



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0103389
 (43) 공개일자 2014년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01)
 A61L 27/10 (2006.01) A61L 27/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0016486
 (22) 출원일자 2013년02월15일
 심사청구일자 없음

(71) 출원인
단국대학교 산학협력단
 경기 용인시 수지구 죽전로 152, 내 (죽전동, 단국대학교)
 (72) 발명자
김해원
 충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트)
김중현
 서울시 서초구 우면동 104동 302호
 (74) 대리인
손민

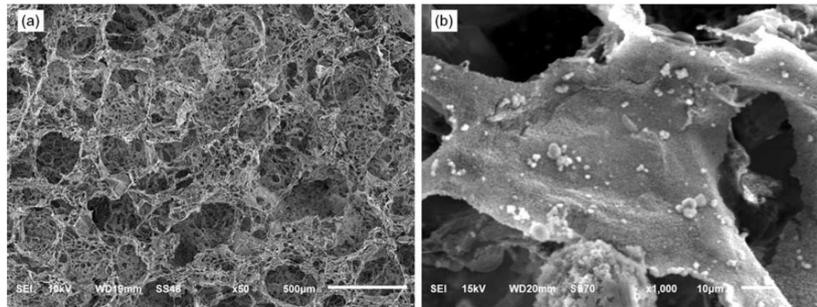
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **골 재생용 고분자 스캐폴드**

(57) 요약

본 발명은 VEGF를 담지한 골 재생용 고분자 스캐폴드에 있어서, 상기 스캐폴드는 인산칼슘계 세라믹으로 표면이 미네랄화되고, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)와 결합하고 있는 골 재생용 고분자 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090093829

부처명 교육과학기술부

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)를 담지한 고분자 스캐폴드에 있어서, 상기 스캐폴드는 인산칼슘계 세라믹으로 표면이 미네랄화되고, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)와 결합하고 있는 골 재생용 고분자 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고분자는 폴리(글리콜산), 폴리(락트산), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산), 폴리(L-락타이드-co-D, L-락타이드), 폴리(히드록시부티레이트), 폴리(히드록시발러레이트), 폴리(발레로락톤), 폴리(카프로락톤), 폴리디옥사논, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 골 재생용 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인산칼슘계 세라믹은 모노칼슘 포스페이트, 디칼슘 포스페이트, 트리칼슘 포스페이트, 테트라칼슘 포스페이트, 하이드록시 아파타이트 또는 이들의 조합인 것인 골 재생용 스캐폴드.

청구항 4

- 1) 생체 적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계;
- 2) 상기 스캐폴드의 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화 하는 단계; 및
- 3) 미네랄화된 스캐폴드에 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)를 담지시키는 단계를 포함하는 골 재생용 스캐폴드의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단계 2)는 상기 스캐폴드를 칼슘 및 인산염의 이온 용액 중에 침지시켜 미네랄 핵을 형성 및 성장시키는 것으로 수행하는 것인 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 미네랄 핵의 형성은 1℃ 내지 10℃에서 촉진시키는 것이고, 미네랄 핵의 성장은 온도를 35℃ 내지 40℃까지 증가시켜 유도하는 것인 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 침지시간은 12시간 내지 36시간인 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 단계 3)은 미네랄화된 스캐폴드를 VEGF를 포함하는 용액 중에 침지시키는 것인 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인산칼슘계 세라믹으로 표면이 미네랄화되고, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)와 결합하고 있는, 골 재생용 고분자 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 골 조직은 인체의 골격을 유지시키는 중요 조직으로 골 조직 재생을 위해서 다양한 재료와 형태의 골 조직 대체용, 재생용 골 이식재가 연구 개발되고 있다. 골 이식재의 경우 골 치유기전에 따라 골 형성 재료, 골 전도성 재료, 골 유도성 재료로 분류할 수 있으며, 골 이식(transplataion)이나 매식(implantation)에 사용되는 이식재에 따라 자가이식, 동종이식, 타종이식 등의 방법을 주로 사용하고 있다. 이중 면역반응을 최소화할 수 있는 방법은 자가이식으로서, 자가골을 이용하여 골 손상부위에 이식을 할 경우 면역반응이 최소화되어 안정적인 골 조직 재생이 가능한 장점이 있다. 그러나, 자가골의 채취로 인한 다른 부위의 2차 골 손실과 회복기간 등의 불편을 가지고 있으며 양이 매우 한정되어 있다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 다른 사람의 골을 사용하는 타종이식이 있으나, 이는 자가골과 달리 많은 면역반응을 일으키고, 가격도 매우 비싸다는 단점이 있다. 따라서, 면역반응을 최소화하면서 많은 사람들에게 이용되기 위해 합성골을 제조하여 이식하고자 하는 골 조직 공학 연구가 많이 진행되고 있다.

[0003] 골 조직 공학에 적용하기 위한 스캐폴드는 숙주 조직의 최적화된 조직 형성을 위해 핵심적인 몇 가지 조건을 만족해야 한다. 이 조건은 세포 친화력, 영양분과 산소가 투과하기 위한 적절한 공극률, 세포 부착 및 분화를 촉진시키기 위한 계면 활성 등을 포함한다. 또한, 이상적으로 스캐폴드는 연속적으로 분해되어 숙주 세포에 의해 대체되어야 한다. 콜라겐과 같은 세포외 기질(ECM) 분자가 적절한 스캐폴드 재료이다. 그러나, 폴리락트산(PLA), 폴리카프로락톤(PCL) 및 이의 공중합체와 같은 합성 분해성 플라스틱은 자연발생 물질에 비하여 정확한 가공이 가능하고, 보다 경제적이어서 임상적으로 널리 사용할 수 있다는 장점이 있다.

