



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0105804
(43) 공개일자 2021년08월27일

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61L 27/52</i> (2006.01) <i>A61L 27/26</i> (2006.01)
 <i>A61L 27/38</i> (2006.01) <i>A61L 27/48</i> (2006.01)
 <i>A61L 27/56</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61L 27/52</i> (2013.01)
 <i>A61L 27/26</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0181006
 (22) 출원일자 2020년12월22일
 심사청구일자 2020년12월22일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020200020501 2020년02월19일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 강원대학교산학협력단
 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)</p> <p>(72) 발명자
 임기택
 강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트 112동 2308호</p> <p>사안 텡 두타
 강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명 과학대학 1호관 307동 207호</p> <p>(74) 대리인
 구현서</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

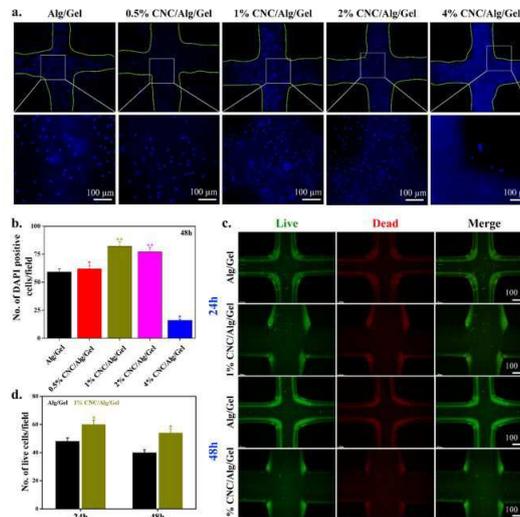
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하는 생체 조직공학용 조성물 및 그 응용**

(57) 요약

본 발명은 알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1중량 %첨가하여 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드의 존재 하에서 중간엽 줄기세포를 배양하여, 상기 줄기세포의 생존률을 증가시키는 방법 및 그 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명의 하이드로겔은 뼈 조직 공학 적용을 위한 우수한 기계적 및 생체 적합성 특성을 갖는 하이드로겔 잉크와 같은 새로운 생체재료 후보로 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

- A61L 27/3834 (2013.01)
- A61L 27/3847 (2013.01)
- A61L 27/48 (2013.01)
- A61L 27/56 (2013.01)
- A61L 2430/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306818
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기여율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포 생존률 증가용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털은 각각 3중량 % 및 1중량 %을 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포 생존률 증가용 조성물.

청구항 3

알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1중량 %첨가하여 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드의 존재 하에서 중간엽 줄기세포를 배양하여, 상기 줄기세포의 생존률을 증가시키는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 생존률을 증가시키는 방법.

청구항 5

알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포의 세포 부착력 효율 증가용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량%이고, 셀룰로스나노크리스털은 1중량 %을 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포의 세포 부착 효율 증가용 조성물.

청구항 7

알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1 중량 %첨가하여 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드의 존재 하에서 중간엽 줄기세포를 배양하여, 상기 줄기세포의 세포 부착 효율을 증가시키는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 효율을 증가시키는 방법.

청구항 9

알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조되고 가교된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층(layer) 무결성 증가용 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량%이고, 셀룰로스나노크리스털은 1 중량 %을 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층 무결성 증가용 조성물.

청구항 11

알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1 중량 %첨가하여 제조되고 가교된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드에서 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층 무결성을 증가시키는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것을 특징으로 하는 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드에서 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층 무결성을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하는 생체 조직공학용 조성물 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 생명공학 분야 중에서도 조직의 치료 및 재생을 위한 조직공학(tissue engineering) 분야가 발달하고 있다.

[0003] 생체조직공학(Tissue engineering)이란 생명과학, 의학 및 공학의 기본 개념과 기술을 바탕으로 생체조직의 대용품을 만들어 생체에 이식함으로써 생체 기능의 유지, 향상 및 복원을 가능하게 하는 기술을 통틀어 일컫는 말이다.

[0004] 예를 들어 생체조직공학의 실제 구현은 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양하여 필요한 양만큼 증식시키고 다공성을 지닌 생분해성 지지체(또는 스캐폴드, Scaffold)에 심어 일정 기간 체외배양한 후 이러한 지지체를 다시 인체 내에 이식하는 방식으로 이루어진다.

[0005] 이식 후에 세포들은 대부분의 조직이나 장기의 경우 신생 혈관이 형성될 때까지는 체액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받다가 인체 내의 혈관이 들어와 혈액의 공급이 이루어지면 세포들이 증식 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 생분해성 고분자 지지체는 그 동안 분해되어 사라지게 된다.

[0006] 인체조직의 재생을 위해 사용되는 지지체 재료의 주된 요건은 다음과 같다.

[0007] 가장 기본적으로는 조직세포가 그 위에 잘 부착(유착)되어야 하고, 조직세포가 재료 표면에 부착하여 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 지지체의 역할을 충분히 할 수 있는 소정의 기계적 강도를 지녀야 한다.

[0008] 또한 이식 후 혈액응고나 염증반응 등이 일어나지 않는 무독성의 생체적합성이 있어야 한다. 아울러 이식된 세포가 새로운 체내조직으로서 기능과 역할을 하게 되면 원하는 시간 안에 생체 내에서 완전히 분해되어 사라질 수 있는 생체분해성도 겸비해야 한다.

[0009] 이러한 생체조직공학용 지지체의 제조와 관련하여 바이오 3D 프린팅 기술이 급격히 발전하였다.

[0010] 그러나, 3차원 지지체 제조를 위한 바이오 3D 프린팅 기술에 사용되는 원료 물질은 합성 고분자 등으로 한정되어 있고 새로운 원료에 대한 연구는 거의 진행되지 않고 있는 상황이다.

[0011] 구체적으로, 현재 바이오 3D 프린팅 기술을 통해 제조되는 대부분의 지지체는 FDA의 승인을 받은 분해성 합성 고분자, 예컨대 PLGA(Poly(lactic-co-glycolic acid)), PCL(Poly(caprolactone)), PLA(Poly(lactic acid)),PGA(Poly(glycolic acid)) 등을 사용하고 있다.

[0012] PLGA나 PCL 등의 합성 고분자들은 물성이 우수하고 다른 합성 고분자들에 비해 생체적합성도 높은 편이나, 분해시 발생하는 산성 부산물로 인해 조직에 염증을 유발할 수 있는 위험이 있다.

[0013] [선행 특허 문헌]

[0014] 한국공개특허 제10-2011-0118095호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규의 생물학적, 물리화학적 및 기계적 특성이 강화된 생체재료를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포 생존률 증가용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털은 각각 3중량 % 및 1중량 %을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0018] 또 본 발명은 알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1중량 %첨가하여 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드의 존재 하에서 중간엽 줄기세포를 배양하여, 상기 줄기세포의 생존률을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0020] 또 본 발명은 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 3차원 인쇄된 스캐폴드에서 중간엽 줄기세포의 세포 접착력 효율 증가용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량%이고, 셀룰로스나노크리스털은 1중량 %을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0022] 또 본 발명은 알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1 중량 %첨가하여 제조된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드의 존재 하에서 중간엽 줄기세포를 배양하여, 상기 줄기세포의 세포 부착 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0024] 또한 본 발명은 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털을 유효성분으로 포함하여 제조되고 가교된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층(layer) 무결성 증가용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량%이고, 셀룰로스나노크리스털은 1 중량 %을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0026] 또한 본 발명은 알지네이트 및 젤라틴 하이드로겔 스캐폴드에 셀룰로스나노크리스털을 전체 1 중량 %첨가하여 제조되고 가교된 알지네이트, 젤라틴 및 셀룰로스나노크리스털 하이드로겔로 프린팅된 스캐폴드에서 상기 가교된 하이드로겔로 제조된 프린팅된 스캐폴드의 층 무결성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔에서 알지네이트는 4 중량 %, 젤라틴은 3중량 % 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

[0028] 이하 본 발명을 설명한다

[0029] 본 발명에서는 알지네이트 (Alg)/젤라틴 (Gel)/ CNC 기반 3D 프린팅 가능, 생물활성을 가진 생분해성 및 생체 적합성 나노 복합체 잉크를 조제하고 인쇄된 스캐폴드를 물리적 및 화학적 가교를 통해 제조하여 생물학적 활성을 비교했다. CNC는 Alg/Gel 매트릭스에서 우수한 기계적 안정성과 점도 조절제로 인해 강화제로 간주되었다. 안정성, 점도 및 세포 적합성에 대한 CNC의 영향은 형태학적 관찰, FTIR 분석, 유변학적(rheological) 테스트, 팽창 작용 및 시험관 내 세포 생존력을 통해 테스트되었다. Alg/Gel/ CNCs 복합 잉크를 DIW 기반 인쇄를 통해 가교제로서 CaCl2를 혼입하기 전과 후에 인쇄 가능성과 형상 충실도를 평가했다. 3D 프린팅된 구조는 뼈 재생을

위해 두개 결합 모델에서 테스트되었다.

발명의 효과

[0030]

본 발명에서, 조직 공학 응용을 위한 3D 프린팅에서 바이오 잉크로 사용하기 위해 알지네이트/젤라틴을 통합한 CNC의 생물 활성 및 생분해성 하이드로겔을 제작했다. 순수한 고분자 하이드로겔과 비교하여 복합 하이드로겔에서 강화된 가교 결합이 관찰되었으며, 이러한 경향은 인쇄된 스캐폴드에 가교 결합제를 추가함으로써 더욱 증가되었다. 인쇄된 스캐폴드의 구조는 동결 건조 후에도 유지되어 안정성을 나타낸다. 폴리머 사슬과 통합된 CNC 사이에 더 큰 상호 작용이 관찰되어 기계적 강도가 크게 향상되었다. 더 큰 가교 경향으로 인해 합성 스캐폴드에서 순수 폴리머 스캐폴드보다 팽창 가능성이 감소했다. 인쇄된 스캐폴드의 존재 하에서 hBMSC로부터 어떠한 부작용도 발생되지 않아 생체 적합성을 보여 주었다. 골 형성 관련 유전자 마커(Runx2, ALP, BMP-2, OCN, OPN, BSP 및 COL1)의 발현이 대조군보다 인쇄된 복합 스캐폴드의 존재에서 발생하여 향상된 골 형성 능력을 보여준다. 또한, 이식 3 주 후 복합 스캐폴드의 존재하에 래트 CCD-1 결합 모델에서 신속한 뼈 재생이 관찰되었다. H & E 염색 결과는 대조군과 비교하여 인쇄된 복합 스캐폴드가 있을 때 새로 생성된 뼈 조직의 밀도가 향상되었음을 보여주었다. 따라서 제작된 하이드로겔은 쉽게 인쇄하여 골조직의 빠른 재생을 위한 생체 재료로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1의 왼쪽 세 열: 3D 프린팅 후 가교되지 않은(a-q), 가교된 (b-r) 및 냉장 건조된 (c-s) 스캐폴드를 보여주는 디지털 사진(스케일 막대 : 5mm). 오른쪽 두 열 : CaCl2 가교 후 인쇄된 스캐폴드의 SEM 형태. 스케일 바 : 1mm 및 50 μm(d-t).

도 2는 (a) 순수 폴리머, (b) 나노 복합체 스캐폴드의 FT-IR 스펙트럼.

