

11-1543
000-002
116-01

발간등록번호

11-1543000-002116-01

오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화 최종보고서

2017. 10. 14.

주관연구기관 / 세원셀론텍(주)

협동연구기관 / 전북대학교

협동연구기관 / 한림대학교

위탁연구기관 / 카톨릭대학교

농림축산식품부

Commercialization and development of biomaterial utilizing
collagen derived from duck feet R&D Report

오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료
개발 및 상용화 최종보고서

2017

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화”

(개발기간 : 2014. 10. 15. ~ 2017. 10. 14.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 10. 14.

주관연구기관명 : 세원셀론텍(주)	(대표자) 서 동 삼 (인)
협동연구기관명 : 전북대학교	(대표자) 송 정 은 (인)
협동연구기관명 : 한림대학교	(대표자) 이 옥 주 (인)
위탁연구기관명 : 카톨릭대학교	(대표자) 권 순 용 (인)

주관연구책임자 : 서 동 삼

협동연구책임자 : 송 정 은

협동연구책임자 : 이 옥 주

위탁연구책임자 : 권 순 용

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	814005-03	해당단계 연구기간	2016. 10. 15. ~ 2017. 10. 14.	단계구분	(3)/(3)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대과제명	오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화			
	세부과제명	1세부: 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용한 의료용 원료 개발 1협동: 오리발 유래 콜라겐 바이오백과 근골격계용 의료용 생체재료 개발 2협동: 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체재료 개발			
연구책임자	서동삼	해당단계 참여 연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:200,000천원 계:500,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 34명 내부: 34명 외부: 0명	총연구개발비	정부:900,000천원 민간:600,000천원 계:1,500,000천원
연구기관명 및 소속부서명	1세부: 세원셀론텍(주) 1협동: 전북대학교 2협동: 한림대학교			참여기업명: 세원셀론텍(주)	
위탁연구	연구기관명: 카톨릭대학교			연구책임자: 권순용	
<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 분리 공정 확립 및 대량 생산 체계 구축 • 오리발 콜라겐 특성 확인(물리적, 화학적, 생물학적 특성) • 오리발 콜라겐 상용화 • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 천연/HAp 생체소재원천기술 개발 및 생체적합성과 효능평가 • 뼈재생 유도를 위한 최적 환경 조건 확립 및 동물 모델 확립 • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 고막 재생용 지지체, 연부 조직 대체재 및 지혈제 개발 • 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 및 효능 평가 				보고서 면수: 206 page	

- 국문 요약문 -

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>1. 연구의 목적 최종 목적: 오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화</p> <p>1) 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용한 의료용원료 개발</p> <p>2) 오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근골격계용 의료용 생체재료 개발</p> <p>3) 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체재료 개발</p> <p>2. 연구의 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> • 오리발 유래 고순도 콜라겐 대량 생산 체계 확립 및 생산 설비 구축 • 오리발 유래 콜라겐 원료화 • 오리발 유래 의료용 콜라겐 생체 소재 기술 및 콜라겐 지지체 개발 • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 생체 재료의 안전성/유효성 평가 및 시제품 제작 • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 인공고막, 연부조직 대체재, 지혈제 개발 • 오리발 콜라겐 유래 생체 재료 대량 생산 및 시제품 개발 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 분리 공정 확립 및 대량 생산 체계 구축 • 오리발 콜라겐의 특성 확인(물리적, 화학적, 생물학적 특성 분석) • 오리발 콜라겐 상용화(국제 화장품 원료집 등재, 원료 의약품 등재, 원료 상용화) • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 천연/HAp 생체소재원천기술 개발 및 생체 적합성과 효능평가 • 뼈재생 유도를 위한 최적 환경 조건 확립 및 동물 모델 확립(시제품 제작) • 오리발 유래 콜라겐을 이용한 고막 재생용 지지체, 연부 조직 대체재 및 지혈제 개발 • 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 평가 및 효능 평가 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발로부터 콜라겐을 분리하는 대량 생산 체계를 국내 최초로 달성하였기 때문에 콜라겐을 이용하는 모든 산업에 적용 및 상용화가 가능하게 되었음 • 특히 응용 가능한 분야인 ‘연구’, ‘식품’, ‘건강기능식품’, ‘화장품’ 산업에 공급 예정임 • 또한 지속적인 연구를 통해 이비인후과, 정형외과 그리고 조직공학/재생의학 분야에서 사용가능한 의료기기를 개발하여 상용화할 예정임 					
중심어 (5개 이내)	오리발	콜라겐	골대체재	고막	조직공학	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>1. Purpose of Study</p> <p>Purpose: Development and commercialization of biomaterial using collagen derived from duck feet</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Mass production of high-purity collagen derived from duck feet and development of medical raw materials using it 2) Development of collagen bio-bone and musculoskeletal biomaterial from duck feet 3) Development of medical biomaterial for otolaryngology using collagen derived from duck feet <p>2. Contents of the Study</p> <ul style="list-style-type: none"> • Establishment of mass production system of high-purity collagen derived from duck feet and construction of production facility • Commercialization of collagen derived from duck feet • Development of medical collagen biomaterials and scaffolds derived from duck feet • Safety / efficiency evaluation and prototype biomaterial production using collagen derived from duck feet • Development of artificial tympanic membrane, soft tissue substitute, and hemostatic agent using collagen derived from duck feet • Mass production of collagen-based biomaterials and prototype development 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> • Establishment of collagen extraction process and mass production system • Characterization of collagen properties (physical, chemical and biological property) • Commercialization of collagen derived from duck feet (registration of International Cosmetic Ingredient Dictionary, registration of Drug Master File, commercialization of raw material) • Development of natural / HAp biomaterials using collagen derived from duck feet and evaluation of biocompatibility and efficiency • Establishment of optimal environmental condition for induction of bone regeneration and establishment of animal model (prototype production) • Development of artificial tympanic membrane, soft tissue substitute, and hemostatic agent using collagen derived from duck feet • Evaluation of biocompatibility and efficiency of collagen biomaterial 		

	derived from duck feet				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> • We achieved the first mass production system that extracts collagen from duck feet, so we can commercialize the industry using collagen. • Especially, we will utilize it in research, food, health functional food, cosmetics industry. • We will also continue to develop and commercialize medical devices that can be used in otorhinolaryngology, orthopedics, and tissue engineering / regenerative medicine fields. 				
Keywords	Duck feet	Collagen	Bone substitute	tympanic membrane	Tissue engineering

< Contents >

1. Chapter 1 Outline of Research and Development	9
2. Chapter 2 Domestic and overseas technology development status	16
3. Chapter 3 Research Contents and Results	28
4. Chapter 4 Achievement and Contributions	186
5. Chapter 5 Future Use of Results	190
6. Chapter 6 Technology Informations Collected Abroad	191
7. Chapter 7 Security level of Results	193
8. Chapter 8 Research facilities registered in the N.T.I.S.	194
9. Chapter 9 Implementation of safety measures in laboratories	195
10. Chapter 10 Primary Research Results	198
11. Chapter 11 Others	200
12. Chapter 12 References	201

〈 목 차 〉

1. 제1장 연구개발과제의개요	9
2. 제2장 국내외 기술개발 현황	16
3. 제3장 연구수행 내용 및 결과	28
4. 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	186
5. 제5장 연구결과의 활용계획 등	190
6. 제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	191
7. 제7장 연구개발성과의 보안등급	193
8. 제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	194
9. 제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	195
10. 제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	198
11. 제11장 기타사항	200
12. 제12장 참고문헌	201

제1장. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 최종 목적: 오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화
 - 오리발 유래 콜라겐을 이용한 근골격계용 및 이비인후과용등의 의료용 치료재 개발
 - 오리발 유래 고순도 콜라겐 대량 생산체계 확립, 이식재료 소재화
- 세부별 최종 목적
 - 가. 1세부: 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용한 의료용 원료 개발
 - 오리발 유래 고순도 콜라겐 대량 생산 체계 확립 및 생산 설비 구축
 - 오리발 유래 콜라겐 원료화
 - 나. 1협동: 오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근골격계용 의료용 생체 재료 개발
 - 오리발 유래 의료용 콜라겐 생체 소재 기술 및 콜라겐 지지체 개발
 - 오리발 유래 콜라겐을 이용한 생체 재료의 안전성/유효성 평가 및 시제품 제작
 - 다. 2협동: 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발
 - 오리발 유래 콜라겐을 이용한 인공고막, 연부조직 대체재, 지혈제 개발
 - 오리발 콜라겐 유래 생체 재료 대량 생산 및 시제품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

○ 오리 농가의 현황 및 도축 폐기물의 처리

가. 오리 농가의 현황

- 한국오리협회에서 발표한 자료에 따르면 오리의 사육 수는 AI 피해로 인해 2014년에 사육수가 급감하였으나, 2015년 피해 복구 이 후 사육수가 전년대비 41% 증가함(표 1)

표 1. 최근 3년간 오리 사육수(단위: 천 마리, 천 가구, %).

구 분		2013	2014	2015	증 감	전년도
오 리	총 마릿수	10,899	6,089	10,798	+3117	+41
	1) 종 오 리	1,064	709	830	+108	+15
	2) 육용오리	9,835	5,380	9,968	+3008	+43
	사육 가구 수(가구)	866	549	772	+191	+33

(출처 : 한국오리협회)

- 우리나라의 오리고기 자급율은 95% 이상으로 국내생산이 절대적인 비중을 차지하고 있으나, 소비가 꾸준히 증가(2014년, AI 피해 제외)하면서 수입량도 증가하고 있는 추세임 (표 2)

표 2. 오리고기 수급동향(단위: 톤).

		2009	2010	2011	2012	2013	2014
공급	생산	104,639	118,891	154,514	169,568	158,303	95,393
	수입	452	2,137	4,333	3,654	2,981	2,904
	계	105,091	121,028	158,847	173,222	161,284	98,297
수요	소비	104,198	114,836	148,514	165,454	154,610	97,532
	수출	893	6,192	10,333	7,768	6,674	765
	계	105,091	121,028	158,847	173,222	161,284	98,297
1인당 소비(kg)		2.1	2.4	3.1	3.4	3.2	1.9

(출처: 한국오리협회, 농수산식품수출지원정보)

- 2011년 오리고기 수입량 1,113톤 중에서 대만산은 전체 수입량의 97.2%인 1,082톤이었으며, 그 외 미국과 프랑스산이 소량 수입됨(표 3)

표 3. 국가별 오리고기 수입량 및 점유율(단위: 톤).

	대만		미국		프랑스		전체	
	수입량	점유율	수입량	점유율	수입량	점유율	수입량	점유율
2009	76	79.8%	9	9.8%	9	9.4%	96	100%
2010	320	87.9%	9	2.6%	15	4.2%	365	100%
2011	1,082	97.2%	14	1.3%	17	1.5%	1,113	100%

(출처 : 한국농수산물유통공사)

- 2011년 하반기부터 오리산지 가격은 생산비 이하에서 형성되었으며, 냉동비축물량 및 오리고기 생산량이 많아 이 문제가 단기간에 해결되기는 어려운 상황임. 한·중국 FTA 타결로 인해 국내 오리농장은 전멸 할 것으로 예측됨
- 오리 및 농축산물의 경우 한·중국 FTA 타결로 인해 치명적인 타격이 불가피함. 이에 고부가가치 산업을 빠른 시간 내에 개발해야할 절대적인 위기 상황임

나. 도축 폐기물의 처리

- 동물성 폐기물은 소, 돼지, 닭, 오리 등 가축을 도축 또는 도계하는 과정과 육가공 공장에서 발생하는 동물의 가죽, 내장, 지방, 피, 털 등의 가축 폐기물과 수산물 도소매업, 수산물 가공공장 등에서 발생하는 생선 머리, 내장, 뼈, 비늘 등의 수산물 폐기물을 통칭하여 부르는 것을 의미함
- 네오너지에서 발표한 도축폐기물문제 자료에서 일일 평균폐기물 발생량은 319,923톤으로 이들은 재활용하거나 매립, 소각 및 해양배출 됨. 이중 재활용이 86.6%, 매립이 8.0%, 소각 5.4%, 해양배출이 3.0%임. 매립이 8%로 비교적 높은 비율을 차지하고 있는데 매립시 악취 발생, 지하수 오염, 해충 번식등 문제점이 따름(그림 1, 2)



그림 1. 폐기물 발생량(출처: 네오너지).



그림 2. 도축폐기물 문제 현황.

- 2005년 1월부터 유기성폐기물의 직매립을 법적으로 전면금지함으로써 도축 폐기물의 재활용 처리에 대한 집중 연구가 필요함
- 특히 오리부산물인 오리발 경우 개 사육농가에 의해 수거되거나 도축양이 많은 경우 대부분이 폐기물로 버려지고 있음(그림 3)

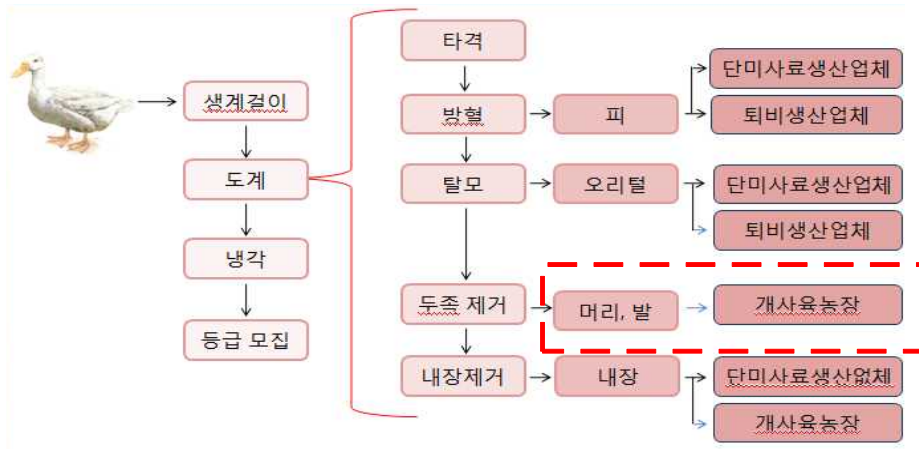


그림 3. 오리류 부산물 발생 및 처리과정.

- 또한 오리발의 경우 뼈 및 기타 주변 조직의 가공이 어려워 막대한 양이 동물 사료로 버려지고 있어 환경오염이 심각하고, 이를 이용한 고부가가치 산업 개발이 절실함
- 이에 대해 본 연구팀의 오리부산물에 대한 고부가가치 생체 소재개발 연구 중, 버려지는 오리발에서 대량으로 콜라겐추출 방법을 개발함
- 본 연구팀의 공정으로, 오리발 1 kg당 17.5 g의 콜라겐추출 가능 하므로, 연간 버려지는 13만 7,964톤 오리발에서 2,415톤의 콜라겐을 추출할 수 있음
- 현재 시판되는 의료용 콜라겐이 1 g당 40만원임을 가정하면 상징적으로 966조원이라는 천문학적인 부가가치를 얻을 수 있음. 이는 무에서 유를 창출하여 농촌의 수익에 큰 기여를 할 수 있는 고부가가치 사업이 될 것임

○ 콜라겐 연구의 필요성

가. 콜라겐의 인체 구성

- 콜라겐은 몸속에서 세포와 세포가 떨어지지 않도록 접착제 같은 역할을 하는 단백질로 우리 몸을 구성하는 단백질 중 무려 1/3을 차지하는 중요한 성분임
- 콜라겐은 눈의 각막, 결막의 주성분이며, 이의 상아질의 18%, 잇몸이나 치근막도 주로 콜라겐으로 되어있음. 피부표피 아래 있는 진피의 70%는 콜라겐이고, 관절에선 연골의 50%, 뼈의 유기물 중 80%가 콜라겐임. 마지막으로 힘줄에서는 뼈와 근육을 이어주는 힘줄의 80%가 콜라겐임
- 이 사실에 주목하여 콜라겐 단백질 모방체를 만들어 인공뼈, 인공각막, 인공피부 및 인공혈관을 만들려는 연구가 과거부터 지속되고 있음
- 인간에서 발견된 콜라겐은 22종 이상이며, 그 중 중요한 콜라겐을 표 4.에 표기하였음

표 4. 인간에서 발견된 콜라겐의 종류와 그 기능.

콜라겐 분류	기능
Type I	섬유형 콜라겐이며 가장 많이 존재하는 콜라겐 피부의 진피에 존재하며, 피부 탄력 형성 기능이 있음
Type III	I형 콜라겐이 존재하는 조직에 III형 콜라겐도 공존함 상처 치유 과정의 초기 단계에서 증식하며 I형 콜라겐을 대체함으로 치유되는 것으로 알려져 있음. 최근 아기 피부에 많이 존재하는 것으로 알려짐
Type V	섬유형 콜라겐으로 I형, III형 콜라겐이 들어있는 조직에 소량 포함되어있음
Type VI	미세한 섬유(마이크로 피브릴) 성분이 존재함. 미세한 섬유는 콜라겐의 가는 섬유와 다른 섬유구조이며, 직경 13 nm 정도로 세포외 기질에 존재함
Type VII	점착성 섬유 형태로 기저세포의 헤미데스모솜과 진피내의 콜라겐 층과 연결하여 두 조직의 결합력을 강화, 유지시켜주는 역할을 함

나. 새로운 콜라겐 추출원 발굴의 필요성

① 새로운 대체원으로 고순도 오리발 유래 콜라겐의 필요성

- 지금까지는 소나 돼지에서 얻어진 콜라겐이 주로 이용되어 왔지만, 소 광우병의 발병 이후로 어류나 기타 가축에서 유래하는 콜라겐이 주목을 받아 화장품이나 건강식품의 원료로서 이용이 검토되고 있음. 이는 사람으로부터 진화적으로 멀리 떨어져 있는 하등척추동물인 어류나 기타 가축에서 사람과 공통되는 감염증이 비교적 발견되어 있지 않아 소나 돼지의 콜라겐에 비하여 안전성이 높기 때문임
- 오리 유래 콜라겐 등의 생체 재료를 이용한 인공장기의 생산은 현재 사회적 문제로 대두되고 있는 뇌사자에 의한 장기기증 부족과 인간 및 동물복제에 의한 장기 공급의 윤리적인 문제를 해결할 수 있는 유일한 대안임
- 그러나 생체친화성이 떨어져 생체 소재로의 개발은 한계가 있음. 따라서 지속적인 연구 개발과 투자, 상업화가 필요한 분야임

② 종교적 신념으로 인한 새로운 콜라겐원의 필요성

- 소/돼지 동물 유래의 원료나 제품은 종교적인 신념이나 관습 등으로 기피하거나 수출이 불가능한 국가가 있으므로 이를 고려해야 함
- 소/돼지 동물 유래의 원료나 제품을 수출하는데 제한되는 종교와 금기동물 그리고 해당 되는 국가는 표 5.와 같음

표 5. 종교에 따른 금기동물과 해당국.

종교	금기동물	해당국
힌두교	소	인도, 네팔, 방글라데시 등
이슬람교	돼지	사우디아라비아, 아랍에미레이트, 쿠웨이트, 이란, 이라크, 레바논, 카타르 등
유대교		이스라엘

- 이슬람교 국가인 사우디아라비아의 경우는 기본 법률표준으로 EU 표준을 밀접하게 준용하고 있지만, 이슬람 법률을 준수함에 있어 EU 표준보다 상위개념으로 두어 법규를 운용하고 있음. 특히, 사우디아라비아 화장품 법규에는 이슬람법에 따라, 돼지 파생물의 사용에 대해 엄격히 금지된다고 구체적으로 명기되어 있음
- 동물 유래의 원료와 제품은 단일 원료로써 세계시장의 보편적 접근에 어려움이 있으며, 특히, 이슬람교와 힌두교 그리고 유대교는 돼지와 소 유래의 원료를 금기시하기 때문에 전 세계의 약 40% 인구(약 27억)에 대한 시장 공략에 어려움이 있음(그림 4)

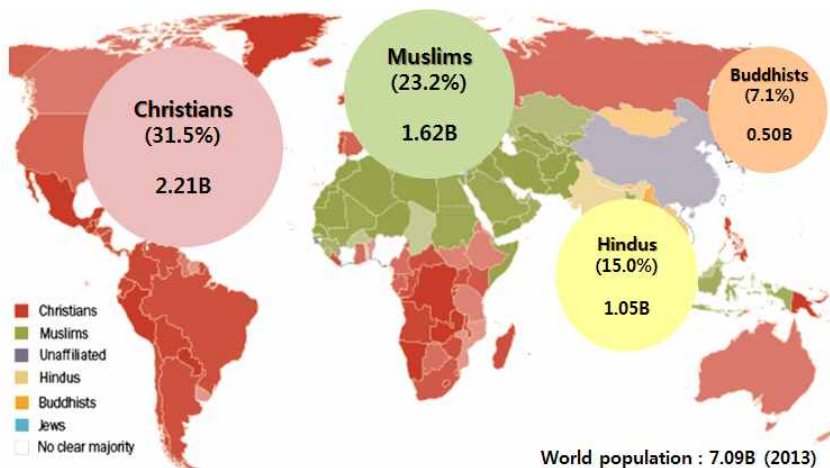


그림 4. 세계 종교분포 및 종교인구(참조: www.pewforum.org).

- 따라서, 오리발 유래의 콜라겐을 개발하면 돼지나 소 유래 콜라겐을 종교적인 문제로 사용할 수 없는 수출 제한 지역으로 판매 가능하며 이를 통해 고부가가치 원천 소스를 확보할 수 있음

③ 생체 소재로서의 콜라겐 고기능화/스마트화 기술개발의 필요성

- 콜라겐을 베이스로한 생체 재료의 경우에는 줄기세포를 하이브리드화 하는 이른바 재생 의학/조직공학 연구 등 이들의 고부가가치화 및 고기능화를 달성하기 위하여 BIN (Bio Technology + Information Technology + Nano Technology) 융합기술을 이용한 인체 모사화에 근접한 생체 재료 개발이 최근에 세계 유수의 연구그룹에 의해 접근되는 상황임

- 또한, 콜라겐에 폴리(α -hydroxy acid) 계열의 생분해성 고분자 및 바이오세라믹과 생분해성 메탈 등과의 복합 재료화에 의하여 새로운 기능성을 갖는 생체 재료 개발에도 많은 관심이 있어 이들의 연구 및 상용화에 많은 국가적인 연구개발이 이루어지고 있음

1-3. 연구개발 범위

○ 과제별(세부·협동) 연구개발 범위

가. 1세부: 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용한 의료용 원료 개발

- ① 오리발 유래 고순도 콜라겐 대량 생산 체계 확립 및 생산 설비 구축
 - 오리발 유래 고순도 콜라겐 분리 정제 PILOT SCALE 체계 확립
 - 분리 정제된 오리발 유래 콜라겐의 원료 시험 및 콜라겐 확인 시험 정립
 - 오리발 유래 고순도 콜라겐 생산 설비의 적격성 및 밸리데이션 체계 구축
- ② 오리발 유래 콜라겐 원료화
 - 오리발 콜라겐 시험 규격 정립
 - 오리발 유래 다양한 제형의 원료 형태 개발

나. 1협동: 오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근골격계용 의료용 생체 재료 개발

- ① 콜라겐을 이용한 생체 소재 원천기술 및 지지체 개발
 - 고순도 의료용 오리발 유래 콜라겐 추출 원천 기술 개발
 - 오리발 유래 콜라겐-HAp 하이브리드 뼈 충전재 개발
- ② 콜라겐을 이용한 생체 소재와 하이브리드 지지체의 안전성/유효성 평가 및 시제품 제작
 - 오리발 유래 콜라겐 생체 소재와 하이브리드 지지체의 안전성/유효성 평가
 - 오리발 유래 콜라겐 생체 소재 및 지지체의 시제품 제작

다. 2협동: 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발

- ① 이비인후과용 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 개발
 - 오리발 유래 콜라겐을 이용한 고막 재생용 지지체 개발
 - 오리발 유래 콜라겐 연부 조직 대체재 개발
 - 오리발 유래 콜라겐을 이용한 지혈제 개발
 - 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 평가 및 효능 평가
- ② 이비인후과용 오리발 콜라겐 생체 재료 시제품 개발
 - 오리발 유래 콜라겐 생체 재료의 안전성/유효성 평가 및 전임상 시험
 - 오리발 유래 콜라겐 생체 재료의 시제품 개발

○ 연차별 연구개발 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2014	오리 유래 콜라겐을 이용한 천연/HAp 생체소 재원천기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 콜라겐/HAp 하이브리드 지지체를 제작하여 최적 조건 확립 • 콜라겐 함량 및 다공조건 확립
		뼈재생 유도를 위한 최적 환경 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 최적 재생 구조 개발 • 콜라겐/HAp 하이브리드 지지체의 최적화
		오리발 유래 콜라겐을 이용한 고막 재생용 지 지체 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 필름 형태의 지지체를 이용한 생물학적 안 정성 실험 • 동물 모델을 이용한 in vivo test
		오리발 콜라겐 분리 공정 정립	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 분리 최적 조건 확립 • 콜라겐 시험 기준 마련
		Pilot-scale 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 생산 수준 규모 확대 위한 기준 설정 • 생산 수율 검증
2차 년도	2015	뼈재생용 콜라겐/HAp지지체의 생체적합성 평 가 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> • MTT, SEM 분석 • 지지체에서 세포의 형태학적 분석
		오리발 유래 콜라겐 연부 조직 대체재 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 스폰지 형태의 지지체를 이용한 생물학적 안전성 실험 • 동물 모델을 이용한 in vivo test
		물질 및 제품의 물리화학적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 콜라겐 특성 확인 위한 효능효과 시험 • 설비 도입 위한 시험 기준 마련
		콜라겐 생산 체계 구축 및 DMF 자료 구성	<ul style="list-style-type: none"> • 제품 제작 관련 설비 구축 • 오리발 콜라겐 의약품 원료 기초 자료 확립
3차 년도	2016	뼈대체재 실험을 위한 동물 모델 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 뼈대체재 실험을 위한 동물 실험 모델 확립
		뼈재생용 콜라겐/HAp 지지체의 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> • 재현성 있는 지지체제조기술 확립 및 시제 품 제조 • 전임상 시험을 위한 뼈대체재 모형 개발 • 시제품의 성능 평가
		오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 평 가 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 전임상 시험을 위한 동물 실험 • 생물학적 실험
		오리발 콜라겐의 원료화	<ul style="list-style-type: none"> • 콜라겐의 원료 기준 정립 • 오리발 콜라겐 의약품 원료 등재

제2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

○ 제품 및 시장 분석

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 우리나라의 콜라겐 시장 규모는 2010년 약 600억 원에 이르며 국제 시장 규모는 2000억 원임. 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 임윤목 박사팀은 화학물질을 이용해 해파리에서 콜라겐을 추출하는 기존 공정에 감마선이나 전자선 등 방사선을 쬐이는 공정을 추가함으로써 콜라겐 추출 효율을 4배 이상 크게 높임. 국내 연안에서 수거한 해파리를 기존 공정대로 분쇄 후 산 처리한 상태에서 25 kGy (킬로그래이)의 감마선을 2시간 가량 조사한 결과, 방사선이 해파리 몸체의 지질과 콜라겐의 사슬을 끊어줌으로써 기존 방법보다 콜라겐 추출 효율이 4배 이상 높아지는 것을 확인함. 이 기술은 산 처리를 통해 반복적으로 콜라겐을 침전시키는 기존의 추출법보다 공정비용과 시간을 대폭 단축시키고 콜라겐 추출 효율을 크게 높일 수 있음
- 2000년부터 콜라겐의 연구개발을 준비한 바이오랜드는 기술력을 바탕으로 콜라겐을 이용한 제품 개발에 성공하여, 유럽과 미국에서 제조한 수입품이 대부분인 국내 생물학적 드레싱제 시장에서 국산화를 통해 환자의 치료환경 개선, 비용감소 등의 효과와 국내 의료기기 제조 역량 증대 및 수출시장 판로를 개척함. 국내에 유통되고 있는 폴리우레탄 폼 등의 합성 고분자를 원료로 한 창상피복재의 국내 시장규모는 약 500억 원 정도임. 2005년 조직은행설립 허가증을 받은 바이오랜드는 현재 의료산업의 조직공학 제품군으로 인공각막과 인공피부 개발 사업에 역량을 집중해 그 성과로서 각막 드레싱인 양막을 국제조직은행의 규정에 따라 제조함. 2007년 8월부터 약 10개월간 2도 화상환자를 대상으로 한강성심병원 화상센터와 대구 계명대동산병원에서 다기관 임상시험을 진행해 제품의 안전성과 효과를 식약청으로부터 인정받음. 기존의 합성 고분자를 원료로 하는 창상피복재와는 달리 상처가 치유되기까지 단 일회만 적용해 자연스럽게 상처로부터 분리되는 제품으로 상처치유인자(EGF, FGF)가 있어 상피화를 촉진, 기존의 처치 방법에 비해 빠른 상처치유 효과가 나타남. 대부분이 수입에 의존하고 있는 멤브레인 시장을 대체할 것으로 기대되며, 국내 시장규모는 연간 100억 원 대로 추정됨

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 콜라겐 창상피복재의 세계 시장규모는 약 7800만 달러로 추정함. 뼈 세포치료체는 아직 상용화에 이르지 못한 못했지만, 큰 시장 규모(2007년 미국 인공뼈 시장 28억 달러 추정)와 세계적으로 상용화 업체가 없다는 점을 감안할 때 잠재적인 기회 요인으로 작용할 것임. 세계 콜라겐 시장(2007년 세계 시장 3억 달러로 추정)도 3~4개의 영세 업체들에 의해 주도되고 있어 성장 기회로 작용할 가능성이 있음(그림 1)

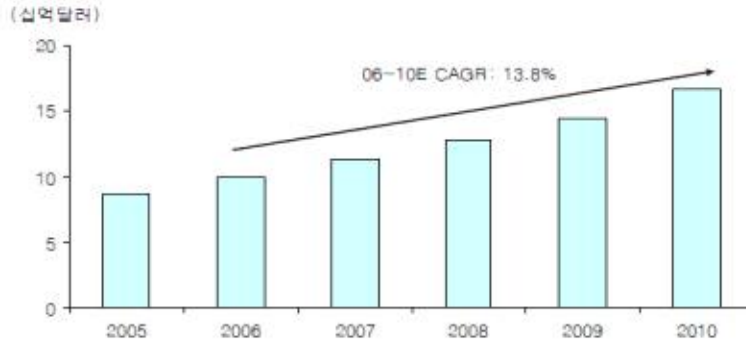


그림 1. 세계 인공관절 시장 현황.

다. 본 연구에서 개발할 예정인 제품의 시장 동향

- 현재 국내 시장의 인공 연골 지지체의 경우, 대부분 수입에 의존하고 있거나, 줄기세포를 탑재한 하이드로겔 자체로 기계적인 물성이 약하며 연골 재생에 한계를 가지고 있음. 따라서 이를 극복한 시장 경쟁력을 가진 제품 개발을 통해 상용화가 된다면 천억대의 국내 시장 및 7백억 달러 규모의 해외 시장을 공략할 수 있음



그림 2. 국내 인공관절 시장 현황.

- 인공 피부의 국내 수요 규모는 욕창환자가 약 650억 원, 여기에 화상환자, 외상환자, 피부 성형수술 환자까지 포함하면, 1,500억 원의 시장으로까지 확대될 것으로 전망됨. 따라서 우리나라의 인공피부에 대한 잠재적 시장규모는 650억 원 ~ 1,500억 원 정도임(표 1)

표 1. 인공피부 국내시장규모(단위: 억원).

연도	기존 인공피부	배양 인공피부	합계
2002년	125	-	125
2003년	140	-	140
2006년	150	20	170
2008년	160	150	310
2010년	180	220	400
2015년	1300	700	2000

- 국소 지혈제는 창상에 대한 응급처치나 외과수술 중 출혈에 대한 처치용으로 사용되는 의약품으로, 국내 시장에서는 약 400억 원의 시장규모를 형성하고 있으며 평균 20%의 고성장률을 기록하고 있음
- 세계적으로 의료용 지혈제 및 생체접착제 시장은 연간 4조여 원이 넘을 것으로 보이며, 지속적으로 시장이 확대될 전망이다
- 국내 의료용 지혈제 및 생체접착제 시장도 지속적으로 커질 전망이다
- 고막 재생을 위한 고막패치술(Patch Graft For Tympanic Membrane Perforation) 또는, 고막성형술(Myringoplasty)의 기술을 시행하지만, 기술에 사용되는 재료로서 현재 시판된 제품은 전무한 실정임
- 고막성형술(Myringoplasty)은 고막재생율이 우수한 반면 고막패치술(Patch Graft For Tympanic Membrane Perforation)에 비해 고비용과 긴 치유 시간이 든다는 단점이 있음. 따라서, 고막재생율이 우수하고 자가이식물을 대체가능한 지지체의 개발이 시급한 실정임
- 고막패치술 기술 현황은 30,000 건/년 이며, 세계 인공 고막 시장 규모는 900억대 규모를 웃도는 편임

○ 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 콜라겐은 여러 종류의 동물 세포에 대한 천연 매트릭스로서 동물조직내의 다른 단백질에 비하여 상대적으로 많은 양이 함유되어 있고, 동물 조직으로부터 쉽게 추출하고 정제 할 수 있음. 콜라겐은 낮은 항원성 및 지혈효과와 세포부착능력이 우수하여 인공조직 대체물의 주요성분으로 널리 사용됨. 콜라겐 재료는 손상된 조직들이 재생 및 치유되는 과정에서 우수한 생체적합성과 생분해성을 가져 여러 목적으로 상품화가 되며 연구가 활발하게 진행되고 있음. 콜라겐이 사용되는 형태는 젤, 섬유, 스폰지 그리고 용액 등으로 다양하게 이용되고 있음
- 최근 국내외 연구에서 콜라겐을 이식한 결과 면역거부반응이 나타나지 않았으며 뼈 재생에도 탁월한 효과를 나타내었음. 임플란트 이식재, 콜라겐 화장품, 콜라겐 분말 등 생체적합성 소재로 콜라겐을 새로운 소재 영역으로 용도를 개발하여 산업화되어 시판되고 있음. 최근 인공뼈 시장은 2,000억 원(2010)으로 매년 20%이상 확대되고 있는 것으로 예측되며 생체 적합한 인공뼈소재로 적합한 콜라겐 사용을 위한 관심이 증대되고 있음

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	62,150	86,388	110,626	179,891
경제적 파급효과	2,352	3,269	4,186	71,35
부가가치 창출액	204	283	362	619
합 계	64,706	89,940	115,174	187,645

다. 시장화에 대한 가능성

- 콜라겐의 원료시장 규모는 연간 12.3%의 높은 성장률을 보이며, 2010년 형성된 1.2조 원 시장은 2017년에는 2.7조 원의 시장이 형성될 것으로 예측하고 있음. 국내 시장을 전세계 시장의 2% (한국 GDP, 전세계 2%)로 예상할 수 있으며, 이는 2017년에는 540억 원 규모의 원료시장이 형성될 것으로 판단됨. 이는 의료용으로 사용되는 콜라겐의 시장이며, 화장품 및 식품 분야에 적용된다면 더 넓은 시장을 예상할 수 있음

표 2. 생체 재료 및 콜라겐과 콜라겐 유래 젤라틴의 시장규모(2010~2017, 단위: B \$).

유 형	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	CAGR% (2012-2017)
콜라겐과 젤라틴	1.19	1.34	1.51	1.70	1.91	2.15	2.40	2.69	12.3
셀룰로오스	0.96	1.06	1.17	1.29	1.42	1.56	1.72	1.89	10.0
키틴	0.91	1.01	1.11	1.22	1.35	1.49	1.63	1.80	10.1
알지네이트	0.65	0.69	0.74	0.79	0.84	0.89	0.94	1.00	6.2
히알루론산	1.27	1.44	1.63	1.85	2.10	2.37	2.68	3.03	13.1
계	4.98	5.54	6.16	6.85	7.61	8.45	9.38	10.40	11.0

○ 콜라겐을 소재로한 재생의료/조직공학 산업의 환경 분석

가. 재생의료 산업 동향

- 2014년까지 전세계적으로 100여개의 조직공학 및 생체재료 관련 회사들이 150여개의 pipeline을 형성하여 전임상 단계부터 시장에서 판매되고 있는 제품까지 개발해 왔음 [Global Regenerative Medicine Market, Frost & Sullivan, 2014년 5월]
- 상용화된 조직공학제제의 대다수가 근골격계(Musculoskeletal) 및 비치유 상처(Non-healing wound)에 치우쳐져 있음 [Global Regenerative Medicine Market, Frost & Sullivan, 2014년 5월]

Tissue Engineering Regenerative Medicine Segment: Per cent Breakdown of Commercially Available Products by Therapeutic Area, Global, 2013

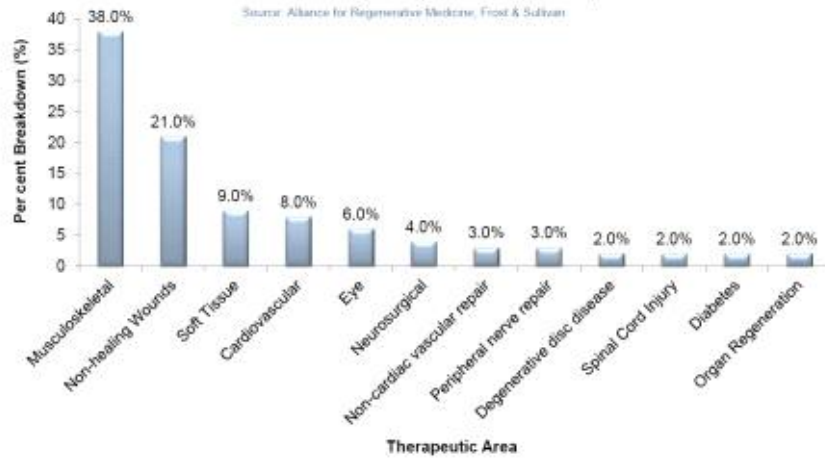
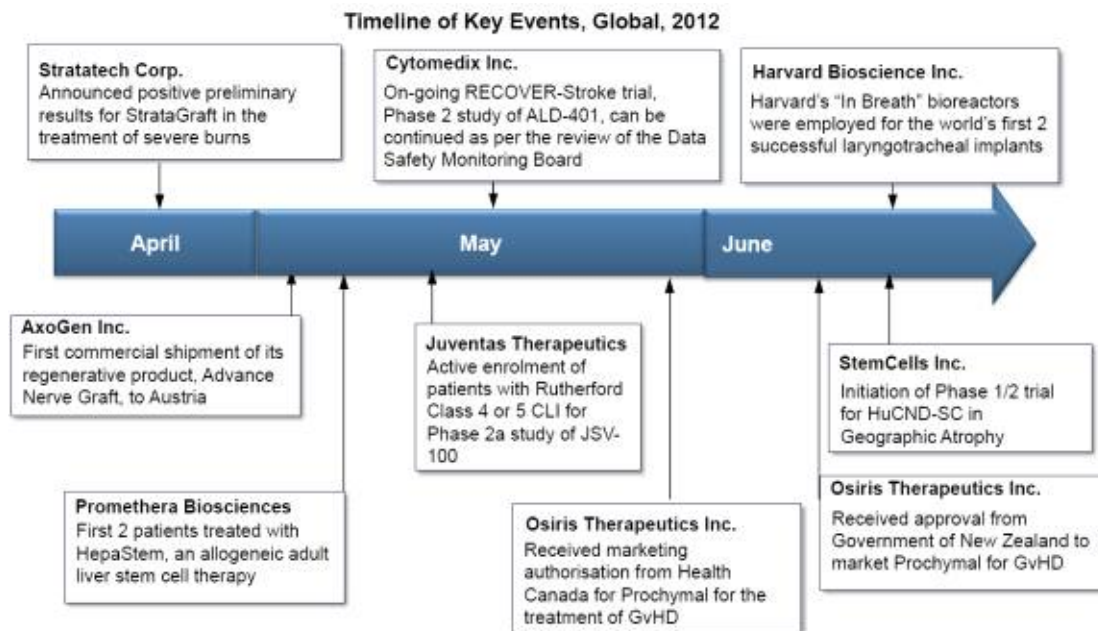
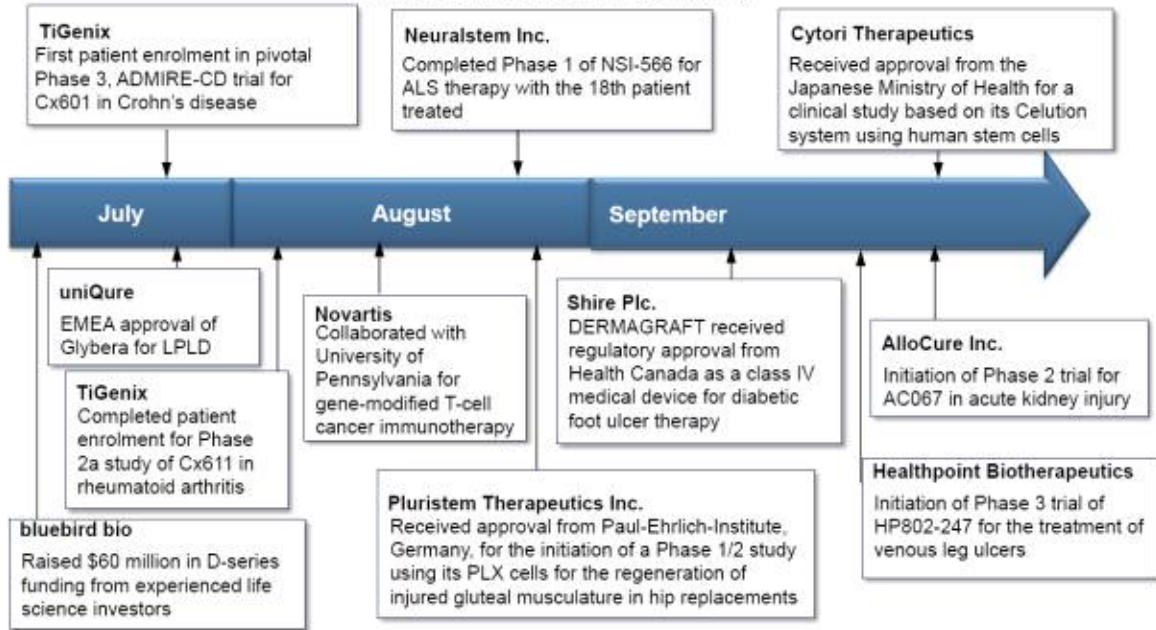


그림 3. 상용화된 조직공학 재생의학 분야.

