

명세서

발명의 명칭: 연골 재생용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법, 및 상기 제조방법을 이용하여 제조된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드

기술분야

- [1] 본 명세서는 2018년 1월 31일에 한국특허청에 제출된 한국 특허 출원 제 10-2018-0012221호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 내용 전부는 본 명세서에 포함된다.
- [2] 본 발명은 연골 재생용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법, 및 상기 제조방법을 이용하여 제조된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis) 또는 골관절증이라고도 한다. 퇴행성관절염은 만성관절염의 하나로, 체중 부하를 많이 받는 관절 연골에서 퇴행성 변화가 일어나 관절면의 뼈가 과잉 성장되어 발생하는 질환이며, 중장년기 성인에게 많이 나타난다. 이 질환은 먼저, 연골 조성 성분을 만들어내는 연골세포가 노화로 인해 기능이 떨어지면서 연골이 탄력성을 잃게 된다. 그리고, 시간이 흐르면서 연골의 표면이 거칠어지고, 관절막으로 싸여진 관절강 내부로 여러 종류의 물질이 유입되어 염증이 생기게 된다. 임상적으로는 반복적인 통증, 관절의 강직감, 관절의 점진적인 운동장애 등이 나타난다. 퇴행성 관절염의 원인은 노화 현상이나 과도한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에게서 더 많이 그리고 더 심하게 나타난다. 초기 증상은 한 개 또는 두 개의 관절이 강직과 함께 쑤시는 듯한 통증이 나타나며, 장기화 되면 연골 하골의 경화, 관절 주변에 골의 과잉형성, 관절의 변형 등을 초래하게 된다.
- [4] 관절연골의 퇴행성 변화의 원인은 아직 규명되어 있지는 않지만, 연골세포 수의 절대적 감소와 연골세포(chondrocytes)에서 일어나는 연골기질 합성과 분해의 불균형이 하나의 원인으로 알려져 있다. 따라서, 관절연골의 퇴행성 변화는 연골기질의 분해로 인하여 연골 강도와 쿠션으로서의 능력이 감소된다.
- [5] 기존 세포 치료제들은 이식된 세포가 중력에 의해 한 방향으로 쏠리기 때문에 결손 부위에 균등하게 분포되기 어려운 단점이 있으며, 세포 생착의 어려움이 있어 연골 결손부의 세포 재생을 감소시킨다. 또한, 자가 연골세포 이식술 및 줄기세포 이식술의 경우엔 조직을 추출한 후 배양과정을 거쳐 환자에게 적용되므로 2번의 수술이 필요하며, 약 4주간의 세포 배양기간 또는 조작을 필요로 한다. 아울러, 이식된 세포가 중력에 의해 결손 부위에 균등하게 분포 및

생각 되기 어렵고, 초자연골의 분화가 아닌 섬유연골로의 분화가 유도되어 추후에 연골이 잘 부서지는 현상이 생기는 문제가 있다. 그러므로, 연골 결손부의 세포 재생을 효과적으로 수행할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] KR 특허 공개 공보 10-2017-0012099

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 결손된 연골 부위의 연골 재생을 위한 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조를 위한 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 제공하고자 한다. 나아가, 상기 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 이용하여, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 실시상태는, 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction), 유리연골(hyaline cartilage) 파우더, 및 피브리노젠을 포함하는 제1 액; 및 트롬빈을 포함하는 제2 액;을 포함하는, 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 제공한다.
- [11] 본 발명의 다른 실시상태는, a) 3D 스캐너를 이용하여, 결손된 연골 부위의 3차원 데이터를 취득하고, 3D 프린터를 이용하여 스캐폴드용 몰드를 제조하는 단계; b) 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction), 유리연골(hyaline cartilage) 파우더, 및 피브리노젠을 포함하는 제1 액을 이용하여 상기 스캐폴드용 몰드 내에 도포하여 제1 층을 형성하는 단계; c) 트롬빈을 포함하는 제2 액을 상기 제1 층 상에 도포하여 제2 층을 형성하는 단계; 및 d) 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 연골 재생용 스캐폴드를 형성하는 단계;를 포함하는, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [12] 본 발명의 또 다른 실시상태는, 상기 제조방법을 이용하여 제조된, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명에 따른 연골 재생용 바이오 잉크 조성물은 환자 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제조할 수 있는 장점이 있다.
- [14] 본 발명에 따른 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 이용하여 제조된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 이식된 지방조직 유래 기질혈관분획의 연골 분화능을 높이고, 나아가 이식 부위에서의 연골 재생을 증가시켜 효과적인 연골 치료가 가능하다.
- [15] 본 발명에 따른 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 환부에 대하여 우수한

접합력을 가지며, 이로 인하여 연골 분화능 및 연골 재생 효과가 우수한 장점이 있다.