도 3은 서로 다른 조건에서 3D 프린팅된 스캐폴드의 팽창 거동, (a) 가교되지 않은 스캐폴드, (b) 지정된 시간 간격으로 가교된 스캐 폴드.

도 4는 상온에서 겔 조건에서 제작된 스캐폴드의 기계적 강도 측정. (a) 0.1-100 rad/s의 주파수 범위 내에서 제작된 스캐폴드의 저장 (G ') 및 (b)손실 (G ") 계수의 변화, 및 (b) 각(angular) 주파수로 제작된 것의 점도 복합체의 변화(η^*).

도 5는 Alg/Gel/CNCs 바이오 잉크의 인쇄성 분석. (a) 인쇄 가능성을 위한 확장 현상의 개략도. (b) 인쇄 및 압출 후 공정 중 Alg/Gel/CNC 바이오 잉크의 형상 충실도를 결정하기위한 인쇄 매개 변수. (c) 가교되지 않은 (a 1) 및 가교된 (a2) 샘플에서 필라멘트 직경에 대한 유속의 영향. (d-e) 비가교 및 가교 조건에서 제조된 바이오 잉크의 균일성 계수(U) 및 무결성 계수(I)(* p <0.05 및 ** p <0.01, Tukey의 사후 분석 테스트).

도 6은 3D 바이오프린팅된 구조 내에서 세포 생존력 및 증식. (a) 48 시간 동안 3D 인쇄된 스캐폴드에 생존 세포 배양의 DAPI 염색 (스케일 바 : 100 μm). (b) 배양 48 시간 후 DAPI 양성 세포의 정량화. (c) 표시된 시간 간격에서 세포가 포함된 3D 바이오 프린팅된 구조(Alg / Gel 및 1 % Alg/gel)의 Live / Dead 분석의 대표적인 이미지(스케일 바 : 100 μm). (d) 배양 24 시간 및 48 시간 후 라이브 / 사멸 세포 계수의 정량화. (* p <0.05 및 ** p <0.01, Bonferroni의 사후 분석 테스트).

도 7(a) 표시된 시간 간격으로 WST-1 분석에 의해 3D 프린팅된 스캐폴드에 대한 hBMSC의 시험관 내 세포 독성 평가, (b) 제작된 스캐폴드의 표면에 물방울의 디지털 이미지. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± SD, * p <0.05 및 ** p = 0.046에서의 통계적 유의성(Tukey의 테스트 사후 분석).

도 8은 3D 프린팅된 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드에서 hBMSC의 형태. (a) 표시된 시간 간격에서 3D 스캐폴드에 성장하는 DAPI 양성 세포를 보여주는 대표적인 형광 현미경 이미지(스케일 바 : 200 μm). (b-c) 표시된 시간 간격으로 3D 스캐폴드에 배양된 hBMSC의 Vinculin 및 F- 액틴 발현의 해당 ROI 강도 프로파일이 포함된 형광 이미지 (스케일 바 : 100 μm).

도 9 (a-g) 7 일 및 14 일 배양 후 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드 존재 하에서 골 형성 특이 적 유전자 마커의 실시간 PCR (qPCR) 분석 (* p <0.05 및 ** p <0.01, Tukey의 사후 분석). (h) 3D 프린팅된 스캐폴드에 대한 hBMSC의 골 형성 분화의 가상 도면.

도 10 (a) 생체 내 수술 실험의 디지털 사진, (b) 이식 후 3 주 후 쥐 두개 결손 모델에서 골 재생 결과를 보여

주는 μ CT 이미지. 검은 색과 빨간색 화살표는 치유 및 치유되지 않은 부분을 나타냄.

도 11은 이식 후 3 주 후 결합 부위에서 얻은 조직 절편의 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 염색 (스케일 바: 500 μ m). (a)음성 대조군(-스캐 폴드), 양성 대조군(BMP-2 만) 및 (c) 1 % CNC/Alg/Gel + BMP-2. PE; 골막, NB; 새로운 뼈 형성, OB; 원래 뼈.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0033] 본 발명에서 사용된 먼 펄프 유래 셀룰로스 나노결정(CNC; 평균 입자 크기 10-20 nm 폭, 50-400 nm 길이; 12 % 고형분; 결정 지수 > 70 %)은 Cellulose Laboratories (Cellulose Lab., Canada)로부터 구입하였다.
- [0034] 돼지 피부 유래 젤라틴 타입 B 분말 (순도 : ≥ 98 %; 겔 강도 약 300g 블룸) 및 갈조류 유래 알긴산 나트륨 (순도 ≥ 98 %)은 미국 미주리 주 세인트 루이스 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 완전 자동화된 CELLINK® BIOX 3D 바이오 프린터는 EU, 스웨덴의 CELLINK Corporation에서 구입하였다.
- [0035] 실시예 1. 바이오 잉크 제형:
- [0036] Alg/Gel/CNCs 하이드로 겔은 이전 문헌(Ojansivu, M., et al., Biofabrication, 2019. 11(3): p. 035010)에 설명된대로 제조되었다. 요약하면, CNC 겔을 1x 인산 완충 식염수 (PBS)용액 (Welgene, 대한민국)에 희석하여 0.5, 1, 2 및 4 % (w/v)의 최종 농도를 얻었다. 필요한 양의 Na-alginate 분말을 70 ° C에서 20 분 동안 연속 기계적으로 교반하면서 CNC의 균질 용액에 첨가한 다음 계산된 양의 젤라틴을 45 ° C에서 용액에 통합했다. 용액을 수조(초음파 세정기, 대한 과학)에서 초음파 처리하여 용액에서 기포를 제거하였다. 용액은 밤새 4 ° C에서 냉장고에 보관하여 젤화를 시작하였다. 5 개의 서로 다른 하이드로겔의 조성은 표 1에 나와 있다. 하이드로겔은 4 ° C에서 보관하고 사용하기 전에 37 ° C에서 배양했다 (그림 S1). 서로 다른 농도의 CNC(0, 0.5, 1, 2 및 4 %)를 포함하는 5 개의 모든 하이드로 겔은 Alg/Gel, 0.5 % CNC/Alg/ Gel, 1 % CNC/Alg/Gel, 2 % CNC/Alg/Gel 및 4 % CNC/Alg/Gel로 지정되었다. 모든 구성 요소와 장비는 실험 전에 오토 클레이브 및/또는 UV 광선으로 멸균되었다.

표 1

조성	CNCs (w/v)	Alginate (w/v)	Gelatin (w/v)	Final volume (mL)
Alg/Gel	0% (0g)	3% (1.5g)	4% (2g)	50
0.5% Alg/Gel	0.5% (0.25g)	3% (1.5g)	4% (2g)	50
1% Alg/Gel	1% (0.5g)	3% (1.5g)	4% (2g)	50
2% Alg/Gel	2% (1g)	3% (1.5g)	4% (2g)	50
4% Alg/Gel	4% (2g)	3% (1.5g)	4% (2g)	50

- [0037] 표 1은 본 발명에서 하이브리드 스캐폴드의 합성을 위한 alginate, gelatin, 및 CNCs의 양 및 다른 비율을 나타낸 표.
- [0039] 실시예 2.3D 바이오프린팅
- [0040] 프린팅을 위해, 하이드로겔을 37°C로 가열하고 0.36 mm 금속 니들 (CELLINK, Sweden, EU)을 갖는 플라스틱 인쇄 카트리지 (CELLINK, Sweden, EU)에 부었다. 프린팅은 BIO-X (CELLINK, Sweden, EU)로 수행되었으며 구조물은 냉각된 인쇄상(4-6 ° C)에서 멸균 페트리 디쉬에 직접 인쇄되었다.
- [0041] 그 구조들은 Solidworks 소프트웨어 (www.solidworks.com, Dassault Biosystems, France)에 의해 설계되었다. 정사각형 (5×5×0.8mm), 직사각형 (50×15×0.8mm), 원형 (5×5×0.8mm) 구조는 27G (0.2mm) 금속 헤드 바늘을 사용하여 조심스럽게 인쇄되었다. 인쇄 매개 변수는 표 2에 나열되어 있다.
- [0042] 스캐폴드는 문헌(Soltan, N., et al., ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019. 5(6): p. 2976-2987)에 설명된대로 CaCl2 (100mM)의 유무에 관계없이 처리되었다. 1 시간의 가교 후, 인쇄된 스캐 폴드를 1x PBS (3 회)로 세척하여 스캐폴드에서 과잉 칼슘을 제거하였다.

표 2

조건	Alg/Gel	0.5% Alg/Gel	1% Alg/Gel	2% Alg/Gel	4% Alg/Gel
Needle size (G)	27G	27G	27G	27G	27G
Pressure (kPa)	100	200	350	500	500
Speed (mm/s)	5	5	5	5	5
Print-head Temperature (° C)	35	35	35	35	35
Print-bed temperature (° C)	4	4	4	4	4

[0043]

[0044]

[0045]

[0046]

[0047]

[0049]

[0050]

[0052]

[0053]

[0055]

[0057]

[0058]

[0060]

[0061]

[0062]

[0064]

[0065]

표 2는 5종의 다른 하이드로겔의 삼차원 프린팅 파라미터를 나타낸 표

실시예 3. 특성 연구

형태학적 분석:

인쇄된 스캐폴드의 형태는 가속 전압이 15.0 kV/cm인 주사 전자 현미경 (UR-SEM, Hitachi-S4800, California, USA)으로 분석되었다. 모든 이미지는 1mm 및 50 μm 해상도에서 촬영되었으며 대조군과 비교되었다.

유변학적 분석:

유변학적 분석은 ARES-G2 레오미터(TA Instruments, New Castle, New Castle, Delaware, USA)를 사용하여 6mm 평행 플레이트를 실온에서 수행했다. 하이드로겔은 흐름 및 온도 스위프로 특성화되었다. CNC가 없는 하이드로겔은 대조군으로 간주되었다.

팽윤 테스트:

팽창률을 측정하기 위해 3D 프린팅된 샘플(5 × 5 × 0.8 mm)을 동결 건조하고 샘플의 건조 중량 (Wdry)을 기록했다. 다음으로, 샘플은 평형 팽윤에 도달하기 위해 37 ° C에서 3mL 1x PBS에 담갔다. 마지막으로, 스캐폴드를 블로팅하고 각 샘플의 부어 오른 무게(Wwet)를 서로 다른 시간 간격 (0, 2, 8, 10, 24 및 36h)에서 기록했다. 팽윤율은 아래 식으로 계산하였다.

$$\text{팽윤율}(\%) = (W_{wet} - W_{dry}) / W_{dry} \times 100$$

실시예 6. 인쇄성(printability):

우수한 형상 충실도를 가지는 우수한 품질의 스캐폴드를 인쇄하려면 최적의 인쇄 매개 변수를 사용하여 바이오 잉크의 인쇄 가능성 평가를 결정해야 한다. 여기서, 우리는 5 층의 바늘(27G; 0.2mm)을 사용하여 5mm/s의 인쇄 속도로 하이드로겔의 다른 모양을 인쇄했다. 제조된 바이오 잉크의 인쇄 가능성은 다음 매개 변수에 의해 결정되었다.

