm 직경의 힘줄 유닛을 형성하며 조립된다. 힘줄 세포는 콜라겐 섬유 사이에 주고 존재하고, 콜라겐 구조에 의해 영향을 받는다. 이러한 잘, 고도로 정렬된 콜라겐 섬유와 힘줄에서의 나노 스케일 ECM의 존재를 확인하기 위해, 손상되지 않은 토끼 힘줄 조직을 사용하여 생체 외 연구를 수행했다. 도 1은 직경이 약 800 nm인 고도로 정렬된 콜라겐 섬유를 보여주는데, 이는 힘줄 회복 또는 재생 중에 ECM의 힘줄 세포의 운명과 기능을 가이드하는 특정 지형적 단서를 제공할 수 있음을 시사한다. 따라서, 힘줄 ECM의 이러한 특정 콜라겐 섬유 배열이 힘줄 조직과 회전 근개의 기계적 특성 회복에 사용하기 위한 스캐폴드의 설계에 적용될 수 있다고 가정하고, 실험하였다.

[112] 모세관력 리소그래피는 잘 조직화된 힘줄 조직의 나노 지형 ECM과 유사하고, 조정 가능한 구조와 크기를 갖는 PCL 매트릭스 기반 나노 지형적으로 정렬된 스캐폴드를 제조하기 위해 적용되었다. PCL에서 나노 지형적 구조를 효과적으로 제어하기 위해, 원형 유리상에 폴리머를 스핀 코팅하여 얇은 층으로 된 PCL 패치를 제작했다(도 2). 스핀 코팅 공정 중, 용매 증발로 인해 얇은 층으로

된 PCL 패치의 표면이 불규칙하게 구조화되었기 때문에, 표면이 형형한 PDMS 몰드를 사용하여 PCL 표면을 투명하고 고도로 정렬된 지형 구조로 평탄화시켰다. 본 실험에서는 PDMS 단독을 대조군으로 사용하였다. PCL 패치 상에 정렬된 매트릭스 나노 지형을 형성하기 위해, 나노 패터닝된 표면(릿지와 그루브: 800nm, 깊이: 500nm)을 갖는 PDMS 몰드가 마스터 몰드(master mold)로 준비되었다. 마지막으로, 평평한 표면과 나노 패턴을 가진 PDMS 몰드를 사용하여 모세관력의 열과 압력을 적용한 소프트 리소그래프 공정으로 평평한(flat), 나노 패터닝된(nanopatterned) PCL 패치(각각 '평평한 스캐폴드', '나노 패터닝된 스캐폴드'로 명명될 수 있다)를 각각을 제조하였다. 도 2 및 도 3은 본 실험에서 제조된 스캐폴드 제조공정을 개략적으로 도시한 것이다.

[113] 나노 패터닝된 스캐폴드의 표면 형태학의 SEM 이미지(도 4)는 힘줄 ECM의 잘 조직된 지형과 유사하게, 고도로 정렬된 릿지와 그루브 지형을 보여준다. 나노 패터닝된 스캐폴드의 단면 SEM 이미지에서 볼 수 있듯이, 지형은 30 μm 두께의 나노 스케일 릿지와 그루브(800 nm, 깊이: 500 nm)를 가지고 있다. 소프트 리소그래피 공정에서 사용된 열과 압력이 PCL의 특성을 변화시켰는지 여부를 확인하기 위해, 폴리머의 화학적 특성을 분석했다. EDS(Energy-dispersive X-ray spectroscopy)는 PCL 매트릭스에서 약 80%의 탄소와 20%의 산소 원소를 검출하였고, 평평한 스캐폴드와 나노 패터닝된 스캐폴드 사이에 큰 차이는 없었다(도 5). 스캐폴드의 두 가지 유형의 작용기를 FT-IR 분광법으로 조사하였는데, PCL과 관련된 특징적 흡수 밴드 (2944 cm^{-1}에서의 CH_2 비대칭 연신, 2866 cm^{-1}에서의 대칭 연신, 1721 cm^{-1}에서의 카보닐 그룹의 C=O 신축 진동 및 1161 cm^{-1}에서의 C-O 변형)가 양 스캐폴드 모두에서 검출되었는데(도 6), 이는 작용기가 잘 유지되었고, 사용된 열과 압력에 의해 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 더 나아가, XRD 분광법에 의해 두 스캐폴드의 결정성을 조사하였는데, 21.48° 및 23.67°에서의 강하고 날카로운 결정 피크는 PCL 결정의 결정학적 평면에 기인하고, 이는 두 스캐폴드 모두 순수 PCL의 특정 결정성 구조의 변이 없이 성공적으로 제조되었음을 나타낸다. 회전근개 파열 수술 후, 나노 패턴의 지형이 힘줄 조직을 지지할 수 있는지를 평가하기 위해, 인장 시험기를 사용하여 두 스캐폴드의 인장 강도를 측정하였다. 흥미롭게도, 하중이 정렬된 지형의 방향에 따라 가해지면, 나노 지형은 평평한 지형에 비해 큰 기계적 응력(평균 6 N/mm^2 이상)을 나타냈다(도 7). 이 결과는, 나노 지형이 성공적으로 제조되었고, 이는 회전 근개의 치유를 위해 세포 기능을 조절하고, 회복시키고, 재생시키기 위한 효율적인 스캐폴드로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

[114]

[115] **실시예 3. In vitro 실험**

[116] 나노 지형적 신호는 살아있는 세포 및 조직 기능의 중요한 조절자로 알려져 있습니다. 단일 세포 수준에서 세포 형태와 방향에의 나노 지형적 신호의 효과를

조사하기 위해, 나노 패터닝된 스캐폴드 상의 힘줄세포의 형태와 방향성이 SEM으로 관찰되었다. 나노 지형적 신호는 힘줄세포의 극성(polarity)에 큰 영향을 주었고, 이는 세포 골격 구조가 고도로 정렬된 나노 지형에 반응하여 정렬됨으로 입증되었다(도 8). 배양 6시간 후, 힘줄세포는 평평한 스캐폴드 및 나노 패터닝된 스캐폴드 모두에 잘 부착되었다(도 9). 그러나, 평평한 스캐폴드 상의 힘줄세포는 무작위적인 형태와 방향성을 보였으나, 나노 패터닝된 스캐폴드 상의 힘줄세포는 고도로 정렬되고 방향성 있는 형태를 보였다. 배양 3일 후, 나노 지형적 신호의 힘줄세포에의 형태, 조직 및 방향에의 영향은 면역 형광 염색을 사용하여 다중 세포 수준에서 평가하였다. 면역 형광 이미지는 힘줄세포가 평평한 스캐폴드에 부착되었고, 무작위적으로 퍼졌음을 보여주었다. 이와 반대로, 나노 패터닝된 스캐폴드 상에서는, 자연적 힘줄 ECM과 유사하게, 힘줄세포가 고도로 정렬된 세포 형태와 잘 조직된 세포 간 상호작용을 갖고, 나노 지형의 방향에 따라 정렬되었다. 이를 종합하면, 상기 결과는, *in vivo*에서 세포의 자연적인 방향성과 정확하게 일치하게, 힘줄 ECM 유래 나노 지형이 힘줄세포의 정렬과 형태 방향성에 큰 영향을 미치는 것이 가능함을 가리킨다.

[117] 스캐폴드의 지형적 신호가 세포 증식과 부착에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해, *in vitro* 상에서, 힘줄세포를 평평한 스캐폴드(대조군) 및 나노 패터닝된 스캐폴드 상에 배양했다. 세포 배양 6시간 후, 스캐폴드에 부착된 세포를 WST 분석에 의해 정량화하였다. 힘줄세포는 지형적 특성과 상관없이 양 스캐폴드에 모두 잘 부착되어 있었고, 양 스캐폴드간 큰 차이가 없었다(도 9). 세포 배양 3일 후, 나노 패터닝된 스캐폴드에서의 세포 증식은 평평한 스캐폴드에 비해 유의미하게 높았다.

[118] 회전 근개 파열은 힘줄 삽입 부위의 상완골두의 극상근 힘줄의 탈락으로 가장 많이 발생하기 때문에, 재생을 위해 정상 힘줄을 뼈에 삽입해야 한다. 극상근 힘줄은 직접적인 인공물 삽입을 통해 상완골두에 통합되는데, 이것은 영역에 의존적인 매트릭스 이질성을 나타내고, 광물 함량의 구배로 구성된 다-구역(multi-zonal) 인터페이스이다; 주로, 힘줄, 비-광물(non-mineralized) 섬유연골 및 뼈. 따라서, 뼈에 광물화된 섬유연골의 재생을 위한 골 형성 분화는 회전 근개의 기계적 특성과 작용을 회복시키기 위해 중요하다. 이에 따라, 14일 동안 골 형성 유도 배지에서 2개의 스캐폴드 상에 세포를 배양하여, 나노 패터닝된 지형에서의 힘줄세포의 골 형성의 광물화를 조사하였다. Alizarin Red 염색(도 10)은 평평한 지형 및 조직 배양 폴리스티렌 기질(TCPS) 대비 나노 지형에서 더 높은 칼슘 발현 수준을 나타냈다. 3개의 기질에 대한 골 형성의 광물화량은 또한 나노 지형상의 세포에 의한 골 형성 정도가 더 높음을 나타낸다. 힘줄세포 분화와 관련된 분자의 발현을 측정하여, 힘줄 조직 유사 나노 지형의 표과를 보다 잘 입증하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. 결과는 평평한 스캐폴드 대비, 나노 패터닝된 스캐폴드 상에서 콜라겐 유형 I,

오스테오칼신 및 피브로넥틴이 상향조절됨을 나타낸다. 이와 반대로, 콜라겐 유형 III은 나노 패터닝된 스캐폴드 상에서 하향조절되었다(도 11). 상기 결과는, 힘줄 조직 유사 나노 지형이 골 형성과 섬유화를 촉진시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[119] 일반적으로, 상처 치유는 2가지 세포의 행동에 의해 좌우된다: 이동과 증식. 힘줄 상처 치유에의 정렬된 나노 지형의 효과를 평가하기 위해, 스캐폴드 상에 무세포 영역을 만들어 *in vitro*에서 상처 치유 시스템을 제작했다. 도 12는 상처 치유 시스템에 대한 실험 설계를 도시한 것이다. 얇은 PDMS 슬랩을 평평한 또는 나노 패터닝된 스캐폴드의 표면에 먼저 놓는다. 이후, 힘줄세포를 스캐폴드 상에 접종하고, 융합 단층이 형성될 때까지 배양한다. PDMS 슬랩을 조심스럽게 제거하고, 무세포 영역에서의 세포 이동과 증식을 12시간 마다(0, 12, 24, 36 시간) 독립적으로 관찰하고 분석했다. 약 800 nm 폭의 무세포 영역(상처 생성)이 0시간째에 형성되었다(도 12). 36시간째에, 평평한 지형상의 힘줄세포는 무세포 영역을 완전히 덮지 않았다. 이와 대조적으로, 24시간째에, 정렬된 나노 지형상의 힘줄세포는 무세포영역을 완전히 덮었고, 36시간째에, 완전한 상처 재생이 관찰되었다. 특히, 나노 패터닝된 지형상의 회복된 상처는 잘 조직된 자연 힘줄 조직의 구조와 유사하다. 상기 결과는 추가로 정량화되었고, 시간이 지남에 따라 평평한 지형에 비해 나노 패터닝된 지형에서 세포에 의해 지속적으로 더 많은 영역이 덮어졌다(도 13). 나노 그루브와 릿지의 방향은 또한 세포 이동 속도에 유의한 영향을 주었는데, 나노 패터닝된 지형의 경우 평평한 지형의 경우보다 더 빠르다(도 14). 따라서, 상기 결과는 상처 치유 과정에서 나노 패터닝된 지형의 주목할 만한 영향을 보여주는 것이다: ① 나노 지형적 신호는 상처 세포로의 힘줄 세포 이동을 유의하게 촉진시켰다; ② 나노 지형의 방향은 힘줄 세포의 이동 속도에 큰 영향을 주었다; ③ 나노 패터닝된 스캐폴드는 힘줄세포가 증식하여 상처 부위로 이동할 수 있는 고유 힘줄 ECM 구조를 만들기 위한 효율적인 환경을 제공했다.

