



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년04월13일
 (11) 등록번호 10-1135709
 (24) 등록일자 2012년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 31/16 (2006.01) **C12N 5/07** (2010.01)
C12M 3/00 (2006.01) **A61K 47/30** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-0099579
 (22) 출원일자 2009년10월20일
 심사청구일자 2009년10월20일
 (65) 공개번호 10-2010-0114815
 (43) 공개일자 2010년10월26일
 (30) 우선권주장
 1020090033079 2009년04월16일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020080104932 A
 KR100715505 B1
 KR100816395 B1

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
박귀덕
 서울특별시 노원구 노원로 62, 303동 1201호 (공릉동, 효성 화운트빌)
김희중
 서울특별시 강남구 압구정로 313, 803호 (압구정동, 한양아파트42동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인이름

전체 청구항 수 : 총 11 항

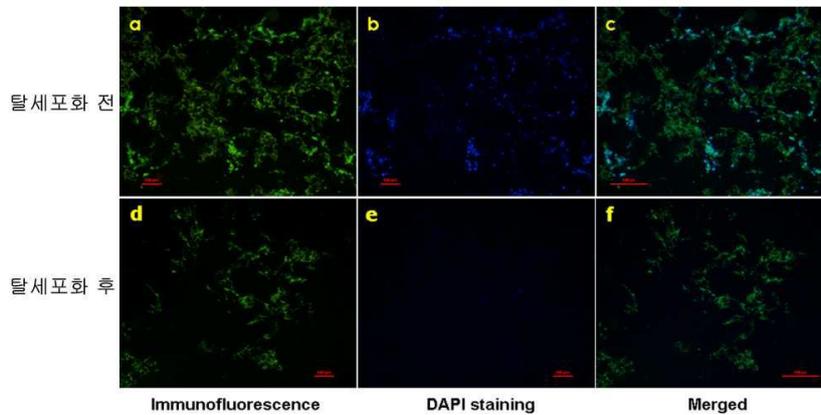
심사관 : 고태욱

(54) 발명의 명칭 **탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법**

(57) 요약

본 발명은 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 고분자 지지체의 표면 개질 방법은 특정세포로부터 유래된 탈세포화된 세포의 기질을 이용하여 지지체 표면을 개질함으로써, 세포부착을 용이하게 하고 나아가 줄기세포의 성장 및 분화에도 효과적인 생체모방형의 표면 환경을 구현할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

한동근

서울특별시 노원구 상계동 694 임광아파트 1동 70
1호

홍유진

서울특별시 양천구 목동중앙남로 100, 101동 105호
(목동, 목동2차성원아파트)

전홍재

서울특별시 중구 칠패로 27, 포스코 더샵 49406 A
동 1204호 (순화동)

장주웅

서울특별시 동작구 매봉로 134, 신동아아파트 4동
307호 (본동)

