



(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년09월04일
(11) 등록번호 10-3015236
(24) 등록일자 2026년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0099900

(22) 출원일자 2023년07월31일

심사청구일자 2023년07월31일

(65) 공개번호 10-2025-0019214

(43) 공개일자 2025년02월10일

(56) 선행기술조사문헌

Chen Feng et al., "Three-Dimensional Bioprinting and Electrospinning of Cellulose Nanocrystal/Polycaprolactone for Tracheal Scaffolds." BioResources (2*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 이수희

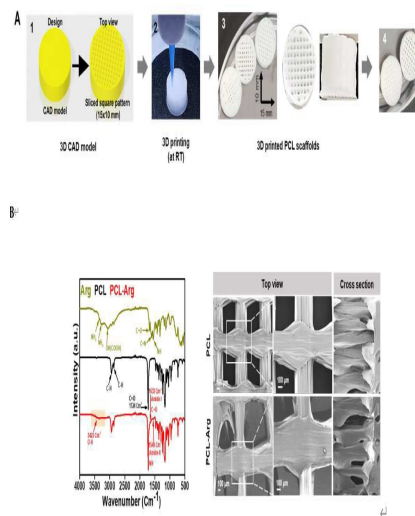
(54) 발명의 명칭 면역 조절 및 뼈 재생을 위한 폴리카프로락톤, 폴리비닐 알코올 및 셀룰로오스 나노결정의 이방성 스캐폴드 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 3차원 인쇄로 폴리카프로락톤(PCL) 스캐폴드를 제조하고,

셀룰로오스 나노결정(cellulose nanocrystal)에 폴리비닐 알코올을 첨가한 후 전기방사(electrospinning)를 통하여 셀룰로오스 나노결정과 폴리비닐 알코올 나노섬유를 제조하고, 상기 나노섬유를 상기 3차원 인쇄된 PCL 스캐폴드의 측면 벽에 롤링하는 것을 포함하는 나노섬유 적층 PCL 스캐폴드를 제조하는 방법 및 그 제조방법에 의하여 제조된 스캐폴드의 면역조절 및 골재생 등과 관련된 응용에 관한 것이다. 본 발명의 스캐폴드는 특히 수술 후 면역 저하 등의 조건에서 면역 조절 뼈 이식편 역할을 할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/34 (2013.01)
A61L 27/3804 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 2400/12 (2013.01)
A61L 2420/08 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Mohammad Saied Enayati et al., "Development of electrospun poly (vinyl alcohol)-based bionanocomposite scaffolds for bone tissue engineering." JOURNAL*
Yuliya Nashchekina et al., "Different Conditions for the Modification of Polycaprolactone Films with L-Arginine." Int. J. Mol. Sci. (2020), Vol. 21, 6*
W02021077042 A1
US20170360562 A1

KR1020230054548 A

KR1020170070008 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345280875
과제번호	2018R1A6A1A03025582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명	강원지역 산림바이오매스 유래 '나노셀룰로오스 융복합응용연구 허브' 구축
기 여 율	10/100
과제수행기관명	강원대학교 산림과학연구소
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354507
과제번호	2022R1I1A3063302
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	미세전류 자극을 이용한 조직공학용 3D 프린팅 전도성하이드로겔 패치 개발
기 여 율	80/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.05.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306818
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널자동화 바이오리액터 기술개발
기 여 율	10/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

3차원 인쇄로 폴리카프로락톤(PCL) 스캐폴드를 제조하고, 셀룰로오스 나노결정(cellulose nanocrystal)에 폴리비닐 알코올을 첨가한 후 전기방사(electrospinning)를 통하여 셀룰로오스 나노결정과 폴리비닐 알코올 나노섬유를 제조하고,

상기 나노섬유를 상기 3차원 인쇄된 PCL 스캐폴드의 측면 벽에 롤링하는 것을 포함하는 나노섬유 적층 PCL 스캐폴드를 제조하는 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드를 유효 성분으로 포함하는 조성물에 있어서,

상기 조성물은 유체 전단 응력(fluid shear stress, FFS) 처리 과정을 병용하는 것을 특징으로 하는 바이러스 및 그램 양성균 및 그램 음성균에 대한 항생용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 Tlr4 및 IL 15 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 바이러스 및 그램 양성균 및 그램 음성균에 대한 항생용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 조절 및 뼈 재생을 위한 폴리카프로락톤, 폴리비닐 알코올 및 셀룰로오스 나노결정의 이방성 스캐폴드 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수술 후 면역 억제, 특히 세포 매개 면역의 상실은 수술 스트레스 및 조직 손상의 정도에 따라 카테콜아민, 프로스타글란딘 및 코르티솔과 같은 면역 억제 호르몬의 방출 증가로 인해 자주 관찰된다.

[0003] 수혈, 저체온, 탈수, 마취 등은 면역력을 더욱 저하시킬 수 있다. 수술 후 약해진 면역 체계는 상처 치유 지연 및 감염을 포함하여 더 나쁜 예후와 관련이 있다. 뼈 손상 동안, 선천적 면역 체계의 초기 반응은 M1 대식세포의 모집을 활성화하는 것으로 알려져 있다. 상처 부위에 주로 존재하는 M1 대식세포는 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터페론- γ (IFN- γ), 인터루킨- 1β (IL- 1β)와 같은 전염증성 사이토카인을 방출한다. 전염증성 사이토카인은 손상된 조직의 제거를 촉진하고 줄기 세포를 모집한다. 그러나 M1 대식세포가 M2 표현형으로 적시에 전환되는 것은 효과적인 재생을 위해 매우 중요하다. 따라서 면역 조절의 역할은 뼈 조직 재생을 크게 지시할 수 있는 중요한 측면이다.

[0004] 알부민, 피브로넥틴 및 비트로넥틴을 포함한 다양한 혈장 단백질은 이식 직후 임플란트 표면에 침착된다. 이러한 동화 단백질은 이식 부위에서 면역 세포 모집, 접착 및 활동에 상당한 영향을 미친다. 혈액 응고에서 방출되어 임플란트에 침착된 혈소판 유래 TGF- β , CXCL2 및 CXCL8은 순환계에서 호중구를 유인할 수 있으며, 호중구에 의해 발현된 인테그린은 단백질 코팅으로 코팅된 임플란트 표면에 결합하는 데 도움을 준다. 이러한 유형의 결합은 호중구 활성화를 자극하고 염증 반응을 유발하여 면역 세포 모집을 자극한다. 장기간의 호중구 활성화는 만성 염증을 유발하고 조직 치유를 지연시킨다.

[0005] 한편, 호중구는 또한 성장 인자 분비를 통해 조직 재생에 기여할 수 있으므로 이전에 논의한 바와 같이 중간엽 줄기 세포(MSC)의 개조 및 염증 해결을 돕는다. 호중구와 유사하게 TGF- β , CXCL4 및 류코트리엔과 같은 혈소판 및 혈전으로부터의 화학유인 물질의 방출은 단핵구/대식세포를 이식 부위로 유도할 수 있다.

[0006] 인테그린의 도움으로 임플란트에 흡수된 단백질은 대식세포 부착을 촉진한다. 이식 부위에 대식세포가 축적되면 추가 대식세포를 모집하는 화학유인 물질이 분비되고 활성화된 대식세포는 생체 물질을 식균하는 경향이 있다. 초기 단계의 염증성 대식세포는 활성 산소종, 분해 효소, 산과 같은 조직 치유에 해로운 다양한 유해 물질을 생성한다. 염증의 후기 단계에서 대식세포는 항염증성 사이토카인을 발현하여 조직 복구를 촉진하는 M2 유형 표현형으로 분극화된다. 수지상 세포는 임플란트에 흡착된 단백질 층의 리간드 모이어티에 의해 활성화될 때 톨 유사 수용체를 통해 생체 물질을 감지할 수 있다. 수지상 세포는 인테그린을 통해 피브로넥틴에 부착할 수 있다. 알부민은 수지상 세포를 자극하여 항염증성 사이토카인 IL-10을 생성함으로써 염증의 해소와 조직 복구를 촉진할 수 있다.

[0007] 대조적으로, 비트로넥틴은 수지상 세포가 IL-12p40을 발현하게 했으며, 이는 조직 재생을 방해할 수 있는 CD4+ T 세포 증식과 관련이 있다. 전반적으로 임플란트에 흡착된 단백질은 임플란트와 면역 세포 간의 상호 작용을 매개하는 데 중요한 역할을 한다. 결과적으로 생체 재료의 표면 특성을 변경하면 단백질 침착이 변경되고 면역 세포 반응이 조절될 수 있다.

[0008] 뼈 조직 공학(BTE)에서 개발된 면역 조절 마이크로/나노 플랫폼은 주로 줄기 세포 또는 생체 재료 기반 면역 조절을 이용하는 데 중점을 두었다. 중간엽 줄기 세포(MSCs)는 면역 조절 기능을 가지고 있으며 염증 신호에 반응하여 사이토카인을 분비할 수 있다.

[0009] 따라서 MSC는 이식편 대 숙주 질환 및 면역 장애를 비롯한 수많은 뼈 장애를 치료하는 데 사용되었다.

[0010] Liu 등은 생분해성 폴리(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydrovaleric acid)(PHBV), polydopamine-modified hydroxyapatite(PHA) 및 barium titanate(PBT)를 사용하여 면역 조절 유도 골 형성을 위한 생체 모방 골막을 개발하여 다기능 압전 소자를 제작했다. 스핀 코팅 방법에 의한 골막. 개발된 생체모방 골막은 대식세포의 M2 분극화와 중간엽 줄기세포(MSCs)의 골형성 분화를 지시하는 개선된 표면 친수성, 기계적 특성, 분해 거동 및 전기적 자극을 보였다. 개발된 압전 골막은 추가 사이토카인, 성장 인자 또는 세포를 로드할 필요 없이 효과적인 미래 임플란트가 될 수 있다[Liu H, Shi Y, Zhu Y, Wu P, Deng Z, Dong Q, et al. Bioinspired Piezoelectric

Periosteum to Augment Bone Regeneration via Synergistic Immunomodulation and Osteogenesis. ACS Applied Materials & Interfaces. 2023;15:12273-93].

[0011] [선행 특허 문헌]

[0012] 대한민국특허 공개번호 10-2023-0004525

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 면역 조절 및 뼈 재생을 위한 신규한 스캐폴드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 3차원 인쇄로 폴리카프로락톤(PCL) 스캐폴드를 제조하고,
- [0015] 셀룰로오스 나노결정(cellulose nanocrystal)에 폴리비닐 알코올을 첨가한 후 전기방사(electrospinning)를 통하여 셀룰로오스 나노결정과 폴리비닐 알코올 나노섬유를 제조하고,
- [0016] 상기 나노섬유를 상기 3차원 인쇄된 PCL 스캐폴드의 측면 벽에 롤링하는 것을 포함하는 나노섬유 적층 PCL 스캐폴드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 PCL 스캐폴드는 아르기닌으로 코팅된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 셀룰로오스 나노결정은 양이온성 나노결정인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 나노섬유를 상기 3차원 인쇄된 PCL 스캐폴드의 측면 벽에 롤링한 후 챔버에 두는 단계를 추가하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드에 M1 대식 세포와 M2 대식 세포를 처리하여 M1 대식 세포 및 M2 대식의 동적 분극화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드를 유효 성분으로 포함하는 M1 대식 세포 및 M2 대식의 동적 분극화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드를 유효 성분으로 포함하는 면역 조절 골접합용 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드를 유효 성분으로 포함하는 바이러스 및 그램 양성균 및 그램 음성균에 대한 항생용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 유체 전단 응력(fluid shear stress, FFS) 처리 과정을 병용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 Tlr4 및 IL 15 유전자의 발현을 증가시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 또한 본 발명은 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드에 인비트로에서 배양하는 과정에 유체 전단 응력(fluid shear stress, FFS)을 가하여 이러한 FFS를 가하지 않은 것과 비교하여 CCL3 (cytokine ligand 3) 및 TNFR2 (Tumor necrosis factor receptor type II) 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 복합 스캐폴드에 인비트로에서 줄기세포를 배양하는 과정에 유체 전단 응력(fluid shear stress, FFS)을 가하여 이러한 FFS를 가하지 않은 것과 비교하여 골형성 마커 중에서 ALP 및 OCN의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0029] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0030] 본 발명에서는 면역 조절 및 뼈 재생을 위한 폴리카프로락톤(PCL), 폴리비닐 알코올(PVA) 및 셀룰로오스 나노결

정(CNC)의 이방성 스캐폴드를 개발했다. 면역 조절 테스트는 본 발명의 제작된 스캐폴드의 역학이 대식세포의 분극화 및 뼈 재생에 영향을 미칠 수 있음을 밝혔다. 본 발명의 결과는 제작된 스캐폴드가 PVA 및 PVA@cCNC의 위상 및 물리 화학적 특성을 통해 시간에 따라 M1 및 M2 대식세포 분극화를 유도할 수 있고 수술로 인한 산화 스트레스를 감소시킬 수 있으며 면역 조절-유도 된 뼈 재생을 촉진할 수 있음을 시사한다.