팽창 비율:

팽창 비율은 유체 진단 응력으로 인해 니들 팁에서 방출되었을 때 바이오 잉크의 평균 압출로 정의된다. 압출 과정에서 필라멘트 직경이 바늘 직경보다 더 커졌다. 팽창 정도는 각각 잉크 조성, 노즐 직경 (D), 필라멘트 직경 (d) 및 유량에 크게 영향을 받았다. 팽창 비율은 다음 식에 의해 결정될 수 있다.

$$\text{팽창 비율}(\alpha) = d/D$$

균일성 계수:

균일성 계수 (U)는 이론적 설계로 인쇄된 구조의 균일성을 결정하는 데 사용된다. 모든 제조된 바이오 잉크는

동일한 인쇄 속도(5mm/s)로 서로 다른 압출 압력 (잉크 조성에 따라 다름)에서 하나 이상의 레이어를 인쇄하고 도립된 명시야 현미경 (Leica Microsystems, Germany)을 사용하여 이미지를 캡처했다. 인쇄는 세 번 반복되었고 이미지는 ImageJ Fiji 플러그인 (www.imagej.nih.gov)으로 분석되었다. 균일성 계수 (U)는 다음 식에 따라 결정되었다.

[0066] 균일성 계수(U)= 인쇄된 가닥의 길이/이론적 디자인의 길이

[0068] 무결성(Integrity) 계수:

[0069] 무결성 계수는 이론적 설계로 인쇄된 스캐 폴드의 두께를 결정하는 데 사용된다. 각 실험 그룹에 대해 바늘 (27G; 0.2mm)을 사용하여 5mm/s의 압출 속도로 냉각된 프린트 베드에 5 개의 레이어를 조심스럽게 인쇄했다. 인쇄 후 디지털 카메라로 사진을 촬영하고 피지(Fiji) 플러그인이 있는 ImageJ 소프트웨어로 이미지를 분석했다.

[0070] 실험군의 높이를 대조군과 비교하였다. 무결성 계수 (I)는 다음 식에 따라 결정되었다.

[0071] 무결성 계수(I)= 구조체의 두께/대조군 샘플의 두께

[0073] 실시예 7.인 비트로 연구

[0074] 세포 배양 및 유지:

[0075] 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB No. 20018, 서울 대학교)에서 수집하였다. hBMSC는 기존 문헌(Patel, D.K., et al., International Journal of Biological Macromolecules, 2020)을 기초로 배양되었다. 요약 하면, 10 % 소 태아 혈청 (FBS; Welgene Inc., Republic of Korea) 및 1 % 항생제 (Anti-Anti; 100X, Gibco-BRL, USA)를 포함 하는 덜 베코의 변형된 이글 배지(DMEM; Welgene Inc., 대한민국)를 사용하여 5 % CO2를 포함하는 가슴 대기에서 37 ° C (Steri-Cycle 370 Incubator; Thermo-Fischer Scientific, USA)에서 세포 배양을 수행하였다,

[0076] 세포 생존력 분석:

[0077] hBMSC의 생존력은 DAPI 염색 및 WST-1 분석에 의해 평가되었다. 3D 프린팅 된 스캐폴드는 CaCl2와의 가교 직후 세포 생존력을 평가하기 위해 사용되었다. 인쇄된 스캐폴드는 UV 광 처리로 밤새 살균되었다. 멸균된 스캐폴드를 24 웰 플레이트에 놓고 hBMSC (2 x 10⁴ 세포/1mL)를 스캐폴드에 추가하고 최소 48 시간 동안 배양했다. 48 시간 후, 스캐폴드 표면을 1x PBS로 조심스럽게 행구어 파편 또는 죽은 세포를 제거했다. 다음으로 스캐폴드를 3.7 % 파라포름알데히드(PFA; Sigma-Aldrich, USA)로 고정하고 4 ' , 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich, USA)로 염색했다. 추가로, hBMSC (1x 10⁴ 세포/100 μL) 세포를 스캐폴드를 포함하는 96-웰 플레이트에 접종하고 WST-1 분석을 위해 5 일 동안 배양 하였다. 450 nm에서 분광 광도계 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, Switzerland)를 사용하여 세포 생존력을 평가했다. 모든 실험은 삼중으로 수행되었으며 데이터는 평균 OD ± 표준 편차로 표시된다. * p <0.05에서 통계적 유의성이 고려되었다.

[0078] Live-Dead 분석:

[0079] Live-dead 분석의 경우 바이오 잉크를 37 ° C에서 1 시간 동안 예열했다. 그 후, 동일한 부피의 바이오 잉크와 세포(바이오 잉크 : 세포 = 1 : 1 비율)를 사용하여 최종 세포 밀도가 2.5 × 10⁴인 세포가 들어있는 바이오 잉크를 얻었다. 세포가 들어있는 잉크를 냉각했다. 40C에서 5-10 분 동안 냉각된 인쇄 비트에 즉시 인쇄되었다. 인쇄된 구조물을 300mM CaCl2 용액 (1x 멸균 PBS 중 CaCl2)으로 2-5 분 동안 가교 결합하고 PBS(3 회)로 세척 했다. 세포가 실린 구조물을 5 mL의 DMEM 배지로 보충하고 48 시간 동안 배양했다. 특정한 배양 후, 인쇄된 구조물을 1x PBS (2 회)로 세척하고 100 μL의 아크리딘 오렌지/에티뎀 브로마이드(AO:EtBr = 1 : 1 비율, 각각 1 mg / mL 스탁) 염료로 염색하고 도립된 형광 현미경으로 즉시 시각화했다. 이미지는 특정 필터 큐브를 사용하여 캡처되었으며 피지 플러그인(ImageJ, www.imagej.nih.gov, NIH Lab., USA)를 가지는 ImageJ 소프트웨어에 의해 라이브 셀의 비율이 계산되었다.

[0081] 세포 형태 및 부착:

[0082] hBMSC의 형태는 약간의 수정으로 이전 논문(Patel, D.K., et al., International Journal of Biological

Macromolecules, 2020)에서 설명한 바와 같이 광학 및 형광 현미경으로 평가되었다.

[0083] 형광 이미징을 위해 2.5×10^4 세포를 사전 배양된 3D 스캐폴드에 시드하고 7 일 동안 배양했다. 그 후, 세포를 1X PBS로 2 회 행구고 4 % 파라포름알데히드 (PFA; Sigma-Aldrich, USA)에 고정하고 0.1 % Triton-X 100으로 투과시켰다. 다음으로 세포를 1 % 소 혈청 알부민(BSA; ≥ 99 %; Sigma-Aldrich, USA)으로 60 분 동안 차단하였고, 빈쿨린에 대한 마우스 단클론 항체 $150 \mu\text{L}$ (1 : 200 희석, 미국 산타 크루즈 바이오 테크놀로지)로 1 시간 동안 염색 한 후 Alexa-Flour 488로 배양 -표지 된 이차 항체 (1 : 150 희석, Santa Cruz Biotechnology, USA). 특정 항체 처리 후, 세포를 멸균 PBS로 세 번 세척하고 핵을 DAPI로 1 분 동안 카운터 염색하고 20x 대물 렌즈하에 도립 형광 현미경 (DMi8 시리즈, 독일 Leica Microsystems)으로 시각화했다. 액틴 골격을 분석하기 위해 세포를 액틴 마우스 단클론 항체 (1 : 200 희석)로 염색하고 Alexa-Flour 488 표지 염소 항-마우스 2 차 항체(1: 500 희석, Thermo-Fischer Scientific, USA) 프로브를 사용했다. 추가로 적절한 필터 채널로 이미지를 캡처하고 Leica Microsystems Suite X 소프트웨어 (Leica Microsystems, 독일)를 사용하여 형광 강도를 분석했다.

[0084] 광물화 연구:

[0085] 3D 프린팅된 스캐폴드의 광물화 효율은 배양 7 일 및 14 일 후 알리자린 레드-S (ARS) 염색을 통해 평가되었다. 요약하면, hBMSC (4×10^6 세포/1 mL)를 24 웰 플레이트의 3D 스캐폴드에 접종하고 4-5 일 동안 배양했다. 그 후, DMEM 배지는 $50 \mu\text{g/mL}$ 아스코르브산, 10mM β - 글리세로포스페이트 및 100nM 텍사메타손(Sigma-Aldrich Inc., USA)이 포함된 골 유도 배지로 대체되었다. 또한 조 CNC(0 %, 0.5 %, 1 %, 2 % 및 4 %)의 효과도 ARS 염색을 통해 평가하여 hBMSC의 체외 광물화에 대한 CNC의 효과를 평가했다. 특정 배양 기간 후 세포를 1x PBS(Welgene, 대한민국)로 두 번 세척하고 실온에서 15 분 동안 70 % 에탄올로 고정시켰다. 다음으로 고정된 플레이트를 40mM ARS (pH 4.2; Sigma-Aldrich, USA)로 5-10 분 동안 염색 한 후 증류수로 세척하였다. 광물화 된 결절 형성은 도립 광학 현미경 (Zeiss Optical Microscope, Germany)으로 포착되었다. 이미징 후, 웰을 10 %의 세틸피리 디늄 클로라이드(Sigma-Aldrich, USA)와 10nM의 인산 나트륨 (Sigma-Aldrich, USA)을 함유하는 $500 \mu\text{L}$ 의 탈염 용액 (pH 7.0)으로 세척했다. 남아있는 액체를 96-웰 플레이트에 취해서 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화했다. 모든 실험은 삼중으로 이루어졌으며 데이터는 평균 OD \pm 표준 편차로 표시된다. * $p < 0.05$ 에서 통계적 유의성이 고려되었다.

[0086] 유전자 발현 연구:

[0087] 처리된 샘플과 대조 샘플 모두에서 유전자 발현을 연구하기 위해 hBMSC (4×10^4 세포/1mL)를 새로 인쇄된 구조물에 시드하고 37 °C에서 5 % CO2에서 골 형성 유도 배지에서 배양했다. qPCR 분석은 기존 문헌(Patel, D.K., et al., International Journal of Biological Macromolecules, 2020)을 참고하여 수행되었다. 전체 RNA는 제조업체의 지침에 따라 TRIzol® 시약 (미국 Thermo-Fischer Scientific)으로 추출되었다. RNA 샘플 순도와 농도는 분광 광도계 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, Switzerland)로 측정했다. 역전사 효소(Superscript II RTase; Invitrogen, Gaithersburg, MD) 및 SYBR Green Master Mix(Bio-Rad, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하기 위해 $2 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 사용했다. mRNA 발현은 Bio-Rad Real-Time PCR (CFX96™ Maestro Real-Time System, Bio-Rad, USA)을 사용하여 qRT-PCR로 정량화되었다. 모든 반응은 삼중화되었고 하우스 키핑 유전자 베타-액틴 (β - 액틴)으로 정규화되었다. 특정 프라이머 세트 (예 : Runx2, ALP, BMP-2, OCN, OPN, BSP 및 COL1)는 표 3에 나열되어 있다. 모든 프라이머는 BIONEER® Inc. (대한민국 대전)에서 합성했다.