[120]

[121] **실시예 4.** *In vivo* 실험

[122] *In vivo* 실험에 사용된 모든 토끼는 지정된 희생(sacrifice) 날짜까지 살아남았고, 부작용은 관찰되지 않았다. 급성 회전 근개 파열의 생체 내 모델을 만들기 위해, 흰 토끼에서 10 mm 폭의 힘줄 결손이 생겼다(도 15, 16). 다양한 스캐폴드(직경: 25 mm)를 결손 부위에 이식했다(후술할 바대로 만성 파열 생성 후 6주째에). 수술 후 기간동안 모든 토끼에서 감염, 구축, 운동 장애 또는 염증 반응이 관찰되지 않았다. 거시적으로, 스캐폴드가 이식된 모든 결손 부위는 수술 후 4주째까지 부드러운 결합 조직(smooth connective tissue)으로 덮여있었다. 스캐폴드는 변형없이 6주동안 유지되었다.

[123] 나노 지형적 신호의 치유 효과를 확인하는 측면에서, 6주간 스캐폴드로 재생된 회전 근개의 조직학적 질(즉, 힘줄-뼈 인터페이스에서의 콜라겐 섬유의 연결,

콜라겐 섬유의 배향과 밀도, 혈관 밀도, 힘줄-뼈 인터페이스의 성숙도, 혈관 밀도 및 세포 밀도)을 평가하기 위해 H&E 염색과 masson trichrome 염색을 시행하였다. 나노 패터닝된 스캐폴드를 사용하여 회복된 회전 근개 힘줄은 평평한 스캐폴드를 사용한 경우 대비, 높은 밀도의 잘 조직된 콜라겐 섬유를 보여준다(도 17). 또한, 회전 근개 힘줄 섹션에서, 나노 패터닝된 스캐폴드를 사용하여 회복된 근육 조직은 평평한 스캐폴드를 사용한 경우 대비, 감소된 지방 비율을 보여준다(도 22).

[124] 만성 회전 근개 파열 치료에 있어서, 나노 패터닝된 스캐폴드의 효용성을 평가하기 위해, 상완골두의 결절에서 극상근 힘줄을 절단하여 파열된 토끼 모델을 만들었다. 첫째로, 상처를 무시하고 2, 4, 6, 8, 12주에 힘줄의 힘줄의 지방 퇴화(fatty degeneration) 정도를 관찰함으로써, 시간(스캐폴드 삽입 전)에 따른 힘줄 조직 변형의 진행을 확인했다. Goutallier 지방 퇴화 단계가 사용되었다; 즉, 단계 0: 지방 줄무늬가 없는 완전히 정상적인 힘줄, 단계 1: 몇몇의 지방 줄무늬가 있는 힘줄, 단계 2: 힘줄의 양이 지방 침투의 양보다 큼, 단계 3: 힘줄의 양과 지방 침투의 양이 동일, 단계 4: 지방 침투량이 힘줄의 양보다 큼. 만성 파열은 지속기간이 증가함에 따라 지방 퇴화가 증가하여, 6주 후에 2단계 보다 높았다(도 19). 이는 만성 회전 근개 파열의 토끼 모델이 성공적으로 개발되었음을 입증하는 것이다.

[125] 다음으로, 상기 손상 4주 후에, 평평한 스캐폴드와 나노 패터닝된 스캐폴드를 각각 만성적 손상부위 상에 이식한 다음, 조직학적 평가에 의해 6주째의 힘줄 재생을 관찰했다. 두개의 이식된 스캐폴드는 부착 부위에서 이물 반응 없이 체내에 잘 적응하는 생체 적합성이 확인되었다. 나노 패터닝된 스캐폴드로 처리된 토끼는 스캐폴드 아래 섹션에서, 높은 비율의 힘줄 조직 재생과 함께, 고유의 토끼 힘줄 조직 유사 조직학적 치유 패턴을 보여주었다. 또한, 힘줄-뼈 인터페이스는 고밀도의 잘 조직된 콜라겐 섬유를 가지고 있었다(도 20). 이와 대조적으로, 스캐폴드 미처리군(sham group)과 평평한 스캐폴드 처리군은 드문드문한 섬유질 조직과, 상처 부위의 뼈와 연골에서의 낮은 세포 밀도를 보였다(도 20). 또한, 나노 패터닝된 스캐폴드로 처리한 토끼 힘줄 조직은 콜라겐 섬유 조직과 같은 고유 힘줄 조직을 보여주었고, 스캐폴드 미처리군 및 평평한 스캐폴드 처리군 대비 힘줄-뼈 인터페이스에서 세포 및 혈관 섬유 조직의 양이 증가하였다. 나노 패터닝된 스캐폴드로 처리된 힘줄-뼈 인터페이스에서 섬유 연골 조직은 원래의 조직과 유사한 수직 배열을 보였다(도 21). 그러나, 스캐폴드 미처리군과 평평한 스캐폴드 처리군은 처리 부위에서의 지방 변형이 개선되지 않았고, 섬유질 조직과 세포 밀도는 낮은 조직학적 패턴이 관찰되었다(도 21). 회전 근개 힘줄 섹션에서 나노 패터닝된 스캐폴드를 사용하여 회복된 근육 조직은 스캐폴드 미처리군 및 평평한 스캐폴드 처리군과 대비하여 감소된 지방 비율을 보였다(도 22). 따라서, 나노 패턴 지형은 명백하게, 힘줄-뼈 인터페이스에서, 콜라겐 조직, 연결 및 힘줄 조직의 재생에 고유 회전 근개 조직

및 연골 조직과 유사한 구조로 영향을 미쳤다. 상기 결과는 힘줄 조직과 섬유연골 재생을 유도하기 위한 합성 ECM에서 정렬된 나노 지형의 중요성을 나타낸다.

청구범위

[청구항 1] 복수개의 릿지(ridge)와 그루브(groove)를 포함하는 나노 스트라이프 패턴;을 포함하는 회전 근개 파열 치료용 스캐폴드.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 릿지 또는 그루브의 폭은 서로 독립적으로 100 내지 1000 nm인 스캐폴드.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 릿지와 그루브의 폭의 비는 1: 0.5 내지 1.5인 스캐폴드.

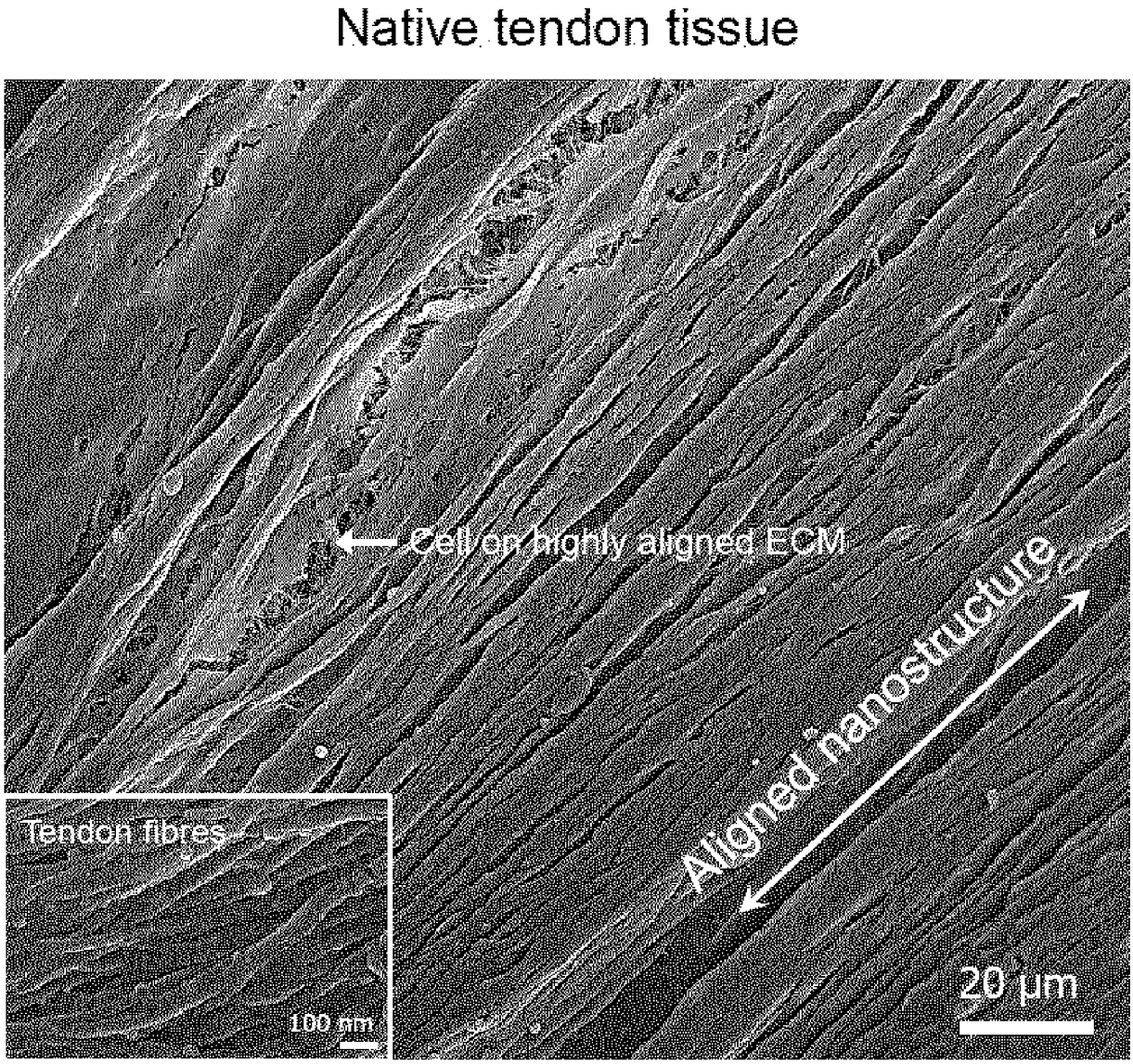
[청구항 4] 청구항 1에 있어서, 그루브로부터의 릿지의 높이가 100 내지 1000 nm인 스캐폴드.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 스캐폴드는 두께가 10 내지 100 μm인 스캐폴드.