[0004] 그러나, 합성 생체 고분자는 낮은 골 생체활성, 높은 소수성, 생체 단백질 및 세포에 대한 낮은 친화력을 가지기 때문에, 합성 생체고분자 스캐폴드는 골 조직 공학에 적합하도록 최적화될 필요가 있다. 성장인자와 같은 치료적인 분자를 로딩하고 전달하는 능력을 가진 스캐폴드를 설계하는 것은 조직 재생 능력을 강화시킨다. 이러한 목적을 위하여, 스캐폴드 표면 또는 이들의 내부에 성장 인자를 흡착/결합시키는 것을 수반하는 많은 방법이 개발되어 왔다(Ziegler J et al., *J Biomed Mater Res*, 2002, 59, 422-428; King WJ et al., *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64, 1239-1256; Yun YR et al., *J Tissue Eng*, 2010, 1, 218142; Wenk E et al., *Biomaterials*, 2009, 30, 2571-2581).

[0005] 일반적으로, 표면에 흡착된 성장인자는 약한 정전기적 상호작용으로 인하여 상당한 초기 버스트(burst) 효과를 나타낸다. 반면, 성장인자가 스캐폴드의 내부에 결합되는 경우, 이들은 더욱 잘 고정될 수 있고 더욱 우수한 서방형 방출을 나타낼 수 있다. pH, 용매 종류, 온도 및 이온 강도를 포함하는 스캐폴딩 조건은 성장인자의 결합에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Fransson J et al., *I. Pharm Res*, 1997, 14, 606-612; van de Weert M et al., *Pharm Res*, 2000, 17, 1159-1167). 이와 같이 스캐폴드 내 성장인자의 로딩에 관한 문제점과 함께, 전달 방식이 최적의 생물학적 기능을 얻기 위하여 특히 중요하다.

[0006] 이러한 배경하에 본 발명자들은, 고분자 스캐폴드의 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화하고, 상기 인산칼슘계 세라믹에 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)를 연결시키는 경우, VEGF를 스캐폴드에 고용량으로 강하게 결합시킬 수 있는 동시에 장기 지속 방출을 제공하여, 골 형성 및 재생을 효과적으로 유도할 수 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 VEGF를 담지한 골 재생용 고분자 스캐폴드에 있어서, 상기 스캐폴드는 인산칼슘계 세라믹으로 표면이 미네랄화되고, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)와 결합하고 있는 골 재생용 고분자 스캐폴드를 제공하기 위한 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명은 1) 생체 적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계; 2) 상기 스캐폴드의 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화 하는 단계; 및 3) 미네랄화된 스캐폴드에 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)를 담지시키는 단계를 포함하는 VEGF 서방출성 골 재생용 스캐폴드의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)를 담지한 고분자 스캐폴드에 있어서, 상기 스캐폴드는 인산칼슘계 세라믹으로 표면이 미네랄화되고, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor)와 결합하고 있는 골 재생용 고분자 스캐폴드를 제공한다.
- [0010] 본 발명에서 사용된 용어 '스캐폴드'는, 생체내에서 손상된 장기나 조직의 일부를 대체하며 이들의 기능을 보완 또는 대신할 수 있는 물질을 의미하며, 구체적으로 상기 고분자 스캐폴드는 스캐폴드가 기능과 역할을 충분히 수행할 때까지 유지된 후 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있는 생분해성 고분자 소재가 바람직하다.
- [0011] 상기 고분자 스캐폴드는 PGA 단사를 이용한 부직포, 가열과 생분해성 코팅을 이용한 PGA 부직포 결합, 염 석출법(Particulate leaching), 용액 캐스팅법(Solution casting), 분사 캐스팅법(Spray casting), 용융 압축 몰딩법(Melt and compression molding), 멤브레닝 적층법(Membrane lamination), 겔 캐스팅법(Gel casting), 고압 가스 팽창법(High pressure gas saturation), 상분리법(Phase separation), 고분자 블렌드법(Polymer blending), 유화동결건조법(Emulsion freeze drying) 등 다양한 방법으로 제조할 수 있으며, 이에 한정하지 않는다. 제조된 고분자 스캐폴드는 조절된 크기와 배열의 기공을 가진 3차원 구조를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0012]
- [0013] 상기 생분해성 고분자로는 폴리(글리콜산), 폴리(락트산), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산), 폴리(L-락타이드-co-D, L-락타이드), 폴리(히드록시부티레이트), 폴리(히드록시발러레이트), 폴리(발레로락톤), 폴리(카프로락톤), 폴리디옥사논, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 폴리(락트산)일 수 있다.
- [0014] 구체적인 일 실시예에서, 스캐폴드는 폴리락트산을 이용한 용매 캐스팅법 및 염-용출(salt leaching)법으로 성형하였으며, 제조된 스캐폴드는 스캐폴드를 관통하는 구멍이 잘 발달된 다공성 물폴로지를 가지는 것을 확인하였다(도 1의 (a)).
- [0015] 본 발명의 고분자 스캐폴드는 그 표면이 생체적합성 무기물인 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화됨으로써, 우수한 생체적합성, 세포적합성, VEGF 로딩 용량의 증가 및 장기 지속 방출성을 갖도록 개질된다. 그 결과, 세포의 부착 및 증식이 촉진되어 골 조직의 재생을 효과적으로 도모할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 사용된 용어 '인산칼슘계 세라믹'은, 분말형 고체상의 인산칼슘 화합물 또는 칼슘 및/또는 인산염 화합물의 혼합물로 구성되는 세라믹을 의미하는 것으로, 칼슘과 인의 비율에 따라 다양하게 나뉠 수 있다. 상기 인산칼슘계 세라믹은 산소와 반응하여 화학적으로 안정하게 변한 세라믹으로서 생체불활성으로 체내에서 생화학적 반응이 없기 때문에 골조직의 손상부위 대체로서 유용하게 사용될 수 있는 장점이 있다.