표 3

[0088]

Genes	GenBank Accession No.	Sequences (5'에서 3')
<i>beta-actin</i>	NM_031144	ACCCGCGAGTACAACCTTCT CTTCTGACCCATACCCACCA
<i>Runx2</i>	NM_001146038	CGCAGACAACCGCACCAT CAGCACGGAGCACAGGAAGTT
<i>ALP</i>	NM_007431	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGAGGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
<i>BMP-2</i>	NM_017178	ACCCGCTGTCTTCTAGTGTTG TTCTTCGTGATGGAAGCTGAG
<i>OCN</i>	AL135927	TGAGAGCCCTCACACTCCTCACCTTTGCTGGACTCTGCAC
<i>OPN</i>	J04765	TGAAACGAGTCAGCTGGATGTGAAATTCATGGCTGTGGAA

<i>BSP</i>	L09555	AAC TTTTATG TCCCCGTTGATGGACTGGAAACCGTTTCAGA
<i>COL1</i>	NM007742	GCTCCTCTTAGGGG CCACT CCACGTCTCACCATTGGGG

[0089] 표 3은 qRT-PCR에서 사용된 특정 유전자 프라이머 서열을 나타내며, 상기 표에서 약어: *beta-actin*; Actin beta, *Runx2*; Runt-related transcription factor-x2, *ALP*; Alkaline phosphatase, *BMP-2*; Bone morphogenic protein-2, *OCN*; Osteocalcin, *OPN*; Osteopontin, *BSP*; Bone sialoprotein, and *COL1*; Collagen type-1.

[0091] 실시예 8.인 비보 연구

[0092] 동물 관리 및 유지:

[0093] 모든 실험은 Capital Medical University 동물 실험 윤리위원회 (AEEC, Capital Medical University 동물 관리 및 사용위원회, 허가 번호 CMUSH-IRB-KJ-2019-04)의 승인을 받았다. 외과 실험은 동물 실험 윤리위원회 (AEEC) 표준에 따라 수행되었다. 2 개월령 ICR 수컷 랫트 (각 실험 그룹에서 n = 6, 2)를 생체 내 뼈 재생 연구에 사용했다. 체외 실험을 기반으로 1 % CNC/Alg/Gel (n = 2)을 실험 그룹으로 선택했다. 또한 1 % CNC/Alg/Gel과 결합된 BMP-2 (rBMP-2, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 뼈 재생 시너지 효과를 연구했다. 미처리 군과 BMP-2 처리 군은 음성 (n = 2) 및 양성 대조군 (n = 2)으로 간주되었다. 모든 쥐는 자동으로 제어되는 12 시간 조명 및 12 시간 어두운주기에서 35 ± 2 %의 일정한 상대 습도 (RH)를 유지하면서 주변 온도 21 ± 2 ° C로 유지되는 절연 된 방음 녹음실에 보관되었다. 동물의 고통과 신뢰할 수 있는 과학적 데이터를 생성하는 데 필요한 동물의 수를 줄이기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0095] 스캐폴드의 수술 및 이식:

[0096] 수술 전에 쥐를 0.5 mL/kg의 5 % 펜토바르비탈 나트륨(Sigma-Aldrich, USA)으로 마취했다. 마취 후 멸균 수술용 칼날을 사용하여 두피에 1-1.5cm 시상면 봉입을 매우 조심스럽게 만들었다. 멸균된 1 % 식염수로 지속적인 관개 하에 두개골의 중앙 영역에 치명적인 결함(약 5mm)이 생성되었다. 결함 부위는 외과용 게이지로 조심스럽게 세척하고 5 x 5 mm 원형 스캐폴드를 무균적으로 이식했다. 나중에 연조직을 재배치하고 봉합했다. 모든 쥐는 희생 될 때까지 음식과 물을 충분히 제공 받았다.

[0097] 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(μCT) 분석:

[0098] 이식 후 3 주 동안 쥐를 μCT 분석을 위해 희생시켜 두개골 결손의 새로운 뼈 형성을 평가했다. 요약하면, 두개골 뼈가 있는 이식된 스캐폴드를 수확하고, 4 % 파라포름알데히드로 고정하고, μCT 스캐너 (Spectral Lago X, Tucson, Arizona, USA)로 20 μm의 해상도로 스캔했다. 3D 이미지는 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ, v1.5, National Institute of Health, USA)로 캡처하고 정량화했다.

[0099] 조직학적 분석:

[0100] 조직학적 분석을 위해, μCT 샘플을 3.7 % 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich, USA)에 48 시간 동안 고정하고 4 ° C에서 12 % EDTA를 사용하여 석회질을 제거했다. 다음으로 샘플을 세척하고 에탄올로 탈수하고 마지막으로 파라핀에 묻혀 미세한 부분을 만들었다. 그런 다음 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H & E)으로 염색하고 도립 광학 현미경으로 시각화했다.

[0102] 상기 실시예의 통계 분석은 OriginPro 9.0 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 치료군과 대조군 사이의 통계적 유의성은 일원 분산 분석 (Tukey의 사후 분석)을 사용하여 비교되었다. WST-1 분석의 경우 Bonferroni의 테스트를 수행했다. 데이터는 3 회 반복 실험 (n = 3)의 평균 ± 표준 편차로 표시되었으며 통계적 유의성은 * p < 0.05에서 고려되었다.

[0103] 상기 실시예의 결과를 하기에 기재한다.

[0104] 스캐폴드 특성화:

[0105] 인쇄된 스캐폴드의 디지털 사진은 그림 1에 나와 있다. 가교되지 않은(그림 1a-q) 및 가교된(그림 1b-r) 스캐폴

드는 습한 조건에서 유사한 모양과 형태를 닮았다. Alginate의 가교를 위해 CaCl_2 용액이 적용되었다. Alg와 Gel의 물리적 가교는 샘플을 40°C에서 배양하여 이루어졌다. 가교된 스캐폴드의 형태는 FE-SEM에 의해 평가되었으며 이미지는 그림 1(d-t)에 표시하였다. 가교된 스캐폴드는 부드러운 형태를 나타내어 CNC가 하이드로겔에 잘 분산되어 있음을 보여준다.

[0106] 그러나 낮은 배율에서는 모든 스캐폴드가 느슨하게 구성된 구조를 나타냈다.

[0107] 본 발명자들은 CNC 기반 스캐폴드를 제조하고 가교제 유무에 관계없이 그들의 생체 활성을 비교했다.

[0108] FTIR 분석:

[0109] 순수 Alg, Gel 및 CNC의 FTIR 스펙트럼은 그림 2 (a)에 나와 있다. Pure Alg는 3203과 1636 cm^{-1} 에서 흡수 피크를 나타내며, 각각 구조에 -OH (하이드록실) 및 -C=O (카르보닐) 그룹이 존재 함을 시사한다. 젤라틴의 1633, 1534 및 1236 cm^{-1} 에서 흡수 피크는 각각 -C=O (카르보닐), -NH (아미드) 및 -CN (아미드 III)의 존재에 기인한다. 젤라틴의 3280 cm^{-1} 에서 넓은 흡수 피크가 나타나는 것은 구조에 -OH (하이드록실) 및 -NH₂(아민) 그룹이 있음을 나타낸다. CNC는 3248 및 2927 cm^{-1} 에서 특징적인 피크를 나타내며, 이는 -OH 및 -CH 스트레칭 진동을 나타낸다. 더욱이 1595와 1406 cm^{-1} 에서 두 개의 피크는 흡착된 물의 존재와 혼합 진동(주로 HCH 및 OCH 진동)에 기인한다. Alg/Gel의 FTIR 스펙트럼과 표시된 복합 스캐폴드는 (그림 2b)에 나와 있다. -C=O 및 -NH 모이어티에 해당하는 Alg/Gel 스캐폴드의 1610 및 1537 cm^{-1} 에서 흡수 피크가 복합 스캐폴드에서 더 높은 파수로 이동하여 하이드로겔 성분 사이에서 더 큰 상호 작용을 보여주는 것은 흥미로웠다. Alg/Gel 스캐폴드에서 3270 cm^{-1} 에서 넓은 흡수 피크가 나타나는 것은 수소 결합된 -NH₂ 및 -OH 모이어티의 존재를 나타낸다.

[0110] 팽윤 연구:

[0111] 팽윤은 생의학 응용을 위한 하이드로겔 스캐폴드의 중요한 요소 중 하나이다. 팽창 효율은 생물학적 시스템 내부의 수화 능력과 안정성을 직접적으로 나타낸다. 가교제가 없는 3D 프린팅된 스캐폴드의 팽윤 효율은 37 ° C에서 PBS 용액에서 평가되었으며 그 결과는 그림 3a에 나와 있다. Alg/Gel 스캐폴드는 Alg/Gel 스캐폴드가 통합된 CNC에 비해 더 높은 팽창 가능성을 나타냈다. 스캐폴드의 팽윤 잠재력은 수산기, 무정형 영역, 가교 정도 및 결정성의 가용성에 의해 크게 영향을 받는다. Alg/Gel 스캐폴드에 비해 복합 스캐폴드의 낮은 팽윤 가능성은 CNC의 존재 하에서 향상된 가교 능력과 관련이 있으며, 이는 물 흡수 가능성을 방해한다. 복합 지지체의 더 높은 가교 능력은 인쇄된 지지체의 확장 비율의 변화로 설명할 수 있다. CNC 농도가 증가하는 복합 스캐폴드에서 팽창 비율의 감소가 관찰되어 반고체 거동이 팽창 가능성을 감소시키는 것을 보여준다. 반면 Alg/Gel 스캐폴드는 더 높은 팽창비를 나타내어 최소 고체 특성을 나타내며 더 많은 수분 섭취를 유도한다.

[0112] 가교제와 함께 3D 프린팅된 스캐폴드의 팽창 가능성도 동일한 조건에서 평가되었으며 그 결과는 그림 3b에 나와 있다. 가교된 스캐폴드는 가교되지 않은 스캐폴드와 유사한 팽창 패턴을 나타냈다. 그러나 가교된 스캐폴드의 팽윤 효율은 스캐폴드의 가교 효율을 제공하는 추가 가교제의 존재로 인해 가교되지 않은 스캐폴드보다 상대적으로 낮았다. 따라서, 가교되지 않은 스캐폴드에 비해 가교된 스캐폴드의 팽윤 잠재력의 감소가 발생했다.

[0113] 유변학적 분석:

[0114] 인쇄된 하이드로겔의 기계적 강도는 실온에서 0.1 ~ 100 rad/s의 각 주파수 (ω) 범위에서 회전 레오미터에 의해 결정되었으며, 측정된 인쇄된 하이드로겔의 저장 모듈러스 (G')의 변화는 ω 범위는 그림 4a에 나와 있다. Alg/Gel 하이드로 겔과 비교하여 복합 하이드로겔에서 측정된 ω 영역 전체에서 G' 값의 향상이 발생했으며, 이 값은 CNC의 함량이 증가함에 따라 더욱 증가하여 CNC가 기계적 강도에 긍정적인 영향을 미친다. 인쇄된 하이드로겔. 복합 하이드로겔에 대한 G' 값의 이러한 개선은 폴리머 매트릭스와 통합된 CNC 사이의 더 큰 상호 작용으로 인해 폴리머 사슬의 움직임을 제한한다. CNC의 존재 하에서 폴리머 사슬의 움직임에 대한 제한은 스캐폴드의 결정 구조를 용이하게 하여 순수한 폴리머 하이드로겔에 비해 G' 값을 증가시킨다. 측정된 ω 범위에서 인쇄된 하이드로겔의 손실 계수(G'')의 변화는 그림 4b에 나와 있다. G'' 값의 향상은 순수 폴리머 하이드로겔에 비해 복합 하이드로겔에서 측정된 ω 영역 전체에서 발생했으며 이 값은 CNC의 함량이 증가함에 따라 더욱 증가했다. 그러나 G'' 의 값은 G' 에 비해 적다. 측정된 ω 영역 내에서 인쇄된 하이드로겔의 점도 복합체 (η^*)의 변화는 그림 4c에 나와 있다. 복합 하이드로겔은 ω 의 하부 영역에서 순수 폴리머 하이드로겔에 비해 높은 η^* 값을 보였으며, 이 값은 폴리머 매트릭스에서 CNC 함량이 증가함에 따라 더욱 향상되어 하이드로 겔의 전단 농축 특성을 보여준다. 그러나 η^* 값의 감소는 ω 의 크기가 증가함에 따라 발생하여 하이드로 겔의 전단 얇아짐 특성을 나타낸다. 전단 두꺼움과 얇아짐 특성은 하이드로겔의 인쇄성에 필수적인 역할을 한다.

