



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151384
(43) 공개일자 2024년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/16 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0047298

(22) 출원일자 2023년04월11일
심사청구일자 2023년04월11일

(71) 출원인

강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호

대표사안

강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명
과학대학 1호관 307동 206호

(74) 대리인

구현서

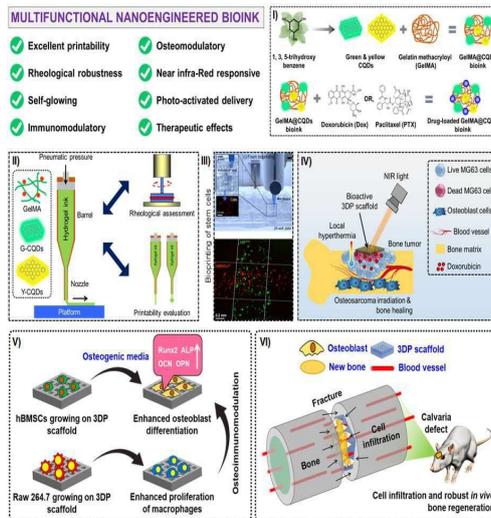
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **중양 세포사멸 및 뼈 재생을 위한 3D 생체 인쇄 나노엔지니어링 하이드로젤 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 젤라틴 메타크릴로일(GelMA) 및 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)을 포함하는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로젤, 그 하이드로젤의 골육종 치료, 항염증 및 골재생에 응용에 관한 것이다. 본 발명은 더 나은 골융합을 위한 면역분극, 중양 세포사멸 및 골 면역을 통해 나노 탄소 물질을 사용하여 뼈 치유 및 재생에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61L 27/222 (2013.01)
- A61L 27/26 (2013.01)
- A61L 27/54 (2013.01)
- A61L 2300/41 (2013.01)
- A61L 2400/12 (2013.01)
- A61L 2430/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345280875
과제번호	2018R1A6A1A03025582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명	강원지역 산림바이오매스 유래 '나노셀룰로오스 융복합 응용연구 허브' 구축
기여율	5/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354507
과제번호	2022R111A3063302
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	미세전류 자극을 이용한 조직공학용 3D 프린팅 전도성 하이드로겔 패치 개발
기여율	95/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.05.30

명세서

청구범위

청구항 1

젤라틴 메타크릴로일(GelMA) 및 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)을 포함하는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 Y-폴리페놀 탄소 양자점(CQD)인 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 6-11 nm 입자 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로겔.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 1, 3, 5-트리하이드록시벤젠 유래인 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로겔.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 골육종(Osteosarcoma) 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 광열 처리 수단을 더욱 포함하는 골육종(Osteosarcoma) 치료용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 항암제를 더욱 포함하는 골육종(Osteosarcoma) 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신인 것을 특징으로 하는 골육종(Osteosarcoma) 치료용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 항염증 및 골재생 개선용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 칼슘 이온 생산을 촉진하는 것을 특징으로 하는 항염증 및 골재생 개선용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 혈관신생(vascularization)을 촉진하는 것을 특징으로 하는 항염증 및 골재생 개선용 조성물.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대식세포 조건화된 배지를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증 및 골재생 개선용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 중앙 세포사멸 및 뼈 재생을 위한 3D 생체 인쇄 나노엔지니어링 하이드로겔 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유발적 부상, 외상, 세균 감염 또는 염증으로 인한 피부 또는 뼈와 같은 손상된 조직의 재생은 클리닉에서 여전히 어려운 일이다. 외인성 또는 내인성 조직의 조직 재생을 위한 기존의 전략은 더 긴 시간이 필요하고 치유 속도가 상대적으로 느리다. 조직 재생의 기본 과정 중 하나는 손상된 조직을 향한 세포의 빠른 증식과 이동이다. 면역 세포는 줄기 세포의 증식과 신생 혈관 생성을 촉진하여 조직 치유에 중요한 역할을 한다. 다양한 면역 관련 세포 중에서 대식세포는 염증 인자의 분비를 통해 손상된 조직을 재생하는 데 상당한 역할을 한다. 대식세포는 원래 성인 골수의 골수 전구 세포인 단핵구 세포에서 유래한다.

[0003] 대식세포는 성질과 기능에 따라 M1형과 M2형의 두 가지 주요 유형으로 세분할 수 있다. M1 또는 전 염증성 대식세포는 주로 괴사, 미생물 제거, 종양 제거, 과도한 섬유증 및 전 염증성 사이토카인 및 케모카인들(예 : IL-1^{high}, IL-6^{high} 및 TNF α ^{high}, IL-12^{high}, IL-23^{high} 및 IL-10^{low})의 분비를 통한 항-치유 기능에 관여한다.

[0004] M1 표현형은 일반적으로 아르기닌(Arg)을 대사하고 높은 수준의 유도성 산화질소 합성효소(iNOS 또는 NOS2)를 생성한 다음 독성 반응성 산소종(ROS) 및 산화질소(NO)를 분비한다. 또한, M2 대식세포는 다양한 세포내(IL-4 또는 IL-10) 또는 세포외 신호(나노입자 또는 단백질)를 통해 주로 활성화되고 항염증 인자(예: IL-4^{high}, IL-13^{high}, IL-10^{high}, IL-6^{low}, IL-12^{low} 및 IL23^{low})를 분비한다.

[0005] M2 대식세포는 주로 골형성, 혈관신생, 멜라닌형성 등과 같은 조직 치유 및 재생과 관련이 있다. 따라서 M1과 M2 대식세포 사이의 균형은 조직 재생 또는 염증의 운명을 결정한다. 생체 모방 스캐폴드는 대식세포의 표현형 가소성을 조작하는 데 사용할 수 있다.

[0006] 스캐폴드의 토폴로지, 표면 기능 그룹, 화학적 조성, 습윤성, 자가 조립 및 표면 거칠기는 주로 대식세포의 운명을 조절한다. 따라서 전염증 반응에서 항염증 반응으로의 상당한 변화는 IL-10, TGF- β (transforming growth factor- β), BMP-2(bone morphogenic protein-2), VEGF(vascular endothelial growth factor), 섬유아세포성장인자(FGF) 분비의 변화에 영향을 미칠 수 있다.

[0007] 뼈는 고도로 전문화되고 복잡한 조직으로, 주로 강성과 하니스(harness), 그리고 골 형성 및 조절 전구 세포의 항구를 특징으로 한다. 감염, 종창, 골절, 관절염, 골다공증, 골괴사 및 골육종(=골암)을 포함한 여러 병리학적 상태가 뼈 조직을 손상시킬 수 있다. 그 중 골절 치유 및 골육종에 대한 효과적인 전략은 적절한 정형외과/치료 진단 임플란트의 부족으로 인해 클리닉에서 여전히 어려운 과제로 남아 있다.

[0008] 뼈 결함을 치료하기 위해 지난 몇 년 동안 몇 가지 발전이 있었지만; 그러나 대부분의 정형외과 임플란트는 품질 관리 및 생체 내 안전성 문제를 입증하지 못하여 임상 시험에 부적절했다. 예를 들어, 성장 인자가 탑재된 정형외과용 임플란트는 이식 위험(예: 숙주 거부), 잘못된 면역 반응, 면역 억제 및 장기 손상을 포함한 심각한 건강 문제를 일으킨다. 동종 이식은 독성과 만성 감염을 어느 정도 유발하여 궁극적으로 골종양 형성으로 이어질 수 있다.

[0009] [선행 특허 문헌]

[0010] 대한민국특허 공개번호 10-2016-0049306

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 골재생과 항종양 효과를 가지는 삼차원 인쇄된 하이드로겔을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 젤라틴 메타크릴로일(GelMA) 및 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)을 포함하

는 3차원 인쇄가능한 다기능 하이드로겔을 제공한다.

- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 Y-폴리페놀 탄소 양자점(CQD)인 것이 바람직하고,
- [0014] 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 6-11 nm 입자 크기를 가지는 것이 바람직하며,
- [0015] 상기 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)은 1, 3, 5-트리하이드록시벤젠 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 골육종(Osteosarcoma) 치료용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 광열 처리 수단을 더욱 포함하는 것이 바람직하고,
- [0018] 상기 조성물은 항암제를 더욱 포함하는 것이 바람직하며, 상기 항암제는 독소루비신인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 항염증 및 골재생 개선용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 칼슘 이온 생산을 촉진하는 것이 바람직하고,
- [0021] 상기 조성물은 혈관신생(vascularization)을 촉진하는 것이 바람직하고,
- [0022] 상기 조성물은 대식세포 조건화된 배지를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0025] 뼈 조직 공학(BTE)에서 중요한 과제 중 하나는 국소 감염 및 지연된 혈관 신생으로 인해 회복하는데 더 오랜 시간이 필요한 외상성 조직 결함의 치유이다. 하이드로겔 드레싱, 성장 인자 전달 및 줄기 세포 요법과 같은 다양한 전략이 외상성 조직 복구에 대한 잠재적인 대안으로 나타났으나 사회 경제적 부담으로 인해 실제 임상 적용이 제한되었다.
- [0026] 본 발명에서는 내인성(뼈) 조직 복구 및 치료를 위한 젤라틴 메타크릴로일(GelMA) 및 폴리페놀 탄소 양자점(CQD)으로 구성된 3D 인쇄 가능한 '다기능' 나노하이브리드 스캐폴드에 관한 것이다(도 1). 생체 내 뼈 결함 모델에서 제작된 GelMA-CQD 스캐폴드는 약물/성장 인자의 보충 없이 8주 후에 뼈 치유를 가속화할 수 있었다.
- [0027] 본 발명의 인쇄된 스캐폴드는 또한 2D 및 3D 배양 모델에서 대식세포와의 면역 혼선을 통해 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSC)의 골 형성을 촉진할 수 있었다. CQD의 뛰어난 근적외선(NIR) 반응 특성은 독소루비신(Dox)의 조절된 전달을 통해 체외 골육종 치료에 활용되었다. 따라서 본 발명의 개발된 스캐폴드는 임상 사용을 위한 다중 모달 조직 재생에 대한 많은 전망을 가지고 있다.
- [0028] 상술하면, 본 발명은 뼈 재생 및 항종양 치료를 위한 폴리페놀 탄소 양자점(CQDs, 100 ug mL⁻¹)과 젤라틴 메타크릴로일(GelMA, 12 wt.%)을 구성하는 3D 인쇄 가능한 다기능 하이드로겔 스캐폴드를 제안한다. CQD는 습식 화학 방법을 통해 식물에서 영감을 받은 생체 활성 분자인 1, 3, 5-트리하이드록시벤젠(폴리페놀)에서 합성되었다. 3D 인쇄된 GelMA-CQDs 하이드로겔은 뛰어난 인쇄성과 함께 전형적인 전단 회석 거동을 보여주었다. 본 발명의 결과는 나노복합체 3D 하이드로겔이 항염증 유전자(예: IL-4 및 IL10)의 상향 조절을 통해 대식세포(Raw 264.7) 세포의 M2 분극화를 촉진하고 인간 뼈 중간엽 줄기 세포(hBMSC)의 혈관신생 및 골형성을 유도함을 입증했다. 바이오프린팅된 hBMSC는 배양 14일 후에 GelMA-CQDs 하이드로겔의 존재 하에 혈관 유사 구조를 생성할 수 있었다. 또한, 3D 인쇄 스캐폴드는 808nm NIR 광(1.0W cm⁻²) 조사에서 현저한 근적외선(NIR) 반응 특성을 보여주었고 pH 6.5에서 항종양 약물의 제어 방출(~49%)을 보여 골육종 세포를 사멸하였다. 따라서 본 발명자들은 3D 프린팅된 GelMA-CQD 스캐폴드의 치료 가능성이 있는 조직 재생 및 치유 능력이 혈관 신생 및 가속화된 면역 조절을 통해 외상성 조직 재생을 위한 유망한 대안을 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

발명의 효과

[0030]

본 발명은 골 면역성을 개선하기 위한 골 형성 및 면역 조절 특성을 모두 가진 CQD 조작 하이드로젤 잉크의 제조를 입증한다. 또한 뛰어난 광열 및 빛 유도 제어 약물 방출 메커니즘은 단일 하이드로젤 내에서 골육종 박멸 및 동시 뼈 재생을 위한 새로운 기능적 전략을 제공한다. 개발된 바이오잉크는 hBMSCs 및 hECs에 매우 전단 희석되고 우호적이며 CQD의 생체 적합성 및 증식 특성으로 인해 혈관 신생을 유도한다. 복합 바이오잉크는 Raw 264.7 세포를 hBMSC의 골형성 분화를 촉진하는 M2 표현형으로 극성화하는 데 도움을 주었다. 생체 내 결과는 제작된 GelMA-CQD 스캐폴드가 새로운 뼈 형성에 긍정적인 역할을 하고 충분한 기계적 안정성을 제공했음을 시사한다. 전체적으로, 본 발명은 더 나은 골융합을 위한 면역분극, 종양 세포사멸 및 골 면역을 통해 나노 탄소 물질을 사용하여 뼈 치유 및 재생의 새로운 전략을 강조한다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 polyphenolic CQDs-incorporated hybrid scaffold에 의한 조직 복구 및 재생 메커니즘의 개략도.

도 2는 GelMA-CQD 바이오잉크의 최적화를 나타낸 그림으로, (a) 바이오잉크 제형 및 최적화 전략의 개략도. (b) 0.1 ~ 100 Rad s⁻¹ 범위 내에서 제작된 GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y 바이오잉크의 전단 계수(G' 및 G''). (c) 순수한 GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y 바이오잉크의 전단 속도($\dot{\gamma}$)의 함수로서 점도(η)는 0.1 ~ 100 s⁻¹ 이내. (d) 상응하는 정량화 데이터로 필라멘트 형성에 대한 압출 속도 및 인쇄 압력의 최적화. (e) GelMA-Y 바이오잉크에 대한 최적화된 인쇄 매개변수. 다양한 충전 구성을 가진 3D 인쇄 GelMA-Y 하이드로젤의 대표적인 디지털 사진 및 현미경 이미지. (f) GelMA-Y를 구성하는 바이오프린팅 구조물에서 배양 14일 후 hEC^{Di1}(적색) 및 hBMSC^{FITC}(녹색)의 대표적인 FL 현미경 이미지. 축척 막대: 100 μ m, 0.2mm 및 0.4mm.

도 3은 제작된 GelMA-Y 스캐폴드의 시험관 내 항-골육종 효과를 나타낸 그림으로, (a) 제작된 스캐폴드의 근적외선 반응에 대한 개략도. (b) 808 nm NIR 레이저(1 W cm⁻²) 조사 시 시간 함수로서의 온도 프로파일. 데모 목적으로 해당 열화상이 표시됨. (c) 808nm NIR 광 조사 하에서 3회 온/오프 주기 후 GelMA-Y 하이드로젤의 온도 안정성. (d) 개발된 하이드로젤의 광열 변환 효율(PCE). (e, f) 약물 로드 3DP 스캐폴드의 대표적인 디지털, 형광 및 초미세 구조 이미지. (g) GelMA-Y 스캐폴드의 약물 적재 효율. (h) 순수한 TEMPO, GelMA-Y@Dox 및 레이저 처리된 GelMA-Y@Dox의 EPR 스펙트럼은 일중항 산소(¹O₂) 피크의 존재를 보여줌. (i-k) NIR 광 조사 유무에 관계없이 다양한 pH 완충액(pH 6.5 및 7.4)에서 대표적인 Dox 방출 연구. 37° C에서 Higuchi 및 Korsmeyer-Peppas 동역학 모델에 대한 누적 Dox 릴리스 피팅 데이터. (l, m) 808 nm NIR 레이저 조사 후 MG-63 세포의 세포독성 평가. 808nm NIR 광 처리 후 살아있는(녹색) 세포와 죽은(적색) 세포의 존재를 보여주는 MG-63 세포의 대표적인 FL 현미경 이미지. 세포 생존력은 WST-8 분석을 사용하여 평가됨. (n) NIR 유발 저체온증 및 ROS 유발 골종양 조사의 가상 도면. 축척 막대: 20 μ m, 200 μ m 및 0.2mm. 데이터는 평균 \pm 표준 편차로 표현. (n = 3), *p < 0.05 및 **p < 0.01에서 통계적 유의성.

도 4는 GelMA-CQD 스캐폴드는 대식세포 생존력을 향상시키고 인 비트로에서 M2 분극화를 촉진하는 것을 나타낸 그림으로, (a) M2 분극화 및 골-면역 조절에 대한 개략도. (b) 배양 24시간 후 GelMA-CQD 스캐폴드의 존재 하에 살아있는/죽은 형태를 나타내는 Raw 264.7 세포의 FL 현미경 이미지. 점선은 인쇄된 가닥을 나타냄. (d, e) 스캐폴드에서 성장하는 평균 세포 질량 및 회전 타원체의 정량화. (e) 액틴 분포 및 분기 패턴을 보여주는 Raw 264.7 세포의 대표적인 FL 이미지. (f) 다양한 발판의 존재 하에서 M2 편향을 보여주는 Raw 264.7 세포의 광학 현미경 사진. (g) 배양 24시간 및 48시간 후 다양한 처리군에서 M2 대식세포의 평균 길이(장축). (h) NOS2(M1) 및 CD163(M2) 마커에 대한 3D 스캐폴드의 존재 하에 Raw 246.7 세포의 유세포 분석. (i) 배양 24시간 후 NOS2 및 CD163 마커의 면역세포화학적 염색. (j) 배양 24시간 후 Tnf α , IL-1b, IL4 및 IL10의 발현을 보여주는 qRT-PCR 결과. 축척 막대: 50, 75, 150 μ m 및 0.2 mm. 데이터는 평균 \pm 표준 편차로 표현, (n = 3), *p < 0.05 및 **p < 0.01.

