

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0069763 (43) 공개일자 2016년06월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/56 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01) A61L 27/12 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2014-0175779	(72) 발명자 송해룡 서울특별시 구로구 신도림로 87, 105동 102호 (신도림동, 동아1차아파트)	
(22) 출원일자 2014년12월09일 심사청구일자 없음	심규식 서울특별시 구로구 새말로6길 25, 303호 (구로동) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 이처영, 장제환	

전체 청구항 수 : 총 15 항

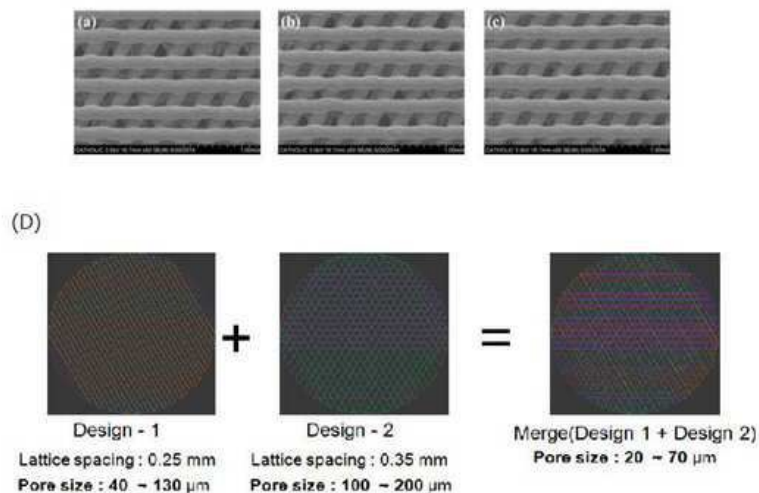
(54) 발명의 명칭 골형성 촉진물질이 함유된 방출형 스캐폴드 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 골형성 촉진물질이 고정 및 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 포어사이즈 40~130 μm 의 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 시트가 머지되도록 성형되어 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드에 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 생체적합성 고분자 스캐폴드의 치밀한 기공구조로 인하여, 골형성 촉진물질이 장기간 지속적으로 방출가능하며, 스캐폴드에 함입되는 조골세포가 빠져나가지 않아, 골 결손부위에서 지속적인 골형성이 가능하게 된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김학준

서울특별시 강남구 선릉로 217, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

윤영필

서울특별시 광진구 천호대로132길 36-7, B102 (구의동)

김성은

서울특별시 강서구 강서로12길 51-13, 401호 (화곡동, 주얼리맨션)

명세서

청구범위

청구항 1

포어사이즈 40~130 μm 의 생체적합성 고분자 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 생체적합성 고분자 시트가 머지되도록 성형되어 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드에 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골형성 촉진물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 티루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF), 토브라마이신, 젠타마이신 및 반코마이신으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골 형성 촉진용 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골 형성 촉진용 스캐폴드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 고분자는 평균분자량이 70,000~80,000 g/mol인 것을 특징으로 하는 골형성 촉진용 스캐폴드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 골형성 촉진물질은 0.01~100 mg/mL의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 골형성 촉진용 스캐폴드.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드의 제조방법:

- (a) 포어사이즈 40~130 μm 의 생체적합성 고분자 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 생체적합성 고분자 시트가 머지되도록 성형되어 최종적으로 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계;
- (b) 형성 촉진물질을 제1용매에 용해시키는 단계;
- (c) 상기 골형성 촉진물질이 용해된 용액에 상기 생체적합성 고분자 스캐폴드와 제2용매를 첨가하여 혼합하는 단계; 및
- (d) (c) 단계에서 수득된 혼합물을 제3용매에 적하하여 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드를 제조하는 단계.