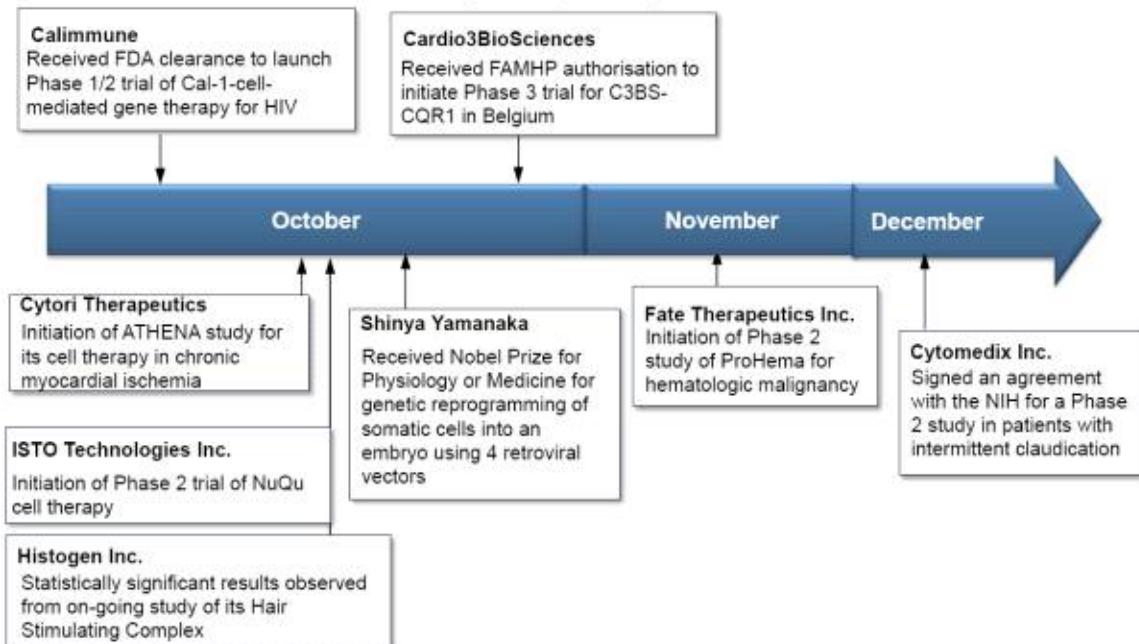
- 2012년 4월 ~ 2013년 4월까지 글로벌 회사들의 산업동향은 다음 도표와 같음



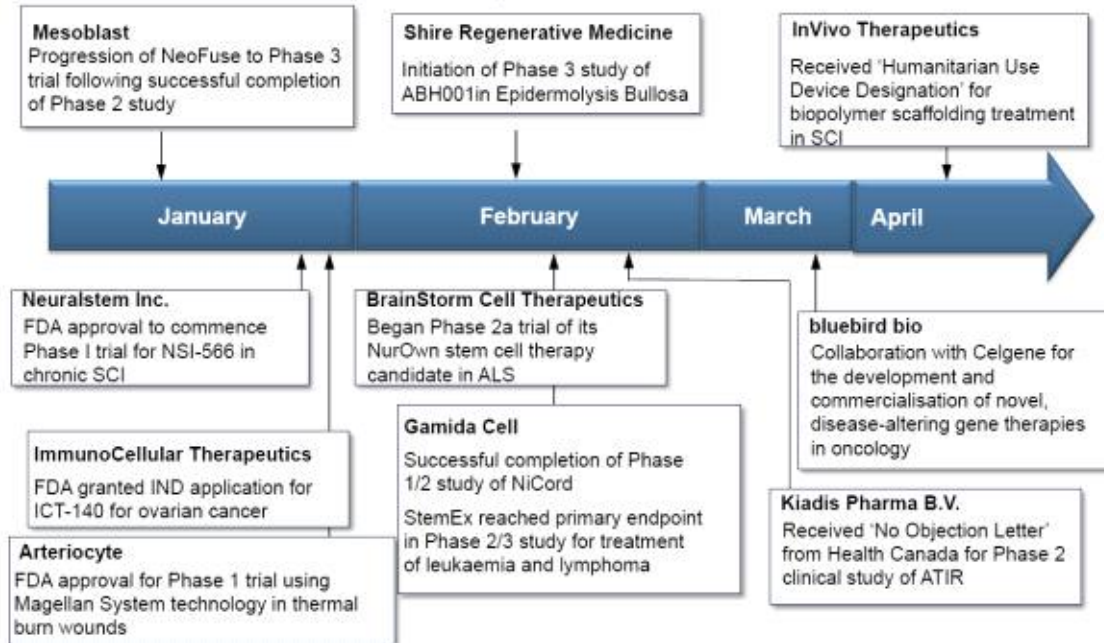
Timeline of Key Events, Global, 2012



Timeline of Key Events, Global, 2012



Timeline of Key Events, Global, 2013



- 현재 미국에서 임상시험 중인 제품은 총 196개에 달하며(임상 1상 59건, 2상 96건, 3상 41건), 전임상 단계에 있는 제품도 112개에 이르는 등 많은 제품이 개발 중
- 쥘자임, 사노피, 아스트롬 등 대형 제약회사들이 세포치료제 기업들과의 MOU 또는 합병을 통해 재생의료 산업에 진출하고 있으므로 향후 관련 산업의 규모가 더 증가할 것으로 예상

① 세포치료제 관련 동향

- 국외에서 출시된 세포치료제 제품은 총 10개 제품으로 미국에서 8개 제품이 출시되었고 EU와 일본에서 각각 1개 제품이 출시되어 있음 [MFDS Press Release, 2010]
- 이에 비해 국내에서 출시된 세포치료제는 총 14개 제품으로, 국외에 비해 세포치료제 개발 및 상업화가 훨씬 더 활발히 진행되어 왔음을 알 수 있음
- 국내·외에서 출시된 세포치료제 제품들은 대부분 체세포를 이용하여 단순 배양한 제품들로서 세포 분화 및 조직공학적 방법 등을 이용한 첨단 제품은 없음
- 줄기세포치료제의 경우, 최근 국내 FCB 파미셀사의 골수 유래 성체줄기세포를 이용하여 심근손상 치료제를 상용화한 것이 대표적이며, 메디포스트사의 Cartistem 및 안드로젠의 Cupistem등도 출시되었으며, 배아줄기세포의 경우 미국 제론(Geron)에서 척수손상 환자를 대상으로 임상시험을 수행하고 있음

② 생체 소재-조직공학 제품 관련 동향

- 전 세계적으로 조직공학 기업은 500개 이상이며, 그 중 선진 5개국(미국, 독일, 영국, 프랑스, 일본)의 기업이 300개 이상을 차지함 [Swedish Possibilities within Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2009]
- 최근 생체 소재 개발은 합성소재에 비해 생체적합성이 높은 천연소재를 중심으로 이루어지고 있는데, 재생의료용 제품의 경우 피부조직과 안구조직을 제외한 다른 장기 및 조직에 대한 제품이 상품화 사례는 없음

- 국내의 경우 폴리우레탄(바이오폴)과 콜라겐/키토산(엠씨티티) 등의 고분자 소재를 이용한 제품과, 화상/창상용 피부세포 배양 시트(테고사이언스), 양막을 이용한 인공각막(바이오랜드)과 연골세포 유래 세포외기질 성분을 이용한 연골재생 생체막(리젠프라임) 등 천연조직을 그대로 이용한 제품이 상용화되어있음

나. 재생의료 시장 동향

① 재생의료 관련 시장 동향

- 2010년 재생의료 관련 세계시장 규모는 대체장기 관련 시장(3,500억 달러)을 포함하여 약 5,000억 달러로 추정되어, 의약품 시장(2010년 약 8,250억 달러) 보다는 작지만 막대한 규모를 형성하고 있음
- 하지만, 상기 시장 규모는 의료소재 전체 및 재생의료 관련 의료기기 시장 등을 포함한 규모이며, 세포를 기반으로 하는 치료기술에 국한 할 경우 2007년 약 320억 달러 규모에서 2017년 약 980억 달러로 약 3배 정도 성장할 것으로 예상됨 [Cell Therapy, Jain PharmaBiotech 2008]

② 세포치료제 시장 현황

- 조직공학을 포함한 세포치료제 분야의 전 세계시장 규모는 2009년 약 69.4억 달러에서 2018년에는 약 318.5억 달러 규모로 성장할 것으로 예상됨(표 3) [2010 MedMarket Diligence, LLC]

표 3. 조직공학 및 세포치료제 시장 규모 (2009-2018)

	Total Market (\$millions)	Growth (%)
2009	\$6,937	
2010	\$8,307	19.8%
2011	\$9,959	19.9%
2012	\$11,954	20.0%
2013	\$14,236	19.1%
2014	\$16,967	19.2%
2015	\$20,237	19.3%
2016	\$23,525	16.2%
2017	\$27,364	16.3%
2018	\$31,849	16.4%
CAGR	2009-2012	19.9%
	2012-2015	19.2%
	2016-2018	16.4%

- 2009년 조직공학/세포치료제 시장(69억 달러)을 적용 분야별로 살펴보면 정형외과 분야(43.5억 달러)가 가장 크고 피부(6.8억 달러), 암(4.9억 달러) 및 심혈관(4.7억 달러) 분야의 순서로 시장이 형성되어 있으며, 향후 이러한 경향이 지속될 것으로 예상됨 [2010 MedMarket Diligence, LLC]
- 글로벌 줄기세포 시장은 연평균 24.2%로 성장하여 '11년 262.3억 달러에서 '18년 1195.1억 달러 규모로 전망되며 세포 종류별로 성체줄기세포 시장이 84.2% (221억 달러), 지역별로 북아메리카 지역이 59% (154.8억 달러)로 가장 큰 비중 차지하나 시장 성장 속도 측면에서는 역분화줄기세포 분야와 아시아 시장이 가장 빠르게 성장할 것으로 전망됨

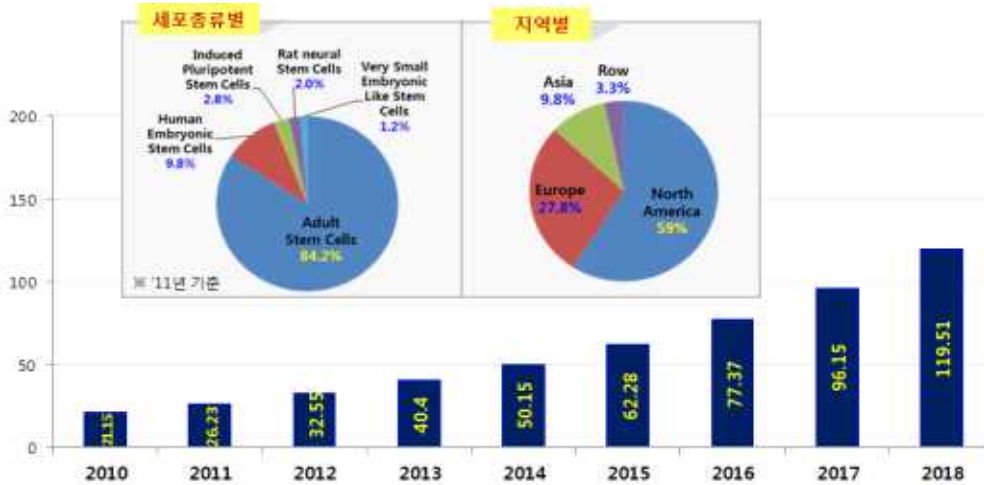


그림 4. 글로벌 줄기세포 시장현황 및 전망.

③ 생체 소재 시장 현황

- 재생의료용 생체 소재의 전 세계 시장 규모는 2009년 225억 달러이나 2014년에는 581억 달러로 급속한 성장이 예상(그림 5) [Market & Market, 2009]
- 2009년 생체 소재 시장에서 질환별로는 정형외과(38%)와 심혈관(37%) 분야가 가장 큰 시장을 형성하고 있음
- 세부 소재별로는 2009년 금속 소재의 시장 규모가 가장 크지만, 향후 고분자 소재의 시장 규모가 급속히 성장할 것으로 예상됨

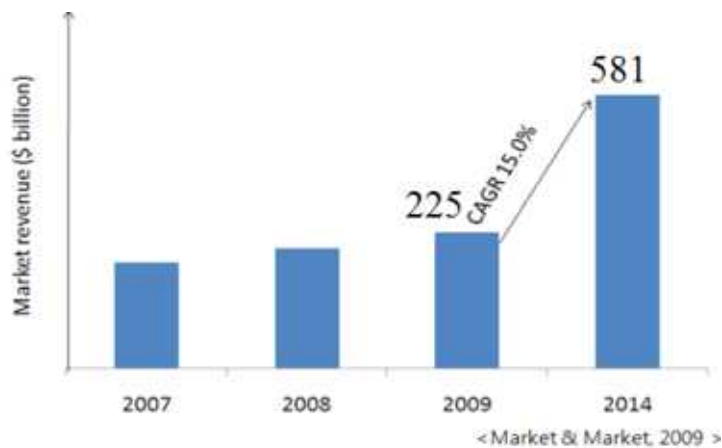


그림 5. 재생의료용 생체 소재 시장 규모(2007-2014).

다. 콜라겐을 이용한 생체 소재 및 이를 응용한 줄기세포/재생의학 산업의 5 Force 분석

- 국내 콜라겐 산업에 대하여 공급자, 수요자, 산업 내 경쟁자, 대체 기술의 5개 항목에 대하여 5 Force 분석을 실시하고 이 과정을 기술함(그림 6)
- 5 Force 분석 결과 도출된 시사점을 평가하여 중요도와 위험도에 따라 5 Force를 high, middle, low의 3가지로 분류함



그림 6. 콜라젠을 소재로 한 줄기세포/재생의료 산업의 5 Force Analysis.

- 5 Force 분석의 시사점을 도출하고 국내 콜라젠 생체 소재 기술과 산업에 대한 강점(S, Strength), 약점(W, Weakness), 기회(O, Opportunity) 및 위협(T, Threat)의 4가지 용도로 분류하여 SWOT분석의 기초 자료로 활용함(표 4)

표 4. 5 Force 분석의 시사점 도출.

① 산업 내 경쟁자 (국외 경쟁자) (H)	<ul style="list-style-type: none"> • 생체 소재의 선진국의 공격적 투자 • 국외에서 콜라젠 고순도기술 선도 • 글로벌 제약회사에의 국내외상권 장악 	T T O
② 공급자 교섭력 (국내 기업/산업) (H)	<ul style="list-style-type: none"> • 미리 형성된 시장성 풍부 • 중소 벤처 중심의 영세한 산업구조로 글로벌 기업육성 어려움 • 원천기술력 부족으로 제품/시장 경쟁력 취약 	S W W
③ 고객 교섭력 (수요 및 시장) (L)	<ul style="list-style-type: none"> • 콜라젠 생체 소재가 아주 고가임 • 콜라젠에 대한 사회적 필요성, 국민 인지도 및 시장 수요 높음 • 보험 수가 및 보험제도 정비 완료 	O W W
④ 대체기술 위협 (기술 우위) (M)	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 소·돼지 유래 콜라젠 소재와의 차별화 필요 • 콜라겐의 새로운 추출원 필요 • 콜라젠 소재를 이용한 조작공학/재생의학 등의 새로운 유형 치료가능 	W W T
⑤ 잠재적 경쟁자 (위협 요소) (M)	<ul style="list-style-type: none"> • 의료용 콜라겐이 고가라서 이의 안정화 필요 • 콜라겐원으로서의 대체 생체 소재의 개발 • 원천기술, 인프라, 임상시험 제품화 단계의 균형을 통해 산업구조 안정화 필요 	W W W

○ SWOT 분석 및 발전 방향 도출

가. 분야별 SWOT 분석 및 중점 추진방향

- 콜라겐을 응용한 산업의 5 Force 분석에 의거, 기회, 위협 요인, 강점과 약점을 도출하여 SWOT 분석을 다음과 실시하였으며, 이를 바탕으로 SWOT 전략을 도출함(표 5)

표 5. 콜라겐 생체 재료 산업화 분야의 SWOT 분석.

SWOT 분석	강점(S)	약점(W)
	S1. 제품화 역량 및 경험 풍부 S2. 기반기술 및 연구역량 우수 S3. 임상기술 및 인력 인프라 우수 S4. 제품화시 타 제품에 비해 수출용이	W1. 경쟁력 있는 원천 기술 부족 W2. 정부지원 미흡 W3. AI 등의 질병에 대한 대비 취약 W4. 산업육성을 위한 통합전략 부재
	기회요인(O)	위협요인(T)
	O1. 고령화로 인한 수요증가에 따른 사회적필요성 O2. 최근 정부의 적극적 지원의지 표명 O3. 현재 초기 단계로 국내 경쟁력 있음 O4. 향후 시장/산업의 급속한 성장 예상	T1. 기술, 제품, 시장 경쟁 가속화 T2. 선진국 정부의 공격적 개발 지원 T3. 기술의 유효성 및 차별성 검증 필요 T4. 기술/제품의 오남용 가능성



SWOT 전략	S-O 전략: 강점과 기회의 시너지 전략	W-O 전략: 약점 극복전략
	SO1. 국내 제품의 해외 진출 지원 SO2. 맞춤형 전문 인력 인프라 육성 SO3. 대국민 홍보 인지도 강화 SO4. 국내외 인허가 지원	WO1. 오픈이노베이션을 통한 연구개발 WO2. 기업의 콜라겐 생체 재료산업 진출 유도 WO3. 지자체와 정부의 적극적 연구개발 투자 유도 WO4. 농림수산부의 썹크탱크 구성 WO5. 농림수산부 마스터 플랜 작성
	S-T 전략: 위협 극복 전략	W-T 전략: 위협 회피 전략
	ST1. 기술 표준화 ST2. 기술과 질환의 연계성 강화 ST3. 콜라겐 정보화 센터 운영 ST4. 치료효능 임상적 검증강화 ST5. 질환별 콜라겐 상용화 최적화	WT1. 국외 네트워크 및 융합 연구 강화 WT2. 상용화 가능한 원천기술 개발 지원 WT3. 체계적인 제품화/사업화 지원 WT4. 참여기업의 해외 사업화 강화 WT5. 콜라겐 적용 확대 및 임상확대 WT6. 조기/고속 상용화 달성 확보

중점 추진 방향

■ 오리발 유래 콜라겐의 대량 생산 및 의료용 치료제 개발

- 오리발 유래 고순도 콜라겐 분리정제 파일럿 스케일 체계 확립
- 오리발 유래 콜라겐 생산설비의 engineering에 따른 적격성 및 밸리데이션 체계 구축
- 오리발 유래 콜라겐의 다양한 원료화

■ 오리발 유래 콜라겐의 근골격계에의 응용 및 개발

- 오리발 유래 고순도 콜라겐 분리 및 정제
- 오리발 유래 콜라겐을 이용한 생체 소재 원천 기술개발
- 골 충전재, 유착방지제 등 제작
- 콜라겐 생체 소재 지지체의 안전성/유효성 평가 및 시제품 제작

■ 오리발 유래 콜라겐의 이비인후과 및 안면 성형 재건용 응용 및 개발

- 이비인후과용 오리발 유래 고순도 콜라겐생체 재료 개발
- 고막재생용지지체, 연부조직대체재, 지혈제 개발 및 기초적인 생체적합성 평가 및 효능평가
- 고막재생용 지지체, 연부조직대체재, 지혈제 등의 시제품 개발

나. 발전방향 도출

- 오리발 유래 고순도 콜라겐 추출 방법의 원천 기술 확보 및 글로벌화 달성
- 오리발 유래 콜라겐의 다양한 의용소재 확보
- 오리발 유래 콜라겐의 근골격계 및 이비인후과/안면성형 재건용 소재 조기 상용화 안착
- 오리발 유래 콜라겐 기반 조직재생 치료기술 및 응용기술의 기초원천 기술의 조기 확보 및 상용화 타진
- 목적 지향적 임상연구 및 상용화 연구를 위한 기초-중개-임상 피드백 시스템 강화
- 임상적용 가능성 높은 생체 소재를 발굴하고 단계적 지원을 통한 지속성 및 글로벌 경쟁력 확보 건인
- 오리발 유래 콜라겐을 소재로 줄기세포 응용의 안전성 및 유효성 검증 연구시스템 확보
- 중점 선도 연구그룹 확보 및 기 연구·개발자들의 지속적 지원
- 국내산업의 관심유도를 위한 국가적 차원의 적극적 투자
- 우수한 연구 인프라 구축을 위한 국가적 차원의 인력지원 강화
- 국내외 연구네트워크 구축 및 성과활용방안 연구

제3장. 연구수행 내용 및 결과

제1절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 기본방안

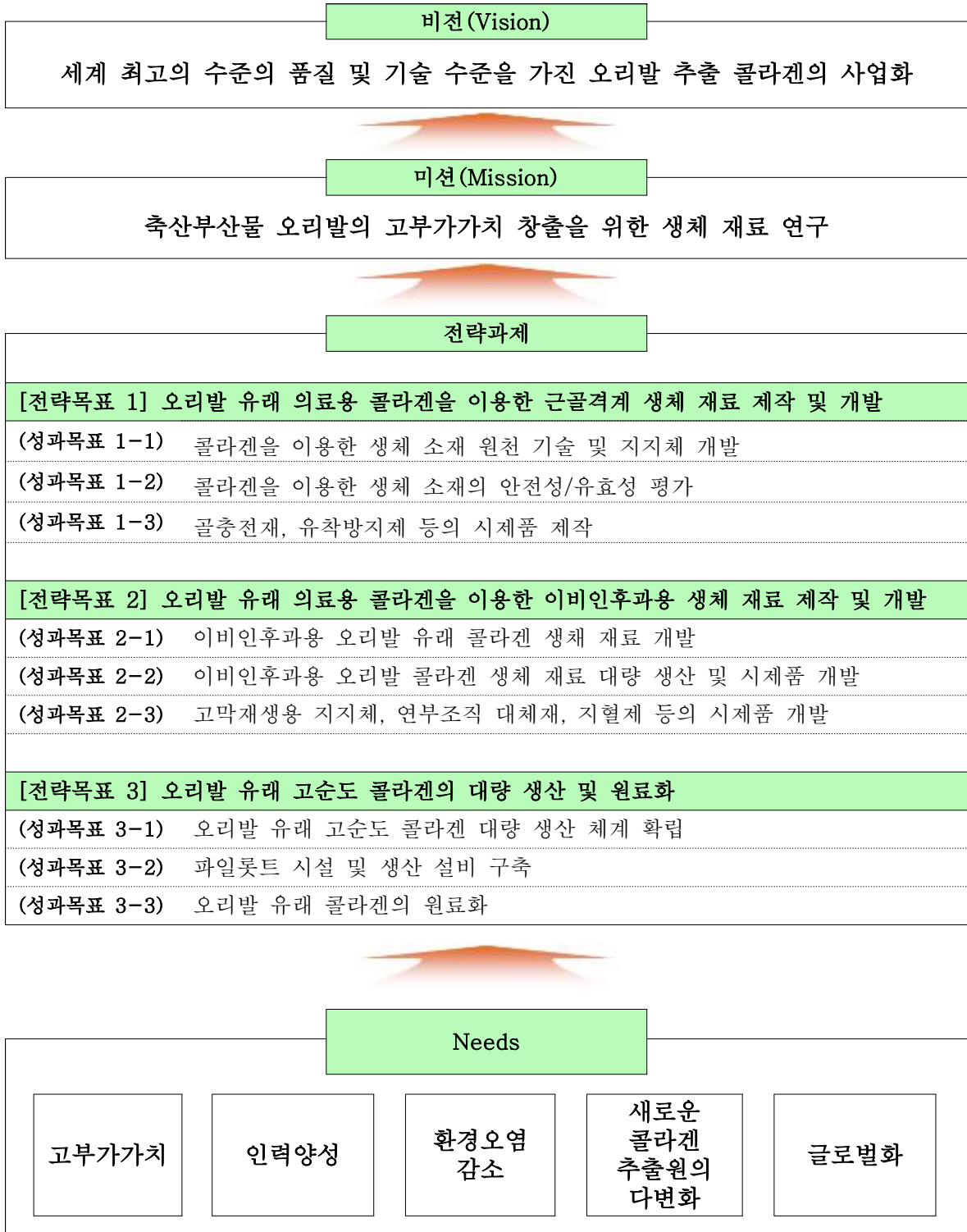


그림 1. 오리발 유래 의료용 콜라겐을 이용한 R&D의 전략 체계.

2. 추진전략

가. 단계별 추진 전략

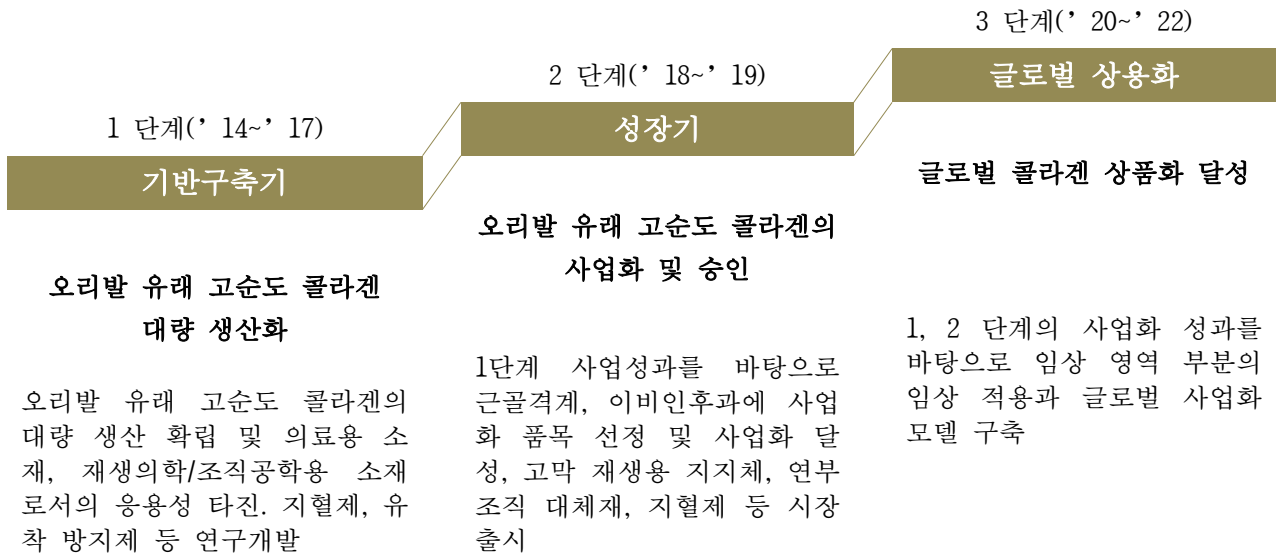


그림 2. 연구·개발팀의 단계별 추진 전략.

본 연구의 총 연구 기간은 3년(36개월)으로 그림 2.의 1단계에 해당됨. 1단계 3년간 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 확립 및 의료용 소재, 재생의학/조직공학용 소재로서의 응용성 타진을 진행할 계획임. 1단계의 기반연구결과를 토대로 2, 3단계 연구개발을 거쳐 본격적인 시장진입 예정임

(1) 1 단계 기반 구축기(' 14 ~ ' 17): 오리발 유래 고순도 콜라겐 대량 생산화

- 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 확립 및 의료용 소재, 재생의학/조직공학용 소재로서의 응용성 타진 지혈제, 유착 방지제 등 연구개발

(2) 2 단계 성장기(' 18 ~ ' 19): 오리발 유래 고순도 콜라겐의 사업화 및 MFDS 승인

- 1단계 사업성과를 바탕으로 근골격계, 이비인후과에 사업화 품목 선정 및 사업화 달성, 매출액 100억 달성. 고막재생용 지지체, 연부조직 대체재, 지혈제 등 시장출시

(3) 3 단계 글로벌 상용화(' 20 ~ ' 22): 글로벌 콜라겐 상품화 달성

- 1, 2 단계의 사업화 성과를 바탕으로 임상 영역 부분의 임상적용과 글로벌 사업화 모델 구축, 후속 상용화 제품 발굴

나. 연차별 추진 전략



그림 3. 연구개발팀의 연차별 추진 전략.

3. 추진체계 및 역할분담 방안

가. 추진주체별 역할분담

(1) 세원셀론텍(주)

- 기획사업에 대한 총괄책임 (정책 의사결정 및 기술적 리더 역할)
- 국민 10대 다발질환에 대한 콜라겐 생체 소재의 응용성 조사
- 사업성 · 시장성 조사 및 투자포트폴리오 예측과 작성
- 콜라겐 고순도 추출기술 및 파일롯트 기술화

(2) 전북대학교

- 오리발 유래 콜라겐 추출 방법의 원천기술 보유
- 콜라겐 소재의 생체 소재로서의 응용 시에 필요한 개발사항
- 콜라겐소재와 다른 소재와의 BIN융합 소재화 조사
- 콜라겐소재의 의료용/줄기세포/조직공학/재생의학 응용연구의 논문, 특허 조사

(3) 카톨릭대학교

- 콜라겐의 정형외과적 응용 자문
- 인공 뼈, 연골 등의 근골격계 연구 자문/수요조사
- 골수 유래 줄기세포와 오리발콜라겐과의 하이브리드화 바이오 장기 개발조사
- 임상으로서 5년 동안의 연구에 대한 milestone 제시

(4) 한림대학교

- 콜라겐의 이비인후과/안면성형재건 분야 자문
- Silk의 상용화 경험을 바탕으로 오리발 유래 콜라겐 소재의 임상화 자문
- 생체 소재로의 콜라겐원의 다양성 조사

4. 산학연 협동연구 체계 구축 방안 및 운영계획

- 세원셀론텍(주), 전북대학교, 한림대학교, 카톨릭의대의 4기관이 상용화에 최대한 조기 진입할 수 있도록 협동연구 체계를 구축할 것임
- 본 연구단에서 개발되는 아이디어 및 사업화 아이টে은 조속히 상용화에 실현될 수 있도록 유기적인 협동관계 유지할 것임
- 각 세미나/심포지엄/포럼 등을 개최할 때 농림수산부관계자 및 MFDS의 참여를 의무화 하여 산업화의 최종목표를 공고히 할 것임
- 기업과 대학의 연구 현장과의 실험성이 있는 실제적인 기술 교육을 갖기 위하여 기업/학교/병원의 연구원/학생/생산직을 상대로 생산/품질관리/임상실험/전문 인력 양성 프로그램 실시 예정
- 본 기획과제의 최종 연구목표는 중개연구를 통하여 기업으로 이전하는 것이므로 관련자원의 운영 효율성을 극대화하기 위하여 글로벌 차원의 네트워크 구축이 필수적임
- 글로벌마인드로 고취하기 위하여 ① 글로벌 공동연구/연수프로그램, ② 글로벌 포럼, ③ 글로벌 심포지움, ④ 글로벌 석·박사 과정 공동 프로그램 등을 개발하여 신체 연구자들인 젊은 연구자/현장인력에 수시로 공급 예정
- 해외교류활성화 방안으로 콜라겐분야의 외국 우수 기업과 연구기관 및 대학 등과도 원활히 교류를 수행하여 조기 글로벌화를 달성할 것임

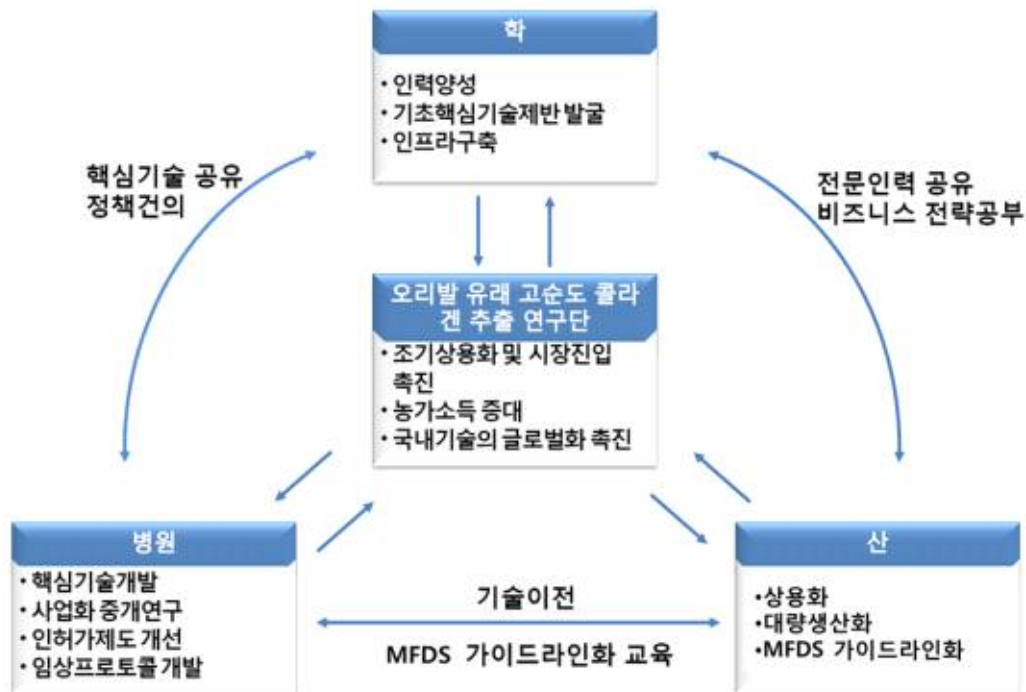


그림 4. 본 기획연구의 산학연 협동체계 구축방안 및 운영 계획.

제2절. 연구 개발 성과

1. 연구 개발 성과표

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표											연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	6	2	·	2	·	·	·	·	·	·	·	6	7	·	·	·	·	·	
1차년도	목표	1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	1	2	4	·	·	·	·	
	실적	1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	4	3	17	·	2	·	·	
2차년도	목표	3	·	·	·	·	·	·	·	·	·	2	2	·	·	·	·	·	
	실적	3	·	·	·	1	1,200만원	·	·	·	1	7	1	12	·	2	·	1	
3차년도	목표	2	2	·	2	·	·	·	·	·	·	3	3	·	·	·	·	·	
	실적	2	2	·	2	500만원	·	217.8만원	·	·	1	4	1	11	·	·	·	2	
소계	목표	6	2	·	2	·	·	·	·	·	·	6	7	·	·	·	·	·	
	실적	6	2	·	2	500만원	1	1,417.8만원	·	·	2	15	5	40	·	4	·	3	
종료 1차년도	·	2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
종료 2차년도	·	2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
종료 3차년도	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
종료 4차년도	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
종료 5차년도	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
소계	·	4	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
합계	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	

2. 연구 성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Inflammatory Response Effect of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering	International Journal of Tissue Regeneration	차세롬	5(3~4)	대한민국	International Journal of Tissue Regeneration	비SCI	2014.12.01.
2	Evaluation of Collagen from Livestock Waste of Duck's Feet and Its Application of Materials for Beauty Food industry	International Journal of Tissue Regeneration	이선의	5(3~4)	대한민국	International Journal of Tissue Regeneration	비SCI	2014.12.01.
3	오리발 유래 콜라겐 스펀지의 피부재생 효과: In vitro 연구	Polymer(Korea)	차세롬	39(3)	대한민국	한국고분자학회	SCI(E)	2015.05.01.
4	Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Silk Fibroin Scaffold	International Journal of Tissue Regeneration	장나금	6(2)	대한민국	International Journal of Tissue Regeneration	비SCI	2015.06.01.
5	Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction	International Journal of Biological Macromolecules	박현정	78	미국	Elsevier	SCI	2015.07.01.
6	다양한 친수성 고분자를 이용한 삼중층 구조의 니페디핀 서방화 및 특성분석	Polymer(Korea)	이천중	39(5)	대한민국	한국고분자학회	SCI(E)	2015.09.01.
7	헤스페리딘을 함유한 락타이드-글리콜라이드 공중합체 지지체에서 섬유류 세포의 증식과 거동 평가	Polymer(Korea)	장나금	39(5)	대한민국	한국고분자학회	SCI(E)	2015.09.01.
8	The Role of demineralized bone particle in a PLGA scaffold designed to create a media equivalent for a tissue engineering blood vessel	MACROMOLECULAR RESEARCH	조한수	23(11)	대한민국	POLYMER SOC KOREA	SCI	2015.11.01.
9	오리발 유래 콜라겐/락타이드-글리콜라이드 하이브리드 지지체의 특성 및 염증 완화 효과	POLYMER-KOR EA	김수민	39(6)	대한민국	POLYMER SOC KOREA	SCIE	2015.11.01
10	오리발 유래 콜라겐/락타이드-글리콜라이드 공중합체 지지체에서의 글분화능 효과	POLYMER-KOR EA	국현	39(6)	대한민국	POLYMER SOC KOREA	SCIE	2015.11.01
11	Inflammatory Response and	POLYMER-KOR EA	장나금	40(1)	대한민국	POLYMER SOC	SCIE	2016.01.01

	Antioxidation on Vitamin C Impregnated Poly (lactide-co-glycolide) Scaffold					KOREA		
12	Skin Regeneration Using Duck's Feet Derived Collagen and Poly (vinyl alcohol) Scaffold	MACROMOLECULAR RESEARCH	송정은	24(4)	대한민국	POLYMER SOC KOREA	SCI	2016.04.01
13	Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering	International Journal of Biological Macromolecules	김수현	85	Netherlands	Elsevier	SCI	2016.04
14	A Release Study of Double-layer Val-sartan and Hydrochlorothiazide Combination Tablets	International Journal of Tissue Regeneration	차재근	7(2)	대한민국	International Journal of Tissue Regeneration	비SCI	2016.06.01.
15	Inflammatory response study of gellan gum impregnated duck's feet derived collagen sponges	Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,	송정은	27(15)	Netherlands	Taylor&Francis	SCI	2016.10.09.
16	Evaluation of Osteogenesis on Duck's Feet Derived Collagen and Demineralized Bone Particles Sponges	POLYMER-KOR EA	차재근	40(6)	대한민국	POLYMER SOC KOREA	SCIE	2016.11.25.
17	Osteogenesis evaluation of duck's feet derived collagen/hydroxyapatite sponges immersed in dexamethasone	Biomaterials research	국연지	21(2)	대한민국	Biomaterials research	비SCI	2017.02.23.
18	Application of a Collagen Patch Derived from Duck Feet in Acute Tympanic Membrane Perforation	Tissue Eng Regen Med	김수현	14(3)	대한민국	TERM	SCI	2017.03.08.
19	Osteogenic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Several Natural Source Biomaterials/PLGA Hybrid Scaffolds	POLYMER-KOR EA	전하얀	41(5)	대한민국	POLYMER-KOREA	SCI(E)	2017.09.25.
20	In vivo Bone Regeneration Evaluation of Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffolds in Rat Calvarial Defect	MACROMOLECULAR RESEARCH	송정은	25(10)	네덜란드	MACROMOLECULAR RESEARCH	SCI	2017.11.01.

– 연구 성과(국내외 논문 게재) 첨부 문서 –

(1) Inflammatory Response Effect of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering

International Journal of Tissue Regeneration, Vol. 5, No. 3-4, pp 84-89 (2014)

| Original Article |

Inflammatory Response Effect of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Se Rom Cha¹, Na Keum Jang¹, Hyeon Kuk¹, Eun Young Kim¹, Jeong Eun Song¹,
Chan Hum Park², and Gilson Khang^{1,†}

¹Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer/Nano Science & Technology and Polymer BIN Research Center, Chonbuk National University 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

²Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

(Received: July 10th 2014, Accepted: July 31st 2014)

Acknowledgments: This research was supported by Brain Korea 21 PLUS Project, MIAFF (814005-03-1-HD020) and the grant (2013HAA11) from “Jeonbuk Research & Development” Program funded by Jeonbuk Province, Republic of Korea.

(2) Evaluation of Collagen from Livestock Waste of Duck's Feet and Its Application of Materials for Beauty Food industry

International Journal of Tissue Regeneration, Vol. 5, No. 3-4, pp 103-109 (2014)

| Original Article |

Evaluation of Collagen from Livestock Waste of Duck's Feet and Its Application of Materials for Beauty Food industry

Seon Eui Lee¹, Se Rom Cha¹, Na Keum Jang¹, Soo Min Kim¹, Eun Young Kim¹, Jeong Eun Song¹,
Chan Hum Park², and Gilson Khang^{1,†}

¹Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer/Nano Science & Technology and Polymer BIN Research Center, Chonbuk National University 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

²Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

(Received: Sept 25th 2014, Accepted: Oct 21st 2014)

Acknowledgments: This research was supported by Brain Korea 21 PLUS Project, MIAFF (814005-03-1-HD020) and the grant(2013HA A11) from Jeonbuk Research and Development Program funded by Jeonbuk Province, Republic of Korea.

(3) 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 피부재생 효과: In vitro 연구

Polymer(Korea), Vol. 39, No. 3, pp. 493-498 (2015)
http://dx.doi.org/10.7317/pk.2015.39.3.493

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

오리발 유래 콜라겐 스펀지의 피부재생 효과: *In vitro* 연구

차세룡 · 정현기 · 김수영 · 김은영 · 송정은 · 박찬흠* · 권순홍** · 강길선¹

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소

*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과, **가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과
(2014년 11월 26일 접수, 2014년 12월 4일 수정, 2014년 12월 9일 채택)

Effect of Duck's Feet Derived Collagen Sponge on Skin Regeneration: *In Vitro* Study

Se Rom Cha, Hyun Ki Jeong, Su Young Kim, Eun Young Kim, Jeong Eun Song,
Chan Hum Park*, Soon Yong Kwon**, and Gilson Khang¹

Dept. of BIN Fusion Tech. & Dept. of polymerNano Sci. Tech., Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

**Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea*

***Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, 62 Yeouido-dong Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea*

(Received November 26, 2014; Revised December 4, 2014; Accepted December 9, 2014)

감사의 글: 이 논문은 2013년 전라북도에서 시행한 R&D
지원사업의 지원(2013하A11), 농림수산식품부 기술사업화 지
원사업(814005-03-1-HD020)과 한국연구재단 BK21 플러스사
업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

(4) Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Silk Fibroin Scaffold

International Journal of Tissue Regeneration, Vol. 6, No. 2, pp 56-63 (2015)

| Original Article |

Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Silk Fibroin Scaffold

Na Keum Jang¹, Seon Eui Lee¹, Se Rom Cha¹, Chang Hyun Kim¹, Hyun Ki Jeong¹,
Su Young Kim¹, Jae Hun Shin¹, Jeong Eun Song¹, Chan Hum Park², and Gilson Khang^{1*}

¹*Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer/Nano Science & Technology and Polymer BIN Research Center,
Chonbuk National University 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea*

²*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University,
1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea*

(Received: March 23rd 2015, Accepted: April 13th 2015)

Acknowledgments: This research was supported by the
Brain Korea 21 PLUS Project, NRF. Bio-industry Technology
Development Program (112007-05-3-SB010) and Technology
Commercialization Support Program (814005-03-1-HD020),
Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries,
Republic of Korea.

(5) Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction

G Model
BBIOMAC 4998 1-9



ARTICLE IN PRESS

International Journal of Biological Macromolecules xxx (2015) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction

Hyun Jung Park^a, Ok Joo Lee^a, Min Chae Lee^a, Bo Mi Moon^a, Hyung Woo Ju^a,
Jung min Lee^a, Jung-Ho Kim^a, Dong Wook Kim^a, Chan Hum Park^{a, b, *}

^a Nano-Bio Regenerative Medical Institute, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 200-702, Republic of Korea
^b Department of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, 152 Kyo-Dong, Chuncheon, Gangwon 200-704, Republic of Korea

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Hallym University Research Fund and Technology Commercialization Support Program (814005-03-1-HD030), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(6) 다양한 친수성 고분자를 이용한 삼중층 정제의 니페디핀 서방화 및 특성분석

Polymer(Korea), Vol. 39, No. 5, pp. 739-745 (2015)
<http://dx.doi.org/10.7317/pk.2015.39.5.739>

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

다양한 친수성 고분자를 이용한 삼중층 정제의 니페디핀 서방화 및 특성분석

이현중^a · 하현정^a · 김수영^a · 박진영^a · 장나글^a · 송정은^a · 김길선^b
전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
(2015년 2월 13일 접수, 2015년 3월 25일 수정, 2015년 4월 10일 채택)

Sustained Release Formulation and Characterization of Nifedipine Three-layered Tablet Using Various Polymers

Cheon Jung Lee^a, Hyun Jung Ha^a, Su Young Kim, Jin Young Park, Na Keum Jang,
Jeong Eun Song, and Gilsun Khang^b

*Dept. of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center &
Dept. of Polymer/Nano Science Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea*
(Received February 13, 2015; Revised March 25, 2015; Accepted April 10, 2015)

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 BK21플러스사업, 바이오·의료기술개발(2012M3A9C6050204)과 기술사업화지원사업(814005-03-1-HD020)에 의해 수행되었습니다.

(7) 헤스페리딘을 함유한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서 섬유분 세포의 증식과 거동 평가

Polymer(Korea), Vol. 39, No. 5, pp. 782-787 (2015)
 http://dx.doi.org/10.7317/pk.2015.39.5.782

ISSN 0379-153X(Print)
 ISSN 2234-8077(Online)

헤스페리딘을 함유한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서 섬유분 세포의 증식과 거동 평가

장나금 · 고현아 · 차세룡 · 이신의 · 정현기 · 김수영 · 신재훈 · 김은영 · 송정은 · 강길선¹
 전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
 (2015년 3월 5일 접수, 2015년 3월 25일 수정, 2015년 3월 31일 채택)

Proliferation and Growth Behavior of Annulus Fibrosus Cells on Hesperidin Loaded Poly(lactide-co-glycolic acid) Scaffold

Na Keum Jang, Hyun Ah Ko, Se Rom Cha, Seon Eui Lee, Hyun Ki Jeong, Su Young Kim, Jae Hun Shin, Eun Young Kim, Jeong Eun Song, and Gilson Khang¹

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea
 (Received March 5, 2015; Revised March 25, 2015; Accepted March 31, 2015)

감사의 글: 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

(8) The Role of demineralized bone particle in a PLGA scaffold designed to create a media equivalent for a tissue engineering blood vessel

Macromolecular Research, Vol. 23, No. 11, pp 986-993 (2015)
 DOI 10.1007/s13233-015-3138-6

www.springer.com/13233
 pISSN 1598-5032 eISSN 2092-7673

The Role of Demineralized Bone Particle in a PLGA Scaffold Designed to Create a Media Equivalent for a Tissue Engineered Blood Vessel

Hansu Jo¹, Minsung Hong¹, Jung Bo Shim¹, Randall F. Ankeny², Hyeonseok Kim¹, Robert M. Nerem², and Gilson Khang^{1,2}

¹Department of BIN Fusion Technology & Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
²Parker H. Pettit Institute for Bioengineering and Bioscience, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA

Received April 9, 2015; Revised August 14, 2015; Accepted August 17, 2015

Acknowledgments. This research was supported by Brain Korea 21 PLUS Project, NRF, NRF-2012M3A9C6050204, Bio-industry Technology Development Program (112007-05-3-SB010), Technology Commercialization Support Program (814005-03-1-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea. Experiments were conducted at the Georgia Institute Technology in USA with support from Robert M. Nerem.