- [16] 본 발명에 따른 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법은 수술실에서 환부의 연골 결손부를 3D 스캐닝하여 바로 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제조할 수 있으므로, 한번의 수술 과정을 통하여 스캐폴드를 이식할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 실험에 1의 연골 분화 능력을 확인하기 위한 펠렛의 제조 과정을 도시한 것이다.
- [18] 도 2는 실험에 1에 따른 비교예 1(MCCM 0 mg)의 펠렛에 사프라닌 O 염색을 한 결과를 나타낸 것이다.
- [19] 도 3은 실험에 1에 따른 실시예 1(MCCM 10 mg)의 펠렛에 사프라닌 O 염색을 한 결과를 나타낸 것이다.
- [20] 도 4는 실험에 1에 따른 실시예 2(MCCM 50 mg)의 펠렛에 사프라닌 O 염색을 한 결과를 나타낸 것이다.
- [21] 도 5는 실험에 1에 따른 실시예 3(MCCM 100 mg)의 펠렛에 사프라닌 O 염색을 한 결과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 6은 실험에 2의 연골 재생 여부의 확인을 위한 동물 실험 과정을 도시한 것이다.
- [23] 도 7은 실험에 2에 따른 실시예 4의 동물 실험 과정 중의 이미지 및 스캐폴드 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대한 마이크로 CT 촬영 이미지를 나타낸 것이다.
- [24] 도 8은 실험에 2에 따른 비교예 2의 동물 실험 과정 중의 이미지 및 스캐폴드 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대한 마이크로 CT 촬영 이미지를 나타낸 것이다.
- [25] 도 9는 실험에 2에 따른 비교예 2의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 사프라닌 O 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- [26] 도 10은 실험에 2에 따른 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 사프라닌 O 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- [27] 도 11은 실험에 2에 따른 비교예 2의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 1형 콜라겐(Collagen type 1)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 12는 실험에 2에 따른 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 1형 콜라겐(Collagen type 1)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 13은 실험에 2에 따른 비교예 2의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 2형 콜라겐(Collagen type 2)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 14는 실험에 2에 따른 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 2형 콜라겐(Collagen type 2)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한

결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 명세서에서 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [32] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [33] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [34] 본 발명의 일 실시상태는, 지방조직 유래 기질혈관분획, 유리연골 파우더, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액; 및 트롬빈을 포함하는 제2 액;을 포함하는, 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 제공한다.
- [35] 본 발명에 따른 연골 재생용 바이오 잉크 조성물은 2액형으로서, 상기 제1 액과 상기 제2 액이 순차적으로 도포된 후 반응하여 연골 재생용 스캐폴드가 형성될 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 액 내의 트롬빈과 상기 제1 액 내의 피브리노겐이 반응하여 피브린 네트워크를 형성할 수 있으며, 이는 상기 지방조직 유래 기질혈관분획, 유리 연골 파우더가 충분히 고정되도록 하는 역할을 할 수 있다.
- [36] 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction)은 지방조직 유래 줄기세포(adipose derived stem cells)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획은 지방조직 유래 줄기세포 외의 다른 세포들(예를 들어, 지방세포, 적혈구세포 및 다른 기질세포, 등) 및 세포외 매트릭스 물질을 실질적으로 포함하지 않을 수 있으며, 보다 바람직하게는 다른 세포들 및 세포외 매트릭스 물질을 전혀 포함하지 않을 수 있다.
- [37] 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획은 동종 동물 또는 이종 동물의 지방 조직으로부터 추출된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 지방조직 유래 기질 혈관 분획은 자가 유래 지방 조직으로부터 추출된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획은 시술 대상인 환자 또는 동물의 지방세포를 이용하여 추출된 것일 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 함량은 1 ml의 제1 액 당 10^5 개 내지 10^7 개일 수 있다. 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 함량이 상기 범위 내인 경우, 제조되는 스캐폴드의 연골 분화 능력 및 연골 재생 능력이 크게 향상될 수 있다.
- [39] 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획은 유리연골 파우더와 함께 사용됨으로써, 연골 세포로 분화될 수 있으며, 이로 인하여 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 환부에 이식되는 경우 연골 세포로의 분화가 활발하게 유도될 수 있다.