[0031] 본 발명자들은 또한 RNA 시퀀싱 분석을 통해 대식세포 분극화에서 기계적으로 활성화된 이온 채널의 기능을 조사하고 유체 전단 응력(fluid shear stress, FFS) 물리적 자극이 대식세포 활성화의 전사체 변화에 미치는 영향을 규명했다. FFS의 영향 하에서 RNA-seq 데이터는 PCL_PVA@cCNC 스캐폴드에서 배양된 세포에서 양이온 채널의 차별적인 발현을 보여주었다. 특히 동적 대식세포 분극화 과정에서 K⁺ 이온 채널의 주요 참여를 확인했다.

[0032] 본 발명자들은 또한 박테리아 침입 방지에 관여하는 두 가지 중요한 유전자(Tlr 4 및 Il 15)의 과발현을 관찰했다. 복합 PCL_PVA@cCNC 스캐폴드에 FFS 자극을 적용하는 것은 주로 K⁺ 이온 채널 활동의 차별적 표현을 통해 동적 대식세포 분극화를 통해 조직 재생에 적합하다.

[0033] M1 및 M2 편광의 변조는 cCNC의 존재로 인한 PVA와 PVA@cCNC 나노섬유 사이의 화학적 구성 변화뿐만 아니라 나노 토폴로지 단서에 의해 상승적으로 제어되었다. 코팅된 아르기닌은 M2 표현형을 향한 대식세포 분극화를 유도하는 반면 cCNC는 M1 분극화를 촉진한다.

[0034] 본 발명의 결과를 바탕으로, 본 발명자들은 제조된 합성물이 임상 적용을 위한 잠재적인 면역 조절 뼈 이식편으로 사용될 수 있을 것으로 기대한다. RNA-seq 데이터는 유체 스트레스를 유발하는 물리적 자극에 반응하여 PCL_PVA@cCNC 스캐폴드에서 배양된 세포에서 양이온 채널의 차등적 발현을 나타냈다.

[0035] 구체적으로, 본 발명자들은 제작된 구조물에 존재하는 양이온성 CNC의 결과인 동적 대식세포 분극화 과정에서 K⁺ 이온 채널 관여의 우세를 관찰했다. 또한, 우리는 PCL_PVA@cCNC 배양 세포에서 세균 침입을 방지하는 것과 관련된 두 가지 핵심 유전자(Tlr 4 및 Il 15)의 자극 유발 상향 조절을 관찰했다.

[0036] 또한, M2 마커의 발현은 자극 유무와 상관없이 PCL에서 배양된 세포에서 증가하였다. 제작된 스캐폴드는 3D 인쇄된 PCL 스캐폴드의 외벽을 덮는 전기방사 매트와 복합 구조물이기 때문에 독특한 제작을 통해 Raw 264.7 세포가 24시간 동안 동적 대식세포 분극을 겪을 수 있다. 따라서 복합 PCL_PVA@cCNC 스캐폴드의 FFS 자극은 주로 K⁺ 이온 채널 활성화의 차등 발현을 통한 동적 대식세포 분극화를 통한 조직 재생에 적합하다.

[0038] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0039] 복합 스캐폴드 제작 및 특성화

[0040] 도 2A는 PCL 스캐폴드의 3D 인쇄에서 순차적인 단계를 보여준다. 15X10mm의 CAD 모델을 사용하여 다공성이 크게 제어된 상호 연결된 채널 네트워크가 있는 PCL 스캐폴드를 인쇄했다. 총 40개의 레이어가 인쇄되었다. 인쇄된 스캐폴드의 내부는 교차 가닥의 망상 구조를 형성하여 각각 10mm의 ≥ 50 정사각형 채널을 형성한다. 각 가닥의 두께는 0.5mm로 측정되었다. 그러나 PCL이 뼈 재생에 적합함에도 불구하고 세포 매트릭스 부착을 종종 제한하는 매우 소수성인 것으로 보고되었다.

[0041] 따라서, 제작된 PCL 스캐폴드는 L-아르기닌으로 코팅되었다. 로드된 아르기닌은 FT-IR 분광법을 사용하여 확인되었다. L-아르기닌의 FT-IR 스펙트럼은 NH, C=N, C=O 진동에 해당하는 1559.46cm^{-1} , 1610.79cm^{-1} , 1670.94cm^{-1} 에서 뚜렷한 피크를 갖는 것으로 관찰되었다. C=O 스트레칭 진동에 해당하는 PCL 스캐폴드에 대해 1724cm^{-1} 에서 뚜렷한 피크가 관찰되었다. 다른 특성은 2863.54 (대칭 CH₂ 스트레칭), 2946.95cm^{-1} (비대칭 CH₂ 스트레칭) 및 1293cm^{-1} (C-O 및 C-C 스트레칭)에서 피크이다. 아르기닌 코팅된 PCL의 FT-IR 스펙트럼은 1633cm^{-1} (아미드 II) 및 1549cm^{-1} (아미드 II)에서 피크의 출현을 보여주었으며, 이는 아르기닌이 PCL 스캐폴드에 성공적으로 로딩되었음을 나타낸다. PCL의 카르보닐기에 대한 아르기닌의 친핵성 공격으로 인해 생성된 2개의 아미드 밴드는 아르기닌-PCL 표면 상호작용의 증거로 해석될 수 있다. $1510\sim 1580\text{cm}^{-1}$ 범위의 첫 번째 밴드는 NH 굽힘 진동과 관련이 있으며 아미드 II에 해당한다. $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$ 사이의 두 번째 밴드는 아미드 I에 해당하며 C=O(카르보닐) 신축 진동 및 C-N 그룹 진동과 관련이 있다고 가정한다(도 2B, 왼쪽 패널). 또한, PCL 스캐폴드의 FE-SEM 이미지는 에칭된 표면을 나타내어 PCL 스캐폴드에서 표면 주름의 확산을 초래했다(도 2B, 오른쪽 패널).

[0042] 다음으로 전기방사된 PVA 및 PVA@cCNC 나노섬유의 물리화학적 특성을 분석하였다. 도 3A는 제조된 PVA 및 PVA@cCNC의 전기 방사 매트와 디지털 사진 이미지를 보여주며 cCNC 통합 시 PVA 매트와 외관에 눈에 띄는 차이

가 없음을 보여준다. 그러나 FE-SEM 이미지를 통해 자세히 관찰하면 PVA 대응물보다 PVA@cCNC 매트에서 더 조밀한 섬유 증착이 나타난다(도 3C 및 3D).

[0043] 또한, PVA 전기 방사 매트의 인장 강도는 PVA@cCNC 매트(탄성 계수, $E = 0.00125$ Pa) 매트보다 더 높은 탄성 계수인 것으로 관찰되었다. 변형된 섬유의 FE-SEM 분석을 통한 면밀한 관찰은 도 3C 및 D에서 알 수 있는 바와 같이, 각각 PVA 및 PVA@cCNC에서 매트의 무작위 및 평행 섬유 배향으로 인해 탄성 계수의 차이가 발생했을 수 있음을 나타낸다.

[0044] 다음으로 나노섬유 매트를 PCL 스캐폴드 위에 겹쳐 합성 구조를 제작한 다음 가슴 챔버에서 구조물을 배양했다(도 4A, B). 공기 중의 습도는 PVA 매트의 용해를 유도하여 PVA@cCNC 나노섬유(나노 섬)와 중첩된 PCL 스캐폴드에서 관찰되는 뚜렷한 마이크로/나노 토폴로지를 생성한다. 나노섬(nano-island)의 형성은 도 4(C, D)에 표시된 것처럼 cCNC를 남기면서 PVA의 부분적 용해에 의해 촉발되었다. 나노복합체의 친수성은 접촉각 측정을 통해 확인하였다. 본 발명자들은 $PCL < PA < PAP < PAPC$ 순서로 나노복합체의 친수성이 뚜렷한 증가를 관찰했다(도 4E).

[0045] 본 발명에서, PA: Polycaprolactone-Arginine, PAP: Polycaprolactone-Arginine-Polyvinyl alcohol 및 PAPC: Polycaprolactone-Arginine-Polyvinyl alcohol- cationic cellulose nanocrystals를 의미함.

[0047] 관류 바이오리액터 설계

[0048] 제작된 구조물은 맞춤형 설계된 생물 반응기를 사용하여 면역 조절 가능성에 대해 테스트되었다. 생물반응기 시스템은 도 5(a-f)와 같이 저장소에서 들어오는 배지를 받는 중앙 웰에 연결된 6개의 주변 원통형 챔버가 있는 원형 금속 본체로 구성된다.

[0049] 각 주변 챔버는 우물의 위에서 아래로 시간순으로 설계된 10, 20 및 35mm 직경의 치수로 설계되어 웰 당 3개의 스캐폴드 지지대를 만든다. 각 스캐폴드는 3개의 독립적인 스캐폴드를 동시에 지지할 수 있는 10mm의 높이를 지원한다. 배양 배지는 붕규산 유리로 만들어진 저장병에 보관된다. 이 저장소는 튜브 시스템을 통해 챔버 및 유량 조절 펌프와 결합된다. 생물반응기 챔버와 배양 배지 저장소는 인큐베이터 내부에 배치된다(37°C , 5% CO_2 , 고습도).

[0050] 실험 중에 생물 반응기 챔버의 스캐폴드는 0.5mL/분의 유속으로 배양 배지와 함께 위에서 아래로 연속적으로 스트리밍됩니다. 도 5(h-k)에 나타난 바와 같이 단일 또는 공동 배양 조건 하에서 Raw 264.7 및 hBMSC에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 또한 도 5(l-p)에서 볼 수 있듯이 양이온성 CNC로 스캐폴드에 시드된 대식세포의 M1 표현형을 관찰하여 CNC의 면역 조절 효율의 효과를 나타낸다.

[0051] 광물화 능력 및 골 형성 능력

[0052] 본 발명자들은 정적 및 동적 조건에서 제작된 스캐폴드에서 배양된 hBMSCs의 광물화 가능성을 확인했다. PVA 나노섬유로 코팅된 스캐폴드에서 더 높은 광물 침착이 관찰되었다(도 6).

[0053] 또한, 골 형성 마커 유전자 분석 결과 FFS 시 PAPC 그룹의 발현 증가, 특히 ALP 및 OCN 발현이 증가한 것으로 나타났다. 도 7(a, c)에 표시된 것처럼 FSS에서 스캐폴드에서 Arg가 손실된 결과일 수 있는 FSS에서 PA 그룹의 Runx2 유전자 발현 감소를 관찰했다.

[0054] 또한, 본 발명의 결과는 FSS가 PAP 및 PAPC 그룹에서 Piezo 1의 발현 증가를 유도했음을 보여준다. 그러나 Piezo 1의 표현은 Runx2 표현과 유사하게 PA 그룹에서 감소했다. 모든 그룹의 SPARC 및 SPP1 발현은 FSS에서 감소하는 것으로 관찰되었으며 이는 Piezo 1이 FSS 유도 기계 변환에서 중요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다. 상대적 유전자 발현은 도 7(b, d)에 나와 있다.