(9) 오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 하이브리드 지지체의 특성 및 염증 완화 효과

Polymer(Korea), Vol. 39, No. 6, pp. 837-845 (2015)
 http://dx.doi.org/10.7317/pk.2015.39.6.837

ISSN 0379-153X(Print)
 ISSN 2234-8077(Online)

**오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 하이브리드 지지체의
 특성 및 염증 완화 효과**

김수민 · 김혜민 · 국 현 · 김은영 · 송정은 · 서동삼* · 박찬흠** · 강길선†
 전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소, *새원셀론텍
 **한림대학교 의과대학 춘천상심병원 이비인후과
 (2015년 2월 13일 접수, 2015년 4월 8일 수정, 2015년 4월 28일 채택)

**Characterization and Effect of Inflammatory Reaction of Duck-Foot Derived
 Collagen/PLGA(Poly lactic-co-glycolide) Hybrid Scaffold**

Soo Min Kim, Hye Min Kim, Hyeon Kuk, Eun Young Kim, Jeong Eun Song,
 Dong Sam Suh*, Chan Hum Park**, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer BIN Fusion Res Center & Dept. of PolymerNano Sci Tech, Chonbuk National Univ,
 567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea
 *Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongju 2gu 3-dong, Seongdong gu, Seoul 133-831, Korea
 **Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine,
 Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea
 (Received February 13, 2015; Revised April 8, 2015; Accepted April 28, 2015)

감사의 글: 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

(10) 오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서의 골분화능 효과

Polymer(Korea), Vol. 39, No. 6, pp. 846-851 (2015)
 http://dx.doi.org/10.7317/pk.2015.39.6.846

ISSN 0379-153X(Print)
 ISSN 2234-8077(Online)

오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서의 골분화능 효과

국 현* · 김혜민* · 김수민 · 김은영 · 송정은 · 권순율* · 서동삼** · 박찬흠*** · 강길선†
 전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소
 *가톨릭대학교 의과대학 어의도성모병원 정형외과, **새원셀론텍
 ***한림대학교 의과대학 춘천상심병원 이비인후과
 (2015년 2월 23일 접수, 2015년 3월 23일 수정, 2015년 4월 10일 채택)

Osteogenic Effect of Hybrid Scaffolds Composed of Duck Feet Collagen and PLGA

Hyeon Kuk*, Hye Min Kim*, Soo Min Kim, Eun Young Kim, Jeong Eun Song, Soon Yong Kwon*,
 Dong Sam Suh**, Chan Hum Park***, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res. Center & Dept. of PolymerNano Sci. Tech.,
 Chonbuk National University, 567 Baekje Daero, Deokjin, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea
 *Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,
 62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea
 **Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongju, 2gu 3-dong, Seongdong gu, Seoul 133-831, Korea
 ***Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine,
 Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea
 (Received February 23, 2015; Revised March 23, 2015; Accepted April 10, 2015)

감사의 글: 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

(11) Inflammatory Response and Antioxidation on Vitamin C Impregnated Poly(lactide-co-glycolide) Scaffold

Polymer(Korea), Vol. 40, No. 1, pp. 85-91 (2016)
http://dx.doi.org/10.7317/pk.2016.40.1.85

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

**비타민 C를 함유한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서의
항염증, 항산화 효과**

장나금 · 이신의 · 차세룡 · 김창현 · 송정은 · 권순홍* · 강길선¹
전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
*가톨릭대학교 의과대학 어의도성모병원 정형외과
(2015년 8월 18일 접수, 2015년 9월 22일 수정, 2015년 9월 22일 채택)

**Inflammatory Response and Antioxidation on Vitamin C Impregnated
Poly(lactide-co-glycolide) Scaffold**

Na Keum Jang, Seon Eui Lee, Se Rom Cha, Chang Hyun Kim, Jeong Eun Song,
Soon Yong Kwon*, and Gilson Khang¹

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of Polymer Nano Sci Tech., Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea
^{*}Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07345, Korea
(Received August 18, 2015; Revised September 22, 2015; Accepted September 22, 2015)

감사의 글: 이 논문은 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020)과 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(NRF-2012M3A9C6050204)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

(12) Skin Regeneration Using Duck's Feet Derived Collagen and Poly(vinyl alcohol) Scaffold

Macromolecular Research, Vol. 24, No. 4, pp 359-365 (2016)
DOI 10.1007/s13233-016-4051-3

www.springer.com/13233
pISSN 1598-5032 eISSN 2092-7673

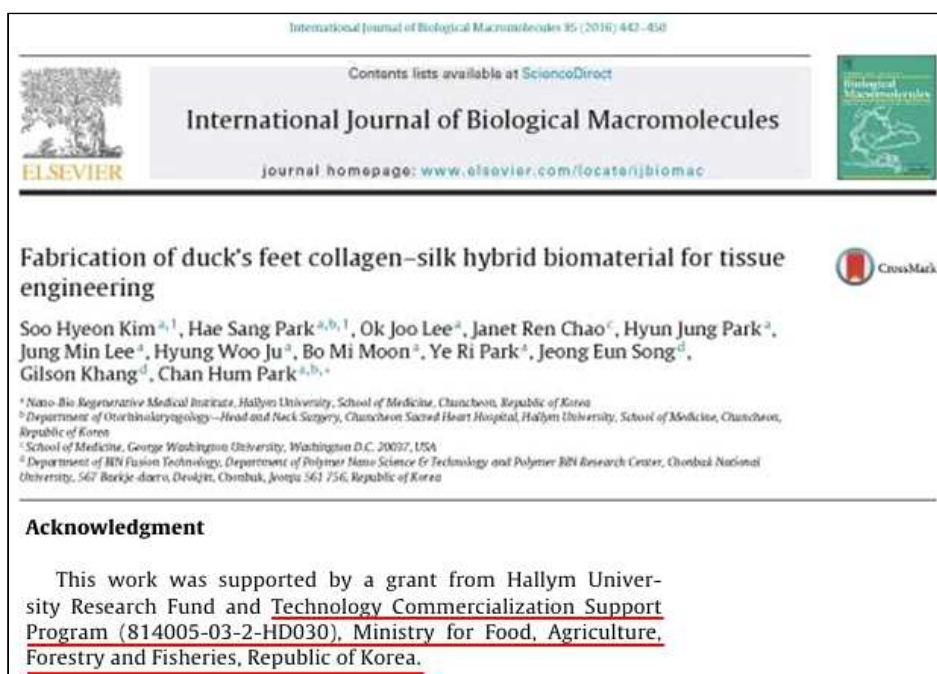
**Skin Regeneration Using Duck's Feet Derived Collagen and
Poly(vinyl alcohol) Scaffold**

Jeong Eun Song¹, Nirmalya Tripathy¹, Jae Hun Shin¹, Dae Hoon Lee¹, Chan Hum Park², and Gilson Khang^{*1}

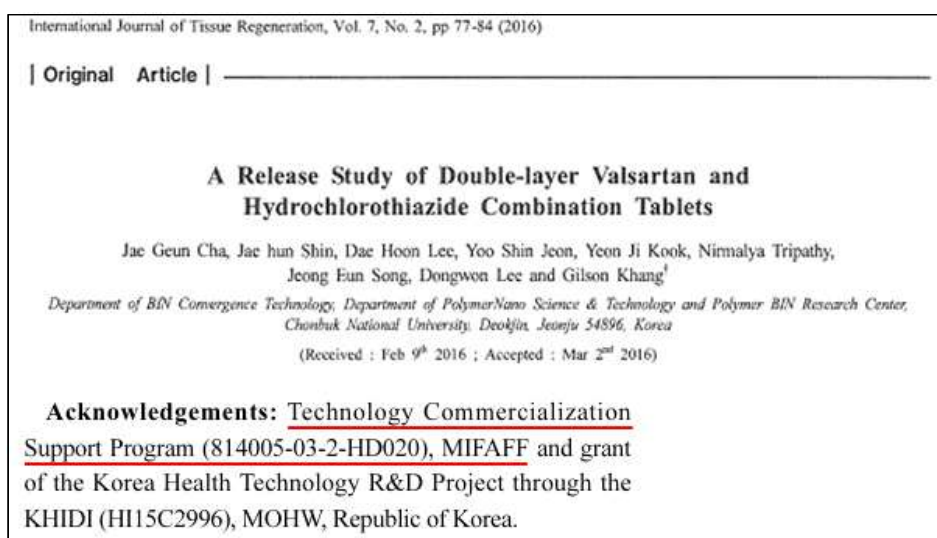
¹Department of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer Nano Sci Tech,
Chonbuk National Univ. 567 Baekje-daero, Jeonju, Jeonbuk 54898, Korea
²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, School of Medicine,
Hallym University, 77, Sakju-ro, Chuncheon, Gangwon 24253, Korea
Received October 15, 2015; Revised January 28, 2016; Accepted February 18, 2016

Acknowledgments. This research was supported by Brain Korea 21 PLUS Project, Technology Commercialization Support Program (814005-03-1-HD020), Bio-industry Technology Development Program (112007-05-3-SB010), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(13) Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering



(14) A Release Study of Double-layer Valsartan and Hydrochlorothiazide Combination Tablets



(15) Inflammatory Response Study of Gellan Gum Impregnated Duck's Feet Derived Collagen Sponges

JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE, POLYMER EDITION, 2016
VOL. 27, NO. 15, 1495–1506
<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1213218>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Inflammatory response study of gellan gum impregnated duck's feet derived collagen sponges

Jeong Eun Song^a, Seon Eui Lee^a, Se Rom Cha^a, Na Keum Jang^a, Nirmalya Tripathy^a, Rui L. Reis^b and Gilson Khang^a

^aDepartment of BIN Fusion Technology, Department of Polymer Nano Science & Technology and Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea; ^b3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Guimaraes, Portugal

Funding

This work was supported by Technology Commercialization Support Program [grant number 814005-03-2-HD020], Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF) and grant of the Korea Health Technology R&D Project through the KHIDI [grant number HI15C2996], Ministry of Health and Welfare (MOHW), Republic of Korea.

(16) Evaluation of Osteogenesis on Duck's Feet Derived Collagen and Demineralized Bone Particles Sponges

Polymer(Korea), Vol. 40, No. 6, pp. 858-864 (2016)
<http://dx.doi.org/10.7317/pk.2016.40.6.858>

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

오리발 유래 콜라겐과 탈미네랄화된 골분 스펀지에서 골 분화능력평가

차재근 · 차세롬 · 이대훈 · 신재훈 · 송정은 · 서동삼* · 박찬흠** · 강길섭¹
전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소,
*세원실문역, **한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과
(2016년 4월 4일 접수, 2016년 6월 13일 수정, 2016년 7월 26일 채택)

Evaluation of Osteogenesis on Duck's Feet Derived Collagen and Demineralized Bone Particles Sponges

Jae Geun Cha, Se Rom Cha, Dae Hoon Lee, Jae Hun Shin, Jeong Eun Song, Dong Sam Suh*, Chan Hum Park^{**}, and Gilson Khang¹

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 54896, Korea
^{*}Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongsu 2ga 3-dong, Seongdong gu, Seoul 04783, Korea
^{**}Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 24252, Korea
(Received April 4, 2016; Revised June 13, 2016; Accepted July 26, 2016)

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업 (814005-03-2-HD020)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

(17) Osteogenesis evaluation of duck's feet derived collagen/hydroxyapatite sponges immersed in dexamethasone

Biomater. Res. (2017) 21(1) : 10-16
DOI 10.1186/s40824-017-0088-4
ISSN 1226-4601(Print) / ISSN 2055-7124(Online)

Biomaterials
Research
© The Korean Society for Biomaterials

RESEARCH ARTICLE Open Access

 CrossMark

Osteogenesis evaluation of duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite sponges immersed in dexamethasone


Yeon Ji Kook¹, Dae Hoon Lee¹, Jeong Eun Song¹, Nirmalya Tripathy¹, Yoo Shin Jeon¹, Ha Yan Jeon¹, Joaquim M. Oliveira², Rui L. Reis² and Gilson Khang^{1*}

Acknowledgements
This work was supported by Technology Commercialization Support Program [grant number 814005-03-3-HD020], Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF).

(18) Application of a Collagen Patch Derived from Duck Feet in Acute Tympanic Membrane Perforation

Tissue Eng Regen Med
DOI 10.1007/s13770-017-0039-0

Online ISSN 2212-5469
Print ISSN 1738-2696

TERM  CrossMark

ORIGINAL ARTICLE

Application of a Collagen Patch Derived from Duck Feet in Acute Tympanic Membrane Perforation

Soo Hyeon Kim¹ · Ju Yeon Jeong¹ · Hyun Jung Park¹ · Bo Mi Moon¹ · Ye Ri Park¹ · Ok Joo Lee¹ · Md Tipu Sultan¹ · Dong-Kyu Kim^{1,2} · Hae Sang Park^{1,2} · Jun Ho Lee^{1,2} · Chan Hum Park^{1,2}

Acknowledgements This work was supported by a grant from Hal-lym University Research Fund and Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD030), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(19) Osteogenic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Several Natural Source Biomaterials/PLGA Hybrid Scaffolds

Polymer(Korea), Vol. 41, No. 5, pp. 867-873 (2017)
https://doi.org/10.7317/pk.2017.41.5.867

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

여러 가지 천연고분자를 함유한 PLGA 하이브리드 지지체에서
토끼 골수줄기세포의 골분화 능력 평가

전하얀 · 김수민 · 전유신 · 국연지 · 송정은 · 강길선¹
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소
(2017년 4월 4일 접수, 2017년 5월 12일 수정, 2017년 5월 26일 채택)

**Osteogenic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in
Several Natural Source Biomaterials/PLGA Hybrid Scaffolds**

Ha Yan Jeon, Soo Min Kim, Yoo Shin Jeon, Yeon Ji Kook, Jeong Eun Song, and Gilson Khang¹
Department of BIN Convergence Tech, Polymer BIN Fusion Res Center & Department of Polymer-Nano Sci Tech,
Chonbuk National University, 567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 54898, Korea
(Received April 4, 2017; Revised May 12, 2017; Accepted May 26, 2017)

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 바이오·의료기술개발
사업(2012M3A9C6050204)과 농림수산식품부 기술사업화지
원사업(814005-03-3-HD020)의 지원을 받아 수행된 연구입
니다.

(20) In vivo Bone Regeneration Evaluation of Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffolds in Rat Calvarial Defect

Macromolecular Research Article

DOI 10.1007/s13233-017-5134-5 www.springer.com/13233 pISSN 1598-5032 eISSN 2092-7673

In vivo Bone Regeneration Evaluation of Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffolds in Rat Calvarial Defect

Jeong Eun Song¹
Nirmalya Tripathy¹
Jae Hun Shin¹
Dae Hoon Lee¹
Jae Geun Cha²
Chan Hum Park²
Dong Sam Suh³
Gilson Khang^{*1}

¹Dept of BIN Convergence Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer-Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, 567 Baekje-daero, Jeonju, Jeonbuk 54896, Korea
²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chunchon Sacred Heart Hospital, School of Medicine, Hallym University, 77, Sakju-ro, Chuncheon, Gangwon 24253, Korea
³Sewon Cellontech, 801, Wooyoung Techno Center, 273-15 Seongsu, 2ga 3-dong, Seongdong-gu, Seoul 04783, Korea

Received January 16, 2017 / Revised May 29, 2017 / Accepted June 3, 2017

Acknowledgments: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2014 term stem Characterization and effect of inflammatory reaction of duck-foot derived collagen/plga hybrid scaffold	김수민	2014.10.23.	Hotel intercontinental palacio das cardosas porto, Portugal	포르투갈
2	2014 term stem Wound healing using duck feet-derived collagen and polyvinyl alcohol scaffolds	신재훈	2014.10.23.	Hotel intercontinental palacio das cardosas porto, Portugal	포르투갈
3	2014 term stem Evaluation of the effect of hydroxyapatite (HAP) coated duck's feet collagen scaffolds for bone tissue engineering	차세롬	2014.10.23.	Hotel intercontinental palacio das cardosas porto, Portugal	포르투갈
4	2014 term stem Evaluation of the duck's feet collagen	정현기	2014.10.23.	Hotel intercontinental palacio das cardosas porto, Portugal	포르투갈
5	2015 Spring Meeting of the Korean Society for Biomaterials Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In vitro and in vivo Study	차세롬	2015.03.27.	South Korea	대한민국
6	2015 The Polymer Society of Korea Spring Meeting Evaluation of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering	이선의	2015.04.08.	Dae-jeon, South Korea South Korea	대한민국
7	2015 The Polymer Society of Korea Spring Meeting Characterization and Fabrication of Duck Feet-Derived Collagen and Polyvinyl Alcohol Scaffolds for Skin Regeneration	신재훈	2015.04.08.	Dae-jeon, South Korea South Korea	대한민국
8	16회 한국조직공학재생의학회 Collagen Extraction from Duck's Foot and Fabrication of Collagen-based Scaffolds	김수현	2015.05.29.	카톨릭대학교	대한민국
9	2015 TERMIS WORLD CONGRESS Effect of DC/PLGA Scaffolds on the Attachment and Proliferation of Costal Cartilage Cells	차세롬	2015.09.09.	Boston Marriott Copley Place	미국
10	2015 TERMIS WORLD CONGRESS Collagen Extraction from the Duck's Foot and Fabrication of Collagen Patch for the Repair of Acute Tympanic Membrane Perforations	김수현	2015.09.10.	Boston Marriott Copley Place	미국
11	2015 TERMIS WORLD CONGRESS Evaluation of the effect of Bone Differentiation of Bone Marrow Stem Cells on DC/DBP Sponges	정현기	2015.09.10.	Boston Marriott Copley Place	미국
12	2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Mg-Ca Particles and Synthetic Body Fluid Loaded Silk Fibroin Scaffold	장나금	2015.09.17.	Pangyo	대한민국
13	2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF LOW-ACYL GELLAN GUM SPONGES COATED BY COLLAGEN SOLUTION	이선의	2015.09.17.	Pangyo	대한민국

14	2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS IN VITRO&IN VIVO STUDY USING DC/DBP SCAFFOLDS FOR BONE DIFFERENTIATION OF BONE MARROW STEM CELL	차세롭	2015.09.17.	Pangyo	대한민국
15	The Polymer Society of Korea Fall Meeting Silk Fibroin Scaffolds as a Transporter to Deliver Demineralized Bone Particles for Bone Defect Treatment	국현	2015.10.07.	대구컨벤션센터 (EXCO)	대한민국
16	The Polymer Society of Korea Fall Meeting Effect of PLGA/Duck Feet-derived Collagen and hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Tissue Engineering	신재훈	2015.10.08.	대구컨벤션센터 (EXCO)	대한민국
17	The Polymer Society of Korea Fall Meeting Characterization of Silk/ β -Tricalcium Phosphate Scaffolds for the Bone Tissue Engineering	신재훈	2015.10.08.	대구컨벤션센터 (EXCO)	대한민국
18	21차 이미인후과 종합학술대회 이미인후과 영역에서 사용 가능한 오리발 추출 콜라겐 및 실크 복합 지지체의 개발	박혜상	2015.10.24.	군산 새만금 컨벤션센터	대한민국
19	21차 이미인후과 종합학술대회 Comparison of methods for repair of acute tympanic membrane perforations: Duck feet derived collagen patch vs. paper patch	이준호	2015.10.24.	군산 새만금 컨벤션센터	대한민국
20	2016 SPRING CONFERENCE OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS Effects of Duck Feet-derived Collagen/Poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Healing	차재근	2016.03.25.	경북대학교 글로벌플라자 효석홀	대한민국
21	TERMIS EU 2016 Conference Potency of duck's feet-derived collagen/poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering	이대훈	2016.06.30.	Uppsala concert hall	스웨덴
22	TERMIS EU 2016 Conference Osteogenic differentiation evaluation of quercetin-functionalized silk fibroin/hydroxyapatite scaffolds	이대훈	2016.06.30.	Uppsala concert hall	스웨덴
23	Termis EU 2016 Conference Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering	박혜상	2016.06.30.	Uppsala Konsert & Kongress	스웨덴
24	Termis AP 2016 Conference Development of an Artificial Dermis Using Duck's Feet Extract Collagen	정주연	2016.09.05.	Fullon hotel tamsui fishermen's wharf	대만
25	2016 TERMIS AP Evaluation of Osteogenesis from Duck's Feet-derived Collagen/Hydroxyapatite Sponges Immersed Medium with Dexamethasone	이대훈	2016.09.05.	Fullon hotel tamsui fishermen's wharf	대만
26	2016 TERMIS AP Effect of Duck's Feet Derived Collagen and Ploy (Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffold on Bone Regeneration in Rat Calvarial Defect Model	송정은	2016.09.05.	Fullon hotel tamsui fishermen's wharf	대만

27	20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016 Drug Release Behavioural Study of Olmesartan-Loaded POX/PLGA Blend Microsphere	김창현	2016.09.29.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
28	20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016 Improved Dissolution Behavior of Blonanserin Loading with PVP k-30 Using Rotary Evaporation	이원택	2016.09.29.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
29	20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016 Preparation of Celecoxib-loaded Polyoxalate Microspheres with Blending Condition for Control Release	송아성	2016.09.29.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
30	한국줄기세포학회 2017 동계학술대회 Effect of quercetin-functionalized duck's feet collagen/hydroxyapatite scaffolds using bone marrow-derived mesenchymal stem cells for bone healing	국연지	2017.01.12.	평창	대한민국
31	TERMIS-EU Evaluation of silymarin/duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration	전유신	2017.06.27.	DAVOS	SWITZERLAND
32	TERMIS-EU Effects of quercetin-functionalized collagen/hydroxyapatite composites for enhancing osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells	국연지	2017.06.27.	DAVOS	SWITZERLAND
33	FBPS'2017 A Comprehensive Study on Cartilage Regeneration Using Gellan-Gum.Chondroitin Sulfate Hybrid Hydrogel	최일남	2017.07.19.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
34	FBPS'2017 Evaluation of Silymarin/Duck's Feet-Derived Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration	전유신	2017.07.19.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
35	FBPS'2017 Smart Scaffolding Using Nature Originated Materials&Bioactive Molecular for Regenerative Medicine	국연지	2017.07.20.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
36	FBPS'2017 A Comparative Study on Duck's Feet and Porcine Collagen for Prompt Bone Regeneration	국연지	2017.07.20.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
37	FBPS'2017 Three-Dimensional Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffold for Chondrification:Role of Pore Size and Porosity	송정은	2017.07.20.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
38	FBPS'2017 Evaluation of quercetin loaded silk fibroin/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering	송정은	2017.07.20.	한국과학기술연구원 (KIST)	대한민국
39	TERMIS-AP Bone Regeneration Using Quercetin/Duck's Feet Derived Collagen/Hydroxyapatite scaffold	송정은	2017.09.22.	China Nantong	중국
40	2017 한국생체재료학회 추계학술대회 및 총회 Comparison of the bone regeneration effect of collagen derived from flippers and collagen derived from porcine	최민정	2017.10.19.	관교 차바이오킴플렉스	대한민국

– 연구 성과(국내 및 국제학술회의 발표) 첨부 문서 –

(1) 2014 term stem

Characterization and effect of inflammatory reaction of duck-feet derived collagen/plga hybrid scaffold

(TS22)

CHARACTERIZATION AND EFFECT OF INFLAMMATORY REACTION OF DUCK-FEET DERIVED COLLAGEN/PLGA HYBRID SCAFFOLD

S. M. Kim¹, H. Kuk¹, E. Y. Kim¹, J. E. Song¹, G. Khang¹

¹ Dept of BIN Fusion Tech of Chonbuk National University, Republic of Korea

Collagen consists of about 30% among proteins of body. As a extracellular matrix, collagen is important factor and affects on attachment, proliferation, differentiation, and migration of cells. So, we extracted collagen from feet of duck (DC) as a new collagen source and mixed with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), synthetic polymer approved by FDA as a biomaterial. DC/PLGA hybrid scaffold were fabricated and evaluated to confirm possibility as a construction for diverse application in tissue engineering. Collagen extracted from feet of duck is composed of most collagen type I. Duck-feet derived collagen based scaffold showed excellent compressive strength and porosity to be able to apply as a scaffold for bone regeneration. Moreover, anti-inflammatory study was conducted for in vivo application. As results, adding DC is affected on mechanical properties and cell proliferation, positively. Futhermore, inflammatory response was significantly reduced by adding DC. Thus, these results demonstrated DC has a potential as a material for tissue engineering.

Acknowledgment: This research was supported by NRF-2012M3A9C6050204, Bio-industry Technology Development Program (KMFAFF, 112007-05-2-SB010) and the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF.

(2) 2014 term stem

Wound healing using duck feet-derived collagen and polyvinyl alcohol scaffolds

(TS24)

WOUND HEALING USING DUCK FEET-DERIVED COLLAGEN AND POLYVINYL ALCOHOL SCAFFOLDS

J. H. Shin,¹ J. E. Song,¹ D. Lee¹ and G. Khang¹

¹ Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, 567 Baekje-daero, Jeonju, Korea 561-756

Skin consists of the epidermis and the dermis. Also it is the soft outer covering of body to protect inner tissues from external stimulus. Therefore, damaged skin such as from trauma, burn and chronic disease should be performed clinical treatment. For this reason, regeneration of skin has been focused as an important medical issue. In tissue engineering, the scaffold is usually used and studied as a frame of tissue formation. A common approach has been used biodegradable scaffolds to sustain and guide cell growth through the regeneration process. The role of the scaffold is to provide an artificial environment enabling cell adhesion, migration, and spreading thus allowing cell proliferation and extracellular matrix (ECM) synthesis. The purpose of this study was to develop a wound dressing made from a duck feet derived collagen (DC) which has enhanced healing effect.

The cross-linked hydrogel was prepared with poly(vinyl alcohol) (PVA) and DC using a freeze-thawing method. We prepared DC/PVA scaffolds contained 0, 10 wt% of DC and performed compressive strength, SEM analysis, swelling test and FT-IR for mechanical property and morphology of DC/PVA scaffold. For biocompatibility test, NIH/3T3 mouse fibroblasts were cultured

(3) 2014 term stem

Evaluation of the effect of hydroxyapatite (HAP) coated duck's feet collagen scaffolds for bone tissue engineering

(TS25)

EVALUATION OF THE EFFECT OF HYDROXYAPATITE (HAP) COATED DUCK'S FEET COLLAGEN SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

S. R. Cha,¹ E. Y. Kim,¹ J. E. Song¹ and G. Khang¹

¹Dept of BIN Fusion Tech & Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer-Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, 567 Baekje-daero, Jeonju Korea 561-756

In this study, we carried out the possibility of the application of duck's feet derived collagen from livestock waste for bone tissue engineering. We fabricated 2 and 3% DC sponges and then compare with hydroxyapatite (HAp) coated DC scaffolds. To analyze physical properties and morphology of HAp/DC scaffolds, compressive strength and scanning electron microscope (SEM) were conducted. Assays of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) are carried out to measured the attachment and proliferation of bone marrow stem cell (BMSc) in DC content of HAp/DC composite scaffolds. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to confirm the BMSc specific genetic marker. Overall, this study shows that HAp/DC scaffold have biocompatibility and good physical properties. Also HAp/DC scaffolds show having the possibility to use it as bone graft materials for tissue engineering application.

Acknowledgment: This research was supported by NRF-2012M3A9C6050204, Bio-Industry Technology Development Program (KMFAFF, 112007-05-2-5B010) and the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF.

(4) 2014 term stem

Evaluation of the duck's feet collagen

(TS29)

EVALUATION OF THE DUCK'S FEET COLLAGEN

H. K. Jeong,¹ S. E. Lee,¹ J. e. Song,¹ D. Lee,¹ and G. Khang¹

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer-Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, 567 Baekje-daero, Jeonju Korea 561-756

Collagen has properties that help migration, proliferation of cell. Also help construction of cell structure in formation. In collagen relation study, the collagen is known to have an effect of anti-inflammatory and antioxidant but it is too expensive. Therefore we extracted collagen from duck's feet. To evaluate the purity assessment of collagen, we performed SDS-page and GAG test. And the antioxidant effect of the duck's feet collagen is measured by DPPH test. This study was designed to investigate the effect of duck's feet collagen as a natural material on the local inflammatory reaction. The RT-PCR results showed specific mRNA expression related with immune response factor. And the possibility of cell proliferation were evaluated using an NIH/3T3 cells were seeded into duck's feet collagen substrate. Cell proliferation and viability were measured by MTT assay after 1, 2 and 3 days. As a result, the duck's feet collagen appear to be a promising approach for tissue engineering application due to excellent biocompatibility and anti-inflammatory effects.

Acknowledgment: This research was supported by NRF-2012M3A9C6050204, Bio-Industry Technology Development Program (KMFAFF, 112007-05-2-5B010) and the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF.

(5) 2015 Spring Meeting of the Korean Society for Biomaterials

Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In vitro and in vivo Study

PO-87

DUCK'S FEET DERIVED COLLAGEN SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY

Se Rom Chu¹, San Na Kim¹, Jeong Eun Song¹, Chan Hum Park², Dong Sam Suh¹ and Gilson Khang^{1,2}

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer-Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, gskhang@bnu.ac.kr

²Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

³RMS Division, SewonCellontech Co., Ltd. 801, Wooyoung Techno Center, 273-15 Seongsa 2-Ga 3-Dong, Seongdong-Gu, Seoul 133-831, Korea

In this study, we carried out the possibility of the application of duck's feet derived collagen from livestock waste for bone tissue engineering. We fabricated 2 and 3% DC sponges and then compared with hydroxyapatite (HAp) coated DC scaffolds. To analyze physical properties and morphology of HAp/DC scaffolds, FT-IR and SEM were conducted. Assays of MTT are carried out to measured the attachment and proliferation of bone marrow stem cell (BMSc) in DC content of HAp/DC composite scaffolds. RT-PCR was performed to confirm the BMSc specific genetic marker. For the immunohistochemistry staining, H&E and von Kossa staining were carried out. Overall, this study shows that HAp/DC scaffold have biocompatibility and good physical properties. Also HAp/DC scaffolds show having the possibility to use it as bone graft materials for tissue engineering application.

This research was supported by the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF and Technology Commercialization Support Program (KMFAFF 814005-03-1-HD020).

(6) 2015 The Polymer Society of Korea Spring Meeting

Evaluation of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering

IPS-305 이선의

Evaluation of Duck's Feet Derived Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering

이선의, 차세롬, 김은영, 송정은, 박찬홍¹, 서동삼², 강길선³ 전북대학교; ¹한림대학교; ²세원셀론텍

In this study, we carried out the possibility of the application of duck's feet derived collagen from livestock waste for bone tissue engineering. We fabricated 2 and 3% DC sponges and then compared with hydroxyapatite (HAp) coated DC scaffolds. To analyze physical properties and morphology of HAp/DC scaffolds, FT-IR and SEM were conducted. Assays of MTT are carried out to measured the attachment and proliferation of bone marrow stem cell (BMSc) in DC content of HAp/DC composite scaffolds. RT-PCR was performed to confirm the BMSc specific genetic marker. For the immunohistochemistry staining, H&E staining were carried out. Overall, this study shows that HAp/DC scaffold have biocompatibility and good physical properties. Also HAp/DC scaffolds show having the possibility to use it as bone graft materials for tissue engineering application. This research was supported by the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF and Technology Commercialization Support Program (KMFAFF 814005-03-1-HD020).

(7) 2015 The Polymer Society of Korea Spring Meeting

Characterization and Fabrication of Duck Feet-Derived Collagen and Polyvinyl Alcohol Scaffolds for Skin Regeneration

2PS-287 신재훈

Characterization and Fabrication of Duck Feet-Derived Collagen and Polyvinyl Alcohol Scaffolds for Skin Regeneration

신재훈, 송정은, 이동원, 박찬흠¹, 서동삼², 강길선[†] 전북대학교; ¹한림대학교; ²세원셀론텍

The purpose of this study was to develop a wound dressing made from a duck feet derived collagen (DC) with enhanced healing effect. The hydrogel was prepared with poly(vinyl alcohol) (PVA) and DC. We performed compressive strength, SEM, swelling test and FT-IR for mechanical property and morphology of DC/PVA scaffold. For biocompatibility test, NIH/3T3 mouse fibroblasts were cultured in the DC/PVA scaffold for 3days. Cell proliferation and viability were measured *via* MTT assay. 10% DC/PVA scaffold showed a higher biocompatibility in vitro and the better ability of cell adhesion and growth, compared to PVA scaffolds. The in vivo assay also revealed the better results in 10% DC/PVA scaffolds and improved the wound healing process in rats. In conclusion, the 10% DC/PVA scaffold is a potential wound dressing with enhanced wound healing effect. This research was supported by the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF and Technology Commercialization Support Program (KMFAFF 814005-03-1-HD020).

(8) 16회 한국 조직공학 재생의학회

Collagen Extraction from Duck's Foot and Fabrication of Collagen-based Scaffolds

Collagen Extraction from the Duck's Foot and Fabrication of Collagen-based Scaffolds

Soo Hyeon Kim¹, Chan Hum Park²

¹Nano Bio Regenerative Medical Institute, Hallym University; ²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, School of Medicine, Hallym University, Korea

Collagen constituting the extra cellular matrix (ECM) has been widely used as biocompatible materials for human use. In this connection, collagen had been isolated from bovine, porcine and rat name to few. However, all these methods are proving to be economically unfeasible. Therefore, collagen is considered as most expensive biomaterial which had limited its use only in research labs and not at the place where patients requiring can be benefited. In this study, we have carefully selected duck foot which is a livestock waste which can potentially solve this burning issue as it had totally no use in any other industry. A simple method not utilizing the use of harsh chemical had been employed to extract collagen from duck foot. The fabrication of collagen-based scaffolds using collagen extracted from the duck foot waste. The collagen extracted from the duck foot waste had been analyzed for SDS-PAGE and collagenase reaction test. We compared the characteristics of each scaffold via structural analysis using scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), cell infiltration and cell viability (CCK-8). To investigate the degradation of each scaffolds in vivo, they were implanted subcutaneously in rats and harvested 1, 2, 3 weeks after surgery. These results suggest that extracted collagen is biocompatible and is having resemblance with that of collagen available from other sources. In conclusion, we can extract collagen from duck's foot which is economically feasible than bovine and porcine collagen.

(9) 2015 TERMIS WORLD CONGRESS

Effect of DC/PLGA Scaffolds on the Attachment and Proliferation of Costal Cartilage Cells

826. Effect of DC/PLGA Scaffolds on the Attachment and Proliferation of Costal Cartilage Cells

S. Cha¹, S. Kim¹, J. Song¹, C. Park², D. Suh³, G. Khang¹;

¹Chonbuk National University, Jeonju, KOREA, REPUBLIC OF,

²Hallym Univ., Chuncheon, KOREA, REPUBLIC OF, ³Sewon Cellontech, seoul, KOREA, REPUBLIC OF.

(10) 2015 TERMIS WORLD CONGRESS

Collagen Extraction from the Duck's Foot and Fabrication of Collagen Patch for the Repair of Acute Tympanic Membrane Perforations

11:00 am-11:15 am

148. Collagen Extraction from the Duck's Foot and Fabrication of Collagen Patch for the Repair of Acute Tympanic Membrane Perforations

S. Kim, C. Park

Hallym University, Chuncheon, Republic of Korea

(11) 2015 TERMIS WORLD CONGRESS

Evaluation of the effect of Bone Differentiation of Bone Marrow Stem Cells on DC/DBP Sponges

848. Evaluation of the effect of Bone Differentiation of Bone Marrow Stem Cells on DC/DBP Sponges

H. Jeong¹, W. Lee¹, S. Cha¹, J. Song¹, C. Park², D. Suh³, G. Khang¹;

¹Chonbuk National University, Jeonju, KOREA, REPUBLIC OF,

²Hallym University, Chuncheon, KOREA, REPUBLIC OF, ³Sewon Cellontech, Seoul, KOREA, REPUBLIC OF.

(12) 2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS

Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Mg-Ca Particles and Synthetic Body Fluid Loaded Silk Fibroin Scaffold

PO-54

Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Mg-Ca Particles and Synthetic Body Fluid Loaded Silk Fibroin Scaffold

Na Keum Jang¹, Nirmalya Tripathy¹, Jeong Eun Song¹ and Gilson Khang¹

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

An ideal tissue engineering scaffold following characteristics such as biocompatibility, suitable porosity, pore size, sufficient mechanical strength and good cell affinity. Silk as a tissue engineering material has excellent biocompatibility, bioactivity, low immunity and ease of fabrication. On the other hand, We were also attraction attention from scientist as Mg-Ca alloys a biodegradable biomaterials for orthopedic applications. In this study, silk-fibroin hard and soft condition scaffolds were prepared coated with Mg-Ca particles Synthetic Body Fluid solution for bone tissue engineering. Structured mechanical characteristics all coated and non-coated samples by Gross image, FT-IR, SEM, Compressive strength analysis, Osteogenic differentiation of Bone Marrow Stem Cells was further confirmed through MTT, ALP, RT-PCR, SEM. Results suggest that Mg-Ca/SBF solution helps osteogenic differentiation of BMSC, and can be considered for potential applications as scaffolds for future tissue regeneration. This research was supported by the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF Bio-industry Technology Development Program (112007-05-3-SB010) and Technology Commercialization Support Program (814005-03-1-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(13) 2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF LOW-ACYL GELLAN GUM SPONGES COATED BY COLLAGEN SOLUTION

PO-55

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF LOW-ACYL GELLAN GUM SPONGES COATED BY COLLAGEN SOLUTION

Seon Eun Lee¹, Jeong Eun Song¹, Dong Sam Suh² and Gilson Khang^{1*}

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Biomaterials Sci Tech, Chonbuk National Univ, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

²Sewon Cellotech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongju, Gyeongsang-do, Seongdong gu, Seoul 133-831

In this study, we prepared the only low-acyl gellan gum (LAGG) sponges and the impregnated LAGG sponges in collagen solution. We used SEM microphotographs to compare porosity between non-impregnated LAGG sponges and impregnated LAGG sponges. NIH/3T3 cells were seeded on sponges and examined to evaluate the degree of cell viability, cell adhesion and proliferation. We confirmed the effect of collagen coating on anti-inflammatory and cell affinity. mRNA such as GAPDH, TNF- α , COX-2, IL-1 β and IL-6 were confirmed in order to determine the effect of inflammatory cytokines. Histological and immunocytochemistry analysis was used to evaluate the inflammatory responses by using hematoxylin-eosin section of sponges after 1 and 4 weeks of implantation. The impregnated LAGG sponges in collagen solution became more increase the cell proliferation and differentiation of cells than the LAGG sponges. In result, this study suggests that the LAGG sponges developed in this study has possibility of applications for medical materials of tissue regeneration with low inflammatory responses.

This research was supported by Bio-industry Technology Development Program (KMIFAF, 112007-05-2-SB010), Technology Commercialization Support Program (814005-03-1-HD020) and the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF.

(14) 2015 FALL MEETING OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS
IN VITRO&IN VIVO STUDY USING DC/DBP SCAFFOLDS FOR BONE
DIFFERENTIATION OF BONE MARROW STEM CELL

PO-56

**IN VITRO & IN VIVO STUDY USING DC/
DBP SCAFFOLDS FOR BONE
DIFFERENTIATION OF BONE MARROW
STEM CELL**

**Se Rom Cha¹, Jeong Eun Song¹, Chan Hum Park²,
Dong Sam Suh³ and Gilson Khang^{1*}**

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept of Polymer/Nano
Sci Tech, Chonbuk National Univ, E-mail: gskhang@jbru.ac.kr
²Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chunchon Sacred
Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University
³BMS Division, SewooCellontech Co., Ltd.

Biomaterials for bone tissue engineering with high bioactivity and
biocompatibility are highly required. Collagen is known to be the most
promising materials and diversely applied in bone tissue engineering due to
their excellent biocompatibility and biodegradability. Duck's feet collagen
(DC) is possess excellent adhesion ability and its extraction process takes
short time. However the DC has low mechanical properties. To solve this
problem, we prepared DC and demineralized bone particle (DBP)
composites. DBP is a natural bioactive material which powerfully induces
new bone growth. DBP is composed of collagen, calcium and proteoglycan.
In this study, we fabricated natural biomaterial sponges used to make DC/
DBP composite powder with different ratios of DC:DBP i. e 3:1, 1:1 and 1:3.
Bone marrow stem cells (BMSC) were seed on DC/DBP sponges and
confirmed porosity, compressive strength. Cell attachment, proliferation and
osteogenesis were observed by the SEM, MTT and ALP assay. RT-PCR was
performed to confirm the bone differentiation specific genetic marker. To
confirm bone forming *in vivo*, environment on DC/DBP sponges were
studied by histological staining. DC/DBP sponges showed the effect of bone
differentiation *in vivo* from H&E staining. This results suggest that DC/DBP
can provide suitable environment to BMSC and proper content affected on
culture condition to improve bone differentiation.

This research was supported by Bio-industry Technology Development
Program (112007-05-2-SB010), Technology Commercialization Support
Program (814005-03-1-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry
and Fisheries, Republic of Korea and the Brain Korea 21 PLUS Project,
NRF.

(15) The Polymer Society of Korea Fall Meeting

Silk Fibroin Scaffolds as a Transporter to Deliver Demineralized Bone
Particles for Bone Defect Treatment

IPS-249 국 헌

**Silk Fibroin Scaffolds as a Transporter to Deliver Demineralized Bone Particles for Bone
Defect Treatment**

국 헌, 김은영, Nirmalya Tripathy, 송정은, 김길선[†] 전북대학교

Silk fibroin has been widely used in tissue engineering due to its biocompatibility and
biodegradability. Demineralized bone particle (DBP) is well-known as an inducer of
osteogenesis. Herein, we have designed silk fibroin scaffolds loaded with DBP for bone
defect treatment. Structural properties were performed using SEM. And cell proliferation
activity and osteogenesis were evaluated by MTT and ALP assay. Various mRNA from
scaffolds were also collected and studied. Furthermore, histological staining
demonstrated enhancement in the nucleation sites of bone marrow mesenchymal stem
cells. Collectively, the enhancement in mechanical properties result in formation of bone
matrix and cell growth through establishment of structural connectivity of the fabricated
silk fibroin-DBP scaffolds. This research was supported by Bio-industry Technology
Development Program (112007-05-3-SB010), Technology Commercialization Support
Program (814005-03-1-HD020) and the Brain Korea 21 PLUS Project, NRF.

(16) The Polymer Society of Korea Fall Meeting

Effect of PLGA/Duck Feet-derived Collagen and hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Tissue Engineering

2PS-266 신재훈
 Effect of PLGA/Duck Feet-derived Collagen and Hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Tissue Engineering
 신재훈, 이대훈, 차재근, 송정은, 박찬홍, 서동삼, 강길선¹ 전북대학교; ²한림대학교; ³세원셀
 문텍
 Collagen has been widely used as a potential biomaterial. Collagen has low immunity, high biocompatibility. In this study, we fabricated PLGA and Duck Feet-derived collagen (DC) based scaffolds 10, 20, 40, 60, 80wt% were produced by salt leaching methods. And we confirm characteristics of PLGA and DC scaffolds by FT-IR, Compressive strength, SEM, and EDS. Also, osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) cultured in scaffold was evaluated by using alkaline phosphatase (ALP), MTT, RT-PCR, SEM. This study suggests that PLGA and DC scaffolds of easily produced and has possibility of applications for future usage in bone tissue engineering. This research was supported by Bio-Industry Technology Development Program (112007-05-3-SB010), Technology Commercialization Support Program (B14005-03-1-HD020), Republic of Korea.

(17) The Polymer Society of Korea Fall Meeting

Characterization of Silk/ β -Tricalcium Phosphate Scaffolds for the Bone Tissue Engineering

2PS-267 신재훈
 Characterization of Silk/ β -Tricalcium Phosphate Scaffolds for the Bone Tissue Engineering
 신재훈, 이대훈, 송정은, 박찬홍, 강길선¹ 전북대학교; ²한림대학교
 Silk is a potential material for biomedical applications. To increase osteoconductivity and osteoinductivity, we modified the mechanical property and osteoconductivity of silk with β -TCP. We checked the physical and chemical characterizations of silk/ β -TCP scaffolds using SEM, compressive strength, and FTIR, etc. Also, osteogenic differentiation

(18) 21차 이비인후과 종합학술대회

이비인후과 영역에서 사용 가능한 오리발 추출 콜라겐 및 실크 복합 지지체의 개발

HNOP-77 15:40~15:50
이비인후과 영역에서 사용 가능한 오리발 추출 콜라겐 및 실크 복합 지지체의 개발
 한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후-두경부외과학교실¹,
 나노바이오재생의학연구소²
 박혜성¹, 김수현², 김민재¹, 배승희¹, 이준호¹, 김동규¹, 박찬홍^{1,2}

(19) 21차 이비인후과 종합학술대회

Comparison of methods for repair of acute tympanic membrane perforations: Duck feet derived collagen patch vs. paper patch

OTOP-53 11:20~11:30
Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Duck feet derived collagen patch vs. paper patch
 Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, School of Medicine, Hallym University
 Jun Ho Lee*, Sohyeon kim, Dong-Kyu Kim, Hae Sang Park, Chan Hum Park.