진용 스캐폴드를 제조하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제1용매는 Dimethylsulfoxide인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 제2용매는 아세톤인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 제3용매는 알코올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 골형성 촉진물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 틸루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트, 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF), 토브라마이신, 젠타마이신 및 반코마이신으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자의 평균분자량은 70,000~80,000 g/mol인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 골형성 촉진물질을 함유하는 용액의 농도는 0.01~100 mg/mL인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 골형성 촉진용 스캐폴드를 함유하는 골 조직 재생용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 알지네이트, 하이드록시아파타이트 및 CMC로 구성된 군서 선택되는 물질을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 골 조직 재생용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 골형성 촉진물질이 고정 및 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 3D 프린팅 기술로 포어사이즈 40~130 μm 의 지지체 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 지지체 시트가 머지되도록 성형되어 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드에 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뼈(bone)는 척추동물의 대표적인 특징으로, 생체 내에서는 살아있는 조직 중 하나이다. 상기 뼈는 장기를 보호 할 뿐 아니라 몸 전체 각 조직에 필요한 영양분과 노폐물을 운반하는 혈액세포를 생성하는 조혈작용을 하며, 칼슘 및 미네랄(mineral)을 축적하는 등 매우 다양한 역할을 한다.
- [0003] 상기 뼈를 구성하는 세포로는 뼈의 항상성을 유지하는 골세포(osteocyte), 뼈를 형성하는 골모세포(osteoblast), 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclast) 및 뼈의 말단의 관절 기능을 담당하는 연골세포(chondrocyte) 등이 있다. 뼈의 성장기에는 골모세포가 뼈를 활발하게 형성하고, 성장기 이후에는 골 형성과 골 흡수가 반복(remodeling)된다.
- [0004] 상기 골형성과 골 흡수의 균형이 깨뜨려져 어느 한쪽으로 치우친다면 골 질환을 일으키게 되는데, 이는 심각한 증상을 유발하여 심하면 난치성으로 이를 수 있다. 난치성 골 질환에는 골다공증 및 당뇨병에 의해 부러진 뼈가 붙지 않는 불유합(non-union) 골절, 선천적인 골 결함으로 인한 골 형성 부전증, 골 기질에 무기질의 침착이 부족하여 생기는 골연화증(Osteomalacia), 그리고 골종양 및 사고로 인한 골 결손 등이 있다.
- [0005] 이러한 골 결손에 대한 전통적인 치료방법으로 제안되는 자가골 이식(autografting), 동종골 이식(allografting) 및 인조골 이식(artificial bone grafting)의 경우에도 문제점이 제기되고 있다. 자가골 이식은 골 채취 부위의 감염, 통증 또는 혈종과 같은 합병증의 문제를 갖는다. 동종골 이식은 공여자로부터의 질병 전염 가능성의 문제를 갖고, 골유합 및 골 형성 효과가 저조한 단점을 갖는다. 인조골 이식은 근본적인 골 생성이 되지 않아, 뼈 재생시간이 오래 걸리며, 주변의 기존 뼈 조직과의 융합이 잘 되지 않는다는 문제점이 있다.