[0115] 인쇄 가능성 분석:

[0116] 그림 5a는 인쇄 중 점탄성 및 전단 응력으로 인한 팽창 현상의 개요를 나타낸다. 인쇄 공정은 바이오 잉크의 조성, 농도, 층 두께 및 인쇄 속도에 의해 크게 영향을 받는다. 여기에서는 모든 다른 바이오 잉크에 대해 1 층, 2 층 및 5 층 스캐폴드를 인쇄하고 각각 확장 비율 (α), 균일성 계수 (U) 및 무결성 계수 (I)를 사용하여 인쇄 가능성을 분석했다. 인쇄된 스캐폴드의 기하학적 구조에 영향을 미치는 다양한 인쇄 매개 변수가 그림 5b에 나와 있다. 가교되지 않은 샘플과 가교된 샘플의 팽창비는 그림 5c에 나와 있다. α 값은 가교 전 (α_1)과 가교 후 (α_2) 필라멘트의 팽창 정도를 나타낸다. D 와 d 는 필라멘트 폭과 바늘 직경 (0.2mm)을 나타낸다. 본 발명자들은 인쇄된 스캐폴드의 균일성을 유지하기 위해 실험 전반에 걸쳐 27G 바늘을 사용했다. 결과는 인쇄된 스캐폴드의 확장 비율이 가교되지 않은 샘플과 가교된 샘플 모두에서 다양하다는 것을 나타낸다. 가교되지 않은 스캐폴드의 경우 CNC 농도가 증가함에 따라 α 값이 점차 감소한다. 유사한 관찰이 가교된 스캐폴드에서도 관찰되었는데 이는 CNC와 Alg/Gel의 더 큰 상호 작용을 나타내며, 이는 고점도 잉크의 형성을 선호한다. 이러한 개선으로 인해 팽창률이 감소하고 하이드로겔의 기계적 강도가 증가한다. 균일성 계수는 모든 실험 그룹에 대해 5mm/s의 인쇄 속도로 전체 구조의 한 레이어에 대해 결정되었다. 상응하는 광학 이미지가 있는 모든 다른 바이오 잉크에 대한 균일성 계수는 그림 5d에 나와 있다. 결과는 가닥의 길이가 가교제의 영향을 많이 받는다는 것을 나타낸다. 가교되지 않은 것과 가교된 스캐폴드는 4 ° C에서 거의 완벽한 가닥($U=1.2$)을 가졌다. 가교되지 않은 샘플과 가교된 샘플 모두의 무결성 계수는 5 겹 인쇄 후 평가되었고 대조 샘플과 비교되었다. 해당 디지털 사진과 함께 인쇄된 모든 스캐폴드의 무결성 계수는 그림 5e에 나와 있다. 이전 매개 변수와 달리 CaCl₂ 가교는 인쇄된 스캐폴드의 레이어 무결성을 크게 향상시켰다. 특히, 1 % CNC/Alg/Gel, 2 % CNC/Alg/Gel 및 4 % CNC/Alg/Gel 샘플은 다른 실험 그룹에 비해 우수한 무결성 ($I=0.8$ mm)을 가졌다.

[0117] 생체 적합성 및 광물화 능력:

[0118] 인쇄된 스캐폴드의 생체 적합성은 48 시간 동안 hBMSC의 존재 하에서 통상적인 배양과 세포가 있는 기술로 평가되었으며 그 결과는 그림 6에 나와 있다. Alg/Gel 스캐폴드가 있는 배양 배지는 대조군으로 간주되었다. 원하는 기간 후에 세포를 DAPI로 염색하고 DAPI 양성 세포의 수를 ImageJ에 의해 계수했다. DAPI 염색된 세포의 이미지는 그림 6a에 나와 있다. 대조군과 비교하여 복합 스캐폴드에서 DAPI 염색된 세포 밀도의 상당한 향상이 발생하여 폴리머 매트릭스에 CNC가 존재하면 세포 부착이 용이함을 나타낸다. DAPI 양성 세포/필드의 수는 그림 6b에 나와 있다. 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드의 표면에 최대 세포 수가 부착되었기 때문에 세포가 실린 실험을 위해 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드를 사용했다.

[0119] 또한, WST-1 분석에서 얻은 결과는 1 % CNC/Alg/Gel 그룹에서 더 큰 세포 생존력이 발견되었으며, 대조군 및 다른 실험 그룹보다 상당히 높았다 (** $p = 0.046$)(도 7). 흥미롭게도, 이러한 향상은 배양 시간이 최대 5 일까지 증가했을 때 더욱 분명해졌으며, 이는 제형화된 바이오 잉크가 hBMSC 증식에 악영향을 미치지 않았음을 시사한다.

[0120] 본 발명의 연구는 또한 제형화된 바이오 잉크가 hBMSC 와도 친근하다는 것을 보여주었다. 따라서, 우리는 세포의 생존력을 결정하기 위해 1 % CNC/Alg/Gel 하이드로겔을 사용하여 세포가 있는 3D 프린팅을 수행했다. 세포가 함유된 배양 48 시간 후, Live/Dead 분석을 통해 살아있는 세포의 수를 정량화하고 그 결과를 그림 6c에 나타냈다. 흥미롭게도 세포는 하이드로겔 내부에서 살아있는 것으로 발견되었다. 그러나 기존의 세포 파종 방법(그림 6d)과 비교하여 생체 잉크에 캡슐화했을 때 살아있는 세포의 수가 현저하게 감소했다 (* $p < 0.05$). 따라서, 감소된 수의 생존 세포는 제작된 하이드로겔 스캐폴드의 생체 적합성이 낮음을 나타낸다. 그러나 스캐폴드는 표면 세포 파종이 수행되었을 때 세포에 더 친숙하다. 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드의 경우 70 % 이상의 세포가 스캐폴드 표면에 부착된 것으로 확인되었다. 따라서, 우리는 제작된 하이드로겔 스캐폴드가 세포가 있는 배양보다 표면 세포 파종에 더 반응한다는 가설을 세웠다.

[0121] CaCl₂- 가교된 Alg/Gel/CNCs 스캐폴드의 표면은 균열이나 응집없이 거의 매끄러웠으며, 이는 천연 ECM의 미세한 나노 구조와 유사하고 인쇄된 스캐폴드의 표면에 단백질 흡착을 촉진했다. 또한, Ca²⁺의 추가와 CNC와 Alg 사이의 강한 상호 작용은 세포 접촉 및 세포 간 통신에 매우 적합한 매우 균일 한 구조를 생성한다. 3D 프린팅된 스캐폴드의 흡윤 가능성은 프린팅된 스캐폴드의 표면에 있는 물방울의 거동을 평가하여 평가되었다. 결과는 Alg/Gel 대조군 샘플에 비해 CNC가 있는 스캐폴드 표면에 물방울이 더 평평한 형태를 나타내며, CNC와 Alg/Gel 폴리머를 혼합하면 친수성이 향상되고 결과적으로 hBMSC의 접착력과 증식이 향상됨을 시사한다.

[0122] 체외 분화 가능성을 조사하기 위해 hBMSC를 3D 스캐폴드에 배양하고 7 일 및 14 일 동안 배양했다. 원하는 시간 간격 후, 세포를 알리자린 레드 -S(ARS) 염색에 적용하여 무기화 잠재력을 연구했다. BMP-2 처리된 플레이트는

양성 대조군으로 간주되었다. 7 일 시점에서 BMP-2의 광물화 효율(A562)과 1 % CNC/Alg/ Gel간에 큰 차이가 없다. 그러나 14 일 시점에서 BMP-2 양성 대조군에 비해 1 % CNC/Alg/Gel에서 광물화 효율이 약간 증가한 것으로 나타났다. ARS의 진한 붉은 색의 출현은 각각 1 % CNC/Alg/Gel 인쇄된 스캐폴드의 골 유도 잠재력을 나타낸다. 따라서 BMP-2 + 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드의 조합은 생체 내 뼈 재생 잠재력을 시너지적으로 유발할 수 있다. 스캐폴드 형태, 표면 화학, 표면 거칠기 및 강성과 같은 다양한 생물 물리학적 및 생화학적 요인은 줄기 세포의 세포 생존력, 증식 및 분화에 중요한 역할을 한다. 세포 및 분자 수준에서 세포-스캐폴드 상호 작용의 메커니즘은 뼈 조직 공학 응용을 위한 새로운 기능성 생체 재료를 개발하는 데 필수적이다.

[0123] 세포 부착 및 형태:

[0124] ECM에 대한 세포의 부착은 시험관 내 증식 및 분화를 위한 중요한 특성 중 하나이다. 따라서 다양한 생체 모방 스캐폴드를 사용하여 ECM을 변형하면 세포 접착력과 골 유도 특성이 각각 향상될 수 있다. 이는 7 일의 배양 후 스캐폴드 표면을 통한 DAPI 염색에 의해 확인되었다(그림 8a). 더욱이, 세포는 배양 시간이 증가했을 때 스캐폴드의 전체 공간을 차지했다. 더욱이, 세포는 배양 7 일 후에 스캐폴드 가닥을 관통하는 것으로 밝혀졌다.

[0125] 세포의 미세 형태는 형광 현미경을 통해 추가로 조사되었다. 해당 ROI 강도를 갖는 빈쿨린 및 F-액틴의 발현은 그림 8(b & c)에 제시되어 있다. 1 % CNC/Alg /Gel 스캐폴드에서 3 일 동안 배양한 후, 세포는 정상적인 빈쿨린 및 F- 액틴 발현으로 건강해 보였다. 흥미롭게도 7 일 후 스캐폴드 표면이 세포로 완전히 덮였다. 일부 세포는 스캐폴드를 통해 튀어 나왔다(그림 8b). 세포 밀도가 7 일 지점에서 증가했기 때문에 계산된 ROI 강도가 3 일 샘플에 비해 크게 증가했다는 점이 흥미로웠다(그림 8c). 이러한 결과는 1 % CNC/Alg/Gel을 포함하는 제형화된 바이오 잉크가 hBMSC에 친화적임을 나타낸다. 따라서, 우리의 결과는 1 % CNC의 추가가 Alg/ Gel 스캐폴드에 비해 Alg/Gel 매트릭스에서 hBMSCs 접착 특성에 큰 영향을 미친다는 것을 시사한다. 이는 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드가 뼈 조직 공학 적용에 이상적인 생체 재료로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0126] 조골 세포 특이적 유전자 마커의 향상된 발현:

[0127] 실시간 중합 효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 수행하여 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드의 존재 하에서 골 유도 동안 골아 세포 특이적 유전자 발현을 조사했다. 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드는 더 큰 광물화 가능성 때문에 유전자 발현 분석을 위해 사용되었다. 존재 하의 상대적 mRNA 발현은 배양 7 일 및 14 일 후에 평가되었고, 도 9에 제공되었다. 스캐폴드가 없는 플레이트는 대조군으로 간주되었다. hBMSC는 다 능성으로 인해 오랫동안 알려져 있다. 초기 발생 중에 hBMSC는 성숙하기 전에 다른 단계를 거친다. 런트 관련 전사 인자-2 (Runx2), 골 형성 단백질-2 (BMP-2), 알칼리성 포스파타제 (ALP), 오스테오칼신 (OCN), 오스테오폰틴 (OPN), 뼈 시알로 단백질 (BSP), 오스테릭스 (OSX), 콜라겐(COL) 등과 같이 골아 세포 발달 과정에서 무작위로 '켜고' '끄는' 다양한 유전자가 있다.