(20) 2016 SPRING CONFERENCE OF THE KOREAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS

Effects of Duck Feet-derived Collagen/Poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Healing

PO-91

Effect of Duck Feet-derived Collagen/ Poly(lactic-co-glycolic acid)/Hydroxyapatite Scaffolds for the Bone Healing

Jae Geun Chu¹, Dae Hoon Lee¹, Jae Hun Shin¹, Yeon Ji Kook¹, Yoo Shin Jeon¹, Jeong Eun Song¹, Chan Hum Park², Dong Sam Suh³ and Gilson Khang^{1,4}

¹Department of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of Polymer/Nano Science& Technology, Chonbuk National University, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr
²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Hallym University
³Sewon Cellontech, 801, Wonyoung techno center, 273-15 Seongsu 2ga 3-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-831

Collagen has been widely used as a potential biomaterial. Collagen has low immunity, high biocompatibility. However, collagen is a lack of mechanical properties considerably. Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) is relatively biocompatible and biodegradable and has high mechanical strength. In this study, we fabricated PLGA/Hydroxyapatite(HAp) scaffolds containing different ratios of Duck's feet-derived collagen(DC). And then, they were produced by salt leaching methods. And we check characterization of DC/PLGA/HAp scaffolds using FT-IR, porosity, Compressive strength and SEM. Also, osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) cultured in scaffold was assessed by alkaline phosphatase (ALP), MTT, RT-PCR and SEM. In these results, 80wt% DC/PLGA/HAp scaffolds were higher cell viability and differentiation in comparison with other groups. This study suggests that 80wt% DC/PLGA/HAp scaffolds of easily produced and has possibility of applications for future usage in bone tissue engineering. This research was supported by Bio-industry Technology Development Program (112007-05-4-5B010), Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Republic of Korea.

(21) TERMIS-EU 2016 Conference

Potency of duck' s feet-derived collagen/poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 100B(1):171-179 (2016)

Potency of duck's feet-derived collagen/poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering

Jae Geun Chu¹, Dae Hoon Lee¹, Jae Hun Shin¹, Yeon Ji Kook¹, Yoo Shin Jeon¹, Jeong Eun Song¹, Chan Hum Park², Dong Sam Suh³ and Gilson Khang^{1,4}

¹Department of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of Polymer/Nano Science & Technology, Chonbuk National University, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr
²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Hallym University
³Sewon Cellontech, 801, Wonyoung techno center, 273-15 Seongsu 2ga 3-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-831, Republic of Korea

INTRODUCTION: Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) has been widely used as a non-resorbable because of its easy synthesis protocols. However, PLGA has some defects in causing inflammatory reaction due to the size of cell adhesion and society of degradation particles. On the other hand, collagen possesses about 30% of human protein, main component of ECM and used for cartilage, bone and skin regeneration source by its osteogenic and biodegradable nature. Therefore, duck's feet-derived collagen(DC) have defined related inflammatory reaction when mixed with PLGA [1]. Inspired by those properties of collagen, we have fabricated 80% DC/PLGA/hydroxyapatite (HAp) scaffolds to study its potential for bone tissue engineering. Further, we also studied the mechanical properties influence on osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

METHODS: DC (10, 20, 40, 60, 80 wt%) were fabricated via salt leaching method. All samples characteristics were checked by FTIR, compressive strength, porosity and SEM (Fig. 1). Also, osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) cultured in scaffold was evaluated by ALP assay, MTT assay, RT-PCR, SEM.

RESULTS: We found decrease in porosity with an increase DC content in scaffolds. In contrast, compressive strength was increased. In vivo studies showed cell proliferation and osteogenesis. DC concentration



Fig. 1. SEM images of 10, 20, 40, 60, 80 wt% DC scaffolds at a 10x magnification of 100 micrometers.



Fig. 2. Osteogenic Differentiation and Cell Proliferation of rBMSCs in DC/PLGA/HAp scaffolds was analyzed by ALP activity and MTT assay after 7, 14, 21, and 28 days.

Osteogenesis was increased with rising DC content. Slightly cell proliferation and osteogenic differentiation was higher in 80wt% DC/PLGA/HAp scaffold (Fig. 2).

DISCUSSION & CONCLUSIONS: This study showed the higher cell proliferation and osteogenesis in 80wt% DC/PLGA/HAp scaffold.

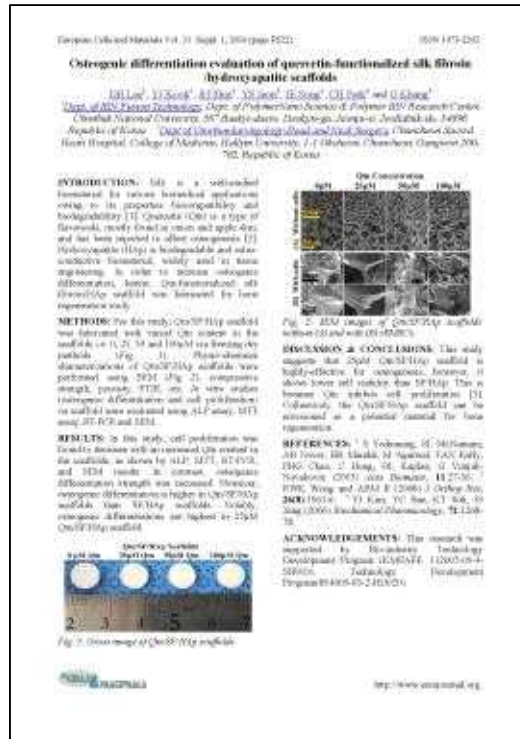
REFERENCES: 1. S. M. Kim, H. M. Kim, H. Kim, E. T. Kim, I. P. Song, D. S. Suh, C. H. Park, and D. Chung (2015). *Polymer Bulletin*, **59**(6):857-865.

ACKNOWLEDGEMENTS: This research was supported by Bio-industry Technology Development Program (112007-05-4-5B010), 359416, Technology Development Program (100005-03-2-HD020).

http://www.international.org

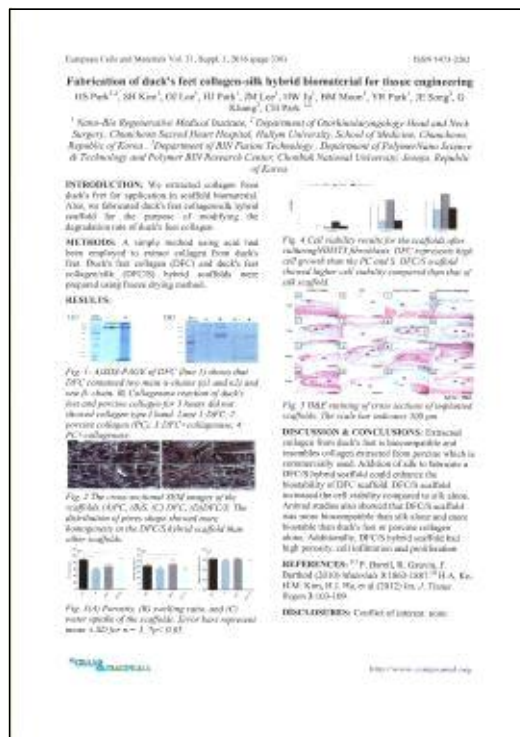
(22) TERMIS-EU 2016 Conference

Osteogenic differentiation evaluation of quercetin-functionalized silk fibroin/hydroxyapatite scaffolds



(23) Termis EU 2016 Conference

Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering



(24) Termis EU 2016 Conference

Development of an Artificial Dermis Using Duck's Feet Extract Collagen



(25) 2016 Termis AP

Evaluation of Osteogenesis from Duck's Feet-derived Collagen/Hydroxyapatite Sponges Immersed Medium with Dexamethasone



(26) 2016 Termis AP

Effect of Duck's Feet Derived Collagen and Ploy(Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffold on Bone Regeneration in Rat Calvarial Defect Model

Session No.: P6-206

Effect of Duck's Feet Derived Collagen and Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffold on Bone Regeneration in Rat Calvarial Defect Model

Jeong Eun Song¹, Jae Hun Shin¹, Dae Hoon Lee¹, Jae Geun Chu¹, Chan Hum Park², Dong Sam Suh¹, Gilson Gilson³

¹Chonbuk National University
²Hallym University
³Sewon Cellontech

Bone substitutes during bone defects should be used to natural bone-like biomaterial, biocompatible, mechanical stable etc. Collagen is one of bone organic matrix occupying, is highly suitable as biomaterials for bone regeneration. However, using alone as scaffold material is not possible because of its poor mechanical property. Therefore, to increase mechanical properties, we fabricated 0, 10, 20, 40, 60, 80 wt% DC/PLGA scaffold by mixing poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and collagen extracted from the duck's flippers (DC) using solvent casting/salt leaching method. The results of evaluating whether or not suitable for bone regeneration, it was confirmed that 80 wt% DC/PLGA scaffolds is most excellent bone regeneration capacity in vitro environment. Therefore, we investigated the in vivo environment in this study. In other words, this study evaluated the capability of PLGA and 80 wt% DC/PLGA scaffold when grafted in rat calvarial defect model. Also, Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) were seeded in scaffolds of two types. At 2, 4, 8 weeks after surgery, 2 and 3 dimensional micro-CT and histological analysis of calvarium was performed in vivo. These results showed that 80wt% DC/PLGA scaffold with rBMSC revealed higher bone regeneration capacity than another group. Thus, 80wt% DC/PLGA scaffold can be envisioned as an useful biomaterials for future bone regeneration applications. This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(27) 20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016

Drug Release Behavioural Study of Olmesartan-Loaded POX/PLGA Blend Microsphere

PO-91

Drug Release Behavioural Study of Olmesartan-Loaded POX/PLGA Blend Microsphere

Chang Hyun Kim¹, Ya Sung Song¹, Il Nam Choe¹, Do Kyung Kim¹, Nirmalya Tripathy¹, Jeong Eun Song¹, and Gilson Khang^{1*}

¹Department of BIN Convergence Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of PolymerNano Science&Technology, Chonbuk National University, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

Olmesartan is an angiotensin II receptor antagonist which has been used for the treatment of high blood pressure. For initial release and sustained release, microspheres were prepared by O/W solvent evaporation methods with various blending ratio of polyoxalate and poly(lactic-co-glycolic acid). This study investigates the release behavior according to the blending ratio of POX and PLGA. Morphological and Physiochemical properties of microspheres were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC) and Fourier transform infrared (FT-IR). The release behavior of olmesartan was investigated for 27 days in vitro by HPLC. The results showed that the drug release behavior and encapsulation efficiency (EE) and size of olmesartan loaded microsphere can be controlled by various blending ratio of POX and PLGA. This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(28) 20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016

Improved Dissolution Behavior of Blonanserin Loading with PVP k-30 Using Rotary Evaporation

PO-89

Improved Dissolution Behavior of Blonanserin Loading with PVP k-30 Using Rotary Evaporation

Won Taek Lee, Sung Hyun Jeon, Bo Ra Sim, Hyeon Park, Jeong Eun Song and Gilson Khang*

Department of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of PolymerNano Science&Technology, Chonbuk National University, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

Blonanserin(BLN) is a relatively new drug commercialized by Daiinippon Sumitomo Pharma in Japan and Korea for the treatment of schizophrenia. BLN is an antipsychotic drug having poor aqueous solubility. Therefore, reduced number of doses can be achieved by sustained release formulation of the drug. PVP is the most important hydrophilic carrier used for the preparation of oral controlled drug delivery systems. We analyzed surface of solid dispersed sample by scanning electron microscope(SEM) and X-ray diffraction(XRD) was used to analyze the crystallinity. Also the change of structure and crystallinity characteristic of solid dispersion tablet were analyzed by fourier-transform infrared spectoscopy(FT-IR). We prepared tablet with solid dispersion by direct compression and observed in vitro release behavior of solid dispersion from tablets in gastric juice.

This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(29) 20th Anniversary Internatilonal Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016

Preparation of Celecoxib-loaded Polyoxalate Microspheres with Blending Condition for Control Release

PO-87

Preparation of Celecoxib-loaded Polyoxalate Microspheres with Blending Condition for Control Release

Yah Seong Song, Chang Hyun Kim, Su Young Kim, Ill Nam Choi, Do Kyung Kim, Ha Yan Jeon, Dong won Lee and Gilson Khang*

Department of BIN Convergence Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of PolymerNano Science&Technology, Chonbuk National University, E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

The purpose of this study was to prepare and evaluate celecoxib-loaded microspheres from various combination ratio of two POX (POX) molecular weights i. e. 30K and 100K. POX was synthesized as an alternative for manufacturing drug-loaded microsphere and it could be successfully designed by O/W (oil-in-water) solvent-evaporation methods. Celecoxib-loaded POX microspheres were characterized for drug loading, size distribution, measurement of molecular weight, out/inner surface morphology and in vitro drug release. Physicochemical characters and morphology of prepared POX microspheres were evaluated by X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC), Fourier transform infrared (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM). Also, the degradation of microspheres by SEM and the drug release patterns were obtained from the in vitro test for 12 days. Through the study results, it shows that the source of the skin layer of celecoxib-loaded microspheres is comprised of POX and celecoxib was encapsulated within the microspheres.

This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(30) 한국줄기세포학회 2017 동계학술대회

Effect of quercetin-functionalized duck's feet collagen/hydroxyapatite scaffolds using bone marrow-derived mesenchymal stem cells for bone healing

P-3
Stem Cell Engineering
(Gene Engineering, Tissue Engineering, etc)

KSSCR 2017 Winter Conference

한국줄기세포학회

Effect of quercetin-functionalized duck's feet collagen/hydroxyapatite scaffolds using bone marrow-derived mesenchymal stem cells for bone healing

Yeon Ji Kook¹, Jae Geun Cha¹, Yoo Shin Jeon¹, Jeong Eun Song¹, Nirmalya Tripathy¹, Chan Hum Park², Dong Sam Suh³, Gilson Khang^{1,*}

¹Dept of BIN Fusion Tech, Polymer Process Res Center & Dept of Polymer/Biomaterials Tech, Chonbuk National Univ., 567 Baegje-daero, Jeonju 541-756, ²Dept of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chunchon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Oshneon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

Collagen is a biomaterial for biomedical applications because it has several attractive properties such as biocompatibility and biodegradability. Quercetin(Qtn) is a type of flavonoids found in fruit, and has been reported to affect bone metabolism. For increasing osteogenic differentiation, Qtn was used in combination with collagen as scaffolds. Hydroxyapatite(HAp) is biodegradable and osteoconductive. We determined the physical and chemical characterizations of Qtn/DC/HAp scaffolds using SEM, compressive strength, porosity, and FT-IR, etc. Also, osteogenic differentiation of rabbit bone marrow stem cells(rBMSCs) cultured in scaffold was evaluated by using ALP assay, MTT assay, RT-PCR, and SEM. These results showed that 25µM Qtn/DC/HAp sponge increased cell proliferation and osteogenic differentiation of rBMSCs in vitro during 4 weeks. From these results, it could be suggested that 25µM Qtn/DC/HAp sponge can be applied as one of potential biomaterials for bone regeneration.

Acknowledgments: This research was supported by Bio-industry Technology Development Program(KMFAFF, 112007-05-4-SE010), Technology Commercialization Support Program(814005-03-2-HD000).

(31) TERMIS-EU

Evaluation of silymarin/duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration

P215 Evaluation of silymarin/duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration
YooShin Jeon, Hansol Kim

(32) TERMIS-EU

Effects of quercetin-functionalized collagen/hydroxyapatite composites for enhancing osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

P015 Effects of quercetin-functionalized collagen/hydroxyapatite composites for enhancing osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells
Yeon ji Kook, Jong Ho Park, Ok Kyun Choi, Jae Geun Cha, Jeong Eun Song, Nirmalya Tripathy, Chan Hum Park, Dong Sam Suh, Gilson Khang

(33) FBPS'2017

A Comprehensive Study on Cartilage Regeneration Using Gellan-Gum/Chondroitin Sulfate Hybrid Hydrogel

PO-17
A Comprehensive Study on Cartilage Regeneration Using Gellan-Gum/Chondroitin Sulfate Hybrid Hydrogels

InamChoi, JeongEun Song, Jongseon Baek, HaYan Jeon, and Gilson Khang^{1,*}

¹Department of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center, Department of Polymer Nano Science & Technology, Chonbuk National University
(*gskhang@jbn.u.ac.kr)

Gellan gum is a heterosaccharide composed of rhamnose, glucuronic acid and glucose. It is a colorless tasteless odorless powder extracted from aquatic plants in Erodium. It is a biomaterial mainly used in modern tissue engineering. The chondroitin sulfate(CS) has been found to induce slow, sustained relief for osteoarthritis(OA) patients worldwide. It has been also proven structurally improved arthritis drug that can relieve, delay or stabilize joint inflammation in many animal experiments and clinical trials, thus providing symptom relief in long-term. In this study, we investigated the effect of gellan gum scaffolds containing chondroitin for treating osteoarthritis in vitro. The content of chondroitin hybride in the scaffolds were set to 10, 20 and 30%, and scaffolds was prepared by hydrogel type. SEM was performed to characterize the scaffolds. The cell adhesion and proliferation rate were confirmed by MTT assay and gene expression by RT-PCR. In addition, the compressive strength test were performed to confirm mechanical strength. Overall results showed that 20%CS/GG scaffolds was best suitable for adhesion, proliferation rate and gene expression and can be potentially applied for cartilage regeneration.

This research was supported by Bio-industry Technology Development Program (112007-05-4-SB010), Technology Commercialization Support Program (814005-03-2-HD020), Republic of Korea.

(34) FBPS'2017

Evaluation of Silymarin/Duck's Feet-Derived Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration

PO-19
Evaluation of Silymarin/Duck's Feet-Derived Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration

Yoo Shin Jeon, Yeon Ji Kook, Han Sol Kim, Jeong Eun Song, Nirmalya Tripathy and Gilson Khang^{*}

¹Department of Polymer Nano Science and Technology, Department of BIN Fusion Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 54896, Republic of Korea
(*gskhang@jbn.u.ac.kr, Tel: +82-10-9111-7579)

Tissue engineered scaffolds are promising alternative for bone regeneration. In this study, we have designed biocompatible and biodegradable collagen sponges by blending silymarin and hydroxyapatite as an alternative for bone regeneration. The morphological and structural properties of scaffold were analyzed using scanning electron microscope (SEM), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and MTT assay for cell proliferation, ALP assay for osteogenic differentiation of cell, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for expression of mRNAs and histological analysis. Furthermore, in vitro biological compatibility was studied using rabbit bone marrow stem cells (rBMSCs). The prepared scaffold showed high porosity and had a sponge-like compressive strength. Results showed that the Smn/DC/HAp scaffold efficiently enhances the rBMSCs adherence, growth and maintains cell morphology, formation of cell junctions and gene expression required for functional rBMSCs. Thus, the results suggest that collagen sponge has an excellent environment as carrier and silymarin plays a role to improve biological properties. Overall results showed that incorporation of Smn/DC/HAp can be potentially applied as suitable alternative for high level bone tissue expansion and transplantation.

Acknowledgment: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD020), Ministry of Trade, Republic of Korea.

(35) FBPS'2017

Smart Scaffolding Using Nature Originated Materials&Bioactive Molecular for Regenerative Medicine

PO-57
Smart Scaffolding Using Nature Originated Materials & Bioactive Molecular for Regenerative Medicine.

Yeon Ji Kook, Jingwen Tian, Min Joung Choi, Jeong Eun Song and Gilson Khang*

Department of PolymerNano Science and Technology, Department of BIN Fusion Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 54896, Republic of Korea
(*gskhang@jbnu.ac.kr, Tel: +82-10-9111-7579)

Quercetin (Qtn) is a flavonoid materials and is known for enhancing the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cell and osteoblastic MC3T3-E1 cells. Collagen is mainly used for cartilage, bone and skin regeneration due to its well-known biocompatibility, biodegradability. We prepared duck's feet collagen solution and mixed quercetin with different ratios and then lyophilized. We evaluated porosity, compressive strength, MTT assay, ALP assay, SEM, RT-PCR, and etc. We found tendency related decrease in porosity with increasing Qtn content in the sponges. In contrast, compressive strength was increased. Notably, cell proliferation and osteogenic differentiation are highest in 25µM. RT-PCR result showed that real-time quantitative (RQ) values of OCN, RUNX-2 and COL1 on the 25µm Qtn/DC/HAp sponges displayed highest expressions. In vivo test showed that 25Qtn/DC/HAp is highest bone volume and bone mineral density. Conclusively, 25µM/DC/HAp sponges can be envisioned as a promising biomaterial for bone regeneration.

Acknowledgment: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD020), MIAFF, Republic of Korea.

(36) FBPS'2017

A Comparative Study on Duck' s Feet and Porcine Collagen for Prompt Bone Regeneration

PO-59
A Comparative Study on Duck's Feet and Porcine Collagen for Prompt Bone Regeneration

Yeon Ji Kook, Tian Jingwen, Min Joung Choi, Jeong Eun Song, Nirmalya Tripathy, and Gilson Khang*

Department of PolymerNano Science and Technology, Department of BIN Fusion Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 54896, Republic of Korea
(*gskhang@jbnu.ac.kr, Tel: +82-10-9111-7579)

Collagen, in the form of various structures and in combinations, have been used in tissue engineering studies since collagen networks define most human tissues and can form three-dimensional architecture to entrap other ingredients. In this study, we presented a comparative study on the efficiencies of different types of collagens i.e. duck's feet (DC) & porcine collagen (PC) for bone regeneration in vitro. Both DC and PC sponge have shown elliptical pore morphology with a higher porosity for DC sponge compared to the PC sponges. Furthermore, we performed in vitro analysis such as MTT assay, ALP assay, RT-PCR and histological assay. Results showed that cell viability and ALP activity of DC sponge have similarities with PC sponges. However, the in vivo outcomes demonstrated that the PC sponges promptly stimulated formation of new bone in SD rat models than DC sponges, with insignificant bone volume differences between DC and PC sponges. Collectively, DC sponges were suggested as potential candidates for bone tissue regeneration.

Acknowledgment: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD020), MIAFF, Republic of Korea.

(37) FBPS'2017

Three-Dimensional Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffold for Chondrification: Role of Pore Size and Porosity

PO-60
Three-Dimensional Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffold for Chondrification: Role of Pore Size and Porosity

Jeong Eun Song¹, Nirmalya Tripathy¹, Se Rom Cha¹, Sung Hyun Jeon², Soon Yong Kwon², Dong Sam Suh³ and Gilson Khang^{1,*}

¹Department of BIN Convergence Technology, Department of Polymer Nano Science & Technology and Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, 567, Beackje-daero, Deokjin, Jeonju, 561-756, Republic of Korea

²Department of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, 62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Republic of Korea

³Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongsu, 2ga 3-dong, Seongdong gu, Seoul 133-831, Republic of Korea
(*gskhang@jbu.ac.kr, Tel: +82-10-9111-7579)

In this study, three-dimensional scaffolds based on blends of duck's feet collagen (DC) and Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) with different pore sizes i.e. 90-180, 180-250, 250-355 and 355-425 μm were prepared using solvent casting/salt leaching approach. As-fabricated scaffolds were characterized by SEM, pore size and porosity. The cell proliferation and gene expression were investigated after culturing nasal chondrocytes on each scaffolds using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and qRT-PCR. In vivo histological staining was performed in nude mice as models. The biological evaluation showed a pore-size dependent chondrification at different time points. Especially, the 355-425 μm DC/PLGA scaffold showed a highest positive impact on maintenance of cell proliferation, costal chondrocyte phenotype and increased GAG accumulation than the other groups. These results indicated that DC/PLGA scaffolds with pore size ranging from 200-425 μm can be considered as highly-suitable constructs for enhanced chondrification.

Acknowledgment: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (B14005-03-3-HD020), MEF&T, Republic of Korea.

(38) FBPS'2017

Evaluation of quercetin loaded silk fibroin/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering

PO-61
Evaluation of Quercetin Loaded Silk Fibroin/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Jeong Eun Song, Dae Hoon Lee, Nirmalya Tripathy, Yeon Ji Kook, Jae Geun Cha, Gilson Khang*

Department of BIN Convergence Technology, Department of Polymer Nano Science & Technology and Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, 567, Beackje-daero, Deokjin, Jeonju, 561-756, Republic of Korea
(*gskhang@jbu.ac.kr, Tel: +82-10-9111-7579)

Silk is a well-studied biomaterial for various biomedical applications owing to its properties biocompatibility and biodegradability. Quercetin (Qtn) is a type of flavonoids, mostly found in onion and apple skin, and has been reported to affect osteogenesis, anti-inflammatory and antioxidant. Hydroxyapatite (HAp) is biodegradable and osteo-conductive biomaterial, widely used in tissue engineering. In order to increase osteogenic differentiation, 0, 0.03, 0.05 and 0.1 wt% Qtn-functionalized silk fibroin/HAp scaffold was fabricated for bone regeneration study. In this study, cell proliferation was found to decrease with an increased Qtn content in the scaffolds, as shown by ALP, MTT, RT-PCR, and SEM results. In contrast, osteogenic differentiation strength was increased. However, osteogenic differentiation is higher in Qtn/SF/HAp scaffolds than SF/HAp scaffolds. Notably, osteogenic differentiations are highest in 0.03 wt% Qtn/SF/HAp scaffold.

Acknowledgment: This study was the Bio & Medical Technology Development Program (NRF-2012M3A9C6050204) and Technology Commercialization Support Program (B14005-03-3-HD020), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

(39) TERMIS-AP

Bone Regeneration Using Quercetin/Duck's Feet Derived Collagen/Hydroxyapatite scaffold

Bone Regeneration Using Quercetin/Duck's Feet Derived Collagen/Hydroxyapatite Scaffold

Jeong Eun Song
Department of BIN Convergence Technology

Quercetin (Qtn) is a flavonoid materials and is known for enhancing the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cell. Collagen is mainly used for cartilage, bone and skin regeneration due to its well-known biocompatibility, biodegradability. We prepared duck's feet collagen solution and mixed quercetin with different ratios and then lyophilized. We evaluated porosity, compressive strength, MTT assay, ALP assay, SEM, RT-PCR, and etc. We found tendency related decrease in porosity with increasing Qtn content in the sponges. In contrast, compressive strength was increased. Notably, cell proliferation and osteogenic differentiation are highest in 25µM. RT-PCR result showed that real-time quantitative (RQ) values of OCN, RUNX-2 and COL1 on the 25µM Qtn/DC/HAp sponges displayed highest expressions. In vivo test showed that 25Qtn/DC/HAp is highest bone volume and bone mineral density. Conclusively, 25µM/DC/HAp sponges can be envisioned as a promising biomaterial for bone regeneration. Acknowledgment: This research was supported by Technology Commercialization Support Program (814005-03-3-HD020), MIFAFF, Republic of Korea.

(40) 2017 한국생체재료학회 추계학술대회 및 총회

Comparison of the bone regeneration effect of collagen derived from flippers and collagen derived from porcine

PO-106 Comparison of the bone regeneration effect of collagen derived from flippers and collagen derived from porcine

Min Joung Choi¹, Yeon Ji Kook¹, Tian Jingwen², Jeong Eun Song¹, and Gilson Khang^{1*}

¹Department of BIN Convergence Technology, Department of Polymer/Nano Science and Technology, Chonbuk National University ²Department of Orthopaedic Surgery, Medical School and Research Institute of Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 54896, Republic of Korea

*E-mail: gskhang@jbn.u.ac.kr

다. 생명자원(생물자원)/화합물

- 해당사항없음 -


라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품중, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	자외선을 이용한 콜라겐 필름의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 콜라겐 필름 및 콜라겐 필름을 이용하여 제조된 생체재료	대한민국	세원셀론택(주)	2015. 06.03.	10-2015-0078507	-	-	-	1/1

2	콜라겐의 수득률을 높이는 방법 및 이를 이용하여 제조된 콜라겐	대한민국	세원셀론텍(주)	2015.11.23.	10-2015-0164277	-	-	-	1/1
3	고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치	대한민국	한림대학교산학협력단	2015.11.24.	10-2015-0164964	-	-	-	1/1
4	진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체	대한민국	한림대학교산학협력단	2016.09.29.	10-2016-0125373	-	-	-	1/1
5	콜라겐의 수득율을 높이는 방법	대한민국	세원셀론텍(주)	2015.11.23.	10-2015-0164277	세원셀론텍(주)	2016.10.20.	10-1669478	1/1
6	오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 이식재와 그 제조방법	대한민국	전북대학교산학협력단	2016.12.28.	10-2016-0180681	-	-	-	1/1
7	지혈용 다공성 스펀지 및 그 제조방법	대한민국	한림대학교산학협력단	2017.07.07.	10-2017-0086481	-	-	-	1/1
8	고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법에 의해 재생용 콜라겐	대한민국	한림대학교산학협력단	2015.11.24.	10-2015-0164964	한림대학교산학협력단	2017.09.07.	10-1778386	1/1

- 연구 성과(지식재산권) 첨부 문서 -

(1) 자외선을 이용한 콜라겐 필름의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 콜라겐 필름 및 콜라겐 필름을 이용하여 제조된 생체재료

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0142758 (43) 공개일자 2016년12월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/24 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01) A61K 8/02 (2006.01) A61K 8/65 (2006.01) A61L 16/32 (2006.01) A61L 17/10 (2006.01) C08J 6/18 (2006.01)	(71) 출원인 세원셀론텍(주) 서울특별시 영등포구 의사당대로 83, 한국에이치피빌딩 (여의도동)	(72) 발명자 이준호
(52) CPC특허분류 A61L 27/24 (2013.01) A61K 47/42 (2013.01)	(21) 출원번호 10-2016-0025744(분할) (22) 출원일자 2016년03월03일 심사청구일자 2016년03월08일	유지결
(62) 원출원 원출원일자 2015년06월03일 심사청구일자 2015년06월03일	특허 10-2015-0078607 원출원일자 2015년06월03일 심사청구일자 2015년06월03일	(74) 대리인 특허법인 남양
전체 청구항 수 : 총 13 항		
(54) 발명의 명칭 자외선을 이용한 콜라겐 필름의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 콜라겐 필름 및 콜라겐 필름을 이용하여 제조된 생체재료		
이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 814006-03 부처명 농림축산식품부 연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원 연구사업명 기술사업화지원사업 연구과제명 오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화 기여율 1/1 주관기관 세원셀론텍(주) 연구기간 2014.10.15 - 2017.10.14		


(2) 콜라겐의 수득률을 높이는 방법 및 이를 이용하여 제조된 콜라겐

출원번호통지서

출원일자 2015.11.23
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2015-0164277 (접수번호 1-1-2015-1142496-52)
 출원인명칭 세원셀론텍(주)(1-2006-035015-7)
 대리인성명 특허법인 남양(9-2015-100081-5)
 발명자성명 이준호 유지철 정형우 최상범 서동삼 장정호
 발명의명칭 콜라겐의 수득률을 높이는 방법 및 이를 이용하여 제조된 콜라겐

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 814005-03
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 기술사업화지원사업
 연구과제명 오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화
 기여율 1/1
 주관기관 세원셀론텍
 연구기간 2014.10.15 ~ 2017.10.14

(3) 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치

	(19) 대한민국특허청(KR)	(45) 공고일자 2017년09월13일
	(12) 등록특허공보(B1)	(11) 등록번호 10-1778386
		(24) 등록일자 2017년09월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 9/70 (2006.01) A61K 38/01 (2006.01) A61K 47/08 (2006.01) A61K 47/16 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)		(73) 특허권자 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(52) CPC특허분류 A61K 9/7023 (2013.01) A61K 38/014 (2013.01)		(72) 발명자 박관흠
(21) 출원번호 10-2015-0164964		김수현
(22) 출원일자 2015년11월24일 심사청구일자 2015년11월24일		
(65) 공개번호 10-2017-0060477		(74) 대리인 특허법인 티앤아이
(43) 공개일자 2017년06월01일		
(56) 선행기술조사문헌 KR1020120076901 A KR1020120103773 A		
전체 청구항 수 : 총 16 항		심사관 : 최인철
(54) 발명의 명칭 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치		
이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 <u>814005-03-2-HD030</u> 부처명 농림축산식품부 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원 연구사업명 <u>기술사업화지원</u> 연구과제명 <u>오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발</u> 기여율 1/1 주관기관 한림대학교 산학협력단 연구기간 2015.10.15 ~ 2016.10.14		

(4) 진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체

출원 번호 통지서

출원 일자 2016.09.29
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2016-0125373 (접수번호 1-1-2016-0945254-99)
 출원인 명칭 한림대학교 산학협력단(2-2007-019517-5)
 대리인 성명 특허법인 티앤아이(9-2014-100061-6)
 발명자 성명 박찬홍 문보미 박현정 박예리 이옥주 이정민 정주연 주형우 연응규 김순희
 발명의 명칭 진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 814005-03-2-HD030
【부처명】 농림축산식품부
【연구관리전문기관】 농림수산식품기술기획평가원
【연구사업명】 기술사업화지원
【연구과제명】 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발
【기여율】 1/1
【주관기관】 한림대학교 산학협력단
【연구기간】 2015.10.15 ~ 2016.10.14

(5) 콜라겐의 수득율을 높이는 방법

<p>(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)</p>	<p>(45) 공고일자 2016년10월26일 (11) 등록번호 10-1669478 (24) 등록일자 2016년10월20일</p>
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 14/78 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01) (52) CPC특허분류 C07K 14/78 (2013.01) C12N 13/00 (2013.01) (21) 출원번호 10-2016-0164277 (22) 출원일자 2016년11월23일 심사청구일자 2016년11월23일 (56) 선행기술조사문헌 KR1020120084189 A KR1020140118753 A* KR1020150102865 A KR1020110068948 A* *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p>	<p>(73) 특허권자 세원셀론텍(주) 서울특별시 영등포구 의사당대로 83, 한국에이치피빌딩 (여의도동) (72) 발명자 이준호 [Redacted] 유지철 [Redacted] (74) 대리인 특허법인 남양</p>
<p>전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 손영희</p>	
<p>(54) 발명의 명칭 콜라겐의 수득율을 높이는 방법</p>	
<p>이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 814005-03 부처명 농림축산식품부 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원 연구사업명 기술사업화지원사업 연구과제명 오리발 유래 콜라겐을 활용한 생체재료 개발 및 상용화 기 여 율 1/1 주관기관 세원셀론텍 연구기간 2014.10.15 - 2017.10.14</p>	


(6) 오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법

출원번호통지서	
출원일자	2016.12.28
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(10655)
출원번호	10-2016-0180681 (접수번호 1-1-2016-1283370-61)
출원인명칭	전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9)
대리인성명	황이닝(9-1998-000610-1)
발명자성명	강길선 송정은 이대훈 차재근
발명의명칭	오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】	
【과제고유번호】	<u>814005-03-3-HD020</u>
【부처명】	농림축산식품부
【연구관리 전문기관】	농림수산식품기술기획평가원
【연구사업명】	<u>기술사업화지원사업</u>
【연구과제명】	<u>오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근골격계용 의료용 생체 재료 개발</u>
【기여율】	1/1
【주관기관】	전북대학교 산학협력단
【연구기간】	2014. 10. 15 ~ 2017. 10. 14

(7) 지혈용 다공성 스펀지 및 그 제조방법

출원번호통지서	
출원일자	2017.07.07
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P2017295)
출원번호	10-2017-0086481 (접수번호 1-1-2017-0652529-90)
출원인명칭	한림대학교 산학협력단(2-2007-019517-5)
대리인성명	특허법인(유)화우(9-2006-100002-2)
발명자성명	박찬홍 박현정 박예리 이옥주 주형우 서예빈 이지승
발명의명칭	지혈용 다공성 스펀지 및 그 제조방법
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】	
【과제고유번호】	<u>814005-03-3-HD030</u>
【부처명】	농림축산식품부
【연구관리 전문기관】	농림수산식품기술기획평가원
【연구사업명】	<u>기술사업화지원</u>
【연구과제명】	<u>오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발</u>
【기여율】	1/1
【주관기관】	한림대학교 산학협력단
【연구기간】	2016. 10. 15 ~ 2017. 10. 14

(8) 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)		(45) 공고일자 2017년09월13일 (11) 등록번호 10-1778386 (24) 등록일자 2017년09월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 9/70 (2006.01) A61K 38/01 (2006.01) A61K 47/08 (2006.01) A61K 47/16 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)	(73) 특허권자 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥원동)	(72) 발명자 박관흠
(52) CPC특허분류 A61K 9/7023 (2013.01) A61K 38/014 (2013.01)	(21) 출원번호 10-2015-0164964 (22) 출원일자 2015년11월24일 심사청구일자 2015년11월24일	(74) 대리인 특허법인 티앤아이
(65) 공개번호 10-2017-0060477 (43) 공개일자 2017년06월01일 (56) 선행기술조사문헌 KR1020120076901 A KR1020120103773 A	전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 최인철	
(54) 발명의 명칭 고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치		
이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 814005-03-2-HD030 부처명 농림축산식품부 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원 연구사업명 기술사업화지원 연구과제명 <u>오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발</u> 기여율 1/1 주관기관 한림대학교 산학협력단 연구기간 2015.10.15 - 2016.10.14		

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

- 해당사항없음 -

바. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	연구인력	2015		1			1		1					
2	연구인력	2015	1				1							1
3	연구인력	2016		1			1			1				
4	연구인력	2016		1				1						1

사. 산업기술 인력양성

- 해당사항없음 -

아. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	전용실시권	진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체	주식회사 엔비알테크	2017.05.01.	2,000,000 원	2,000,000 원
2	전용실시권	오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법	주식회사 엔비알테크	2017.10.11.	3,000,000 원	3,000,000 원

- 기술거래(이전) 첨부 문서 -

(1) 진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체

기술이전계약서

(기술명: "진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체")

※ 기술이전계약 대상기술의 출처 정보

- 부 치 명 : 농림축산식품부
- 연구개발과제명 : 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 생체재료 개발 (814005-03-3-HD030)
- 총연구기간 : 2015. 10. 15 ~ 2017. 10. 14
- 총연구개발비 : 27,000,000 원(정부출연금: 27,000,000 원, 기업부담금: 0원)
- 기술실시 계약명 : 진피 대체용 지지체의 제조방법 및 그 방법에 따라 제조된 진피 대체용 지지체
- 기술료 : 2,000,000원(VAT포함)
- 계약기간 : 1년(2017. 5. 1 ~ 2018. 4. 30)
- 계약당사자
(갑) 주관연구기관 : 한림대학교 산학협력단
(을) 실시기업(참여기업) : 주식회사 엔비알테크

2017년 5월 1일

한림대학교 산학협력단장 최성찬 (인)

주식회사 엔비알테크 대표이사 주형우 (인)
이정민 (인)

(2) 오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법

기술이전 계약서

전북대학교 공과대학 교수 강길선(이하 '기술개발자'라 한다)이 개발하여 전북대학교 산학협력단(이하 '甲'이라 한다)이 보유하고 있는 "오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법(특허출원번호 : 10-2016-0180681)"에 관하여 주식회사 엔비알테크(이하 '乙'이라 한다)에 실시권을 허여하고자 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.

제1조(목적)
본 계약은 "甲"이 개발하여 보유하고 있는 "오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 골 이식재와 그 제조방법(특허출원번호 : 10-2016-0180681)"(이하 "본 기술"이라 한다)에 대한 프로그램에 대해서 전용실시권 허여 및 이의 활용에 있어서 양 당사자의 권리 및 의무를 규정하는 것을 목적으로 한다.

제2조(신의성실 및 상호 협조)
① "甲"과 "乙"은 신의를 가지고 본 계약의 내용을 성실히 이행하여야 한다.
② 양 당사자는 본 기술 내용에 관하여 서로 협의하여야 하며, "甲"과 "乙"은 필요한 사항에 관하여 상호 적극 협조하여야 한다.
③ "甲"과 "乙"은 본 기술의 실시를 허여 받지 아니한 제3자의 실시에 대한 증거확보에 노력하여야 하고, 확보된 증거에 대하여는 상호 이를 서면으로 통지하고 필요한 조치를 위하여 협조하여야 한다.

제3조(지식재산권에 대한 보증)
① "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 본 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다.
② 당사자 일방은 지식재산권에 대한 권리의 전부 또는 일부를 상대방의 동의 없이 포기할 수 있다. 단, 포기 2개월 전까지 그 사실을 상대방에게 서면 통지하여야 하며, 상대방의 비용부담 및 요청에 따라 권리를 이전하여야 한다.

제4조(실시기간)
① 전용실시권의 허여기간은 2017년 10월 11일부터 2018년 10월 10일로 하며, 계약 종료일까지 본 기술에 대한 산업재산권 획득 및 유지비용은 "乙"의 부담으로 한다.
② "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의

자. 사업화 투자실적
- 해당사항없음 -

차. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	매출액		매출 발생년도	기술 수명
						국내	국외		
1	자기실시	기술보유자의 직접사업화	국내 & 국외	연구용 오리발 콜라겐 판매 사업	연구용, 화장품 제조용 목적으로 오리발 유래 콜라겐을 조해하여 제형으로 판매한다.	1,417.8 만원	-	2016, 2017	10년

- 사업화 현황 첨부 문서 -

(1) 거래일자: 2016년 5월 03일

거래일자		거래명세표										
2016년 5월 3일												
공급자	등록번호	[Redacted]								등록번호	206-85-21463	
	상호 (법인명)	[Redacted]								상호 (법인명)	세원셀론텍(주) 성명 장정호	
	사업장 주소	[Redacted]								사업장 주소	서울시 성동구 아차산로 144	
	담당자	[Redacted]								전화	02-460-9705	팩스
배송지 주소		[Redacted]										
배송 방법		배송팀 배송										
공급 가액	1,200,000	세액	120,000	합계 금액	1,320,000						[Redacted]	
월 일	품 목(품목코드)	규 격	수 량	단 가	공급가액	세 액	비고					
5 3	오리발 콜라겐 파우더(1g)	EA	1	1,200,000	1,200,000	120,000						

(2) 거래일자: 2016년 7월 08일

거래일자		거래명세표										
2016년 7월 8일												
공급자	등록번호	[Redacted]								등록번호	206-85-21463	
	상호 (법인명)	[Redacted]								상호 (법인명)	세원셀론텍(주) 성명 장정호	
	사업장 주소	[Redacted]								사업장 주소	서울시 성동구 아차산로 144	
	담당자	[Redacted]								전화	02-460-9705	팩스
배송지 주소		[Redacted]										
배송 방법		배송팀 배송										
공급 가액	4,800,000	세액	480,000	합계 금액	5,280,000						[Redacted]	
월 일	품 목(품목코드)	규 격	수 량	단 가	공급가액	세 액	비고					
7 8	오리발 콜라겐파우더	1g	4	1,200,000	4,800,000	480,000						

(3) 거래일자: 2016년 12월 30일

거래일자		거래명세표																
2016년 12월 30일																		
공급받는자	등록번호					등록번호	2	0	6	-	8	5	-	2	1	4	6	3
	상호 (법인명)					상호 (법인명)	세원셀론텍(주)				성명	장정호						
	사업장 주소					사업장 주소	서울시 성동구 아차산로 144											
	담당자			전화			전화	02-460-9705		팩스	02-460-9725							
배송지 주소																		
배송 방법		배송팀 배송																
공급가액	6,000,000		세액	600,000		합계금액	6,600,000											
월	일	품목(품목코드)	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고										
12	30	오리발 클라겐파우더	1g	5	1,200,000	6,000,000	600,000											

(4) 거래일자: 2017년 11월 16일

거래일자		거래명세표																
2017년 11월 16일																		
공급받는자	등록번호					등록번호	2	0	6	-	8	5	-	2	1	4	6	3
	상호 (법인명)					상호 (법인명)	세원셀론텍(주)				성명	장정호						
	사업장 주소					사업장 주소	서울시 성동구 아차산로 144											
	담당자			전화			전화	02-460-9705		팩스	02-460-9725							
배송지 주소																		
배송 방법																		
공급가액	1,980,000		세액	198,000		합계금액	2,178,000											
월	일	품목(품목코드)	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고										
11	16	오리발콜라겐		2	990,000	1,980,000	198,000											

카. 표준화

- 해당사항없음 -

타. 기술요약정보

- 해당사항없음 -

파. 보고서 원문

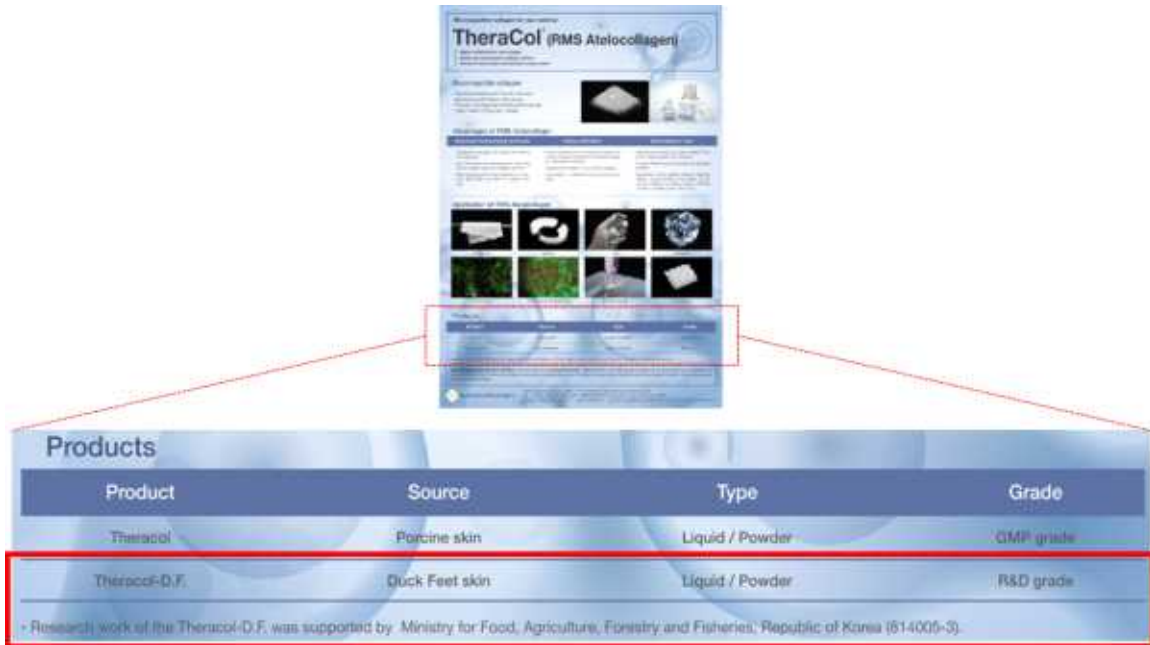
- 해당사항없음 -

하. 기타

No	항 목	내 용
1	홍보 실적	1) 국제 학술대회(Pre-FBPS) 홍보 · 세원셀론텍㈜ · 국제 학술대회 {Pre-International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymer (Pre-FBPS)} 초록집에 오리발 콜라겐 및 농림부 주관 과제 홍보 · 2016년 04월 29일 2) 국제 학술대회(FBPS) 홍보 · 세원셀론텍㈜ · 국제 학술대회 {International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymer (FBPS)} 초록집에 오리발 콜라겐 및 농림부 주관 과제 홍보 · 2017년 07월 11일
2	전시회 참가	1) 국제 박람회 참가 · 세원셀론텍㈜ · 국제 박람회 ‘2017 코리아브랜드 & 한류상품박람회(자카르타)’에 참가하여 오리발 콜라겐 전시 및 홍보 · 2017년 09월 05일
3	수상 실적	1) 한국조직공학 재생의학회 참가 · 한림대학교, 김수현 · 한국조직공학 재생의학회에 참가하여 ‘BEST STUDENT SESSION AWARD’ 우수 구두 발표상 수상 · 2015년 05월 30일
4	인증	1) 국제 화장품 원료집 등재 · 세원셀론텍㈜ · 연구 개발 성과인 오리발 콜라겐을 국제 화장품 원료집인 ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary)를 발행하는 미국의 PCPC (Personal Care Products Council)에 등재 · INCI Name: Collagen · INCI Monograph ID: 592 · On-Line 국제 화장품 원료집 등재 완료: 2016년 04월 25일 · Off-Line 국제 화장품 원료집 발행 예정: 2018년 4월 중 (2년마다 발행) 2) 원료의약품 신고제도 등록 · 세원셀론텍㈜ · 연구 개발 성과인 오리발 콜라겐을 미국식품의약국(FDA; Food and Drug Administration)의 원료의약품 신고제도(DMF; Drug Master File)에 등록을 완료함 · DMF 등재 번호: 031659 · DMF type: II · 등재명: ATELOCOLLAGEN-D.F. · 등재 원료 소유자: SEWON CELLONTECH CO., LTD.