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 생분해성 유기 고분자를 유기용매에 녹인 후, 이를 무기질 성분 또는 천연 고분자와 혼합하고, 여기에 NaHCO_3 를 넣고 발포 및 동결과정을 거쳐 다공성 복합 지지체를 제조하는 단계,
- 2) 상기 제조된 다공성 복합 지지체를 플라즈마 처리하고 멸균처리한 후, 복합 지지체 내에 조직세포를 이식 및 배양하고, 이를 탈세포화 용액에 담귀 탈세포화하는 단계, 및
- 3) 상기 탈세포화된 지지체에 줄기세포를 이식 및 배양하는 단계를 포함하는, 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 1)단계에서 생분해성 유기 고분자는 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리- ϵ -카프로락톤(PCL), 폴리아미노산 및 이들의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 1)단계에서 무기질 성분은 하이드록시아파타이트 (hydroxyapatite, HA), β -트리칼슘포스페이트(β -tricalcium phosphate, β -TCP), BCP(biphasic calcium phosphate), 탄산칼슘(calcium carbonate) 및 결정화 유리 (glass ceramics)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 1)단계에서 천연 고분자는 콜라겐, 알기네이트, 히알루론산, 젤라틴, 키토산, 및 피브린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 1)단계에서 유기용매는 메틸렌클로라이드, 헥산, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 테트라히드로퓨란 및 헥사플루오로이소프로판으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 조직세포는 섬유아세포, 연골세포, 혈관내피세포, 평활근세포, 조골세포, 간세포, 신경세포, 심근세포 및 척추 추간판세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 조직세포는 자가조직세포, 동종조직세포 또는 이종조직세포인 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 탈세포화 용액은 용해 용액(lysis solution), 저장성 용액(hypotonic solution), 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 리보핵산가수분해효소 A (Ribonuclease A, RNase A) 및 디옥시리보핵산가수분해효소(Deoxyribonuclease I, DNase I)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 2)단계 및 3)단계에서 배양시 생리활성물질을 추가적으로 첨가하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 생리활성물질은 전환 성장인자(transforming growth factor-beta, TGF-β), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 골 형태발생 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 태반 성장인자(placental growth factor, PIGF), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 및 아스코르베이트 2-포스페이트(ascorbate 2-phosphate)와 같은 배지 첨가물로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 3)단계에서 줄기세포는 자가줄기세포로서, 배아줄기세포, 골수유래 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포 및 유도 만능 줄기세포로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분자 지지체의 표면 개질 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재, 재생의학(regenerative medicine)과 관련하여 인체이식이 가능한 인공조직 개발을 위한 조직공학적인 기초 및 응용기술의 개발이 활발히 진행되고 있다. 구체적으로는, 줄기세포의 증식 및 분화 연구, 세포 및 생체적합 삼차원적 지지체 개발, 및 다양한 조직공학적 틀 개발을 위한 연구 등이 있다. 이들 중에서도 줄기세포 또는 조직세포를 담지할 수 있는 삼차원적 지지체는 인공조직 및 장기 개발에 있어서 핵심적인 요소이다.

[0003] 인체 조직의 재생을 위해서 사용되는 지지체 재료의 주된 요건으로는 조직세포가 재료표면에 유착하여 3차원 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 기질 또는 틀의 역할을 충분히 해내야 하고, 이식된 세포와 숙주 세포 사이에 위치하는 중간 장벽으로서의 역할도 해야하는데 이는 이식 후 혈액 응고나 염증반응이 일어나지 않는 무독성의 생체적합성이 있어야 함을 의미한다. 또한 이식된 세포가 충분히 조직으로서 제 기능과 역할을 하게 되면 원하는 시간에 따라 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있는 생분해성을 지녀야 한다. 따라서, 지지체는 주로 합성 및 천연 고분자, 그리고 이들의 복합체를 이용하여 삼차원적으로 제조되며 다양한 형태와 물성을 가지고 있다. 현재 널리 상용되고 있는 합성 생분해성 고분자로는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL)과 이들의 유도체 및 공중합체들이 대부분이다. 천연 생분해성 고분자로는 콜라겐, 알기네이트, 히알루론산, 젤라틴, 키토산, 피브린 등이 사용되고 있다. 지지체의 형태로는 스폰지, 겔, 섬유 및 미세구슬 등의 여러 가지 형태가 사용되고 있으며, 이들 중 다공성의 스폰지와 주입형의 하이드로겔이 가장 널리 사용되고 있다.

[0004] 현재 조직공학의 여러 가지 기술적인 제약들 중에서도 지지체와 관련한 시급한 요소기술은 무엇보다도 지지체 내의 세포적합 표면 환경조성 기술이다. 지지체의 주요 임무가 세포부착 및 성장에 유리한 삼차원적인 환경을 제공하는 것에 비추어 세포부착이 일어나는 지지체 표면의 특징은 현재 및 미래의 세포거동을 결정짓는 중요한 잣대가 될 수 있다.