[0055] 본 발명자들은 또한 정적 배양 조건에서 PA 및 PAP 스캐폴드에서 M2 표현형을 향한 대식세포 분극화를 관찰했다. 그러나 유체 전단 응력에서 PAPC 스캐폴드는 정적 배양 조건에서 무시할 수 있는 M2 마커의 발현에서 급격한 증가를 유도하여 대식세포의 분극화 능력이 CNC 함유 나노복합체에 대한 유체 전단 응력을 사용하여 미세 조정될 수 있음을 나타낸다(도 8).

[0056] cCNC와 Arg의 대식세포 분극화 능력은 대식세포 분극화를 조절하는 것으로 밝혀졌다. 표 1, 2, 및 3에서 알 수 있듯이; 제조된 복합 스캐폴드의 느린 분해는 코팅된 Arg에 대한 노출을 지연시키면서 cCNC와의 대식세포 상호작용의 더 긴 기간을 유도할 수 있다.

[0057] FSS에서 본 발명자들은 스캐폴드를 포함하는 cCNC에서 IL-6의 발현이 극적으로 증가하는 것을 관찰했다. 중요한 신호 인자 중 하나인 IL-6는 유체 전단 응력 하에서 증가한다. 따라서 cCNC 스캐폴드에서 IL-6 발현의 극적인

증가는 다른 대응물과 비교하여 IL-6 발현 활성화에서 cCNC의 역할을 나타낸다.

- [0058] 다음으로, 본 발명자들은 FSS와 대조군에서 TGF β 1 발현의 발현을 분석했다. 대조군 및 PAP 스캐폴드에 비해 CNC 함유 그룹 및 PA 스캐폴드에서 발현의 급격한 증가가 관찰되었다. 이것은 스캐폴드에 PVA의 침착이 해당 유전자의 발현을 방해한다는 것을 나타낸다. PA 스캐폴드에서 높은 Arg 함량의 존재는 유전자 발현을 촉진하는 반면, FFS와 함께 cCNC의 존재는 TGF β 1의 발현을 훨씬 더 높게 촉진했다. 유사한 경향이 VEGF, Arg-1 및 CD 163의 발현에서 관찰되었다. 흥미롭게도, iNOS의 발현은 FSS에서 cCNC 함유 그룹에서도 관찰되었다. 전체적인 발현은 스캐폴드를 포함하는 cCNC가 다른 모든 제작된 스캐폴드에 대해 PPS 자극 시 M1 및 M2 대식세포 분극화를 조절할 수 있음을 보여준다.
- [0059] 유체 전단 자극에 관련된 DEG
- [0060] 유체 전단 자극의 적용 시, 본 발명자들은 PCL 스캐폴드에서 정적 조건 하에서 배양된 세포에 관하여 유체 전단 응력 하에서 PCL 스캐폴드에서 639개 유전자의 상향 조절 및 467개 유전자의 하향 조절을 관찰했다.
- [0061] 반면, FSS 시 양이온성 CNC 함유 PCL(PCL_PVA@cCNC) 스캐폴드에서 897개 유전자가 상향조절되고 650개 유전자가 하향조절되는 것으로 관찰되었다.
- [0062] 두 그룹 중에서 도 9(a, b) 및 표 4에 표시된 것처럼 FFS 시 PCL 및 PCL_PVA@cCNC 스캐폴드 모두에서 367개의 유전자가 상향 조절되었고 258개의 유전자가 하향 조절되었다.
- [0063] 본 발명자들은 먼저 대식세포 분화 과정과 관련된 유전자 발현을 연구했다. 본 발명자들은 모든 그룹에서 VEGF의 가장 높은 발현을 관찰했지만 유체 전단 자극을 받은 그룹에서 발현의 급격한 감소가 관찰되었다. 더욱이, PCL 스캐폴드를 포함하는 CNC는 유전자의 유체 전단 유도된 하향 조절을 나타내는 유전자의 최소 발현을 나타내었다. M1 대식세포의 핵심 마커인 NOS2 발현은 정적 배양 조건에서 CNC 함유군에서 가장 높게 관찰되었다. 그러나 동적 배양 조건 하에서 CNC 함유 그룹에서 발현이 감소하였다. Arg1의 발현은 유체 전단 자극에서도 감소했다.
- [0064] 반면 IL6 및 CD163 유전자 발현에서는 발현의 변화가 관찰되지 않았다. RNA-seq 데이터는 대부분의 대식세포 분극화 유전자가 TGF β 1을 제외하고 기계적 자극에 노출된 대식세포에서 하향조절되었음을 나타내며, 이는 기계적 자극이 대식세포 집단의 전반적인 분극화 과정을 지연시킬 수 있음을 나타낸다(도 9c, 표 5).
- [0065] 대식세포 분극화 및 염증에 관여하는 DEG
- [0066] 본 발명자들은 대식세포 분극화 및 염증 과정에 관여하는 8개의 주요 유전자를 관찰했으며 데이터는 도 10(a, b) 및 표 6에 나와 있다.
- [0067] 데이터에서 가장 중요한 관찰은 유체 전단 자극 하에서 PCL 스캐폴드를 포함하는 CNC에서 Tlr4의 발현과 관련이 있는데, 이는 Tlr 4가 바이러스 성분뿐만 아니라 그람 음성 및 그람 양성 박테리아의 병원균 인식에 관여하기 때문이다. 이것은 기계적 자극 하에서 CNC의 M1 분극화 능력에 대한 거대한 증거를 나타낸다. 동시에 박테리아 감염 예방에 중요한 역할을 하는 FFS 하의 PCL_PVA@cCNC 구조물서 I115의 발현이 급격히 증가하는 것을 관찰했다. Tlr4와 I115 모두의 상향 조절은 제작된 구조물에서 세포의 M1 활성을 크게 지원한다.
- [0068] 이온 채널 활동에 관여하는 DEG
- [0069] 내부 세포 환경에 대한 외부 자극의 인식을 제어하는 중요한 측면 중 하나는 이온 채널이다. 유체 전단 응력이 동적 대식세포 분극화를 초래함에 따라 본 발명자들은 transcriptomic 수준에서 이온 채널 발현 프로파일을 조사했다.
- [0070] 본 발명자들은 도 11(a, b) 및 표 7에 나와 있는 것처럼 대조군과 처리군에서 FSS에 따라 차등적으로 조절되는 총 85개의 이온 채널을 관찰했다.
- [0071] 본 발명자들은 칼륨(K⁺) 채널, 칼슘 채널(Ca²⁺) 및 나트륨 채널(Na²⁺)을 포함하는 양이온 채널의 발현에서 큰 차이를 관찰했다. 총 16개의 K⁺ 채널이 차등적으로 발현되는 것으로 관찰되었으며, 그 중 8개는 상향 조절되었고 4개는 하향 조절되었다. Ca²⁺ 이온에 관한 이온 채널은 각각 5가지 유형의 상향 조절 및 하향 조절을 나타냈다. 반면, FFS에서는 두 개의 Na²⁺ 채널이 상향 조절되었고 하나는 하향 조절되었다. 음이온 채널 중 클로라이드 이온 채널(Cl⁻)은 자극에 의해 영향을 받는 것으로 관찰되었다. 5개의 Cl⁻ 채널 중 3개는 상향 조절된 반면 2개는 하향 조절되었다.

[0072] 본 발명자들은 전체 대식세포 동적 분극화 과정에서 양이온 채널의 역할이 양이온 CNC를 포함하는 PCL_PVA@cCNC 구성에서 비롯된 것으로 추정한다. CNC에서 양이온성 표면 그룹의 존재는 궁극적으로 Raw 264.7 세포의 전반적인 동적 분극화 행동을 초래한 대식세포에서 양이온성 채널의 차등적 발현을 촉진했다.

[0073] 도 11c는 FFS에서 발현되는 단백질의 차등 발현을 보여준다. 본 발명자들은 대식세포의 M1 분극화에서 핵심 매개체로서 CCL3(사이토카인 리간드 3)의 관여를 관찰했다. 또한, 항염증 반응에 관여하는 TNFR2(종양괴사인자수용체 II형)의 발현 증가를 관찰하였다.

발명의 효과

[0075] 본 발명자들은 동적 대식세포 분극화 및 뼈 재생을 제어하기 위해 PVA 및 PVA@cCNC의 정렬 및 무작위 나노섬유의 혼합 토폴로지로서 아르기닌 코팅 PCL 스캐폴드 라미네이트를 제작했다. 본 발명의 제작된 합성물이 면역 결핍 환자, 특히 수술 후 면역 저하 시나리오에서 면역 조절 뼈 이식편 역할을 할 수 있을 것으로 기대한다.

[0076] 또 본 발명자들은 RNA-seq 분석을 통해 FSS 유도 동적 대식세포 분극화 과정의 분자 메커니즘을 추가로 연구했다. 본 발명의 결과는 전단 자극을 받았을 때 본 발명의 구조물의 독특한 구조로 인해 동적 대식세포 분극화 거동을 결정하는 데 중요한 이온 채널의 관련성을 밝혀냈다. 본 발명자들은 메커니즘의 규명이 동적 면역 조절을 통해 작동하는 미래 스마트 스캐폴드 제조의 미세 조절에 큰 도움이 될 것으로 기대한다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 3D프린팅과 전기방사를 결합한 나노복합체 제조과정의 개략도,
 도 2(A)는 PCL 스캐폴드의 3D 프린팅을 나타낸 것으로; (A1) 디자인의 CAD 모델; (A2) 3D 프린팅 공정; (A3) 10 X 15mm 인쇄 구조물; (A4) 아르기닌 코팅 후 PCL 스캐폴드.
 2(B)는 아르기닌으로 PCL 스캐폴드의 성공적인 코팅을 보여주는 PCL, Arg 및 PCL-Arg 구조물의 FT-IR 스펙트럼 (왼쪽 패널); 아르기닌 코팅 전후의 PCL 스캐폴드의 FE-SEM 이미지(오른쪽 패널).
 도 3(A) 전기 방사된 PVA 및 PVA@cCNC 매트리의 광학 이미지,
 (B) PVA, PVA@cCNC 나노섬유의 FE-SEM 이미지,
 (C 및 D) 해당 FE와 함께 PVA 및 PVA@cCNC 나노섬유의 인장 강도-섬유 중단점에서 SEM 이미지.
 도 4(A) 전기 방사된 PVA 및 PVA@cCNC 매트가 3D 인쇄된 PCL 스캐폴드에 롤링되는 과정의 광학 이미지,
 (B) 고습도 조건에서 스캐폴드에 섬유 코팅,
 (C) 니트 및 섬유 코팅의 FE-SEM 이미지 PCL 스캐폴드,
 (D) PVA의 FE-SEM 이미지, 뚜렷한 나노섬유 토폴로지를 보여주는 PVA@cCNC 나노섬유,
 (E) 제작된 스캐폴드의 물 접촉각 측정.
 도 5(A-E) 3D 환경에서 세포 배양 조건을 보여주는 유체 흐름 생물 반응기 설정,
 (h-j) Raw 264.7, hBMSCs 및 정적 및 유체 전단 역학 하에서의 공동 배양의 세포 생존 가능성 분석
 (k) 생사 유체 흐름 환경 하에서 공동 배양된 세포의 분석,
 (l-p) 정적 배양 조건에서 Raw 264.7 세포의 FE-SEM 이미지는 대식세포 분극화에 대한 나노물질의 효과를 보여줌. 데이터는 3회 실험의 평균 $\pm$ SD, * p <0.05, ** p <0.01 및 *** p <0.001에서 통계적 유의성임.
 도 6은 정적 및 동적 조건 하에서 제조된 나노복합체 스캐폴드의 ARS 염색을 통한 광물화 가능성의 평가.
 도 7은 정적 및 동적 배양 조건 하에서 배양 7일 후 (a) 골형성 및 (b) 기계변환 마커 유전자의 발현에 대한 실시간 q-PCR 연구를 나타낸 그림으로, 데이터는 3회 실험의 평균 $\pm$ SD, ** p <0.01 및 *** p <0.001에서 통계적 유의성임.
 도 8은 정적 및 동적 조건 하에서 배양 24시간 후 대식세포 M1 및 M2 마커 유전자의 실시간 qPCR 분석을 나타낸 그림으로 데이터는 3회 실험의 평균 $\pm$ SD, ** p <0.01 및 *** p <0.001에서 통계적 유의성임. P: PCL, PA: PCL-아르기닌, PAP: PCL-아르기닌-PVA, PAPCCNC: PCL-아르기닌-PVA양이온성 셀룰로오스 나노결정.