도 5는 hBMSCs의 시험관내 혈관신생 및 골형성 능력을 나타낸 그림으로, (a) bioprinted 구조물의 존재 하에서 혈관 신생 스프라웃을 보여주는 hBMSC의 대표적인 명시야 및 FL 이미지. (b, c) 생체 인쇄 구조 내부의 스프라웃 수 정량화. (d, e) 혈관 신생 새싹의 살아있는/죽은 분석의 정량화. (f) 제작된 스캐폴드의 존재 하에 ARS+ 세포의 존재를 보여주는 상응하는 현미경 이미지를 사용한 대표적인 ARS 염색. (g) 배양 14일 후 hBMSCs의 ARS 정량화 시험. (h) 인큐베이션 14일 후 제조된 스캐폴드의 존재 하에 hBMSCs의 ALP 활성화. (i) 칼슘 함량 분석의 정량화 데이터. (j, k) 배양 14일 후 골형성 관련 유전자 마커에 대한 qRT-PCR 분석. (l) 면역원성 마커로 염색한 후 hBMSC의 FL 이미지: Runx2(녹색), ALP(녹색) 및 OPN(빨간색). 축척 막대: 100 및 150 μ m. 데이터는 평균

± 표준 편차로 표현, (n = 3), *p < 0.05 및 **p < 0.01.

도 6은 hBMSC에 대한 대식세포 조절 배지(M-CM)의 골면역 조절 효과 평가를 나타낸 그림으로, (a, c) 배양 7일 및 14일 후 hBMSC의 2D 배양의 광학 현미경 사진이 있는 대표적인 ARS 스테인드 플레이트. (b, d) 2D 배양 시스템의 ARS 정량화. (e) 배양 14일 후 3D 배양에서 hBMSC의 광학 현미경 사진이 있는 ARS 염색 플레이트. (f) 3D 배양 시스템의 ARS 정량화. (g, h) 골-면역 조절 14일 후 상응하는 정량화 데이터를 갖는 hBMSC 회전 타원체의 대표적인 H&E 및 Massion's Trichrome 염색. (i) 배양 14일 후 Runx2 및 OCN 마커의 발현을 보여주는 2D 및 3D 배양에서 hBMSC의 FL 현미경 이미지. 축척 막대: 100 μm. 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표현, (n = 3), *p < 0.05 및 **p < 0.01.

도 7은 3D 프린팅 스캐폴드의 생체 내 뼈 재생 가능성을 나타낸 그림으로 (a) 쥐의 수술 절차와 스캐폴드 이식의 디지털 사진. 노란색 점선 원은 관심 영역을 나타냄. (b, c) 이식 후 8주 후 골 회복률 및 골밀도(BMD)의 정량화 데이터. (d) 새로운 뼈 형성(검은색 점선 원)을 보여주는 석회화된 쥐 스킴의 대표적인 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(μCT) 이미지. (e) 혈관화 된 뼈 재생을 나타내는 calvaria 결함 영역의 대표적인 hematoxylin 및 eosin (H & E) 염색 이미지. 스캐폴드 처리가 없는 쥐는 대조군으로 간주. GelMA 및 GelMA-Y 스캐폴드가 있는 쥐를 +ve 대조군 및 실험군으로 간주. 검은색 선은 관심 영역을 나타냄. FT, IO, MO, NB, BV는 각각 섬유조직, 미성숙 골세포, 성숙 골세포, 신생골, 혈관을 나타낸다. 노란색 화살표는 골아세포 라이닝의 존재를 나타낸다. 축척 막대: 500 μm, 1mm 및 2cm. 보고된 데이터는 평균 ± 표준 편차. 삼중 실험(n = 3)의 경우, *p < 0.05 및 **p < 0.01에서 통계적 유의성을 고려한 반면, n.s. 중요하지 않은 값을 나타냄.

도 8(a) G-CQD 및 (b) Y-CQD의 HR-TEM 이미지. 축척 막대: 5nm.

도 9(a) G-CQD 및 Y-CQD의 XRD 스펙트럼. (b) 준비된 G-CQD 및 Y-CQD의 라만 스펙트럼. (c) G-CQD 및 Y-CQD의 FT-IR 스펙트럼.

도 10(a) G-CQD 및 Y-CQD의 XPS 총 측량 스펙트럼. (b, c) G-CQD 및 Y-CQD의 XPS 고해상도 C1s 스펙트럼.

도 11은 G-CQD 및 Y-CQD의 UV-Vis 스펙트럼.

도 12 (a) G-CQD 및 (c) Y-CQD의 PL 여기 의존 방출 스펙트럼. (b) G-CQD 및 (d) Y-CQD 방출의 대표적인 색 등고선 맵.

도 13은 인쇄된 하이드로겔의 물리화학적 특성을 나타낸 그림으로, (a) 다공성 및 박편 특성을 보여주는 개발된 하이드로겔 스캐폴드의 FE-SEM 이미지. (b) 하이드로겔 스캐폴드의 평균 기공 크기. (c) 개발된 하이드로겔 스캐폴드의 팽창률. 축척 막대: 100 μm. 데이터는 3개의 독립적인 이미지의 평균 ± sd, **p < 0.01에서 통계적 유의성.

도 14는 300초의 시간 프레임 내에서 개발된 GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y 하이드로겔의 회복 가능성.

도 15는 hBMSCs의 M-CM perpetration 및 osteo-immunomodulation 연구의 그래픽 설명.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0033] 본 발명에 사용된 재료 및 장치와 관련하여, 돼지 피부 유래 B형 젤라틴(순도: >98%), 1,3,5-트리하이드록시벤젠(폴로로글루시놀, C7H6O4), 황산(H2SO4), 메타크릴산 무수물(순도 >94%) 및 리튬 페닐-2,4, 6-트리메틸벤조일 포스피네이트(LAP)는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다. 모든 재료는 달리 명시되지 않는 한 받은 그대로 사용되었다. Milli-Q 물(18.2 MΩ cm⁻¹@25 ° C)은 CQD 및 기타 고분자 재료의 합성에 사용되었다. HR-TEM(JEM 3010, Jeol, Japan) 및 FE-SEM(Jeol, Japan)을 사용하여 CQD 및 폴리머 스캐폴드의 형태를 평가하였다. UV-Vis 분광광도계(Varian Cary 100, Nevada, USA) 및 PL 분광계(Quanta Master, Photon Technology International, New Jersey, USA)를 사용하여 CQD의 발광 특성을 평가했다. FT-IR 분광광도계(Bruker Vertex 70, Bruker, Massachusetts, USA)를 사용하여 CQD와 폴리머 스캐폴드의 기능적 특성과 화학적 상호작용을 측정했다. CQD의 표면 작용기 및 상호 작용은 X-선 소스를 트윈 애노드(Al-Kα, hv = 1486.6 eV) 건과 단색 건을 사용한 XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)를 사용하여 조사했다. CQD의 구조적 특징은 4kW X-선 발생기와 D/TeX Ultra 250 검출기 시스템이 장착된 X-선 회절계(XRD, Smart-Lab, Rigaku, Japan)를 통해 평가되었다. 라만 스펙트럼은 여기 레이저가 633 nm인 마이크로 라만 분광광도계(ANDOR Monora500i, Oxford Instruments, UK)를 사용하여

기록되었다.

[0034] 실시예 1: CQD의 합성

[0035] 200mg의 1,3,5-트리하이드록시벤젠을 2mL의 DI 물 및 2mL의 농축된 H₂SO₄와 혼합하고 연한 황색 용액이 얻어질 때까지 30분 동안 교반하였다. 다음으로, 황색 용액을 100mL 유리 비이커에 취하고 190°C로 예열된 오븐에 넣었다. G-CQD와 Y-CQD는 각각 반응 50분과 90분 후에 얻었다. 그 후, 비이커를 오븐에서 꺼내 상온에서 냉각시켰다. 다음으로, 2 mL의 DI 물을 반응 혼합물에 첨가하고 용액을 13,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 CQD를 수집하였다. 수득된 덩어리를 DI 수로 3회 세척한 다음, DI 수에 대해 셀룰로오스 에스테르 막(M.W. 컷오프: 500 kDa)으로 적어도 72시간 동안 투석하였다. 투석 후 얻어진 생성물을 순수 에탄올에 분산시키고 0.22 μ m 셀룰로오스 아세테이트 멤브레인을 사용하여 여과하였다. 상기 단계를 세 번 반복했다. 마지막으로, 얻은 흑갈색 덩어리를 에탄올에 재분산하고 진공 오븐에서 48시간 동안 건조하여 흑색 CQD 분말을 얻었다.

[0037] 실시예 2: 메타크릴화 젤라틴(GelMA)의 합성

[0038] 젤라틴 B형 분말 10g을 50° C에서 1X PBS(pH 7.4)에 용해한 다음 메타크릴산 무수물(MA) 2mL를 2시간 동안 첨가했다. 2시간 후, 반응을 2-4배 따뜻한 PBS를 사용하여 쉐킷하고 실온에서 10-15분 동안 방치하였다. 그 후 메타크릴화 젤라틴 용액을 5-7일 동안 DI water에 대해 셀룰로오스 에스테르 멤브레인(M.W. cut-off: 14 kDa)을 사용하여 투석하여 미반응 MA와 아크릴산을 제거하였다. 다음으로, 투석된 생성물을 진공 농축하고 7일 동안 동결 건조하여 백색의 GelMA 폼을 얻었다. 순수 GelMA 폼은 추가 사용 전까지 -20° C에서 보관되었다.

[0040] 실시예 3: GelMA-CQD 바이오잉크의 제작 및 특성화

[0041] 바이오잉크 제조를 위해 12wt.% GelMA를 1X PBS에 용해하고 일정량의 G- 및 Y-CQD(100 μ g/mL⁻¹)를 45° C에서 일정한 자기 교반 하에 첨가했다. CQDs 농도는 인 비트로 실험에 따라 선택되었다. 그 후, 0.25%(w/v) 광개시제(LAP)를 혼합물에 첨가하고 다시 15분 동안 교반하였다. 준비된 프리젤 용액을 인쇄 카트리지에 로드하고 추가 사용까지 섭씨 4도로 유지했다. 하이드로겔은 60초 동안 365nm UV 광(5W) 하에서 가교결합되었다. UV 노출 후 얻은 갈색 용액은 glass vial tilting 방법을 통해 예측한 바와 같이 반투명한 하이드로겔로 변했다.

[0042] 세포 배양 실험을 위해 인쇄되고 가교된 하이드로겔을 1X PBS(pH 7.4)로 여러 번 세척하여 미반응 폴리머 및 광개시제를 제거했다. 바이오잉크는 GelMA-'x'로 지정되었으며, 여기서 'x'는 CQD를 나타낸다. 세 가지 다른 유형의 바이오잉크가 각각 GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y로 공식화되고 명명되었다.

[0043] 제조된 바이오잉크의 점탄성 특성은 25° C에서 8mm 평행판이 있는 회전 레오미터(ARES G2, TA Instruments, USA)를 사용하여 평가되었다. 바이오잉크는 25° C에서 주파수($\omega = 0.1 \sim 100 \text{ Rad s}^{-1}$ 범위) 및 흐름($\dot{\gamma} = 0.1 \sim 100 \text{ s}^{-1}$ 범위) 스윙을 통해 특성화되었다. UTM(A&D Digital, Tokyo, Japan) 기계를 사용하여 일정한 힘으로 일축 압축 하중을 통해 하이드로겔 스캐폴드(1 x 1cm 디스크)의 기계적 특성을 평가했다. 제작된 스캐폴드의 팽윤 효율 및 분해 특성은 본 발명자의 기존 연구에서 보고된 바와 같이 평가되었다(Reeves AR, Spiller KL, Freytes DO, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Controlled release of cytokines using silk-biomaterials for macrophage polarization. *Biomaterials*. 2015;73:272-83; Ye J, Xie C, Wang C, Huang J, Yin Z, Heng BC, et al. Promoting musculoskeletal system soft tissue regeneration by biomaterial-mediated modulation of macrophage polarization. *Bioactive Materials*. 2021;6:4096-109).

[0044] 실시예 4: 제작된 하이드로겔의 광열 특성

[0045] 광열 측정을 위해 CQD를 포함하는 가교된 하이드로겔을 1.5 mL Eppendorf 튜브에 넣고 808 nm NIR 레이저(CNI Lasers, Changchun, China)를 사용하여 1.0 W cm⁻²의 전력 밀도에서 360초(= 6분) 동안 조사했다. NIR 카메라(FLIR-E6390, FLIR, Sweden)를 사용하여 하이드로겔의 온도 변화를 기록하였다. CQD가 없는 하이드로겔을 대조군으로 삼았다. GelMA-Y 하이드로겔의 광열 안정성은 6분의 가열 및 냉각 주기로 근적외선을 조사하여 측정하고 온도 변화를 시간의 함수로 기록했다.

[0046] GelMA-Y 하이드로겔의 광열 변환 효율(PCE)은 이전 보고서[Chen Y, Chen L, Wang Y, Lin K, Liu J. Lithium-containing bioactive glasses enhanced 3D-printed PLGA scaffolds for bone regeneration in diabetes.

Composites Part B: Engineering. 2022;230:109550; Wang Y, Yuan X, Ye J, He F. Effects of zinc/gallium dual doping on the physicochemical properties and cell response of 3D printed tricalcium phosphate ceramic scaffolds. Ceramics International. 2022;48:28557-64]에 따라 계산되었다. NIR 조사 선량은 6분 동안 1.0 W cm⁻²였다. DI 물은 음성 대조군으로 사용되었다. PCE(η)는 다음 방정식 (1)을 사용하여 계산되었다.:

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{surr}) - Q_{Dis}}{I(1 - 10^{-A\lambda})} \quad (1)$$

여기서 h, A, Tmax 및 Tsurr는 각각 열전달 계수, 튜브 표면적, 평형 온도(63.4° C) 및 주변 온도(27.3° C)를 나타낸다. I는 입사 레이저 소스의 출력 밀도이고 Aλ는 808nm에서 GelMA-Y 하이드로겔의 흡광도이다.

hA는 다음 방정식 2에서 결정할 수 있다.

$$\tau_s = \frac{M_D \times C_D}{hA} \quad (2)$$

여기서 τs는 GelMA-Y 하이드로겔의 냉각 프로파일에서 얻은 실험 시스템의 시정수를 나타낸다. MD 및 CD는 DI water의 질량(1.2g) 및 열용량(4.2J g⁻¹)을 나타낸다. τs를 계산하기 위해서는 θ의 값을 고려하여 다음 식 (3)과 같이 결정해야 한다.:

$$\theta = \frac{\Delta T}{\Delta T_{max}} \quad (3)$$

여기서 ΔT는 용액온도와 상온의 온도차이고 ΔTmax는 최대 정상상태 온도에서의 온도차이다. 따라서 τ의 값은 다음 식(4)에 따라 냉각 시간 대 -ln(θ)의 선형 플롯의 기울기에서 결정될 수 있다. :

$$t = -\tau(\ln\theta) \quad (4)$$

따라서, 각각 hA의 값은 0.012로 계산되었고, GelMA-Y 하이드로겔의 PCE는 η = ~49.54%로 측정되었다.

실시예 5: GelMA-CQD 바이오잉크의 3D 바이오프린팅

GelMA-CQDs 하이드로겔의 3D 프린팅은 이전 연구(Dutta SD, Hexiu J, Patel DK, Ganguly K, Lim K-T. 3D-printed bioactive and biodegradable hydrogel scaffolds of alginate/gelatin/cellulose nanocrystals for tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;167:644-58)에서 설명한 대로 수행되었다. 3D 바이오프린팅을 위해 hBMSCs(4×10⁴ 세포)와 hECs(4×10⁴ 세포)를 Dil(Sigma-Aldrich, USA) 또는 FITC(SCBT, USA) 염료로 30분 동안 미리 염색했다. 그 후, 세포를 원하는 양의 하이드로겔 잉크와 혼합(1:1 비율)하여 각각 2 x 10⁴의 최종 세포 농도를 달성했다. 그 후, 세포 함유 잉크를 미리 냉각된 24-웰 플레이트에 층별로 압출하고 30-60초 동안 365nm UV 광을 사용하여 즉시 가교결합했다. UV 가교 후, 바이오프린팅된 구조물을 DMEM 배지와 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, DMEM 배지를 Opti-MEM/Hams F12 배지로 교체하여 hBMSCs의 섬유아세포 분화 및 혈관신생 유도를 유도하였다. 다음으로, 세포 이동 및 내피 내강 형성을 연구하기 위해 원하는 배양 기간 후에 도립형 FL 현미경(Leica, 독일)을 사용하여 세포를 촬영하였다. Opti-MEM/Hams F12 배지를 매일 교체하여 배양 세포에 신선한 영양분을 공급할 수 있도록 했다.

실시예 6: 대식세포 생존력 및 분극화 연구

Raw 264.7 세포(마우스 단핵구)에 대한 3DP 스캐폴드의 유도 효과는 다음과 같이 cytometry 및 fluorometry 방법을 통해 조사되었다.