- [0006] 최근 전통적인 치료방법에 대한 대안으로 제안된 치료방법은 상처 부위에 골유도성 단백질(osteoinductive protein)이 주입된 생분해성 담체를 이식하는 방법이다. 상기 골 재생 또는 골 형성을 유도할 수 있는 단백질인 골유도성 단백질은 생체 내 짧은 활동기간을 갖기 때문에, 치료 효과를 달성하기 위해서 다량의 재조합 단백질의 투여가 요구된다. 따라서, 상기 치료법은 상기 재조합 단백질의 과다한 투여에 의한 부작용 등의 안전성 문제가 제기될 뿐만 아니라, 치료 효과를 보장할 수 없다는 단점이 있다.
- [0007] 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 최근에는 콜라겐이나 인산칼슘으로 구성된 다공성 지지체에 골유도성단백질들을 부착하여 골 결손부위에 이식하는 방법들이 개발되고 있으나(Toker, H. *et al.*, *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 114: S146,2012; US 2012/0142641), 지지체의 강도나 골 형성 촉진물질이 골 결손부위에서 지속적으로 방출되는 효과가 부족하여 일시적인 효과만을 나타내고 있는 실정이다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 골형성 촉진물질을 지속적으로 방출하여 지속적인 골 형성유도 효과를 나타내는 골형성 촉진물질이 탑재된 지지체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 폴리카프로락톤(polycaprolactone)에 알렌드로네이트를 고정 및 탑재시킨 스캐폴드를 사용하는 경우, 알렌드로네이트의 지속적인 방출능을 나타내어, 조골세포의 칼슘 침착능 및 골 결손 마우스에서 골 융합능이 향상되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 골형성 촉진물질을 지속적으로 서서히 방출하는 골형성 촉진물질이 스캐폴드를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 골형성 촉진물질을 지속적으로 서서히 방출하는 골형성 촉진물질이 탑재된 스캐폴드의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3D 프린팅 기술로 포어사이즈 40~130 μm 의 지지체의 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 지지체 시트가 가 머지되도록 성형되어 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드에 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 3D 프린팅 기술로 포어사이즈 40~130 μm 의 지지체의 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 지지체 시트가 머지되도록 형성된 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계; (b) 형성 촉진물질을 제1용매에 용해시키는 단계; (c) 상기 골형성 촉진물질이 용해된 용액에 상기 생체적합성 고분자 스캐폴드와 제2용매를 첨가하여 혼합하는 단계; 및 (d) (c) 단계에서 수득된 혼합물을 제3용매에 적하하여 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드를 제조하는 단계를 포함하는 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 골형성 촉진용 스캐폴드를 함유하는 골 조직 재생을 위한 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 생체적합성 고분자 스캐폴드의 치밀한 기공구조로 인하여, 골형성 촉진물질이 장기간 지속적으로 방출가능하며, 스캐폴드에 함입되는 조골세포가 빠져나가지 않아, 골 결손부위에서 지속적인 골형성이 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1는 PCL 스캐폴드와 알렌드로네이트가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드의 주사전자현미경 사진으로, 각각 (a) PCL, (b) Aln(1 mg)/PCL, (c) Aln(5 mg)/PCL의 표면에 대한 주사전자현미경 사진이며, (d)는 Aln/PCL 스캐폴드의 포어사이즈를 나타낸 그림이다.