도 9는 대식세포 Raw 264.7 세포 생리학과 관련된 차별적으로 발현된 유전자(DEG)를 나타낸 그림으로;

- (a) transcriptomic 변경과 관련된 DEG의 총 수;
- (b) 대식세포 분화 과정에 관여하는 DEG를 보여주는 히트맵. 하향 조절된 유전자(파란색)와 상향 조절된 유전자(노란색)는 -0.5에서 +0.5 Z-점수로 표시된 색상 코드로 표시됨.
- (c) 대식세포 분극화 마커 유전자의 차등 발현 패턴을 보여주는 그래픽 플롯.

도 10은 대식세포 분극화 및 염증에 관여하는 차별적으로 발현되는 유전자를 나타낸 그림으로;

- (a) 모든 연구 그룹에서 유전자의 배수 변화;
- (b) 정적 제어 그룹과 비교하여 동적 그룹의 DEG 히트맵.

도 11은 이온 채널에 관여하는 차별적으로 발현되는 유전자를 나타낸 그림으로;

- (a) 모든 연구 그룹의 이온 채널에 관여하는 DEG;
- (b) 정적 대조군과 비교한 동적 그룹의 DEG 히트맵;
- (c) FFS 하에서 대식세포 분극화의 단백질 분석.

본 발명의 도면에서, PA: Polycaprolactone-Arginine, PAP: Polycaprolactone-Arginine-Polyvinyl alcohol 및 PAPC: Polycaprolactone-Arginine-Polyvinyl alcohol- cationic cellulose nanocrystals를 의미함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0080] 실시예 1:재료

[0081] Polycaprolactone (PCL; Sigma-Aldrich, USA; CAS: 24980-41-4, Average Mol. Wt. 80K, ≥95%), Poly Vinyl Alcohol (PVA; Daejung Chemicals, Korea; CAS: , Average Mol. Wt. 98-99%), 양이온성 셀룰로오스 나노크리스탈(Cellulose Lab; 캐나다), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC; Alfa Aeser, USA; CAS: ,98%), N-하이드록시수신이미드(NHS) ; Alfa Aeser, 미국; CAS: ,98%), 수산화나트륨(NaOH; Alfa Aeser, USA; CAS: ,97%), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% 태아 소 혈청(FBS), Dulbecco's phosphate- 완충 식염수(DPBS) 및 트립신-에틸렌 디아민 테트라 아세트산(Trypsin-EDTA)을 제공한 항생제는 대한민국 Welgene Inc.에서 구입했다. 했습니다. 골 유도 배지, 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI) 및 alizarin red(ARS) 염색 키트는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다. WST-8 염료(EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit®) 및 Alexa Fluor 접합 단일클론 항체는 각각 대한민국의 DoGenBio Co., Ltd.와 미국의 Santa Cruz Biotechnology에서 구입했다. TRIzol® 시약, Acridine orange 및 Ethidium bromide 얼룩은 미국 Thermo Fisher Scientific의 Invitrogen에서 구입했다. cDNA 합성 키트는 Gaithersburg의 Invitrogen에서 구입했다. 미국 Bio-Rad Laboratories에서 SYBR Green Master 믹스를 공급했다. 유전자 프라이머는 대한민국 대전 소재의 BIONEER® Inc.에서 공급받았다. 완전 자동화된 CELLINK® BIO-X 3D 바이오 프린터는 스웨덴의 CELLINK Corporation에서 구입했다.

[0083] 실시예 2:바이오리액터 디자인

[0084] 생물반응기 시스템은 저장소에서 들어오는 배지를 받는 중앙 웰에 연결된 6개의 주변 원통형 챔버가 있는 원형 금속 몸체로 구성된다. 각 주변 챔버는 웰의 위에서 아래로 시간순으로 설계된 10, 20 및 35mm 직경의 치수로 설계되어 웰 당 3개의 스캐폴드를 만든다. 각 스캐폴드 지지대는 높이가 10mm로 3개의 독립적인 스캐폴드를 동시에 지지할 수 있다. 배양 배지는 튜브 시스템을 통해 챔버 및 유량 조절 펌프와 결합된 붕규산 유리로 만들어진 저장 용기에 보관된다. 생물반응기 챔버 및 배지 배양 저장소는 인큐베이터 내부에 배치됩니다(37 °C, 5% CO2, 고습도). 실험 중에 생물 반응기 챔버의 스캐폴드는 0.1mL/분, 0.25mL/분 및 0.5mL/분의 유속으로 배양 배지와 함께 위에서 아래로 연속적으로 스트리밍된다.

[0086] 실시예 3: PCL 잉크 제조 및 3D 프린팅

[0087] 1.5g PCL의 무게를 측정하고 플라스틱 인쇄 카트리지(CELLINK Corporation, Sweden)에 직접 붓고 2mL의 디클로

로메탄과 함께 배양하여 완전히 용해될 때까지 실온에서 75% PCL 용액을 만든다.

[0088] 제조된 PCL 잉크를 사용하여 실온에서 3D 구조물을 인쇄했다. Solid works 소프트웨어를 사용하여 3D 프린팅 구조를 설계했다(www.solidworks.com, Dassault Biosystems, France). 원형(15 × 10mm) 구조물은 22G(0.410mm) 플라스틱 헤드 바늘을 사용하여 실온 및 40° C 프린트 헤드 온도에서 8kPa 인쇄 압력을 사용하여 조심스럽게 인쇄되었다. 인쇄 속도는 2mm/s로 유지되었다. 스캐폴드는 사포를 수용하는 유리 페트리 플레이트에 직접 인쇄되었다. 프린팅 후 스캐폴드는 필요할 때까지 실온에서 보관되었다.

[0090] **실시예 4: 전기방사에 의한 PVA 및 PVA@cCNC 나노섬유의 제조**

[0091] 실온에서 자기 교반에 의해 탈이온수에서 14% PVA(wt./vol)를 제조하였다. 폴리머 용액을 10 cm³ 플라스틱 주사기(Fortuna Optima with Luerlock ti, Poulten & Graf, Wertheim, Germany)로 옮기고 직각으로 끝이 잘린 바늘(G 27 1 1/2 인치, K51 Luer-lock, Italy)로 옮겼다.

[0092] 유사하게, PVA@cCNC 용액은 PVA 농도를 14%로 유지하면서 구입한 양이온성 CNC 용액(1% cCNC 함량)에 PVA를 용해시켜 제조했다.

[0093] 전기방사를 위해 각 용액 5mL를 알루미늄 호일로 덮인 회전 드럼에 210cm 거리에서 40° 각도로 2ml/h의 일정한 유속으로 전달했다. 드럼의 회전 속도는 3000rpm으로 유지하였다. 작동 전압은 상대 습도 40%에서 20.0kV/cm이다.

[0095] **실시예 5:복합 스캐폴드 제작**

[0096] 고정 치수의 PVA 및 PVA@cCNC 나노섬유를 3D 인쇄된 PCL 스캐폴드의 측면 벽에 수동으로 롤링하여 나노섬유 적층 PCL 스캐폴드를 제작했다. 그런 다음 구성물을 가습 챔버에 30분 동안 두어 PVA의 수분 유도 용해를 촉진했다. 복합 스캐폴드는 PVA 나노섬유를 가교하기 위해 30분 동안 50% 글루타르알데히드 증기로 포화된 맞춤형 밀폐 챔버에 두었다. 스캐폴드는 잉여 글루타르알데히드를 완전히 제거하기 위해 PBS 및 DMEM 배지에 담갔다.

[0098] **실시예 6: 화학적 특성 분석**

[0099] 형태학적 분석

[0100] 인쇄된 스캐폴드의 형태는 15.0 kV/cm의 가속 전압으로 주사 전자 현미경(UR-SEM, Hitachi-S4800, California, USA)으로 분석하였다.

[0101] FT-IR 분석

[0102] Perkin Elmer FTIR 분석기(Frontier, Perkin Elmer, UK)를 적용하여 4cm⁻¹의 분해능으로 4000-1000cm⁻¹의 파수 범위에서 투과 모드로 샘플에 존재하는 작용기를 평가했다.

[0103] 인장 시험

[0104] 제작된 스캐폴드의 기계적 물성은 만능시험기(UTM; MCT-1150, AND Inc., Japan)를 이용하여 인장시험을 통해 평가하였다.

[0105] 분석은 10mm/min의 일정한 속도로 수행되었다. 각 샘플은 3중으로 제작되었다.

[0106] 접촉각 측정

[0107] 개발된 구조물의 표면 친수성을 평가하기 위해 Contact Angle Analyzer(SEO-Phoenix MT (M.A.T), Malaysia)를 이용하여 PCL, PA, PAP, PAPC 표면의 수분산도를 측정하였다. 샘플의 친수성은 고각 낙하 방법을 통해 평가되었다. 필름 표면에 수직으로 장착된 주사기로 5μL 물방울을 증착했다. 10초 동안 표면에 물을 가한 후 전하결합소자(CCD) 카메라로 접촉각(θ)과 계면에서의 습윤 에너지를 측정하고 기록했다.

[0108] 분해 연구

[0109] 개발된 스캐폴드의 분해 거동은 PBS(0.2M) 및 프로테아제 용액에서 이전에 다른 곳에서 보고된 바와 같이 25° C에서 일부 수정하여 조사되었다[Wan Y, Cao X, Wu Q, Zhang S, Wang S. Preparation and mechanical properties of poly (chitosan-g-*DL*-lactic acid) fibrous mesh scaffolds. Polymers for Advanced Technologies. 2008;19:114-23].

[0110] 이 조사에서 1mg/mL의 효소 농도가 측정되었다. 이를 위해 스캐폴드를 미리 결정된 시간 동안 PBS 및 프로테아

제 용액에 담갔다. 그런 다음 스캐폴드를 PBS 및 프로테아제 배지에서 제거하고 증류수로 행구었다. 티슈 페이퍼를 사용하여 여분의 물을 추출했다. 건조된 스캐폴드의 무게를 측정했다. 3일 후, 프로테아제 용액을 교체하였다. 다음 공식을 사용하여 in vitro 분해를 계산했다.

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W_i - W_d}{W_i} \times 100$$

여기서 W_i 와 W_d 는 각각 초기 및 분해된 스캐폴드 무게.

실시예 7:인 비트로 연구

세포 배양

골형성 유도를 위해 세포를 50 $\mu\text{g/mL}$ L-아스코르빈산, 10 mM β -글리세로포스페이트 및 100 nM 덱사메타손이 보충된 DMEM을 포함하는 골형성 유도 배지에서 배양하였다. hBMSCs는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, 대한민국)으로부터 입수하여 페니실린(10,000 units/mL), 스트렙토마이신(10,000 $\mu\text{g/mL}$) 및 암포테리신 B(25 $\mu\text{g/mL}$)이 보충된 DMEM을 사용하여 5% CO₂(Steri-Cycle 370 인큐베이터, Thermo Fisher Scientific, USA)의 습한 대기에서 37° C에서 배양하였다.

hBMSC를 인쇄된 GelMA 및 GelMA-nHAp 스캐폴드에 시딩하고 정적 조건에서 24시간 동안 배양했다. 세포 부착 후, 하나의 hBMSC-라덴(laden) GelMA 및 GelMA-nHAp 스캐폴드를 생물반응기로 옮겼다. 두 스캐폴드 모두에서 정적 배양 조건 하에서 배양된 세포를 대조군 세트로 취하였다. 계대 5 세포는 본 발명에서 사용되었다.