(A) 제조된 스캐폴드의 존재 하에서 Raw 264.7 세포의 생존력은 배양 24시간 후 Live/Dead 분석을 사용하여 평가되었다. 요약하면, Raw 264.7 세포(4 x 10⁴ 개 세포/500 μL/웰)를 멸균 3DP 스캐폴드가 포함된 DMEM 배지에서 배양했다. 24시간 후, 세포를 10uL의 Live/Dead 염료로 염색하고 제조사의 지침에 따라 실험을 수행했다. 스캐

폴드 표면의 세포 덩어리 수는 NIH ImageJ 소프트웨어(v1.8, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량화되었다.

- [0064] (B) 24시간 배양 후 ICC를 통해 극성화된 대식세포의 F-액틴 형태 및 분지 패턴을 평가하였다. 이를 위해 스캐폴드 처리된 Raw 264.7 세포를 4% PFA 용액으로 고정하고 상기에서 설명한 대로 염색 절차를 수행했다.
- [0065] (C) 대식세포 분극화는 형태학적 관찰, 유세포 분석, ICC 염색 및 qRT-PCR 방법으로 각각 검사하였다. Raw 264.7 세포는 배양 48시간 후 명시야 현미경(DMi8, Leica, Germany)에서 촬영되었다. 각각 가늘고 긴 막대 모양의 세포는 M2 극성화 대식세포로 간주되었고 구형에서 타원형 세포는 M1 극성화 대식세포로 간주되었다.
- [0066] 세포 측정 분석을 위해 Raw 264.7 세포 현탁액을 4% 파라포름알데히드로 5분 동안 고정하고 0.1% Triton-X 100으로 투과시킨 다음 Fc 수용체 차단제(AAT Bioquest, CA, USA)와 10분 동안 배양했다. 차단 후, 세포를 NOS2(sc-7271, SCBT, USA, M1 마커, SCBT, USA, 1:500) 및 CD163(sc-33715, M2 마커, SCBT, USA, 1:500)에 대한 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 형광 2차 항체(m-IgG kappa BP-FITC, sc-516140, SCBT, USA, 1:500)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 PBS로 2회 행구고 유세포 분석을 위해 1 mL의 PBS에 재현탁하였다. 488 nm 여기 레이저를 사용하여 세포를 분류하고 NOS2 및 CD163 양성 세포의 백분율을 찾기 위해 모집단을 M1에 게이팅했다. ICC 염색을 위해 Raw 264.7 세포를 4% PFA 용액으로 고정하고 염색을 상기에서 언급한 대로 수행했다.
- [0067] (D) 스캐폴드 유무에 관계없이 전염증(TNF α 및 IL-1 β) 및 항염증(IL-4 및 IL-10) 유전자 마커의 활성화를 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR은 이전 연구[Reeves AR, Spiller KL, Freytes DO, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Controlled release of cytokines using silk-biomaterials for macrophage polarization. *Biomaterials*. 2015;73:272-83;Ye J, Xie C, Wang C, Huang J, Yin Z, Heng BC, et al. Promoting musculoskeletal system soft tissue regeneration by biomaterial-mediated modulation of macrophage polarization. *Bioactive Materials*. 2021;6:4096-109; Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25:677-86]에서 보고된 대로 수행되었다. 요약하면, RNazol 시약(Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리하고 cDNA 합성 키트(RevertAid First Strand cDNA 합성 키트, Thermo-Fischer Scientific, USA)를 제조업체 지침에 따라 수행했다. CFX96 Maestro 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad, USA)을 사용하여 GAPDH를 loading control로 사용하여 PCR 실험을 수행하였다. qRT-PCR 분석에 사용되는 지정된 프라이머 서열은 표 1에 나열되어 있다.

표 1

Genes	포워드 프라이머(5' → 3')	포워드 프라이머(5' → 3')
<i>TNF α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-1</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	AAGGTCCACGGAAAGACAC
<i>IL-4</i>	CCATATCCACGGATGCGACA	AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC
<i>IL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Runx2</i>	AGATGATGACACTGCCACCTCTG	GGGATGAAATGCTTGGGAAGTGC
<i>ALP</i>	GTGCCAGAGAAAGAGAGAGAC	GACGCCATACCATCTCC
<i>OCN</i>	GAGTCTGACAAAGCCTTCA	GAGTCTGACAAAGCCTTCA
<i>OPN</i>	CCCACAGACCTTCCAAGTA	ACACTATCACCTCGGCCATC
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCA	TCCACCACCTGTTGCTGT

[0069] 표 1은 마우스(Raw 264.7 세포) 및 인간(hBMSCs) 세포의 qRT-PCR 분석에 사용되는 특정 유전자 프라이머 서열.

[0071] 실시예 7: 인 비트로 골면역 조절

[0072] 인 비트로 골면역 조절 연구는 2D(세포 시딩) 및 3D(스페로이드) 배양 시스템 모두에서 대식세포 조절 배지(M-CM)의 존재 하에 수행되었다. 자세한 실험 절차는 그림 S7.6에 개략적으로 설명되어 있다. 요약하면, 50mg의 3DP 스캐폴드를 DMEM 배지와 혼합하고 밤새 37° C에서 배양하여 스캐폴드 침출 배지를 얻었다. 그 후, Raw 264.7 세포를 침출 배지와 함께 배양하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 대식세포 성장판으로부터 배양 배지를 수집하고 3,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 잔해물을 제거하였다. 투명한 상등액은 M-CM으로 간주하

였다. 3개의 다른 스캐폴드를 기반으로 M-CM은 각각 M-CM(G), M-CM(GG) 및 M-CM(GY)로 명명되었다. 다음으로, hBMSCs를 M-CM 존재하에 14일 동안 배양하고 ARS 염색을 통해 골면역 조절 가능성을 연구하였다. 광물화 결정 형성 사진을 촬영하고 본 명세서에 설명된 대로 칼슘 함량을 측정했다. 실험은 세 번 반복되었으며(n = 3) 데이터는 평균 ± 표준 편차로 기재된다.

[0074] 실시예 8: 약물 로딩 및 방출 연구

[0075] 약물 로딩 및 방출 연구를 위해 두 가지 모델 항암제인 독소루비신(Dox)과 파클리탁셀(PTX)이 선택되었다. GelMA-Y@Dox 및 GelMA-Y@PTX 복합체는 약물 용액을 3DP 스캐폴드와 함께 인큐베이션하여 제조되었다.

[0076] 요약하면, 동결 건조된 3DP GelMA-Y 스캐폴드(180mg)를 100mg/mL의 각 약물 용액과 함께 배양하고 주변 온도에서 밤새 계속 교반했다. 그 후, 약물 적재 스캐폴드를 탈이온수로 행구어 결합되지 않은 약물을 제거하고 24시간 동안 동결건조시켰다. DLE(Drug Loading Efficiency)는 UV-Vis spectrophotometer(Softmax Pro, Molecular Devices, CA, USA)를 통해 측정하였다. 약물 로딩 효율은 다음 식 (5)에 따라 결정되었다.:

[0077]
$$DLE (\%) = \frac{\text{Amount of drug in GelMA - Y}}{\text{Initial amount of drug}} \quad (5)$$

[0078] 약물 부하 스캐폴드는 또한 약물 부하 후 형태를 관찰하기 위해 형광 현미경 및 FE-SEM을 사용하여 특성화되었다. 종양 세포의 고유한 생리학적 환경을 모방하기 위해, 약물이 로딩된 스캐폴드를 다양한 pH(6.5 및 7.4)의 PBS 10mL에 담그고 시스템을 37°C에서 약간 교반하면서 배양했다. 이것은 종양 세포의 간질액 및 엔도리소솜 pH를 나타낸다. 원하는 시점 이후에 완충액 1mL를 꺼내고 새로운 완충액 1mL로 교체했다. 약물 방출량은 UV-Vis 측정을 통해 정량화되었다. Dox 및 PTX의 흡수 스펙트럼은 각각 490nm 및 227nm이다. 근적외선 처리 그룹의 경우 약물이 적재된 스캐폴드를 배지 수집 직전 6분 동안 808 nm 근적외선 레이저로 처리했다. 실험은 세 번 반복되었으며(n = 3) 데이터는 평균 ± 표준 편차로 기재된다.

[0079] 실시예 9: 근적외선 유발 항골육종 치료법

[0080] GelMA-Y@Dox 스캐폴드는 NIR 빛이 있는 pH 6.5에서 Dox의 더 높은 방출 프로파일로 인해 본 발명을 위해 선택되었다. MG-63 세포(2.5×10^4 세포/100 μ l/96-웰)를 24시간 동안 GelMA-Y@Dox 스캐폴드의 존재 하에 배양하였다. 스캐폴드가 없는 플레이트(2D 배양)를 음성 대조군으로 간주했다. GelMA, GelMA-G, GelMA-Y 처리된 세포가 있는 플레이트를 양성 대조군으로 사용했다. GelMA-Y@Dox 및 GelMA-Y@Dox + 레이저를 각각 처리군으로 취하였다. 레이저 그룹은 단일 실험을 위해 1회 6분 동안 1.0 W cm^{-2} 의 선량을 받았다. 원하는 배양 후, 플레이트를 Live/Dead 염료로 염색하고 도립 형광 현미경(DMi8, Leica, Germany)을 사용하여 시각화했다. WST-8 분석을 사용하여 상대 세포 생존력도 측정했다. 제작된 스캐폴드의 항증식 효과를 알아보기 위해 인간/마우스 cleaved caspase-3 ELISA 키트(R&D Systems, USA)를 사용하여 caspase-3 활성을 조사하였다. 실험은 세 번 반복되었으며(n = 3) 데이터는 평균 ± 표준 편차로 기재된다.

[0082] 실시예 10: 생체 내 뼈 재생 연구

[0083] 3D 인쇄된 GelMA-Y 스캐폴드의 생체 내 뼈 재생 가능성은 이식 후 8주 후 calvaria 치명적인 결함 모델에서 조사되었다. 모든 동물 실험은 베이징 수도 의과 대학 IACUC(허가 번호 KQYY-201912-003)의 지침에 따라 수행되었다. 9주령의 Sprague-Dawley(SD; n = 9) 수컷 쥐를 생체 내 연구에 사용했다. GelMA-Y로 구성된 전층 골 이식편(10 × 1mm, 충전 밀도: 100%)을 생체 내 골 재생 연구에 사용했다. 쥐를 무작위로 세 그룹으로 나누었다:

- [0084] (1) 스캐폴드 치료를 받지 않음(음성 대조군; n = 3),
- [0085] (2) GelMA 스캐폴드를 받음(양성 대조군; n = 3),
- [0086] (3) GelMA-Y 스캐폴드를 받음(실험군; n = 3).

[0087] 수술 전에 쥐에게 0.5% Avertin(Sigma-Aldrich, USA)을 주입했다. 그 후 오른쪽 두정골에 10 mm 원형 결함을 만들고 요오드 용액(1X PBS에 0.1% 요오드)으로 세척했다. 다음으로, 무균 스캐폴드를 결함 부위에 이식하고 피부를 조심스럽게 봉합했다. 원하는 시간 후에 쥐를 안락사시키고 전체 두개골을 4% PFA로 4°C에서 밤새 고정했다. 그 후, 고정된 두개골을 건조시키고 가속 전압 50kV, 전류 800 μ A, 분해능 30 μ m의 μ CT 스캐너

(Skyscanner1174, Bruker, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0088] 다음으로 직경 10mm, 두께 80mm의 원통형 영역을 만들고 관심 영역(ROI)으로 지정했다. 뼈 회복률과 골밀도(BMD)는 소프트웨어의 지침에 따라 계산되었다. 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 위해 고정된 두개골을 12% EDTA 용액(pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 탈회하고 마이크로톰 절편을 위해 파라핀에 매립했다. H&E 염색을 위해 5 μm 두께의 슬라이스를 고려했다. 제조사의 지시에 따라 H&E 염색 키트(Abcam, USA)를 이용하여 염색하였고, 광학현미경을 이용하여 신생골 형성을 관찰하였다.

[0090] 상기 실시예의 통계 분석은 Origin Pro v9.0 소프트웨어(Origin Lab, USA)를 이용하여 수행하였다. 대조군과 처리군 간의 유의성 차이를 결정하기 위해 일원 분산 분석(ANOVA) 테스트를 수행했다. 데이터는 *p < 0.05 및 **p < 0.01에서 통계적 유의성, 삼중(n = 3) 실험의 평균 ± 표준 편차로 기재된다.

[0091] 참고예

[0092] CQD 입자의 특성

[0093] CQD는 식물에서 영감을 받은 폴리페놀 분자인 플로로글루시놀(1,3,5-트리하이드록시벤젠)에서 합성되었다. 열 가열 과정에서 황산 환경에서 삼분자 반응 경로를 통해 -H 및 -OH 그룹을 제거하여 여러 플로로글루시놀 분자가 융합되어 고리 구조를 형성한다. G- 및 Y-CQD 입자의 형태는 고해상도 투과 전자 현미경(HR-TEM)으로 관찰하였다. 도 8(a, b)에서 볼 수 있듯이 G- 및 Y-CQD의 평균 입자 크기는 각각 ~5-7 nm 및 ~6-11 nm였다. 또한, 두 CQD 모두 0.22 nm의 뚜렷한 라인 간격을 나타내어 (100) 평면의 면간 분리를 보여주며, 따라서 결합이 없는 그래핀 또는 그래핀 유사 구조를 부여한다. 이러한 결과는 합성된 나노입자가 CQD임을 확인하였다.

[0094] CQD의 구조적 특성

[0095] CQD의 구조적 특성은 X선 회절(XRD), 라만 및 FT-IR(푸리에 변환 적외선) 분광법으로 평가했다. XRD는 CQD 입자의 위상 및 미세 구조를 결정하기 위해 수행되었다. 도 9(a)에서 볼 수 있듯이 G- 및 Y-CQD는 그래핀 구조의 (001) 평면에 할당된 2θ = 23.9° 및 22.6° 에서 넓고 선명한 피크를 나타냈다. Y-CQD의 회절 피크가 G-CQD보다 좁다는 것은 흥미로웠는데, 이는 황산에서 플로로글루시놀의 더 긴 배양과 더 긴 가열 시간이 더 높은 결정성을 가진 더 큰 입자의 형성을 촉진할 수 있음을 의미한다. CQD의 상속 특성을 이해하기 위해 라만 스펙트럼을 기록했다.

[0096] 도 9(b)에서 볼 수 있듯이 CQD의 라만 스펙트럼은 열 가열 공정 동안 상당한 양의 흑연화를 나타냈으며 이는 ~1354 cm⁻¹ 및 ~1598 cm⁻¹에서 두 개의 피크가 나타나는 것으로 입증되었다. D-밴드와 G-밴드. D-밴드는 무질서한 탄소 구조 또는 상온에서 산화로 인한 표면 결함에 할당되었다. 반면에 G-band는 sp²-conjugated carbon framework의 존재를 나타내며 탈수 매개 고리 융합을 통한 흑연화로 인해 발생했을 가능성이 가장 크다. G- 및 Y-CQD의 IG/ID 값은 모두 1로 계산되어 고품질 그래핀 구조를 나타낸다.

[0097] CQD의 화학적 및 표면 특성

[0098] G- 및 Y-CQD의 화학적 조성 및 표면 작용기는 푸리에 변환 적외선(FT-IR) 분광법 및 X선 광전자 분광법(XPS)을 사용하여 평가되었다. 도 9(c)에서 볼 수 있듯이 G- 및 Y-CQD의 FT-IR 스펙트럼은 CO/C-S 및 O-H 진동에 해당하는 1170 및 3400cm⁻¹에서 특징적인 스트레칭 진동을 나타낸다. 흥미롭게도, ~1590 cm⁻¹ 부근의 스트레칭 진동은 가장자리에 -OH 그룹을 포함하는 탄소 구조의 C=C 네트워크에 할당되었다. 또한 ~1028 및 ~1360 cm⁻¹ 부근의 피크는 황산 산화로 인해 CQD 표면에 -SO₃H가 존재함을 나타낸다. 따라서 FT-IR 분석을 통해 CQD가 주로 CO/C-S, -OH 및 SO₃H 그룹으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

[0099] 다음으로 XPS를 사용하여 원소 조성 및 원자가 상태를 분석했다. G- 및 Y-CQD의 XPS 측량 스펙트럼은 각각 C, O 및 S의 존재를 보여주었다(도 10a). G- 및 Y-CQD의 C1의 고해상도 XPS 스펙트럼은 C=C, CC/C-S 및 CO 결합에 해당하는 약 ~284, ~286 및 ~288 eV에서 세 개의 뚜렷한 피크의 존재를 나타낸다. 따라서 FT-IR과 XPS 데이터를 통해 CQD가 대부분 C=C, C-O, -C-SO₃H 결합 또는 작용기로 구성되어 있음을 알 수 있다.