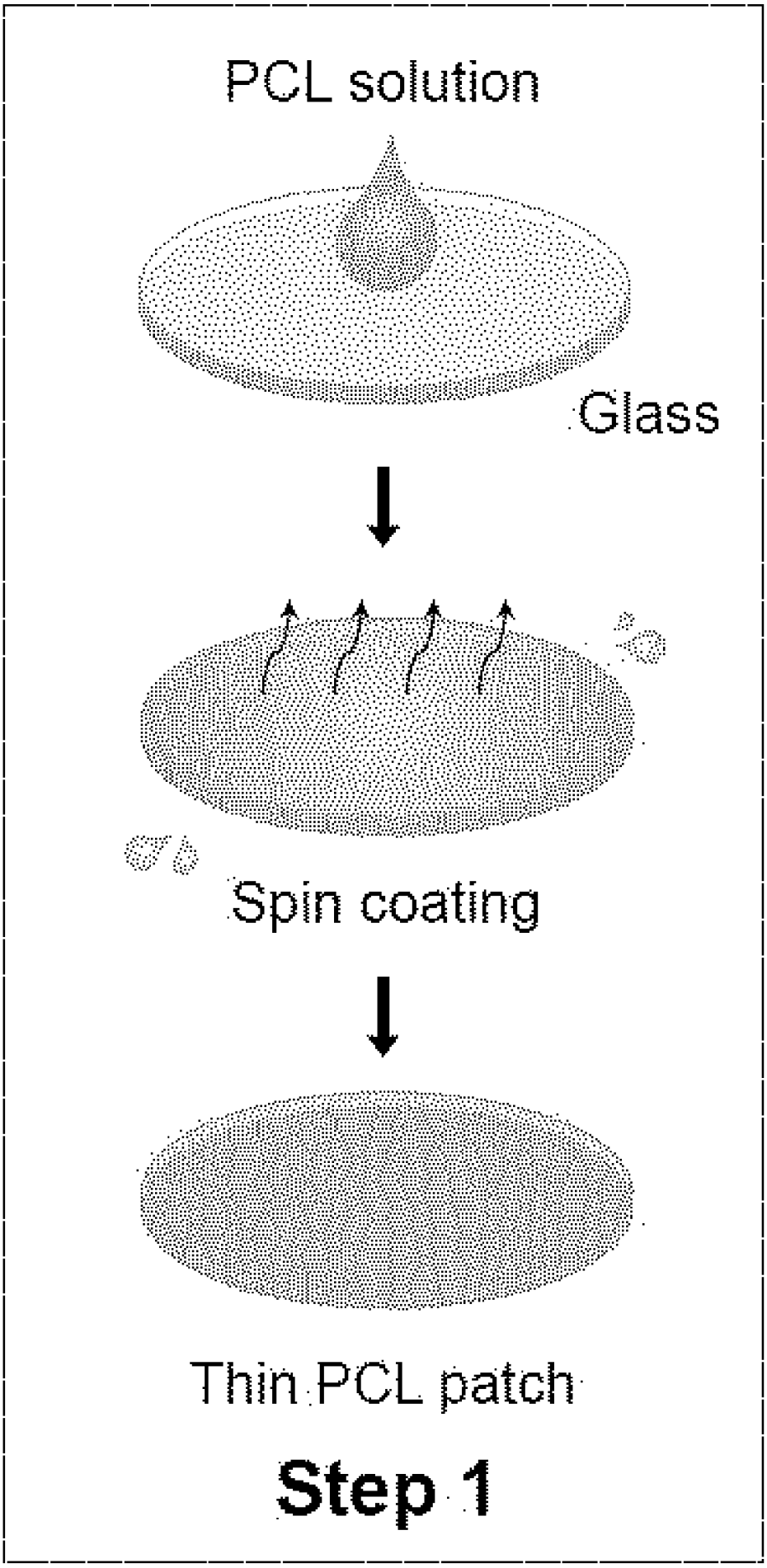
[청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 스캐폴드는 스트라이프 패턴 방향으로 0.5 내지 2.0 mm 신장시켰을 때, 평균 6 N/mm^2 이상의 기계 응력(mechanical stress)을 나타내는 스캐폴드.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 회전 근개 파열은 급성 파열 또는 만성 파열인 스캐폴드.

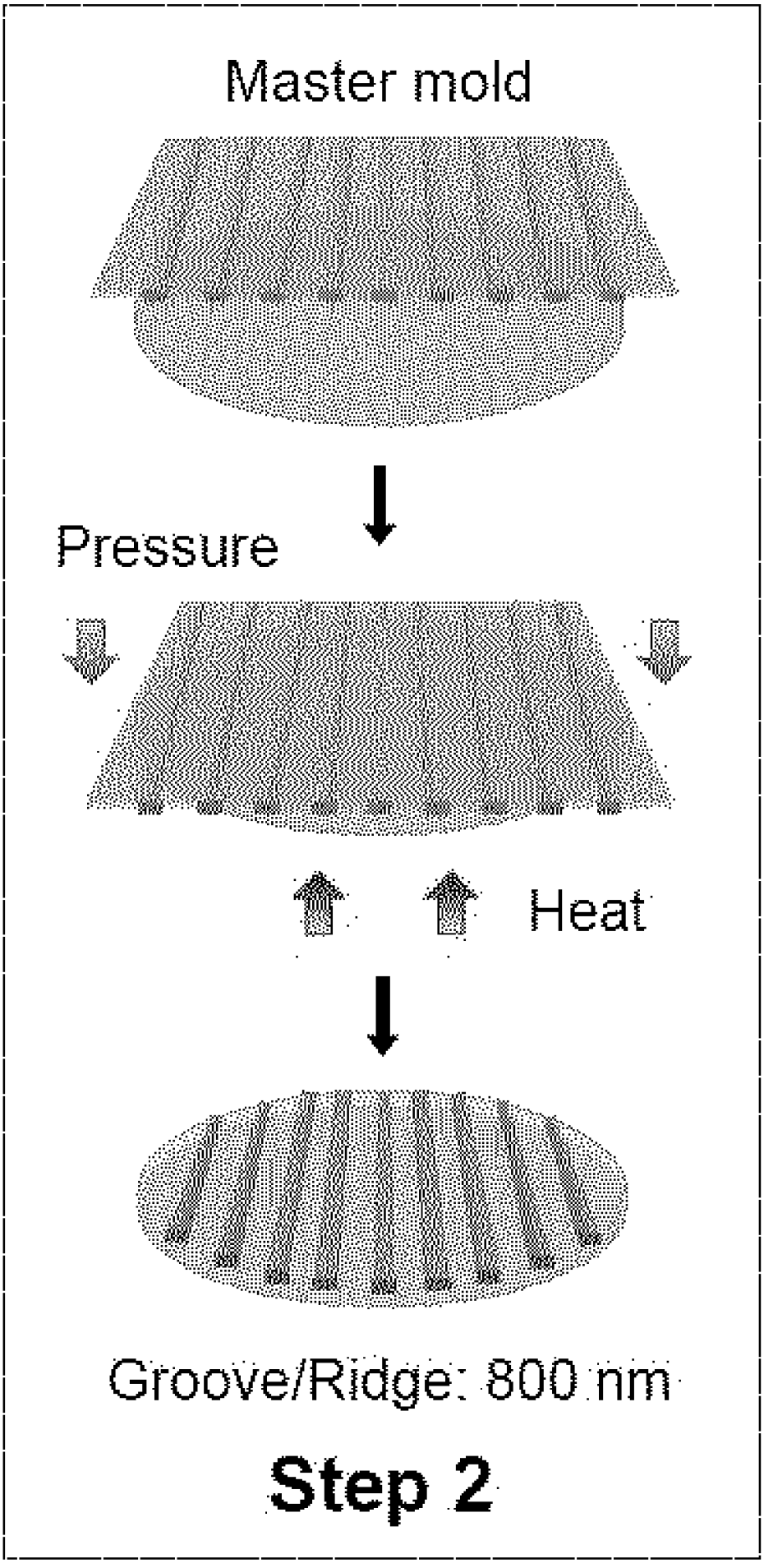
[도1]


Native tendon tissue
Cell on highly aligned ECM
Aligned nanostructure
Tendon fibres
100 nm
20 μm

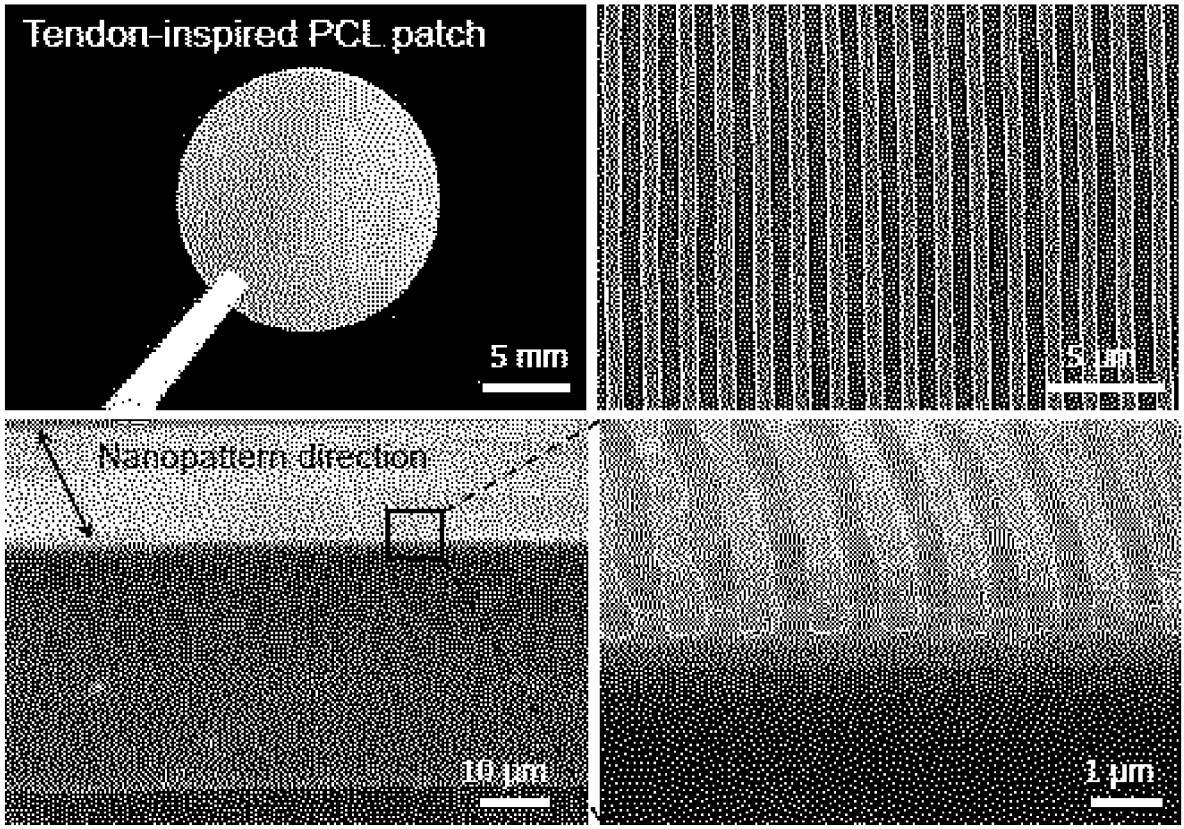
[도2]



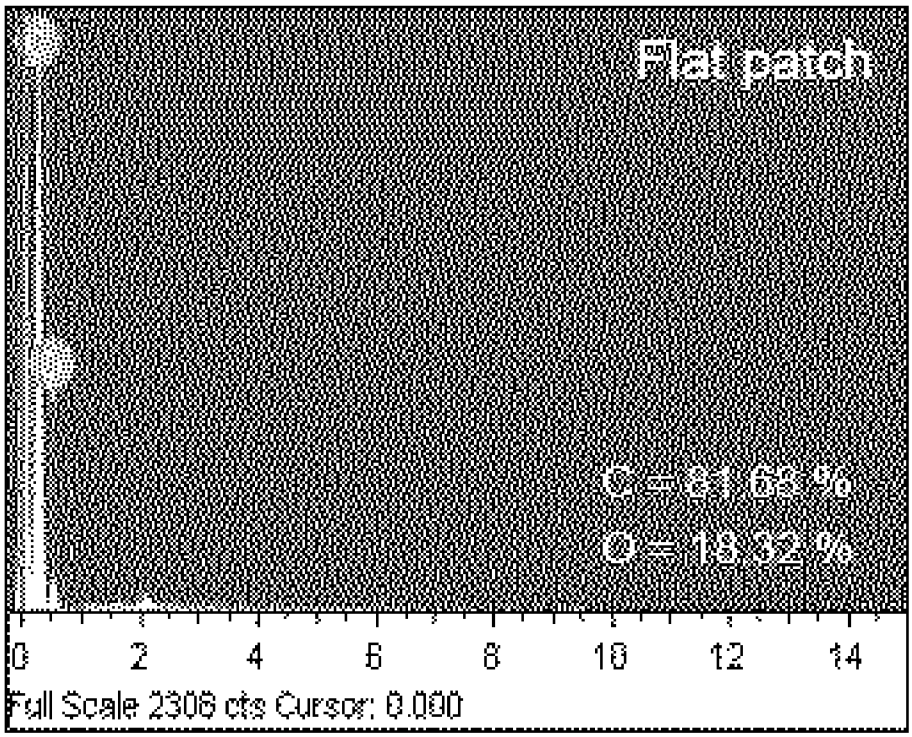
[도3]