- [40] 상기 유리연골(hyaline cartilage) 파우더는 상기 연골 재생용 바이오 잉크 조성물을 이용하여 제조된 스캐폴드의 지지체를 구성하는 요소가 될 수 있다. 구체적으로, 상기 피브리노겐과 트롬빈의 반응을 통한 피브린 매트릭스는 상기 유리연골 파우더의 입자들을 서로 결합시킬 수 있다.
- [41] 상기 유리연골 파우더는 동종 또는 이종의 유리연골로부터 유래된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 유리연골 파우더는 동종의 유리연골로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, 연골 시술 대상이 사람인 경우, 사람의 유리연골로부터 추출된 유리연골 파우더를 사용할 수 있다. 또한, 연골 시술 대상이 동물인 경우, 같은 종의 동물의 유리연골로부터 추출된 유리연골 파우더를 사용할 수 있다.
- [42] 상기 유리연골 파우더는 연골 재생 관련 성장인자를 배출하여, 상기 지방조직 유래 기질 혈관분획이 연골 세포로 분화되는 것을 유도할 수 있다. 나아가, 상기 유리연골 파우더에 포함되는 단백질은 환부의 연골 재생이 활발하게 이루어지도록 돕는 역할을 할 수 있다.
- [43] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 유리연골 파우더는 갈비 연골(costal cartilage)로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 적용 대상이 사람인 경우, 상기 유리연골 파우더는 사람의 갈비 연골로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 적용 대상이 동물인 경우, 상기 유리연골 파우더는 대상인 동물과 같은 종의 갈비 연골로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 상기 유리연골 파우더는 시중에 판매되는 동종 이계의 늑골 연골(allogenic costal cartilage)을 파우더화하여 사용할 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 유리연골 파우더의 입경은 30 μm 이상 300 μm 이하일 수 있다. 상기 유리연골 파우더의 평균 입경이 상기 범위 내인 경우 연골 세포의 분화 및 재생이 효과적으로 이루어지는 장점이 있다.
- [45] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 유리연골 파우더의 농도는 0.005 % (w/v) 내지 0.1 % (w/v)일 수 있다. 즉, 상기 유리연골 파우더는 상기 제1 액 1 ml 당 0.005 g 내지 0.1 g으로 포함될 수 있다. 상기 유리연골 파우더의 농도는 바람직하게는 0.005 % (w/v) 내지 0.07 % (w/v), 보다 바람직하게는 0.005 % (w/v) 내지 0.03 % (w/v), 가장 바람직하게는 0.007 % (w/v) 내지 0.03 % (w/v)일 수 있다. 상기 유리연골 파우더의 농도가 상기 범위 내인 경우, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 이식 후, 연골 세포의 생존성, 연골 세포로의 분화 및 모폴로지가 가장 우수하게 구현될 수 있다.
- [46] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 유리연골 파우더 5 mg 내지 100 mg에 대하여, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획의 개수는 10^5 내지 10^7 개일 수 있다. 바람직하게는, 상기 유리연골 파우더 5 mg 내지 70 mg에 대하여, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획의 개수는 10^5 내지 10^7 개일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 유리연골 파우더 5 mg 내지 30 mg에 대하여, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획의