- [0017] 이러한 인산칼슘계 세라믹은 이 분야에서 공지된 인산칼슘계 무기물일 수 있다. 예시적으로 모노칼슘 포스페이트, 디칼슘 포스페이트, 트리칼슘 포스페이트, 테트라칼슘 포스페이트, 하이드록시 아파타이트 등일 수 있다. 인산칼슘계 세라믹의 종류는 표면 개질시 칼슘 이온 및 인산 이온의 농도, 처리조건 또는 처리시간을 조절하여 적절하게 결정할 수 있다.
- [0018] 바람직하게 본 발명의 고분자 스캐폴드는 하이드록시아파타이트로 미네랄화된다. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 구조를 갖는 하이드록시아파타이트의 Ca/P 몰비는 1.67으로 인체의 뼈와 가장 유사한 화학구조를 가지고 있다. 따라서, 하이드록시아파타이트 세라믹으로 인체 내 이식되는 고분자 스캐폴드를 미네랄화하여 표면 개질하는 경우, 이식 주위의 뼈나 조직과의 접착력 및 안정성이 우수한 이점이 있다.
- [0019] 생체재료로서 사용되는 고분자는 다양한 형태로 제작이 용이하나, 생체 불활성이거나, 생체 활성이 적은 제한적인 단점이 있다. 이에, 본 발명에 따른 고분자 스캐폴드는 그 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화하는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 상기 미네랄화는 고분자 스캐폴드의 구조를 손상시키지 않으면서, 인산칼슘계 세라믹으로 표면을 코팅하여 고분자의 표면에 세포가 잘 부착할 수 있도록 개질하는 것을 의미하며, 구체적으로는 고분자 스캐폴드 표면에 인산칼슘계 세라믹을 부착하거나 침투하도록 하는 즉, 포함하는 개념을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0021] 상기 인산칼슘계 세라믹은 조직세포의 유착과 증식이 잘 일어나고 분화된 세포의 기능이 보전되며, 체내 이식 후에도 주위 조직과 잘 융화되어 염증 반응을 유발하지 않는 생체적합성 인산칼슘계 무기물이 형성되도록 한다. 또한, 상기 인산칼슘계 세라믹은 VEGF와 결합하여 VEGF의 로딩율을 높이고, 방출양상을 서방화하여 장기 지속 방출이 가능하도록 한다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 'VEGF (Vascularendothelial growth factor)'는, 혈관내피생장인자라고도 불리며 배양하수체 folliculo-stellate 세포 상층액에서 혈관내피세포에 대한 성장활성을 지표로 하여 분리되는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 VEGF는 대식세포, 평활근세포, 종양세포 등 여러 세포에서 생산되며, 강력한 EC 미토젠으로서, 골 형성(osteogenesis)와 혈관신생(angiogenesis)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3249-3255). 또한 VEGF의 국소 전달은 neovascularization에 이어서, 골 턴오버(bone turnover), 조골세포 이동(osteoblast migration)과 미네랄화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611).
- [0023] 상기 VEGF는 본 발명에 따른 고분자 스캐폴드에 담지되어 있으며, 특히 인산칼슘계 세라믹과 결합되어 있는 것을 특징으로 한다. 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화된 표면은 VEGF와의 결합에 있어서 매우 높은 친화성을 나타내며, 특히 이들 결합은 주로 많은 칼슘과 인 이온의 이온성 잔기에 의한 강력한 많은 이온 결합 자리와 VEGF가 연결되는 것에 의한다.
- [0024] 구체적인 일 실시예에서, CaP로 표면 미네랄화된 고분자 스캐폴드에 VEGF를 로딩시켜 VEGF 방출양상을 확인한 결과 약 한달 가량 지속적으로 VEGF가 방출되는 것을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0025] 또한, 구체적인 다른 실시예에서, CaP로 표면 미네랄화한 고분자 스캐폴드와 별도의 처리를 하지 않은 고분자 스캐폴드의 세포 증식 수준을 확인한 결과, 7일째 현저하게 세포 증식이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0026] 한편, 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 1) 생체 적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계; 2) 상기 스캐폴드의 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화 하는 단계; 및 3) 미네랄화된 스캐폴드에 VEGF

(Vascularendothelial Growth Factor)를 담지시키는 단계를 포함하는, 골 재생용 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