[0128] 흥미롭게도, 배양 7 일 후에 Runx2, ALP, BMP-2, OPN 및 COL1의 mRNA 발현 증가가 관찰되었다(그림 9a-g). 유전자 마커는 hBMSC를 포함하는 대조군에서도 발현되었지만 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드가 있을 때 그 발현이 더 높았다. OCN, BMP-2, OPN, BSP 및 Col-1의 발현은 14 일 배양 후 유의하게 더 높았다(* p <0.05). Runx2, ALP, BMP-2, OCN, OPN, BSP 및 COL1의 상대적 발현이 계산되었으며 대조군보다 각각 1.0, 1.5, 1.3, 0.5, 0.6, 1.0 및 0.5 배 더 높았다. Runx2 및 ALP는 주로 조골 세포 및 조골 세포에서 발현되는 초기 전사 인자로 일관되게 알려져 있다. 이러한 결과는 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드를 포함하는 배지에서 골아 세포 특이 유전자가 높게 발현되었음을 나타낸다. 따라서 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드는 뼈 조직 재생을 위한 생체 재료로 사용될 수 있다. 3D 스캐폴드의 존재 하에서 골 형성 분화의 가상 그림은 그림 9 (h)에 나와 있다.

[0129] 생체 내 뼈 재생 연구:

[0130] 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드의 생체 내 골 재생 효율은 이식 3 주 후 두개골 임계 결함 모델에서 평가되었으며 그 결과는 그림 10a에 나와 있다. 설치류 모델은 두개골 안면 재생과 두개 세포의 신경 문장 기원 사이의 밀접한 관계로 인해 선택되었다. 따라서 두개 안면 부위, 특히 두개골의 치명적 결함은 생체 내 뼈 재생 연구에 적합하다. 여기에서, 우리는 세포 생존력 및 qPCR 결과에서 입증된 바와 같이 향상된 골 형성 효능으로 인해 뼈 재생 연구를 위해 1 % CNC/Alg/Gel 스캐폴드를 사용했다. 또한 BMP-2는 뼈 조직을 재생하는 잠재력 때문에 1 % Alg/Gel 스캐폴드와 함께 사용되었다. 1 % CNC/Alg/Gel + BMP-2 스캐폴드 처리 그룹에서 양성 및 음성 대조군에 비해 결함 부위가 현저하게 감소했다는 점이 흥미로웠다. 1 % CNC/Alg/Gel + BMP-2 스캐폴드 처리 그룹은 그림 10b에 표시된 바와 같이 양성 및 음성 대조군에 비해 더 많은 양의 골 형성을 나타 냈다. 또한 이식 부위에 염증의 흔적이 없었기 때문에 스캐폴드의 생체 적합성을 더욱 알 수 있다. 3D 프린팅된 스캐 폴드의 독특한 구조는 세포-스캐폴드 상호 작용에 의해 새로 형성된 조직의 재생을위한 더 많은 결함 부위를 허용했다. 따라서,

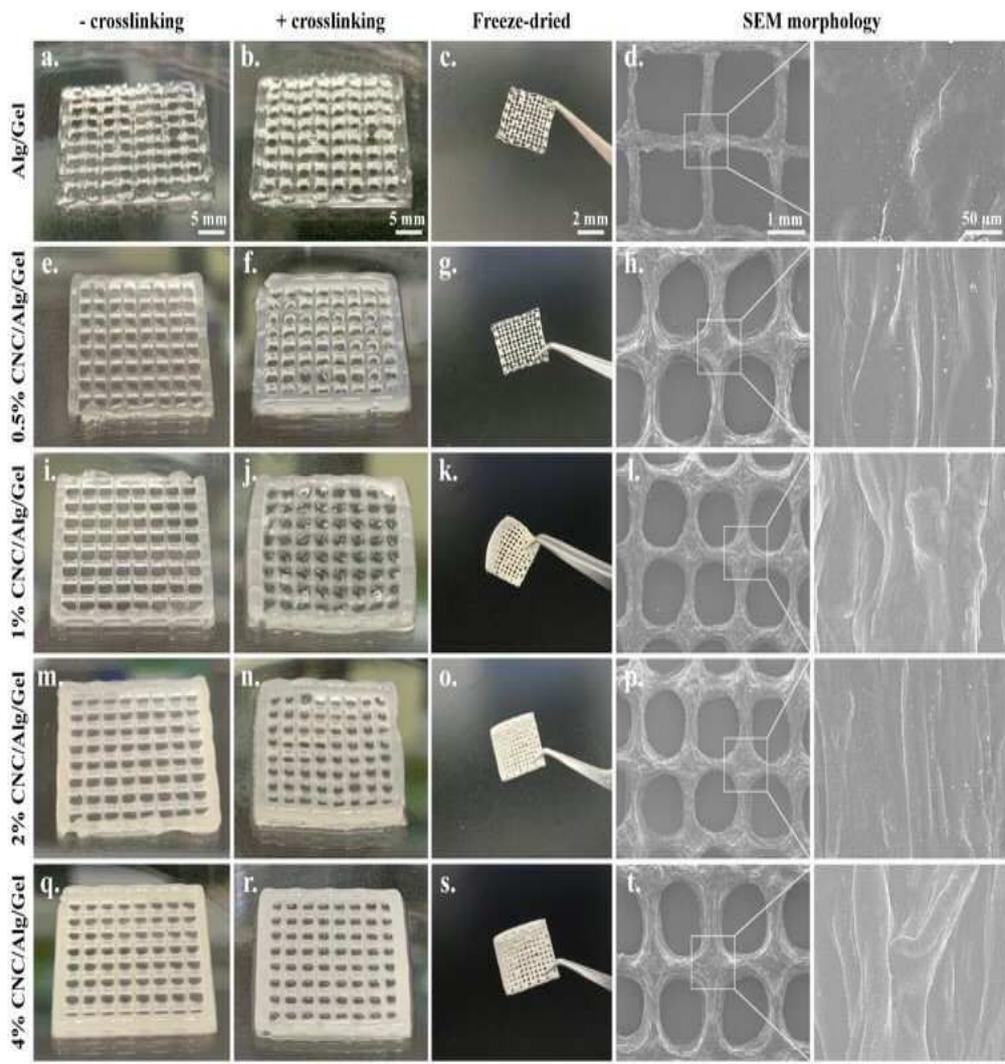
BMP-2 전사 인자의 상향 조절 및 다양한 성장 인자와의 상호 작용은 생체 내 시스템 내에서 세포-스캐폴드 상호 작용 동안 뼈 재생을 촉진할 수 있다고 가정한다.

[0131]

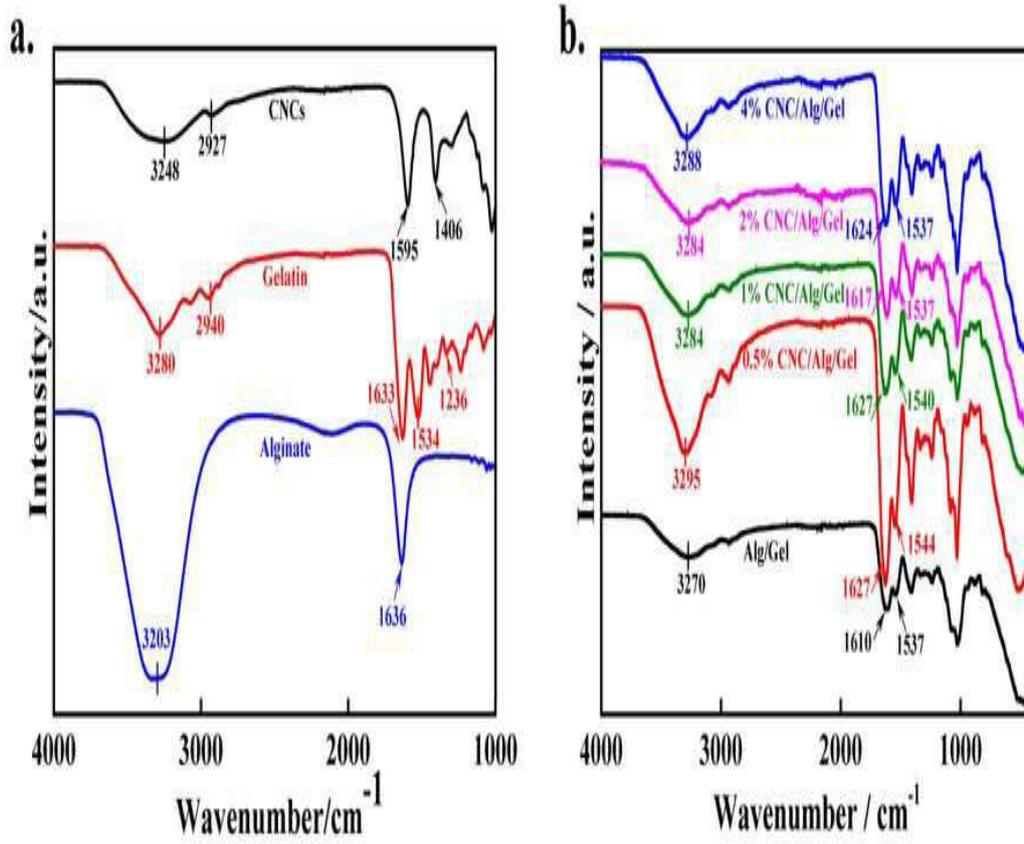
조직학적 발달을 평가하기 위해 헤마톡실린과 에오신(H & E) 염색을 수행했으며 그 결과는 그림 11에 나와 있다. 음성 대조군에서는 결함 부위가 새로운 뼈로 덮이지 않았다(그림 11a). 유사하게 양성 대조군에서는 이식 3 주 후 결함 부위에서 몇 개의 새로운 뼈만 발견될 수 있었다(그림 11b). 게다가, 1 % CNC/Alg/Gel + BMP-2 스캐폴드 처리 그룹은 놀라운 새로운 뼈 형성을 나타냈다. 스캐폴드를 처리 한 그룹에서는 염증 세포 나 조직이 관찰되지 않았으며 이는 스캐폴드의 우수한 생체 적합성을 나타낸다. 흥미롭게도 양성 대조군과 스캐폴드 처리 군 모두에서 연골 세포가 새로운 뼈와 연관되어 있어 연골 내 골화가 새로운 뼈 형성에 관여했음을 시사한다(그림 11c). 그러나 CNC는 스캐폴드가 기계적 강도를 유지하는 데 사용되었기 때문에 Alg / Gel 스캐폴드에 CNC가 있으면 혈관 신생과 새로운 뼈 형성 동안 세포 성장과 발달이 향상되었다. 종합해 보면, 본 발명의 결과는 3D 인쇄된 스캐폴드가 뼈 형성을 가속화할 수 있는 잠재력이 있으며 뼈 조직 공학을 위한 이상적인 생체 재료로 사용될 수 있음을 나타낸다.