- 연구 성과(홍보 전시, 기술 인증) 첨부 문서 -

(1) 홍보 실적-국제 학술대회(Pre-FBPS, FBPS) 홍보 2건



The image shows a product information sheet for TheraCol (RMS Atelocollagen) and a table listing its products. The table is as follows:

Product	Source	Type	Grade
TheraCol	Porcine skin	Liquid / Powder	GMP grade
TheraCol-D.F.	Duck Feet skin	Liquid / Powder	R&D grade

Research work of the TheraCol-D.F. was supported by Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (614005-5).

<오리발 콜라겐 국제 학술대회 홍보 자료>

(2) 전시회 참가



<국제 박람회 참가(오리발 콜라겐 전시 및 홍보)>

(붉은 점선: 오리발 콜라겐 원료 전시)

(3) 수상실적



<한국조식공학 재생의학회 참가 및 우수 구두 발표상 수상>

(4) 인증

Personal Care Products Council

On-Line INFOBASE >> Ingredient Database

print close window

Collagen

- INCI Name: Collagen
- INCI Monograph ID: 592
- VCRP Reported Name: Collagen
- CAS No: 9007-34-5
- EINECS (R) / ELINCS (L): 232-697-4 (R)
- Definition: Collagen is the protein found in cartilage and other connective tissues in animals.
- SAFETY/REGULATORY INFORMATION
- Information Source(s): FCC, JCIC, JCLS, M, TSCA
- Chemical Class(es): Proteins (including enzymes)
- Reported Functions: Hair Conditioning Agents, Skin Conditioning Agents, Miscellaneous
- Reported Product Categories: Bath Capsules, Bath Oils, Tablets, and Salts; Bath Preparations, Misc.; Body and Hand Preparations (Excluding Shaving Preparations), Cleansing Products (Cold Soaks, Cleansing Lotions, Lotions, and Pads); Eye Lotions; Eye Makeup Preparations, Misc.; Eye Makeup Removers, Face and Neck Preparations (Excluding Shaving Preparations); Foundations; Hair Conditioners, Hair Preparations (Non-coloring), Misc.; Hair Sprays (Aerosol Preparations); Lipsticks; Makeup Bases; Makeup Preparations (Not exfol., Misc.; Mascara; Moisturizing Preparations; Night Skin Care Preparations; Paste Masks (Mud Packs); Shampoos (Not-coloring), Shaving Preparations, Misc.; Skin Care Preparations, Misc.; Skin Treatments; Suntan Gels, Creams, and Liquids; Tonics, Dressings, and Other Hair Grooming Aids
- Ingredient Source(s): Animal
- Technical Name(s):
 - Collagen Fiber
 - Collagen Sheet
 - Freeze-Dried Collagen Sheet
 - InoCyl
- Trade Name(s): [Click here to view full list of Trade Names](#)
- Trade Name Mixture(s): [Click here to view full list of Trade Name Mixtures](#)
- Translations:
 - Japanese Translation
 - Chinese Translation
 - International Buyers' Guide

VCRP Frequency of Use as of 01/2015: 242

On-Line INFOBASE >> Ingredient Database

print close window

Collagen Trade Name(s):

- Abalone Collagen (Yamaguchi & Co., Ltd.)
- AEC Collagen (S. & C. Cosmetics (Perfumery & Cosmetics) Ltd.)
- Collagen ESM (cosmo, inc.)
- Collagen FCC (Mitsui Toyoko Co., Ltd.)
- Collagena (Gloria)
- Collagen Powder 100 (Onogawa Shear, LTD)
- EPI V-Collagen (Lipincos)
- Fish Collagen Peptide (SBL Co., Ltd.)
- Marmigen S-15C (Nissei Cosmetics Co., Ltd.)
- Oristar CS (Oristar Stars, LLC)
- Oristar Marine Collagen (Oristar Stars, LLC)
- Oristar Marine Collagen Soft (Oristar Stars, LLC)
- RMS Collagen-D F. (Gerson, California Co., Ltd.)
- Salmon Collagen Extract (Charm Cosmetics Ltd.)
- Sic Fish Collagen (Globe-Chem Industry, Inc.)
- SF Collagen (National Fisheries Research & Development Institute)
- Sisu-Mat CM SD (UM) (Guhm, Personal Care Products, L.E./Lorca Personal Care)
- Triple Herx FD (Tali Chemical Co., Ltd.)

<오리발 콜라겐 On-Line 국제 화장품 원료집 등재>
(www.personlacarecouncil.org)



DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Food and Drug Administration
Silver Spring, MD 20993

DMF 031659

DMF ACKNOWLEDGEMENT

SEWON CELLONTECH CO., LTD
ATTENTION: JOON HO LEE, MANAGER
506 WOORYOUNG TECHINO CENTER, 144
ACHASAN-RO, SEONGDONG-GU
SEOUL, 04783, SOUTH KOREA, REPUBLIC OF KOREA

Dear Joon Ho Lee,

The Food and Drug Administration acknowledges receipt of the following Drug Master File (DMF) submission:

DMF NUMBER ASSIGNED:	031659
DATE OF SUBMISSION:	MARCH 28, 2017
DMF TYPE:	II
SUBJECT/TITLE:	ATELOCOLLAGEN-D.F.
HOLDER:	SEWON CELLONTECH CO., LTD
SUBMITTED BY:	SEWON CELLONTECH CO., LTD
AGENT:	MGK CORPORATION

All subsequent correspondence to this DMF should be identified with the information as provided above. One original and one duplicate copy should be submitted to the following address.

Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research
Central Document Room
Drug Master File Staff
9901-B Annapondie Road
Beltsville MD 20705-1266

Your DMF will be reviewed only in connection with a New Drug Application, Abbreviated New Drug Application, Investigational New Drug Application, Biological License Application, New Animal Drug Application, Abbreviated New Animal Drug Application, Investigational New Animal Drug Application, or DMF it is intended to support when a Letter of Authorization (LOA) is submitted to the DMF and a copy of the LOA is submitted in the application e.g., NDA, that references the DMF. Currently, there is no requirement to submit or resubmit DMFs in any electronic format. However, starting May 5, 2018, new DMFs, as well as any submissions to the existing DMFs must be submitted electronically in eCTD (electronic Common Technical Document) format specified by FDA in the

DMF#	STATUS	TYPE	SUBMIT DATE	HOLDER	SUBJECT
31655	A	II	3/28/2017	AMINO GMBH	BETAINE PHARMACEUTIC
31656	A	II	4/4/2017	INTERQUIM SA DE CV	FOSFOMYCIN TROMETAM
31657	A	III	4/4/2017	PRECISE FLEXIBLES PVT LTD	PRINTED/PLAIN COATED/ STRIP FOILS FOR PHARM
31658	A	II	5/31/2017	SEASONS BIOTECHNOLOGY (TAIZHOU) CO LTD	MACITENTAN
31659	A	II	3/28/2017	SEWON CELLONTECH CO LTD	ATELOCOLLAGEN-D.F.
31660	A	II	5/24/2017	HUNAN NORCHEM PHARMACEUTICAL CO LTD	5TR
31661	A	II	4/5/2017	JIANGXI SYNERGY PHARMACEUTICAL CO LTD	MIRABEGRON
31662	A	II	4/3/2017	RIOCARE INDIA PRIVATE LTD	SIMETHICONE 50% POWD
31663	A	II	4/5/2017	JIANGXI SYNERGY PHARMACEUTICAL CO LTD	VILDAGLIPTIN
31664	A	II	4/28/2017	ALEMBIC PHARMACEUTICALS LTD	MACITENTAN
31665	A	II	6/16/2017	ALEMBIC PHARMACEUTICALS LTD	RIOCIGUAT
31666	A	III	4/11/2017	NIHON MATAI CO LTD	LAL SERIES

<원료의약품 신고제도 등록 완료>

(좌: DMF 등록 확인서, 우: DMF list)

(<https://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/formssubmissionrequirements/drugmasterfilesdmfs/default.htm>)

제3절. 연구수행 내용 및 결과

1세부(세원셀론텍㈜)

과제명: 오리발 유래 고순도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용한 의료용 원료 개발

1. 오리발 유래 콜라겐 대량 생산 체계 구축

오리발을 이용한 고순도 콜라겐을 제조하기 위하여 오리발로부터 콜라겐을 분리·정제하는 공정을 확립한 후 pilot scale(오리발 조직: 100 g, working volume: 4.5 L, 건조 콜라겐 생산량 10 g/batch 기준) 생산 체계를 구축함. 이 후 pilot scale을 기반으로 대량(오리발 조직: 6.6 kg, working volume: 300 L, 건조 콜라겐 생산량 400 g/batch 기준) 생산 체계를 구축 하였고 공정에 대한 밸리데이션을 완료하였음

가. 분리 공정 확립

오리발은 축산부산물로써 콜라겐이 다량 포함되어 있음. 콜라겐은 체내에서 지지체 역할을 하는 단백질로써, 세포를 지지하는 중요한 성분으로 의료용 또는 화장품 원료로 이용 가능한 고부가가치 생체 소재임. 오리발 콜라겐 상용화를 위해 콜라겐 분리방법을 개발하고 순도 및 생산수율을 높이는 방법을 체계화 함

(1) 오리발 원료 확보

(가) 오리발 공급 업체

- 상호: 전북대학교 학교 기업 전북대햄(축산물가공업체)
- 주소: 전주시 덕진구 백제대로 567 전북대학교(561-756)
- 사업자 등록번호: 418-83-00219
- ISO 인증: 2005년 05월 ISO9001 인증(TUV사)
- HACCP 인증: 2008년 03월 HACCP 인증(농림수산식품부 2008-881호)

(나) 오리발 공급 상태

- 오리발은 발목 이하의 부위가 절단된 상태로 -20℃에서 동결되어 제공됨(그림 1)



그림 1. 원료 입고 및 해동 전/후의 오리발 원료 이미지

(다) 오리발 원료의 육안적 특성 및 조직 구성

- 해동된 오리발은 특유의 향이 있으며 길이는 15 ± 2 cm, 중량은 30 ± 3 g임
- 오리발은 크게 뼈, 피부, 인대/건의 조직으로 이루어져 있으며, 각 조직의 함량은 44%, 33%, 23% (w/w)임(그림 2)

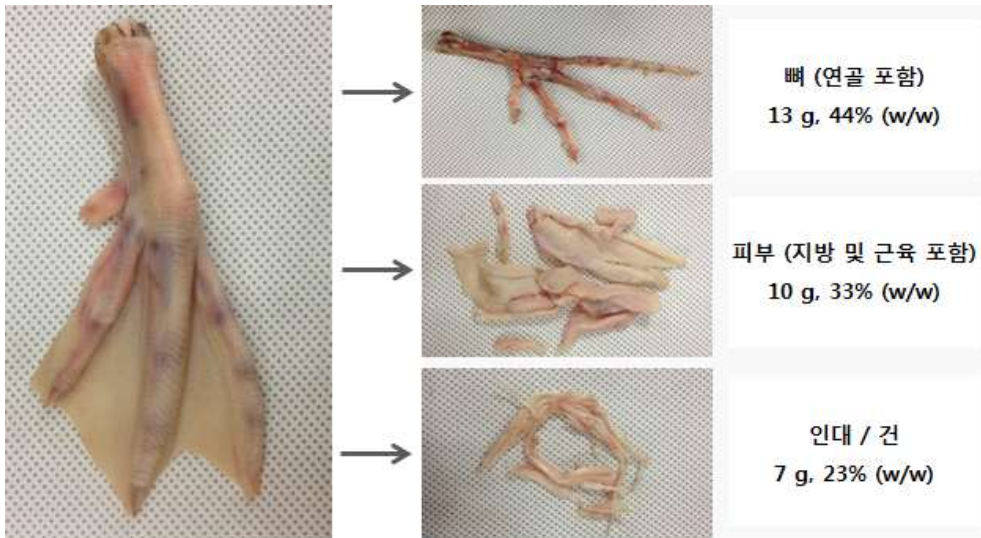


그림 2. 오리발 조직의 이미지 및 조직 구성

(2) 오리발 유래 콜라겐의 분리 공정(Lab. scale) 확립

(가) 콜라겐 분리법

- 오리발 콜라겐을 분리하기 위해 산 용액 처리 방식과 효소 처리 방식을 이용함
- 산 용액 처리 방식은 절편화된 오리발 조직을 산 용액에 침지하여 분해된 조직으로부터 콜라겐을 수득하는 방법임
- 효소 처리 방식은 절편화된 오리발 조직을 효소를 포함하는 산 용액에 침지하여 조직의 특정 결합 부위를 효소가 특이적으로 분해하여 콜라겐을 수득하는 방법임

(나) 산 용액 처리 방식을 이용한 오리발 콜라겐 분리 공정(그림 3)

- 동결(-20℃)된 오리발을 해동시킨 후 증류수, 에탄올, 증류수의 순서로 세척함
- 오리발 조직을 분쇄 후 산 용액과 함께 저온(4℃)에서 7일간 교반함
- 반응이 완료된 용액으로부터 여과망을 이용하여 비분해 조직을 분리함
- 염을 첨가 후 저온(4℃)에서 염석시킴
- 층이 분리된 콜라겐과 증류수를 혼합함
- 원심분리 후 상등액을 제거함
- 분리된 콜라겐을 -20℃에서 동결 및 동결 건조하여 콜라겐을 수득함

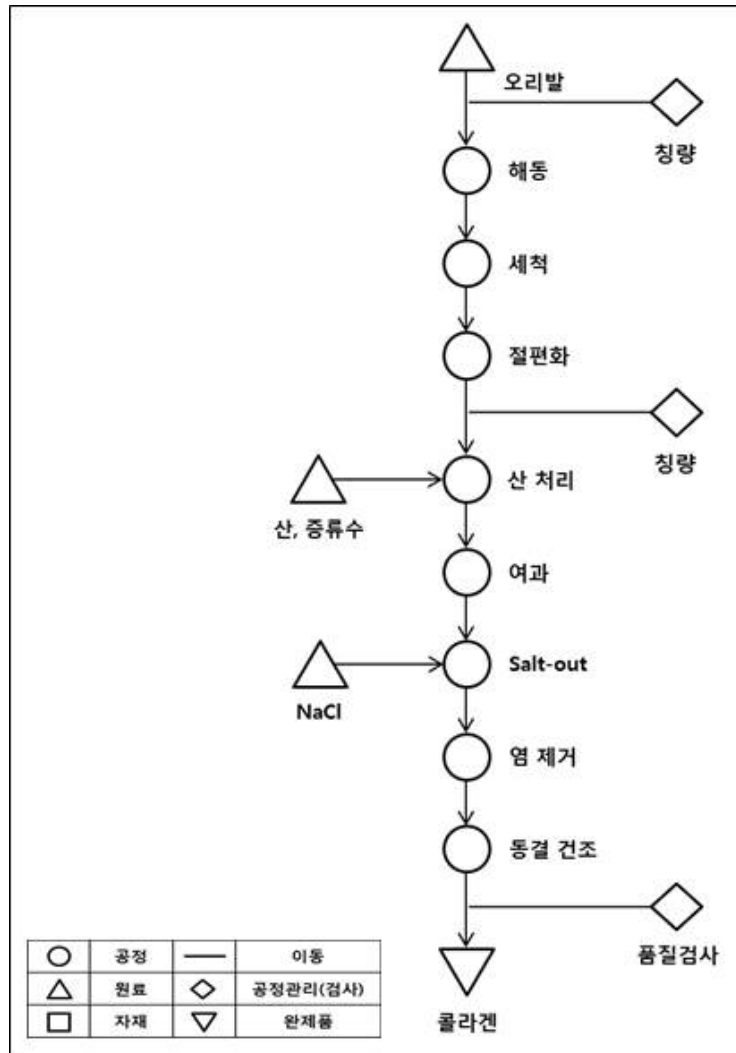


그림 3. 산 용액 처리 방식의 오리발 콜라겐 분리 공정도

(다) 효소 처리 방식을 이용한 오리발 콜라겐 분리 공정(그림 4)

- 동결(-20℃)된 오리발을 해동시킨 후 증류수, 에탄올, 증류수의 순서로 세척함
- 오리발 조직을 분쇄 후 효소와 함께 산 용액에 넣어 3~4일간 교반함
- 반응이 완료된 용액으로부터 여과망을 이용하여 비분해 조직을 분리함
- 염을 첨가 후 저온(4℃)에서 염석시킴
- 분리된 콜라겐과 증류수를 혼합 후 산성 pH로 조정함
- 여과 장치를 이용하여 탈염함
- 층이 분리된 콜라겐과 증류수를 혼합함
- 원심분리 후 상등액을 제거함
- 분리된 콜라겐을 -20℃에서 동결 및 동결 건조하여 콜라겐을 수득함

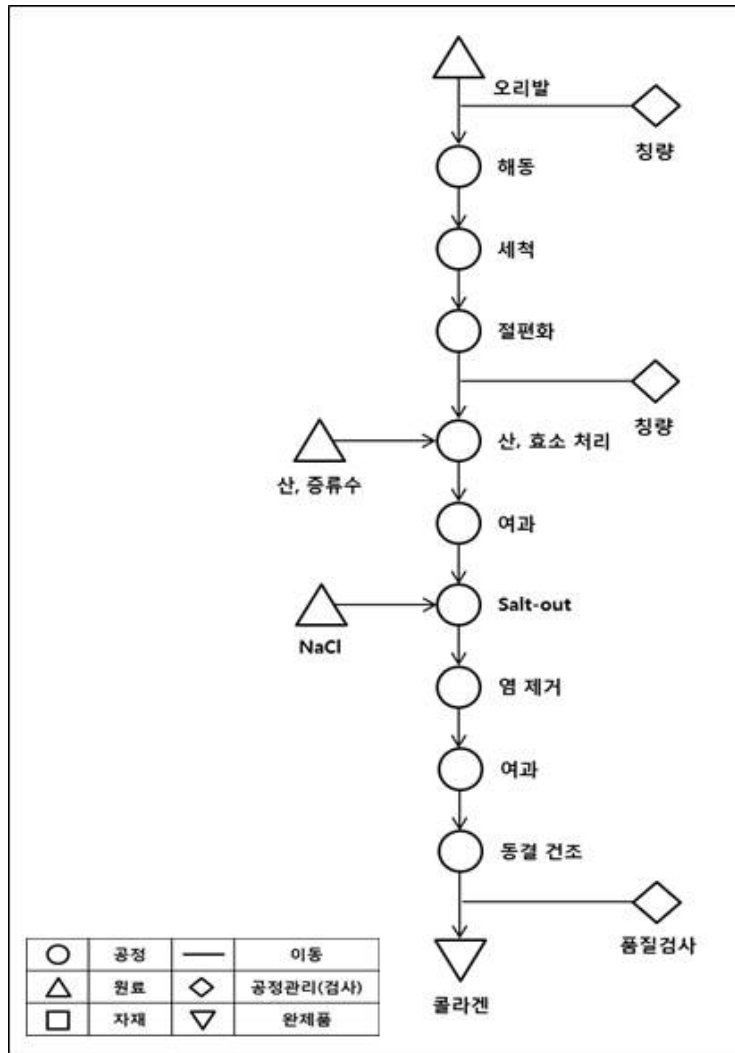


그림 4. 효소 처리 방식의 오리발 콜라겐 분리 공정도

- (라) 산 용액 처리 방식과 효소 처리 방식을 이용하여 분리한 콜라겐의 특성 비교(표 1)
- 5 g의 오리발로부터 산 용액 처리 방식에 의해 분리된 콜라겐의 건조 중량은 0.21 g이며, 효소 처리 방식에 의해 분리된 콜라겐의 건조 중량은 0.42 g임
 - 각각의 콜라겐은 모두 옅은 노란색을 띠는 백색이며, 오리 특유의 향이 존재함
 - 산 용액 처리 방식에 의해 분리된 콜라겐의 함량은 $49.5 \pm 1.0\%$ (wt.)이며, 효소 처리 방식에 의해 분리된 콜라겐의 함량은 $71.5 \pm 0.8\%$ (wt.)임
 - Collagenase 또는 열처리 후 trypsin을 처리하면 분해되는 특성이 산 용액 처리 방식에 의해 분리한 콜라겐에서 관찰되지 않음(그림 5)
 - 산 용액 처리 방식에 의해 분리된 콜라겐은 상대적으로 많은 양의 회분, 지방과 같은 불순물들이 포함되어 있기 때문에 콜라겐 특유의 효소에 대한 저항성이 나타나지 않은 것으로 예상됨

표 1. 산 용액 및 효소 처리 방식으로 분리한 오리발 콜라겐의 특성 비교

Item	Acid soluble duck feet collagen	Pepsin soluble duck feet collagen
Isolated collagen wt. (per 5 g wet tissue)	0.21 g	0.42 g
Color	Ivory	Ivory
Collagen contents (wt. %)	49.5 ± 1.0	71.5 ± 0.8
SDS-PAGE band form	$\alpha_1, \alpha_2, \beta$	$\alpha_1, \alpha_2, \beta$
Trypsin resistance	Y	Y
Collagenase digestion	N	Y
Moisture contents (%)	6.9 ± 0.9	7.1 ± 1.0

SDS-PAGE & Enzyme resistance analysis

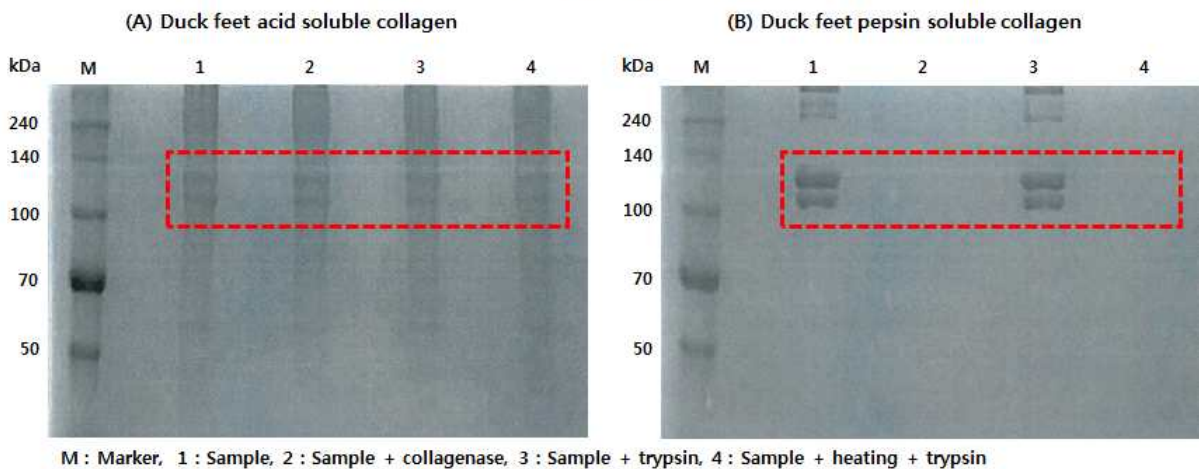


그림 5. SDS-PAGE를 이용한 산 용액 / 효소 처리 오리발 콜라겐의 효소 저항성 분석

(3) 오리발 유래 콜라겐의 수율 및 순도 증대를 위한 공정 개선

- 콜라겐의 수율을 증가시키기 위해 조직 전처리 공정과 산 처리 공정 개선 연구 진행
- 콜라겐의 순도를 증가시키기 위해 회분 및 지방 제거 연구 진행

(가) 오리발 원료 전처리 방식 변경에 따른 콜라겐 분리 수율 및 순도 증가 여부 확인

- 오리발 조직 절편화 방식 변경
- 산 용액에 노출되는 면적을 증가시키기 위해 오리발을 더 작은 크기로 절편화함 (조직 절편 직경: 4.0 ~ 15.0 mm → 0.5 ~ 3.0 mm)
- 분리된 콜라겐의 건조 중량이 0.21 g에서 1.27 g으로 분리 수율이 약 6배 증가함 (그림 6)

Process change (Lyophilized collagen wt.)

Before (Collagen dry wt. = 0.21 g)

After (Collagen dry wt. = 1.27 g)

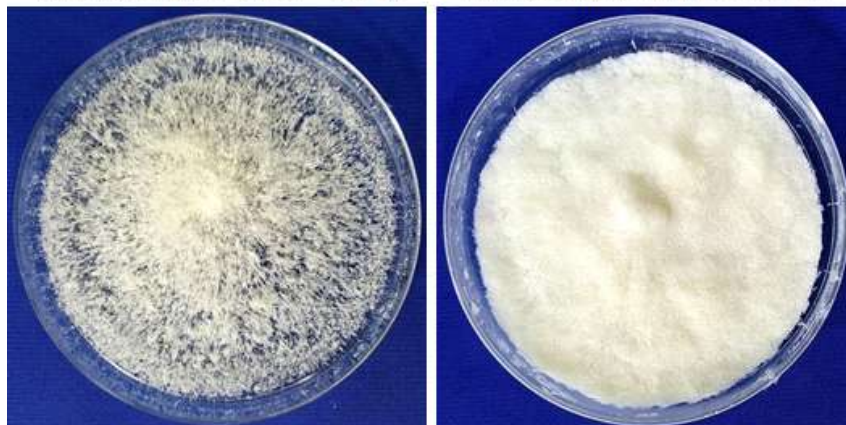


그림 6. 오리발 절편화 공정 변경 전/후의 동결 건조 콜라겐(좌: 전, 우: 후)

- 오리발 원료 변경(오리발 전체 조직 → 오리발 피부 조직)
- 오리발 전체를 이용하여 분리한 콜라겐 원료에는 회분이 잔류할 가능성이 존재하여, 오리발 전체를 이용하는 대신 오리발 피부 조직만을 분리하여 공정을 진행함
- SDS-PAGE를 통해 효소에 대한 저항성을 확인한 결과 콜라겐 고유의 특성을 확인함(그림 7)
- 콜라겐의 순도가 향상되었음을 확인하여, 이 후 공정은 오리발 피부 조직을 분리하여 진행하는 것으로 변경함

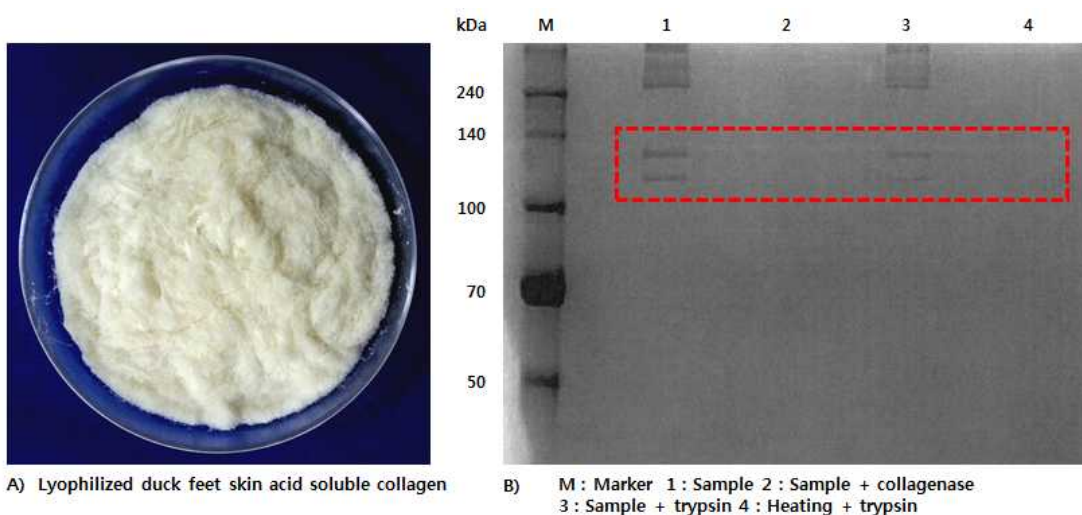


그림 7. 동결 건조된 산 용액 처리 오리발 피부 조직 콜라겐 및 SDS-PAGE를 이용한 콜라겐의 효소 저항성 분석

- 참고문헌을 통해 확인한 결과, 오리발 조직에 30%(w/w) 이상의 지방이 포함되어 있을 것으로 추정되어 지방 제거 공정을 추가함
- 오리발 피부 조직 내외에 존재하는 지방을 제거하기 위해 90% 에탄올과 함께 분쇄 후 2시간 마다 새로운 에탄올로 교체하여 6시간 동안 교반하는 공정을 추가함

- 지방 제거 공정을 추가한 결과 연한 노란색의 콜라겐이 유백색으로 변화하였고, 오리 특유의 향이 존재하지 않았음(그림 8)
- SDS-PAGE 결과 콜라겐 특유의 bands를 확인 가능하였고, 지방 제거 공정을 통해 오리발 유래 콜라겐의 색상과 향을 개선하였기 때문에 이 후 공정은 오리발 피부 조직을 에탄올에 분쇄 및 세척 후 진행하는 것으로 변경함

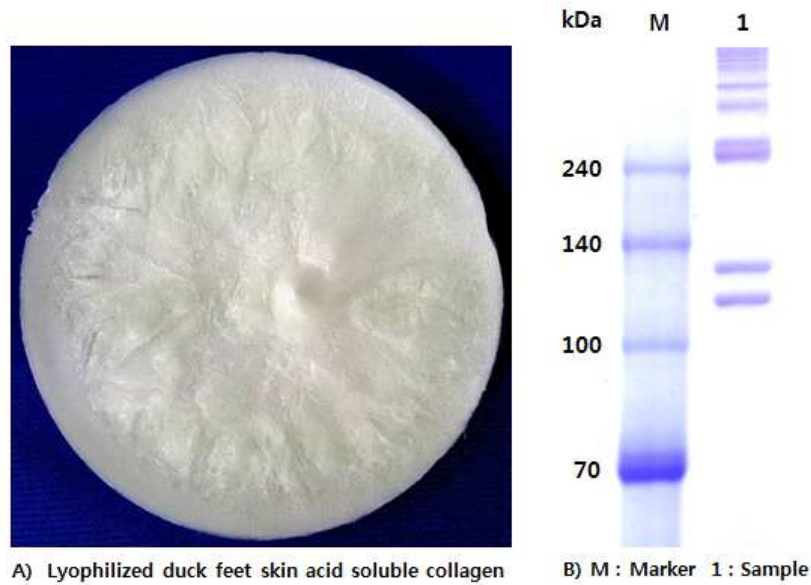


그림 8. 동결 건조된 산 용액 처리 오리발 피부 조직 콜라겐 및 SDS PAGE 분석 결과

(나) 반응 조건 변경에 따른 콜라겐 분리 수율 및 순도 증가 여부 확인

- 오리발로부터 콜라겐을 분리하기 위하여 산 용액을 처리하는 기간에 따른 콜라겐 분리 수율을 동결 건조된 콜라겐의 중량을 통해 비교함
- 5 g의 오리발 피부 조직에 산 용액을 첨가 및 분쇄하여 각각 3, 5, 7일간 산 용액 처리 후 분리한 콜라겐의 건조 중량은 0.73, 0.77, 0.74 g이었음(그림 9)
- 공정 기간 단축에 의한 생산비용 절감효과 및 원료 변성 최소화를 위해 산 용액 처리 기간은 7일에서 3일로 변경함



그림 9. 산 용액 처리 기간에 따라 분리된 동결 건조 콜라겐 이미지

- 오리발 피부 조직으로부터 콜라겐을 분리하기 위한 산 용액의 pH 변화에 따른 콜라겐 분리 수율 변화 여부를 동결 건조된 콜라겐 중량을 통해 비교함
- 5 g의 오리발 피부 조직에 각각 pH 2.0, 2.5, 3.0의 산 용액을 이용하여 분리한 콜라겐의 건조 중량은 0.69, 0.53, 0.40 g임(그림 10)
- 오리발 유래 콜라겐의 분리 수율은 산 용액의 pH가 2.0일 때 최적임을 확인하여 공정에 적용함

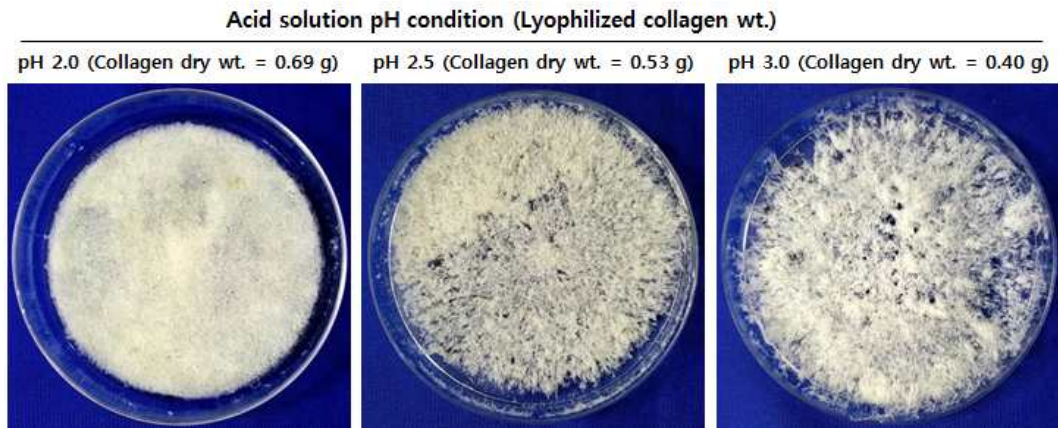


그림 10. 산 용액 pH에 따라 분리된 동결 건조 콜라겐 이미지

- 콜라겐에 포함된 염(NaCl)을 제거하기 위해 염석 후 증류수를 혼합하여 다시 원심 분리를 반복하는 방식으로 탈염 공정을 진행함
- 탈염 공정을 0, 1, 2, 3회 반복한 상등액의 삼투압은 $1,457 \pm 1.0$, 175 ± 1.0 , 10 ± 0.6 , 1 ± 0.0 mOsm/kg (상등액 중량에 대한 삼투압 측정)이었고 잔존하는 염을 충분히 제거하기 위해 탈염 공정을 1회에서 3회 반복으로 변경하여 공정에 적용함

표 2. 탈염 공정 횟수에 따른 상등액 삼투압 측정

Desalting times	Osmolality (mOsm/kg)
0	$1,457 \pm 1.0$
1	175 ± 1.0
2	10 ± 0.6
3	1 ± 0.0

- 산 용액 처리 방식에 의한 개선 전/후의 오리발 콜라겐 분리 공정 및 분리된 콜라겐의 특성을 비교함(표 3)

표 3. 공정 개선 전/후의 특성 비교표

Item	Duck feet collagen isolation process	Improved duck feet collagen isolation process
Tissue size	4.0 ~ 15.0 mm	0.5 ~ 3.0 mm
Material	Total duck feet	Duck feet skin
Fat removal process	-	90% Et-OH crushing & washing
Acid solution pH	2.5 ~ 3.0	2.0 ~ 2.2
Desalting times (Osmolality)	1 (175.0 ± 1.0 mOsm/kg)	3 (1.0 ± 0.0 mOsm/kg)
Isolated collagen wt. (per 5 g wet tissue)	0.21 g	0.68 g
Color	Ivory	White
Collagen contents (wt. %)	49.5 ± 1.0	56.4 ± 0.2
SDS-PAGE band form	$\alpha_1, \alpha_2, \beta$	$\alpha_1, \alpha_2, \beta$
Trypsin resistance	Y	Y
Collagenase digestion	N	Y

나. Pilot scale 생산 체계 구축

오리발 콜라겐을 의료용 또는 화장품 원료로 이용하기 위하여 순도 개선이 요구되었고, 개선된 공정을 바탕으로 pilot scale 수준의 오리발 콜라겐 생산 체계를 구축하였음

(1) 오리발 원료 확보 체계화

- 동물 유래 물질을 의료용 원료로 이용하기 위해서는 원료 자체의 안전성이 확보되어야 하기 때문에 ‘HACCP’ 인증 업체로부터 오리발 원료를 확보하여 연구에 적용함

(가) 업체 정보

- 회사명: ㈜삼호유황오리
- 소재지: 전라북도 정읍시 고부면 덕인리 950번지 고부농공단지
- 적용 업종: 식육포장처리업
- 인증 사항: HACCP (그림 11)

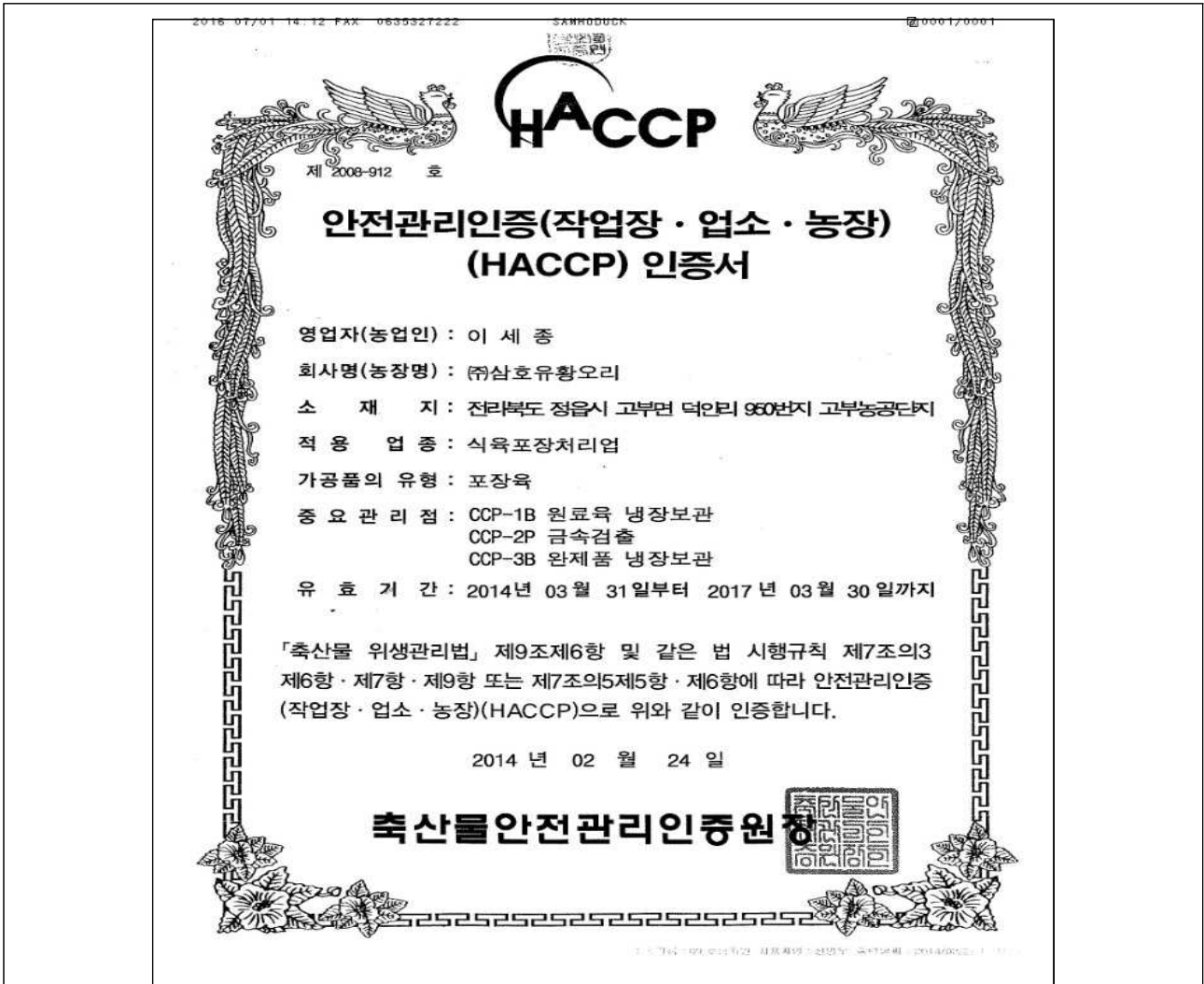


그림 11. 오리발 공급업체(㈜삼호유황오리)의 HACCP 인증서

(2) 콜라겐 분리 공정 개선 및 차별화

- 의료용 콜라겐으로 활용 가능한 고순도 오리발 콜라겐을 분리하기 위해 분리 공정을 개선하였음
- 기존의 다른 동물로부터 콜라겐을 분리하는 기술과 차별화하기 위해 오리발 유래 콜라겐 추출 기술을 개선하였음

(가) 콜라겐 분리 공정 개선

- 콜라겐의 순도가 산 처리 공정에 비해 효소 처리 공정에서 높았던 연구 결과를 바탕으로 효소를 이용한 콜라겐 분리 공정을 개선함
- 또한 원료의 특성상 조류 바이러스를 불활화하기 위한 공정이 포함되어야 했으며, 3단계의 바이러스 불활화 공정을 적용하여 공정을 개선함(그림 12)

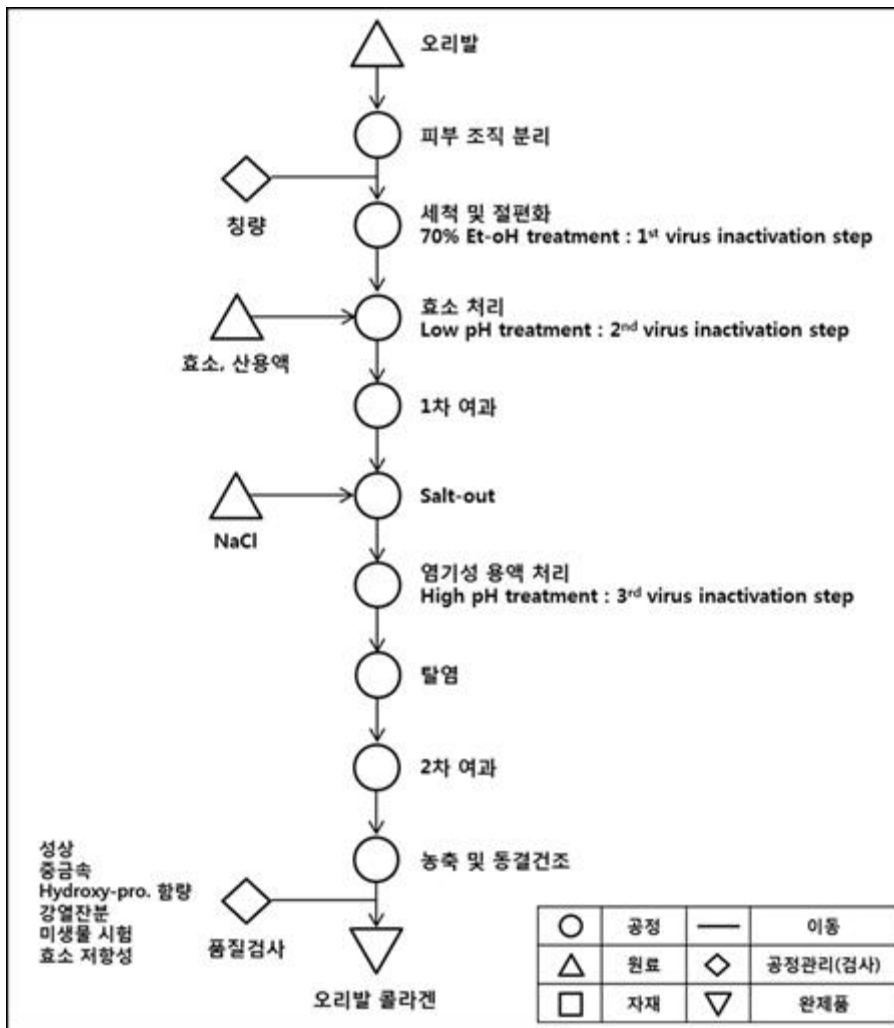


그림 12. 오리발 콜라겐 분리 공정도

- 개선된 분리 공정에 의해 수득된 오리발 콜라겐을 SDS-PAGE로 분석한 결과(그림 13) 콜라겐 특유의 band들(α_1 , α_2 , β)이 확인되었으며, 산을 처리한 콜라겐은 콜라겐 특유의 band들 이외의 band들이 관찰되었음. 반면에 효소를 처리한 콜라겐은 α_1 , α_2 , β 밴드 이외에는 관찰되지 않았음
- 돼지 피부를 산 처리 또는 효소 처리하여 추출한 콜라겐에서도 동일한 패턴의 결과가 확인됨