- [0027] 상기 1) 단계는 생체 적합성 고분자 스캐폴드를 제조하는 단계이다. 이때 사용되는 고분자 소재로는 상기에서 설명한 바와 같으며, 바람직하게는 폴리락트산을 사용할 수 있다. 제조된 고분자 스캐폴드는 조절된 크기와 배열의 기공을 가진 3차원 구조를 가진다.
- [0028] 상기 2) 단계는 스캐폴드 표면을 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화하는 단계이다. 상기 미네랄화에 의해 스캐폴드의 표면이 개질됨으로써, 스캐폴드의 생리활성이 더욱 증가하며, 나아가 VEGF와 같은 생리활성물질과 결합하여 보다 높은 로딩률을 가질 수 있도록 하며 지속적인 제어방출을 가능하도록 한다.
- [0029] 상기 미네랄화는 스캐폴드를 칼슘 및 인산염의 이온 용액 중에 침지시켜 미네랄 핵을 형성 및 성장시키는 것으로 이루어진다.
- [0030] 상기 칼슘 및 인산염의 이온 용액은 스캐폴드를 미네랄화시킬 목적으로 사용하는 미네랄화 용액으로서, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} 를 포함하는 유사체액을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 CaCl_2 및 NaHPO_4 용액을 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 미네랄 핵의 형성은 1 내지 10℃에서 촉진시키고, 미네랄 핵의 성장은 온도를 35 내지 40℃까지 증가시켜 유도할 수 있다. 바람직하게, 미네랄 핵의 형성은 4℃에서 촉진시킬 수 있으며, 핵의 성장은 37℃에서 유도할 수 있다. 또한, 바람직하게, 상기 칼슘 및 인산염 이온 용액 중의 침지시간은 12시간 내지 36시간일 수 있으며, 보다 바람직하게는 24시간일 수 있다.
- [0032] 상기 3) 단계는 표면이 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화된 스캐폴드에 VEGF (Vascularendothelial Growth Factor) 용액을 침지시켜, 고분자 스캐폴드에 VEGF를 담지시키는 단계이다. 상기 담지는 VEGF가 고분자 스캐폴드에 부착하거나, 침투 또는 포함되는 개념을 의미하는 것이고, 바람직하게는 표면의 인산칼슘계 세라믹과 연결, 결합되는 것을 의미한다.
- [0033] 상기 침지는 구체적으로 VEGF가 포함된 용액에 일정시간 미네랄화된 스캐폴드를 담가 VEGF가 고분자 스캐폴드에 부착, 침투하면서 동시에 인산칼슘계 세라믹에 연결, 결합되도록 한다. 담지 시간은 특별히 한정할 필요는 없으며 VEGF가 잘 부착가능한 시간이면 족하다.
- [0034] 상기 제조방법에 따라 제조된 스캐폴드는 표면의 인산칼슘계 세라믹으로 인하여 고용량의 VEGF를 담지할 수 있으며 동시에 VEGF의 방출을 서방형으로 조절하여 장기간 방출이 가능한 골 재생용 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명에 따른 골 재생용 고분자 스캐폴드는 표면이 인산칼슘계 세라믹으로 미네랄화되어, 우수한 생체적합성, 세포적합성, VEGF 로딩 용량의 증가 및 장기 지속 방출성을 제공할 수 있으며, 이에 따라 궁극적으로 세포의 부착 및 증식이 촉진되어 골 조직의 재생을 효과적으로 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1의 (a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자 스캐폴드의 표면이고, 도 1의 (b)는 CaP로 표면이 미네랄화된 고분자 스캐폴드의 표면을 나타낸 그림이다.
- 도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 CaP로 미네랄화된 고분자 스캐폴드의 VEGF 방출양상을 시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 네 가지 스캐폴드(PLA, mPLA, PLA+VEGF, mPLA+VEGF)의 세포 증식 수준 확인 시험(CCK assay) 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 세 가지 스캐폴드(PLA, mPLA, mPLA-VEGF)의 이식 4주후 실험동물의 조직을 대상으로 한 HE 또는 MT 염색 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 mPLA-VEGF 스캐폴드의 vWF 발현 정도를 면역조직화학염색으로 확인한 그림이다(ML: muscle, FT: fibrous tissue, AT: adipose tissue, FB: fibroblasts).
- 도 6은, 본 발명의 일 실시예에 따른 세 가지 스캐폴드(PLA, mPLA, mPLA-VEGF)의 이식 4주후 실험동물의 조직을 대상으로 한 혈관형성 정도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1: 스캐폴드 제조 및 CaP 처리

[0039] 스캐폴드는 용매 캐스팅법 및 염-용출(salt leaching)법으로 성형하였고, 구체적으로는 논문(Oh SA, Lee WK, Shin US, Kim HW. Poly(lactic acid) porous scaffold with calcium phosphate mineralized surface and bone marrow mesenchymal stem cell growth and differentiation. Mater Sci Eng C 2010;31:612-619)에 기재된 방법과 동일하게 제조하였다. 간략하게, PLA (DL type, Boehringer Ingelheim, Germany) 펠렛을 1,4-디옥산(5% w/v)에 용해시키고, 점성있는 고분자 용액을 200~500 μm 사이즈를 가지는 NaCl을 함유하는 몰드에 부었다. 그리고 나서 샘플들을 즉시 얼리고(-20 $^{\circ}\text{C}$) 동결건조시켰다. 동결건조시킨 매트릭스는 ~1.5 mm의 두께로 잘랐고, 염 제거를 위하여 이중-증류(double distilled)시킨 물에서 6시간 동안 적시고, 건조하였다. 그리고 나서, PLA 스캐폴드의 표면을 CaP로 미네랄화하였다. 구체적으로, 칼슘 및 인산염의 이온 용액을 제조하고, 여과하였다. PLA 스캐폴드를 상기 여과 용액에 완전히 적신 후, 24시간 동안 교반하여 표면을 균일하게 미네랄화시켰다. 이 과정 중에, 온도는 상대적으로 낮은 4 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 CaP 핵 형성을 촉진시켰다. 그 후 온도를 37 $^{\circ}\text{C}$ 까지 점차 증가시켜 핵의 성장을 유도하였다. CaP로 미네랄화된 스캐폴드는 세척하고 건조시켰다. 제조한 스캐폴드의 표면 morphology는 field emission scanning electron microscopy (FE-SEM; MIRA II LMH, Tescan, Czech)로 분석하였다.