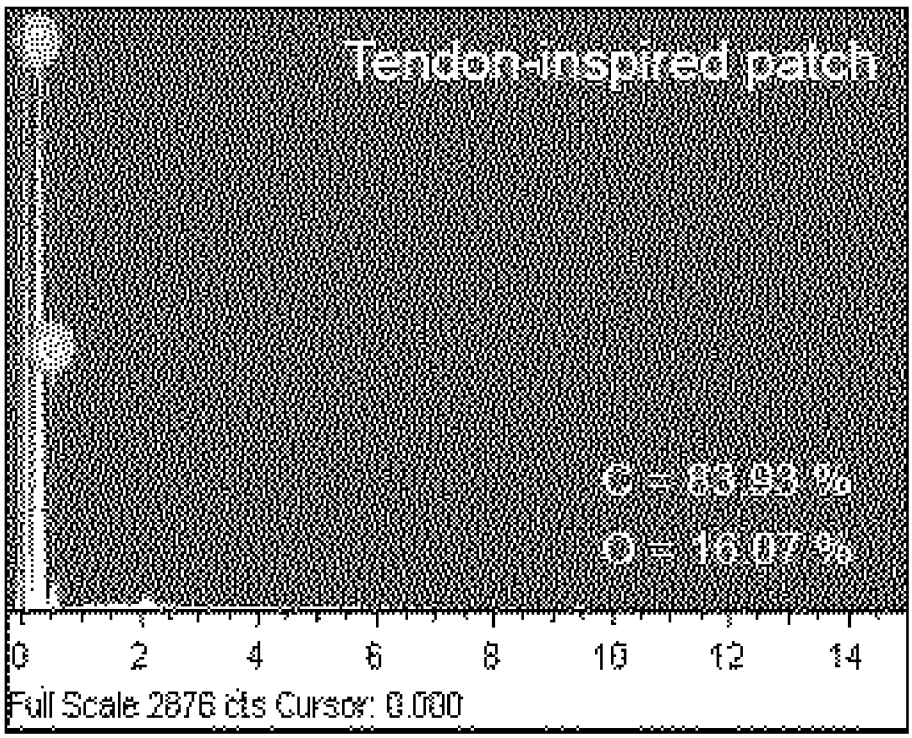


[도4]

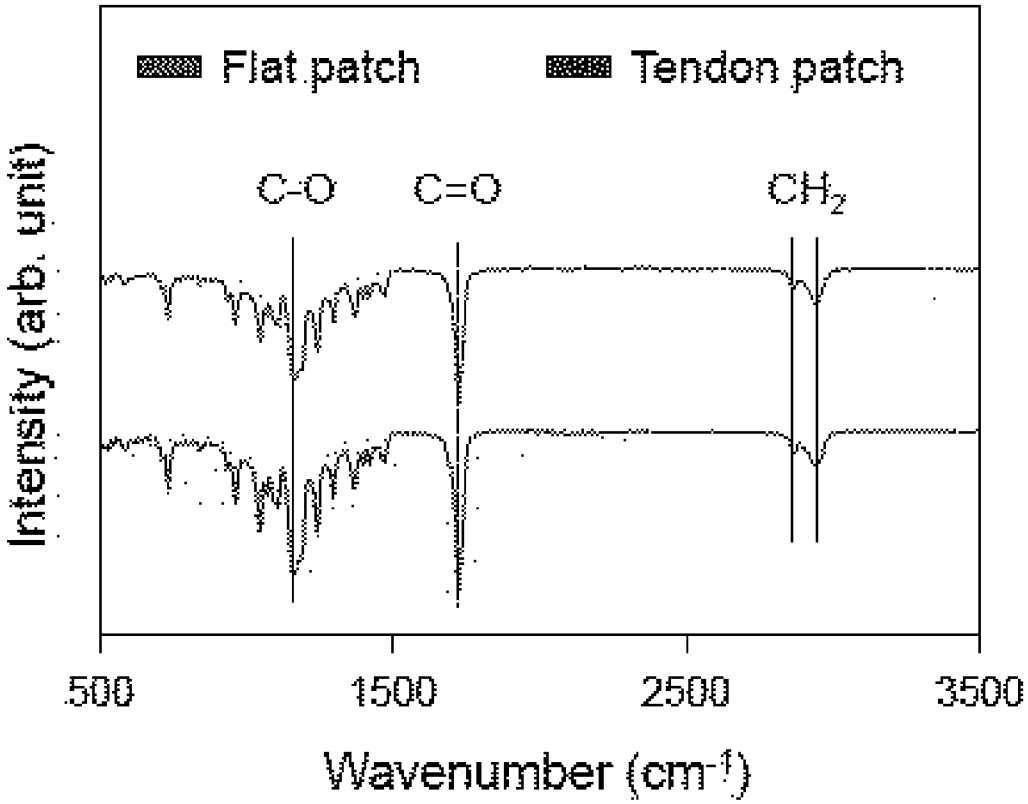

Tendon-inspired PCL patch
5 mm
5 μm
Nanopattern direction
10 μm
1 μm

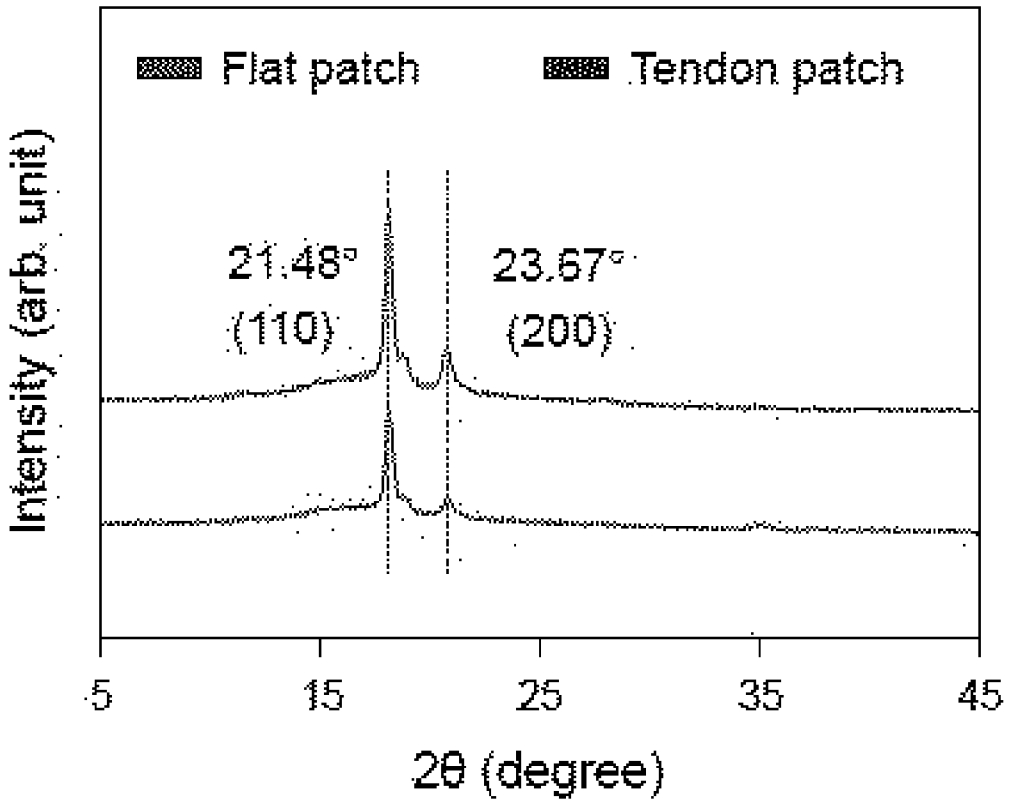
[도5]


Flat patch
C = 81.68 %
O = 18.32 %
0
2
4
6
8
10
12
14
Full Scale 2306 cts Cursor: 0.000
Energy (KeV)

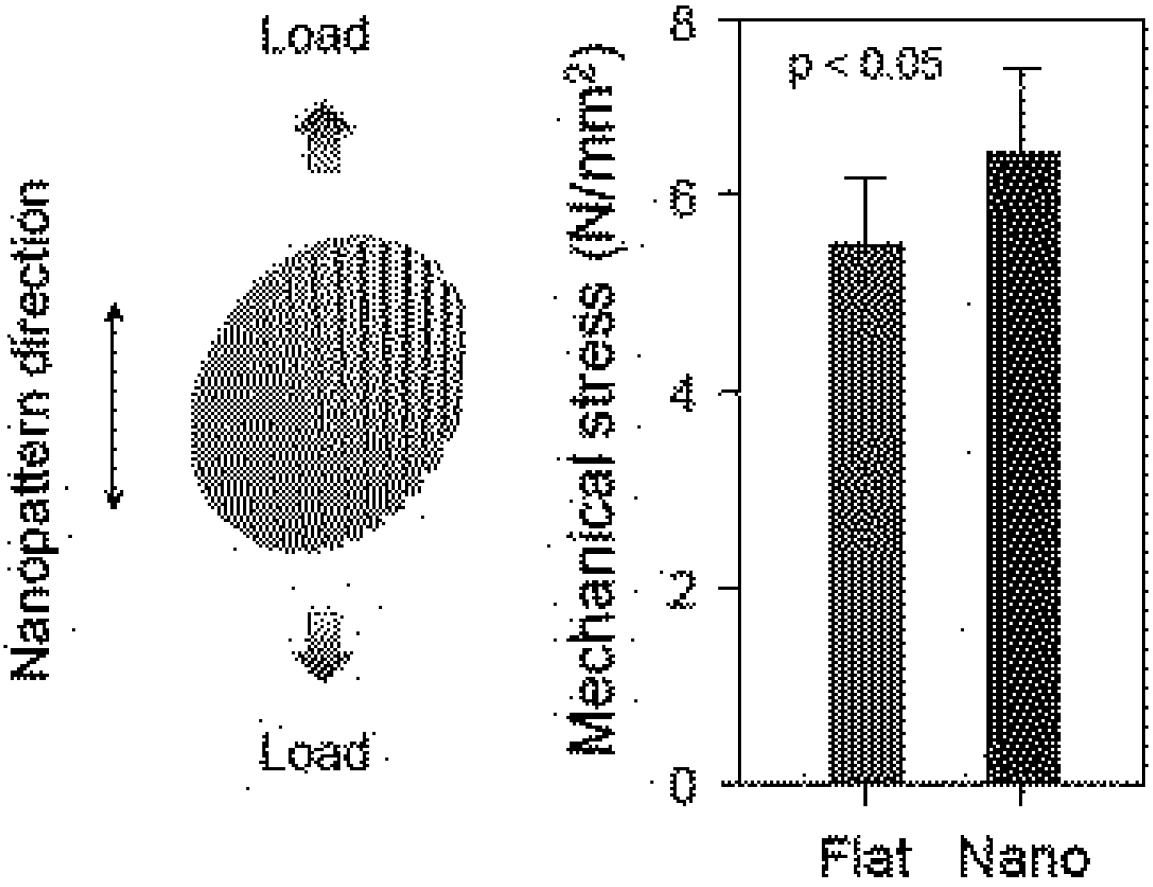

Tendon-inspired patch
C = 83.93 %
O = 16.07 %
0
2
4
6
8
10
12
14
Full Scale 2676 cts Cursor: 0.000
Energy (KeV)

[도6]