도 2는 PCL 스캐폴드와 알렌드로네이트가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드의 열 중량 분석기를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 PCL 스캐폴드와 Alendronate가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드로부터 알렌드로네이트의 약물방출거동을 나타낸 것이다.

도 4는 PCL 스캐폴드와 Alendronate가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포독성 결과를 24, 48시간으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 PCL 스캐폴드와 Alendronate가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드에서 조골세포를 3일, 7일, 10일 배양 한 후의 알칼리성 포스파타아제 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 Alendronate가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드에서 조골세포를 21일 동안 배양한 후 칼슘 침착결과를 나타낸 것이다.

도 7은 Alendronate가 함유된 Aln/PCL 스캐폴드의 골 형성능을 알아보기 위하여, 쥐 경골의 결손 부분에 이식된 스캐폴드에 대하여, x-ray 분석(a) 및 조직학적 형태분석(b)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 3D 프린팅 기술로 포어사이즈 40~130 μm 의 지지체 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 지지체 시트가 머지되도록 성형된 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스

스캐폴드에 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드에 관한 것이다.

- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 스캐폴드에 고정 및 탑재될 수 있는 골형성 촉진물질로는 비스포스네이트 계열의 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 틸루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이바드로네이트 등일 수 있으며, 골성장 유도인자인 골유도단백질(BMP), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 등일 수 있으며, 골형성 유도 후에 발생할 수 있는 세균의 부착 및 감염을 방지하기 위한 항생제인 토브라마이신, 젠타마이신, 반코마이신 등일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 골형성 촉진물질을 함유하는 용액의 농도는 0.01~100 mg/mL인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일양태에서 골형성 촉진물질로서 사용한 알렌드로네이트는 아미노-비스포스토네이트계 약물로, 파골세포를 억제시켜 골다공증 예방과 치료 효과가 있으며, 조골세포 표면의 RANKL을 감소시켜 파골세포의 형성을 억제시키고, 조골세포의 증식과 분화를 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리엔하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 생체적합성 고분자 스캐폴드는 환자의 골결손부위에 따라 다른 모양의 환자맞춤형 형태로 제작이 가능하며, 골형성인자 및 약물탑재가 용이하다.
- [0022] 본 발명의 일양태에서, 폴리카프로락톤 스캐폴드는 3D 프린팅 기술로 포어사이즈 40~130 μm 의 지지체 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 지지체 시트가 머지되도록 성형되어 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 폴리카프로락톤 스캐폴드이며(도 1(d)), 본 발명의 스캐폴드의 이러한 구조는 부착되는 세포들이 스캐폴드에서 빠져나가지 못하게 고정하며, 이미 고정되어 있는 골 형성 촉진물질이 장기간에 걸쳐 지속적으로 방출되는 능력(서방성)을 향상시키는 역할을 한다.
- [0023] 기존의 3D printing 기법으로 제작한 스캐폴드의 경우 pore size가 크면 cell이 부착이 어렵고 pore 사이로 다 빠져나가는 단점이 있으며, 폴리카프로락톤이 가지는 소수성으로 인하여 세포에 대한 부착능이 떨어졌었으나, 본 발명의 방법으로 제작한 폴리카프로락톤 스캐폴드의 경우는 20~70 μm 의 작은 포어사이즈로 인하여, 세포가 스캐폴드 사이로 빠져나가지 않고 부착되어 골재생에 효과적이다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 폴리카프로락톤의 평균분자량은 70,000~80,000 g/mol인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 골형성 촉진용 스캐폴드에 고정되는 골형성 촉진물질은 0.01~100 mg/mL의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 다른 관점에서, 본 발명은 포어사이즈 40~130 μm 의 생체적합성 고분자 시트와 포어사이즈 100~200 μm 의 생체적합성 고분자 시트가 머지되도록 성형되어 최종적으로 포어사이즈 20~70 μm 를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계; (b) 형성 촉진물질을 제1용매에 용해시키는 단계; (c) 상기 골형성 촉진물질이 용해된 용액에 상기 생체적합성 고분자 스캐폴드와 제2용매를 첨가하여 혼합하는 단계; 및 (d) (c) 단계에서 수득된 혼합물을 제3용매에 적하하여 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드를 제조하는 단계를 포함하는 골형성 촉진물질이 고정 또는 탑재되어 있는 골형성 촉진용 스캐폴드의 제조방법에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 제1용매는 Dimethylsulfoxide인 것을 특징으로 할 수 있으며, 제2용매는 아세톤인 것을 특징으로 할 수 있으며, 제3용매는 알코올인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 골형성 촉진물질을 함유하는 용액의 농도는 0.01~100 mg/mL인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리엔하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤

의 공중합체, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 양태에서는, 알렌드로네이트를 함유하는 폴리카프로락톤 스캐폴드는 Alendronate를 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 하루 동안 용해시키고, 상기 용액에 PCL을 첨가하고, 아세톤을 더하여 60℃에서 교반하며 용해시켰다. 용해된 혼합액을 50℃로 설정된 히팅블럭 위에서 예열한 뒤 래피드 프로토타이핑(rapid prototyping) 장비 용 주사기에 PCL 용액을 주입하고, 상기 주사기에 플런저를 넣고 주사기 안의 공기를 빼준 뒤 25G 니들을 주사기에 장착하였다. 상기 주사기를 어답터 어셈블리 주사기에 연결시키고, 오토메틱 디펜서(Model : AD 3000C, IWASHITA, 일본)에 있는 에어 프레서를 작동시켜서 PCL 용액이 잘 나오는지 확인하고 PCL 용액이 들어있는 주사기를 히팅 블럭에 고정시켜 준 뒤 본체 부분에 100% 알코올이 들어있는 15 x 4cm 디쉬를 올렸다. RP 기기의 공기압을 55 Kpa로 설정하고, 속도는 5 mm/sec 로 설정한 후, RP 기기를 작동시켜 Aln/PCL 스캐폴드를 제작하였다.

[0030] 또 다른 관점에서, 본 발명은 골형성 촉진용 스캐폴드를 함유하는 골 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 상기 조성물은 알지네이트, 하이드록시아파타이트 및 CMC로 구성된 군에서 선택되는 물질을 추가로 함유할 수 있다.