[0040] 또한, CaP-미네랄화 표면의 거칠기 분석을 위하여 PLA 필름을 제조하였고, 표면 거칠기 파라미터(평균값, R_a , 및 root-mean-square value, R_q)는 scanning probe microscopy (SPM; DAFMCL, Digital Instrument)로 확인하였다. 각 샘플의 representative area (20 μm ×20 μm)는 SPM 분석에서 고려하였다.

[0041] 그 결과, 도 1의 (a)에 나타나듯이 제조된 고분자 스캐폴드는 스캐폴드를 관통하는 구멍이 잘 발달된 다공성 morphology를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 상기 구멍들은 200~500 μm 사이즈의 염 입자 침출로 생성된 것이다. 또한, 도 1의 (b)에 나타나듯이, CaP로 미네랄화된 스캐폴드는 표면에 미네랄 나노결정이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 또한, SPM으로 평평한 타입 PLA 필름 표본의 거칠기를 측정한 결과, R_a 는 123 nm, R_q 는 172 nm를 나타내었고, 이는 PLA 대조군의 값(R_a : 53 nm, R_q : 70 nm)보다 더 높은 값을 확인할 수 있었다.

[0043] 실시예 2: 재조합 인간 VEGF의 발현 및 정제

[0044] rhVEGF를 인식하기 위한 PCR1 프라이머는 다음과 같이 디자인하였다:

[0045] VEGF forward primer, 5'-GACGGTACCGCACCCATGGCAGAAGG-3',

[0046] VEGF reverse primer, 5'-AGAATTCTACCGCCTCGGCTTGTC-3'.

[0047] PCR은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 100 µg/ml, 젤라틴, 0.2 mM dNTPs, 1.25 유닛의 Taq 폴리머라아제(iNTRON, Seoul, Korea), 및 각 50 pmol의 포워드 및 리버스 프라이머를 포함하는 30 µl 반응 혼합물로 수행하였다. PCR은 55°C에서 1분(annealing), 72°C에서 2분(extension) 및 94°C에서 1분(denaturation)으로 30 사이클 수행하였다. 증폭 산물은 Xho I 및 EcoR I으로 소화시킨 후, pBAD/HisA-VEGF construct가 생기는 pBAD/HisA 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA) 다중 클로닝 사이트와 연결하였다. 재조합 VEGF를 발현시키기 위하여, TOP 10개의 세포들을 37°C, LB-Amp 배지에서 하룻밤 동안 키웠다. 배양액이 0.6의 A₆₀₀에 다다랐을 때, induction을 0.02% (w/v) L-아라비노스로 초기화시켰다. 여섯 시간 후, 박테리아를 6000 g에서 10분간 원심분리하여 pelleting 하고, 용해시키고 초음파 처리하였다. 가용성 추출물을 4°C 14,000 g에서 10분간 원심분리하였고, 얻어진 상청액을 깨끗한 튜브에 옮겼다. 초음파 처리한 박테리아 상청액으로부터 얻어진 조 단백질을 헥사히스티딘 태그(VEGF 아미노 말단에 위치한) 결합을 통하여 제조사(Invitrogen, Carlsbad, CA)의 설명서에 따라 니켈-니트릴로트리아세탄 레진 컬럼으로 정제하였다. VEGF 정제도는 변성조건 하에 12%(v/v) SDS-PAGE 겔의 쿠마신 블루 염색으로 확인하였다.

[0048] 실시예 3: VEGF 로딩 및 방출 시험

[0049] 실시예 2로 제조한 VEGF를 CaP-미네랄화 스캐폴드에 로딩하였다. 대조군으로, CaP 처리를 하지 않은 PLA 스캐폴드에도 VEGF를 로딩하였다. 구체적으로 VEGF 10 마이크로그램을 1 ml의 완충액에 용해시키고, 각 스캐폴드를 200 µl의 VEGF 용액에 담그고, 스캐폴드 위에 VEGF가 로딩되도록 실온에서 4시간 동안 방치하여 스캐폴드에 VEGF를 담지시켰다.

[0050] 한편, 제조된 스캐폴드의 VEGF 방출성을 확인하기 위하여 in vitro 상에서 스캐폴드로부터 VEGF가 방출되는 양상을 시험하였다. 구체적으로 VEGF가 로딩된 스캐폴드를 두 번 세척하고, 37°C로 유지되는 인큐베이터 안에서 1% bovine serum albumin (BSA)를 함유한 1 ml의 인산염 완충 식염수(PBS)에 적셨다. 정해진 타임 포인트(1, 4, 8, 12 및 24시간 및 2, 3, 5, 6, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 27 및 30일)에, 상청액을 모두 모아 VEGF 방출을 평가하였다. 방출된 VEGF는 인간 VEGF enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development kit (Peprotech, Rocky Hill, NJ)로 평가하였고, 정량은 표준 곡선을 이용하여 얻었다.

[0051] 그 결과, 도 2에 나타나듯이 VEGF의 방출패턴은 매우 지속적이어서 시험 기간동안인 30일 동안 VEGF가 계속적으로 방출되는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이로부터 mPLA 스캐폴드가 약 한 달동안 지속적으로 VEGF를 전달할 수 있는 장기 지속방출형 스캐폴드임을 확인할 수 있었다.