[0100] CQD의 광학적 특성

[0101] G- 및 Y-CQD의 광학적 특성은 UV-Vis 분광법 및 PL 분광광도계를 사용하여 조사되었다. 도 11에서 알 수 있듯이

G- 및 Y-CQD는 ~309 및 ~314 nm에서 보드 흡수 피크를 나타냈으며 이는 고유한 $\pi-\pi^*$ 전이에 기인한 것이다. 따라서 두 CQD 모두 UV-Vis 스펙트럼 하에서 적색광 이동 특성을 나타냈다. G- 및 Y-CQD의 PL 스펙트럼은 두 CQD 모두 345-350nm의 여기에서 516 및 551nm에서 최대 PL 강도를 가짐을 보여주었다(도 12a&c). G- 및 Y-CQD의 해당 PL 색상 등고선 맵은 그림 도 12(b&d)에 나와 있다. 이러한 결과는 CQD가 350nm 여기에서 우수한 FL 방출 특성을 가지며 생물학적 응용 분야에 이상적인 재료로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0103] 상기 실시예의 결과를 하기에 상술한다.

[0104] 하이드로겔 잉크의 물리화학적 특성

[0105] 자연 대기 조건에서 GelMA와 CQD를 사용하여 하이드로겔 잉크를 제조했다. CQD의 형태학적, 구조적 및 광학적 특성은 다양한 현미경 및 분광 기술을 사용하여 평가되었다. 결과는 도 8 내지 12에 설명되어 있다. 인쇄 가능한 잉크 제조를 위해 G-CQD 및 Y-CQD의 미리 결정된 양($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)을 12 wt.% GelMA 용액(1x PBS 중)과 혼합한 다음 LAP 광개시제(0.25%)를 첨가했다. 그 후, 제작된 하이드로겔 잉크를 깨끗한 유리 바이알에 옮기고 365 nm UV 광을 60초 동안 조사하였다. 순수한 GelMA와 복합 하이드로겔 스캐폴드의 구조적 특성은 FE-SEM을 사용하여 평가되었으며 그 결과는 도 13에 표시된다.

[0106] 동결 건조된 GelMA 및 GelMA-CQD 스캐폴드는 고유한 다공성을 가진 비슷한 미세 다공성 형태를 보여주었다(도 13a). 특히, G-CQD 및 Y-CQD를 첨가하면 순수 GelMA에 비해 기공 크기가 크게(** $p < 0.01$) 증가했다. GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y 스캐폴드의 평균 기공 크기는 각각 $90 \sim 155 \pm 25 \mu\text{m}$, $122 \sim 320 \pm 60 \mu\text{m}$ 및 $230 \sim 400 \pm 56 \mu\text{m}$ 로 계산되었다(도 13b). GelMA 스캐폴드의 다공성은 줄기세포의 증식과 분화에 큰 영향을 미친다. 특히, 더 작은 구멍($<50 \mu\text{m}$)은 더 높은 골 형성을 유도할 수 있는 반면, 더 큰 구멍($>200 \mu\text{m}$)은 용해성 영양소의 더 높은 이용 가능성과 우수한 산소 확산으로 인해 더 큰 증식과 대사 향상을 촉진했다.

[0107] GelMA-CQD 스캐폴드의 박편 및 거대다공성 모양은 팽윤 효과를 증가시키고 상처 치유를 위한 세포 침투 및 증식을 촉진할 수 있다. 제작된 스캐폴드의 팽윤 거동은 상온에서 1X PBS의 존재 하에 조사되었다. 생물학적 응용에 사용되는 하이드로겔 복합물의 가장 중요한 특성 중 하나는 팽윤 거동이다. 팽윤 성능은 의료용 임플란트의 구조적 특성과 기계적 강성을 간접적으로 드러내며 구조의 재수화 능력 및 내구성과 밀접한 관련이 있다. 도 13c에서 볼 수 있듯이 GelMA-CQDs 스캐폴드는 순수한 GelMA에 비해 더 높은 팽창도를 나타내어 GelMA-CQDs 스캐폴드가 더 큰 수화 특성을 가짐을 나타낸다. 따라서 동결 건조된 GelMA 스캐폴드는 주변의 수분을 성공적으로 유지하기 때문에 뼈 조직 재생에 유리한 것으로 입증되었다. 본 발명의 GelMA-CQD 복합 하이드로겔은 순수한 GelMA보다 팽윤 특성이 더 컸다. 하이드로겔의 확장 능력은 친수성 -OH 그룹의 존재, 가교 정도 및 결정화도에 의해 실질적으로 영향을 받는다. 50시간 배양 후 GelMA-G 및 GelMA-Y 복합 하이드로겔의 팽윤 효율은 순수한 GelMA 스캐폴드(~218%)보다 훨씬 더 컸다. CQD와 GelMA 스캐폴드 사이의 수소 결합 형성을 촉진하는 GelMA-CQD 복합 하이드로겔에서 폴리페놀 CQD의 더 큰 기공과 수많은 페놀성 -OH 그룹은 GelMA-CQD 복합 하이드로겔의 우수한 팽윤 가능성에 기인한다. 순수한 GelMA의 그것. G-CQD보다 Y-CQD에 접근 가능한 친수성 -OH 그룹이 더 많기 때문에 GelMA-Y 복합 하이드로겔은 GelMA-G 복합 하이드로겔보다 더 많은 물을 흡수할 수 있다. 또한 GelMA-Y 복합 하이드로겔은 팽윤 거동, 팽창률 및 고체 특성 측면에서 GelMA-G 복합 하이드로겔을 능가했다. 이에 본 발명자들은 개발된 GelMA-CQD 하이드로겔이 뛰어난 팽윤 효과와 고유한 다공성을 나타내어 뼈 조직 공학에 이상적인 소재로 유용할 것이라고 예측했다.

[0109] 점탄성 및 바이오프린팅 특성

[0110] 복합 하이드로겔 잉크의 점탄성 특성 및 흐름 거동을 회전식 레오미터를 사용하여 평가했다. 유변학은 3D 프린팅 적용을 위한 바이오잉크 품질을 테스트하기 위한 중요한 매개변수이다. 도 2(a)는 개발된 바이오잉크의 특성화 절차에 대한 개요를 보여준다. 바이오잉크는 25°C 에서 1% 변형률로 주파수(ω) 스윙($0.1 \sim 100 \text{ Rad s}^{-1}$)을 통해 특성화되었다. 예를 들어 저장 탄성률(G') 및 손실 탄성률(G'')과 같은 전단 계수를 계산하고 그 결과도 도 2(b)에 표시한다.

[0111] 순수 GelMA 및 GelMA-CQD 바이오잉크의 G' 및 G'' 값을 조사했다. 순수한 GelMA와 비교하여 GelMA-CQD 샘플의 G' 값은 더 빠르게 증가했다. 100 Rad s^{-1} 에서 GelMA-G(622 Pa) 및 GelMA-Y(1066 Pa) 바이오잉크의 G' 값은 순수한 GelMA(430 Pa)의 값보다 컸다. GelMA, GelMA-G 및 GelMA-Y의 G'' 값은 각각 110Pa, 206Pa 및 638Pa로 계

산되었다. 이는 바이오잉크의 흐름 곡선에도 반영되었다. 바이오잉크의 흐름 거동은 점도(η) 대 다양한 전단 속도($\dot{\gamma} = 0.1 \sim 100 \text{ s}^{-1}$)의 관점에서 측정되었다. 도 2(c)에서 볼 수 있듯이 제작된 모든 바이오잉크는 측정된 전단 범위 내에서 전단 종속 점도 변화를 나타냈다.

- [0112] 바이오잉크는 낮은 전단 속도($\dot{\gamma} = 0.1 \text{ s}^{-1}$)에서 더 높은 점도를 나타낸 다음 높은 전단 속도($\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$)에서 각각 급격한 감소를 보였다. 이는 인쇄 가능한 바이오잉크의 전형적인 전단 희석 특성을 나타낸다. 낮은 곡선은 Herschel-Bulkley 모델에 더 적합하여 전단 박화 지수(n) 값을 결정했다. GeIMA, GeIMA-G 및 GeIMA-Y의 n 값은 각각 0.824($R^2 = 0.999$), 0.667($R^2 = 0.998$) 및 0.516($R^2 = 0.999$)으로 계산되었다. 일반적으로 $n < 1$ 인 이상적인 바이오잉크는 3D 프린팅 및 바이오프린팅 응용 분야에 중요한 전단 희석 재료로 간주된다.
- [0113] 다음으로 제작된 하이드로겔 잉크의 회복 가능성을 이해하기 위해 요변성 거동을 평가했다. 도 14에 표시된 대로 GeIMA-CQDs 하이드로겔 잉크는 높은 전단 응력(100s^{-1})에서 복구한 후 순수한 GeIMA에 비해 더 높은 복구 가능성을 나타냈다. 이것은 GeIMA-CQD의 우수한 탄성 회복에 기여한 GeIMA 매트릭스와 CQD의 강력한 상호 작용 때문일 수 있다. 종합하면, 본 발명의 결과는 개발된 GeIMA-CQD 바이오잉크가 우수한 회복 강도로 전단 희석성이 높고 조직 공학 응용을 위한 인쇄 가능한 생체 재료로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [0114] 다음으로 제작된 바이오잉크의 인쇄 성능을 체외에서 평가했다. GeIMA-Y 하이드로겔 잉크는 뛰어난 점탄성과 기계적 안정성으로 인해 3D 프린팅 및 바이오프린팅 평가를 위해 선택되었다.
- [0115] 도 2d(i)는 인쇄 속도와 압력이 GeIMA-Y 바이오잉크의 압출성에 미치는 영향을 보여준다. 3D 프린팅에 앞서 SolidWorks 프로그램을 사용하여 CAD 모델($20 \times 20 \times 5\text{mm}$)을 구성하고 오픈 소스 소프트웨어를 사용하여 슬라이스했다. GeIMA-Y 바이오잉크를 프린팅 배열에 조심스럽게 넣고 4°C 에서 30분 동안 식혔다. 30분 후, 프린트 베드 온도를 $4-8^\circ \text{C}$ 로 유지하면서 3D 프린팅을 수행했다. 다음으로, 인쇄된 구조물을 60초 동안 365nm UV 광을 사용하여 광 가교하고 인쇄 가능성을 테스트했다. 도 2d(ii)에서 볼 수 있듯이 인쇄 속도와 압력은 필라멘트 직경과 인쇄 가능성에 큰 영향을 미쳤다. GeIMA-Y 바이오잉크의 최적 인쇄 압력과 속도는 각각 65kPa와 4.5m s^{-1} 로 측정되었다. 인쇄 매개변수의 요약은 도 2d(iii)에 나와 있다. 정사각형 및 육각형 충전 패턴을 사용하여 GeIMA-Y 하이드로겔의 인쇄 성능을 테스트했으며 UV 가교 결합 후 인쇄된 구조가 CAD 모델의 모양을 유지했다(도 2e).
- [0116] Y-CQD의 고유한 형광 특성으로 인해 인쇄된 하이드로겔은 561nm 여기 레이저에서 노란색으로 나타낸다. 그러나, 하이드로겔은 405nm 및 488nm 여기에서 약한 방출을 나타냈다. 인쇄된 구조의 해당 거시적 이미지가 포함된 디지털 현미경 사진이 도 2(f)에 나와 있다. 천연 ECM의 일부인 젤라틴과 복합 바이오잉크는 세포 캡슐화에 안전했다.
- [0117] 연구에 따르면 3D 바이오프린팅된 GeIMA 하이드로겔은 다른 상업용 바이오잉크보다 캡슐화된 세포의 더 큰 가시성을 나타냈다. GeIMA-CQD 하이드로겔의 뛰어난 생체 적합성에 따라 이중 셀 구조의 바이오프린팅을 위해 선택했다. 이를 위해 hECs 및 hBMSCs(각각 4×10^4)를 Dil($50 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich, USA) 또는 FITC($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, USA)로 30분 동안 표지하고 3 mL GeIMA-Y 프리겔 용액과 혼합하였다. 그런 다음 세포-캡슐화된 바이오잉크를 5-10분 동안 냉각하고 24웰 플레이트에 빠르게 바이오프린팅했다(도 2g(i)). 그런 다음 세포를 FL 현미경을 사용하여 시각화하여 균질성을 확인했다. 그런 다음 이중 세포-적재된 구조물을 적합한 성장 배지(처음 24시간 동안 DMEM/F12 배지로 보충한 다음 100 ng mL^{-1} VEGF로 보충한 Opti-MEM 배지로 교체)와 함께 배양하고 14일 동안 배양했다. 흥미롭게도, 세포는 3일째에 대부분 인쇄된 가닥 쪽으로 중심을 잡았다. 세포는 배양 7일 후에 하이드로겔 가닥의 전체 영역을 덮었다(도 2g(iii)). 또한, hEC^{Di1}은 혈관을 형성하는 경향이 있다. 14일 배양 후 하이드로겔 단면에서 hBMSCFITC가 hECDi1 혈관과 섞여 있는 것을 확인하였으며, 이는 개발된 바이오잉크가 혈관신생을 유도할 수 있음을 시사한다. 종합하면, 개발된 GeIMA-Y 바이오잉크가 다양한 제형 중에서 우수하여 연조직 공학 응용에 적합할 것으로 예상했다.
- [0119] 체의 약물 전달 및 근적외선 유발 항골육종 요법
- [0120] 악성 골종양의 치료는 종양 조직의 급속한 성장과 전이로 인해 여전히 도전 과제로 남아 있다. 본 발명에서는 생체 활성 CQD를 약물 전달 및 후속 골육종 치료를 위한 광열원 물질로 활용했다. 도 3(a)는 골육종 치료를 위한 근적외선 유발 약물 방출 및 광선 요법의 개요를 보여준다. GeIMA-CQDs 하이드로겔의 광열 성능은 각각 1.0

W cm⁻²의 전력 밀도를 갖는 808 nm NIR 광을 사용하여 평가되었다. 도 3(b)에서 볼 수 있듯이 하이드로겔 온도는 조사 6분 이내에 25 ° C에서 75 ° C로 급격히 증가했다. 순수한 Ge1MA 하이드로겔은 조사 6분 후에도 눈에 띄는 광열 특성을 나타내지 않았다. 흥미롭게도, CQDs-loaded hydrogel은 최대 6분 동안 놀라운 온도 변화를 보였다. Ge1MA-Y 하이드로겔은 1.0 W cm⁻²에서 6분 동안 조사한 후 가장 높은 표면 온도 상승 정도를 나타냈다. 이후 Ge1MA-Y 하이드로겔은 뛰어난 광열 특성을 보였으므로 나머지 실험을 위해 선택되었다. 특히, Ge1MA-Y 하이드로겔은 3주기의 가열 및 냉각 후에도 온도 안정성을 나타냈다(도 3c). Ge1MA-Y 하이드로겔의 더 높은 광열 성능과 안정성은 아마도 큰 다방향족 도메인을 가진 Y-CQD의 존재 때문일 것이다. Ge1MA, Ge1MA-G 및 Ge1MA-Y의 광열 변환 효율(PCE)은 각각 4.84%, 22.5% 및 49.52%로 계산되었다(도 3d).

[0121] Ge1MA-Y의 뛰어난 PCE를 기반으로 약물 로딩 및 방출 연구를 위해 선택했다. 3D 프린팅된 Ge1MA-Y 스캐폴드는 화학요법 약물(Dox 및 PTX)을 탑재하고 광열 치료에 사용되었다. 약물이 로드된 Ge1MA-Y 스캐폴드의 해당 FL 이미지가 포함된 디지털 사진이 도 3(e)에 나와 있다. 본 발명에 사용된 두 약물 모두 형광성이기 때문에 로딩 능력을 모니터링하기 위해 FL 현미경을 사용했다. Dox-loaded 및 PTX-loaded Ge1MA-Y 스캐폴드는 562nm 여기에서 빨간색과 녹색으로 나타났으며 이는 약물의 성공적인 로딩을 나타낸다. Ge1MA-Y@Dox 및 Ge1MA-Y@PTX의 FE-SEM 형태도 형태에서 눈에 띄는 변화를 나타내지 않았다. 뚜렷한 다공성 형태가 약물 부하 샘플 모두에서 관찰되었다(그림 2f). Dox 및 PTX에 대한 약물 부하 효율은 각각 64.28% 및 41.54%로 계산되었다(도 3g). 더 높은 Dox 로딩 효율은 아마도 Dox가 친수성 약물이기 때문에 Dox와 CQD 및/또는 폴리머 매트릭스와의 더 큰 상호작용 및 친화성 때문일 것이다.

[0122] 근적외선 조사는 고열로 인한 세포 손상으로 인해 종종 세포 내 반응성 산소 종(ROS)의 형성을 유도한다. EPR(Electron ParaMagnetic Resonance) 분광법을 사용하여 NIR 광 조사 유무에 관계없이 ROS를 조사했으며 그 결과는 도 3(h)에 나와 있다. 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실(TEMPO)은 ROS 실험을 위한 스핀 포집제로 사용되었다. 본 발명의 결과는 순수한 TEMPO 및 Ge1MA-Y@Dox가 어떠한 라디칼에 대해서도 명확한 신호를 나타내지 않는다는 것을 보여준다. 놀랍게도 6분 동안 근적외선 조사 후 강도 비율이 1:1:1인 3개의 뚜렷한 피크가 334~340G 사이에서 관찰되었다. Ge1MA-Y@Dox를 통한 단일 산소 생성은 아마도 분자 산소의 존재 하에서 3O₂ → 1O₂(유형 II 에너지 전달 메커니즘)의 전환 때문일 것이다. 따라서 본 발명자들은 Ge1MA-Y@Dox 스캐폴드 단독으로는 ROS를 생성할 수 있는 능력이 없지만 근적외선 조사 시 상당량의 1O₂ 라디칼을 생성하여 고열 유발 골육종 치료에 활용할 수 있을 것으로 예상했다.