- 개수는 10^5 내지 10^7 개일 수 있다.
- [47] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액은 아프로티닌을 더 포함할 수 있다. 상기 아프로티닌(aprotinin)은 췌장에서 분비되는 프로틴분해효소의 억제제로서, 총 58 개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다. 주로 소의 폐에서 추출되며 혈액 속에서는 피브리노겐의 분해를 저지하여, 지혈작용을 하는 것으로 알려져 있다.
- [48] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 피브리노겐은 1 ml의 제1 액 당 65 mg 내지 115 mg으로 포함될 수 있다.
- [49] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 아프로티닌은 1 ml의 제1 액 당 900 KIU 내지 1,100 KIU(kininogen Inactivator Unit), 구체적으로 1000 KIU로 포함될 수 있다.
- [50] 구체적으로, 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액은 1 ml 당, 10^5 내지 10^7 개의 지방조직 유래 기질혈관분획, 5 mg 내지 100 mg의 유리연골 파우더, 65 mg 내지 115 mg의 피브리노겐 및 900 KIU 내지 1,100 KIU의 아프로티닌을 포함할 수 있다.
- [51] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제2 액은 염화칼슘 용액 내에 트롬빈이 분산된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 액은 1 ml 당, 400 IU 내지 600 IU의 트롬빈, 5 mg 내지 6.5 mg의 염화칼슘을 포함할 수 있다.
- [52] 상기 제1 액 및 제2 액의 용매는 물, 구체적으로는 생리식염수일 수 있다. 또한, 상기 제1 액 내의 피브리노겐과 상기 제2 액 내의 트롬빈은 상용의 피브린 글루 키트를 통하여 입수할 수 있다.
- [53] 상기 제1 액과 제2 액은 10분 이내, 바람직하게는 5분 이내에 반응이 완료되므로, 상기 연골 재생용 바이오 잉크 조성물은 시술 현장에서 3D 프린터를 이용하여 환자 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 즉석에서 제조할 수 있는 장점이 있다.
- [54] 본 발명은 피브리노겐 및 피브린으로 구성되는 피브린 글루를 접착제로 사용하며, 이는 히알루론산 접착제 또는 콜라겐 접착제보다 높은 점성을 확보할 수 있으므로, 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 환부와의 우수한 접착력을 가지고, 나아가 높은 강도를 유지할 수 있다.
- [55] 본 발명의 다른 실시상태는, a) 3D 스캐너를 이용하여, 결손된 연골 부위의 3차원 데이터를 취득하고, 3D 프린터를 이용하여 스캐폴드용 몰드를 제조하는 단계; b) 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction), 유리연골(hyaline cartilage) 파우더, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액을 이용하여 상기 스캐폴드용 몰드 내에 도포하여 제1 층을 형성하는 단계; c) 트롬빈을 포함하는 제2 액을 상기 제1 층 상에 도포하여 제2 층을 형성하는 단계; 및 d) 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 연골 재생용 스캐폴드를 형성하는 단계;를 포함하는, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [56] a) 단계는 당업계에서 알려진 3D 스캐너 장비 및 3D 프린트 장비를 이용할 수

- 있다. 또한, 상기 스캐폴드용 몰드는 상기 제1 액 및 제2 액의 도포시 입체적 형태를 고정할 수 있도록 하는 역할을 할 수 있다. 상기 스캐폴드용 몰드는 상기 연골 재생용 스캐폴드 형성 후 제거될 수 있다. 상기 스캐폴드용 몰드는 당 업계에서 일반적으로 사용되는 생체 적합성 고분자를 이용하여 형성될 수 있다.
- [57] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, b) 단계 및 c) 단계는 잉크젯 프린팅 또는 3D 프린팅을 이용하여 수행될 수 있다. 구체적으로, b) 단계 및 c) 단계는 당업계에서 알려진 2 이상의 노즐을 가지는 프린팅 장치를 이용할 수 있으며, 각각의 노즐에서 상기 제1 액 및 제2 액을 각각 토출하여 입체 형상을 만들 수 있다.
- [58] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, b) 단계 및 c) 단계는 2회 이상 교대로 반복 수행될 수 있다. 구체적으로, 부피가 큰 연골 재생용 스캐폴드의 형성이 필요한 경우, b) 단계 및 c) 단계가 교대로 수행되어, "제1 층/제2 층/제1 층/제2 층"과 같이 적층된 후 응고하여 연골 재생용 스캐폴드가 형성될 수 있다.
- [59] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, d) 단계는 10분 이내에 완료될 수 있으며, 바람직하게는 5분 이내에 완료될 수 있다. 구체적으로, d) 단계는 3분 내지 7분 동안 반응하여 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 연골 재생용 스캐폴드를 형성하는 것일 수 있다.
- [60] 기존의 자가 연골세포 이식술 및 줄기세포 이식술의 경우, 환자의 결손된 연골 영역의 조직을 추출하기 위하여 환부를 1차 절개한 후, 상기 조직의 배양 과정을 거쳐 환부에 이식하기 위한 2차 절개가 필요하여 2번의 수술과정이 필요한 문제가 있었다. 이에 반하여, 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법은 1차 절개를 통하여 결손된 연골 영역을 확인한 후, 단시간 내에 결손된 연골 영역에 대응하는 스캐폴드를 제조하여 결손된 연골 영역에 이식할 수 있는 장점이 있다. 즉, 본 발명에 따른 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드의 제조방법은 1회의 절개만으로 환부에 맞춤형 스캐폴드를 이식할 수 있는 장점이 있다.
- [61] 본 발명의 또 다른 실시상태는, 상기 제조방법을 이용하여 제조된, 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제공한다.
- [62] 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 전술한 바와 같이, 단시간 내에 결손된 연골 영역에 대응하는 형상으로 제조되어 이식될 수 있다. 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 세포를 위한 배양과정을 필요로 하지 않으며, 이식 후 상기 스캐폴드 내의 지방조직 유래 기질혈관분획은 연골 세포로 분화되며, 유리연골 파우더는 연골의 재생을 활성화시키고, 재생된 연골 세포의 생존율을 높일 수 있다.
- [63] 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드는 환부에 이식되는 경우, 상기 유리연골 파우더로부터 분비되는 초자연골(유리연골) 성장 인자 및 단백질에 의하여 연골(구체적으로는 무릎 연골) 본연의 초자연골이 재생되도록 유도할 수 있다. 이를 통하여, 상기 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드가 환부에 적용되는 경우, 효과적으로 기존의 연골과 동일 또는 유사한 상태로 회복이 될 수 있다.
- [64] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게