[0052] 실시예 4: EC 배양 및 성장 양상

[0053] 일차 ECs는 다 자란 수컷 Sprague-Dawley (SD) 래트의 신선한 동맥으로부터 분리하였다. 세포는 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하고 있는 10% 소태아혈청(FBS)로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)의 표준 배양 배지에서 배양하였다. 8×10³개의 세포들을 24 웰 플레이트에 각각 시딩하였다. 하루가 지나고, 네 가지 다른 타입의 스캐폴드(PLA; CaP-미네랄화 PLA, mPLA; VEGF가 로딩된 PLA, PLA-VEGF; VEGF가 로딩된 mPLA, mPLA-VEGF)를 각 24 웰에 함유된 세포 배양 insert (0.32cm², pore diameter 0.4µm; Millipore, Millicell)에 두었다. 배지는 이틀마다 교체하였다. ECs의 증식은 제조사(Dojindo Molecular Technologies, Japan)의 설명서

에 따라 셀 카운팅 키트-8(CCK-8)를 사용하여 평가하였다. 배양 1, 4, 및 7일 후, CCK-8 용액을 각 웰에 첨가하였고, 3시간 동안 37°C에서 배양하였다. 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 최적의 밀도인 파장 450 nm에서 측정하였다.

[0054] 그 결과, 도 3에 나타나듯이 PLA와 mPLA는 세포 증식 수준에 있어서 크게 차이나지 않았으나, 스캐폴드 중에 VEGF를 포함하는 경우, 증식 수준은 시간이 지날 수록 확연하게 차이가 났다. 특히, mPLA+VEGF의 경우, 7일째 가장 높은 세포 증식을 나타내었고, 이로써, 스캐폴드로부터 VEGF의 방출이 안정적이고 효과적으로 이루어져 세포 증식을 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 5: 인 비보 동물 실험**

[0056] 래트 실험은 한국의 단국대학교 Animal Care and Use Committee의 승인하에 수행하였다. 실험에는 10주령의 건강한 SD 수컷 래트 세 마리를 사용하였다. 세가지 실험군(PLA, mPLA 및 mPLA-VEGF)에 대하여 각 군당 네 가지 샘플을 실험하였다. 스캐폴드는 에틸렌 옥사이드로 멸균하였다. 모든 수술 절차는 멸균 기술을 이용하여 전신마취하에 수행하였다. 동물들은 근육 주사(intramuscular injection)으로 80 mg/kg의 케타민 및 10 mg/kg의 자일라진으로 마취하였다. 래트 등 부분의 피부를 준비하고 bard-parker scalpel 장착된 #10 blade를 사용하여 2 cm 길이로 절개하였다. 4가지 작은 피하 임플란트 부위를 blunt dissection으로 만들어내었고, 각 동물들에 스캐폴드(PLA, mPLA 및 mPLA-VEGF)를 삽입하였다. 절개는 4-0 비흡수성 모노필라멘트 봉합 기재(Dafilon, B. Braun, Germany)로 봉합하였다. 수술 중 및 후에, 온기를 유지하도록 하였고 마취에서 회복될 때까지 관찰하였으며, 한 마리당 한 케이지(cage)에서 사육하였다. 동물들은 12시간 낮/12시간 밤의 스케줄을 유지하였고 표준 펠렛 음식 및 물을 임의 제공하였다.

[0057] **실시예 6: 조직학적 분석**

[0058] 이식 후 모든 동물들은 염증 반응 없이 정상적인 상처 치유과정을 나타내었고 시험 기간 동안 건강한 상태를 유지하였다. 이식 4주 후, 샘플들 및 주변 조직들은 현미경 관찰상 흉조 또는 염증이 나타나지 않은 것을 확인하고, 실험동물들을 희생하였다. 주변 조직을 포함한 샘플들을 각 래트로부터 분리하여 즉시 4% 완충 포르말데하이드에 24시간 동안 실온 조건에서 적셨다. 그리고 일련의 graded 에탄올로 탈수시켰다. 샘플을 이등분하여 파라핀 중에 내포시켰다. 파라핀 블록들을 로타리 마이크로톰을 이용하여 길이방향으로 5 μm의 두께로 절단하였다. 슬라이드는 헤마토실린 및 에오신(HE) 또는 마손스 트리크롬(MT)로 염색하였고, 생분해성 및 혈관 형성을 위해 최적의 현미경으로 관찰하여 도 4에 나타내었다. 또한, 염증 반응의 정도, 섬유성 피막의 두께, 혈관의 존재 및 섬유아세포의 증식(부재~심각한 정도까지 0~3)을 포함하여 점수를 매겼고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0059]

	PLA				mPLA				mPLA-VEGF			
	FC	IR	BV	FB	FC	IR	BV	FB	FC	IR	BV	FB
1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	3	2
2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	3	2
3	1	1	1	2	1	2	1	2	2	1	3	2
4	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	3	2

[0060] (1: mild changes or low numbers of infiltrated inflammatory cells, 2: moderate changes or intermediate numbers of infiltrated inflammatory cells, 3: severe changes/numbers of infiltrated inflammatory cells. FC: fibrous capsule, IR: inflammatory response, BV: blood vessel, F: fibroblasts)

[0061] 그 결과, 도 4 및 상기 표 1에 나타나듯이 스캐폴드 주변과 안의 조직 물폴로지를 관찰한 결과 모든 스캐폴드에 새롭게 형성된 조직은 기존의 주변 조직들과 잘 융화되었으며, 적절하게 유기화된 얇은 섬유성 과립조직들이 스캐폴드와 주변 연결 조직 및 근육 사이의 공간을 채우고 있었다.