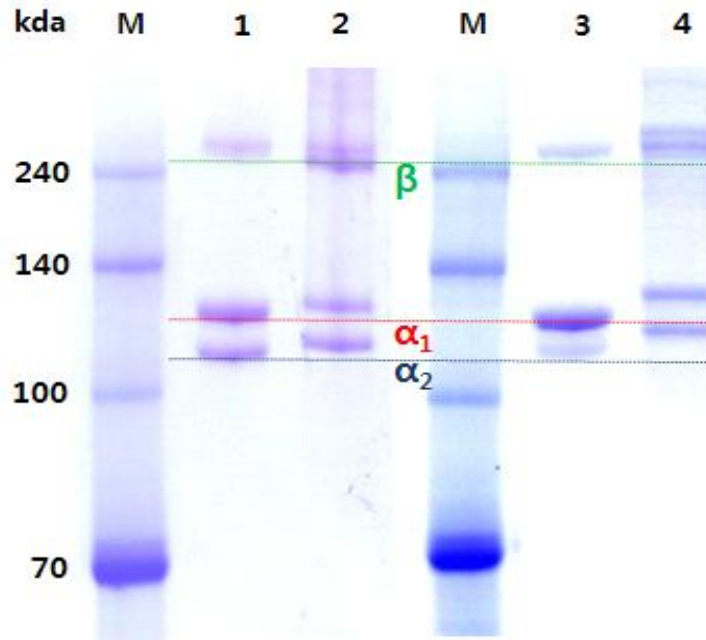




그림 13. 오리발 콜라겐 SDS-PAGE 분석 결과

(M: Marker, 1: 오리발 효소 처리 콜라겐, 2: 오리발 산 처리 콜라겐, 3: 돈피 효소 처리 콜라겐, 4: 돈피 산 처리 콜라겐)

- 산 처리 콜라겐에는 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있는 telopeptide가 결합되어 있어, 효소 처리 콜라겐에 비해 분자량이 큰 것으로 확인됨
- 산 처리 콜라겐은 약 50%의 α_1 band가 β band form으로 존재하기 때문에 효소 처리 콜라겐에 비해 α_1 band의 함량이 적고 β band의 함량이 높게 나타남(표 4)

표 4. 효소 처리 콜라겐과 산 처리 콜라겐 비교

항 목	효소 처리 콜라겐	산 처리 콜라겐
구 성	Atelo Collagen 	Native Collagen (AteloCollagen + Telopeptide) 
분자량	Low	High
α_1 band 함량	High	Low
β band 함량	Low	High

- 콜라겐 분리 공정 개선 전과 후의 함량을 비교함(표 5, 그림 14)
- 콜라겐 분리공정 개선 전(오리발 피부조직과 효소를 사용한 조건)의 콜라겐 순도는 $93.2 \pm 0.5\%$ 이었고, 콜라겐 분리공정 개선 후(오리발 피부조직과 효소를 사용한 조건)의 콜라겐 순도는 $99.2 \pm 3.7\%$ 으로 순도가 향상되었음

표 5. 콜라겐 분리 공정 개선 전/후의 콜라겐 순도 비교

공정 개선 전		공정 개선 후	
검체	콜라겐 순도(%)	검체	콜라겐 순도(%)
Total duck foot acid soluble collagen	49.5 ± 1.0	N/A*	N/A*
Duck foot skin acid soluble collagen	56.4 ± 0.2	N/A*	N/A*
Total duck foot pepsin soluble collagen	71.5 ± 0.8	Total duck foot pepsin soluble collagen	92.8 ± 1.4
Duck foot skin pepsin soluble collagen	93.2 ± 0.5	Duck foot skin pepsin soluble collagen	99.2 ± 3.7

* N/A : Non-Application

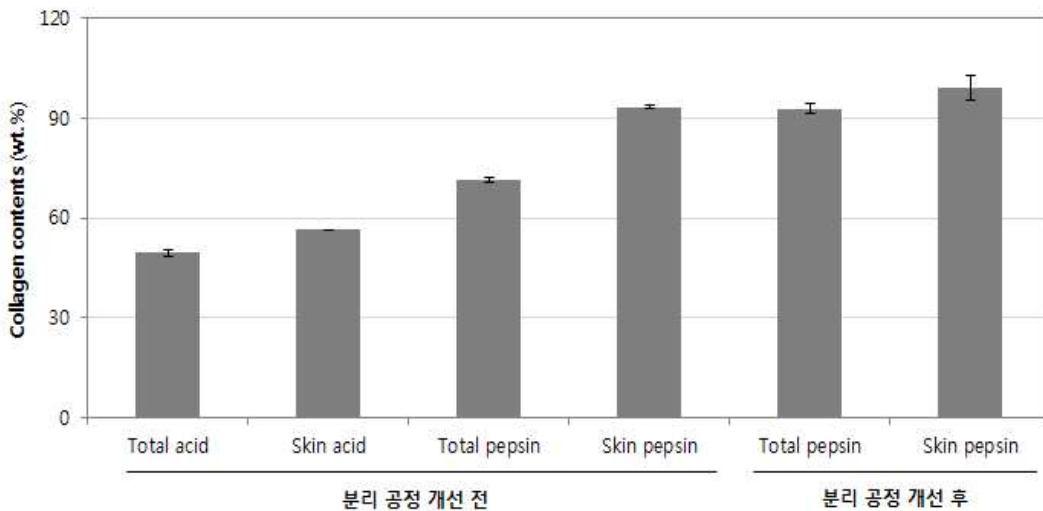


그림 14. 콜라겐 분리 공정 개선 전과 후의 콜라겐 함량 그래프

(나) 콜라겐 추출 기술 차별화

- 오리발 조직에 방사선을 조사하여 원료 차원에서 유해균을 제거함으로써 보존성을 높임과 더불어 콜라겐의 변성 없이 수득율을 높일 수 있도록 개선함으로써 차별화된 콜라겐 추출 기술을 확립함
- 25 kGy의 감마선이 조사된 오리발 조직으로부터 분리되는 콜라겐의 수율은 감마선을 처리하지 않은 조직대비 43.2 ± 3.8 (wt./wt.)%가 증가하였고, 진균 및 세균은 모두 검출되지 않았음
- SDS-PAGE 분석 결과 25 kGy의 감마선이 조사된 오리발 조직으로부터 분리되는 콜라겐은 변성되지 않음을 확인하였음(그림 15)
- 따라서 이 후 오리발 콜라겐 분리에 사용되는 오리발 조직은 25 kGy의 감마선을 조사하여 유해균을 제거하고 콜라겐의 변성 없이 수득율을 높일 수 있도록 개선하였음

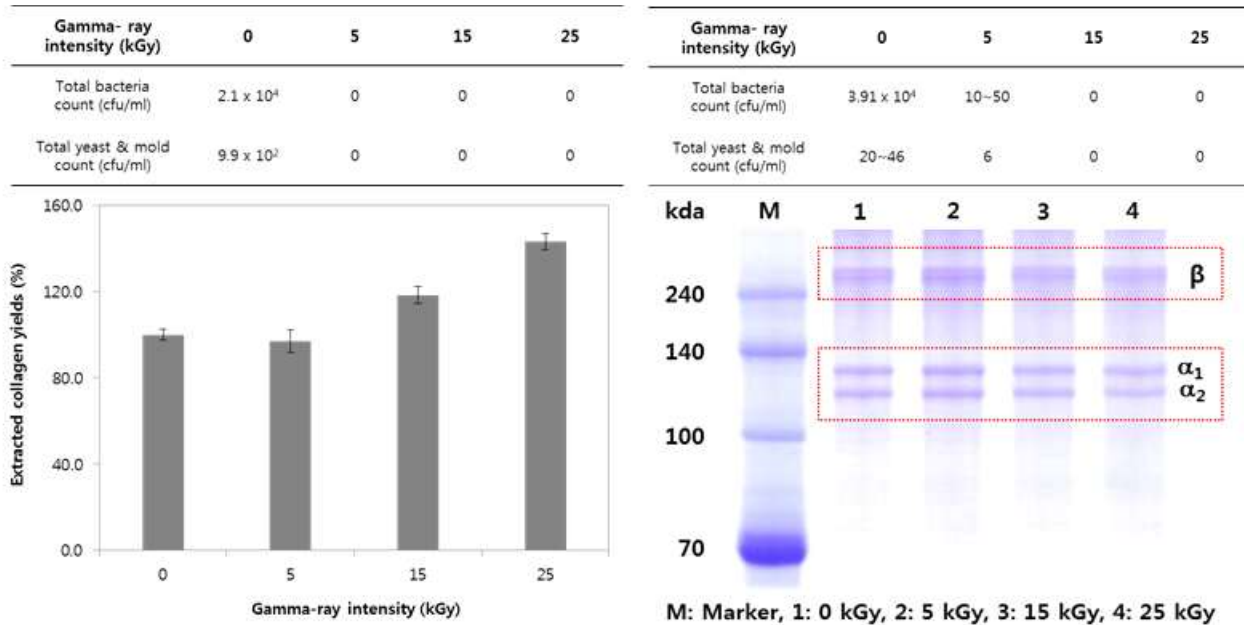


그림 15. 방사선을 처리한 오리발 조직으로부터 수득된 콜라겐의 특성 분석 결과

(3) 생산 설비 구축

- 기존의 콜라겐 분리 공정과 차별화된 고순도 콜라겐을 분리할 수 있는 공정을 확립 후, 중간 생산 수준(pilot scale)의 설비를 구축 및 오리발 콜라겐을 생산함

(가) 중간 생산 수준(pilot scale)의 설비 구축

- 1 batch에 100 g의 오리발 피부 조직을 이용하여 4.5 L의 working volume으로 약 10 g/batch의 콜라겐 생산 수율을 기준으로 pilot scale을 구축함
- Pilot scale 구축에 사용된 설비는 표 6.과 같으며, 공정 흐름은 그림 16.과 같음

표 6. 오리발 콜라겐 pilot scale 설비 리스트

No.	항 목	세부 사항	
		사용 목적	수량
1	Blade mixer	오리발 조직절편	1
2	pH meter	pH 측정	1
3	마그네틱교반기	교반 및 반응	2
4	저울	원료 무게측정	1
5	냉장고	원료 보관	1
6	냉동고	원료 보관 및 동결	1
7	Bottle roller	교반 및 반응	1
8	원심분리기	콜라겐 수득	1
9	Autoclave	기자재 멸균	1
10	Clean bench	오염 방지	1
11	Peristaltic pump	콜라겐 용액 여과	1
12	동결건조기	콜라겐 제형화	1

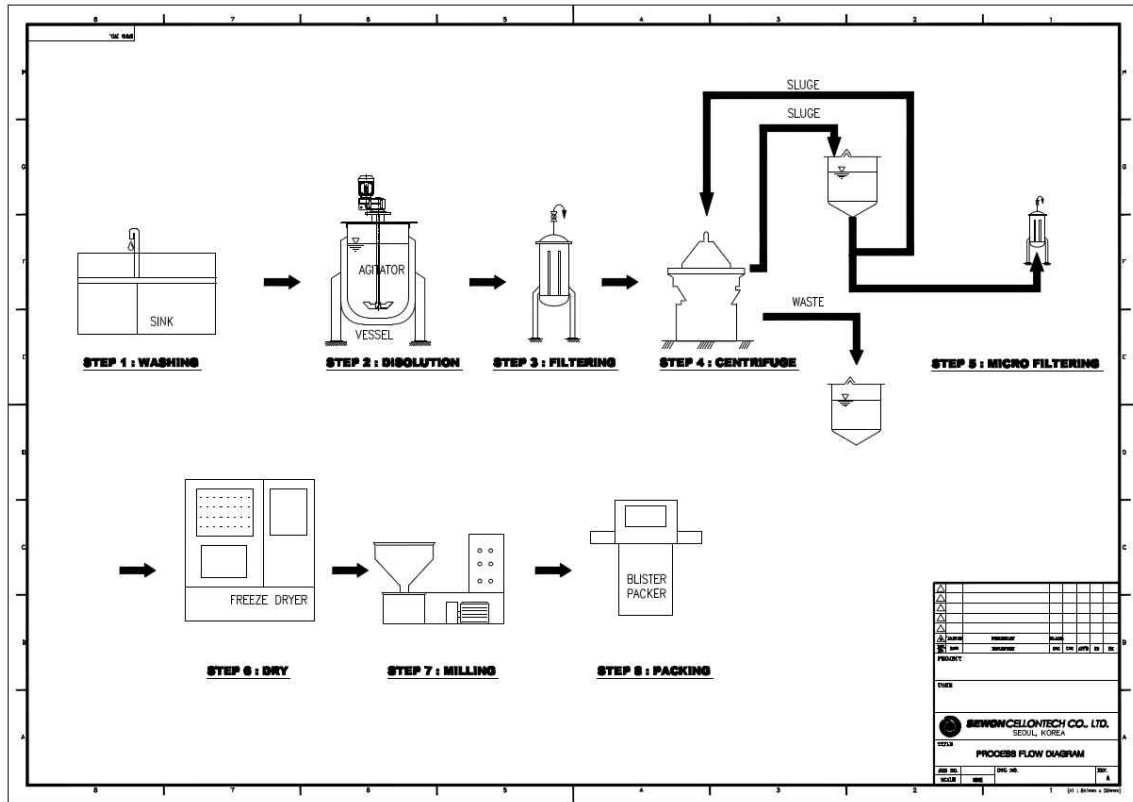


그림 16. Pilot scale 공정 흐름도

- Pilot scale로부터 생산된 오리발 콜라젠은 파우더 타입과 액상 타입이 있음(그림 17)
- 파우더 타입의 오리발 콜라젠은 동결 건조 시 백색을 띄었으며, 오리 특유의 향이 존재하지 않았음
- 액상 타입의 오리발 콜라젠은 점도가 있는 투명한 용액으로 이취가 존재하지 않았음



그림 17. Pilot scale로 생산한 오리발 콜라젠



다. 대량 생산 체계 구축

Pilot scale의 오리발 콜라겐 분리 공정을 바탕으로 상업화가 가능한 규모의 대량생산 (오리발 조직: 6.6 kg, working volume: 300 L, 건조 콜라겐 생산량 400 g/batch 기준) 공정을 확립하였고, 공정에 대한 밸리데이션을 완료하였음

(1) 대량 생산 공정 구축

- 대량 생산 체계의 공정 흐름은 pilot scale 공정과 동일하게 진행하였음
- Pilot scale (오리발 조직: 100 g, working volume: 4.5 L, 건조 콜라겐 생산량 10 g/batch 기준)보다 약 66배 증가한 규모의 대량 생산(오리발 조직: 6.6 kg, working volume: 300 L, 건조 콜라겐 생산량 400 g/batch 기준) 체계를 구축함
- 이 후 본격적인 오리발 콜라겐 상용화 시점에서는 구축한 대량 생산 공정을 통해 원가 구조를 개선하여 기 상용화된 콜라겐들과의 가격 경쟁력에서 우위를 차지할 예정임

(가) 대량 생산 공정 및 설비 확립

공정 설명	공정 이미지
<p>① 오리발 원료에 감마선 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> • 원료(오리발 전체)에 25 kGy의 감마선 조사 	
<p>② 오리발 피부 조직 분리</p> <ul style="list-style-type: none"> • 원료(오리발)로부터 피부 조직 분리 <p>③ 원료칭량</p> <ul style="list-style-type: none"> • 원료(오리발), 산 용액, 펩신 	

④ 조직 절편 및 세척

- 조직 절편기를 이용하여 원료를 절편 후 70% Et-OH을 넣어 수 시간 동안 교반
- 70% Et-OH에서 overnight 교반 후 증류수를 이용하여 교반 및 세척



⑤ 효소 처리

- 교반 탱크에 세척한 원료와 산 용액, 펩신 투입
- 교반기를 가동하여 혼합, 수 일간 반응(pH, 온도 확인)



⑥ 여과

- 탱크에 거름망 설치 후 여과



⑦ 염처리

- NaCl solution을 투입 후 교반
- 염 침전 확인 후 여과망을 이용하여 층 분리된 콜라겐 수득



⑧ 염기성 용액 처리

- NaOH를 추가하여 수득된 콜라겐 염 침전물의 pH를 염기성으로 변화시킨 후 수 시간 동안 정치



⑨ 탈염

- 수득한 콜라겐 염 침전물에 3차 증류수와 NaOH를 첨가하여 원심분리 후 탈염함(2회 추가 반복)



⑩ 제균 여과

- 분리된 콜라겐에 산 용액을 추가하여 희석
- 제균 여과 필터를 이용하여 제균 여과

⑪ 농축

- 여과된 콜라겐 용액에 NaOH를 첨가하여 원심분리 후 농축



⑫ 보관

- HCl을 첨가하여 pH를 산성으로 변경 후 냉장 보관
- 또는 동결 건조하여 고체 형태로 실온에서 보관



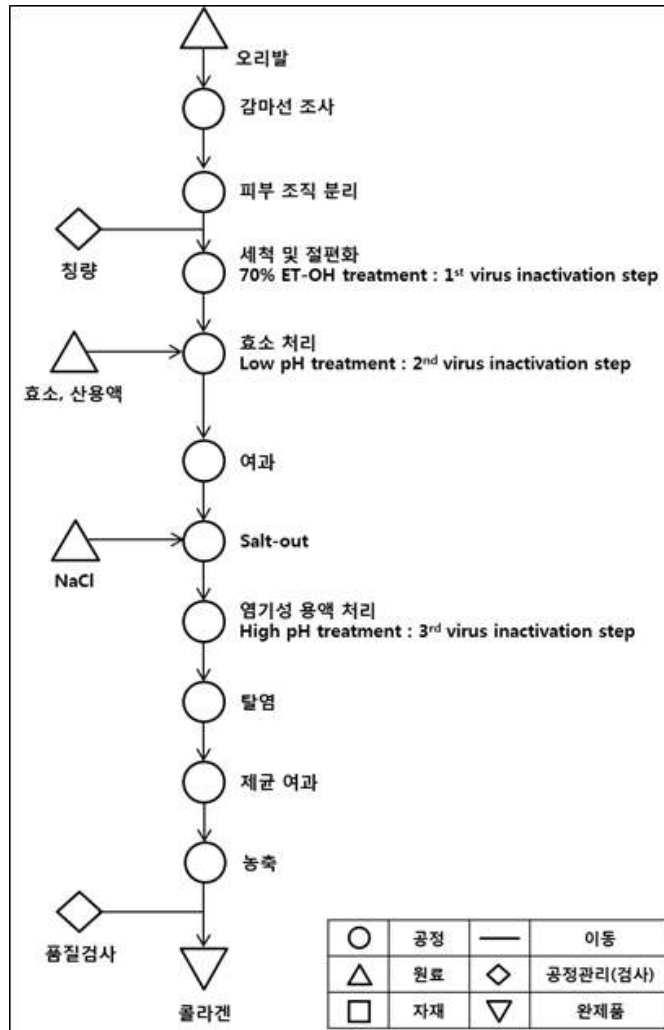


그림 18. 대량 생산 규모의 오리발 콜라겐 분리 공정도

- 오리발 콜라겐 원료는 동결 건조된 파우더 타입과 액상 타입으로 구분하여 생산함



그림 19. 대량 생산 공정을 통해 생산한 오리발 콜라겐

(2) 공정밸리데이션

- 대량 생산 공정으로부터 생산되는 오리발 콜라겐이 기준에 적합한 품질의 제품을 일관적으로 제조할 수 있음을 검증하기 위해 오리발 콜라겐 대량 생산 공정밸리데이션을 진행하였음

항 목	내 용																														
1. 목적	본 공정 밸리데이션은 오리발콜라겐 중요공정의 작업조건과 기준이 적합한 품질의 제품을 일관되게 제조함을 검증하기 위함이다.																														
2. 범위	본 공정 밸리데이션은 오리발콜라겐 제조 공정 중 중요공정의 변수와 검체 채취, 시험방법, 판정기준 등의 세부사항을 계획하여 오리발콜라겐 3 Lot에 대한 공정밸리데이션에 적용한다.																														
3. 개요	<p>1) 제품개요</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">제품명</td> <td colspan="2">오리발콜라겐(Duck Feet Collagen)</td> </tr> <tr> <td>제형</td> <td colspan="2">용기에 포함된 고점도 콜라겐</td> </tr> <tr> <td>보관조건</td> <td colspan="2">냉장 조건(2 ~ 8℃)보관</td> </tr> <tr> <td>사용기한</td> <td colspan="2">제조일로부터 36 개월</td> </tr> <tr> <td>이론생산량</td> <td colspan="2">500 g (콜라겐 건조 중량)</td> </tr> <tr> <td rowspan="7" style="text-align: center; vertical-align: middle;">제품규격</td> <td style="text-align: center;">성상</td> <td style="text-align: center;">투명 및 반투명 용액</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">무균시험</td> <td style="text-align: center;">불검출</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">엔도톡신</td> <td style="text-align: center;">< 0.5 EU/mL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">pH</td> <td style="text-align: center;">1.5 ~ 5.5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">콜라겐함량</td> <td style="text-align: center;">> 0.1%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">중금속</td> <td style="text-align: center;">불검출</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Collagenase/ Trypsin Resistance</td> <td style="text-align: center;">Collagenase에 의해 완전 분해됨 Trypsin에 의해 분해되지 않음</td> </tr> </table> <p>2) 방법 본 공정 밸리데이션은 중요공정에 대한 시험을 3 Lot 반복하여 진행한다.</p> <p>3) 시험항목 및 기준 오리발콜라겐 각 제조공정 단계가 제품의 품질특성에 영향을 미치는 수준을 평가하여 중요공정을 선정한다. 선정된 중요공정이 제품의 품질특성에 미치는 영향을 확인할 수 있는 시험항목과 기준을 선정하여 계획된 검체 채취계획에 따라 검체를 취하여 시험을 실시한다.</p>	제품명	오리발콜라겐(Duck Feet Collagen)		제형	용기에 포함된 고점도 콜라겐		보관조건	냉장 조건(2 ~ 8℃)보관		사용기한	제조일로부터 36 개월		이론생산량	500 g (콜라겐 건조 중량)		제품규격	성상	투명 및 반투명 용액	무균시험	불검출	엔도톡신	< 0.5 EU/mL	pH	1.5 ~ 5.5	콜라겐함량	> 0.1%	중금속	불검출	Collagenase/ Trypsin Resistance	Collagenase에 의해 완전 분해됨 Trypsin에 의해 분해되지 않음
제품명	오리발콜라겐(Duck Feet Collagen)																														
제형	용기에 포함된 고점도 콜라겐																														
보관조건	냉장 조건(2 ~ 8℃)보관																														
사용기한	제조일로부터 36 개월																														
이론생산량	500 g (콜라겐 건조 중량)																														
제품규격	성상	투명 및 반투명 용액																													
	무균시험	불검출																													
	엔도톡신	< 0.5 EU/mL																													
	pH	1.5 ~ 5.5																													
	콜라겐함량	> 0.1%																													
	중금속	불검출																													
	Collagenase/ Trypsin Resistance	Collagenase에 의해 완전 분해됨 Trypsin에 의해 분해되지 않음																													
4. 공정 기술	<p>1) 제조공정 흐름도(우측 공정도)</p> <p>2) 중요공정 선정 중요공정은 각 공정 별 분석을 통해 품질특성에 미치는 영향의 수준이 '높음' 으로 분류된 공정을 중요공정으로 선정하여 적격성 평가를 진행한다. 분석 결과 '제균여과' 와 '농축' 공정이 중요공정으로 선정되었다.</p> <div style="text-align: right;"> </div>																														

5. 작업소	오리발콜라겐 제조 공정 중 비무균 조작 공정이 이루어지는 공간은 청정도 등급 C (Class 100,000) 지역이며 무균조작 공정이 이루어지는 공간의 청정도 등급은 A (Class 100), B (Class 10,000) 이다.						
6. 공정 변수	각 공정 진행 중 공정 변수와 작업조건을 확인하고 각 Lot 별 결과를 기록한다.						
6. 공정 변수	공정	공정변수	작업조건	작업결과			
				1 st Lot	2 nd Lot	3 rd Lot	
	제균여과	SIP 온도	≥ 122℃	≥ 122℃	≥ 122℃	≥ 122℃	
		SIP 시간	16 분	16 분	16 분	16 분	
		최대 여과압력	≤ 2 bar	1.9 bar	1.7 bar	1.8 bar	
		여과용량	≤ 5.36 mL/cm ²	3.62 mL/cm ²	3.64 mL/cm ²	3.67 mL/cm ²	
	농축	여과시간	≤ 60 분	45 분	37 분	44 분	
		rpm	5,500 ± 500	5,300	6,000	5,500	
시간(min)		≥ 3	5	6	5		
	온도(℃)	25 ± 5	22	22	22		
7. 시험 항목 및 결과	공정	시험항목	시험기준	시험결과 및 판정			
7. 시험 항목 및 결과	제균여과	무균시험	불검출	적합 (불검출)	적합 (불검출)	적합 (불검출)	
		성상	투명 또는 반투명용액	적합 (양호)	적합 (양호)	적합 (양호)	
		무균시험	불검출	적합 (불검출)	적합 (불검출)	적합 (불검출)	
	농축	엔도톡신	< 0.5 EU/mL	적합 (<0.050)	적합 (<0.050)	적합 (0.143)	
		pH	1.5 - 5.5	적합 (4.8)	적합 (4.7)	적합 (4.4)	
		함량 균일성	콜라겐함량 상대 표준편차	> 0.1%	적합(6.1)	적합(3.7)	적합(4.9)
			≤ 10%	적합(2.3)	적합(1.9)	적합(3.3)	
	중금속	불검출	불검출	적합 (불검출)	적합 (불검출)	적합 (불검출)	
	Collagenase/Trypsin Resistance		Collagenase에 의해 완전 분해되어야 함. / Trypsin에 의해 분해되지 않아야 함.	적합	적합	적합	
	8. 결론	오리발콜라겐 3 Lot의 각 중요공정변수가 작업조건 내에 이루어졌으며 시험 결과가 모두 기준에 적합함을 확인하였다. 이로써, 오리발콜라겐 중요공정의 작업조건과 기준이 적합한 품질의 제품을 일관되게 제조함을 검증되었다.					

2. 오리발 유래 콜라겐 특성 확인

오리발 콜라겐의 특성을 명확하게 규명하기 위하여 ‘ASTM F2212-11 (Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products)’ 을 조사 및 분석에 적용함. 해당 규격에 제시되어 있는 시험방법들을 근거로 ‘오리발 콜라겐’ 의 물리·화학적·생물학적 특성 분석을 완료하였고, 수행한 시험의 성격에 따라 각각 1) 화학적 2) 물리적 그리고 3) 생물학적 특성으로 분류하여 정리하였음

가. 화학적 특성 분석 결과

‘ASTM F2212-11’ 에서 제시하는 시험들 가운데 콜라겐의 화학적 특성을 규명할 수 있는 분석법에 대하여 시험을 진행하였고 분석 항목은 표 7.과 같음

표 7. 콜라겐의 화학적 특성 규명을 위한 분석법

번호	분석 항목	분석 방법 및 조건 등
1	The concentration of collagen	Hydroxyproline assay (wt./vol. or wt./wt.)
2	Purity of soluble collagen	SDS-PAGE (collagenase)
3	Amino acid analysis	High Performance Liquid Chromatography
4	Heavy Metal Content	USP Method
5	Elastin Assay	Western blots or ELISAs
6	Glycosaminoglycans (GAG)	ELISAs
7	Trypsin Susceptibility	SDS-PAGE (Trypsin resistance)

(1) The concentration of collagen

- Hydroxyproline 표준용액을 이용하여 작성한 standard curve를 통해 오리발 콜라겐에 포함된 hydroxyproline 함량을 측정하였고, 시험 결과는 $11.00 \pm 0.16\%$ 로 기준 (10.0 ~ 15.0%)에 적합하였음(그림 20)

Curve Fitting Results							
Curve Name	Curve Formula	A	B	R2			
Curve	Y=A*X+B	0.0565	0.115	0.997			
Powder							
Name	Conc/Dil	concentration X dilution	Powder	Mean	Std Dev	CV (%)	
RMS Collagen-D.F. 160219	50	1082.60	10.83	11.00	0.16	1.45	
	50	1101.90	11.02				
	50	1114.12	11.14				

그림 20. 오리발 콜라겐의 Hydroxyproline 함량 시험 결과

(2) Purity of soluble collagen

- 오리발 콜라겐을 콜라겐 분해 효소(Collagenase)로 처리 후 전기영동을 진행한 결과, Collagenase로 처리한 군은 모든 단백질이 분해되어 콜라겐 이외의 단백질이 혼합되어 있지 않음을 확인함(그림 21)

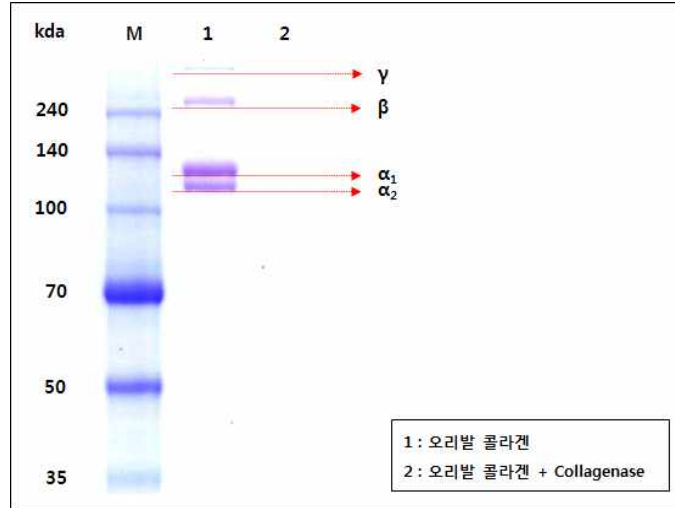


그림 21. SDS-PAGE를 이용한 콜라겐 순도 시험 결과

(3) Amino acid analysis

- 생체고분자물질 분석시스템(아미노산조성분석기)을 이용하여 시험 방법에 따라 전처리 후 오리발 콜라겐의 아미노산 함량을 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 아미노산 함량은 거의 유사하였고, 콜라겐 특성에 해당하는 모든 기준(표 8. 비교)에 적합하였음(표 8)

표 8. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 아미노산 시험 결과

Amino Acids	오리발 콜라겐 (MOL%)	돼지 콜라겐 (MOL%)	비고
Alanine (ALA)	10.8	10.7	•
Arginine (ARG)	4.9	5.3	•
Aspartic acid (ASX)	4.7	4.9	•
Cysteine (CYA)	0.0	0.0	Collagen Type III에서 관찰되는 아미노산으로 포함하지 않음
Glutamic acid (GLX)	7.6	7.6	•
Glycine (GLY)	32.1	32.8	구조적 고유 특성과 관계된 아미노산으로 총 아미노산의 약 1/3 비율을 차지하고 있음
Histidine (HIS)	1.0	1.1	•
Hydroxy_PRO	11.1	10.3	콜라겐 고유의 아미노산으로 총 아미노산의 약 1/9 비율을 차지하고 있음
Isoleucine (ILE)	1.3	1.0	•
Leucine (LEU)	2.5	2.2	•
Lysine (LYS)	2.7	2.8	•
Methionine (MET)	0.8	0.5	•
Phenylalanine (PHE)	1.7	1.3	•
Proline (PRO)	11.9	12.1	구조적 고유 특성과 관계된 아미노산으로 총 아미노산의 약 1/9 비율을 차지하고 있음
Serine (SER)	2.9	3.4	•
Threonine (THR)	1.9	1.8	•
Tryptophan (TRP)	0.0	0.0	면역 반응과 관계된 아미노산으로 포함하지 않음
Tyrosine (TYR)	0.2	0.1	면역 반응과 관계된 아미노산으로 거의 포함하지 않음
Valine (VAL)	1.7	2.1	•

(4) Heavy Metal Content

- USP (231) method2에 따라 공인된 분석기관인 한국화학융합시험연구원(KTR)에서 중금속 검출 시험을 진행하였고, 시험결과는 시험기준(검액의 색이 비교액보다 진하지 않음)에 적합하였음(그림 22)



그림 22. 오리발 콜라겐의 중금속 시험 결과

(5) Elastin Assay

- 엘라스틴 측정 장비 (Elastin assay kit ((Biocolor, Blyscan™), Spectrophotometer)를 이용하여 1% 오리발 콜라겐 용액에 존재하는 엘라스틴을 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음. 1% 오리발 콜라겐 용액과 1% 돼지 콜라겐 용액에는 엘라스틴이 각각 $1.68 \pm 0.67 \text{ ug/ml}$, $2.09 \pm 0.21 \text{ ug/ml}$ 이 포함되어 있었음(그림 23)

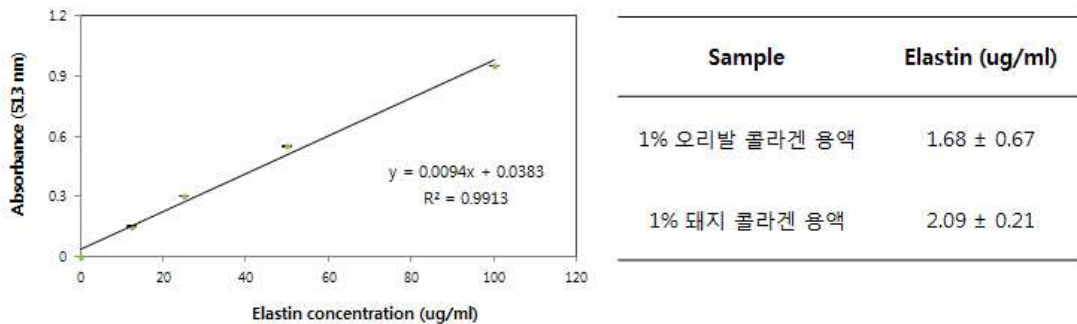


그림 23. 엘라스틴 분석 결과

(좌: 엘라스틴 표준 곡선, 우: 검체의 엘라스틴 함량)

(6) Glycosaminoglycans (GAG)

- GAG 측정 장비(GAG assay kit ((Bicolor, Blyscan™), Spectrophotometer)를 이용하여 1% 오리발 콜라겐 용액에 존재하는 GAG를 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음. 1% 오리발 콜라겐 용액과 1% 돼지 콜라겐 용액에는 GAG가 각각 $0.85 \pm 0.03 \text{ ug/ml}$, $0.95 \pm 0.08 \text{ ug/ml}$ 이 포함되어 있었음(그림 24)

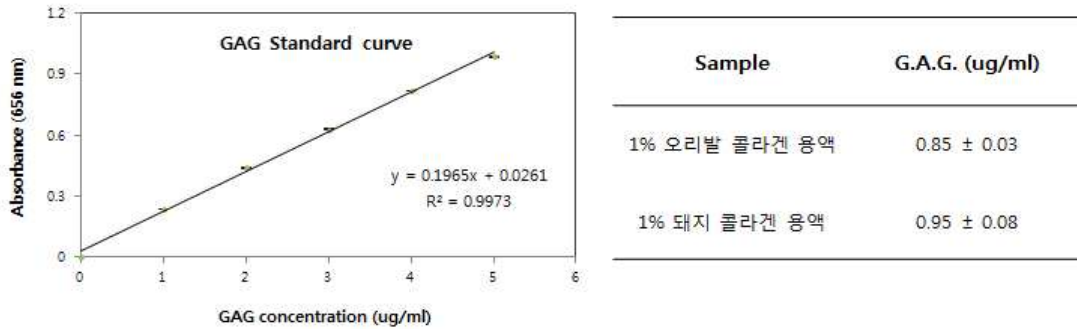


그림 24. Glycosaminoglycans 분석 결과
(좌: GAG 표준 곡선, 우: 검체의 GAG 함량)

(7) Trypsin Susceptibility

- 오리발 콜라겐을 단백질 분해 효소(Trypsin)로 처리 또는 열처리 후 단백질 분해 효소(Trypsin)로 처리하여 전기영동을 진행한 결과, trypsin으로 처리한 군은 콜라겐 고유의 특성인 저항성을 갖기 때문에 분해되지 않았으나, 열처리하여 구조를 변형한 군은 모든 단백질이 분해되었음(그림 25)

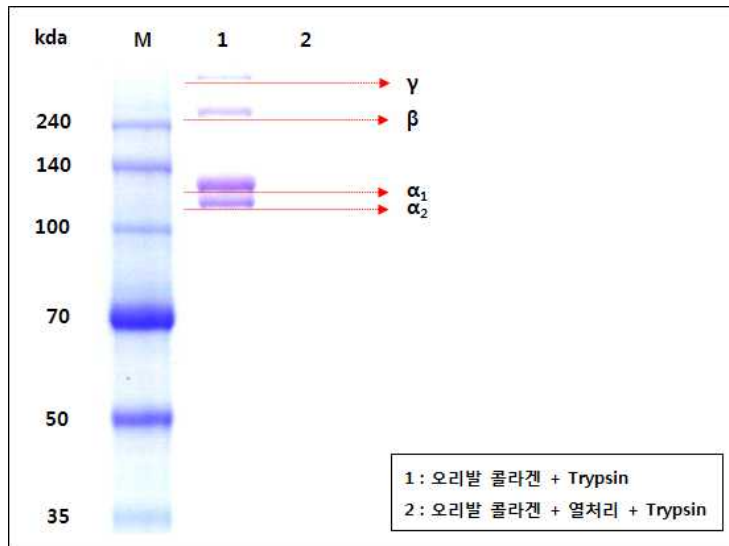


그림 25. SDS-PAGE를 이용한 단백질 분해효소 저항성 결과

나. 물리적 특성 분석 결과

‘ASTM F2212-11’ 에서 제시하는 시험들 가운데 콜라겐의 물리적 특성을 규명할 수 있는 분석법에 대하여 시험을 진행하였고 분석 항목은 표 8.과 같음

표 8. 콜라겐의 물리적 특성 규명을 위한 분석법

번호	분석 항목	분석 방법 및 조건 등
1	Viscosity	Viscometry
2	Transmission electron microscopy (TEM)	Quality of collagen fibers
3	Moisture contents	Dependent on storage environment
4	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	규격 외 추가 분석
5	X-Ray Diffraction (XRD)	규격 외 추가 분석

(1) Viscosity

- 점도 측정 장비(Programmable Viscometer RVDV-II+PRO)를 이용하여 2% 오리발 콜라겐 용액의 점도를 온도 변화(20 ~ 50℃)에 따라 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음
- 상온(20 ± 5℃)에서 2% 오리발 콜라겐 용액의 점도는 705 cP이었으며, 2% 돼지 콜라겐 용액의 점도는 670 cP로 확인되었으며, 점도가 0 cP가 되는(콜라겐이 변성되는) 온도는 2% 오리발 콜라겐 용액의 경우 41.8℃, 2% 돼지 콜라겐 용액의 경우 39.3℃로 확인됨(그림 26)

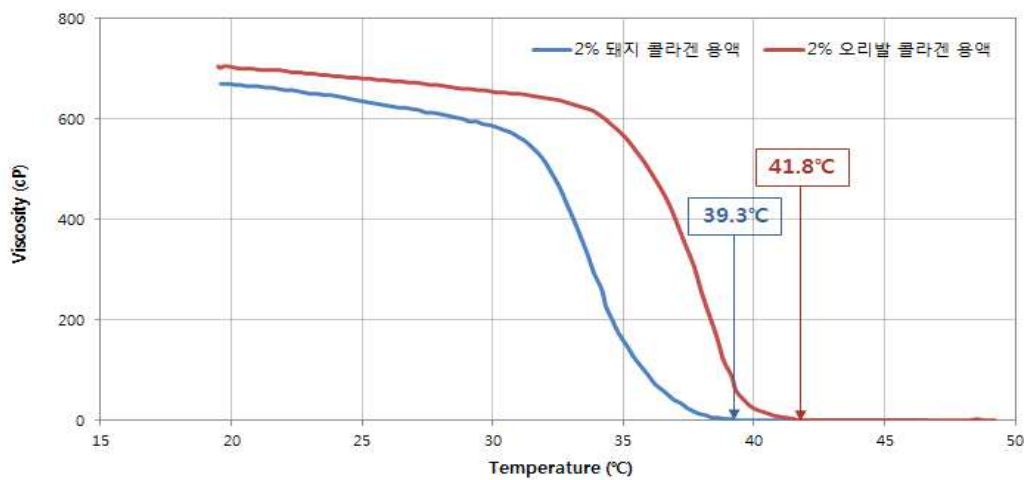


그림 26. 2% 오리발 콜라겐 용액과 2% 돼지 콜라겐 용액의 점도 시험 결과

(2) Transmission electron microscopy (TEM)

- 투과전자현미경(Tecnai G2 Spirit Twin, FEI Company, U.S.A.)을 이용하여 Discharge option (Amp: 10mA, Time: 30s), Negative staining (carbon film 200 mesh copper grid, 시료 5 ul, 1% uranyl acetate staining)의 조건으로 오리발 콜라겐의 세부 구조를 확인하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음
- 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐은 모두 중성 pH 조건에서 유사한 형태의 섬유상 구조가 관찰되었음(그림 27)

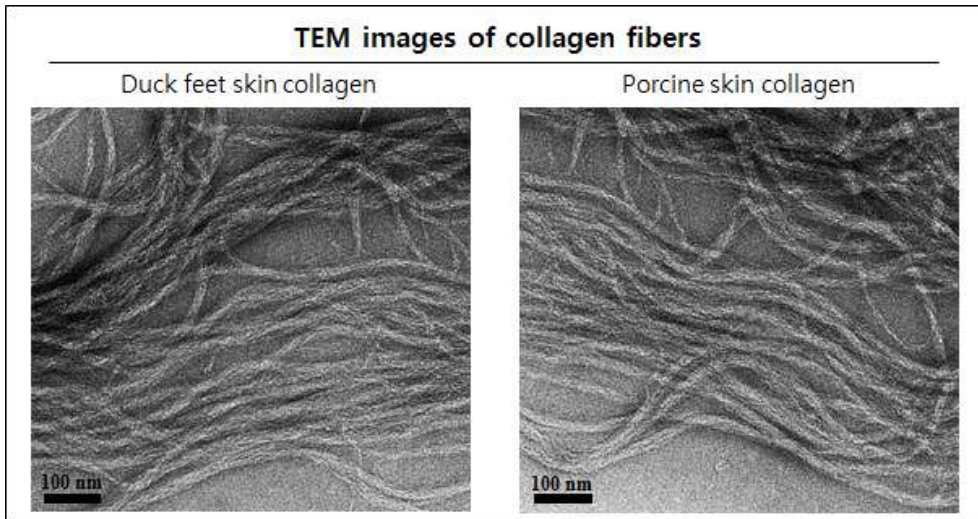


그림 27. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 TEM 시험 결과

(3) Moisture contents

- 수분함량 측정기(IR-30, DENVER INSTRUMENT)를 이용하여 130℃, 10 min의 조건으로 오리발 콜라겐 파우더의 수분 함량을 측정한 결과, 수분 함량은 7.1 ± 1.0% (wt./wt.) 로 기준(20% 이하)에 적합하였음(그림 28)



그림 28. 수분함량 측정 장비

(4) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

- FTIR 측정 장비(JASCO, FT-IR 4100)를 이용하여 분석모드: ATR mode, 분해능: 4 cm^{-1} , Scan 수: 32의 조건으로 오리발 콜라겐의 구조를 분석하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음
- 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐에서 관찰되는 피크 위치가 거의 유사한 것으로 확인되었기 때문에 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 구조가 유사함을 확인하였음(그림 29)