도면

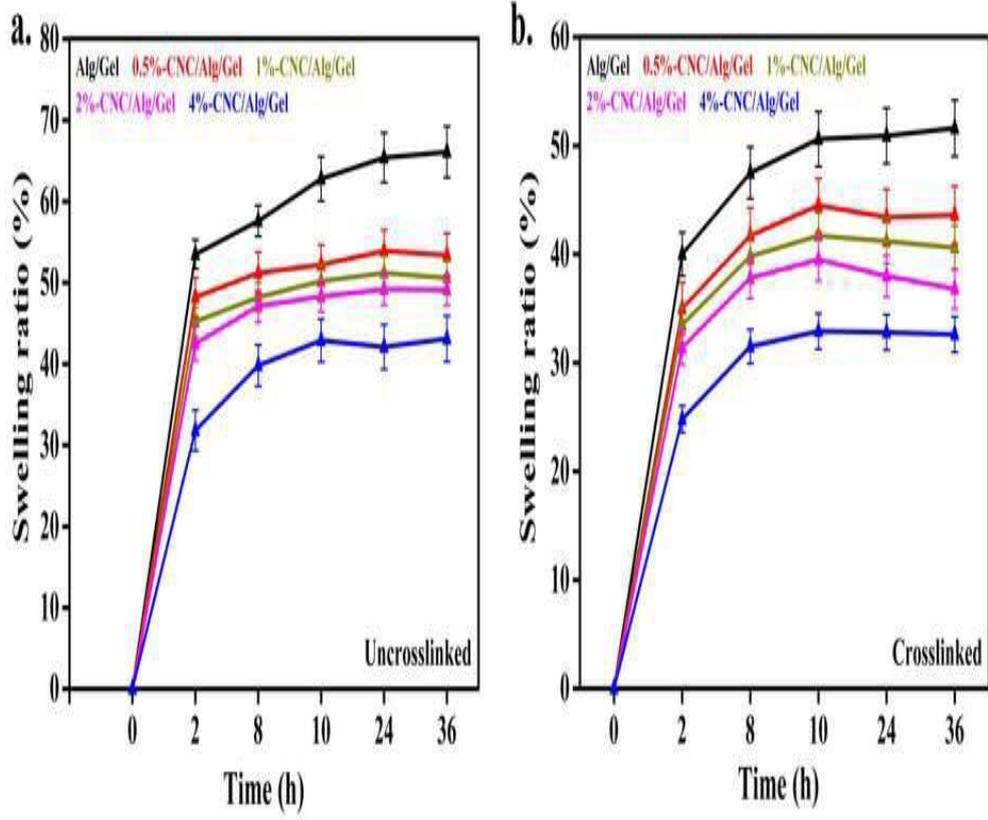
도면1



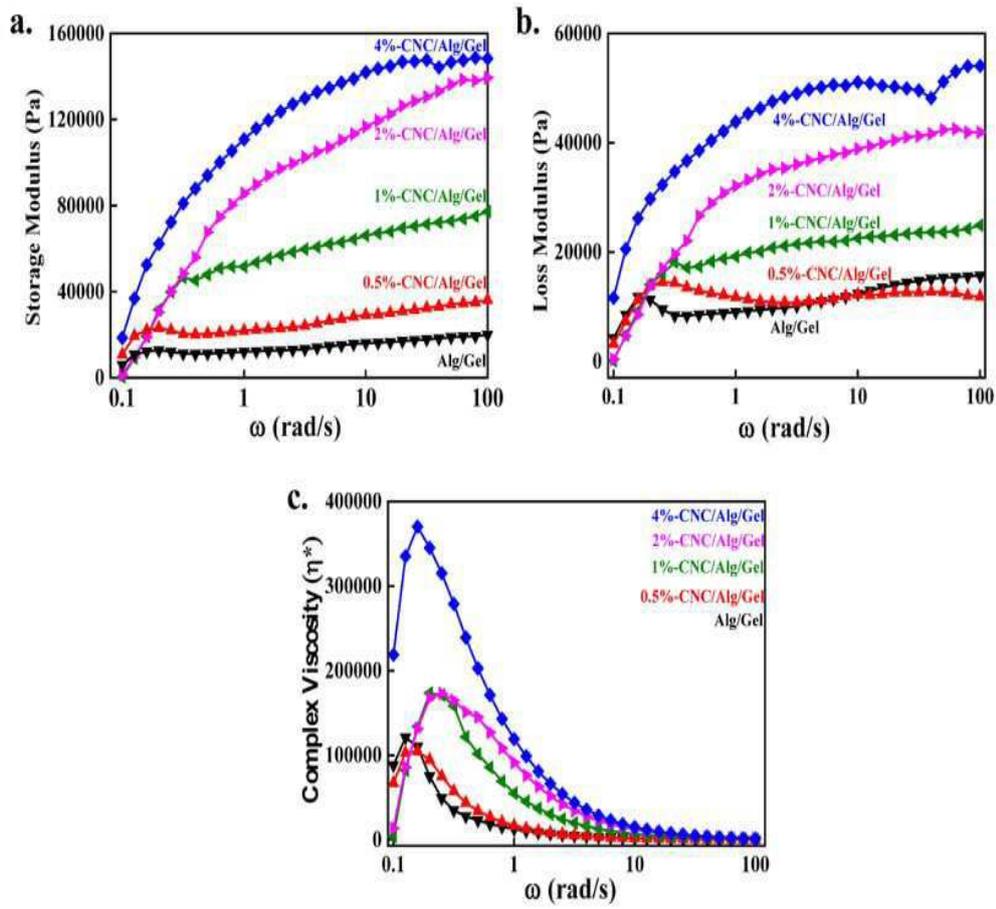
도면2



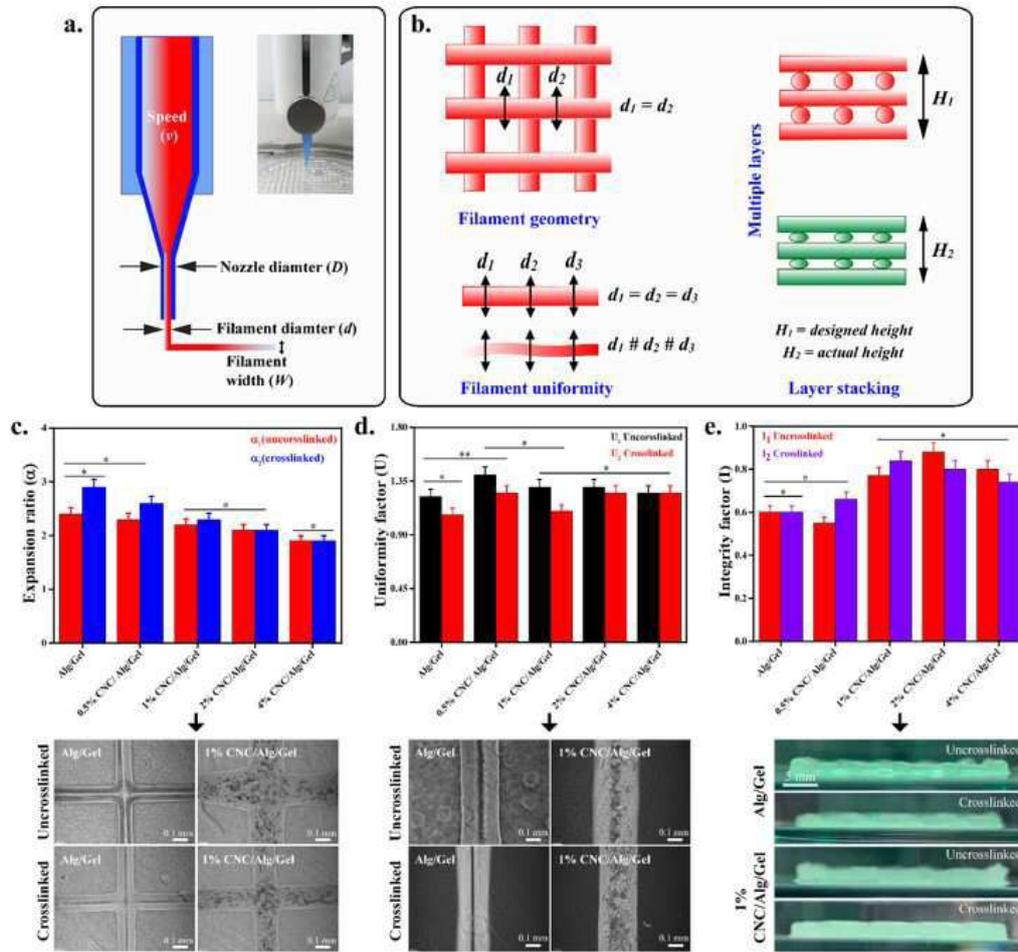
도면3



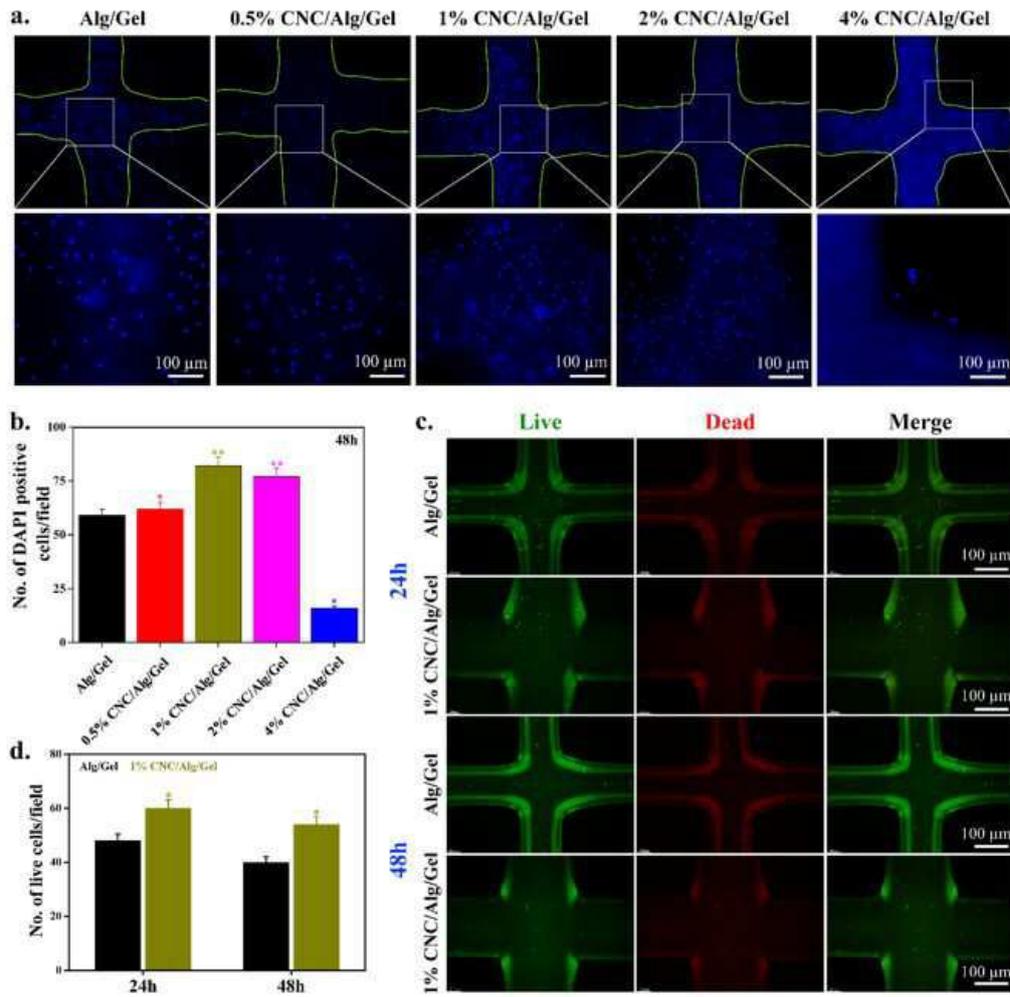
도면4



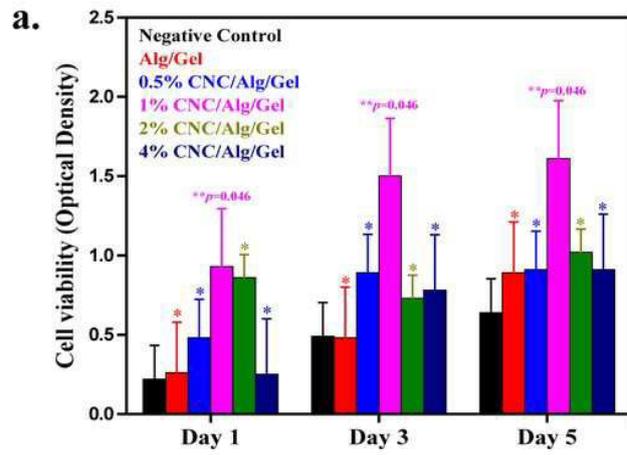