[0005] 세포가 직접 부착되는 고분자 표면은 지지체 설계에서 있어 중요한 요소 중 하나이다. 일반적으로 세포부착은 합성 고분자에서 보다는 천연 고분자 성분 위에서 훨씬 용이하기 때문에, 기존에는 주로 1) 세포표면 수용체가 인식할 수 있는 피브로넥틴, 알기네이트-글리신-아스파르트산(RGD) 펩타이드, 비트로넥틴, 라미닌을 지지체에 코팅 또는 그래프팅하는 방법, 2) 콜라겐, 젤라틴, 피브린과 같은 천연고분자를 고분자 지지체 표면에 처리하는 방법, 또는 3) 합성 및 천연 고분자를 일정 비율로 섞어서 혼성 지지체를 제조하는 방법이 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 방법들은 일정부분 세포부착 및 분화에는 효과적이지만, 실제 세포가 자기 환경이라고 인식하는 단

계인 생체모방(biomimetic)에 가까운 표면 환경을 구현하는데는 한계가 있다.

[0006] 한편, 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)은 세포의 외부를 둘러싸고 있는 기질로서, 세포와 세포 사이를 차지하고 있으며, 주로 단백질과 다당류로 이루어진 망상 구조를 가지고 있다. 세포의 기질의 성분으로는 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 구조체(structural component); 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 및 테나신 등의 접착성 단백질; 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)이나 황산헤파란 (heparan sulfate) 그리고 주단백질로부터 생성되는 프로테오글리칸; 및 다당류로만 이루어진 히알루론산 등으로 구분하고 있다. 이러한 세포의 기질 성분은 세포가 집합하여 구성하는 조직의 형태를 결정할 뿐만 아니라 세포가 정상적인 기능을 할 수 있는 환경을 제공하며, 세포분화에도 관여하는 주요물질이다.

[0007] 따라서, 세포가 정상적인 기능을 할 수 있는 환경을 제공하는 세포의 기질의 장점을 이용하여 지지체를 제조하려는 연구가 다양하게 진행되어 왔다. 예컨대, 폐지 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS), 방광(bladder) 및 피부와 같은 생체조직을 직접적으로 탈세포화하여 세포 없는 매트릭스를 얻은 다음, 이를 세포 이식에 사용하여 왔다. 또한, 대한민국등록특허공보 제 10-715505호에는 세포 유래 세포의 기질 지지체의 제조방법에 대하여 기재되어 있다. 상기 세포 유래 세포의 기질 지지체는 동물의 연골 유래 연골세포로부터 연골세포/세포의 기질 막을 수득한 다음, 수득된 연골세포/세포의 기질 막을 배양하여 지지체가 없는 펠릿-타입 구조물을 수득하고, 상기 수득된 펠릿-타입 구조물을 냉동건조하는 것을 특징으로 하는 지지체-프리 시스템에 의해 조직공학적으로 제작 및 배양된 연골로부터 제조된 다공성 지지체로서 연골 재생에만 유용하다.

[0008] 따라서, 다른 조직세포의 재생에 대해서도 유용할 수 있는 생체모방에 가까운 지지체의 표면 환경을 제공하기 위하여, 세포의 기질을 이용한 지지체의 개발의 필요성이 요구되고 있다.

[0009]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명자들은 생체모방에 가까운 지지체의 표면 환경을 제공하기 위하여 지지체의 표면 개질 방법에 대해 연구하던 중, 유기 고분자와 무기질 성분으로 이루어진 다공성 복합 지지체에 특정세포를 이식하여 일정기간 배양한 후 탈세포화하여 세포의 기질 성분만 남기는 과정을 통해 고분자 지지체 표면을 개질하였으며, 이렇게 탈세포화된 지지체에 실제 줄기세포를 이식한 후 배양한 결과, 표면 개질된 고분자 지지체가 세포의 부착을 용이하게 하고 줄기세포의 성장 및 분화에도 효과적임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명은 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법을 제공하고자 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은

[0013] 1) 생분해성 유기 고분자를 유기용매에 녹인 후, 이를 무기질 성분 또는 천연 고분자와 혼합하고, 여기에 NaHCO_3 를 넣고 발포 및 동결과정을 거쳐 다공성 복합 지지체를 제조하는 단계,

[0014] 2) 상기 제조된 다공성 복합 지지체를 플라즈마 처리하고 멸균처리한 후, 복합 지지체 내에 조직세포를 이식 및 배양하고, 이를 탈세포화 용액에 담귀 탈세포화하는 단계, 및