세포 생존율 분석

hBMSC(1×10^4 개 세포/100 μL 배지)를 96-웰 플레이트에 시딩하고 선택된 기간(1일, 3일 및 5일) 동안 5% CO₂와 함께 37° C에서 개발된 스캐폴드와 함께 배양했다. 스캐폴드 없이 배양된 hBMSC를 대조군으로 간주하였다. WST-8 분석법을 사용하여 세포 생존력을 분석하였다. 원하는 배양 기간 후 WST-8 염료 10 μL 를 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 생성된 포르마잔은 450nm(625nm를 기준값)에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 모든 실험은 3회 수행되었으며 데이터는 평균 OD $\pm$ 표준 편차로 표시된다. 통계적 유의성은 $p^* < 0.05$ 에서 고려되었다.

광물화 연구

hBMSCs의 광물화에 대한 FSS의 효과는 자극 7일 후에 ARS 절차에 의해 평가되었다. 스캐폴드 상의 배양 세포를 PBS로 행구었다. 세포를 RT에서 15분 동안 70% 절대 병냉 에탄올을 1mL로 고정하고 투과성화시켰다. 투과된 세포를 500 μL 의 40mM ARS(pH 4.2) 염색으로 10분 동안 염색한 다음 탈이온수로 세척하여 과잉 염색을 제거했다. 광물화는 형광 현미경을 사용하여 문서화되었다.

RNA 분리 및 실시간 PCR(qRT-PCR) 분석

FSS 처리 세포와 대조 세포에서 골 형성 마커 유전자, 기계 형질 도입 유전자 및 대식세포 분극화 마커의 발현을 qRT-PCR 기술로 평가했다.

요약하면, 제조업체의 지침에 따라 세포(4×10^4 개 세포/100 μL 배지)를 7일 및 14일 동안 골형성 유도 배지에서 실험 조건 하에 배양한 후, TRIzol® 시약(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 RNA를 추출하였다.

추출된 RNA의 순도와 농도는 분광광도계로 평가하였다. 역전사 효소와 SYBR Green Master mix를 사용하여 2 μg 의 RNA로부터 cDNA를 합성했다. mRNA 발현은 Bio-Rad Real-Time PCR(CFX96TM Maestro Real-Time System, Bio-Rad, USA)로 정량화하였다. 반응 조건은 95° C에서 15초 동안 변성 및 60° C에서 1분 증폭을 43회 반복했다. 모든 실험은 3중으로 수행되었고 하우스키핑 유전자 GAPDH로 정규화되었다. 상대 mRNA 발현을 히스토그램으로 비교하였다. 모든 샘플은 실험 동안 3중으로 제조되었다. qRT-PCR 분석에 사용되는 특정 유전자 프라이머는 이전에 보고된 바 있다[Ganguly K, Dutta SD, Jeong M-S, Patel DK, Cho S-J, Lim K-T. Naturally-derived protein extract from Gryllus bimaculatus improves antioxidant properties and promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. PloS one. 2021;16:e0249291;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].

면역세포화학적 염색

[0128] 골 형성 마커 단백질의 발현은 면역 세포 화학 염색 절차를 통해 연구되었다. hBMSCs(4×10^4 개 세포/100 μ L 배지)를 정적 및 FSS 배양 조건에서 7일 동안 배양하였다. CPI가 없는 매체를 대조군으로 삼았다. 세포 염색은 PBS로 세척한 후 실온에서 15분 동안 3.7% PFA로 고정하였다. 다음으로, 실온에서 10분 동안 0.1% Triton X-100을 첨가하여 세포를 투과화시켰다. 그 후, 세포를 PBS로 2회 행구고, 1% BSA로 차단하고, Runx2 및 ALP에 대한 마우스 단일클론 항체 250 μ L와 함께 배양하였다. 핵은 어두운 곳에서 2분 동안 20 μ L의 1 mg/mL DAPI 용액으로 대조염색되었다. 형광 이미지는 형광 현미경으로 40X 배율로 촬영했다.

[0129] 전사체 평가

[0130] transcriptome의 분석은 다양한 실험 그룹에서 DEG를 평가하기 위해 수행되었다. 골분화 7일 후, RNAzol(Sigma-Aldrich, USA) 시약을 이용하여 전체 RNA를 추출하여 표준 RNA 라이브러리를 만드는 데 사용하였다. QuantiSeq 3' mRNA-Seq은 인간 참조 게놈 hg19 및 UCSC 게놈 데이터베이스와 함께 차세대 RNA 시퀀서(Nova-Seq 6000, PE100 bp, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 원시 데이터는 ExDEGA 그래픽 소프트웨어(ebiogen, 대한민국)로 처리하고 log2(각 그룹의 정규화된 데이터 평균)로 정규화했다. Student's t-test는 통계 분석에 사용되었다. 배수 변화가 2.0 이상이고 p 값이 0.05 미만인 유전자는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. STRING 소프트웨어(<https://string-db.org/>)를 사용하여 잠재적인 상호 작용과 공동 발현된 유전자 및 단백질 네트워크를 평가했다.

[0132] OriginPro 9.0을 활용하여 모든 상기 인 비트로 데이터의 통계 분석을 수행했다. 일원 분산 분석을 사용하여 대조군과 치료군 간의 통계적 유의성을 결정했다. 모든 데이터는 평균 표준 편차로 표시되었다. 유의적 차이는 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001일 때 결정했다. edgeR 유틸리티를 사용하여 TMM 및 CPM 기술을 사용하여 RNA 시퀀싱 데이터를 정규화했다. 얻은 p-값은 Benjamin과의 다중 비교 및 DAVID 소프트웨어(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)의 잘못된 발견율에 대해 조정되었다.

표 1

[0134]

Sample conditions	PCL (g)			PCL-Arg (g)			PAP (g)			PAPC (g)		
	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12
Buffer w/o enzyme	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Buffer w/ enzyme	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

[0135] 표 1은 다양한 pH 버퍼를 배양하기 전 샘플의 초기 무게.

표 2

[0136]

Day(s)	PCL (g)			PCL-Arg (g)			PAP (g)			PAPC (g)		
	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12
0	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
1	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.003	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
7	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
14	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
21	0.008	0.01	0.01	0.01	0.01	0.004	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

[0137] 표 2는 효소 없이 다양한 pH 버퍼를 배양한 후 샘플의 남은 무게.

표 3

[0138]

Day(s)	PCL (g)			PCL-Arg (g)			PAP (g)			PAPC (g)		
	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12	pH4	pH7	pH12
0	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
1	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
7	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
14	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
21	0.01	0.008	0.008	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

[0139]

표 3은 효소와 함께 배양한 후 샘플의 남은 무게.

표 4

[0140]

Gene Symbol	DN1..SN1	DC1..SC1	Description
Il1rl1	1.651881985	0.632014093	interleukin 1 receptor-like 1
Casp8	0.563516441	0.210842675	caspase 8
L3mbtl3	0.449832853	0.503509535	l(3)mbt-like 3 (Drosophila)
Socs1	0.156321535	-0.201241566	suppressor of cytokine signaling 1
Nrros	1.667564275	1.533087355	negative regulator of reactive oxygen species
Vegfa	-1.314047655	-1.190185526	vascular endothelial growth factor A
Cd4	0	0.204919462	CD4 antigen
Il15	-0.587635548	0.725537878	interleukin 15

[0141]

표 4는 대식세포 분화 과정과 관련된 주요 DEG 목록.

표 5

[0143]

Gene Symbol	DN/SN	DC/SC
Il6	0	0
Tgfb1	0.09973	0.745032
Nos2	-2.79842	-2.97561
Vegfa	-1.31405	-1.19019
Arg1	-0.66649	-0.57311
Cd163	0	0

[0144]

표 5는 RNA-seq 분석에서 밝혀진 극성화 마커 유전자의 발현 프로파일.

표 6

[0146]

Gene symbol	DN/ SN	DC/ SC	Description
Nrros	3.177	2.894	negative regulator of reactive oxygen species
Csflr	3.372	1.424	colony stimulating factor 1 receptor
Tlr2	2.204	2.760	toll-like receptor 2
Csfl	1.458	1.330	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Tlr4	2.516	3.060	toll-like receptor 4
Itgam	2.150	1.219	integrin alpha M
Il15	0.665	1.654	interleukin 15

Myd88	2.163	1.778	myeloid differentiation primary response gene 88
-------	-------	-------	---

[0147] 표 6은 RNA-seq 분석에서 밝혀진 바와 같이 대식세포 분화 및 염증 모두에 관여하는 DEG의 발현 프로파일.

표 7

[0149]

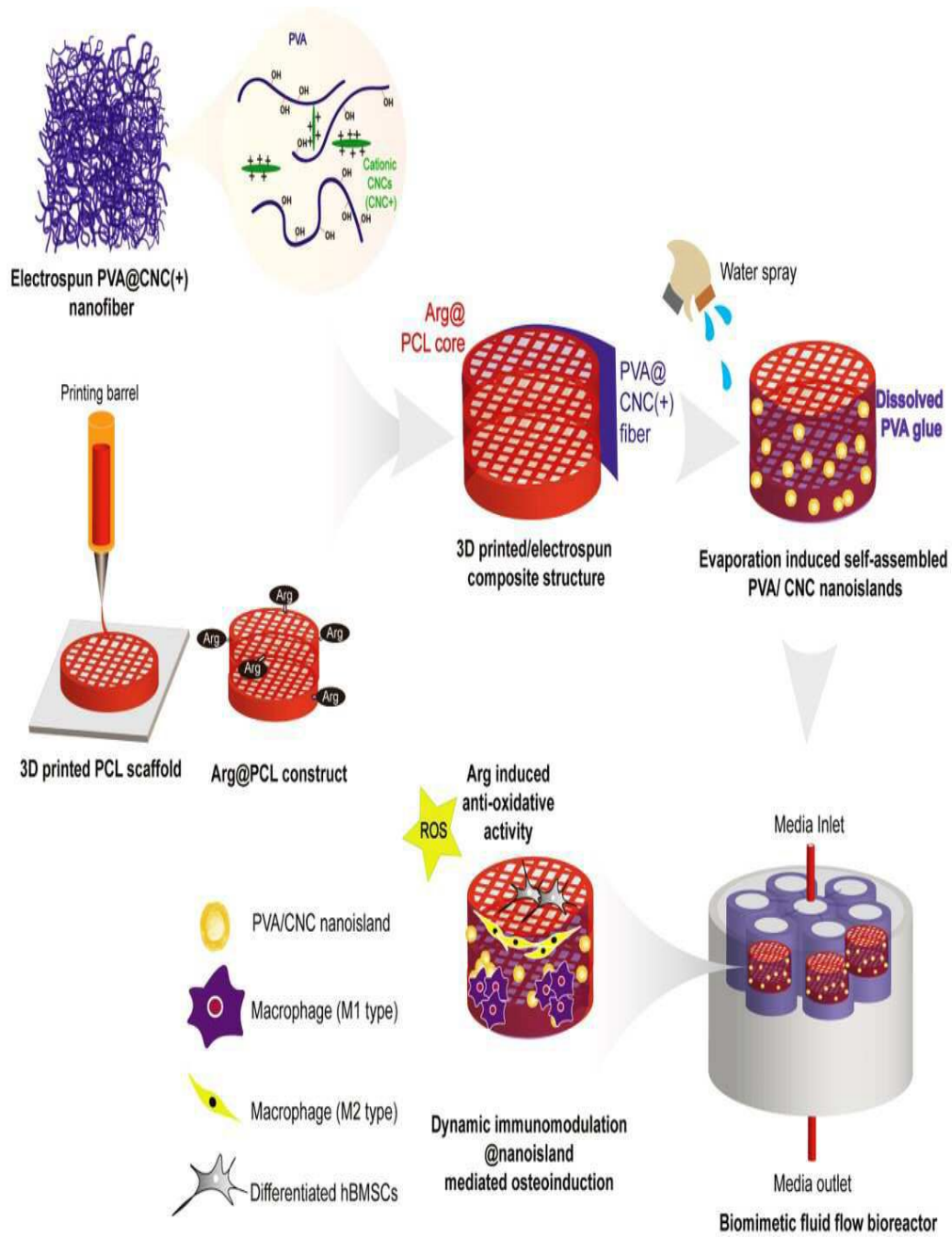
Gene Symbol	DN1..SN1	DC1..SC1
Cnga3	-0.197617166	0.166991748
Slc26a9	-0.371397532	-0.406160934
Tmco1	0.615711021	-0.402071862
Kcnk2	-1.242894804	-0.705245287
Cacnb1	-0.75503746	-0.613034365
Kcnh4	0	0.204919462
Ryr2	0	-0.217326742
Vdac2	0.406198133	-0.011987098
Kcnma1	0	0.384319527
Cacna1d	-1.175393754	-0.158305869
Gsdmd	0.260550834	-0.903004435
Apo19a	2.252135559	1.501547168
Apo19b	1.98471803	0.818121669
Ano6	0.080178732	1.105481638
Cacnb3	-0.14132254	0.778810765
Scn8a	0.054410915	-0.406160934
P2rx6	0.297347566	0.384319527
Clcn2	-1.172840783	1.171409252
Atp5o	0.114924004	-0.618102021
Kcne2	0.652792096	0
Kcnj6	0.156321535	0
Clcn7	0.19360271	0.881131291
Rhag	0	-0.012407431
Kcnk7	0.652792096	0.384319527
Best1	0.080798174	1.047521637
Trpm6	0.156321535	0
Trpm3	0	0.204919462
Atp5c1	-0.387056672	-0.609205548
Cacnb2	0.156321535	-0.997102805
Cacna1b	1.043441801	1.460482567
Grin1	-2.452251693	-2.793044768
Cacnb4	1.100584805	-0.040167094
Scn1a	0.297347566	0
Chrna1	-0.667125282	0.464220753
P2rx3	0.543760147	0
Ryr3	0.543760147	0.204919462
Catsper2	-0.911641812	1.036597576
Trpm7	-0.004575831	0.514796917
Slc4a11	1.324636663	1.089934012
Slc12a5	1.563050229	0.644576203
Kcnb1	-0.127764118	1.004173445
Kcnab1	0.346142228	0.687497015
Gria2	0	0.204919462
Chrnb2	-0.390705904	1.136338405
Clca4a	0	0.384319527
Gabbr2	0.297347566	0.204919462
Grin3a	-0.526477395	0.384319527
Rhd	0.25761413	-0.318073319
Clcn6	-0.6664936	-0.217326742
Kcnab2	-0.492914972	-1.681377036