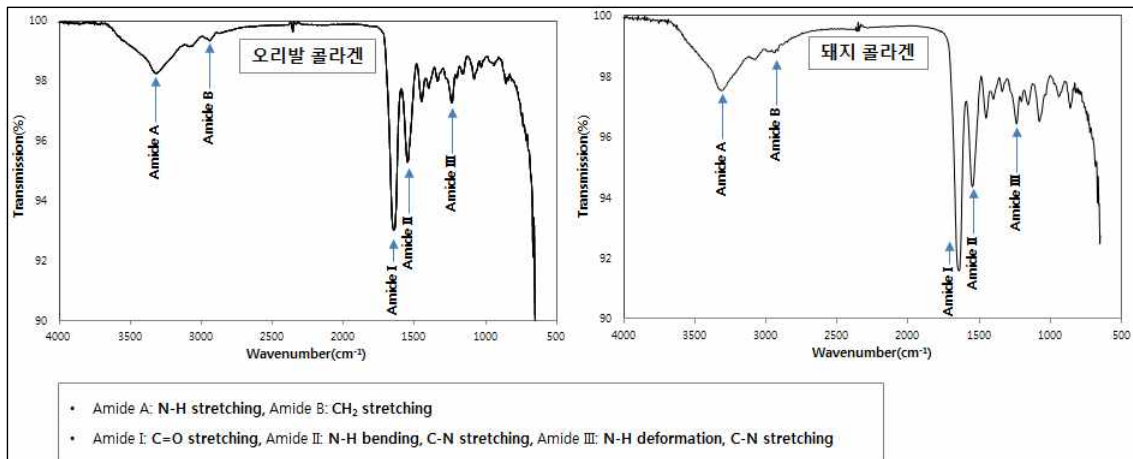


그림 29. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 FTIR 시험 결과

(5) X-Ray Diffraction (XRD)

- XRD 측정 장비(D8 ADVANCE (Bruker AXS GmbH (Germany)))를 이용하여 Step size : 0.02° , Range : $10 \sim 90^\circ$ 의 조건으로 오리발 콜라겐에 잔존하는 결정성 물질을 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음
- 그 결과 분석에 사용된 grid의 background만 확인되었고, 결정성 물질에 해당하는 피크는 확인되지 않아, 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐에는 불순물로 분류되는 결정성 물질이 포함되어 있지 않음을 확인하였음(그림 30)

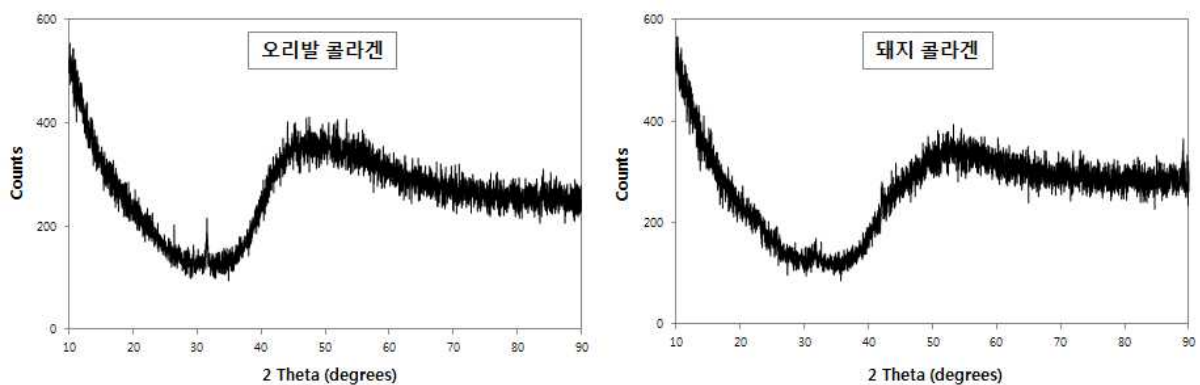


그림 30. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 XRD 시험 결과

다. 생물학적 특성 분석 결과

‘ASTM F2212-11’ 에서 제시하는 시험들 가운데 콜라겐의 생물학적 특성을 규명할 수 있는 분석법에 대하여 시험을 진행하였고 분석 항목은 표 9.와 같음

표 9. 콜라겐의 생물학적 특성 규명을 위한 분석법

번호	분석 항목	분석 방법 및 조건 등
1	Endotoxin Content	Gel clot test (Using LAL test)
2	Microbiological Safety	Bacteria, fungi and Virus
3	Analysis for Type II, III, IV, and Other Collagens	Interrupted SDS-PAGE (Type III) Western Blot (Type II, IV)
4	Total lipid	에테르 추출법

(1) Endotoxin Content

- 엔도톡신 표준용액을 이용하여 작성한 표준곡선과 비탁법(gel 형성 정도를 340 nm에서 탁도 변화로서 측정)을 이용하여 오리발 콜라겐에 포함된 엔도톡신 함량을 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 의료기기 적용을 위한 판정기준(0.5 EU/ml 이하)과 비교함
- 오리발 콜라겐의 엔도톡신 양은 0.0540 ± 0.0069 EU/ml, 돼지 콜라겐의 엔도톡신 양은 0.0598 ± 0.0169 EU/ml로 확인됨(표 10). 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 엔도톡신 양은 유사하였으며, 의료기기 적용을 위한 판정기준인 0.5 EU/ml 이하로 존재하였음

표 10. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 엔도톡신 분석 결과

Sample	엔도톡신(EU/ml)
오리발 콜라겐	0.0540 ± 0.0069
돼지 콜라겐	0.0598 ± 0.0169

(2) Microbiological Safety

(가) Bacteria and fungi 분석

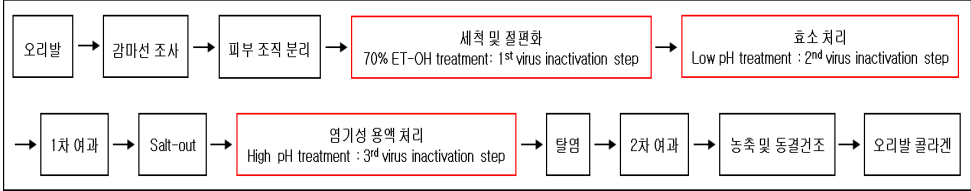
- 오리발 콜라겐을 포함한 액상 티오글리콜산 배지 I(세균 배양 배지)을 이용하여 30 ~ 35℃ 조건에서 14일 이상 배양 또는 대두카제인소화 액체배지(진균 배양 배지)를 이용하여 20 ~ 25℃ 조건에서 14일 이상 배양한 결과 미생물(진균 또는 세균) 증식이 관찰되지 않았음(표 11)

표 11. 오리발 콜라겐의 미생물 증식 분석 결과

구 분	액상티오글리콜산 배지 I		대두카제인소화 액체배지	
	검체	음성대조	검체	음성대조
배양일				
3일	0 / 6	0 / 2	0 / 6	0 / 2
7일	0 / 6	0 / 2	0 / 6	0 / 2
14일	0 / 6	0 / 2	0 / 6	0 / 2

(나) Virus 분석

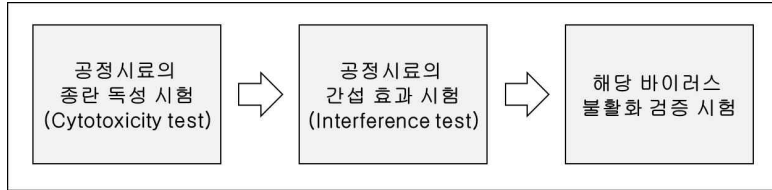
- 동물 유래 성분을 의약품 원료로 사용할 경우 해당 동물종과 관련된 바이러스에 대한 안전성을 입증해야함
- 각종 동물 유래 원재료의 바이러스 불활화 관련 규격들을 바탕으로 오리발 원료로부터 콜라겐을 분리하는 공정에 의해 바이러스들이 제어됨을 바이러스 불활화 시험을 통해 입증하였음
- 관련 연구는 건국대 수의과대학에 위탁연구를 진행하여 완료하였음
- 연구 제목: ‘오리발 유래 콜라겐에 대한 바이러스 불활화 공정 검증’

항 목	내 용												
1. 연구 목적	본 보고서에서는 외부 대학기관에 위탁한 연구(오리발 콜라겐을 제조하는 공정에 의한 조류 유래 바이러스들의 효과적인 불활화 연구)가 타당성 있는 근거들에 의해 설계되고 적합한 방법으로 수행하였는지를 검증하고자 한다.												
2. 오리발 콜라겐 제조 공정													
3. 연구 방법	<p>1. 바이러스 불활화 공정</p> <table border="1" data-bbox="419 1131 1353 1272"> <thead> <tr> <th>구 분</th> <th>처 리 공 정</th> <th>시 간</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>공정 1</td> <td>70% 에탄올 처리</td> <td>24시간</td> </tr> <tr> <td>공정 2</td> <td>강산 처리(pH 2.2 이하)</td> <td>72시간</td> </tr> <tr> <td>공정 3</td> <td>강염기 처리(pH 12 이상)</td> <td>8시간</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. 연구 수행 관련 근거</p> <ul style="list-style-type: none"> • EMEA. International Conference on Harmonization (ICH) Q5A. (1998). Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. • CPMP/BWP. (1996). Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (268/95). • ISO 22442-3. (2007). Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives, Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents. • World Health Organization (WHO). (2004). Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products (Technical Report Series No. 924). • 식품의약품안전처. (2014). 동물 유래 의약품 바이러스 안전성 평가 가이드라인. • 식품의약품안전평가원. (2013). 동물 유래 성분 원재료 사용 의료기기의 바이러스 불활화 처리공정 가이드라인. • 식품의약품안전처. (2006). 혈장분획제제 등 바이러스 검증 평가가이드. 	구 분	처 리 공 정	시 간	공정 1	70% 에탄올 처리	24시간	공정 2	강산 처리(pH 2.2 이하)	72시간	공정 3	강염기 처리(pH 12 이상)	8시간
구 분	처 리 공 정	시 간											
공정 1	70% 에탄올 처리	24시간											
공정 2	강산 처리(pH 2.2 이하)	72시간											
공정 3	강염기 처리(pH 12 이상)	8시간											

3. 시험 대상 조류 유래 바이러스 선정

구분	선정 근거
저병원성 조류 인플루엔자 바이러스(LPAIV H3N2)	전 세계적으로 분포되어 있으며 가금류, 야생조류 그리고 사육조류 등의 다양한 조류 중에 감염되는 바이러스임
뉴캐슬병 바이러스(NDV)	가금, 야생조류를 포함한 대부분의 조류에 감염증(호흡기, 소화기 신경증상)을 일으키는 바이러스임
닭 전염성 기관지염 바이러스(IBV)	닭의 급성, 바이러스성 호흡기 질병을 일으키는 원인체이며 전염성이 매우 높은 바이러스임
오리 간염 바이러스(DHV)	3주령 이하의 오리에서 발생되며, 병의 경과가 빠르고 폐사율도 높은 질병을 일으키는 바이러스임 국내에서는 1985년 이후로 현재까지 발생하고 있음

4. 검증 방법



5. 검증 기준

바이러스 불활화 검증 기준: ≥ 4 log reduction

일반적으로 바이러스 불활화 효율의 검증은 개별 공정들의 log reduction factor를 합한 값으로 표현하며, 측정된 log reduction factor의 합이 4 log reduction 값 또는 이상의 값이 나오면 바이러스를 불활화하기에 효과적인 생산 공정이라 볼 수 있다.

Ref.: CPMP/BWP. (1996). *Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses* (268/95).

1. 공정 시료의 종란 독성 시험 결과

- 70% 에탄올 처리, 강산 처리 그리고 강염기 처리 공정을 거친 시료들은 모두 종란 독성이 없었다.

공정	시료	SPF 종란	Titration range	
				$2^0 \sim 2^{10}$
공정1	에탄올 처리	7일령		2^0
	오리발 조직	10일령		2^0
공정2	강산 처리	7일령		2^0
	오리발 조직	10일령		2^0
공정3	강염기 처리	7일령		2^0
	오리발 콜라겐 염침전물	10일령		2^0

2. 공정 시료의 간섭 효과 시험 결과

- 오리발 조직 파쇄액은 4종의 바이러스 역가에 영향을 미치지 않았다.

- 오리발 콜라겐 염침전물은 NDV, IBV 그리고 DHV의 역가에 영향을 미치지 않았으나, LPAIV는 시료를 10배 희석하였을 때 영향을 미치지 않았다.

4. 연구 결과

바이러스	종란	시료	시료 희석배수	바이러스 역가 (EID ₅₀ /mL)	Virus control
				공정 처리 후 시료	
LPAIV	10 일령	오리발 조직 파쇄액	10^0	$10^{5.8}$	$10^{5.8}$
		오리발 콜라겐 염침전물	10^1	$10^{5.7}$	
NDV	10 일령	오리발 조직 파쇄액	10^0	$10^{6.3}$	$10^{6.3}$
		오리발 콜라겐 염침전물	10^0	$10^{6.3}$	
IBV	10 일령	오리발 조직 파쇄액	10^0	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$
		오리발 콜라겐 염침전물	10^0	$10^{5.3}$	
DHV	7 일령	오리발 조직 파쇄액	10^0	$10^{5.9}$	$10^{6.0}$
		오리발 콜라겐 염침전물	10^0	$10^{6.0}$	

3. 바이러스 불활화 시험 결과

- 70% 에탄올 처리와 강산 처리 공정 후 바이러스 역가가 검출한계 이하로 감소하여 log reduction factor는 5 이상의 값을 나타내었기 때문에 두 공정은 개별 공정만으로도 바이러스들을 효과적으로 불활화할 수 있음을 확인하였다. 강염기 처리 공정 후 log reduction factor는 LPAIV=4.3, NDV=4.2, IBV=4.2, DHV=3.7로 확인되었다.

가. LPAIV 불활화 검증 시험 결과

공정	바이러스 역가(log ₁₀ EID ₅₀ /mL)				Log reduction factor
	공정처리 전		공정처리 후		
	바이러스 농도	용량 (mL)	바이러스 농도	용량 (mL)	
에탄올 처리	5.6	300	≤ 0.3	300	≥ 5.3
강산 처리	5.5	3000	≤ 0.3	3000	≥ 5.2
강염기 처리	5.8	400	1.5	400	4.3

나. NDV 불활화 검증 시험 결과

공정	바이러스 역가(log ₁₀ EID ₅₀ /mL)				Log reduction factor
	공정처리 전		공정처리 후		
	바이러스 농도	용량 (mL)	바이러스 농도	용량 (mL)	
에탄올 처리	6.1	300	≤ 0.3	300	≥ 5.8
강산 처리	5.8	3000	≤ 0.3	3000	≥ 5.5
강염기 처리	6.0	400	1.8	400	4.2

다. IBV 불활화 검증 시험 결과

공정	바이러스 역가(log ₁₀ EID ₅₀ /mL)				Log reduction factor
	공정처리 전		공정처리 후		
	바이러스 농도	용량 (mL)	바이러스 농도	용량 (mL)	
에탄올 처리	5.6	300	≤ 0.3	300	≥ 5.3
강산 처리	5.5	3000	≤ 0.3	3000	≥ 5.2
강염기 처리	5.6	400	1.4	400	4.2

라. DHV 불활화 검증 시험 결과

공정	바이러스 역가(log ₁₀ EID ₅₀ /mL)				Log reduction factor
	공정처리 전		공정처리 후		
	바이러스 농도	용량 (mL)	바이러스 농도	용량 (mL)	
에탄올 처리	6.0	300	≤ 0.3	300	≥ 5.7
강산 처리	5.6	3000	≤ 0.3	3000	≥ 5.3
강염기 처리	6.1	400	2.4	400	3.7

5. 결론

1. 위탁 연구를 진행한 건국대학교 수의과대학에서는 해당 위탁 연구 진행을 위하여 바이러스 불활화 연구에 요구되는 규격 및 가이드라인들을 근거로 타당한 연구를 설계하고 수행하였음을 확인하였다.

가. 콜라겐 원료(오리발)에 감염 가능한 바이러스들을 갈음하여, 연구에 적합한 바이러스들을 선정하였다.

나. 각 바이러스의 특징에 따라 바이러스 배양과 증식 그리고 역가 측정 방법 등을 구분하여 실시함으로써 적절한 연구를 설계하였다.

다. 바이러스 역가 확인에 적합한 단위(log₁₀)로 바이러스 감소 결과를 표기하였다.

라. 바이러스를 불활화하기 위해 선정한 3가지 공정들이 각 바이러스들을 불활화 하는데 유효한지 구별하여 분석하였다.

마. 바이러스 역가 측정에 영향을 미칠 수 있는 기타요인들을 최소화하기 위해 세포 독성 시험과 간섭효과 시험을 실시하여, 불활화 시험에 적합하도록 시료의 최적 조건을 확인하였다.

바. 바이러스 불활화 여부를 PCR 시험을 통해 추가 검증하였다.

	<p>2. 오리발 콜라겐 생산 공정에서 측정된 log reduction factor들의 합은 각각 LPAIV=14.8, NDV=15.5, IBV=14.7, DHV=14.7 이었다. 이 값은 바이러스를 불활화하기에 효과적인 생산 공정이라 판단되는 기준인 4 log reduction 보다 약 3.5 ~ 4.0 배 높은 수치로, 선정된 바이러스 불활화 공정들은 바이러스를 불활화 하기에 충분히 유효하다.</p> <p>3. 위탁 연구 결과를 통해 오리발 조직으로부터 콜라겐을 생산하는 공정이 바이러스를 불활화하여 잔존가능성을 최소화함으로써 안전성을 보장할 수 있는 공정임을 확인하였기 때문에 해당 공정들을 오리발 콜라겐 생산 공정으로 적용하여 생산을 진행한다.</p>
<p>6. 첨부</p>	<p>- 위탁 연구 기관(건국대학교)의 연구시험 결과서 증빙 자료 첨부</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>연구시험 결과서</p> <p>오리발 유래 콜라겐에 대한 바이러스 불활화 공정 검증</p> <p>연구기관장: 건국대학교 산학협력단장 단장 서정향 (직인)</p> <p>연구책임자: 건국대학교 수의과대학 교수 송창선 (인)</p> </div>

(3) Analysis for Type II, IV, and Other Collagens

- 오리발 콜라겐의 원료는 오리발 피부 조직이며, 피부 조직에는 type II, IV 콜라겐이 존재하지 않기 때문에 콜라겐 type III에 대한 분석만 진행함
- 콜라겐을 전기영동하면 Type I 콜라겐의 고유 분자량 위치에 밴드가 나타나지만, disulfide bond가 존재하는 Type III 콜라겐은 β -mercaptoethanol을 추가적으로 처리하여 disulfide bond를 제거해야 밴드가 나타남. 이 후 연속적으로 전기영동을 진행하여 Type I 콜라겐과 Type III 콜라겐 밴드가 확인되면 각 밴드의 면적을 계산하여 구성비율(%)를 확인하는 방법(Interrupted SDS-PAGE method)으로 분석함
- 분석 결과 오리발 콜라겐은 전체 콜라겐 중 약 $98.0 \pm 0.1\%$ 의 type I collagen과 $2.0 \pm 0.1\%$ 의 type III collagen으로 구성되어 있음(그림 31)

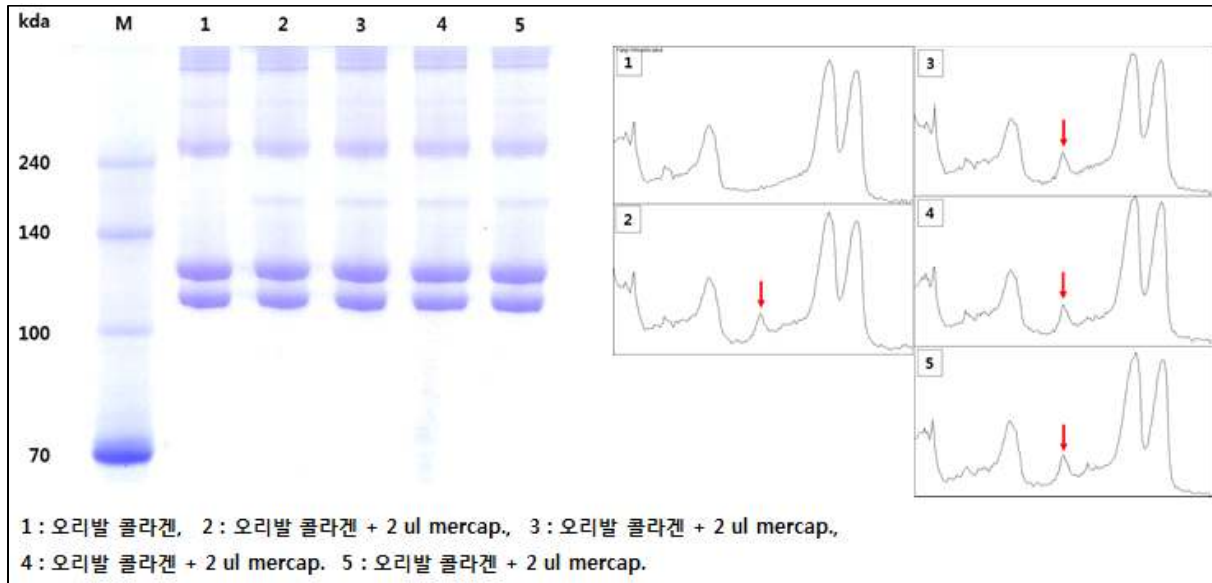


그림 31. 오리발 콜라겐의 Interrupted SDS-PAGE 분석 결과

(4) Total lipid

- 오리발 유래 콜라겐에 포함된 total lipid (조지방) 함량을 에테르추출법을 이용하여 측정하였고, 상용화된 돼지 콜라겐과 비교 분석하였음
- 조지방 함량은 다음 계산식에 의해 계산됨
 - 조지방(%) = $(W_1 - W_0) \times 100 / S$
 - (W_0 : 받는 그릇 무게, W_1 : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇 무게, S: 검체 채취 무게)
- 분석 결과 오리발 콜라겐의 조지방 함량은 0.0%, 돼지 콜라겐의 조지방 함량은 0.1%로 확인됨(표 12)

표 12. 오리발 콜라겐과 돼지 콜라겐의 조지방 분석 결과

Sample	조지방 함량(wt.%)
오리발 콜라겐	0.0
돼지 콜라겐	0.1

라. 품질관리 시험 확립

ASTM F2212-11' 에서 제시하는 시험들 가운데 오리발 콜라겐의 안전성과 유효성을 지속적으로 증명하는데 요구되는 일부 분석법들을 품질검사 시험 항목으로 선정하였고, 대량생산 공정을 위한 '품질관리방법서' 를 확립하였음(표 14)

표 14. 오리발 콜라겐의 품질관리 시험

제품 분류	시험 항목	시험 기준	품질관리방법서 확립
ATELO COLLAGEN-D.F.	성 상	투명 및 반투명 용액	<div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">기밀 세원셀론텍</div> <p style="text-align: center;">품질관리방법서 ATELOCOLLAGEN-D.F.</p> <p>✓ 제정일자: 2017. 07. 14. ✓ 개정일자: - ✓ 개정번호 0</p> <p>■ 관리본 (Controlled) □ 비관리본 (Uncontrolled) (배포처: 품질보증부서)</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; font-size: small;"> 이 문서는 문서보안규정에 의거하여 기밀문서로 분류됩니다. 이 문서의 일부 또는 전부의 복제, 복사 및 대외사용은 보안문서 관리자 이상의 사전승인을 받아야 합니다. 사전승인 없이 상기 행위를 할 경우에는 인사위원회에 회부되어 징계대상이 될 뿐만 아니라 형사상, 민사상의 책임을 지야 합니다. </div> <p style="text-align: center;">세원셀론텍(주)</p>
	무균 시험	불 검 출	
	pH	1.5 ~ 5.5	
	엔도톡신	≤ 0.5 EU/mL	
	콜라겐 함량	> 0.1%	
	중금속	검액의 색은 비교색의 색보다 진하지 않아야 한다.	
	Collagenase / Trypsin resistance		
Trypsin 에 의해 분해되지 않아야 함			
ATELO COLLAGEN-D.F. Powder	성 상	백색 또는 옅은 황색 분말	<div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">기밀 세원셀론텍</div> <p style="text-align: center;">품질관리방법서 ATELOCOLLAGEN-D.F. Powder</p> <p>✓ 제정일자: 2017. 09. 01. ✓ 개정일자: - ✓ 개정번호 0</p> <p>■ 관리본 (Controlled) □ 비관리본 (Uncontrolled) (배포처: 품질보증부서)</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; font-size: small;"> 이 문서는 문서보안규정에 의거하여 기밀문서로 분류됩니다. 이 문서의 일부 또는 전부의 복제, 복사 및 대외사용은 보안문서 관리자 이상의 사전승인을 받아야 합니다. 사전승인 없이 상기 행위를 할 경우에는 인사위원회에 회부되어 징계대상이 될 뿐만 아니라 형사상, 민사상의 책임을 지야 합니다. </div> <p style="text-align: center;">세원셀론텍(주)</p>
	중금속	검액의 색은 비교색의 색보다 진하지 않아야 한다.	
	Hydroxyproline 함량	10.0 ~ 15.0%	
	강열잔분	< 2.0%	
	미생물 시험	< 100 CFU/g	
	Collagenase / Trypsin resistance		
Trypsin 에 의해 분해되지 않아야 함			

마. 결론

- ASTM (F2212_11)에서 제시하고 있는 분석 시험들을 진행하여 오리발 콜라겐의 물리·화학적·생물학적 특성을 입증함
- 콜라겐의 물리·화학적·생물학적 특성 분석 결과를 통해 오리발 콜라겐은 97% 이상 type I 콜라겐으로 구성되어 있음을 확인함(표 13)
- 오리발 콜라겐의 안전성과 유효성을 지속적으로 증명할 수 있도록 일부 시험 항목은 품질검사 시험 항목으로 선정하여 제품 제조 시 마다 진행할 예정임

표 13. 오리발 콜라겐의 성분 분석 결과

Type I 콜라겐	Type III 콜라겐	지방 (Lipid)	GlycosAminoGlycan	엘라스틴 (Elastin)	무기물
97.0% 이상	2.0%	0.0%	0.0085%	0.0168%	0.00%

3. 오리발 유래 콜라겐 상용화

오리발 유래 콜라겐은 연구용 원료, 화장품 원료 그리고 의료용 원료 등으로 상용화할 예정이다

가. 국제 화장품 원료집 등재

오리발 콜라겐은 화장품 원료화를 위해 미국 화장품 협회(PCPC; Personal Care Products Council)에서 발간하는 국제 화장품 원료집(ICID; International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재를 완료함

(1) 국제 화장품 원료집 등재 자료

- 오리발 콜라겐 연구결과를 바탕으로 PCPC에서 발간하는 ICID의 국제 화장품 원료로 등재하기 위한 자료를 확립함
- 자료 제출 목록: ① 원료 제조사에 대한 자료, ② 사업자 등록증 사본, ③ 원료에 대한 자료(그림 32)

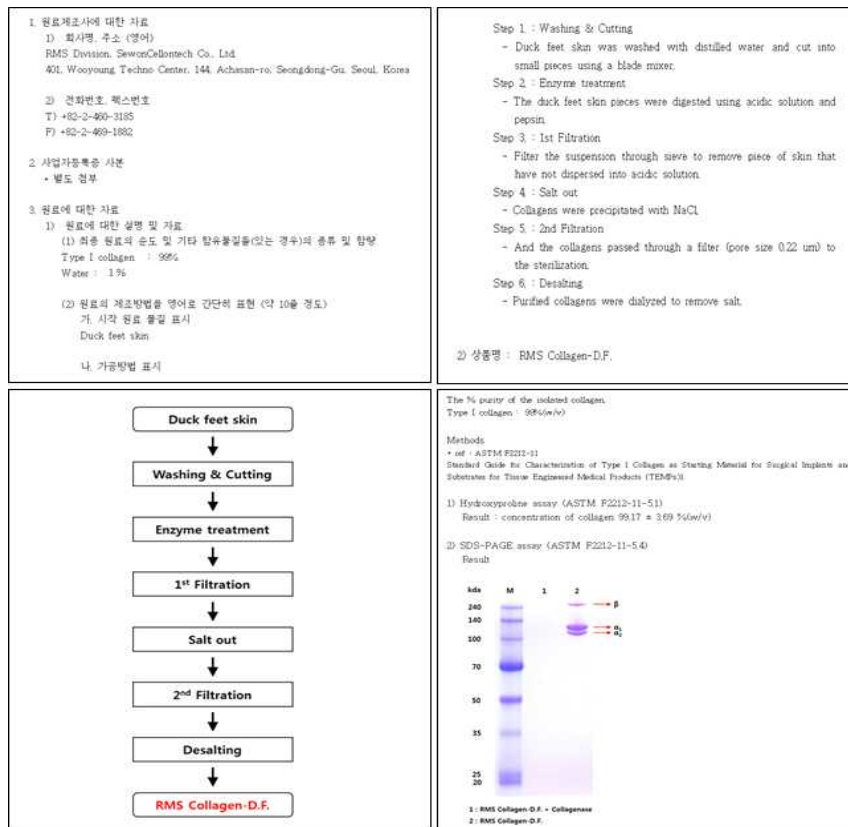


그림 32. 국제 화장품 원료 등재를 위한 자료 구성

(2) 국제 화장품 원료집 등재 완료

- INCI Name: Collagen
- INCI Monograph ID: 592
- On-Line 국제 화장품 원료집 등재 완료: 2016년 04월 25일(그림 33)
- Off-Line 국제 화장품 원료집 발행 예정: 2018년 4월 중(2년마다 발행)

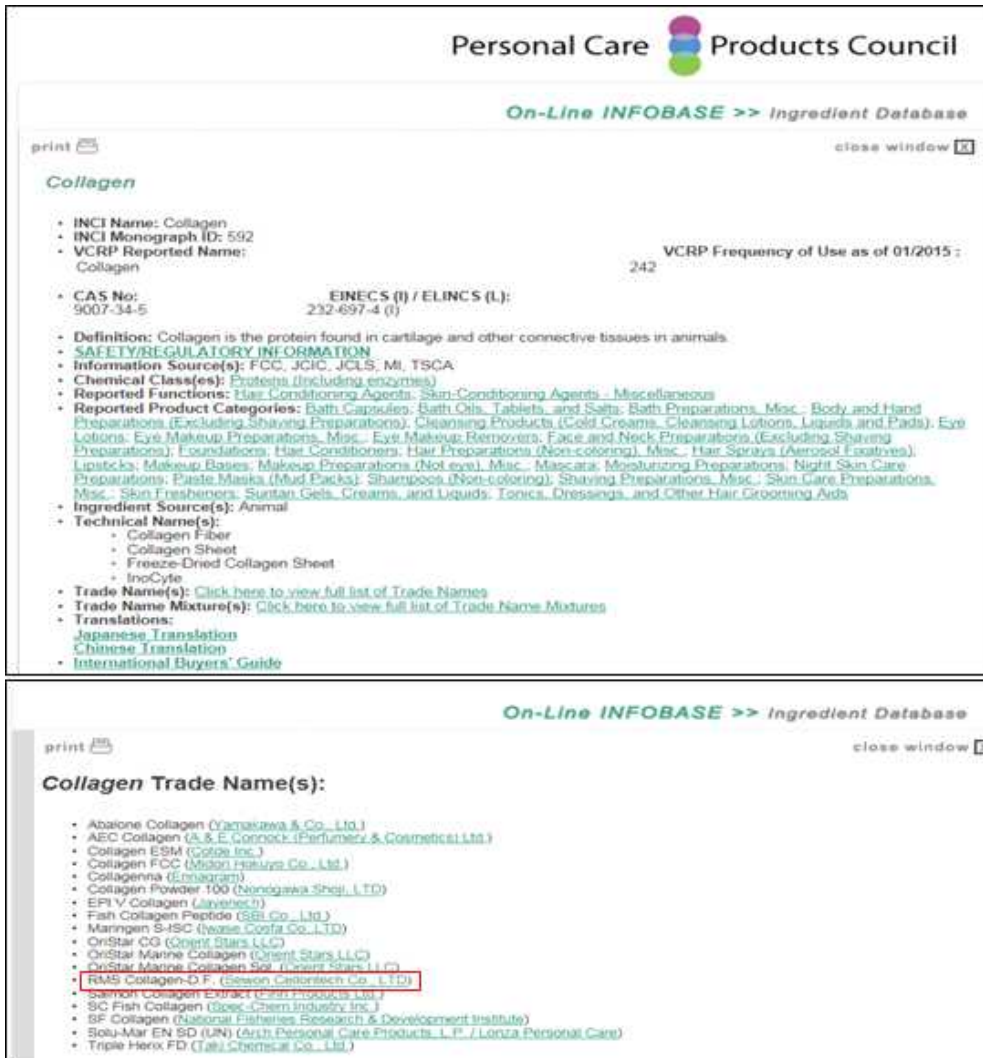


그림 33. 오리발 콜라겐 On-Line 국제 화장품 원료집 등재 완료
(www.personlacarecouncil.org)

나. 원료 의약품(DMF) 등재

오리발 콜라겐은 의료용 원료화를 위해 미국식품의약국(FDA; Food and Drug Administration)의 원료의약품 신고제도(DMF; Drug Master File)에 등록을 완료함

(1) 원료의약품 신고제도 등재 자료

- Drug Master File (DMF)이란 해당 원료의 제조공장, 공정, 제조, 처리, 포장, 저장에서 사용된 물질에 대한 정보 모두 포함하는 문서임

- 오리발 콜라겐 연구결과와 대량 생산 공정을 바탕으로 요구 자료를 구축하여 DMF 등재를 완료함
- 자료 제출 목록: ① DMF 소유권자 정보, ② 제조사에 대한 자료, ③ 제조 및 가공에 사용된 설비, ④ 대리인 정보, ⑤ 제조 및 환경 관련 선언서, ⑥ 오리발 콜라겐의 물리·화학적 특성에 관한 자료, ⑦ 오리발 콜라겐의 제조 공정, ⑧ 주요 원료의 물질안전보건자료(그림 34)

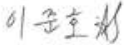
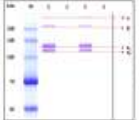
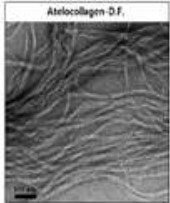
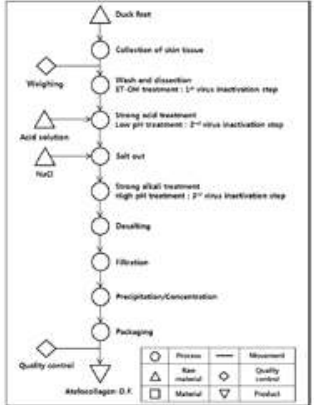
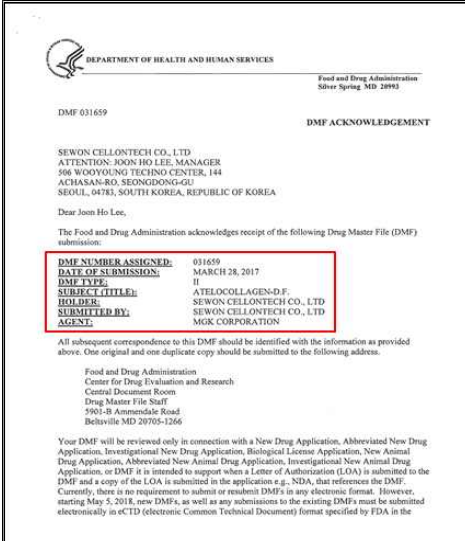
<p>SEWON CELLONTECH CO., LTD. 506 Wooyoung Techno Center, 144, Achaean-ro, Seongdong-gu, Seoul, S. Korea Tel: 82-2-460-3257 Fax: 82-2-460-2885</p> <p>Date: Mar 28, 2017</p> <p>Filed and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research Central Document Room Drug Master File Staff 9607-B Annapolis Plaza Bethesda MD 20895-1398</p> <p>The Original Submission for Type II Drug Master File</p> <p>Holder name: SEWON CELLONTECH CO., LTD. Manufacturer name: SEWON CELLONTECH CO., LTD. Manufacturing Site: 506 Wooyoung Techno Center, 144, Achaean-ro, Seongdong-gu, Seoul, South Korea Tel: 82-2-460-3257 Fax: 82-2-460-2885</p> <p>Subject: DMF filing for Atelocollagen-D.F. (Type II)</p> <p>We request that all information in this file be treated as confidential to the extent possible in accordance with 21 CFR 314.430 and 21 CFR 302.67, and that no information from this file be provided to any unauthorized persons without our written consent.</p> <p>Signature:  Jooh Ho Lee / Manager SEWON CELLONTECH CO., LTD.</p>	<p>Introduction</p> <p>Product Description: SEWON CELLONTECH CO., LTD. manufactures Atelocollagen-D.F. which is a highly purified, genuine atelocollagen with optimal biocompatibility. It is helpful in achieving best tissue reactions in human body.</p> <p>Process Description: Founded under the name of Miwon Heavy Machinery to manufacture and supply equipments for chemical plant of Miwon Group (Daesang Group) in 1971, SEWON CELLONTECH CO., LTD. continues to grow and develop each business area quantitatively and qualitatively, pursuing to specialize characteristics of each business area.</p> <p>Firsting on 3 technology industries including plant, hydraulic and two businesses SEWON CELLONTECH CO., LTD. creates organic synergistic effects based on the complementarity and synergy of each business domain, and is attempting to establish stable growth and rapid development business study.</p> <p>Confidentiality: Information presented in this DMF is confidential and shall be treated as confidential information from this file shall not be provided to any unauthorized persons without the written consent of SEWON CELLONTECH CO., LTD.</p>	<p>Administrative Information</p> <p>Holder name: SEWON CELLONTECH CO., LTD. Holder address: 506 Wooyoung Techno Center, 144, Achaean-ro, Seongdong-gu, Seoul, 04783, South Korea Holder phone: 82-2-460-3257 Holder contact person: Jooh Ho, Lee / Manager Contact person's email address: kee90504@swcell.com</p> <p>Manufacturing Site: Same as Holder information</p> <p>U.S. Agent: MKK Corporation Address: 15414 Rose Rd, Lakewood, WA 98498 USA Phone: 253-414-6693 Contact person: Mrs. Mi-Gum Kwon Email address: mgk@mkcorp@gmail.com</p>																																																							
<p>Characterization</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Apparatus</th> <th>Specifications</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>pH measurement</td> <td>± 0.01</td> </tr> <tr> <td>Heavy Metals</td> <td>Non-detection</td> </tr> <tr> <td>SDS-PAGE analysis</td> <td>Collagen-binding patterns</td> </tr> <tr> <td>Protein digestion</td> <td>Type I procollagen structure of purified collagen is resolved to triple helix structure, hydroxyproline content and aspartic acid content are fully digested.</td> </tr> <tr> <td>Collagenase digestion</td> <td>Purified collagen was used for specific digestion of triple helix collagen.</td> </tr> <tr> <td>Stability Test</td> <td>Non-detection</td> </tr> <tr> <td>Endotoxin</td> <td>< 0.5 EU/ml</td> </tr> <tr> <td>Collagen content</td> <td>> 90%</td> </tr> <tr> <td>Amino acid analysis</td> <td>Amino acids level for entire range of published data for highly purified collagen preparations, generally in the acid sulfate form.</td> </tr> <tr> <td>Transmission electron microscopy</td> <td>Transmission electron microscopy may be used to show the triple helix collagen fibers.</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. Atelocollagen-D.F. SDS-PAGE analysis Type I procollagen structure of purified collagen is resolved to triple helix structure, hydroxyproline content and aspartic acid content are fully digested. Also the collagen demonstrated the absence of non-collagenous proteins.</p>  <p>2. Biological Purification characteristics of Atelocollagen-D.F. (Endotoxin level < 0.5 EU/ml) Negative for the presence of bacteria endotoxin.</p>	Apparatus	Specifications	pH measurement	± 0.01	Heavy Metals	Non-detection	SDS-PAGE analysis	Collagen-binding patterns	Protein digestion	Type I procollagen structure of purified collagen is resolved to triple helix structure, hydroxyproline content and aspartic acid content are fully digested.	Collagenase digestion	Purified collagen was used for specific digestion of triple helix collagen.	Stability Test	Non-detection	Endotoxin	< 0.5 EU/ml	Collagen content	> 90%	Amino acid analysis	Amino acids level for entire range of published data for highly purified collagen preparations, generally in the acid sulfate form.	Transmission electron microscopy	Transmission electron microscopy may be used to show the triple helix collagen fibers.	<p>4. Transmission electron microscopy The triple helix structure of collagen was confirmed by transmission electron microscopy analysis.</p>  <p>Major raw materials</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Manufacturer</th> <th>CAS No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ethylenediamine</td> <td>DAEJUNG Chemical, Korea</td> <td>64-1758</td> </tr> <tr> <td>Hydrochloric acid</td> <td>Wako, Germany</td> <td>7647-01-2</td> </tr> <tr> <td>Formic acid</td> <td>MP Biomedicals, U.S.A.</td> <td>801-704</td> </tr> <tr> <td>Phosphoric acid</td> <td>JUNSEI, Japan</td> <td>7664-38-2</td> </tr> <tr> <td>Sodium chloride</td> <td>DAEJUNG Chemical, Korea</td> <td>7647-145</td> </tr> <tr> <td>Sodium hydroxide</td> <td>Wako, Germany</td> <td>1310-73-2</td> </tr> </tbody> </table>	Name	Manufacturer	CAS No.	Ethylenediamine	DAEJUNG Chemical, Korea	64-1758	Hydrochloric acid	Wako, Germany	7647-01-2	Formic acid	MP Biomedicals, U.S.A.	801-704	Phosphoric acid	JUNSEI, Japan	7664-38-2	Sodium chloride	DAEJUNG Chemical, Korea	7647-145	Sodium hydroxide	Wako, Germany	1310-73-2	<p>Manufacturing Process</p> <p>1. Manufacturing Process of Atelocollagen-D.F.</p>  <p>Quality control</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Symbol</th> <th>Meaning</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>○</td> <td>Process</td> </tr> <tr> <td>△</td> <td>Raw material</td> </tr> <tr> <td>◇</td> <td>Quality control</td> </tr> <tr> <td>□</td> <td>Material</td> </tr> <tr> <td>▽</td> <td>Product</td> </tr> </tbody> </table>	Symbol	Meaning	○	Process	△	Raw material	◇	Quality control	□	Material	▽	Product
Apparatus	Specifications																																																								
pH measurement	± 0.01																																																								
Heavy Metals	Non-detection																																																								
SDS-PAGE analysis	Collagen-binding patterns																																																								
Protein digestion	Type I procollagen structure of purified collagen is resolved to triple helix structure, hydroxyproline content and aspartic acid content are fully digested.																																																								
Collagenase digestion	Purified collagen was used for specific digestion of triple helix collagen.																																																								
Stability Test	Non-detection																																																								
Endotoxin	< 0.5 EU/ml																																																								
Collagen content	> 90%																																																								
Amino acid analysis	Amino acids level for entire range of published data for highly purified collagen preparations, generally in the acid sulfate form.																																																								
Transmission electron microscopy	Transmission electron microscopy may be used to show the triple helix collagen fibers.																																																								
Name	Manufacturer	CAS No.																																																							
Ethylenediamine	DAEJUNG Chemical, Korea	64-1758																																																							
Hydrochloric acid	Wako, Germany	7647-01-2																																																							
Formic acid	MP Biomedicals, U.S.A.	801-704																																																							
Phosphoric acid	JUNSEI, Japan	7664-38-2																																																							
Sodium chloride	DAEJUNG Chemical, Korea	7647-145																																																							
Sodium hydroxide	Wako, Germany	1310-73-2																																																							
Symbol	Meaning																																																								
○	Process																																																								
△	Raw material																																																								
◇	Quality control																																																								
□	Material																																																								
▽	Product																																																								

그림 34. 원료의약품 신고제도 등록을 위한 자료 구성

(2) 원료의약품 신고제도 등록 완료

- DMF 등재 번호: 031659
- DMF type: II
- 등재명: ATELOCOLLAGEN-D.F.
- 등재 원료 소유자: SEWON CELLONTECH CO., LTD.