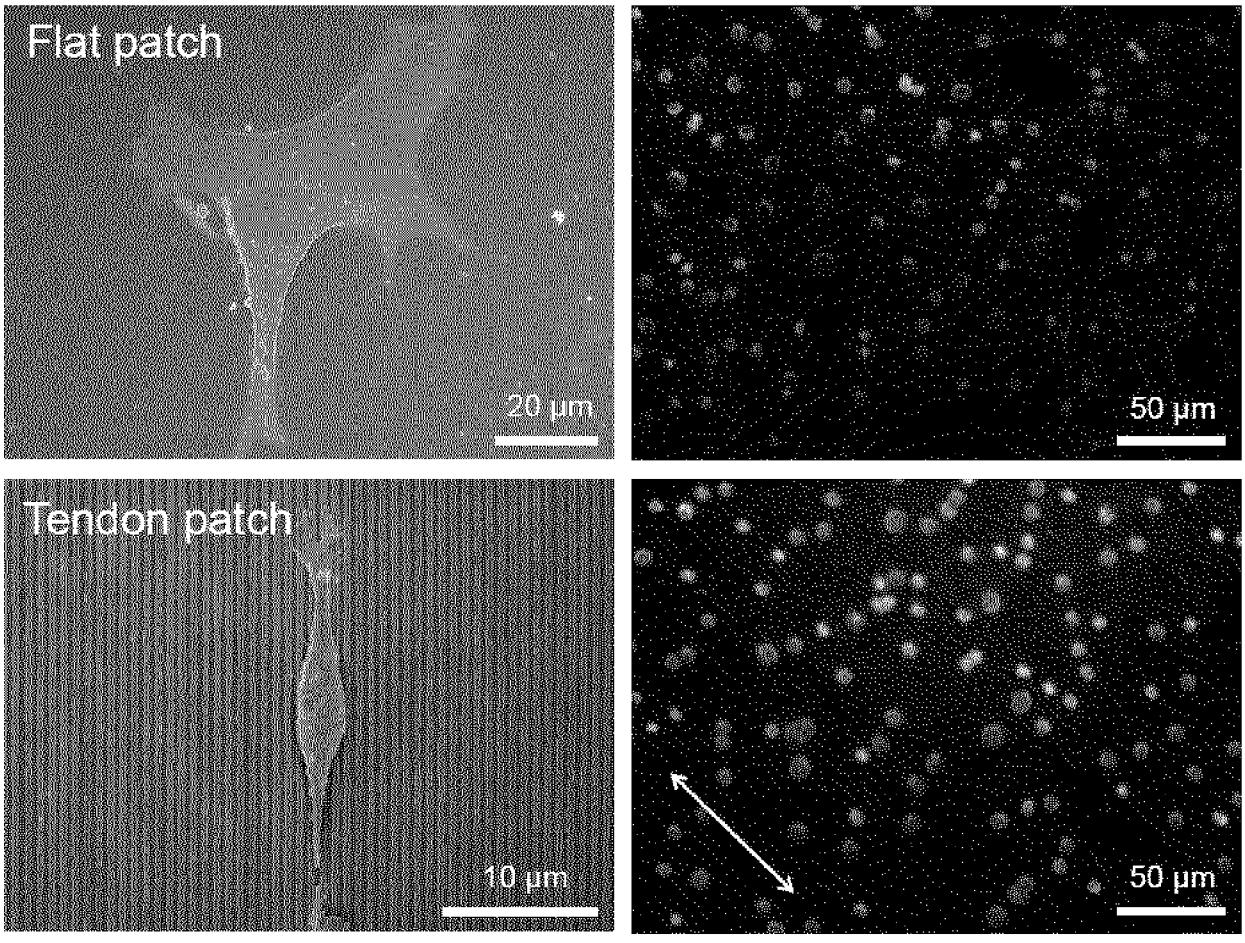

Flat patch
Tendon patch
C-O
C=O
CH_2
Intensity (arb. unit)
500
1500
2500
3500
Wavenumber (cm^{-1})


Flat patch
Tendon patch
21.48°
(110)
23.67°
(200)
Intensity (arb. unit)
5
15
25
35
45
2θ (degree)

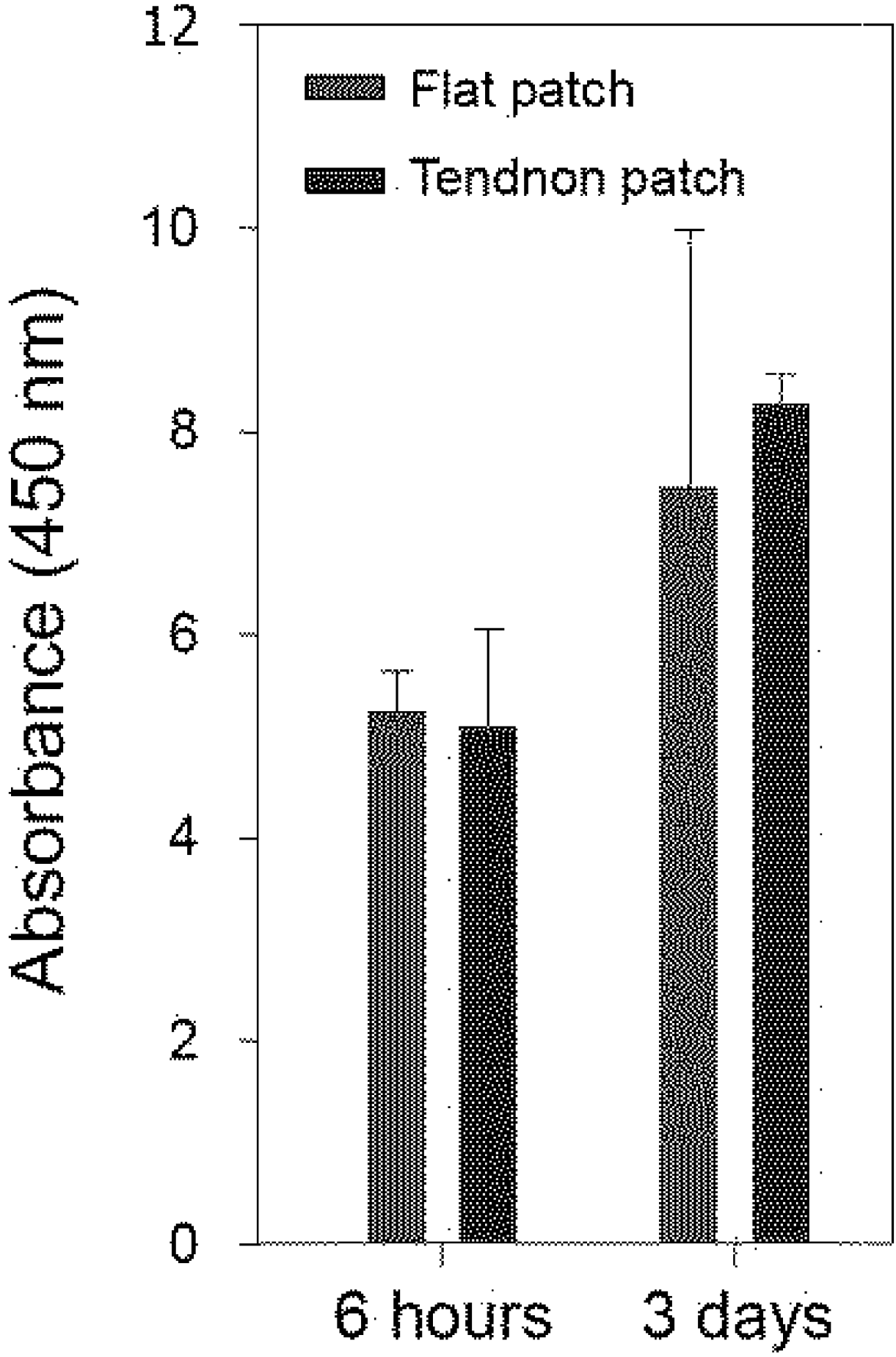
[도7]


Load
Nanopattern direction
Load
Mechanical stress (N/mm²)
p < 0.05
0
2
4
6
8
Flat
Nano

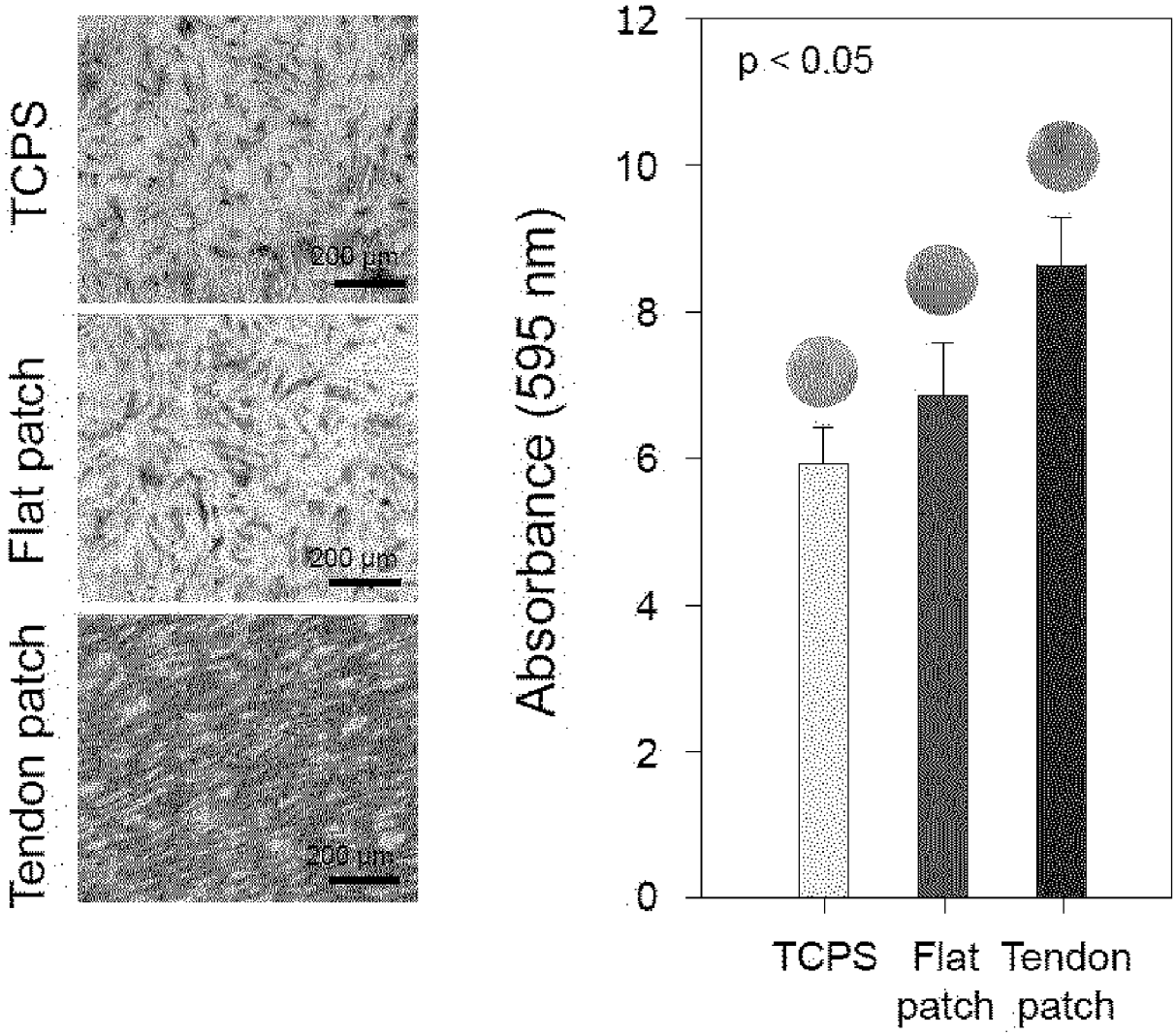
[도8]