[0015] 3) 상기 탈세포화된 지지체에 줄기세포를 이식 및 배양하는 단계를 포함하는, 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법을 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질을 이용한 줄기세포 이식용 고분자 지지체의 표면 개질 방법에서, 상기 1)단계는 다공성 복합 지지체를 제조하는 단계이다. 구체적으로, 생분해성 유기 고분자를 유기용매에 녹인 후, 이를 무기질 성분 또는 천연 고분자와 일정비율로 혼합한다. 지지체 내 기공을 조성하기 위하여 NaHCO_3 를 체로 걸러

200~300 μ m 입자크기를 확보한 후, 이들을 상기 유?무기 성분들과 혼합한다. 이후 상기 혼합물을 실리콘 몰드에 채워 넣어 디스크 모양을 만든 후 액체질소에 넣어 급속냉동시킨 후, 일정시간 경과 후 이들을 꺼내 다시 동결 건조 과정을 거쳐 제조과정에 포함된 용매를 완전히 제거한다. 동결건조 후, 디스크 모양의 지지체를 발포과정을 거치고 마지막으로 증류수로 세척하고 동결건조하여 다공성 복합 지지체를 제조한다.

- [0018] 상기 생분해성 유기 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리- ϵ -카프로락톤(PCL), 폴리아미노산 및 이들의 유도체와 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 상기 무기질 성분은 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA), β -트리칼슘포스페이트(β -tricalcium phosphate, β -TCP), BCP(biphasic calcium phosphate), 탄산칼슘(calcium carbonate) 및 결정화 유리(glass ceramics)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 상기 천연 고분자는 콜라겐, 변성 콜라겐, 알기네이트, 변성 알기네이트, 히알루론산, 변성 히알루론산, 젤라틴, 변성 젤라틴, 키토산, 변성 키토산, 피브린 및 변성 피브린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 상기 유기용매는 메틸렌클로라이드, 헥산, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 테트라히드로퓨란 및 헥사플루오로이소프로판으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 고분자 지지체의 표면 개질 방법에서, 상기 2)단계는 복합 지지체 내에 조직세포를 이식 및 배양하고, 이를 탈세포화 용액에 담귀 탈세포화하는 단계이다. 구체적으로, 복합 지지체 표면에 세포부착을 용이하게 하기 위하여, 플라즈마 처리를 통해서 지지체 표면의 친수화를 유도한 다음, 멸균처리한다. 멸균처리된 지지체에 조직세포를 이식하고 배양한 다음, 인산염완충용액으로 세척하고 탈세포화 용액에 담귀 세포핵을 제거하고 세포의 기질만 남겨 탈세포화한다.
- [0023] 상기 조직세포는 섬유아세포, 연골세포, 혈관내피세포(endothelial cell), 평활근세포(smooth muscle cells), 조골세포, 간세포, 신경세포, 심근세포 및 척추 추간판세포(intervertebral disc cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 조직세포는 자가조직세포, 동종조직세포 또는 이종조직세포일 수 있다.
- [0024] 상기 탈세포화 용액은 용해 용액(lysis solution), 저장성 용액(hypotonic solution), 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 리보핵산가수분해효소 A (Ribonuclease A, RNase A) 및 디옥시리보핵산가수분해효소(Deoxyribonuclease I, DNase I)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 특히, 본 발명에서 사용된 상기 탈세포화 용액은 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.5M NaCl, 1% EDTA, 1% Triton X-100, RNase A, 및 DNase I를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 멸균처리된 지지체에 조직세포를 이식한 후 배양하는 단계에서 조직세포를 증식시키거나 세포의 기질 분비를 촉진시키기 위하여 생리활성물질을 추가적으로 첨가할 수 있다. 상기 생리활성물질로는 전환 성장인자(transforming growth factor-beta, TGF- β), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 골 형태 발생 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 태반 성장인자(placental growth factor, PIGF), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 및 아스코르베이트 2-포스페이트(ascorbate 2-phosphate)와 같은 배지 첨가물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 고분자 지지체의 표면 개질 방법에서, 상기 3)단계는 탈세포화된 지지체에 줄기세포를 이식 및 배양하는 단계이다.
- [0027] 상기 줄기세포는 자가줄기세포로서, 배아줄기세포, 골수유래 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포 및 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 탈세포화된 지지체에 줄기세포를 이식 및 배양하는 단계에서 줄기세포의 성장 및 분화를 촉진시키기 위하여 생리활성물질을 추가적으로 첨가할 수 있다. 상기 생리활성물질로는 상기 2)단계에서 사용한 생리활성물질과

동일하다.