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] 이하, 실시예에서는 생체적합성 고분자 스캐폴드로 폴리카프로락톤을 사용하였으나, 실시예의 방법으로 형성된 포어사이즈 20~70 μm를 가지는 생체적합성 고분자 스캐폴드라면 고분자 스캐폴드의 치밀한 기공구조로 인하여, 골형성 촉진물질이 장기간 지속적으로 방출가능하여, 스캐폴드에 함입되는 조골세포가 빠져나가지 않아, 골 결손부위에서 지속적인 골형성이 가능하게 할 수 있을 것이라는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034] 실시예 1: 알렌드로네이트가 고정 또는 탑재된 폴리카프로락톤(PCL) 스캐폴드의 제조

[0035] 골 손실 억제제인 bisphosphonate의 일종이고 골 형성을 돕는 알렌드로네이트(alendronate, Aln, 삼진제약, 한국)를 생분해성 합성 고분자인 polycaprolactone (PCL)에 함입시켜 Aln/PCL 스캐폴드를 제작하였다. 먼저 Alendronate 각각 1mg 및 5 mg을 Dimethyl sulfoxide 10 ml에 하루 동안 용해시켰다. 그 후, 상기 용액에 PCL 4g을 첨가하고, 아세톤 10ml을 더하여 60℃에서 500RPM으로 교반하며 용해시켰다. 용해된 혼합액을 50℃로 설정된 히팅블럭 위에서 예열한 뒤 RP 장비 용 주사기에 PCL 용액을 주입하고, 상기 주사기에 플런저를 넣고 주사기 안의 공기를 빼준 뒤 25G 니들을 주사기에 장착하였다.

[0036] 상기 주사기를 어답터 어셈블리 주사기에 연결시키고, 오토메틱 디펜서(Model : AD 3000C, IWASHITA, 일본)에 있는 에어 프레서를 작동시켜서 PCL 용액이 잘 나오는지 확인하고 PCL 용액이 들어있는 주사기를 히팅 블럭에 고정시켜 준 뒤 본체 부분에 100% 알코올 200ml이 들어있는 15 x 4cm 디쉬를 올렸다. RP 기기의 공기압을 55 Kpa로 설정하고, 속도는 5 mm/sec 로 설정한 후, 래피드 프로토타이핑(rapid prototyping) 기기를 작동시켜 Aln/PCL 스캐폴드를 제작하였다.

[0037] 알렌드로네이트를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 PCL 스캐폴드를 제작하였다.

[0038] 실시예 2: PCL 스캐폴드와 Aln/PCL 스캐폴드의 표면 분석

[0039] 실시예 1에서 제작된 PCL 스캐폴드와 Alendronate가 농도 별로 함유 된 Aln/PCL 스캐폴드를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, PCL 스캐폴드와 Aln/PCL 스캐폴드는 모두 비슷한 표면 형상이 나타내었다.

[0040] PCL 스캐폴드와 Alendronate가 농도 별로 함유 된 PCL 스캐폴드를 열 중량 분석기를 이용해 표면 분석하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PCL 스캐폴드와 비교하여 Aln(1 mg)/PCL 스캐폴드에서 Alendronate가 성공

적으로 함유가 되었음을 확인하였다.

[0041] 실시예 3: Aln/PCL 스캐폴드의 약물 방출 거동 분석

[0042] 실시예 1에서 제작된 Aln/PCL 스캐폴드로 부터 알렌드로네이트의 방출 거동을 분석하기 위하여, 각 Aln/PCL 스캐폴드를 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고 37℃에서 100 rpm으로 교반하였다. 각각 1시간, 3시간, 6시간, 10시간 및 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일, 28일에 새로운 버퍼를 교환해주며 방출된 알렌드로네이트의 함량을 측정하였다. 방출된 알렌드로네이트는 적외선 및 가시광선 분광분석기(DU-530, Beckman Coulter™, USA)를 이용하여 293nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0043] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, Aln/PCL 스캐폴드로부터 알렌드로네이트는 초기 1일 동안에 약간 빠르게 방출되었으나, 그 이후로는 4주 동안 지속적으로 방출이 되는 것으로 확인되었다.