[0123] 다음으로 Dox의 방출 거동에 대한 NIR 노출의 영향을 조사하기 위해 다양한 pH 완충액(pH 6.5 및 7.4)에서 시험관 내 Dox 방출 연구를 평가했다. Dox는 적재 효율성이 더 크기 때문에 신중하게 선택되었다. 도 3(i)는 시간의 함수로서 NIR 조사 유무에 관계없이 Ge1MA-Y 스캐폴드의 Dox 방출 프로필을 보여준다. Dox 방출 프로파일이 NIR 빛이 없을 때 두 pH에서 거의 유사하다는 점에 주목하는 것이 흥미로웠다. 특히 Dox의 방출 프로파일은 주기적인 NIR 광 처리 후에 더 높은 것으로 나타났다. pH 7.4에서 NIR 처리 후 24시간에 Dox의 23%만 방출되었다. 그러나 pH 6.5에서 근적외선 조사 하에서 24시간 배양 후 약 38.5% Dox가 방출되었다. 이는 Y-CQD의 존재로 인한 근적외선 조사 및 국소 고열이 Dox의 빠른 방출에 원인이 있음을 시사한다. 또한, 7일 후 두 그룹 모두에서 Dox의 느리거나 지속적인 방출이 나타났다. 이것은 아마도 열 반응, 스캐폴드 열화 및 버퍼 매체에서 Dox의 농도 의존적 확산 때문일 것이다.

[0124] 확산 동역학에 대한 통찰력을 얻기 위해 나노필러가 약물 확산에 미치는 영향을 이해하기 위해 다양한 수학적 모델이 사용되었다. 본 발명에서는 실험 데이터에 적합하기 위해 Higuchi 및 Korsmeyer-Peppas 모델을 사용했다. 특정 시간(t)에 방출된 특정 양의 약물(Q)에 대해 방출 동역학은 다음 식으로 설명할 수 있다.

[0125]
$$Q = k \times t^{1/2} \quad (6)$$

[0126]
$$\frac{Q}{Q_0} = k \times t^n \quad (7)$$

[0127] 여기서 k와 n은 각 약물의 방출 상수와 방출 지수를 나타낸다. Q₀는 폴리머 스캐폴드의 초기 약물 양이다.

[0128] Higuchi 모델은 Fick의 법칙에 따라 약물이 폴리머 매트릭스에 균일하게 분산되는 확산 과정을 설명한다. 반대로, Korsmeyer-Peppas 모델은 단순 약물 확산(Fickian 확산)과 폴리머 유도 약물 방출(비-Fickian, 중합체 사슬에서 약물이 단단히 포장된 폴리머 사슬에 의해 제어됨)의 조합으로 약물 방출 프로파일을 설명한다. 본 발명에서는 Dox의 확산 현상을 예측하기 위해 두 모델을 모두 사용했다. 피팅 데이터와 그 값은 표 2에 나열되어 있다. 가장 높은 상관 계수(Pearson의 R² 값)와 방출 지수(n)를 기준으로 가장 잘 맞는 방출 프로파일

선택되었다. 그림 2(k)에서 볼 수 있듯이 Dox 방출 프로파일은 pH 6.5와 7.4 모두에 대해 더 높은 R2 값을 가진 Korsmeyer-Peppas 모델에 가장 적합했다. 그러나 Higuchi 모델은 n 값이 더 높기 때문에(n > 0.49) 가장 적합하지 않다(도 3j). pH 6.5 및 pH 7.4에 대한 Korsmeyer-Peppas 모델에 따른 n의 값은 각각 0.2 및 0.24로 계산되었다. n < 0.49의 값은 Fickian 유형 확산을 나타내고 n > 0.49는 비정상적 또는 비 Fickian 유형 확산에 해당하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 NIR 조사 후 두 샘플(pH 6.5 및 7.4) 모두 비픽키안 유형 확산을 나타냈으며, 여기서 CQD 내장 GeIMA 매트릭스는 광선 요법을 통해 Dox의 방출을 제어했다. 고열 효과는 GeIMA 매트릭스를 유도하여 PBS 버퍼에서 약물 분자를 수축 및 방출한다. 이러한 종류의 약물 방출 현상은 항감염 치료를 위한 화학요법 약물 전달에 적합하다.

표 2

[0129]

Experimental condition	Higuchi model		Korsmeyer-Peppas model	
	pH 6.5	pH 7.4	pH 6.5	pH 7.4
Scaffold + NIR	n = 1.37 R ² = 0.98021	n = 3.23 R ² = 0.99307	n = 0.20 R ² = 0.99594	n = 0.24 R ² = 0.98937
Scaffold - NIR	n = 2.06 R ² = 0.99121	n = 2.53 R ² = 0.98901	n = 0.37 R ² = 0.99417	n = 0.41 R ² = 0.98709

[0130]

표 2는 본 발명에서 사용된 독소로비신 방출 카이네틱 파라미터를 나타냄.

[0131]

GeIMA-Y 스캐폴드의 우수한 약물 전달 특성을 기반으로 시험관 내 골육종 연구를 위해 GeIMA-Y@Dox 스캐폴드를 선택했다. 종양 세포 pH는 생리적 pH 보다 약간 산성이기 때문에 GeIMA-Y 스캐폴드가 근적외선 조사 하에서 pH 6.5에서 Dox를 효과적으로 전달할 수 있다고 가정했다. MG-63 세포를 GeIMA-Y@Dox 스캐폴드와 함께 배양하고 6 분 동안 1Wcm⁻² NIR 광(808nm)으로 조사했다. 24시간 후, MG-63 세포의 생존력을 Live/Dead 및 WST-8 분석을 사용하여 평가했다. TCPS(2D 배양)에서 성장하는 세포를 음성 대조군으로 사용했다. 순수한 GeIMA, GeIMA-G 및 GeIMA-Y가 있는 플레이트를 양성 대조군-1 그룹으로 간주했다. NIR 처리 없이 GeIMA-Y@Dox로 배양된 세포를 양성 대조군-2로 간주하였다.

[0132]

도 3(1)에서 볼 수 있듯이 2D 배양 그룹은 배양 24시간 후 건강한 세포를 나타냈으며 녹색(생) 색상으로 표시되었다. GeIMA, GeIMA-G 및 GeIMA-Y 스캐폴드에서 성장하는 세포도 살아있는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, GeIMA-Y@Dox 스캐폴드에서 성장하는 MG-63 세포는 죽은 세포의 수가 더 많고(빨간색) 소수의 살아있는 세포(녹색)로 표시된 생존력이 감소한 것으로 나타났다. 게다가 GeIMA-Y@Dox + 레이저 그룹은 GeIMA-Y@Dox(-레이저) 또는 다른 그룹에 비해 더 많은 수의 죽은 세포(빨간색)를 나타내어 NIR 치료가 Dox의 지속적인 방출을 촉진했음을 시사한다. WST-1 분석에서도 유사한 결과가 관찰되었다. Dox가 없으면 MG-63 생존력이 상당히 증가했으며(대조군보다 144%), 이는 hDF의 증식률과 비슷하다(도 3m). 그러나 근적외선 조사 후 생존율은 대조군에 비해 ~70% 감소했으며 이는 Live/Dead 분석과 일치했다. 대규모 세포 사멸의 주요 원인은 MG-63 세포에 대한 Dox의 제어 방출과 광선 요법의 일반적인 현상인 고열 유발 ROS 증폭 때문이었다.

[0133]

따라서 본 발명은 3D 프린팅된 GeIMA-Y 스캐폴드가 Y-CQD의 제어된 광열 특성을 독소로비신과 같은 수용성 화학 요법 약물의 지속적인 방출에 활용할 수 있는 스마트 전달 수단이라고 예상했다. 도 3(n)은 항-골육종 치료를 위한 근적외선 유발 약물 전달 및 후속 광선 요법의 개요를 보여준다.

[0135]

대식세포 표현형 및 골 면역 조절 연구

[0136]

대식세포는 초기 뼈 및 혈관 형성 동안 다양한 염증 인자를 분비하여 표현형 가소성으로 인해 골형성 및 혈관신생에 중요한 역할을 한다. M1 대식세포에 비해 M2 분극화 대식세포는 다양한 성장 인자와 사이토카인의 축분비 신호 전달을 통해 더 높은 골 치유 효능을 나타냈다.

[0137]

도 4(a)는 뼈 재생을 위한 3D 프린팅 스캐폴드 보조 대식세포 분극화 및 골유착 과정의 개요를 나타낸다. 본 발명에서 제작된 스캐폴드(GeIMA, GeIMA-G 및 GeIMA-Y)는 Raw 264.7 세포의 더 나은 증식 및 M2 분극화를 나타냈다. 그림 3(b)에서 볼 수 있듯이 Raw 264.7 세포는 24시간 배양 후 3D 인쇄 스캐폴드에서 적절하게 성장했다. Raw 264.7 세포는 클러스터에 있는 것처럼 보였고 제작된 모든 샘플에서 회전 타원체 형태를 형성하는 경향이

있다. 흥미롭게도 세포 질량과 크기의 평균 수는 다른 그룹보다 스캐폴드를 포함하는 Y-CQD의 존재에서 증가했다(도 4, c-d).

[0138] Ge1MA 하이드로겔은 다양한 신호 경로를 통해 대식세포 생존력과 분극화를 향상시키는 것으로 나타났다. 액틴 형태와 대식세포 분화를 조사하기 위해 스캐폴드 침출 배지에서 Raw 264.7 세포를 추가로 배양했다. 도 4에 도시된 바와 같이, Raw 264.7 세포는 F-액틴 필라멘트의 광범위한 분기를 특징으로 하는 순수한 Ge1MA 스캐폴드의 존재에서 대식세포(M0) 표현형으로 분화되었다. 대조군 Raw 264.7 세포는 미분화 단핵구를 나타내는 둥근 형태로 감소된 가지 패턴을 나타냈다. 특히, Raw 264.7 세포는 Ge1MA-G 및 Ge1MA-Y 스캐폴드가 있는 경우 분기 없이 평평하고 덩굴 모양의 형태를 나타내어 M2 극성 대식세포를 나타낸다. Ge1MA 스캐폴드에서 CQD의 존재는 대식세포 분화에 영향을 미쳤으며 광학 현미경, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 면역세포화학(ICC) 및 실시간 PCR(qRT-PCR) 분석에 의해 추가로 확인된다. 결과는 Raw 264.7 세포가 48시간 배양 후 Ge1MA-G 및 Ge1MA-Y 스캐폴드(M2 형태)의 존재 하에서 전형적인 편평한 형태를 나타냄을 보여주었다(도 4f). 그러나 순수한 Ge1MA 스캐폴드에서 성장하는 세포는 거의 원형 및/또는 분기된 형태(M1 표현형)를 나타내며 M2 극성화 세포의 수가 적다. 대식세포의 평균 길이는 다른 그룹보다 Ge1MA-Y 스캐폴드의 존재에서 더 높게($\sim 114 \pm 10.8 \mu\text{m}$) 발견되었으며(도 4g), 이는 Y-CQD가 M2 분극화에 대한 단핵구에 대한 우수한 유도 효과를 가짐을 시사한다.

[0139] 분화된 대식세포(M1 또는 M2)는 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인과 함께 다양한 표면 또는 세포 마커를 발현한다. 도 4(h)에 나타난 바와 같이, Raw 264.7 세포는 Ge1MA-Y 스캐폴드의 존재 하에 NOS2(M1 마커, 8.94%)보다 CD163(M2 마커, 38.64%)에 대해 양성을 나타내었다. 대조적으로, 단지 7.59%의 세포만이 CD163에 대해 양성인 것으로 밝혀졌고 약 12.96%의 세포가 NOS2에 대해 양성인 것으로 밝혀졌으며, 이는 M1 축으로의 분극화를 나타낸다. NOS2 및 CD163의 세포 내 국소화를 확인하기 위해 24시간 배양 후 Raw 264.7 세포의 ICC를 수행했다(도 4i). 결과는 Raw 264.7 세포가 Ge1MA의 존재 하에서 NOS2 마커에 대해 매우 양성이고 CD163 마커에 대해 음성임을 나타낸다. 반대로, Ge1MA-Y 성장 세포는 NOS2보다 CD163 마커에 대해 매우 양성인 것으로 밝혀졌으며, 이는 M2 축으로의 분극화를 나타낸다. 이러한 결과는 순수한 Ge1MA 스캐폴드가 Raw 264.7 세포를 M2 표현형으로 분화하는 능력이 더 적은 반면, Y-CQD를 추가하면 Raw 264.7 세포가 더 많은 수의 M2 표현형으로 가속된다는 것을 확인했다. qRT-PCR 결과는 형태학적 관찰과 유사한 경향을 보였다. 도 4(j)에서 볼 수 있듯이 Raw 264.7 세포는 TNF- α 및 IL-1 β 발현(염증성 마커)에서 하향 조절을 나타낸 반면 IL-4 및 IL-10 유전자(항염증성 마커)의 상향 조절을 나타냈다. Ge1MA-Y 스캐폴드가 있는 경우, 유사하게, 순수한 Ge1MA는 IL-10 마커의 발현이 상당히 적은 TNF- α 및 IL-1 β 유전자의 상향 조절을 나타냈다. 이러한 결과는 제작된 Ge1MA-Y 스캐폴드가 Raw 264.7 세포에 무독성이며 성장을 촉진하고 M2 표현형으로 분화되어 골 면역 조절 및 골 재생 개선에 도움이 될 것임을 시사한다.

[0141] 3D 인쇄 Ge1MA-CQD 스캐폴드는 hBMSC의 인 비트로 혈관신생 및 골형성 기능을 촉진함

[0142] 조혈 계통의 일부인 hBMSC는 혈관신생 계통과 골형성 계통으로 분화할 수 있는 능력이 있다. 혈관신생과 골형성을 모두 유도하는 특성을 가진 스마트 조직 공학 스캐폴드는 정형외과, 특히 외상 손상 복구에 매우 바람직하다. 혈관신생 연구를 위해, hBMSCs(2.5×10^4 세포)를 Ge1MA-CQDs 하이드로겔을 사용하여 생체 인쇄하고 VEGF 보충 없이 Opti-MEM 배지와 함께 24시간 동안 배양했다. Matrigel 코팅된 플레이트를 대조군으로 간주했다. 24시간 후, 바이오프린팅된 구조를 촬영하고 혈관신생 가능성을 측정했다. 도 5(a, 상단)에서 볼 수 있듯이 hBMSC는 여러 개의 분기된 네트워크를 형성하는 것으로 나타났다. 다양한 제형 중에서 Ge1MA-Y 하이드로겔이 함유된 hBMSC는 다른 그룹에 비해 더 많은 스프라웃(sprout) 형성을 나타냈다(도 5a, 하단). 또한, 세포의 %, 스프라웃 수 및 평균 스프라웃 부피는 Ge1MA-Y 하이드로겔(도 5b-e)의 존재에서 상당히 증가했으며, 이는 Ge1MA-Y 하이드로겔이 생체 활성 Y-CQD의 존재로 인해 더 나은 혈관신생 유도 특성을 가짐을 시사한다. 다음으로 제작된 하이드로겔 스캐폴드의 골형성 가능성을 각각 ARS 염색, ALP 활성, 칼슘 함량 분석 및 형광 마커 염색으로 평가하였다. 도 5(f)에 나타난 바와 같이, ARS 염색된 플레이트는 14일의 배양 후에도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 광학 현미경 사진은 광물 퇴적의 상당한 변화를 보여주었다. Ge1MA-Y 처리된 hBMSCs는 골 유도 14일 후에 더 높은 미네랄 유도 효율을 나타냈다. 이것은 ALP 활동에도 반영되었다. 대조군에 비해 Ge1MA-Y 그룹은 치료 14일 후에 더 높은 ALP 활성(* $p < 0.05$)을 나타냈다(도 5g).

[0143] 광물화 시험의 정량화 시험도 Ge1MA-Y의 존재 하에서 더 높은 것으로 나타났다(도 5h, i). 조골 세포는 세포 내 뼈 인회석을 생산하는 능력을 가지고 있으며 과잉 인회석은 무기 Ca^{2+} 또는 PO_4^{2-} 의 형태로 분비된다. 위에서 연

급한 결과를 바탕으로 골 유도 14일 후 세포 배양액의 Ca^{2+} 함량을 조사했으며 그 결과는 도 5(j, k)에 나와 있다. 3D 프린팅된 스캐폴드가 대조군보다 세포의 Ca^{2+} 수준을 높였다는 점은 흥미롭다. 처리 그룹 중에서 Ge1MA-Y 스캐폴드는 순수 Ge1MA 및 Ge1MA-G 스캐폴드에 비해 hBMSCs에서 더 높은 Ca^{2+} 생산(** $p < 0.01$)을 촉진했다. 또한 IF 염색을 통해 골 형성 단백질 마커(Runx2, ALP, OCN 및 OPN)의 수준을 조사했다(도 5l). 이는 대조군과 Ge1MA-Y 스캐폴드 모두 골 형성 분화에 긍정적인 역할을 한다는 것을 나타낸다. 종합하면, 본 발명의 결과는 3D 프린팅된 Ge1MA-CQD 하이드로겔이 스마트 정형외과 이식편을 개발하는 데 활용할 수 있는 더 나은 혈관신생 및 골형성 유도 특성을 가지고 있음을 입증했다.