Cacna2d1	0	-0.217326742
Kcnh2	-0.371397532	0
Asic3	-0.265625677	-1.433620861
P2rx7	0.588586803	0.893367648
P2rx4	0.752731467	1.073619407
Orai1	0.84056797	-0.35744758
Ttyh3	-0.308206977	-0.112731162
Clcn1	0	-0.982191802
Itpr1	0.30341254	0.412980915
Cacnalc	0	-0.217326742
Ttyh1	0.382763521	0.281336233
Kcnn4	0.132872918	-0.652813545
Ryr1	0.263780807	0.616751961
Kcnc3	-0.524122787	-1.242083754
Slc17a7	0.93774588	1.151193154
Trpm4	-0.037891089	0.95846038
Kcnj14	0	0.384319527
Trpm1	0.126222248	-0.569953287
Chrna10	0	0.204919462
Kcnq1	0	0.384319527
Ano1	0.297347566	0.204919462
Tpcn2	0.22768317	-0.438334061
Mcoln1	0.33487829	0.895633007
Clcn3	-0.182391968	0.167207612
Kcnn1	1.629067936	1.306450659
Ano8	0.872654641	0.01235127
Tmem38a	0.305073992	0.276756298
Cacna1a	1.013311461	1.215156709
Cngb1	0	-0.217326742
Trpc1	-0.197617166	0
Cacna2d2	0	-0.573114819
Scn11a	1.577592213	1.336979142
Kcnd1	-1.152766321	3.211324536
Gria3	0	-0.217326742
Gabre	-0.197617166	0

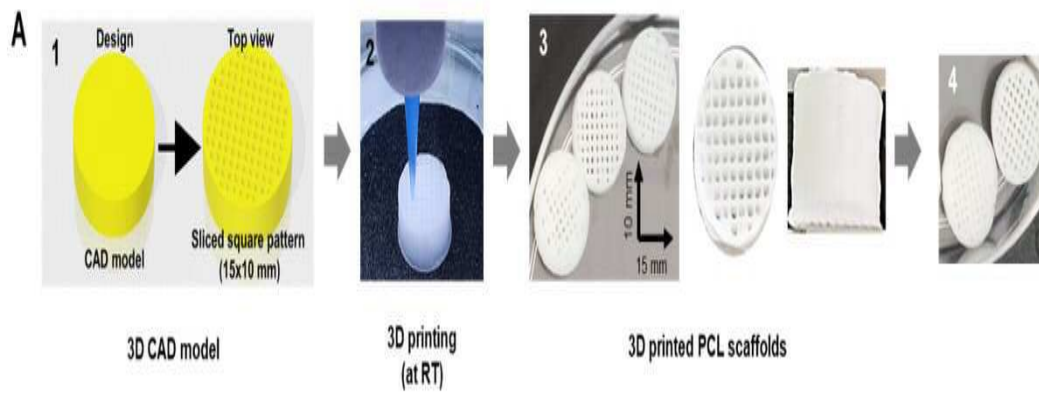
[0150] 표 7은 RNA-seq 분석에서 밝혀진 이온 채널 활성화에 관여하는 DEG의 발현 프로파일.

도면

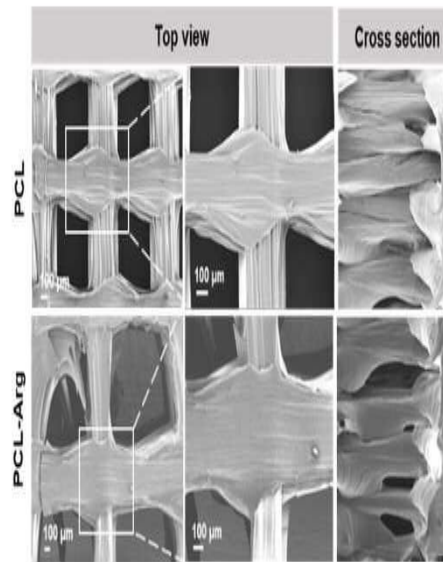
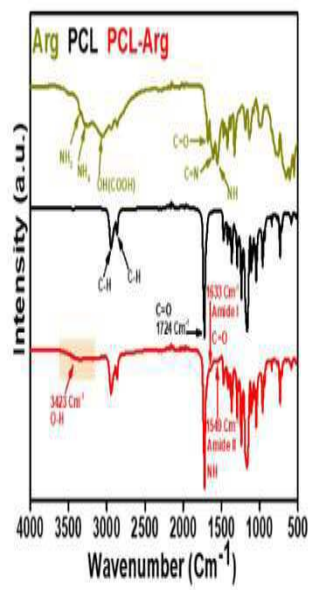
도면1