[0062] 또한, PLA 및 mPLA 스캐폴드에서는 별다른 차이가 없었으나, mPLA-VEGF 스캐폴드에서는 높은 점수를 내어 혈관 형성이 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0063] **실시예 7: 혈관내 증식 평가**

[0064] 스캐폴드에서 새롭게 형성된 혈관의 양을 확인하기 위하여, 슬라이드의 스캐폴드 부분 안의 혈관 갯수를 계산하였다. vWF (von Willebrand factor)는 혈관 기저막과 같은 내피하 매트릭스에 있는 거대 분자량 단백질이기 때문에 새롭게 형성된 혈관을 정량하기 위해서 널리 사용되어 왔다. 이에 슬라이드를 vWF (von Willebrand factor; Abcam, Cambridge, MA)로 면역조직화학적으로 염색하고, 표준 프로토콜에 따라 평가하였다. 일차 항체 (1:2000으로 희석한 토끼 항-vWF; Abcam)으로 처리하고, 이차 항-토끼 IgG 항체(Santa Cruz Inc., CA)로 처리하였다. 1시간 처리 후에, 3,3'-디아미노벤지딘(브라운; Dako, Glostrup, Denmark)을 함유한 퍼옥시다아제 기질 용액을 가시화를 위해 사용하였고, 핵 염색을 위하여 헤마톡실린을 사용하였다. vWF-염색 슬라이드는 스캐폴드 면적을 확인하기 위하여 사진촬영 하여 도 5에 나타내었고, 라이트 마이크로스코프를 사용하여 각각 혈관 농도를 확인하였다. 혈관은 Scion Image Software (Media Cybernetics, Carlsbad, CA)를 사용하여 조직 면적을 정상화하였다. 평균 혈관 수는 각 그룹끼리 비교하였다.

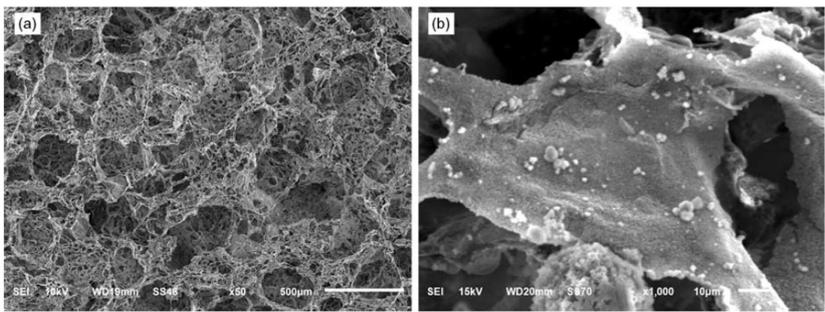
[0065] 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타나듯이 mPLA-VEGF 군에서 가장 높은 vWF의 발현이 관찰되었으며, mPLA-VEGF 스캐폴드가 현저하게 많은 혈관을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] **실시예 8: 통계**

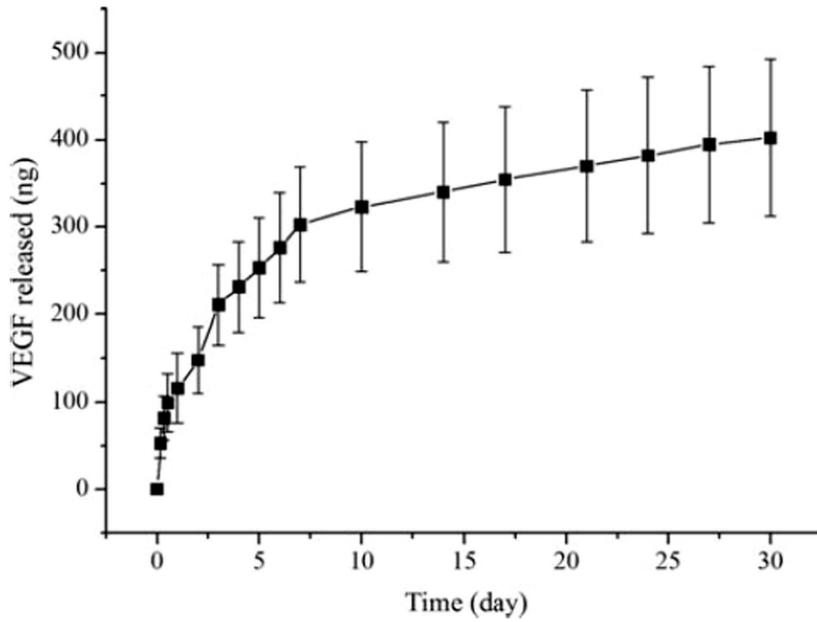
[0067] 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, ANOVA로 분석하였다. $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 의 A값을 유의미한 것으로 해석하였다.