[0029] 본 발명에 따라 표면 개질된 고분자 지지체는 특정세포로부터 유래된 탈세포화된 세포의 기질을 이용하여 지지체 표면을 개질함으로써, 세포부착을 용이하게 하고 나아가 줄기세포의 성장 및 분화에도 효과적인 생체모방형의 표면 환경을 구현할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 표면 개질된 고분자 지지체는 줄기세포를 이용한 질환 치료 등에 담체로서 유용하게 활용될 수 있으며, 연골, 뼈, 신경, 심근, 척추, 간, 피부에 유용하게 적용될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1 : 고분자 지지체의 표면 개질[PLGA/HA/TCP - 탈세포화/섬유아세포]**

[0032] **1. 다공성 복합 지지체의 제조**

[0033] 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA, 75:25, 분자량-110,000; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany)를 메틸렌클로라이드에 녹여 13%(w/v) PLGA 용액을 제조하였다. 여기에 무기질 성분인 하이드록시아파타이트(HA)와 β-트리칼슘포스페이트(β-TCP)를 혼합하였다. 이때 세 성분을 무게비율로 각각 1:0.2:0.8로 유지하였다. 지지체 내 기공을 조성하기 위하여 NaHCO₃를 체로 걸러 200~300μm 입자크기를 확보한 후, 이들을 PLGA 및 무기질 성분과 고르게 혼합하였다. 이후 상기 혼합물을 직경 8mm, 두께 2mm의 실리콘 몰드에 채워 넣어 디스크 모양을 만든 후 액체질소에 넣어 급속냉동시켰다. 일정시간 경과 후 이들을 꺼내 다시 2일 동안 동결건조 과정을 거쳐 제조과정에 포함된 용매를 완전히 제거하였다. 동결건조 후, 디스크 모양의 지지체는 가스발포(gas foaming) 과정을 거치는데, 이때 20% 시트르산 용액을 매일 2차례 갈아주면서 2일 동안 발포과정을 거치고 마지막으로 증류수로 세척하고 동결건조하여 다공성 복합 지지체를 제조하였다.

[0034] **2. 복합 지지체의 표면 플라즈마 처리**

[0035] 상기 1에서 얻은 복합 지지체 표면에 세포부착을 용이하게 하기 위하여, 플라즈마 처리를 통해서 지지체 표면의 친수화를 유도하였다. 이때 사용된 장치는 RFGD(radio frequency glow discharge; Model ATPT-1000, CLIOTEK, Inc., Seoul, Korea) 장치로서, 플라즈마 장치 내 챔버 안에 지지체를 위치시키고 진공펌프를 이용하여 10⁻³ torr의 내부압력을 유지시키고, 아르곤 가스가 채워진 상태에서 플라즈마 처리를 30초간 수행하였다. 이렇게 처리된 지지체는 수분이 없는 상태에서 상온 보관하였다.

[0036] **3. 복합 지지체 내 세포 이식 및 배양**

[0037] 세포배양을 위해서 플라즈마 처리된 지지체를 멸균처리한 뒤, 지지체를 24-웰 배양 플레이트에 넣고 실험 그룹별로 섬유아세포(fibroblasts)를 이식하였다. 이때 이식된 세포수는 지지체 당 5×10⁵이며, 10% 우태아혈청을 포함한 배양 배지를 사용하였고, 일주일 동안 2번 배지를 교체해 주었다.