설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

- [65] **지방조직 유래 기질혈관분획(SVF) 세포의 분리**
- [66] 지방조직 유래 기질혈관 분획(SVF) 세포는 하기 단계를 통하여 획득하였다.
- [67] 1. 무균 수술실에서 의사의 주도하에 지방흡입술을 실시하여 약 60 cc의 지방 조직을 추출하고, 이와 동일한 양으로 0.075 %의 콜라게나아제 지질 파지(collagenase Lipid phase)를 첨가하고, 이를 37 °C의 온도에서 230 rpm의 Shaking incubation으로 30 분 동안 반응시켰다.
- [68] 2. 상기와 같이 반응 후, 420 g의 반응물을 25 °C에서 10분간 원심분리를 하였으며, 원심 분리 결과 SVF 펠렛층, 콜라게나아제층 및 오일층의 3층으로 구분되었다.
- [69] 3. SVF 펠렛층을 제외한 상부액을 제거하고, SVF 펠렛층을 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 재현탁한 후, 100 μ m의 나일론 필터(Cell strainer)를 이용하여 재현탁한 SVF층의 섬유질과 남아있는 불순물을 제거하였다.
- [70] 4. 필터링된 SVF를 포함하는 용액을 재현탁하며 3회 원심분리를 한 후, 최하층의 펠렛만 남기고 제거한 후, Cell counter를 이용하여 nucleus cell을 계산한 결과, 10^5 개 내지 10^7 개의 SVF가 획득된 것을 확인할 수 있었다.
- [71] **유리연골 파우더의 제조**
- [72] 유리연골 파우더는 시중에서 입수할 수 있는 갈비 연골(Costal cartilage)을 이용하여, 30 μ m 내지 300 μ m 입자 크기를 가지는 파우더로 제조하였다. 이하, 상기 유리연골 파우더는 MCCM(micronized costal cartilage matrix)로 지칭한다.
- [73] **실험예 1 - 연골 형성 분화(Chondrogenesis Differentiation) 여부의 확인을 위한 펠렛 제조 (In vitro 실험)**
- [74] [실시예 1 내지 실시예 3]
- [75] 도 1은 연골 분화 능력을 확인하기 위한 펠렛의 제조 과정을 도시하였다. 구체적으로, 연골 분화 능력을 확인하기 위한 실험은 하기와 같이 실시하였다.
- [76] 1. 상기 획득된 SVF(10^5 개 내지 10^7 개)를 상기 제조된 유리연골 파우더(MCCM) 10 mg(실시예 1), 50 mg(실시예 2) 및 100 mg(실시예 3)가 분산된 생리 식염수와 혼합하였다.
- [77] 2. 상기 혼합액을 4 °C에서 5 분간 1000 rpm으로 원심분리한 후, 생리 식염수 상층액을 제거하여 MCCM/SVF 혼합물을 획득하였다.
- [78] 3. MCCM/SVF 혼합물을 피브리노겐이 혼합된 아프로티닌액 1 ml와 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합하였다.
- [79] 4. MCCM/SVF/피브리노겐 용액 1 ml와 트롬빈이 분산된 염화칼슘 용액 1 ml를 각각 Y자 피스에 연결하고, 15 ml 원뿔형 튜브(conical tube)에 각각 200 μ l씩 분주하여, 상온에서 5분 동안 굳혀 펠렛을 형성하였다.