[0044] 실시예 4: Aln/PCL 스캐폴드의 세포독성 평가

[0045] 실시예 1에서 제작된 Aln/PCL 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해, 각각의 스캐폴드를 세포 배양액에 넣고 37℃에서 24시간 배양하여 추출배양액을 얻었다.

[0046] 한편, 조골세포인 MG63세포(한국세포주은행(KCLB 21427)) 1 × 10⁴ 개를 96-well 플레이트에 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다.

[0047] 배양된 조골세포의 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 세척한 후, 추출배양액을 첨가한 후 조골세포를 24시간, 48시간 배양한 후, 추출배양액을 제거하였다. 세포독성은 CCK-8 증식 키트 시약을 첨가하여 37℃에서 1시간을 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0048] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, PCL 스캐폴드와 Aln/PCL 스캐폴드 모두 48시간 배양 후에도 90%이상의 세포 생존율을 보여주었으며, 이 결과는 PCL 스캐폴드와 Aln/PCL 스캐폴드 모두 조골세포에 대한 세포독성이 없음을 의미한다.

[0049] 실시예 5: Aln/PCL 스캐폴드의 알칼리성 포스파타제 활성도

[0050] Aln/PCL 스캐폴드의 골융합 효능을 조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도를 측정하여 평가하였다.

[0051] 1 × 10⁵ 개의 MG63세포(한국세포주은행(KCLB) 21427)를 각각의 스캐폴드 위에 조심스럽게 넣고, 각각 3일, 7일 및 10일간 배양하고, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, 1×RIPA 버퍼를 세포에 넣어 0℃에서 110와트로 1분 동안 초음파처리하였다. 용해된 세포를 4℃에서 3분 동안 13,500 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 p-니트로페닐포스파테이트 용액과 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 500 μl의 1 N NaOH로 반응을 종결시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0052] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군인 PCL 스캐폴드처리 군에서는 조골세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도에 비하여, Aln/PCL 스캐폴드 처리 군에서는 현저하게 높은 알칼리성 포스파타제 활성도를 나타내었다.

[0053] 실시예 6: Aln/PCL 스캐폴드의 칼슘 침착확인

[0054] Aln/PCL 스캐폴드의 골융합 효능을 조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘침착을 측정 분석하여 측정하였다.

[0055] 1 × 10⁵ 개의 조골세포를 각각의 PCL 스캐폴드와 Alendronate가 농도 별로 함유된 PCL 스캐폴드 위에 조심스럽게 넣고 21일 동안 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 각각의 PCL 스캐폴드와 알렌드로네이트가 농도별로 함유된 PCL 스캐폴드로부터 세포를 조심스럽게 떼어내었다.

[0056] 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리한 뒤, 0.1% 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣었다. 세포의 막을 분쇄시키기 위해 0℃에서 약 1분 동안 초음파처리를 한 후, 원심분리하고, 상층액을 분리하여 QuantiChrom™

Calcium Assay 키트를 이용하여 612nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였다.

[0057] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, PCL 스캐폴드와 Aln(1 mg)/PCL 스캐폴드 보다는 알렌드로네이트가 더 많이 함유된 Aln(5 mg)/PCL 스캐폴드에서 현저하게 높은 칼슘 침착 정도를 나타내었다.

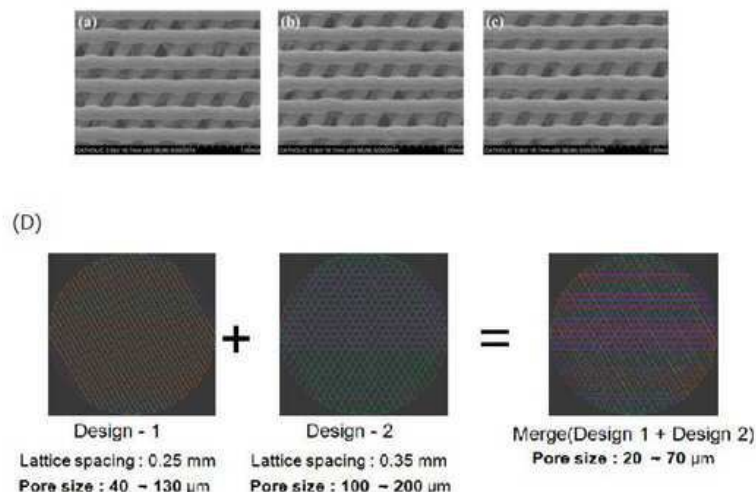
[0058] **실시예 6: Aln/PCL 스캐폴드를 처리한 마우스 골결손부위의 조직학 및 조직형태학적 분석**