Flat patch
20 μm
50 μm
Tendon patch
10 μm
50 μm

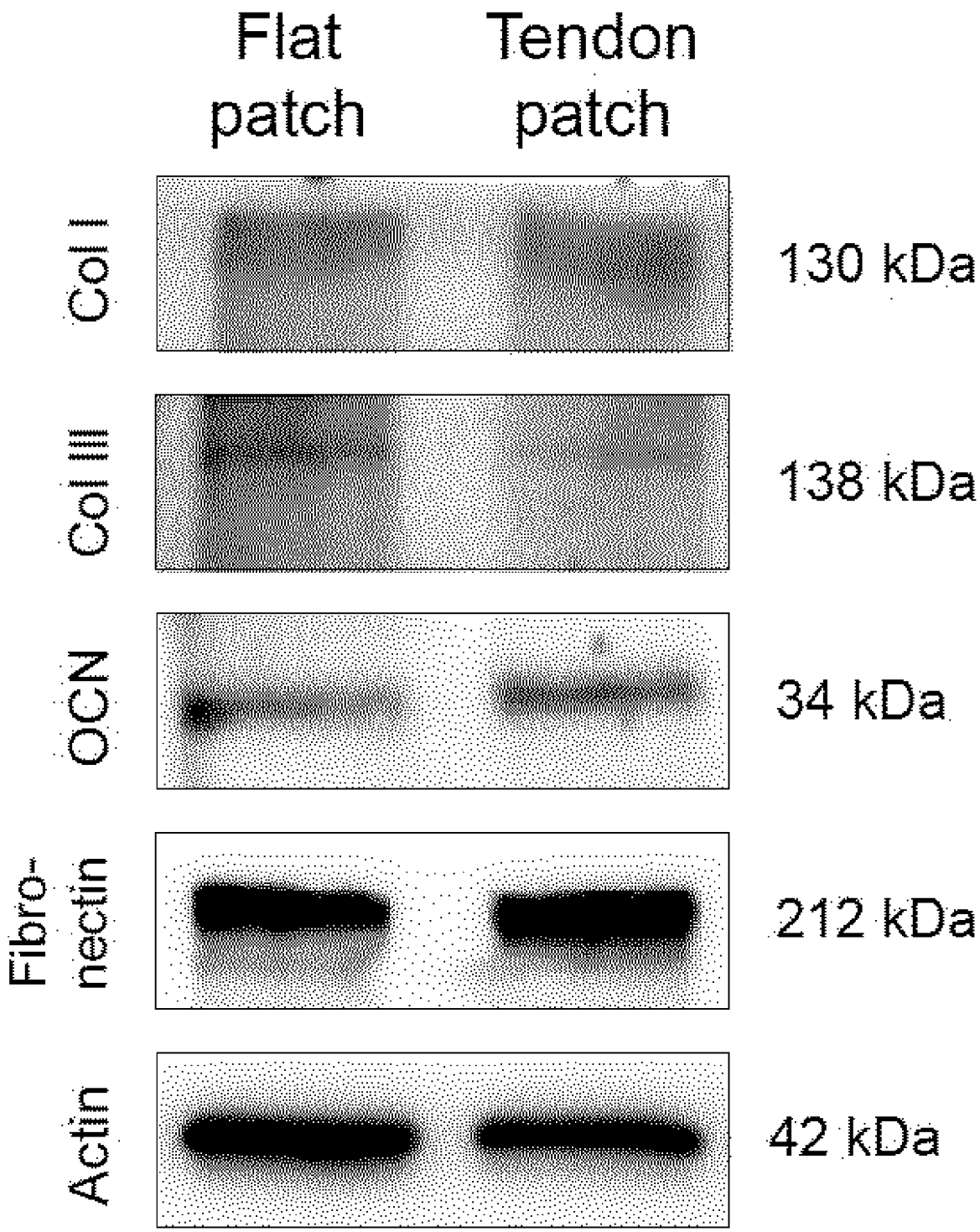
[도9]


Absorbance (450 nm)
0
2
4
6
8
10
12
Flat patch
Tendnon patch
6 hours
3 days

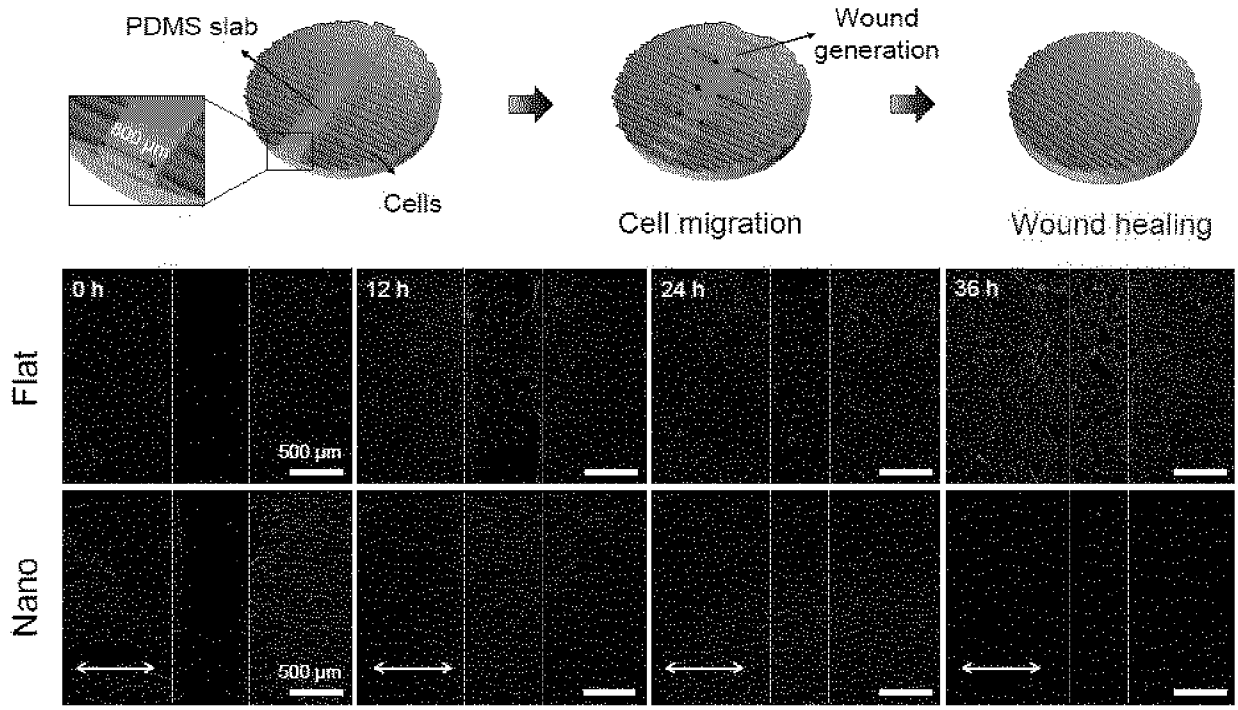
[도10]


TCPS
200 μm
Flat patch
200 μm
Tendon patch
200 μm
p < 0.05
Absorbance (595 nm)
0
2
4
6
8
10
12
TCPS
Flat patch
Tendon patch

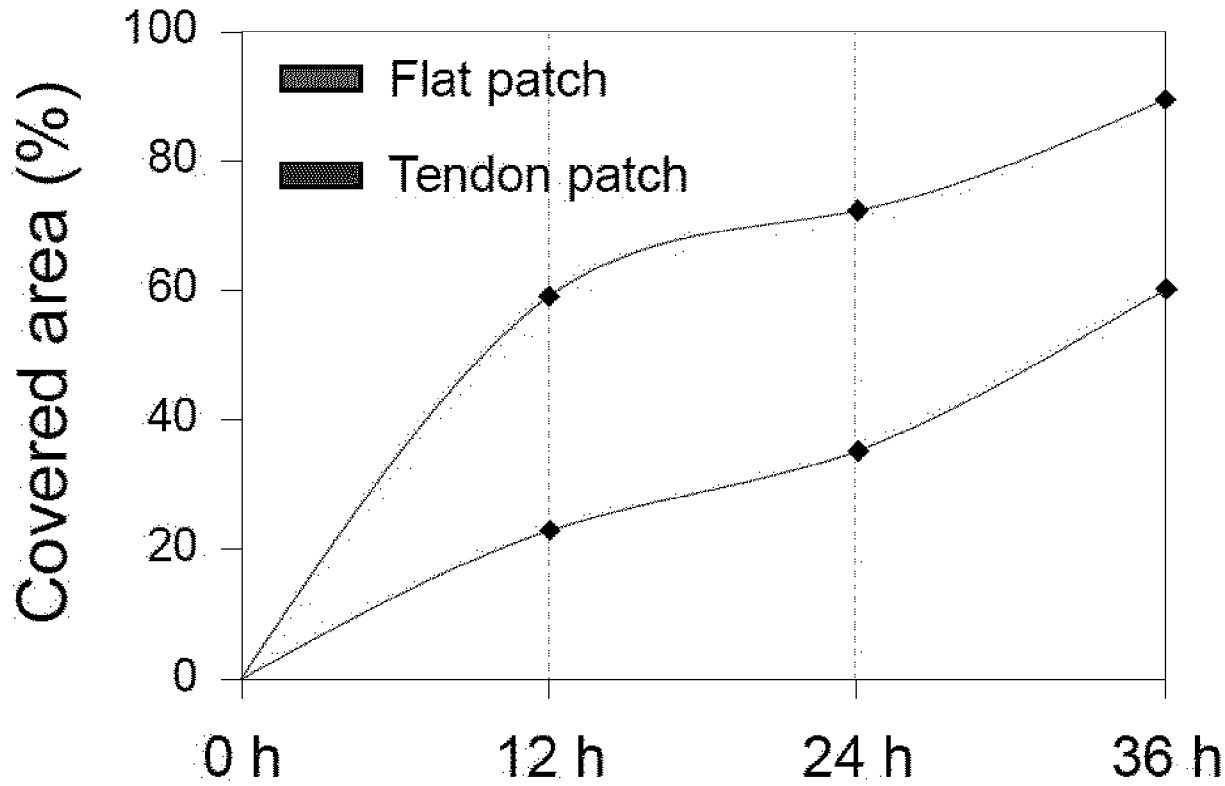
[도11]


Flat patch
Tendon patch
Col I
130 kDa
Col IIII
138 kDa
OCN
34 kDa
Fibro-nectin
212 kDa
Actin
42 kDa

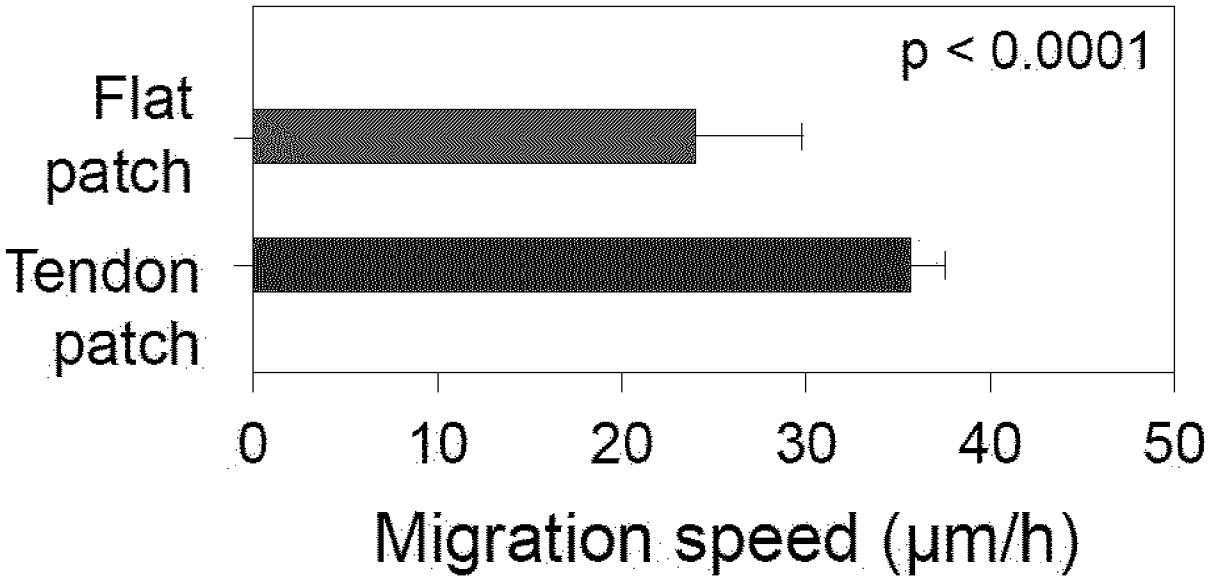
[도12]


PDMS slab
400 μm
Cells
Wound generation
Cell migration
Wound healing
Flat
Nano
0 h
12 h
24 h
36 h
500 μm
500 μm