[0145] 면역 조절 보조 강화 골융합

[0146] 뼈는 조골 세포, 파골 세포, 골 세포, 면역 세포 및 혈액 세포와 같은 다양한 세포 집단을 포함하는 복잡한 조직이다. 스캐폴드 이식 후 새로운 뼈 형성은 뼈와 면역 세포 사이의 지속적인 혼선에 의해 크게 영향을 받는다. 따라서, 제작된 스캐폴드의 골-면역 조절 효과를 대식세포 조건배지(M-CM)의 존재 하에서 평가하였다. 앞서 논의한 바와 같이 Ge1MA-Y 스캐폴드는 항염증 기능이 더 우수했다. 따라서 골 면역 조절 실험을 위해 Ge1MA-Y 지지체를 선택했다. M-CM 제조 및 면역 조절 연구의 개략도가 도 15에 나와 있다. hBMSCs에 대한 M-CM의 면역조절 효과는 각각 ARS 염색(2D 및 3D 배양용), H&E(3D 배양용) 및 Massion's Trichrome 염색(3D 배양용)을 통해 평가된다. 도 5(a)에 나타낸 바와 같이, M-CM(GY)은 7일 후 ARS 염색에 의해 기록된 바와 같이 더 나은 골-면역 조절 효과를 가졌다. 광물화된 결절의 강렬하고 붉은 색은 골 형성의 유도를 의미한다.

[0147] M-CM(GY)으로 처리한 후 ARS+ 영역의 백분율도 크게 증가했다($ARS_{M-CM@Ctrl} = 22\% \rightarrow ARS_{M-CM@GY} = 41.6\%$, $*p < 0.05$)(도 5b). M-CM (GY) 처리 후 hBMSC에서 더 강한 결절 형성이 관찰되는 골 형성 유도 14 일 후에 유사한 경향이 관찰되었다 (도 5c). M-CM(Ctrl) 및 M-CM(GY)에 대한 ARS 시작 영역은 각각 42% 및 73%로 계산되었다(도 5d). 3차원 세포배양에서도 비슷한 경향을 보였다. 예를 들어, hBMSC 스페로이드의 ARS 염색은 골유도 14일 후 M-CM(Ctrl)보다 M-CM(GY)과 배양한 후 고도로 광물화되고 강렬한 붉은 색을 나타냈다(도 5e). 결절의 양은 도 5(f)와 같이 M-CM(GY)이 있는 상태에서 14일에 더 큰(3.2배) 발견되었다. 따라서 전체 회전 타원체의 성장을 평가하기 위해 H&E 및 Trichrome 염색을 평가했다. 결과는 도 5(g, h)에 표시된다. 두 그룹 모두 면역 조절 14일 후에 더 나은 성장과 형태를 보였다는 점은 흥미롭다. 회전 타원체의 콜라겐 함량(Trichrome 염색)은 M-CM(GY) 처리 후 크게 향상되었다. Runx2 및 OCN 마커의 발현을 조사하기 위해 IF 염색을 추가로 수행하였다. 2D 배양 시스템에서 M-CM(Ctrl) 및 M-CM(GY) 처리된 플레이트 모두 처리 14일 후에 Runx2 및 OCN에 대해 양성을 나타냈다. 흥미롭게도, Runx2 및 OCN 마커의 발현은 M-CM(GY) 처리 후에 상당히 상향 조절되었다(도 5i). 종합하면, 본 발명의 결과는 항염증성 대식세포가 면역 누화를 통해 hBMSC 분화를 조절하고 본 발명의 3D 배양 시스템이 더 나은 골형성 모델을 묘사한다는 것을 입증했다. 따라서, 본 발명은 M-CM(GY)과 OIM의 조합이 골 치유를 향한 hBMSC의 골 형성 잠재력을 유도할 수 있다는 가설을 하였다.

[0148] 3D 프린팅된 Ge1MA-Y 스캐폴드는 생체 내 뼈 재생을 촉진함

[0149] 혈관화된 골 재생은 내피 세포를 통해 조골 세포로의 신호 전달을 통해 새로운 골 형성을 간접적으로 촉진하는 신생혈관형성의 발달을 의미한다. 혈관 신생 세포는 VEGF, FGF-2, PDGF 및 IGF를 분비하며 이는 조골세포 이동, 골세포 성숙 및 석회화된 골 기질 형성에 기여한다. 생체 내 뼈 재생 가능성을 조사하기 위해 쥐를 무작위로 세 그룹으로 나누었다.:

[0150] 각각 (1) 음성 대조군(스캐폴드 처리 없음, $n = 3$), (2) 양성 대조군(순수 Ge1MA 스캐폴드, $n = 3$) 및 (3) 실험군(Ge1MA-Y 스캐폴드, $n = 3$).

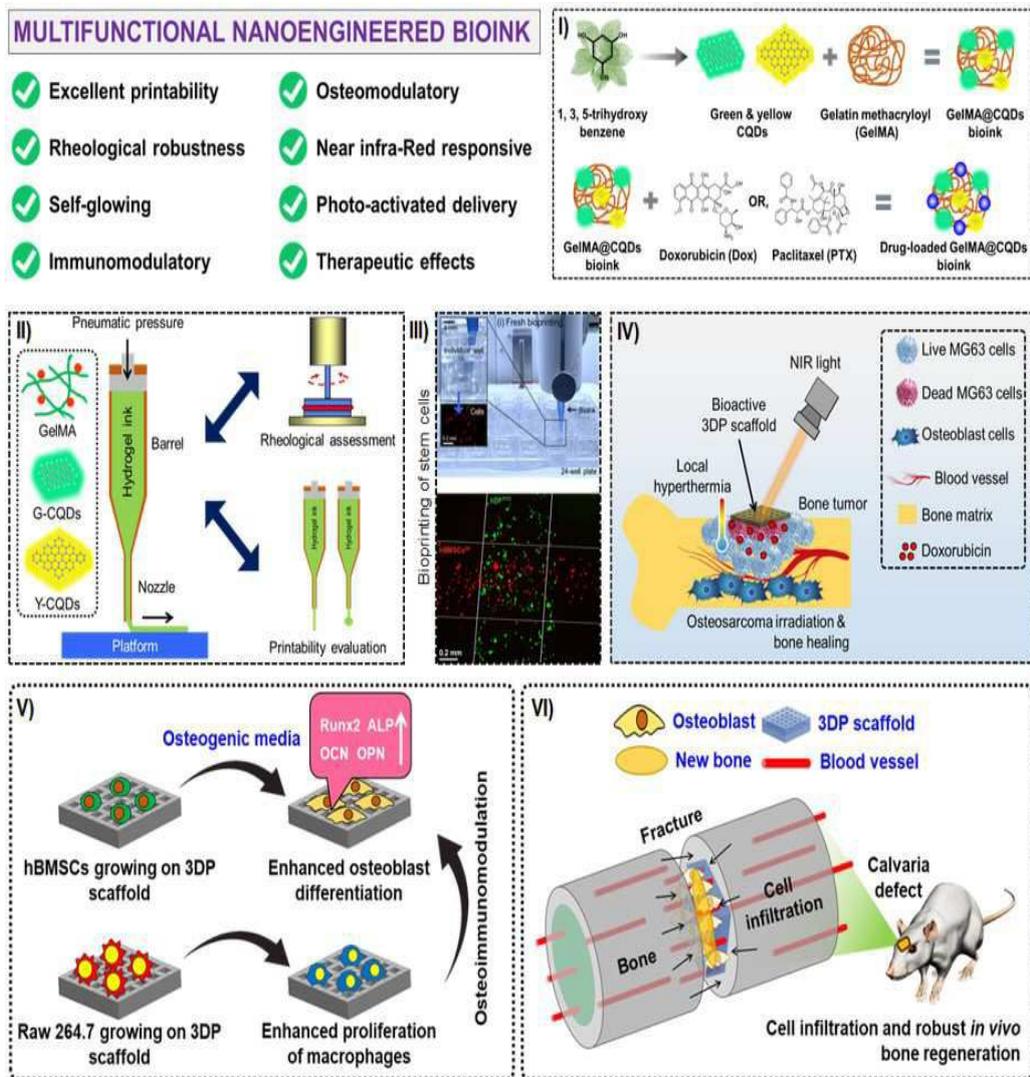
[0151] 수술 절차의 디지털 사진은 도 7(a)에 나와 있다. 이식 후 8주 후, 쥐 두개골을 수확하고, 탈석회화하고, 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(μ CT)을 사용하여 평가한 다음 H&E 염색을 실시했다. 도 7(b, c)에서 볼 수 있듯이 양성(BMD = $0.25g\ cm^{-3}$) 및 음성 대조군(BMD = $0.18g\ cm^{-3}$) 그룹과 비교하여 Ge1MA-Y 처리 그룹은 더 높은 골 재생률($\sim 94.25 \pm 0.82$) 및 골 광물화(BMD_{Ge1MA-Y} = $0.48g\ cm^{-3}$)을 나타내었다. μ CT 이미지의 전체 형태는 Ge1MA-Y 처리된 스캐폴드의 재생 가능성이 의심할 여지 없이 양성 대조군보다 우수하다는 것을 보여주었으며, 이는 치료 8주 후에 상대적으로 낮은 재생 가능성이 관찰된 음성 대조군과 비교할 수 없다(도 7d).

[0152] 이러한 결과는 Ge1MA 스캐폴드 단독으로 Y-CQD(=Ge1MA-Y 스캐폴드)를 첨가한 후 크게 증가한 피질골 형성을 나

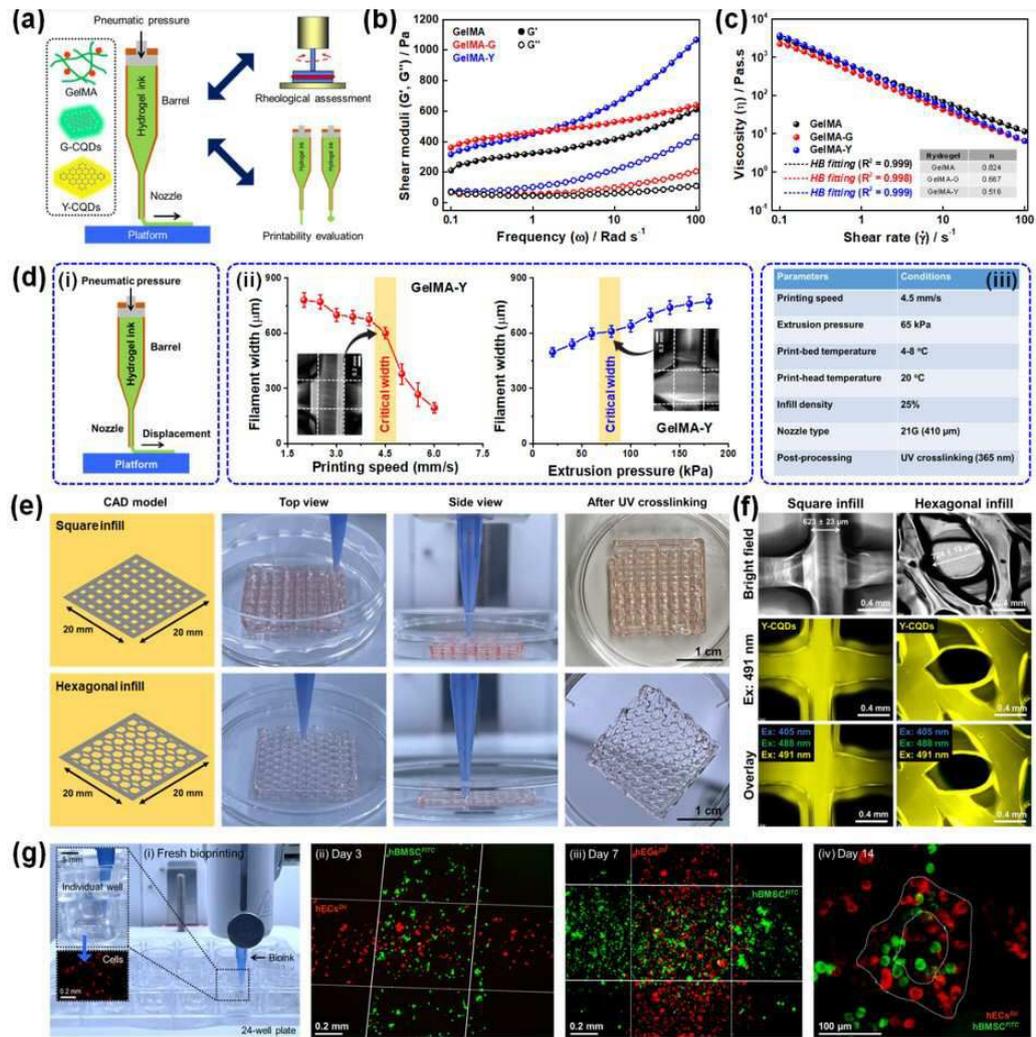
타법을 입증했다. GelMA-Y 스캐폴드의 경우 전체 결손 부위가 새로운 뼈로 덮이는 것으로 나타났으며 이는 CQD 통합이 뼈 형성에 긍정적인 역할을 했음을 시사한다. 혈관화된 뼈 형성에 대한 통찰력을 얻기 위해 H&E 염색을 수행했으며 그 결과가 도 7(e)에 나와 있다. 음성 대조군에서 피질골 형성 불량은 일부 미성숙 골세포(IO)와 함께 거대한 섬유 조직(FT)의 존재를 특징으로 했다. 동시에, 양성 대조군은 조골세포, 성숙한 골세포(MO) 및 결손 부위의 몇 개의 혈관(BV)의 존재를 특징으로 하는 더 큰 새로운 뼈 재생 가능성을 나타냈다. 놀랍게도 GelMA-Y 그룹은 양성 및 음성 대조군 그룹과 큰 차이를 보였다. GelMA-Y 처리군은 많은 BV, 조골세포, MO 및 심하게 석회화된 뼈 매트릭스의 형성을 특징으로 하는 강력한 뼈 재생을 나타냈다. 혈관이 확산된 결손 부위에서 눈에 띄는 조골세포 라이닝이 관찰되었으며, 이는 GelMA-Y 처리군에서 광범위한 혈관 형성으로 새로운 뼈 형성이 이루어졌음을 시사한다. 따라서 본 발명자들은 3D 생체 인쇄 및 화학 보호 GelMA-Y 스캐폴드가 뼈 재생을 촉진할 뿐만 아니라 뼈 리모델링 동안 혈관 형성을 향상시킬 것으로 예상된다.