도면5



도면6



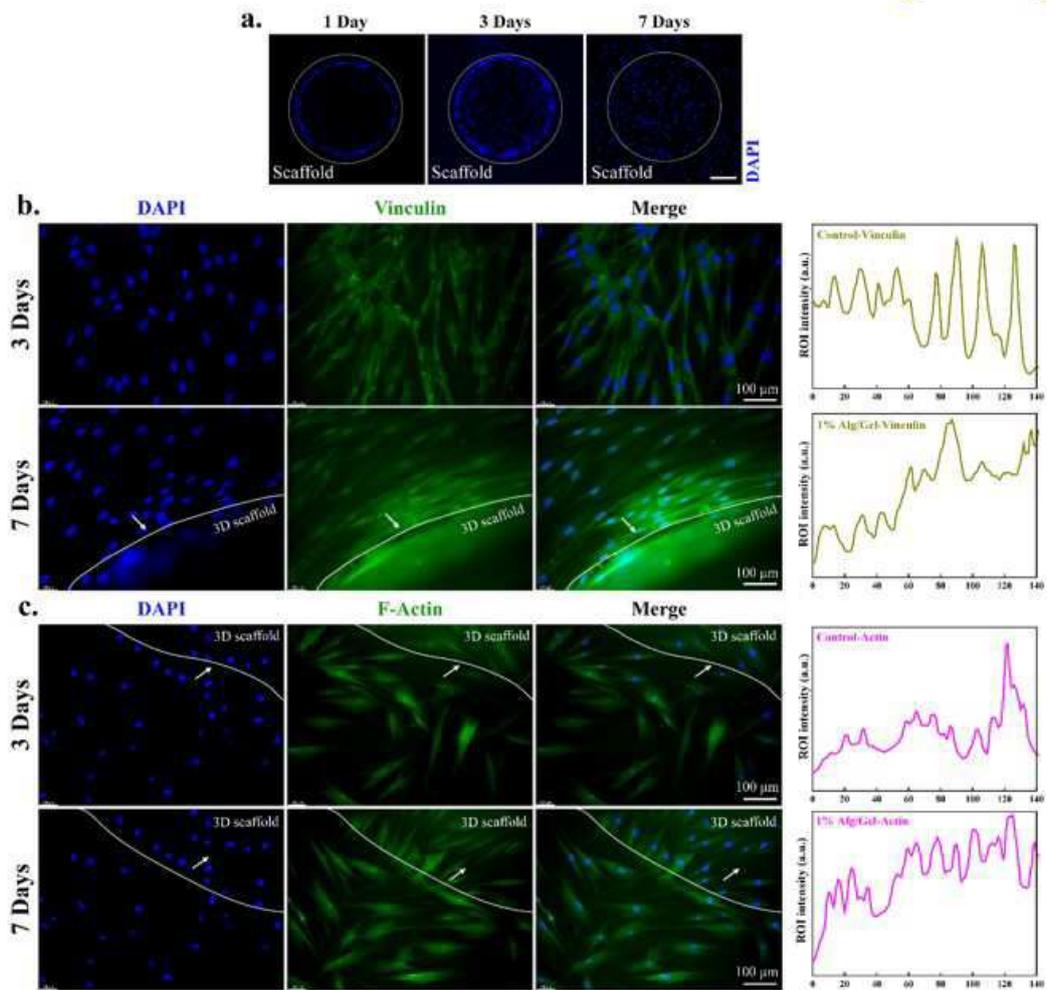
도면7



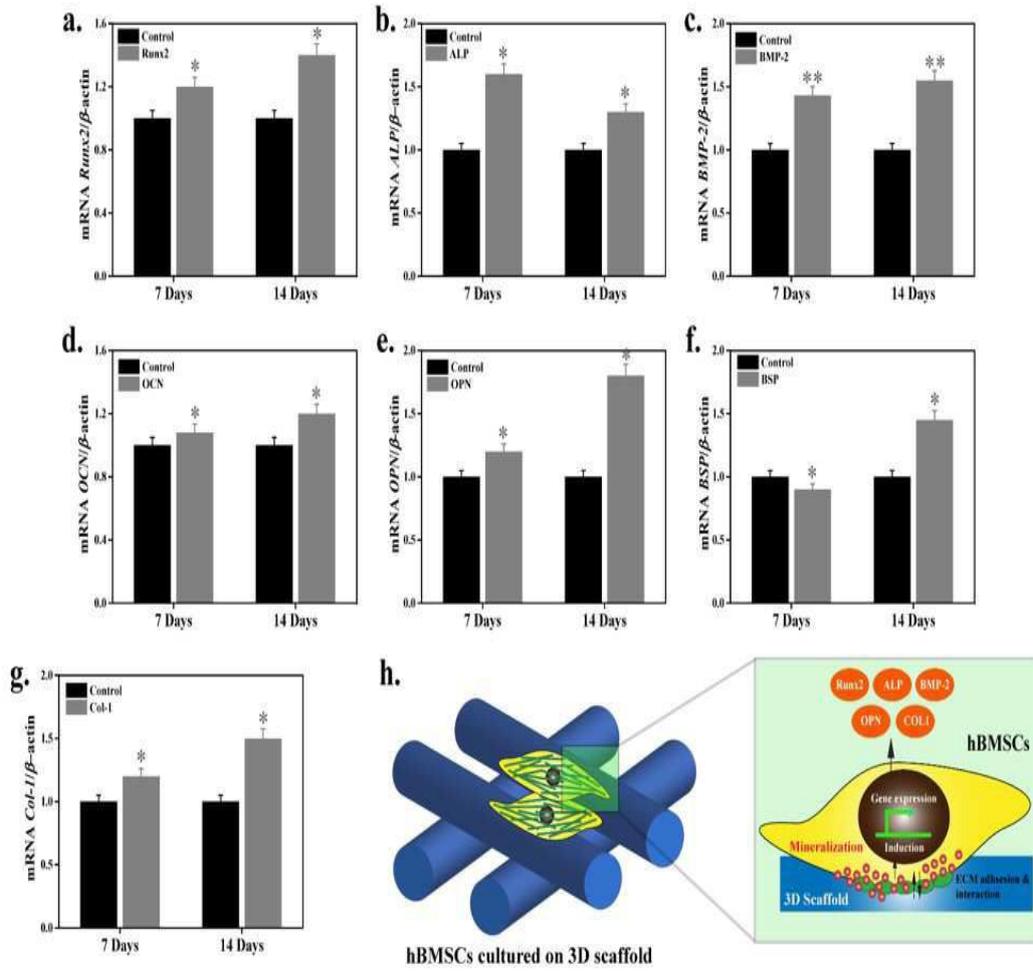
b. Alg/Gel 0.5% CNC/Alg/Gel 2% CNC/Alg/Gel



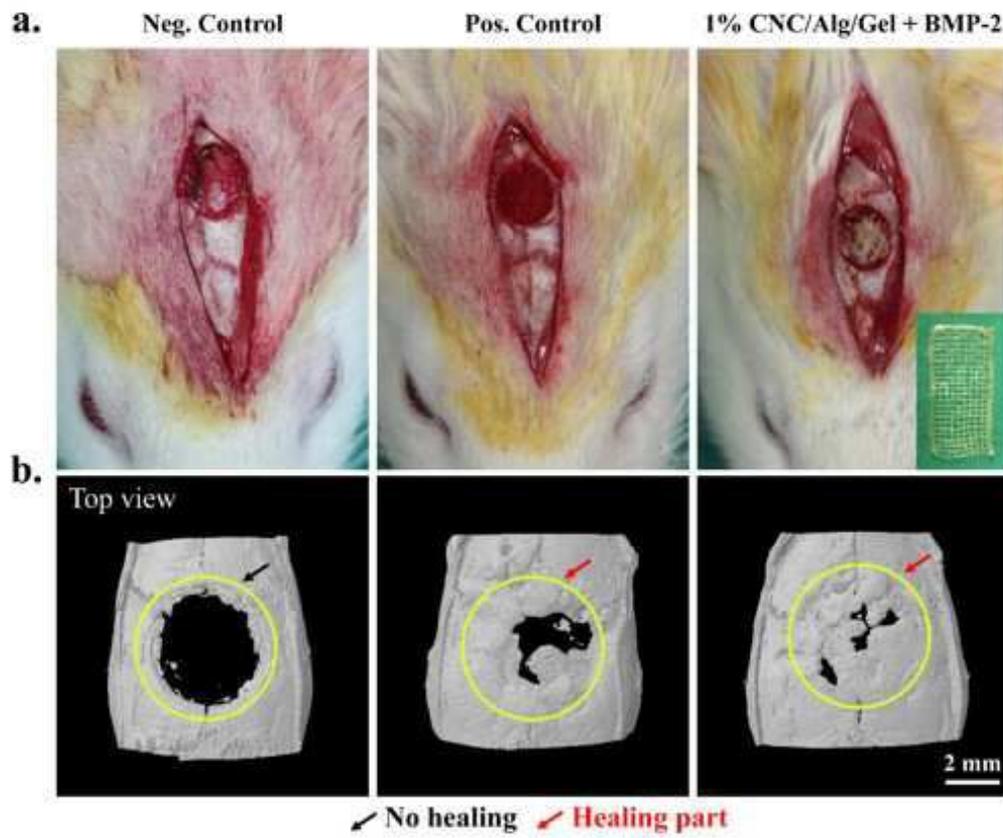
도면8



도면9



도면10



도면11