- [80] 5. 펠렛이 충분히 잠길 정도로 생장인자 유리 배지(Growth factor free media)를 일주일 3회 교체 투여하고, 37 °C, 5% CO₂의 조건에서 5 주간 인큐베이팅한 후, 사프라닌 O 염색을 실시하여 연골 형성 분화를 확인하였다.
- [81] **[비교예 1]**
- [82] MCCM 없이 SVF만을 피브리노겐이 혼합된 아프로티닌액과 혼합(MCCM 0 mg, 비교예 1)하여, 상기와 같은 방법으로 펠렛을 형성하고 인큐베이팅한 후, 사프라닌 O 염색을 실시하여 연골 형성 분화를 확인하였다.
- [83] 도 2 내지 도 5는 각각 비교예 1(MCCM 0 mg), 실시예 1(MCCM 10 mg), 실시예 2(MCCM 50 mg), 및 실시예 3(MCCM 100 mg)에 따른 펠렛에 사프라닌 O 염색을 한 결과를 나타낸 것이다. 도 2 내지 도 5에 있어서, 사프라닌 O 염색에 따라 연골 부분 및 MCCM은 붉은색으로 염색이 되었으며, 실시예 1 내지 3의 MCCM 주변에 연골 세포의 핵이 관찰되는 것을 확인할 수 있었으며, 다수의 살아있는 연골 세포가 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 다만, MCCM을 사용하지 않은 비교예 1의 경우에는 연골 세포가 분화된 것을 확인할 수 없었다. 상기 결과를 통하여, MCCM의 단백질 및 생장인자 등이 방출되며 SVF의 연골 세포로의 분화를 유도한 것으로 유추될 수 있다. 나아가, MCCM의 함량과 관련하여, 실시예 1(MCCM 10 mg)이 실시예 2 및 실시예 3에 비하여, 연골 세포의 생존성 및 연골 세포로의 분화가 가장 활발히 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 즉, MCCM의 함량이 지나치게 많은 경우, 연골 세포로 분화할 수 있는 공간이 적어지기 때문에 연골 세포로의 분화가 더디게 되는 것으로 판단된다.
- [84] **실험예 2 - 연골 재생(Cartilage Regeneration) 여부의 확인을 위한 동물 실험(In vivo 실험)**
- [85] **[실시예 4]**
- [86] 도 6은 연골 재생 여부의 확인을 위한 동물 실험 과정을 도시하였다. 구체적으로, 연골 재생 여부의 확인을 위한 동물 실험은 하기와 같이 진행되었다.
- [87] 1. 상기 수득된 SVF(10⁵ 개 내지 10⁷ 개)를 상기 제조된 유리연골 파우더(MCCM) 10 mg이 분산된 생리 식염수와 혼합하였다.
- [88] 2. 상기 혼합액을 4 °C에서 5 분간 1000 rpm으로 원심분리한 후, 생리 식염수 상층액을 제거하여 MCCM/SVF 혼합물을 수득하였다.
- [89] 3. MCCM/SVF 혼합물을 피브리노겐이 혼합된 아프로티닌액 1 ml와 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합하였다.
- [90] 4. MCCM/SVF/피브리노겐 용액 1 ml와 트롬빈이 분산된 염화칼슘 용액 1 ml를 각각 준비하였다.
- [91] 5. 실험용 비글의 무릎 대퇴부 관절구를 노출시키고, 여기에 지름 약 6 mm, 깊이 약 2 mm 크기의 결함(defect) 영역을 형성하였다.
- [92] 6. 스캐폴드용 몰드를 제조하기 위하여, 3D 스캐너를 이용하여 실험용 비글의 절손된 연골 부위의 3차원 데이터를 수득하고, 이를 기초로 3D Bio 3D

프린터(INVIVO, ROKIT)를 사용하여 의료 등급의 PCL(polycaprolactone) 외벽을 출력하였다. 나아가, MCCM/SVF/피브리노젠 용액과 트롬빈이 분산된 염화칼슘 용액을 각각 3D Bio 3D 프린터(INVIVO, ROKIT)를 이용하여 상기 스캐폴드용 몰드 내에 순차적으로 도포한 후 5분 간 굳혀 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 제조하였다.