[0059] 쥐 경골(tibia)에 8 mm 골 결손(bone defect) 부분에 이식된 각각의 스캐폴드를 X-ray 촬영 후, 각 시료의 절반을 조직학 및 조직형태학적 분석을 위해 처리하였다. 각 조직은 10% buffered formaldehyde에 고정하였으며, 10% formic acid로 탈회하였다. 시상봉합에 직각으로 골 결손부의 적도를 포함하여 양 부위를 trimming 한 후 파라핀에 포매 하였다. 블록을 6 μ m 두께로 절단한 후 hematoxylin and eosin (H&E) 과 Masson' s trichrome (MT) 염색을 하였다. 조직학적 소견상 Alendronate가 함유된 PCL 스캐폴드 군의 경우, 4주로 갈수록 골 형성이 빨리 진행되었고, 수술 후 회복과 골 재생이 잘되는 양상이 관찰되었다. PCL 스캐폴드 군과 Alendronate가 함유된 PCL 스캐폴드군 모두 아직 스캐폴드가 잔존함이 관찰되었다 (도 7). 골 형성양이 4주차에서 Alendronate가 함유된 PCL 스캐폴드가 PCL 스캐폴드에 비해 높은 수치를 보였다.(도 8) 따라서 상기 실험예에 나타난 바와 같이 PCL 스캐폴드에 Alendronate를 함유하여 골 형성 촉진물질을 고정화시킨 스캐폴드인 Aln(1 mg)/PCL 스캐폴드와 Aln(5 mg)/PCL 스캐폴드가 골 융합 및 골 형성 효능에도 우수한 효과를 가지는 것으로 나타났다.

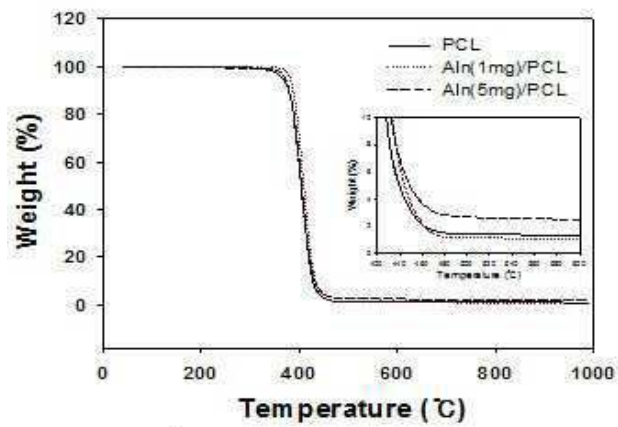
[0060] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