도면

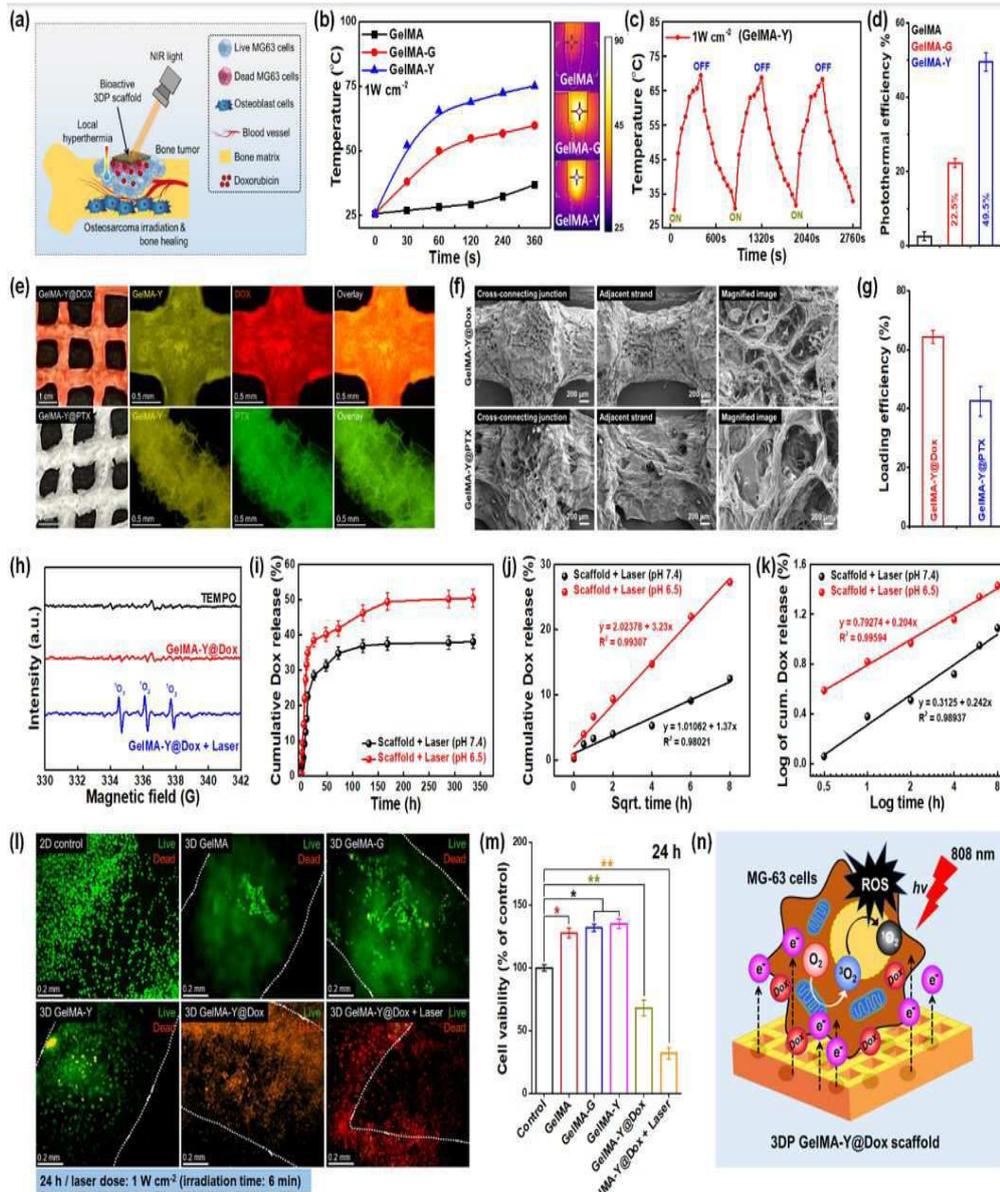
도면1



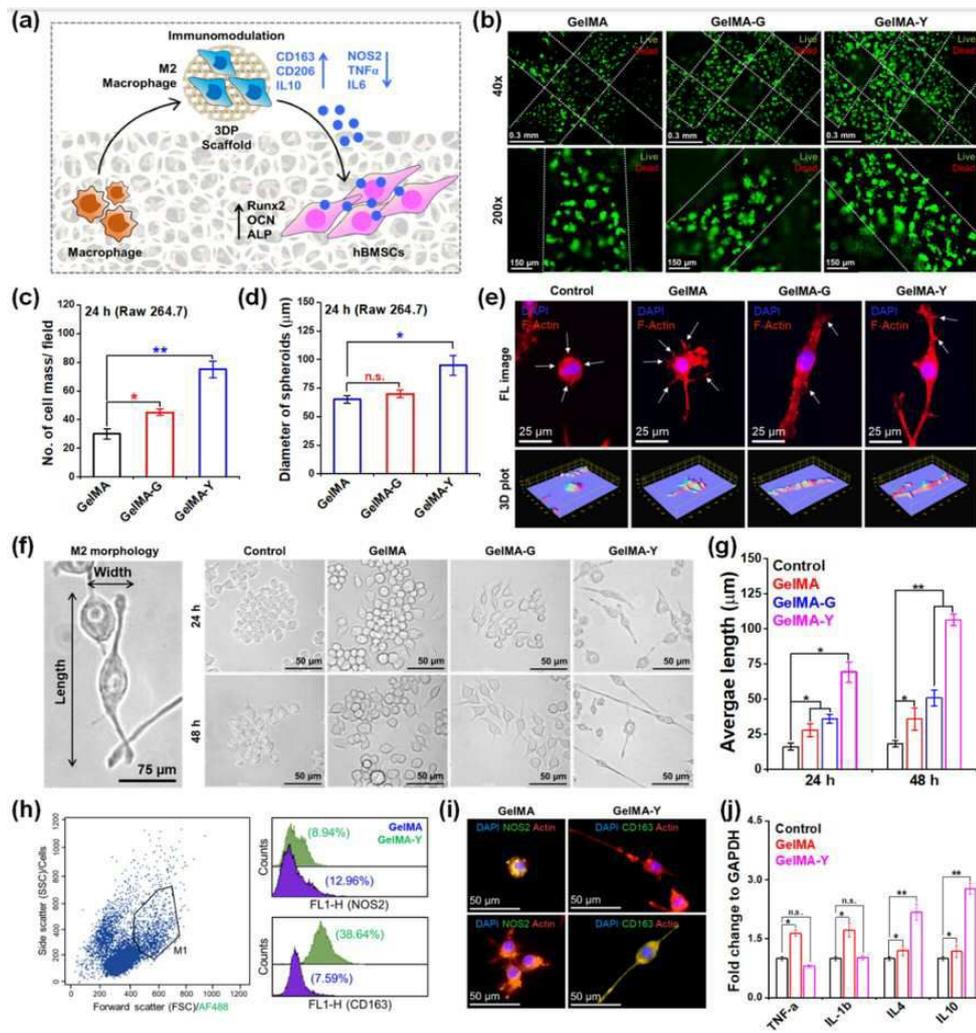
도면2



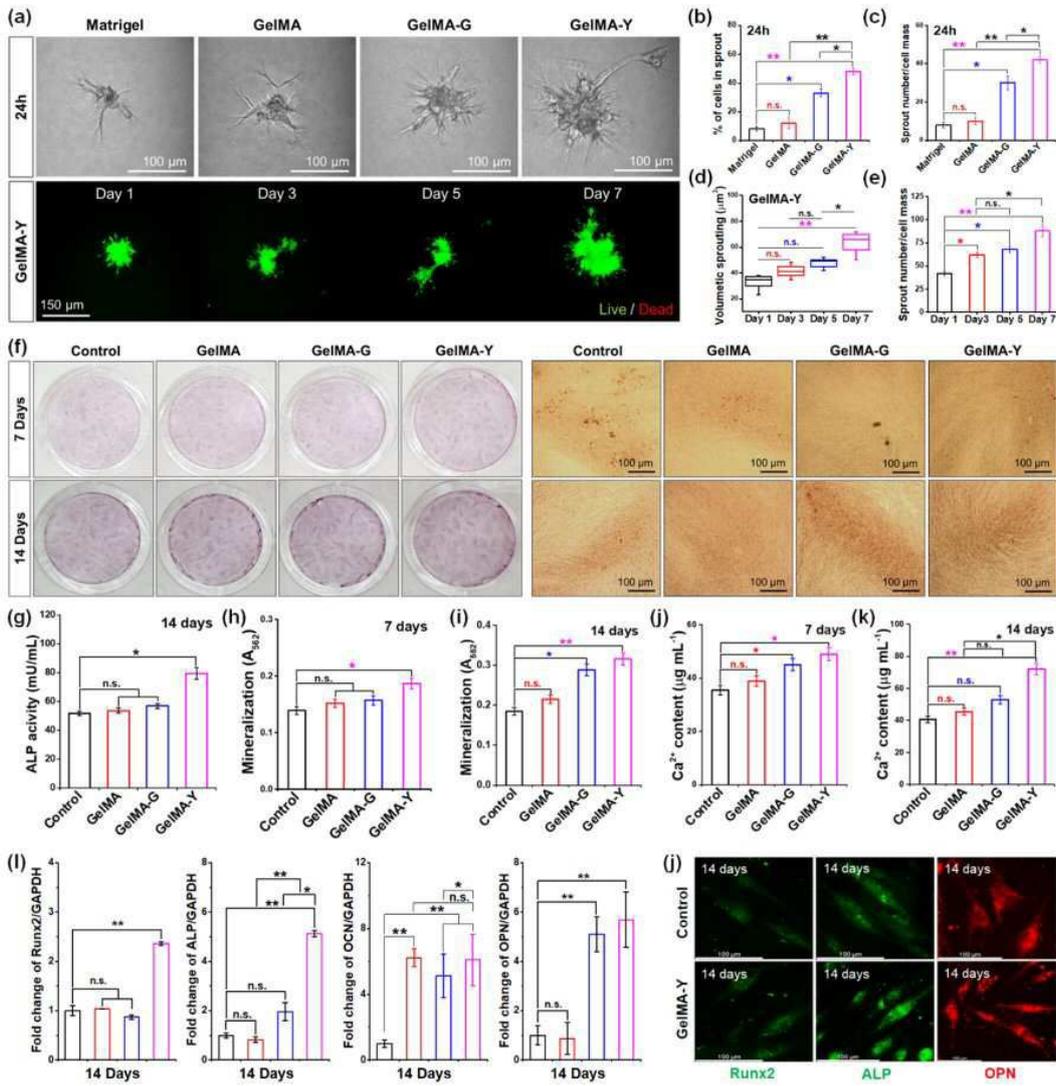
도면3



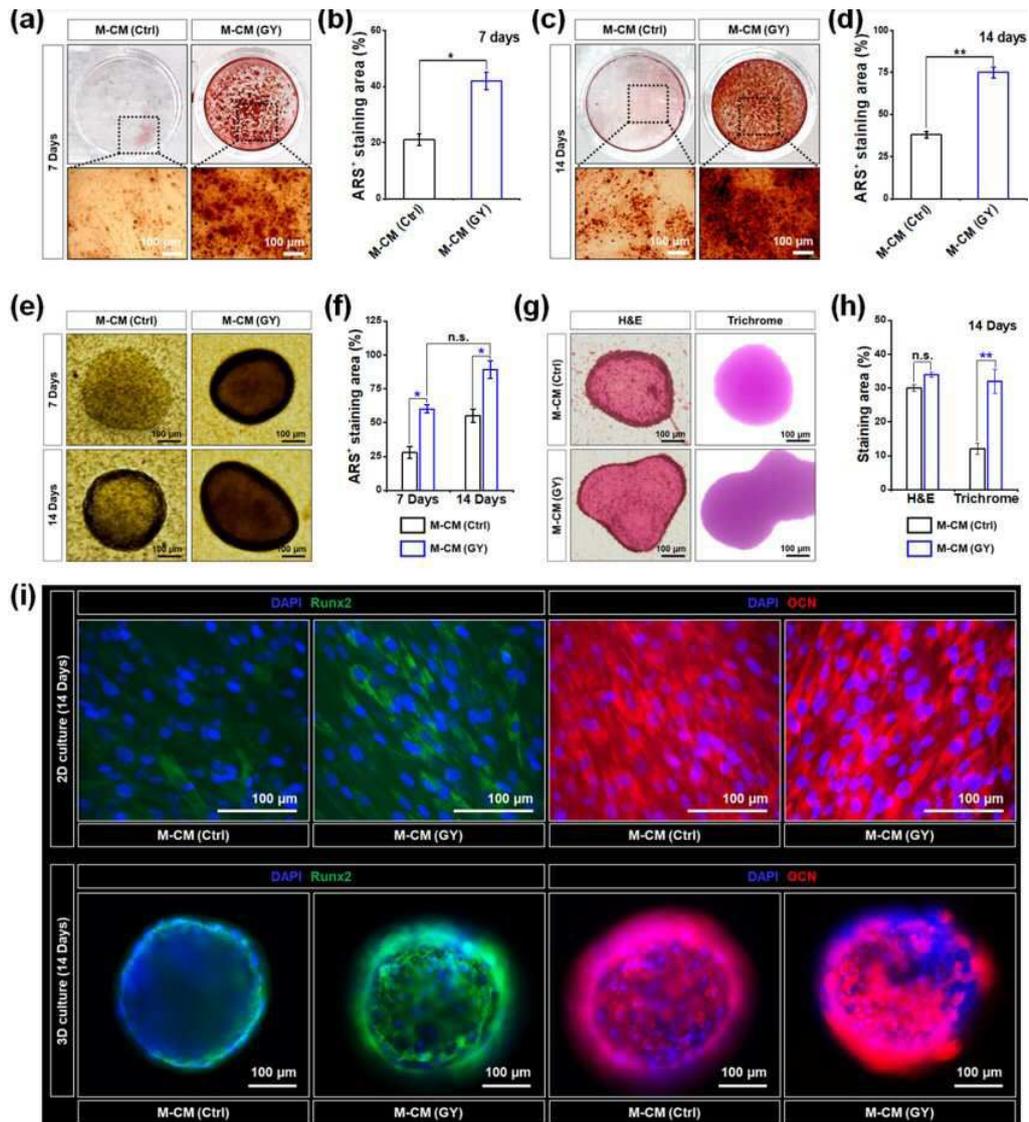
도면4



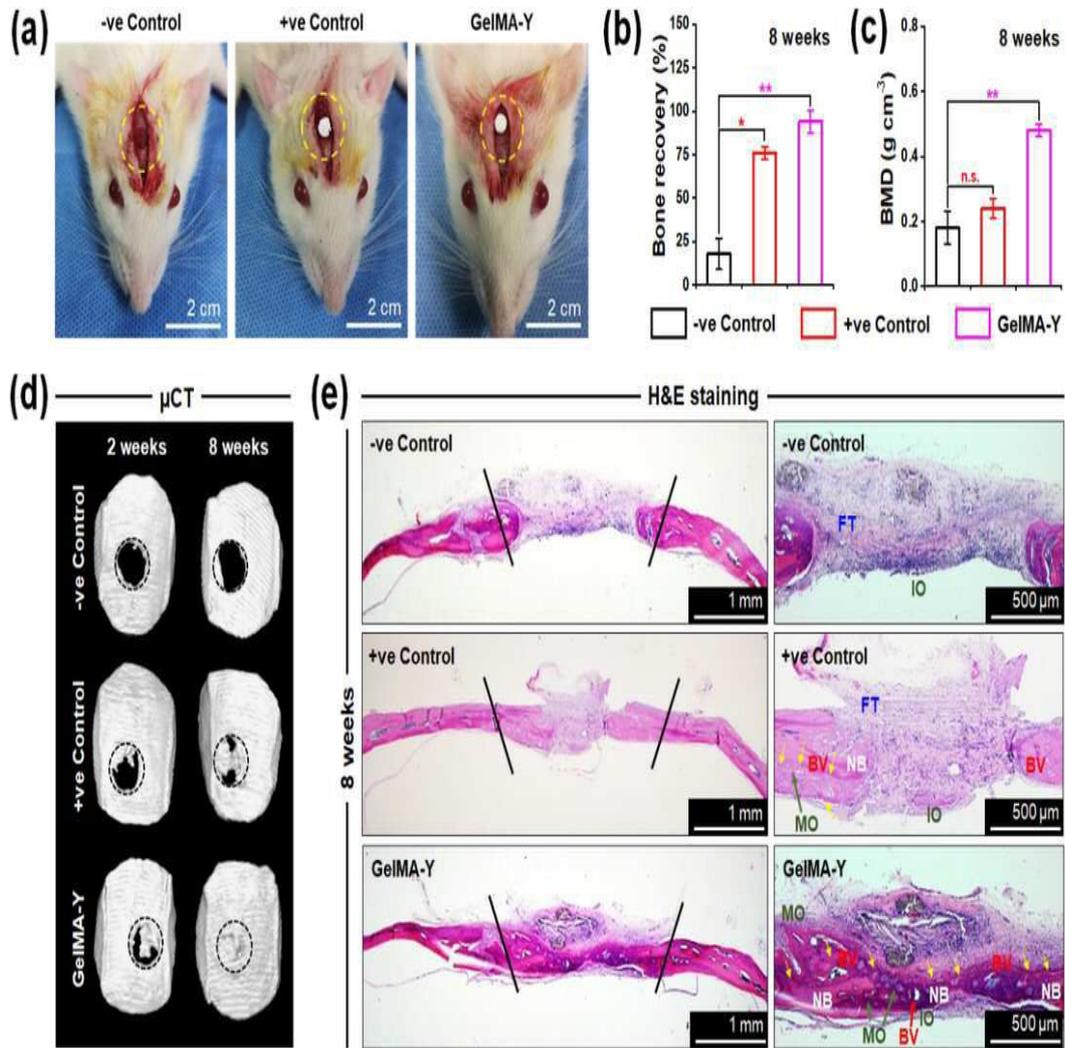
도면5



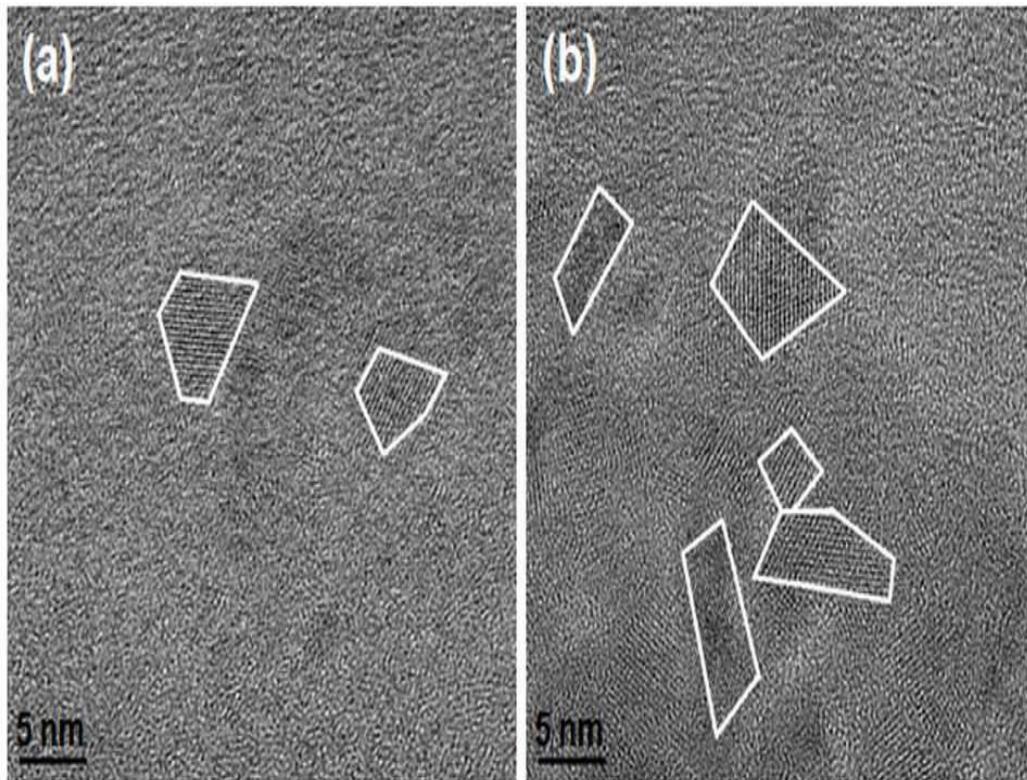
도면6



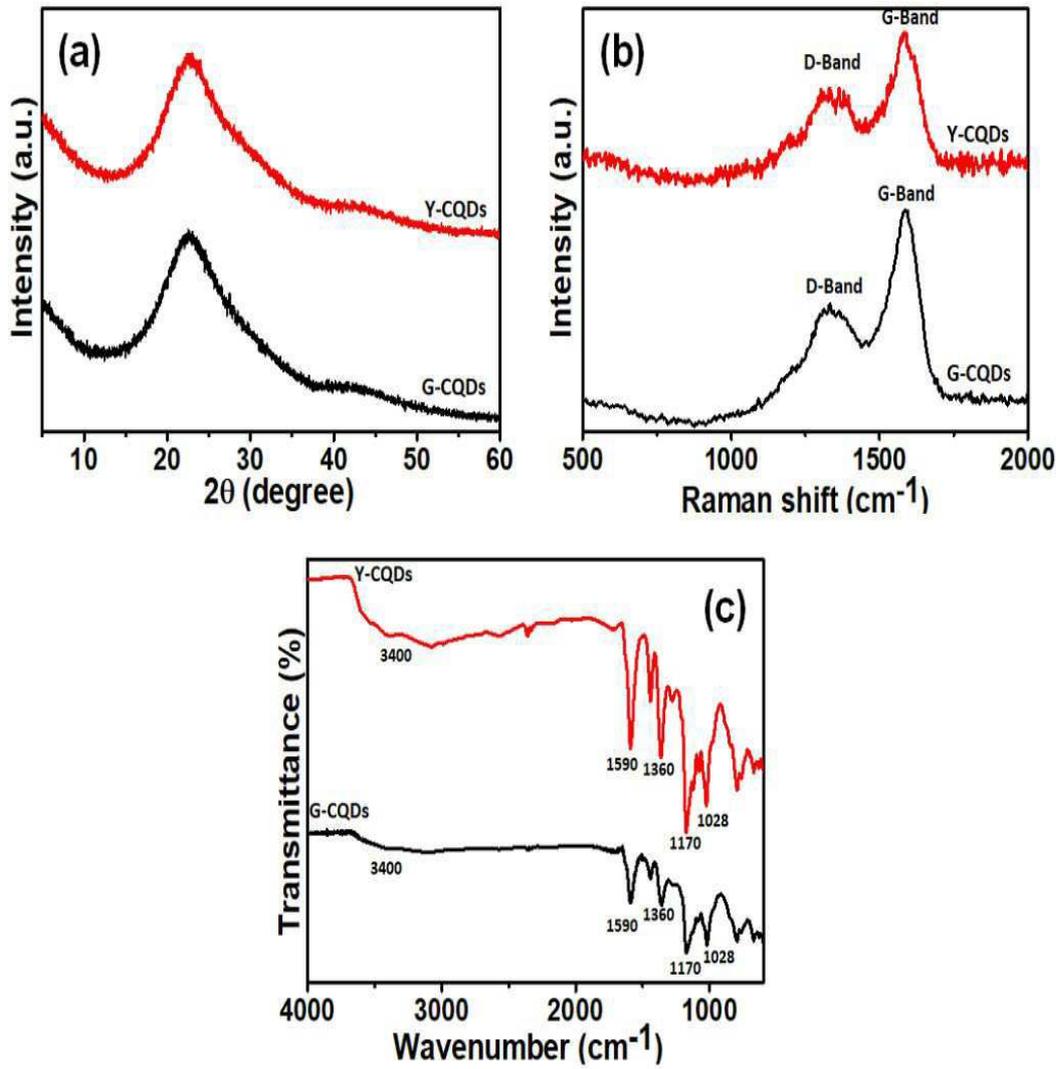
도면7