[0038] **4. 세포이식된 복합 지지체의 탈세포화 처리**

[0039] 일주일 동안 배양된 지지체를 인산염완충용액(PBS)으로 세척한 후 탈세포화 용액[10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.5M NaCl, 1% EDTA, 1% Triton X-100, RNase A, 및 DNase I 포함]에 담겼다. 그리고 거품이 생길 때까지 불텍싱한 후 밀봉하여 온도를 37℃로 유지하고, 120rpm의 조건에서 진탕항온수조(shaking water bath)를 작동시켰다. 이후 48시간이 경과하면 샘플을 꺼내어 클린벤치에서 인산염완충용액으로 세척한 후 다시 인산염완충용액에 담겨 처음과 같은 조건에서 24시간 동안 처리하였다. 이후 샘플을 꺼내어 간단히 세척하고 밀봉한 후 -20℃에 보관하였다.

[0040] **5. 탈세포화된 복합 지지체 내에 줄기세포 이식 및 배양**

[0041] 상기 탈세포화된 복합 지지체에 골수로부터 분리된 줄기세포(5×10⁵)를 이식하고 골형성 유도 배양액(osteogenic medium)에서 4주 동안 체외배양을 수행하였다.

[0042] **실시예 2 : 고분자 지지체의 표면 개질[PLGA/HA/TCP - 탈세포화/전조골세포]**

[0043] 상기 실시예 1의 3에서 섬유아세포 대신 전조골세포(pre-osteoblasts)를 이용한 것을 제외하고는, 실시예 1과

동일한 방법으로 하여 탈세포화된 복합 지지체를 제조하였다.

[0044] 실험예 1 : 탈세포화된 복합 지지체의 평가 - DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole) 염색 및 면역형광염색

[0045] 본 발명에 따른 탈세포화된 복합 지지체가 탈세포화되었는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0046] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균된 복합 지지체를 세개의 군[세포가 이식되지 않은 대조군, 섬유아세포주인 NIH 3T3가 이식된 군, 전조골세포주인 MC3T3-E1이 이식된 군]으로 나누고, 각 군의 지지체에 5×10^5 세포를 이식한 후 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 일주일 동안 배양하였다. 이후 탈세포화 처리를 한 후, 각 군의 지지체를 인산염완충용액으로 세척하고 분석을 위해 탈세포화 지지체들을 4% 파라포름알데히드로 20분 동안 고정시켰다. 다시 10분 동안 0.3% Triton X-100을 넣고 인산염완충용액으로 세척하였다. 동결절편에 사용하는 수용성 포매제인 OCT(optimal cutting temperature) 화합물을 넣고, 지지체가 밀면에 가라앉고 1시간이 지나 지지체에 OCT 화합물이 스며든 상태에서 저온 보관하였다. 이들을 전기식 동결절편기(cryostat)를 사용하여 10μm 두께로 잘랐다. 이후 절편의 면역형광염색을 위해, 0.5% NaBH₄(sodium borate or sodium borohydride)/PBS로 10분 동안 반응시켰다. 0.1% TTBS(Tris-tween buffered saline)로 10분씩 3번 세척한 후 2% BSA(bovine serum albumin)/TTBS로 1시간 동안 블로킹(blocking) 시켰다. 1차 항원 (1:40)을 4℃에서 하룻밤 동안 방치한 후 0.1% TTBS로 10분간 3번씩 세척하고 FITC-2차 항체 (1:1000)로 1시간 동안 상온에서 배양시킨 후 0.1% TTBS로 10분간 3번 세척하였다. 또한, DAPI로 대비염색 후 0.1% TTBS로 10분간 3번 세척 후 표본을 만들었다. 완성된 표본은 형광 현미경으로 관찰하여 세포핵 유무와 제 1형 콜라겐의 존재여부를 평가하였다. 결과는 도 1에 나타내었다.

[0047] 도 1에 나타난 바와 같이, DAPI 염색법에 의하여 탈세포화 전의 지지체에서는 푸른색점이 나타났으나, 탈세포화 후의 지지체에서는 푸른색점이 사라짐으로써, 세포핵이 제거되어 탈세포화됨을 확인하였다. 또한, 면역형광염색법에 의하여 탈세포화 전의 지지체와 탈세포화 후의 지지체에서 초록색점이 계속 유지되고 있음을 확인하였으며, 이는 제 1형 콜라겐이 존재하여 세포외 기질 성분이 유지되고 있는 것으로 판단된다.