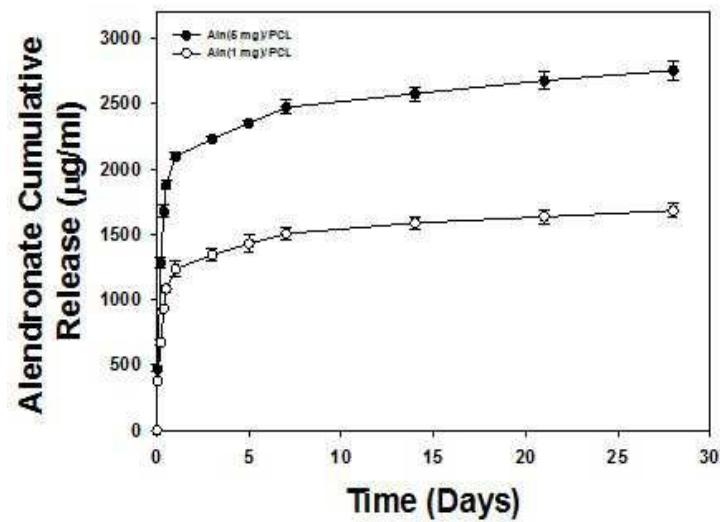
도면1



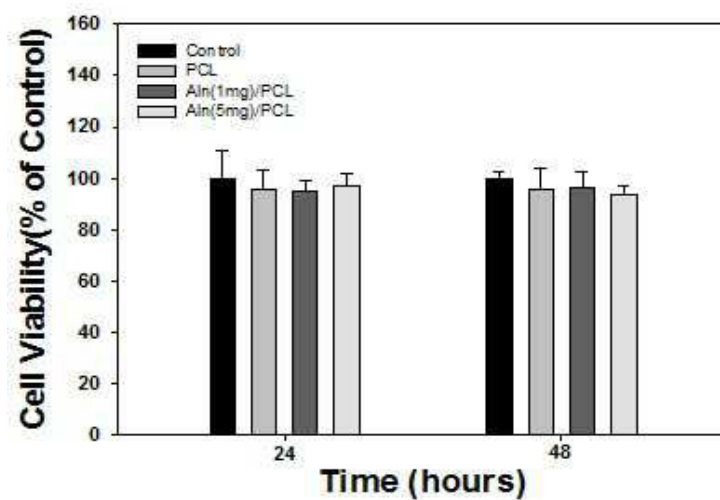
도면2



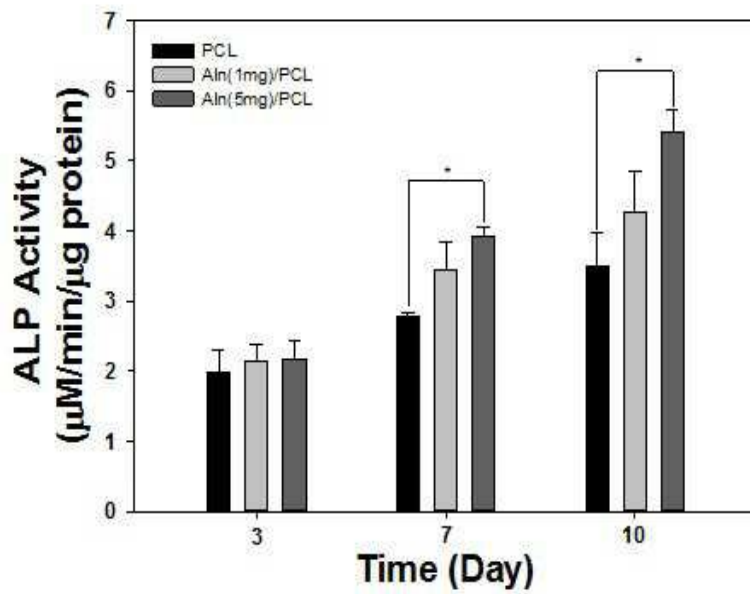
도면3



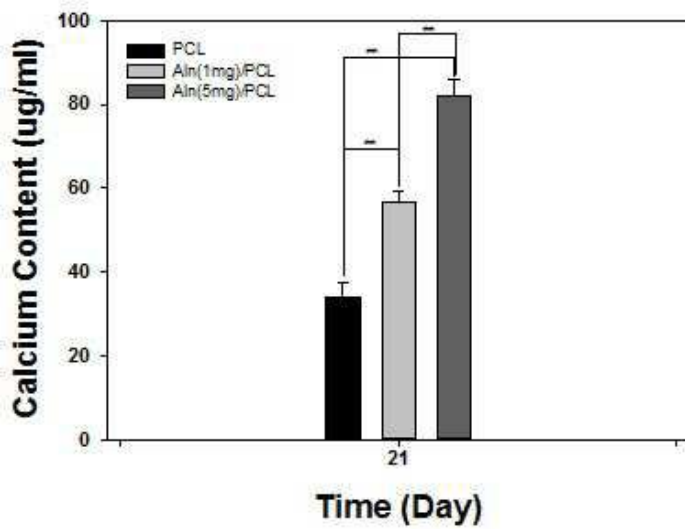
도면4



도면5



도면6



도면7