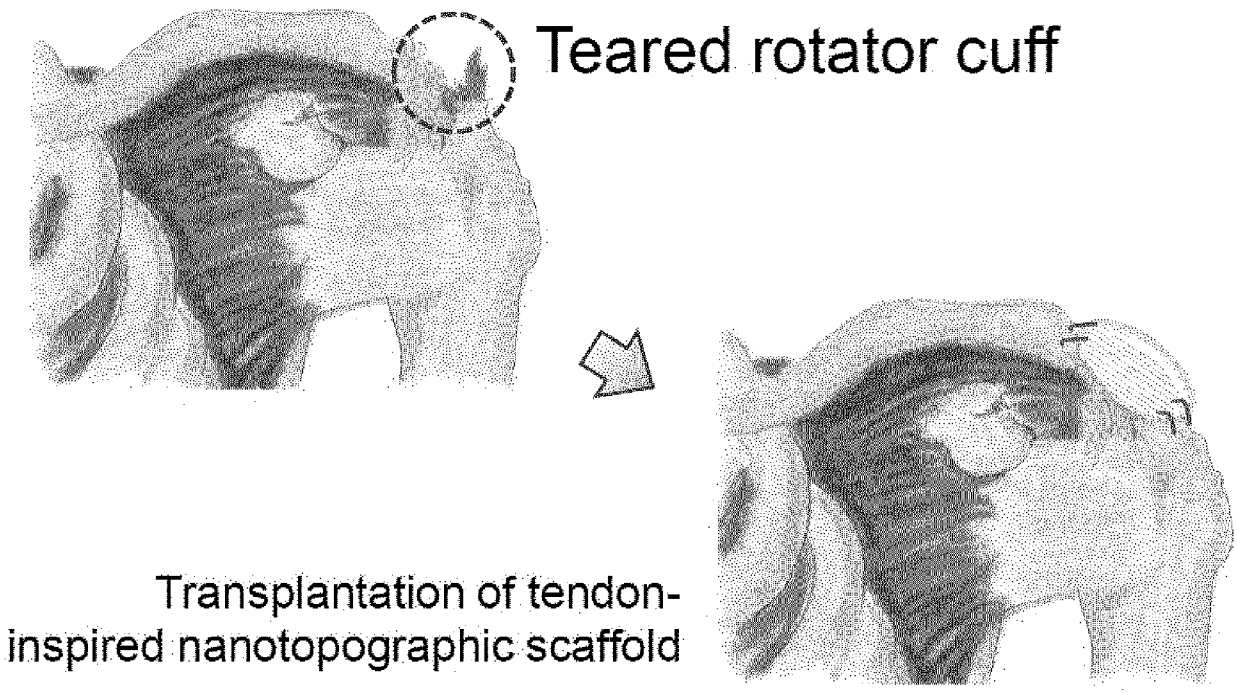
[도13]


Covered area (%)
100
80
60
40
20
0
Flat patch
Tendon patch
0 h
12 h
24 h
36 h

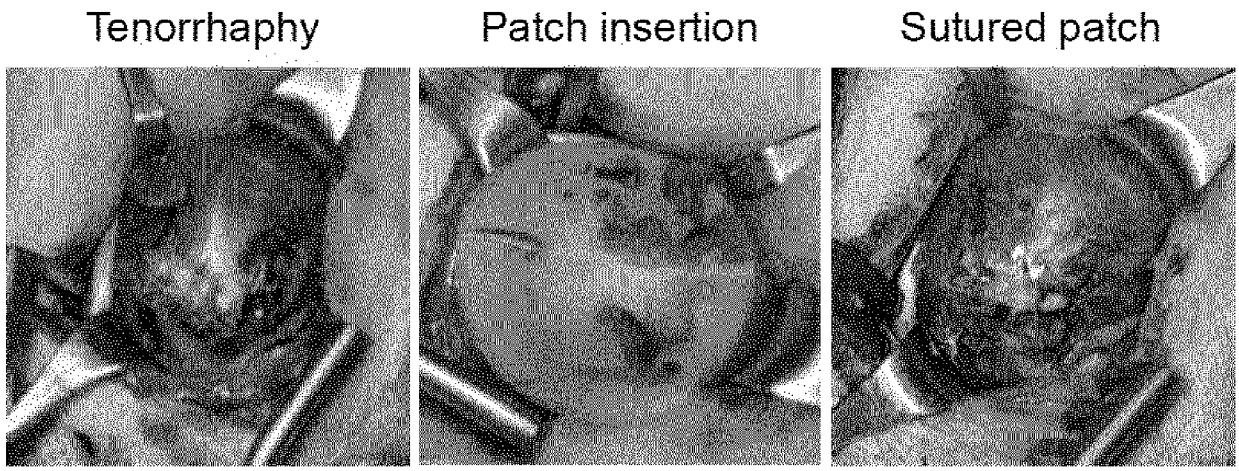
[도14]


p < 0.0001
Flat patch
Tendon patch
0
10
20
30
40
50
Migration speed (μm/h)

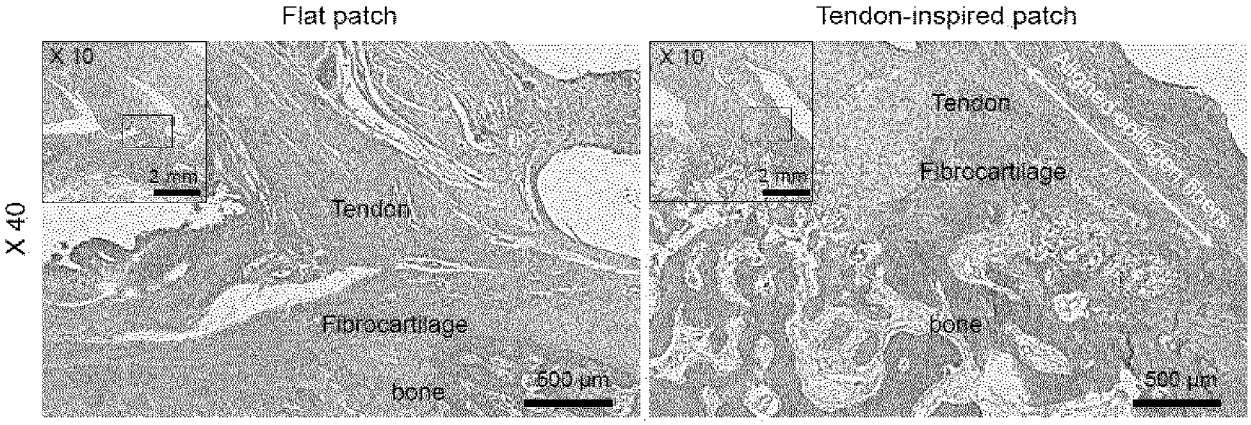
[도15]


Teared rotator cuff
Transplantation of tendon-inspired nanotopographic scaffold

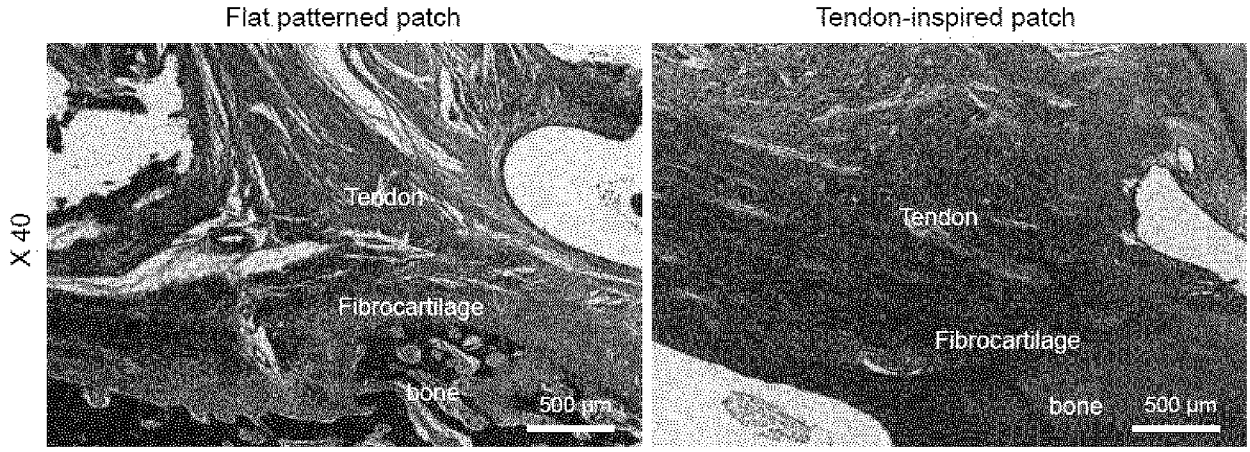
[도16]


Tenorrhaphy
Patch insertion
Sutured patch

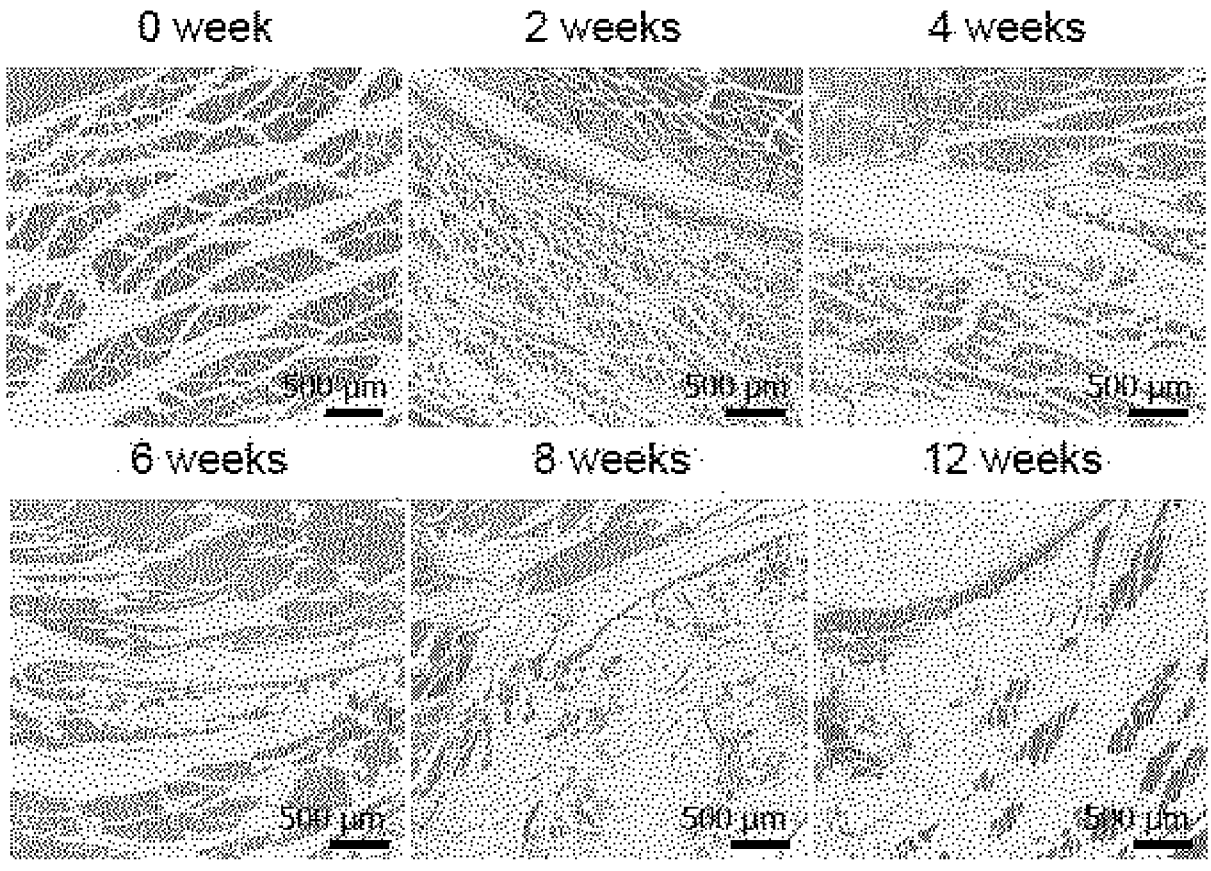
[도17]


Flat patch
Tendon-inspired patch
X 10
2 mm
X 40
Tendon
Fibrocartilage
bone
500 μm