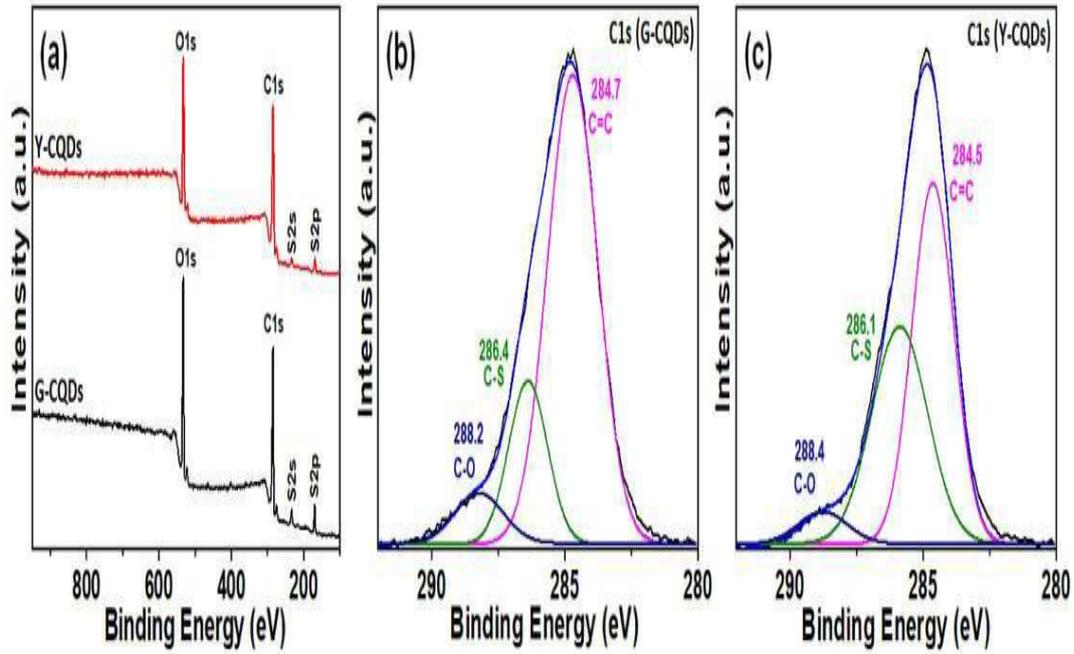
도면8



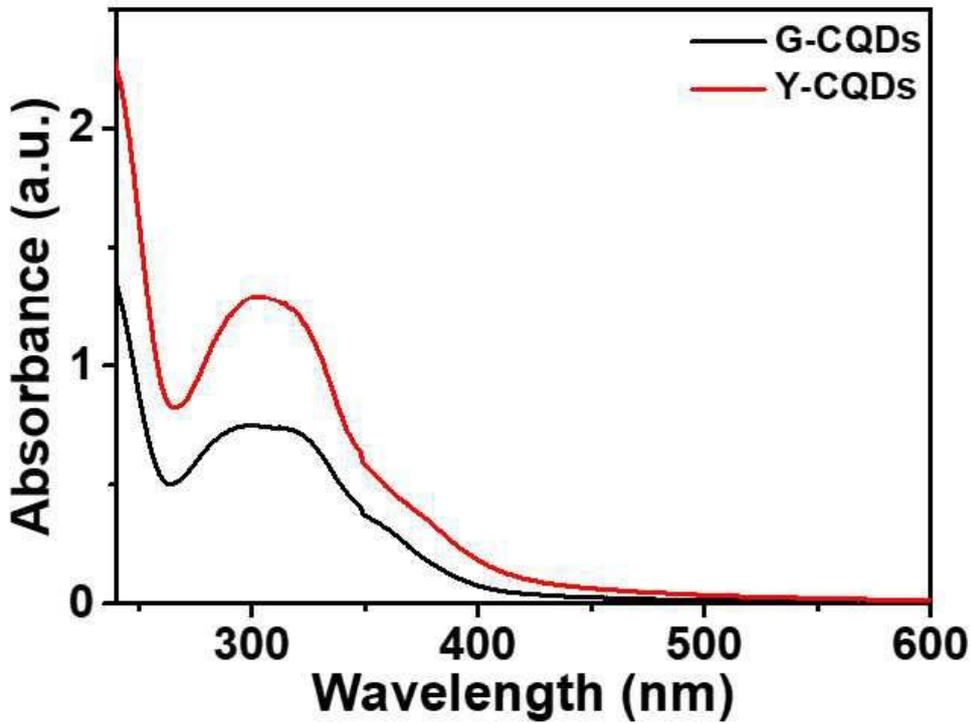
도면9



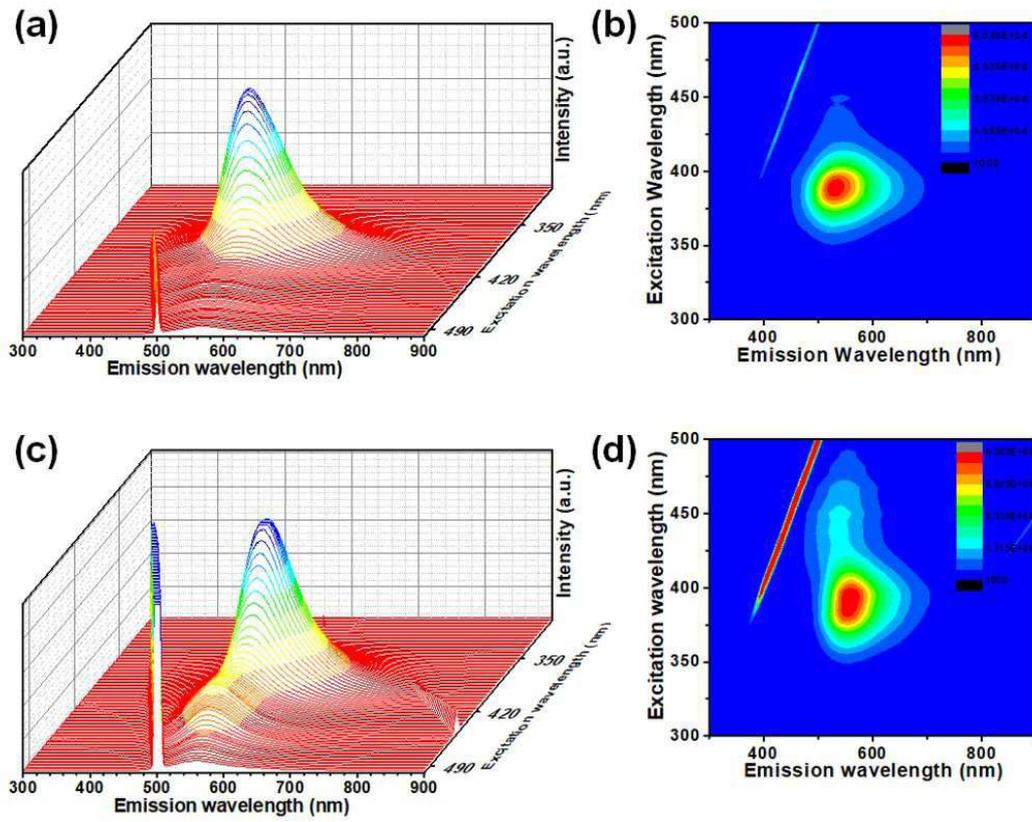
도면10



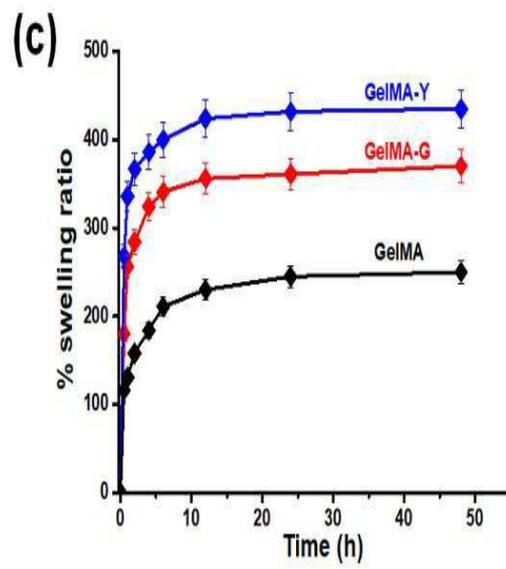
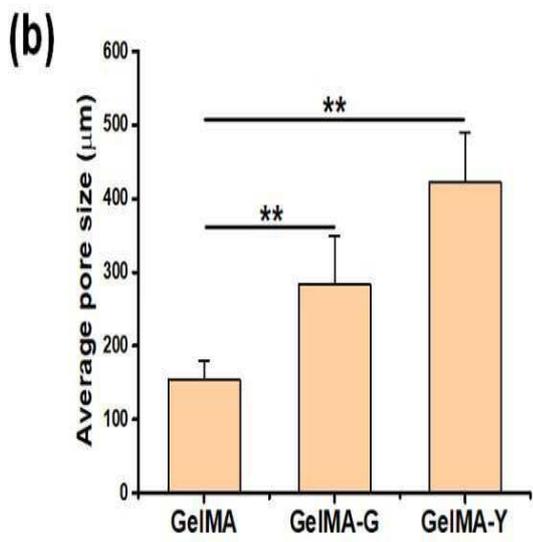
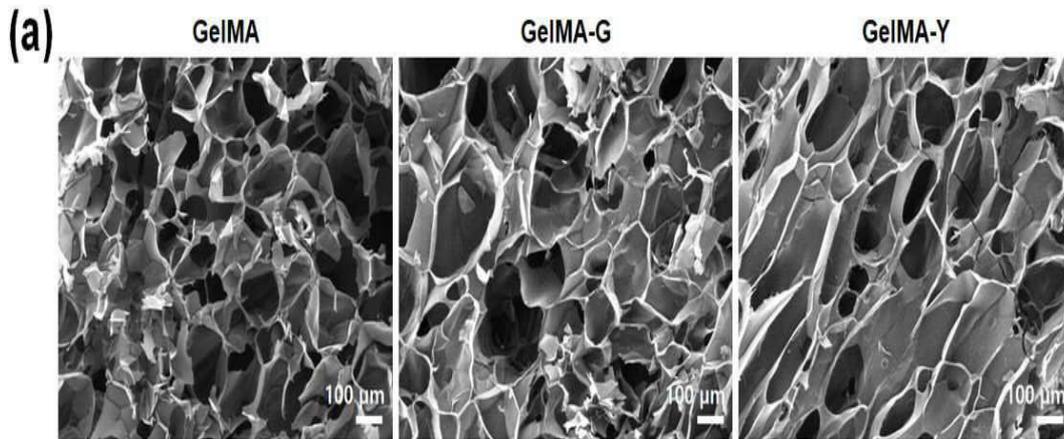
도면11



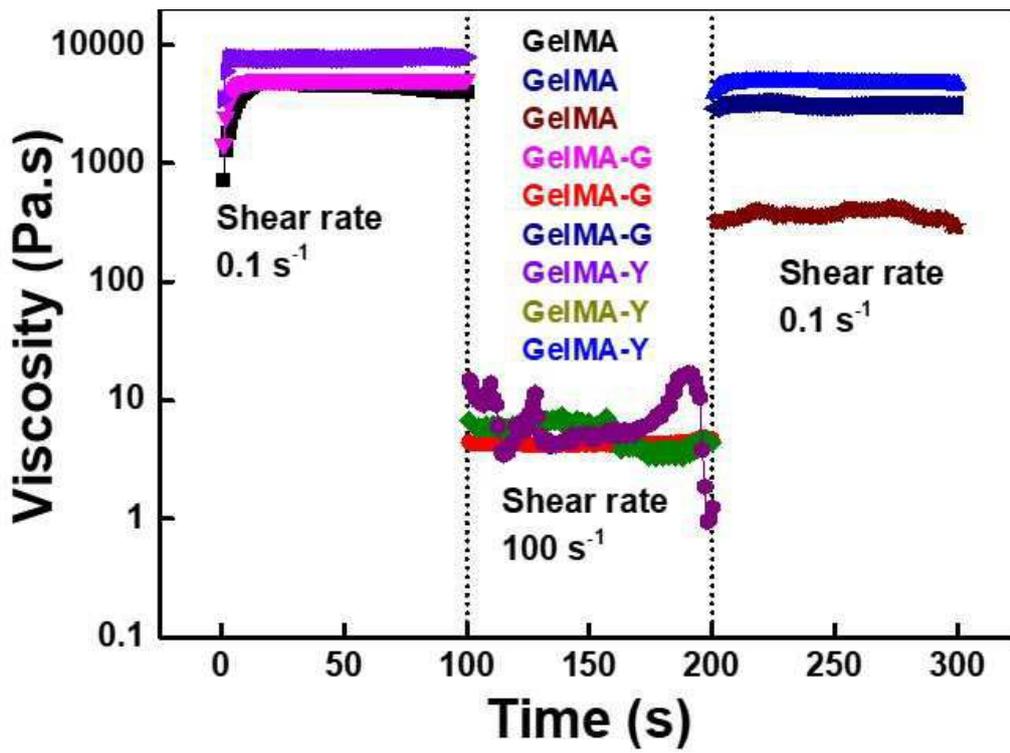
도면12



도면13



도면14



도면15