[93] 7. 실험용 비글의 결함 영역에 피브린 글루(베리플라스트)를 100 μ l를 주입하고, 제조된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 이식한 후 수술 부위를 봉합하였다.

[94] 8. 6주 후, 이식된 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드 내에 연골 세포가 형성되는지 확인하였다.

[95] [비교예 2]

[96] MCCM 없이 SVF만을 피브리노젠이 혼합된 아프로티닌액과 혼합하여, 상기와 같은 방법으로 동물 실험을 진행하였다.

[97] 도 7 및 도 8은 각각 실험예 2에 따른 실시예 4 및 비교예 2의 동물 실험 과정 중의 이미지 및 스캐폴드 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대한 마이크로 CT 촬영 이미지를 나타내었다. 도 7 및 8에 있어서, 실시예 4에 따른 마이크로 CT 촬영 결과는 비교예 2에 따른 마이크로 CT 촬영 결과에 비하여 매우 높은 골밀도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여, MCCM을 이용한 실시예 4의 경우 높은 연골 생성 능력이 있음을 확인할 수 있다.

[98] 도 9 및 도 10은 각각 실험예 2에 따른 비교예 2 및 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에 대하여, 사프란인 O 염색한 결과를 나타낸 것이다. 사프란인 O 염색 결과, 실시예 4의 경우만이 결함 영역의 연골이 재생되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 도 10의 화살표 표시된 부분의 붉게 발현된 볼륨이 생긴 부분으로 확인할 수 있다. 나아가, 도 9에서의 붉게 발현된 부분은 결함 영역을 제작했을 때 정상 연골이 남아있는 부분에 불과한 영역이다.

[99] 도 11 및 도 12는 각각 실험예 2에 따른 비교예 2 및 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에서의 연골 재생이 어떠한 종류의 연골로 재생이 되는지 확인하기 위하여, 1형 콜라겐(Collagen type 1)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한 결과를 나타낸 것이다. 상기 1형 콜라겐은 섬유 연골(fibro-cartilage)의 확인을 위한 항체(antibody)가 결합된 것으로서, 섬유 연골만을 검출하여 갈색으로 발현시키는 역할을 한다. 도 12에 따르면, 결함 영역에서 재생된 부분이 푸른색으로 발현되는 것을 확인할 수 있으며, 이는 재생된 연골이 섬유 연골이 아닌 유리연골로서 결함 영역에 적합한 연골 세포로 재생된 것임을 알 수 있다. 이에 반하여, 도 11의 경우 유리연골로 분화된 영역을 확인할 수 없었다.

[100] 도 13 및 도 14는 각각 실험예 2에 따른 비교예 2 및 실시예 4의 이식 후 6 주 후의 결함 영역에서의 연골 재생이 어떠한 종류의 연골로 재생이 되는지 확인하기 위하여, 2형 콜라겐(Collagen type 2)으로 면역 화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) 처리한 결과를 나타낸 것이다. 상기 2형

콜라겐은 유리연골(hyaline cartilage)의 확인을 위한 항체(antibody)가 결합된 것으로서, 유리연골만을 검출하여 갈색으로 발현시키는 역할을 한다. 도 14에 따르면, 결합 영역에서 재생된 부분이 갈색으로 발현되는 것을 확인할 수 있으며, 이는 재생된 연골이 섬유 연골이 아닌 유리연골로서 결합 영역에 적합한 연골 세포로 재생된 것임을 알 수 있다. 이에 반하여, 도 13의 경우 유리연골로 분화된 영역을 확인할 수 없었다.

- [101] 상기 실시예 및 비교예의 결과를 통하여, 실시예와 같이 지방조직 유래 기질혈관분획과 유리연골 파우더를 동시에 사용한 본 발명에 따른 맞춤형 연골 재생용 스캐폴드를 이식하는 경우, 연골 세포로의 분화가 효과적으로 이루어지고, 나아가 연골 세포의 확산 및 재생이 향상되는 것을 확인할 수 있다.