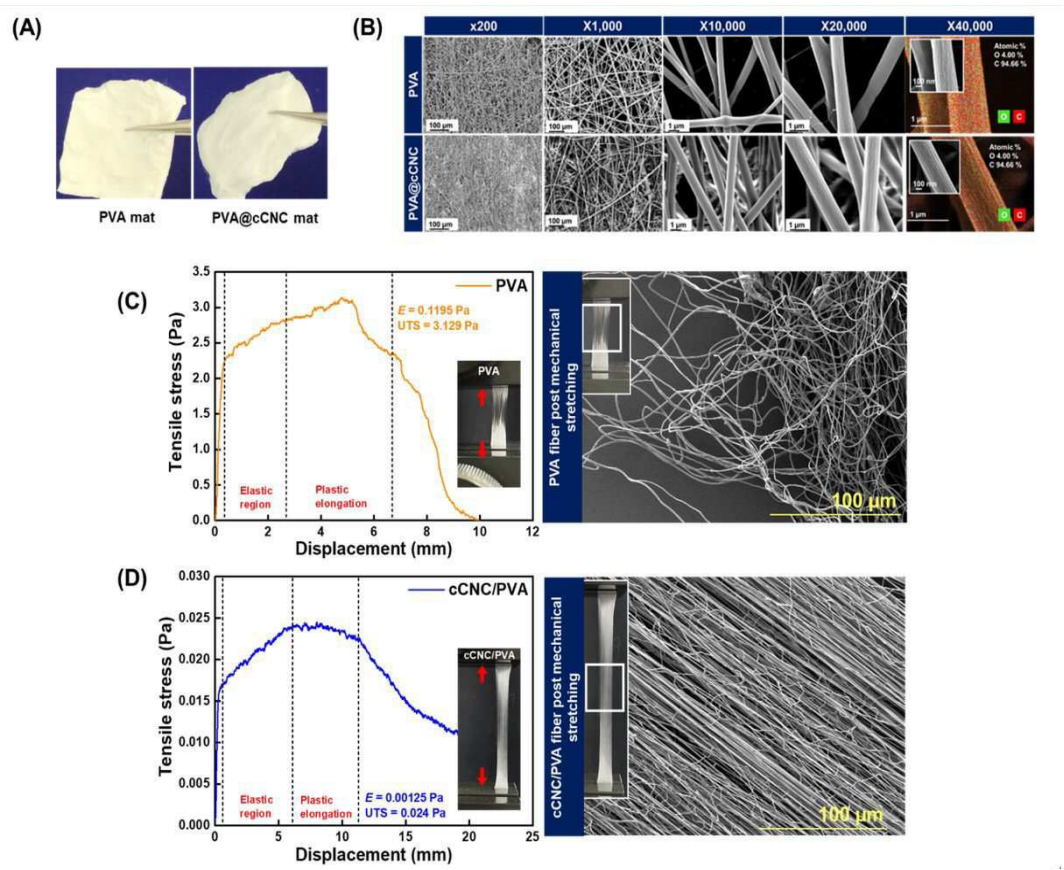
도면2



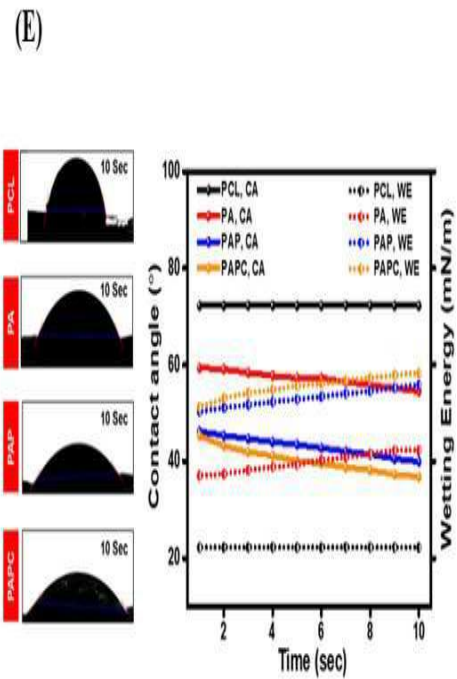
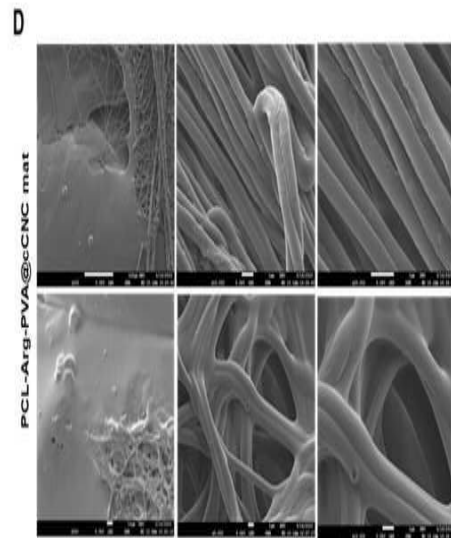
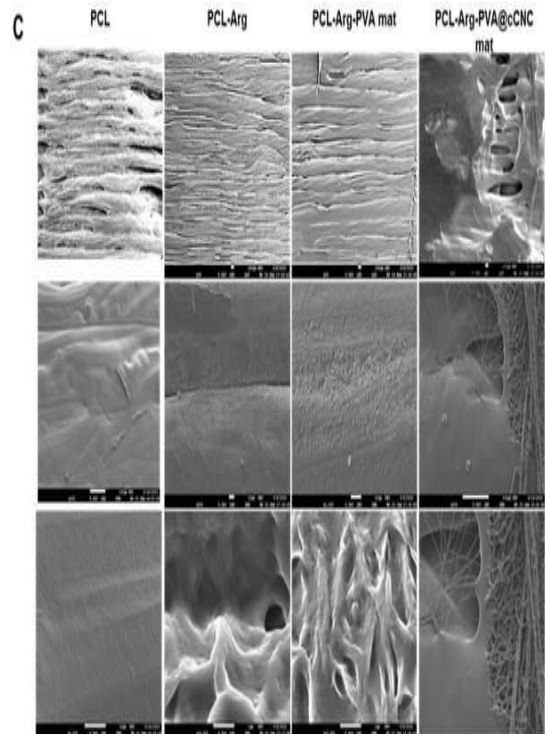
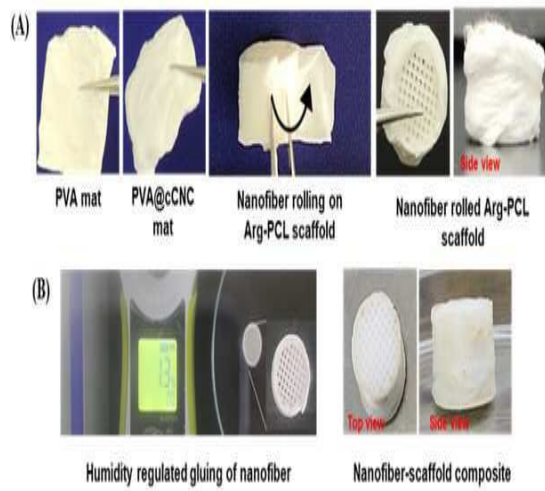
B