[0048] 실험예 2 : 탈세포화된 복합 지지체의 줄기세포의 분화 유도능: Alizarin red 염색

[0049] 본 발명에 따른 탈세포화된 복합 지지체가 표면 개질된 환경에서 줄기세포로부터 골세포로의 분화에 효과적인지 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0050] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 탈세포화된 복합 지지체에 줄기세포를 이식한 후 골형성 유도 배양액에서 2주 및 4주 배양한 후, 골 특이적 기질의 하나인 칼슘 분포 및 농도가 대조군에 비해 탈세포화된 지지체에서 훨씬 우세함을 조직염색법인 Alizarin red 염색을 통하여 확인하였다. 대조군으로는 상기 실시예 1의 1에서 제조한 다공성 복합 지지체를 사용하였다.

[0051] 결과는 도 2에 나타내었다.

[0052] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 탈세포화된 지지체에서 붉게 염색된 부분을 관찰하였으며, 또한 붉게 염색된 부분이 대조군에서보다 더 많이 나타남을 확인하였다. 이는 골 특이적 기질의 하나인 칼슘 분포 및 농도가 대조군에 비해 탈세포화된 지지체에서 훨씬 우세하다는 것을 나타내고, 본 발명에 따른 탈세포화된 지지체가 줄기세포로부터 골 세포로의 분화에 용이한 환경을 제공할 수 있다는 사실을 뒷받침하고 있다고 판단된다.

산업이용 가능성

[0053] 본 발명에 따른 고분자 지지체의 표면 개질 방법은 특정세포로부터 유래된 탈세포화된 세포외 기질을 이용하여 지지체 표면을 개질함으로써, 세포부착을 용이하게 하고 나아가 줄기세포의 성장 및 분화에도 효과적인 생체모방형의 표면 환경을 구현할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 표면 개질된 고분자 지지체는 줄기세포를 이용한 질환치료 등에 담체로서 유용하게 활용될 수 있으며, 연골, 뼈, 신경, 심근, 척추, 간, 피부에 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

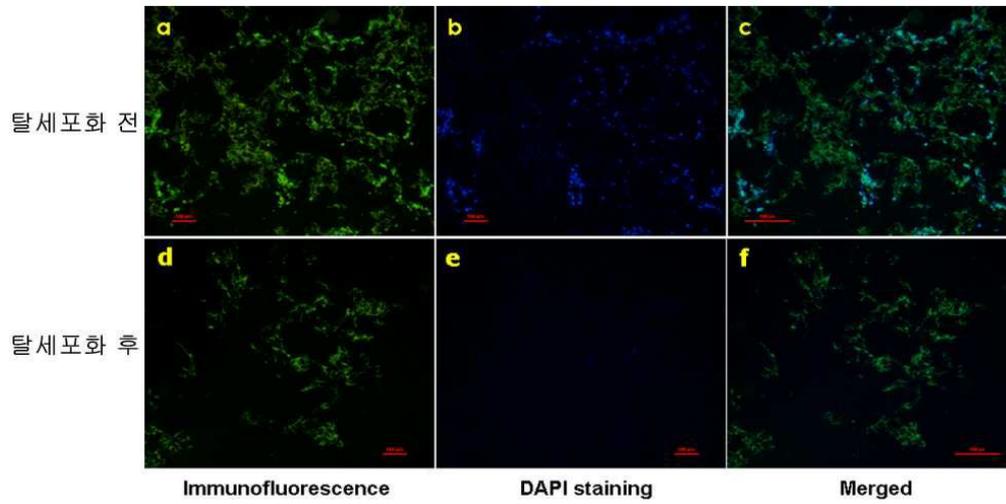
[0054] 도 1은 본 발명에 따라 표면 개질된 고분자 지지체를 면역형광염색법과 DAPI 염색법으로 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하여 세포핵 유무와 제 1형 콜라겐의 존재여부를 관찰한 도이다.

[0055]

도 2는 본 발명에 따라 표면 개질된 고분자 지지체를 조직염색법인 Alizarin red 염색을 통하여 줄기세포의 분화 유도능을 관찰한 도이다.

도면

도면1



도면2