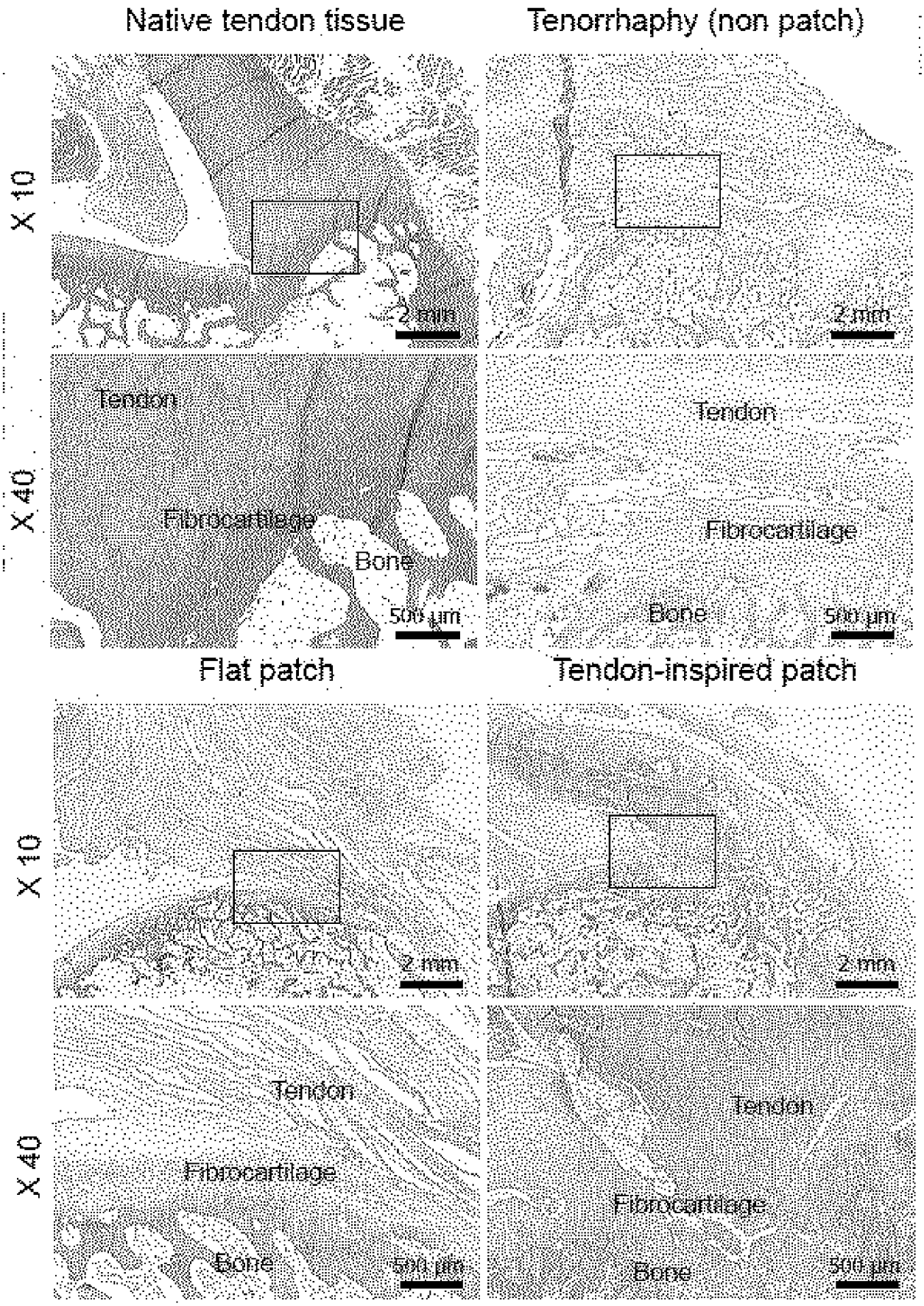
[도18]


Flat patterned patch
Tendon-inspired patch
X 40
Tendon
Fibrocartilage
bone
500 μm

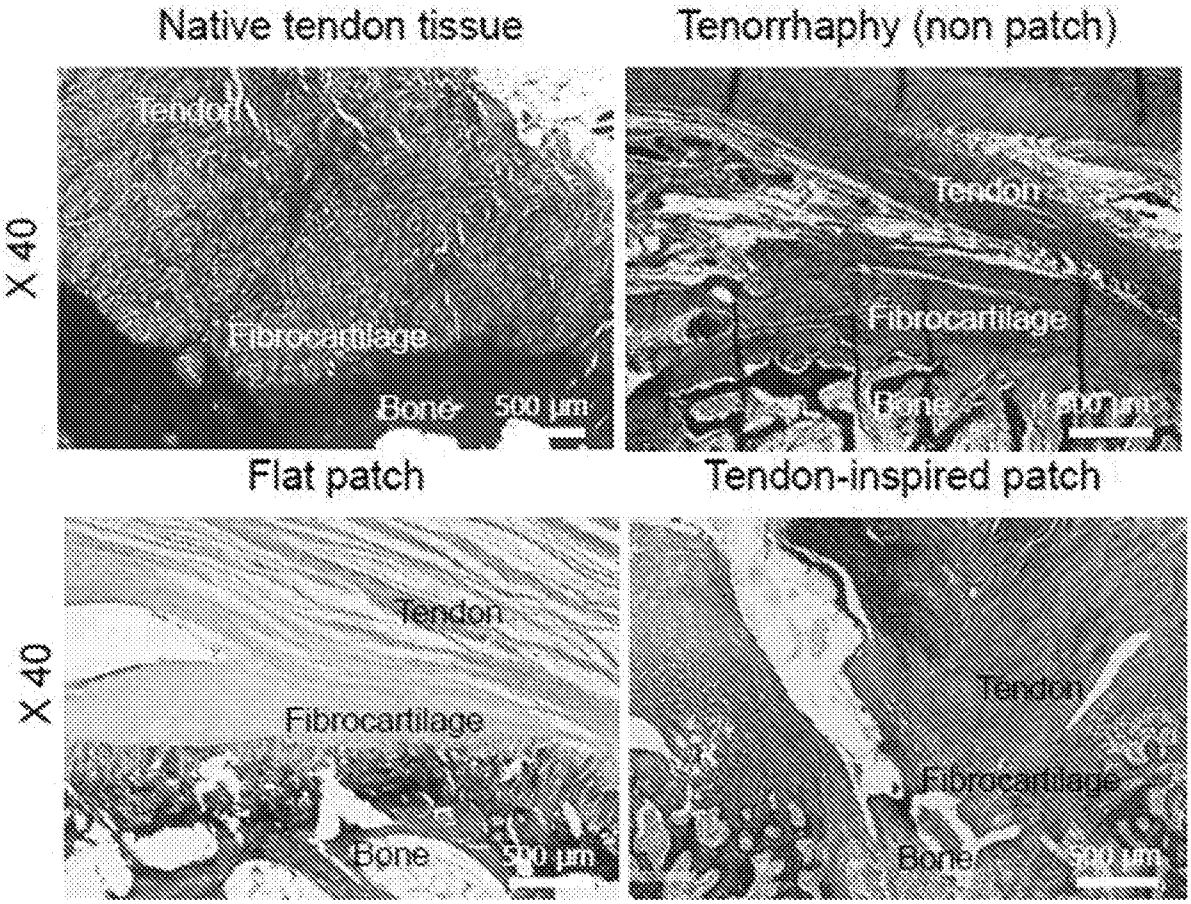
[도19]


0 week
2 weeks
4 weeks
6 weeks
8 weeks
12 weeks
500 μm

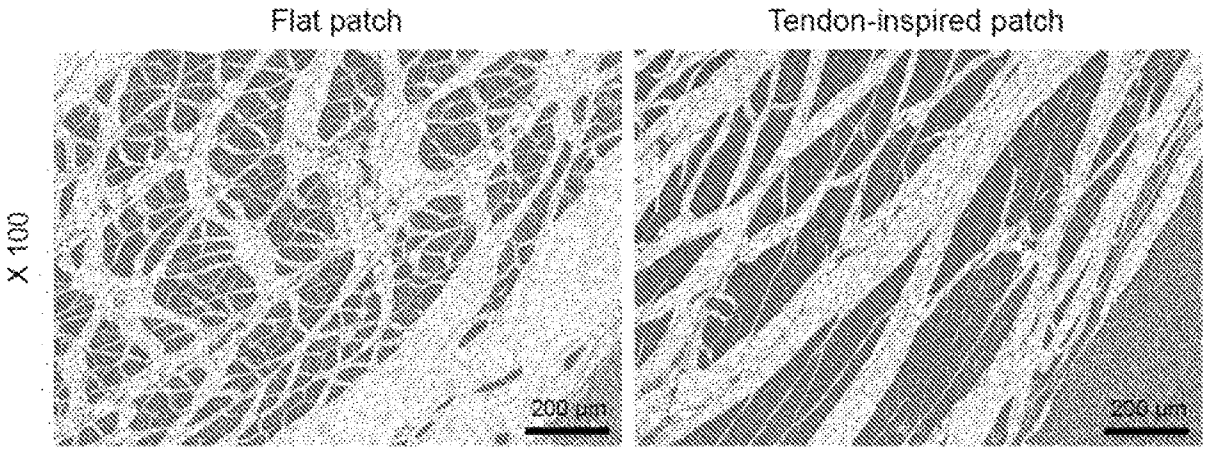
[도20]


Native tendon tissue
Tenorrhaphy (non patch)
X 10
X 40
2 mm
Tendon
Fibrocartilage
Bone
500 μm
Flat patch
Tendon-inspired patch

【도21】


Native tendon tissue
Tenorrhaphy (non patch)
X 40
Tendon
Fibrocartilage
Bone
500 μm
Flat patch
Tendon-inspired patch
X 40
Tendon
Fibrocartilage
Bone
500 μm

【도22】


Flat patch
Tendon-inspired patch
X 100
200 μm
200 μm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61F 2/08(2006.01)i, A61F 2/00(2006.01)i, A61L 27/56(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/38(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)

A61F 2/08; A61L 27/18; A61L 27/38; B82Y 99/00; C12N 5/0735; C12N 5/077; C12N 5/079; A61F 2/00; A61L 27/56; A61L 27/14

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: scaffold, ridge, groove, nano, rotator cuff and tensile

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Sun Jeong et al. Nanotopographic cues and stiffness control of tendon-derived stem cells from diverse conditions. International Journal of Nanomedicine. 08 November 2018, Vol. 13, pages 7217-7227 See pages 7217-7221 and figure 1.	1-7
A	KR 10-2018-0006321 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 17 January 2018 See the entire document.	1-7
A	US 2016-0228608 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 11 August 2016 See the entire document.	1-7
A	KR 10-1782673 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 29 September 2017 See the entire document.	1-7
A	KR 10-1385509 B1 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 07 May 2014 See the entire document.	1-7

☐ 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	Date of mailing of the international search report
26 SEPTEMBER 2019 (26.09.2019)	**27 SEPTEMBER 2019 (27.09.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016868

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2018-0006321 A	17/01/2018	KR 10-1988912 B1	13/06/2019
		US 2018-0066230 A1	08/03/2018
US 2016-0228608 A1	11/08/2016	CN 105979977 A	28/09/2016
		EP 3052152 A1	10/08/2016
		WO 2015-049524 A1	09/04/2015
KR 10-1782673 B1	29/09/2017	KR 10-2016-0000576 A	05/01/2016
KR 10-1385509 B1	07/05/2014	KR 10-2011-0094753 A	24/08/2011

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/016868

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61F 2/08(2006.01)i, A61F 2/00(2006.01)i, A61L 27/56(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/38(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61F 2/08; A61L 27/18; A61L 27/38; B82Y 99/00; C12N 5/0735; C12N 5/077; C12N 5/079; A61F 2/00; A61L 27/56; A61L 27/14

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: 스캐폴드(scaffold), 릿지(ridge), 그루브(groove), 나노(nano), 회전근개(rotator cuff) 및 인장(tensile)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, SUN JEONG et al., Nanotopographic cues and stiffness control of tendon-derived stem cells from diverse conditions, International Journal of Nanomedicine, 08 November 2018, Vol. 13, pages 7217-7227 페이지 7217-7221 및 도면 1 참조.	1-7
A	KR 10-2018-0006321 A (서울대학교산학협력단 등) 2018.01.17 전체 문서 참조.	1-7
A	US 2016-0228608 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2016.08.11 전체 문서 참조.	1-7
A	KR 10-1782673 B1 (서울대학교산학협력단) 2017.09.29 전체 문서 참조.	1-7
A	KR 10-1385509 B1 (한양대학교 산학협력단) 2014.05.07 전체 문서 참조.	1-7

☐ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 09월 26일 (26.09.2019)	2019년 09월 27일 (27.09.2019)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016868

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0006321 A	2018/01/17	KR 10-1988912 B1	2019/06/13
		US 2018-0066230 A1	2018/03/08
US 2016-0228608 A1	2016/08/11	CN 105979977 A	2016/09/28
		EP 3052152 A1	2016/08/10
		WO 2015-049524 A1	2015/04/09
KR 10-1782673 B1	2017/09/29	KR 10-2016-0000576 A	2016/01/05
KR 10-1385509 B1	2014/05/07	KR 10-2011-0094753 A	2011/08/24