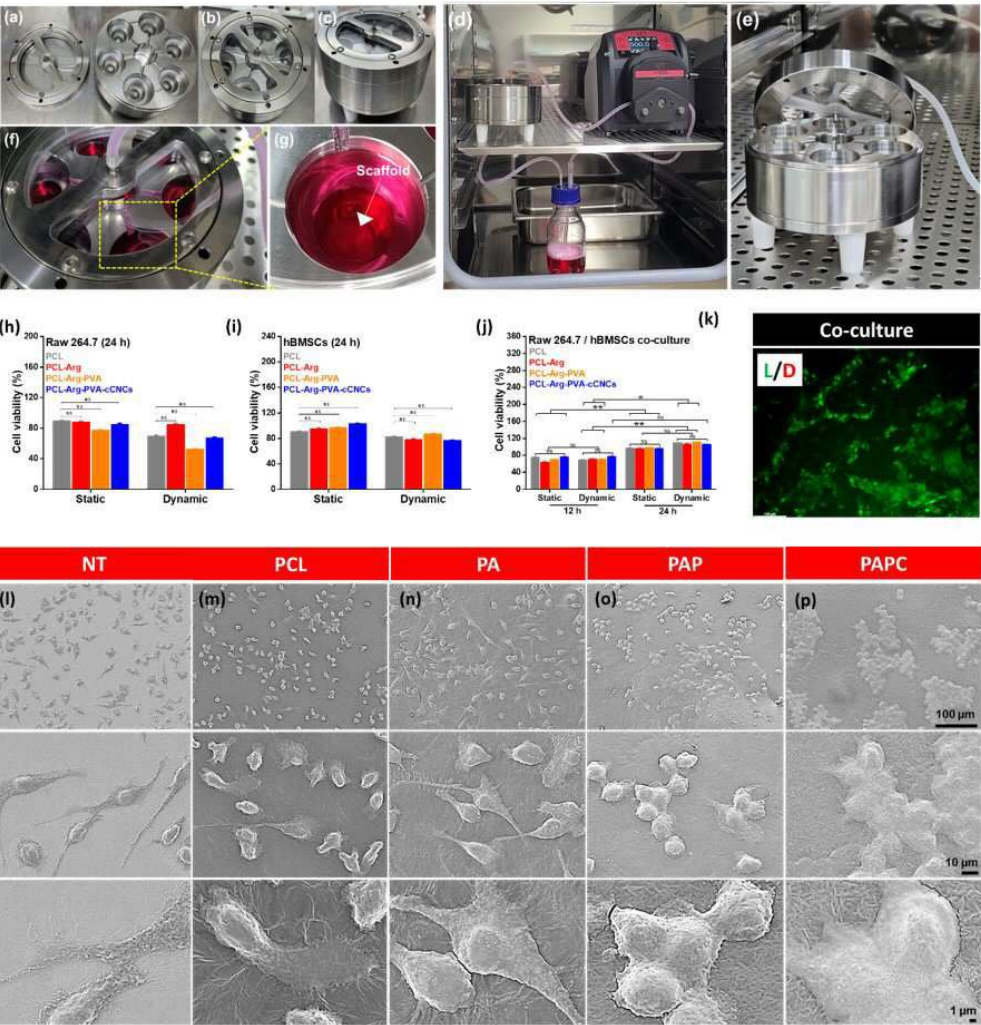
도면3



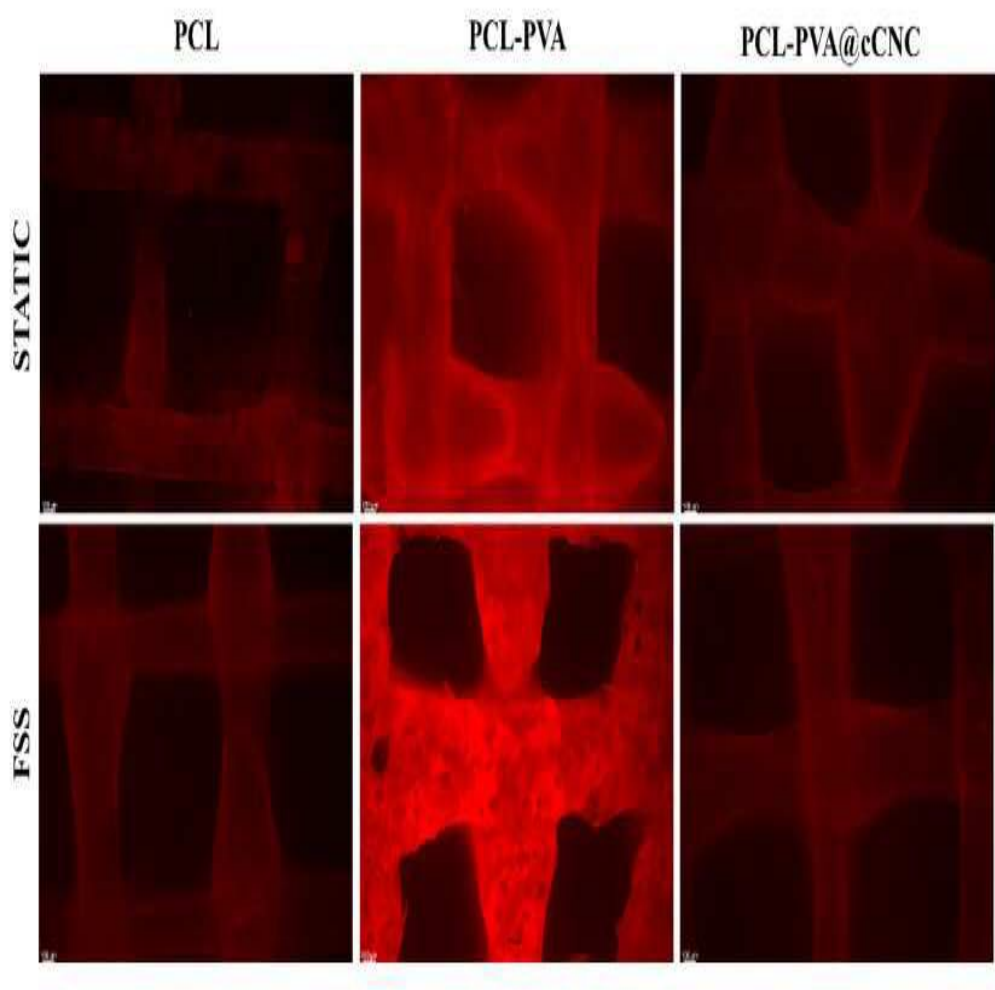
도면4



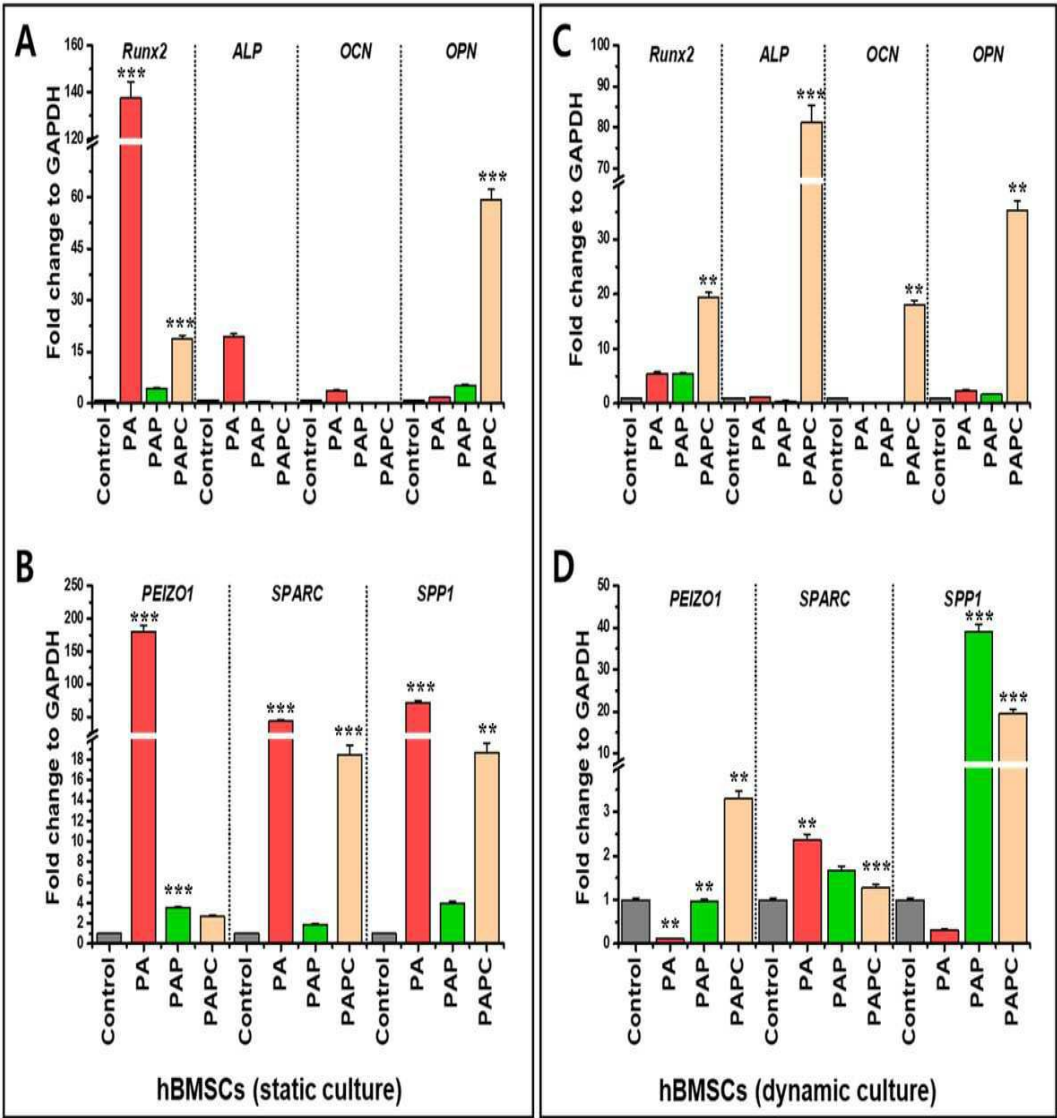
도면5



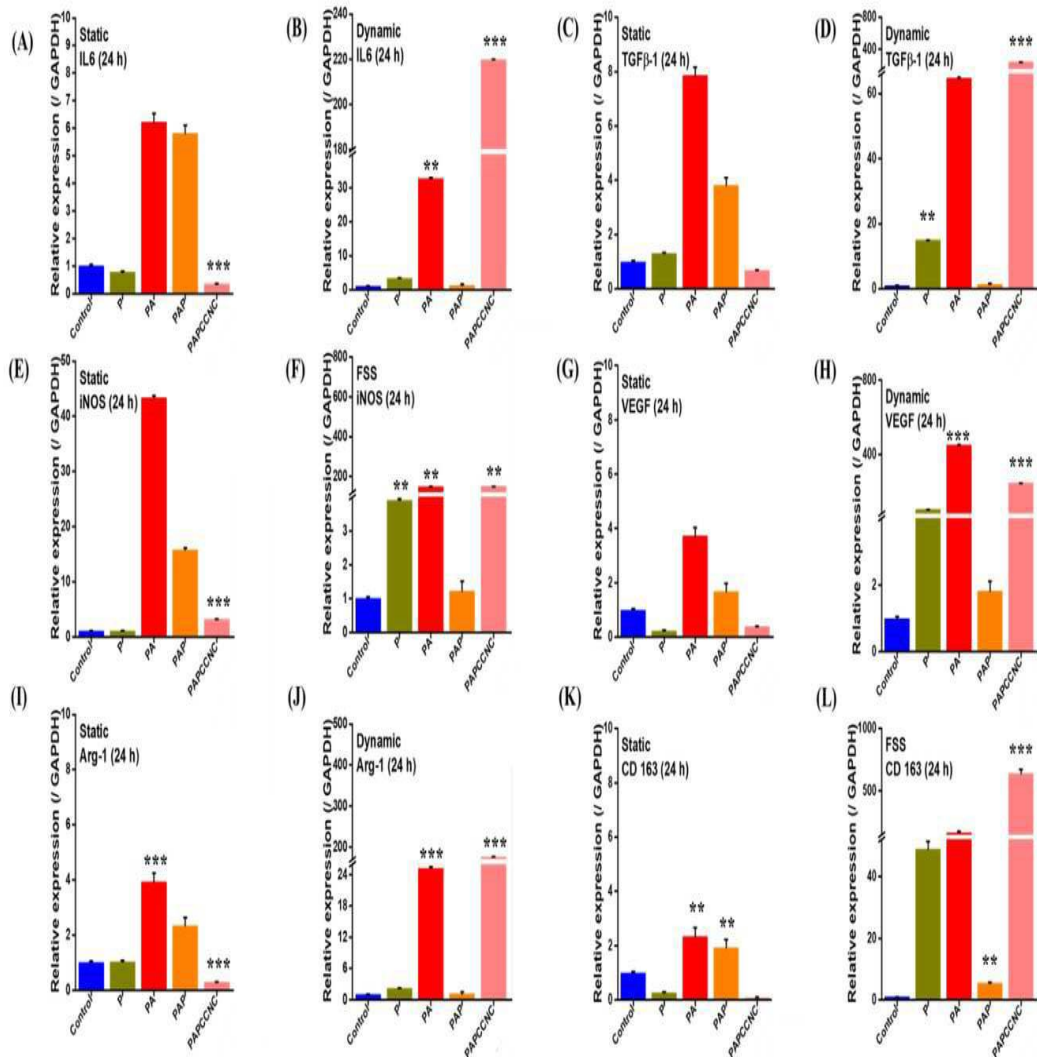
도면6



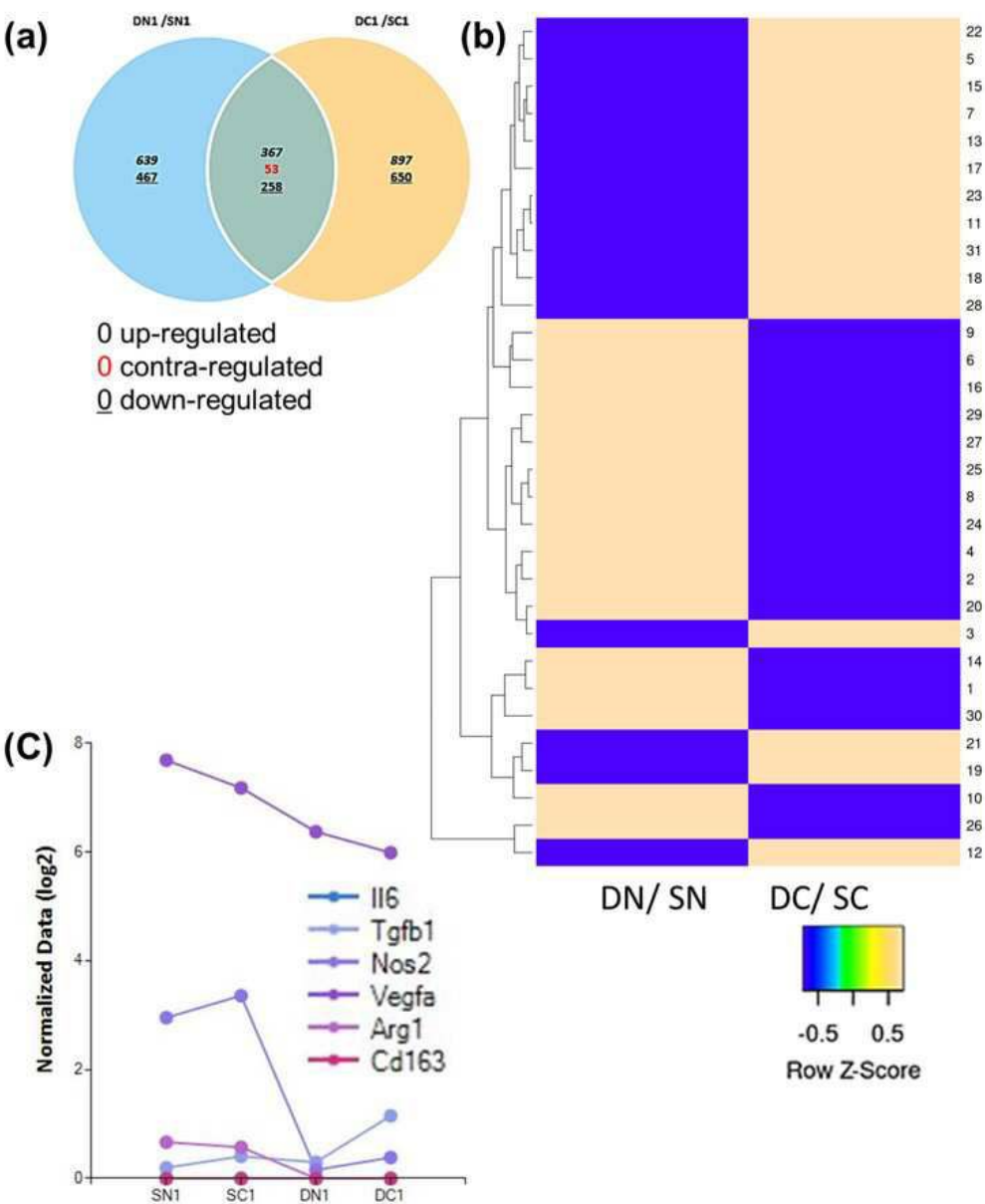
도면7



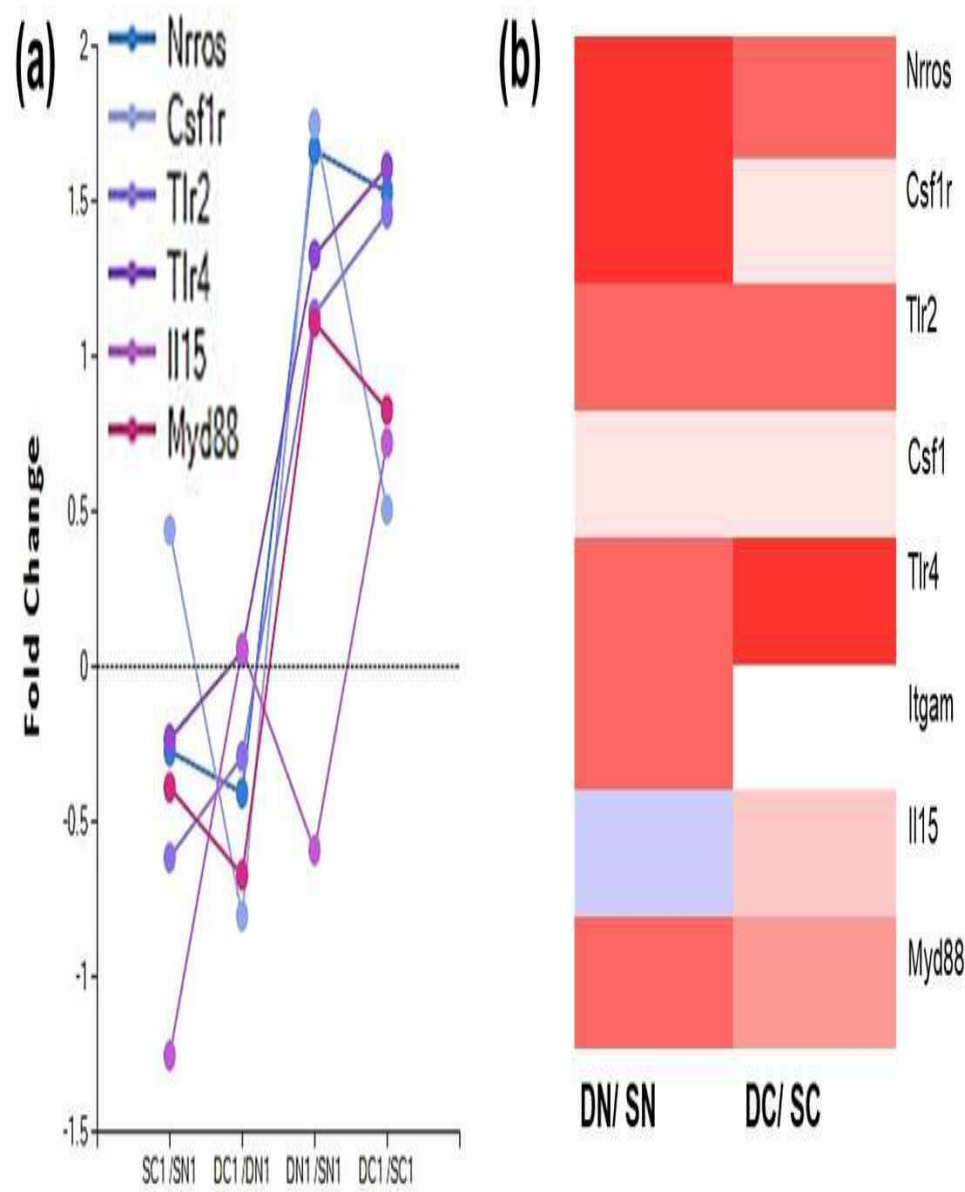
도면8



도면9



도면10



도면11