도면

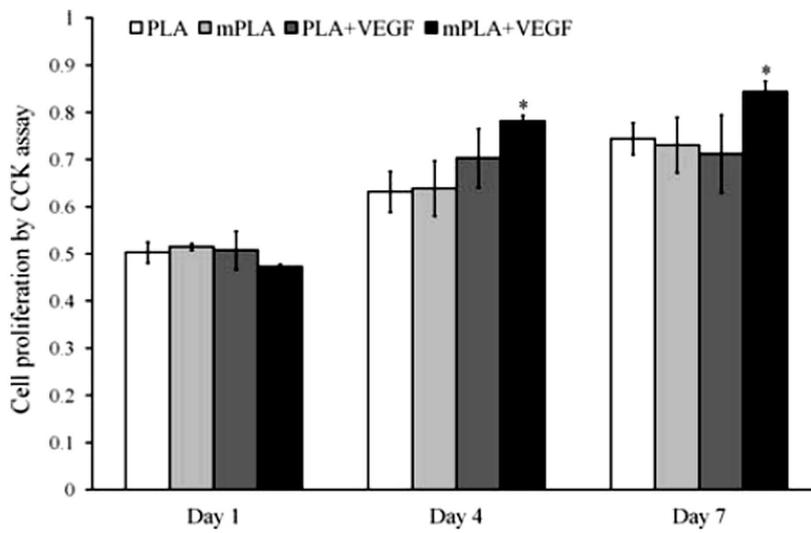
도면1



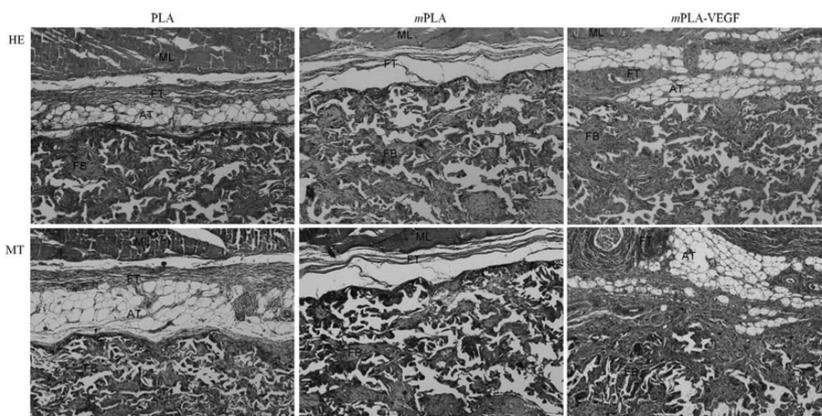
도면2



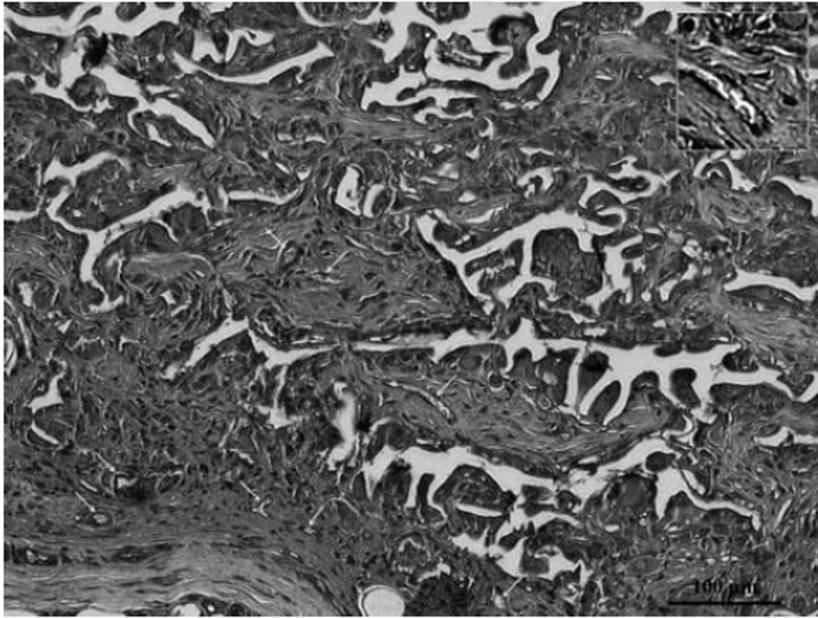
도면3



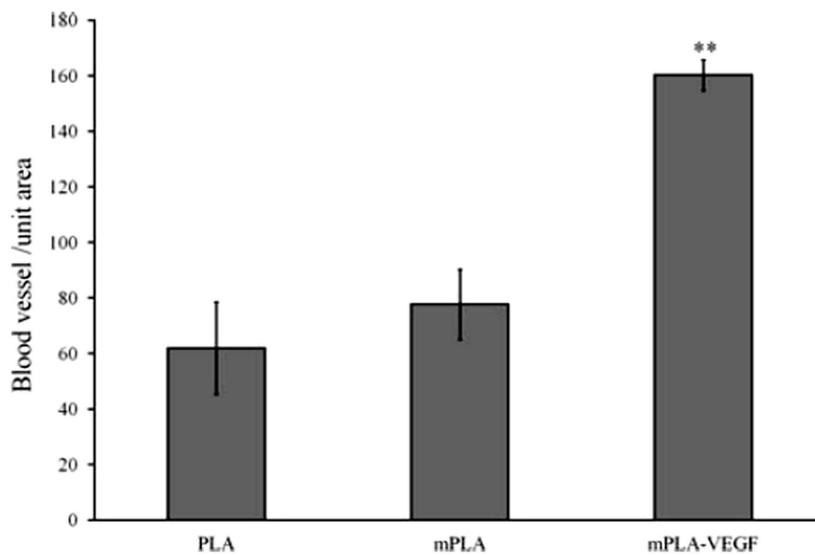
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Dankook University
- <120> Bone regenerating polymer scaffold
- <130> PA120998/KR
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF forward primer

<400> 1

gacggtaccg cacccatggc agaagg

26

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF reverse primer

<400> 2

agaattctca ccgctcggc ttgtc

25