DMF ACKNOWLEDGEMENT

SEWON CELLONTECH CO., LTD
ATTENTION: JOON HO LEE, MANAGER
566 WOYOYONG TECHNO CENTER, 144
ACHASAN-RO, SEONGDONG-GU
SEOUL, 04783, SOUTH KOREA, REPUBLIC OF KOREA

Dear Joon Ho Lee,
The Food and Drug Administration acknowledges receipt of the following Drug Master File (DMF) submission:
DMF NUMBER ASSIGNED: 011659
DATE OF SUBMISSION: MARCH 28, 2017
DMF TYPE: II
SUBJECT/TITLE: ATELLOCOLLAGEN-D.F.
HOLDER: SEWON CELLONTECH CO., LTD
SUBMITTED BY: SEWON CELLONTECH CO., LTD
AGENT: MGK CORPORATION

All subsequent correspondence to this DMF should be identified with the information as provided above. One original and one duplicate copy should be submitted to the following address:
 Food and Drug Administration
 Center for Drug Evaluation and Research
 Central Document Room
 Drug Master File Staff
 5901-B Ammendale Road
 Bethesda MD 20705-1266

Your DMF will be reviewed only in connection with a New Drug Application, Abbreviated New Drug Application, Investigational New Drug Application, Biological License Application, New Animal Drug Application, Abbreviated New Animal Drug Application, Investigational New Animal Drug Application, or DMF if it is intended to support when a Letter of Authorization (LOA) is submitted to the DMF and a copy of the LOA is submitted in the application e.g., NDA, that references the DMF. Currently, there is no requirement to submit or resubmit DMFs in any electronic format. However, starting May 5, 2018, new DMFs, as well as any submissions to the existing DMFs must be submitted electronically as eCTD (electronic Common Technical Document) format specified by FDA in the

DMF#	STATUS	TYPE	SUBMIT DATE	HOLDER	SUBJECT
31655	A	II	3/28/2017	AMINO GMBH	BETAINE PHARMACEUTIC
31656	A	II	4/4/2017	INTERQUIM SA DE CV	FOSFOMYCIN TROMETAM
31657	A	III	4/4/2017	PRECISE FLEXIBLES PVT LTD	PRINTED/PLAIN COATED/
31658	A	II	5/31/2017	SEASONS BIOTECHNOLOGY (TAIZHOU) CO LTD	MACITENTAN
31659	A	II	3/28/2017	SEWON CELLONTECH CO LTD	ATELLOCOLLAGEN-D.F.
31660	A	II	5/24/2017	HUNAN NORCHEM PHARMACEUTICAL CO LTD	5TR
31661	A	II	4/5/2017	JIANGXI SYNERGY PHARMACEUTICAL CO LTD	MIRABEGRON
31662	A	II	4/3/2017	RIOGARE INDIA PRIVATE LTD	SIMETHICONE 50% POWD
31663	A	II	4/5/2017	JIANGXI SYNERGY PHARMACEUTICAL CO LTD	VILDAGLIPTIN
31664	A	II	4/28/2017	ALEMBIC PHARMACEUTICALS LTD	MACITENTAN
31665	A	II	6/16/2017	ALEMBIC PHARMACEUTICALS LTD	RIOCIQUAT
31666	A	III	4/11/2017	NIHON MATAI CO LTD	LAL SERIES

그림 35. 원료의약품 신고제도 등록 완료

(좌: DMF 등록 확인서, 우: DMF list)

(<https://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/formssubmissionrequirements/drugmasterfilesdmfs/default.htm>)

다. 시제품 제작 및 원료 상용화

대량 생산 설비로부터 제조된 오리발 콜라겐을 연구용 및 화장품 원료로 상용화하였으며, 화장품 원료 판매는 세원셀론텍(주)에서 기 구축되어있는 시스템을 활용하고 있음

(1) 연구용 오리발 콜라겐 상용화

- 연구용 오리발 콜라겐을 상용화하기 위해 파우더 타입의 오리발 콜라겐을 제조함
- 파우더 타입의 오리발 콜라겐은 2%의 콜라겐 용액을 동결 건조하여 0.25 cm² 이하의 크기로 절단하여 플라스틱 용기에 포장하여 판매함(그림 36)
- 연구용 오리발 콜라겐은 membrane, implant, gel 그리고 hydrogel 등의 형태로 제조하여 *in vivo* 적용 목적으로도 사용 가능함
- 또한 세포배양, 세포 전달 물질, 3D 프린트 등의 용도로 사용 가능함
- 연구용 오리발 콜라겐 원료는 국제 학술대회(International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymer)의 초록집 광고를 통해 국내·외 연구자 및 기업체에 우수한 생체 재료인 오리발 콜라겐을 홍보함(그림 37)



그림 36. 연구용 오리발 콜라겐 원료

(좌: 오리발 콜라겐 파우더 이미지, 우: 완제품 이미지)

Biocompatible collagen for raw material

TheraCol® (RMS Atelocollagen)

Highly purified sterile atelocollagen
 Nearly non-immunogenic collagen solution
 Advanced technologies and excellent quality control

Biocompatible collagen

- High Biocompatibility with Triple-Helix Structure
- Manufactured with Propriety Technologies
- The Least Immunogenicity with Telopeptide Cleavage
- Highly Purified Porcine Type I Collagen

Advantages of RMS Atelocollagen

Advanced manufacturing processes	Safety verification	Wide variety of uses
<ul style="list-style-type: none"> Telopeptide cleavage with pepsin for removal of antigenicity Low temperature processing and freeze-drying for a stable triple helix collagen structure Strict management of manufacturing environment (ISO15485 and GMP for medical devices) 	<ul style="list-style-type: none"> Ensuring safety of raw materials through strict quality management (HACCP-certificate, Slaughter inspection certificate) Highly biocompatible : immune-free collagen Introduction of validated virus inactivation process 	<ul style="list-style-type: none"> Used as medical devices and for research due to the medical grade raw materials A variety of forms such as sponge, film, hydrogel and fiber Applications: Bone grafting material, ligament healing, wound dressing, hemostasis, as 3D porous scaffolds, a coating material, artificial corneas, cosmetics, and many more

Application of RMS Atelocollagen

Products

Product	Source	Type	Grade
TheraCol	Porcine skin	Liquid / Powder	GMP grade
TheraCol-D.F.	Duck Feet skin	Liquid / Powder	R&D grade

* Research work of the TheraCol-D.F. was supported by Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (814005-3).

RMS (Regenerative Medical System) is the Bio-division of **SewonCellotech**. RMS manufactures GMP grade collagen at its own facility on a foundation of advanced technology. RMS is the leader of innovative biological products in the field of regenerative medicine (covering medical devices, tissue engineering, cosmetics, and so forth).

RMS Regenerative Medical System 404 Wooyoung Techno center, 144, Acheam-ro, Seongdong-Gu, Seoul, Korea
 Tel : +82(0)2 450-3282 (Domestic), +82(0)2 450 3257 (Overseas) / Fax : +82(0)2 499 2865
 Email : contact@sewocell.com www.rmsbio.net Copyright © 2018 SewonCellotech, Co., Ltd. All Rights Reserved.

그림 37. 연구용 오리발 콜라겐 원료 홍보 자료

- 연구용 오리발 콜라겐은 2017년 10월 기준 4건의 판매 실적이 있었으며, 매출액은 1,417.8 만원임(표 15)

표 15. 연구용 오리발 콜라겐 상용화 실적

구분	제품명	제품 출시일	매출액 (천원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지
1	오리발 콜라겐	2016.04.01.	1,200	100	국산
2	오리발 콜라겐	2016.04.01.	4,800	100	국산
3	오리발 콜라겐	2016.04.01.	6,000	100	국산
4	오리발 콜라겐	2017.10.19.	2,178	100	국산

(2) 화장품 원료용 콜라겐 상용화

- 화장품 원료로 콜라겐을 상용화하기 위해 액상 타입의 오리발 콜라겐을 제조함
- 액상 타입의 오리발 콜라겐은 1%의 콜라겐 용액을 플라스틱 용기에 포장하여 판매함 (그림 38)



그림 38. 화장품용 오리발 콜라겐 원료
(좌: 액상 오리발 콜라겐 이미지, 우: 완제품 이미지)

- 화장품 원료용 오리발 콜라겐의 세부 사양은 표 16.과 같음

표 16. 화장품 원료용 오리발 콜라겐 세부 사양

항목	내용
Appearance	A Colorless, clear and viscous liquid
Sterility (bacteria)	Negative
Endotoxin	1 EU/mL
pH	1.8 ~ 3.5
Heavymetals	Negative
Concentration of collagen	0.9 ~ 1.1%
Osmolarity	< 200 mOsm/kg

- 화장품 원료가 아닌 완제품으로 기초화장품(고농축 콜라겐)의 시작품(NovoFill-D.F.)을 제조함(그림 39). NovoFill-D.F.는 Microneedle Therapy System (MTS)과 병합하여 사용할 경우 피부 침투력이 증가 가능한 제품임



그림 39. 오리발 콜라겐 기초 화장품 시작품

- 소/돼지 동물 유래의 원료나 제품을 종교적인 신념이나 관습 등으로 기피하거나 사용이 불가한 국가에 화장품 원료로 오리발 유래 콜라겐을 수출하기 위해 '2017 Korea Brand Entertainment Expo (KBEE) - JAKARTA'에 제품을 전시함(그림 40)
- 세원셀론텍(주)의 화장품 브랜드인 '세라제나' 홍보팀을 통해 KBEE에 오리발 콜라겐을 할랄 제품으로 홍보하였고, 관련 업체로부터 호평을 받았음
- 특히 현재 어류에서 추출한 콜라겐을 사용하여 화장품을 제조하고 있는 업체인 'TRINITY PRATAMA' 사는 오리발 콜라겐에 높은 관심을 보였음



그림 40. 국제 박람회 참가(오리발 콜라겐 전시 및 홍보)
(붉은 점선: 오리발 콜라겐 원료 전시)

1협동(전북대학교)

과제명: 오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근 골격계용 의료용 생체 재료 개발

제 1협동과제(전북대학교)의 목표는 “오리발 유래 의료용 콜라겐을 이용한 근골격계 생체 재료 제작 및 개발” 로 콜라겐을 이용한 생체 소재 원천 기술 및 지지체를 개발하고, 제작한 지지체의 안정성 유효성 평가 및 시제품을 제작하는 연구내용으로 다음과 같이 연구를 수행 하였음

1. 오리발 유래 콜라겐이 함유된 제형 연구

가. 스펀지 형태 제형 연구

(1) SBF 용액 내에서 하이드록시아파타이트(HAp)가 코팅된 오리발 콜라겐(DC) 스펀지의 골 재생 능력 평가

(가) Similar body fluid (SBF) 용액 내에서 HAp를 코팅한 DC 지지체 제조 방법

① DC 스펀지 제조

- 오리발(3개)을 수돗물에 담가 24시간 동안 핏물을 제거한 후 지방제거를 위해 1 M NaOH에 넣고 24 시간 교반함. 메탄올 : 클로로포름을 3 : 1 비율로 혼합한 용액으로 세척하여 지방을 제거한 후 아세톤, 알코올, 증류수(DW) 순서로 세척함
- 콜라겐 추출을 위해 5% 구연산 2 L에 믹서기로 분쇄한 오리발을 담가 48시간 교반하고 불순물을 거즈로 걸러낸 후 원심(10000 rpm, 15 min)을 돌려 산에 녹은 콜라겐을 분리하고 콜라겐양의 3배인 알코올을 넣어 원심 분리함(1500 rpm, 15 min)
- 상층액은 버리고 침전된 콜라겐들을 모아서 증류수에 용해 후 동결 건조하여 DC 분말을 얻음
- 3차 증류수에 3%아세트산과 0.1% 펩신을 함유한 용액에 DC 분말을 2 wt.%, 3 wt.%로 상온에서 48시간 교반 후 48 well plate에 담고 냉장 4시간 냉동 4시간 보관 후 동결 건조함
- 0.25% 글루타알데하이드로 4시간 동안 경화시킨 뒤 3차 증류수로 10분간 3번 세척 후 동결 건조하여 보관함(그림 1)

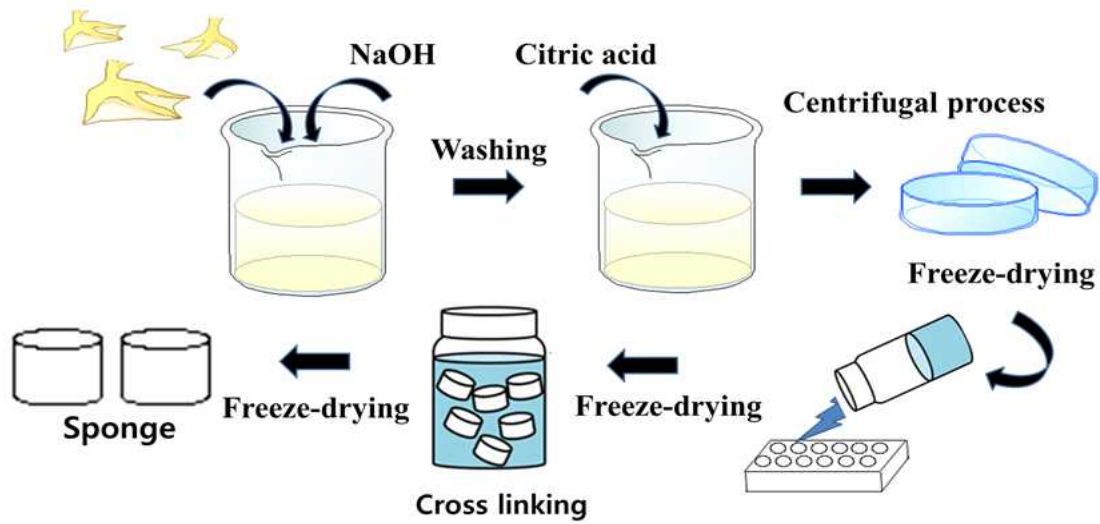


그림 1. DC 스펀지 지지체 제조 방법

② SBF 용액내에서 HA_p 코팅

- 표 1.에 나타낸 조성의 순서로 만든 SBF 용액에 지지체를 담가 인큐베이터내에서 24시간 동안 처리하여 지지체에 HA_p를 침전시켜 코팅함(그림 2, 3)
- 3차 증류수로 세척 후 상온에서 건조한 뒤 수분 없이 데시케이터에 보관함

표 1. SBF 용액 제조법

	Reagent	Weight(g/L)
1	NaCl	12.053
2	NaHCO ₃	0.533
3	KCl	0.338
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.347
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.467
6	1M HCl	50mL
7	CaCl ₂	0.438
8	Na ₂ SO ₄	0.108
9	(CH ₃ OH) ₃ CNH ₂	9.177
10	1M HCl	8.5mL

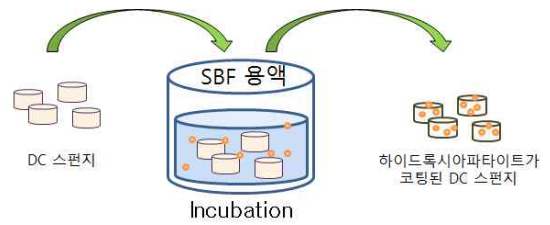


그림 2. HA_p 코팅 방법

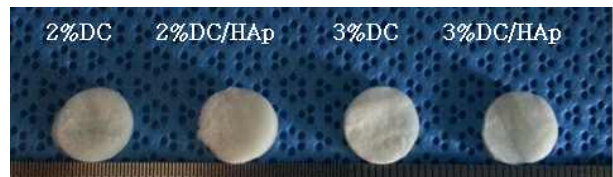


그림 3. 2 wt.%, 3 wt.% DC, DC/HA_p지지체 사진

(나) 물리적 특성 분석

- DC 및 DC/HAp 지지체의 성분을 확인하기 위해서 FT-IR 분석을 시행함. 그 결과 DC 지지체에서는 콜라겐의 전형적인 피크로 1650, 1560, 1235 cm^{-1} 에서 Amide I, II, III가 나타났고, 콜라겐 함량이 증가할수록 3352 cm^{-1} 에서 OH기가 증가함. DC/HAp 지지체에서는 566~605 cm^{-1} 에서 PO_4^{3-} 피크가 확인됨(그림 4)

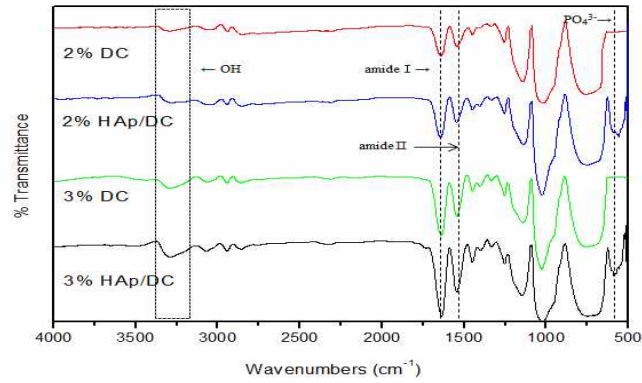


그림 4. DC 및 HAp/DC 지지체의 FT-IR 분석

- 콜라겐 함량에 따른 DC 및 DC/HAp 지지체의 다공 크기를 확인하기 위해 SEM을 촬영 함. 콜라겐 함량이 증가할수록 다공 크기는 작아졌으며, 2 wt.% DC 함량 지지체는 283~295 μm , 3 wt.% DC 함량 지지체는 231~235 μm 로 다공의 크기가 확인됨(그림 5)

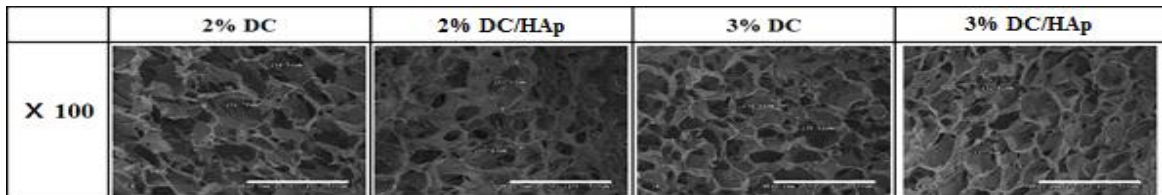


그림 5. DC 및 DC/HAp 지지체의 다공 크기 확인

- 콜라겐 함량에 따른 DC 및 DC/HAp 지지체의 공극률을 측정함
- 그 결과 모든 지지체에서 81.6 ~ 85.7% 사이로 비슷한 공극률 값을 나타내었음(그림 6)

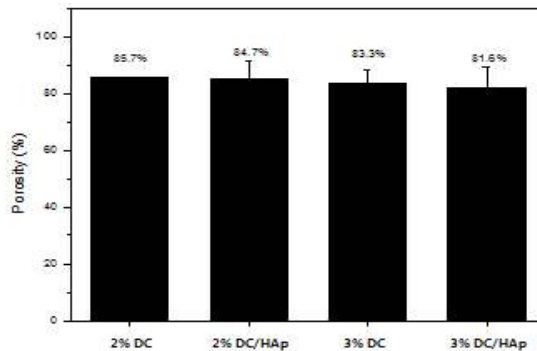


그림 6. DC 및 DC/HAp 지지체의 공극률 확인

(다) 세포 증식과 mRNA 발현도 확인

- DC 및 DC/HAp 지지체에서의 세포 증식률과 골 분화 특이 마커의 발현도를 확인하기 위하여, 제조된 지지체를 지름 7 mm, 두께 3 mm로 절단 후 멸균하여 48well에 넣고 토끼의 다리에서 추출한 Bone marrow stem cell (BMSC)을 1×10^5 cell/scaffold 로 파종함
- 세포는 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 배양액은 20% FBS와 1% antibiotics을 포함한 α -MEM을 사용하였고 배양액은 1 ml씩 3일에 1번 갈아줌
- 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28일 동안 세포 증식률을 MTT assay를 통해 확인함
- 각 타임 포인트에서 새로운 배양액으로 교체 후 배양액의 1/10 ml의 MTT 용액을 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 처리 후 용액을 제거하고 Dimethylsulfoxide (DMSO)를 처리한 후 ELISA reader기를 사용하여 570 nm 파장으로 측정함
- 그 결과 시간이 지날수록 세포 증식률은 증가하였으며, 3 wt.% DC 지지체 보다는 다공크기와 공극률이 큰 2 wt.% DC 지지체와 HAp를 코팅해준 지지체에서 세포증식률이 높았음(그림 7)
- 위와 동일하게 BMSC을 28일 동안 배양한 후 골 분화된 세포의 특정 mRNA 발현 여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 실시함
- PCR 후 증폭된 DNA를 아가로스겔에 전기영동을 한 후 상대적 발현을 EtBr를 사용하여 시각화 하였으며, 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 β -actin, osteocalcin, Type I collagen, Runx-2 프라이머에 대한 밴드의 발현도를 확인함
- β -actin은 house keeping gene으로 발현량을 표준화시켜 비교함
- 세포증식률이 가장 우수하였던 2 wt.% DC/HAp 지지체에서의 각 프라이머에서 발현도가 제일 높은 값을 가지는 것을 확인함(그림 8)

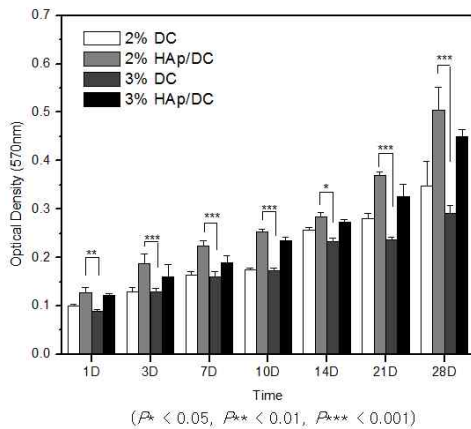


그림 7. MTT assay를 이용한 세포증식률 측정

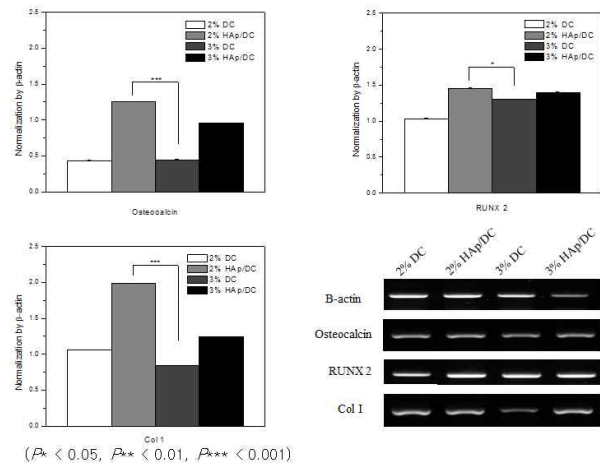


그림 8. 지지체에서 배양한 BMSC의 mRNA 발현도 확인

(라) *In vivo*에서 지지체의 골 재생 효과 확인

- 2 wt.% DC 지지체와 HAp을 코팅한 지지체에 세포를 파종한 지지체와 세포를 파종하지 않은 지지체의 골 재생 효과를 비교함(그림 9, 10)
- SD rat 동물모델을 마취 후 두개골에 결손부를 제거 후 멸균된 지지체를 삽입하고 완전 봉합함
- 2, 4, 8주 동안 지지체 회수 후 micro-CT를 촬영함. 전체적으로 골 미네랄 함유도와 골 볼륨 분석 결과에서 세포를 파종한 2 wt.% DC/HAp 지지체가 골 재생에 우수한 값을 가졌으며, 8주 동안 75% 골 형성이 이루어졌음
- 본 연구를 통해서 제작된 DC/HAp 지지체는 골 조직 재생을 위한 유도재로 활용될 수 있을 것이라 사료됨

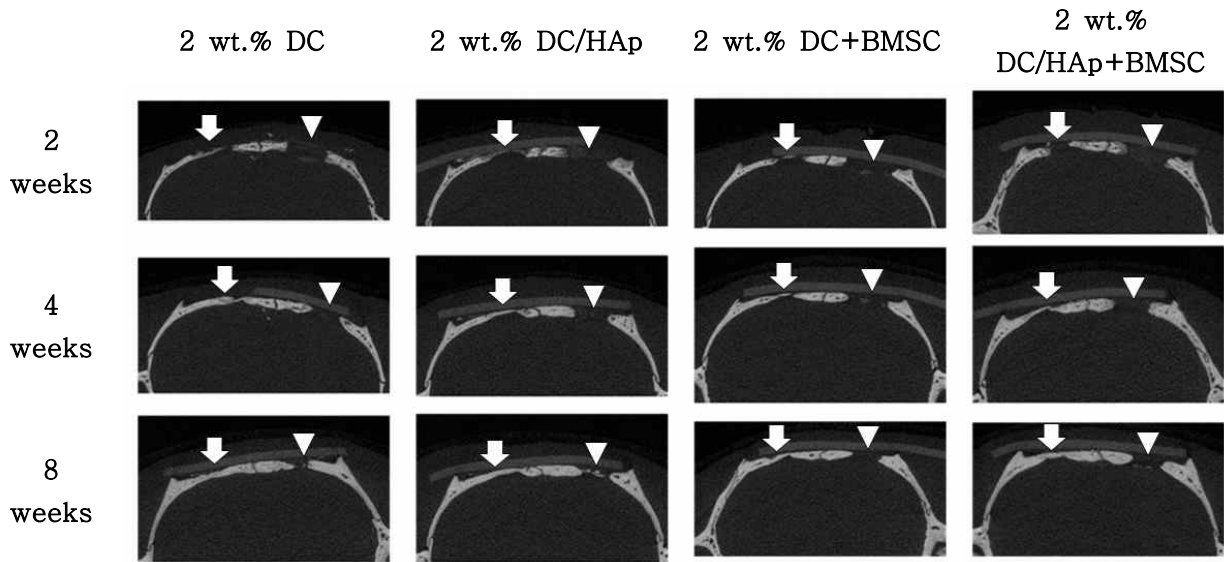


그림 9. DC/HAp지지체의 Micro-CT 2차원 사진 분석(⇓: 지지체, ∇: Blank)

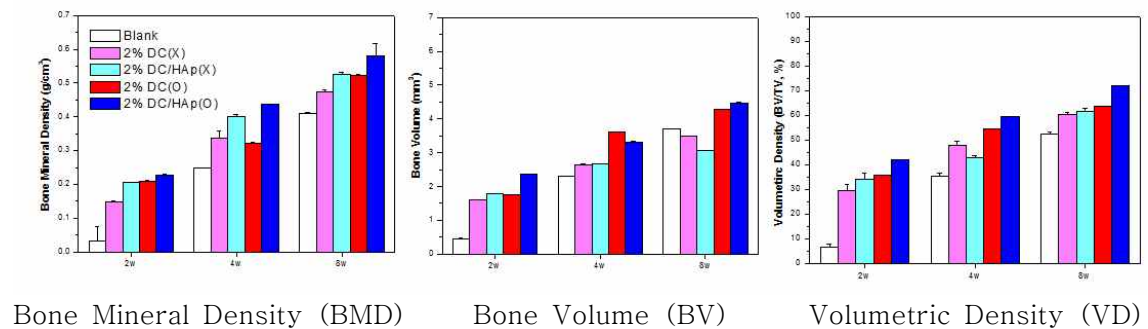


그림 10. DC 및 DC/HAp 지지체에서의 골 재생 능력 관찰을 위한 Micro-CT 결과 (DC(X)군: BMSC가 파종되지 않은 군, DC(O)군: BMSC가 파종된군)

(2) Dexamethasone이 DC, DC/HAp 지지체에서 배양한 골수간엽줄기세포의 골분화에 미치는 영향

- 2 wt.% DC 수용액을 48-well plate에 분주하여 동결건조법을 이용하여 DC 스펀지를 제조함
- DC 스펀지 일부는 SBF 용액에 2일 동안 담가 HAp 코팅을 하여 DC/HAp 스펀지를 제조하였으며, 지지체는 DC, DC/HAp 스펀지를 이용하였음(그림 11)

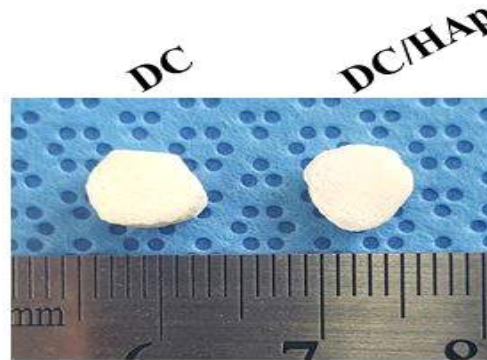


그림 11. DC/HAp 스펀지 gross image

- 제조된 스펀지를 일반 BMSC 배양액으로 배양한 군과 dexamethasone이 포함된 BMSC 배양액으로 배양한 군으로 나누었음
- 제조된 스펀지들은 모두 다공이 잘 이루어짐을 확인하였으며, 다공의 크기는 DC/HAp 스펀지가 더 작았음(그림 12)

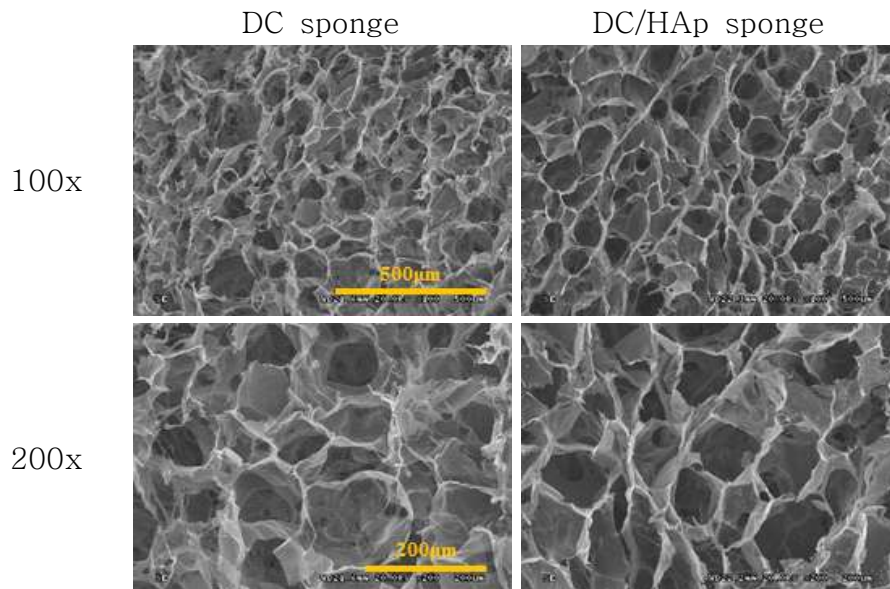


그림 12. DC, DC/HAp 스펀지 SEM 촬영

- 각각 다른 배양지 조건에서 키운 DC, DC/HAp 스펀지에서 보면, 모든 군에서 세포들이 부착과 이동이 잘 일어났으며, 그중에서도 Dex(+)-DC/HAp 스펀지에서 세포증식이 잘 일어남을 알 수 있었음(그림 13)

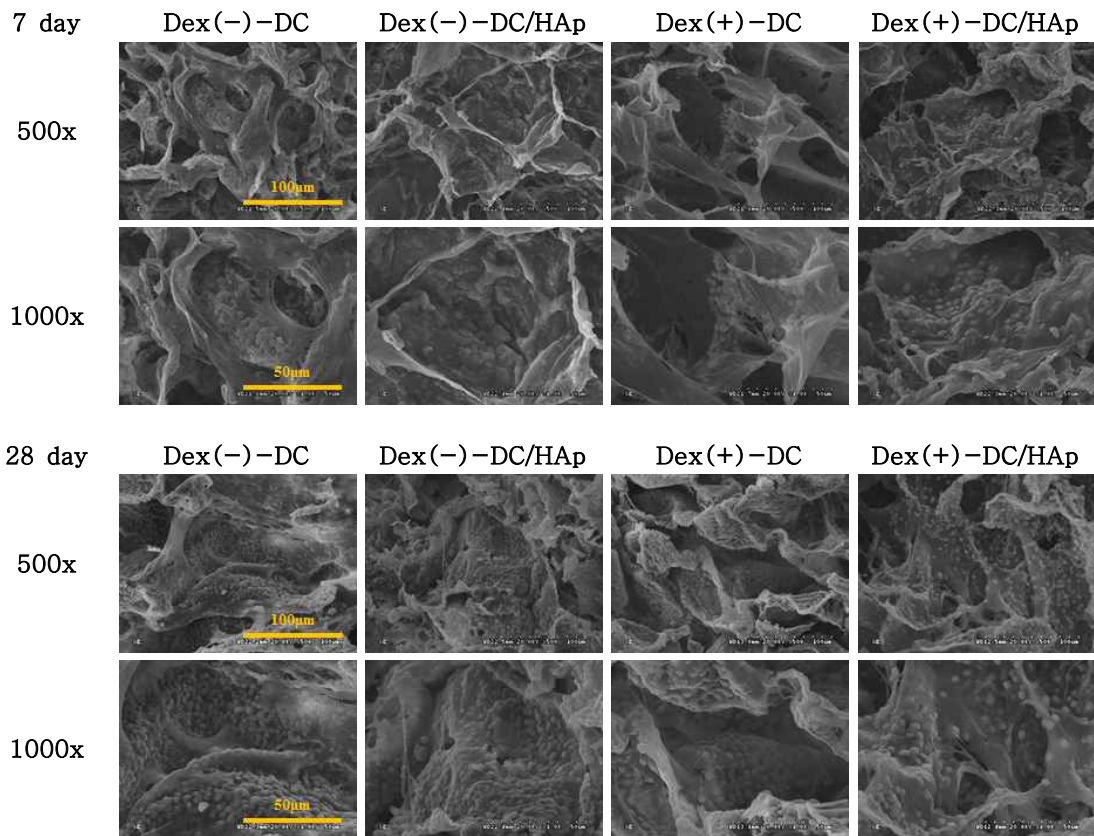


그림 13. Dex-DC/HAp 지지체에서 배양한 세포의 SEM촬영

- 각각 다른 배양 조건에서 키운 DC, DC/HAp 스펀지에서, Dexamethasone이 포함된 배양지에서 키운 세포가 더 증식이 잘 일어났고, 그중에서도 Dex(+)-DC/HAp 스펀지가 세포의 증식이 가장 높게 나타남(그림 14)
- Dexamethasone이 포함된 배양지에서 배양한 세포들의 골분화가 더 잘 일어났고, 특히 Dex(+)-DC 스펀지에서 배양한 세포들의 골분화가 더 잘 일어났음(그림 15)

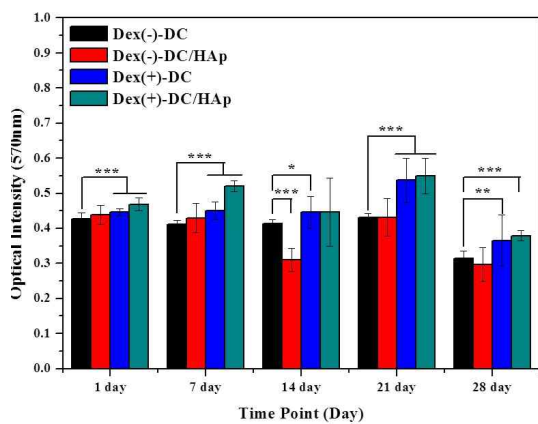


그림 14. MTT assay를 이용한 Dex-DC/HAp 지지체에서의 세포증식을

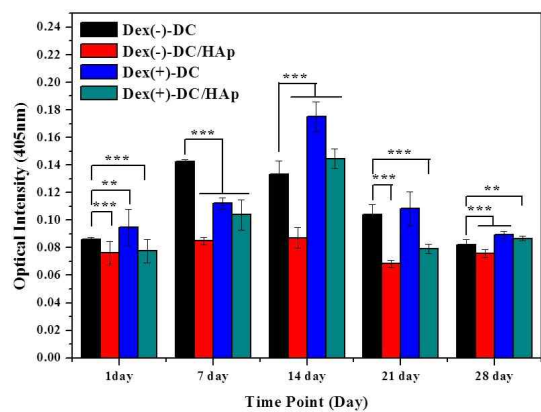


그림 15. Dex-DC/HAp 지지체에서 BMSCs의 ALP 활성화도 분석

(3) DC/DBP 스펀지에서의 골 분화 능력 평가

(가) DC/DBP 스펀지 지지체 제조 방법

- 3%아세트산과 0.1% 펩신을 함유한 용액에 DC 분말과 DBP (탈미네랄화된 소골분) 분말을 1:1, 1:3, 3:1 비율로 혼합한 분말을 최종 2 wt.%의 농도가 되도록 혼합하여 상온에서 48시간 교반함. 이 후 혼합물을 48 well plate에 담고 냉장 4시간 냉동 4시간 동안 보관 후 동결 건조함
- 0.25% 글루타알데하이드에 4시간 동안 침지하여 경화한 뒤, 3차 증류수로 10분간 3번 세척 후 동결 건조하여 보관함(그림 16)

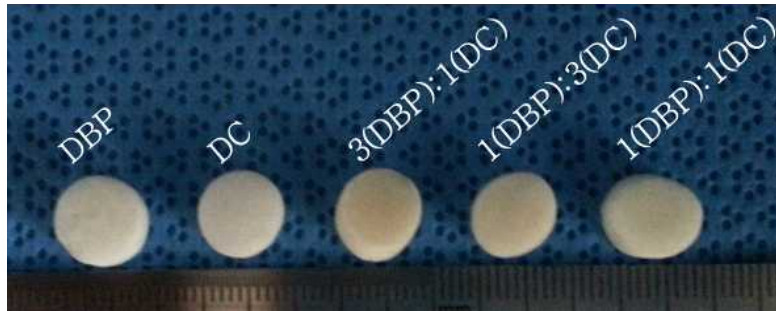


그림 16. DBP, DC 비율별로 제조한 DBP/DC 지지체의 사진

(나) 물리적 특성 분석

- DC스펀지의 물성을 증가시키고자 DBP와 혼합하여 스펀지를 제조하였음. 제조된 스펀지의 물리적 특성을 확인하고자 압축강도와 공극률 측정함
- DBP를 혼합한 DC 스펀지는 DBP를 혼합하지 않은 DC 스펀지 보다 압축강도가 약 2배 증가함(그림 17)
- 공극률 측정 결과, DBP와 DC 스펀지는 92.8, 85.7%로 높은 값을 가졌으나 DC/DBP 혼합한 스펀지는 67.5~71.2%로 혼합하지 않은 스펀지 보다 적은 값의 공극률이 확인됨(그림 18)

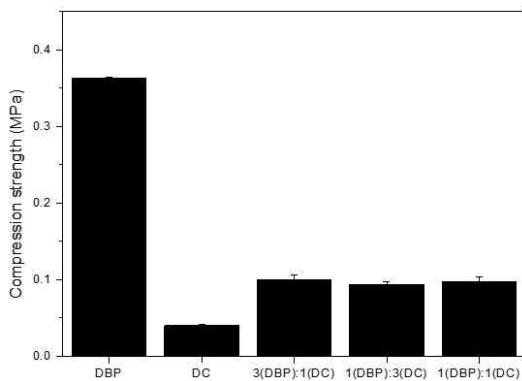


그림 17. DC/DBP 스펀지의 압축강도

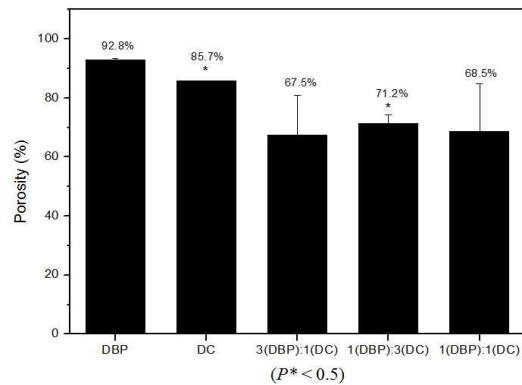


그림 18. DC/DBP 스펀지의 공극률

(다) 세포증식률과 ALP 활성화도 분석

- DC/DBP스펀지에서의 세포 증식률과 ALP 활성화도를 확인하기 위하여, 제조된 스펀지를 지름 7 mm, 두께 3 mm로 절단한 후 멸균하여 48well에 넣고 BMSC를 1×10^5 cell/scaffold로 파종함
- 1, 3, 7, 14, 28일 동안 세포 증식률을 확인한 결과 시간이 지날수록 세포 증식률은 증가하였으며, 특히 DC 스펀지에서의 세포 증식률이 가장 높았음
- DC/DBP 혼합스펀지는 같은 비율로 제조된 군에서 우수한 세포 증식률을 보임(그림 19)
- DC/DBP 스펀지에 BMSC를 파종하고, ALP 활성화도를 세포 파종 1, 3, 7, 14, 28일에 분석한 결과, 대조군인 DBP에서 가장 우수한 활성화도가 나타났으며, DC/DBP 혼합스펀지는 같은 비율로 제조된 군에서 우수한 활성화도를 보임(그림 20)
- 본 연구를 통해서 제작된 DC/DBP 혼합 지지체는 세포 증식이 우수하고, 물성이 증가되었기 때문에 골 적용 지지체를 위한 유도재로 활용될 수 있을 것이라 사료됨

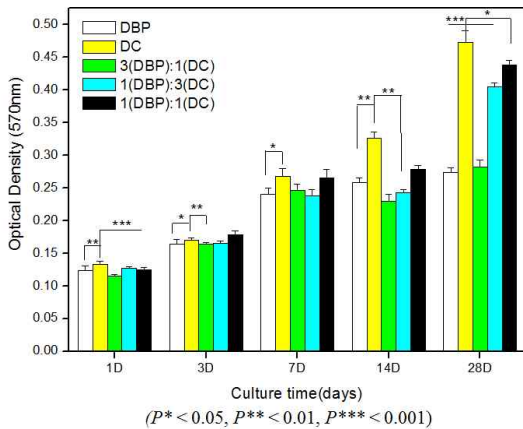


그림 19. MTT assay를 이용한 세포증식률 측정

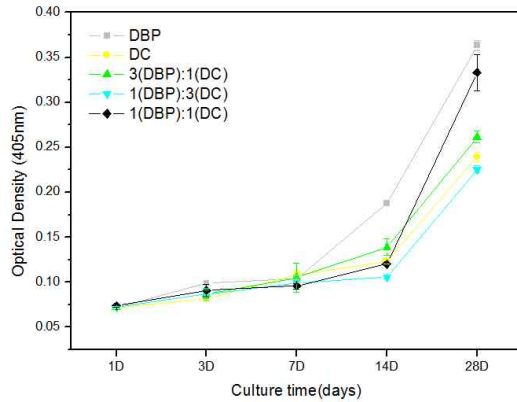


그림 20. ALP 활성화도 분석

나. 지지체 형태 제형 연구

(1) 다공별 DC/PLGA 지지체에서의 녹연골 재생 능력 확인

(가) 다공별 DC/PLGA 지지체 제조 방법

- 다공별 DC/PLGA 지지체는 용매 캐스팅/염 침출법에 의해 제조함
- 1 g의 PLGA를 4 mL의 methyl chloride (MC)에 용해한 후, 다공형성 물질인 NaCl을 90~180 um, 180~250 um, 250~355 um 355~425 um 크기 별로 PLGA의 9배(9 g)가 되도록 첨가한 후 80 wt.% DC 분말을 첨가함
- 직경 7 mm, 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압함
- 다공형성을 위해 3차 증류수를 6시간마다 교체하면서, 48시간 동안 NaCl를 용출함
- 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25°C 진공오븐에서 건조하였음

(나) 물리적 특성 분석

- 다공 크기에 따른 80 wt.% DC/PLGA 지지체의 표면관찰을 위해 SEM 촬영을 한 결과, 지지체의 표면은 사각형의 다공형태를 나타내며, 다공 크기별로 지지체가 제조됨(그림 21, 22)

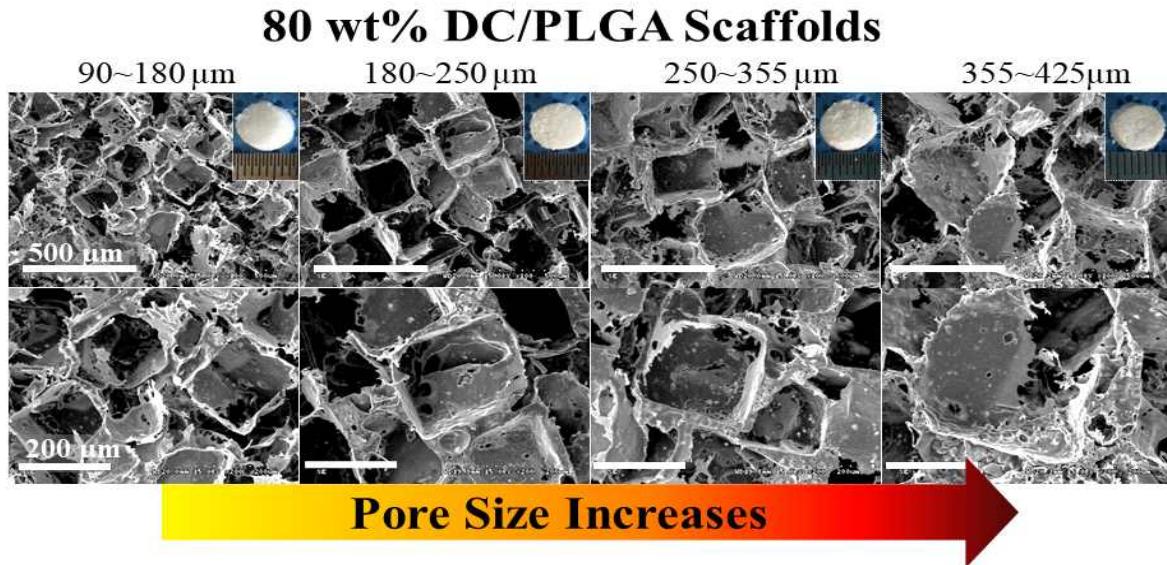


그림 21. 다공 크기별로 제조된 DC/PLGA 지지체의 SEM 사진

- 다공 크기별로 제조된 DC/PLGA 지지체의 공극률을 측정한 결과, 다공 크기가 가장 작은 90~180 μm 지지체는 71.8%, 180~250 μm 지지체는 73.9%, 250~355 μm 지지체는 80.8%, 355~425 μm 지지체는 84.3%로 다공크기가 클수록 지지체의 공극률 또한 증가하였음(그림 22)

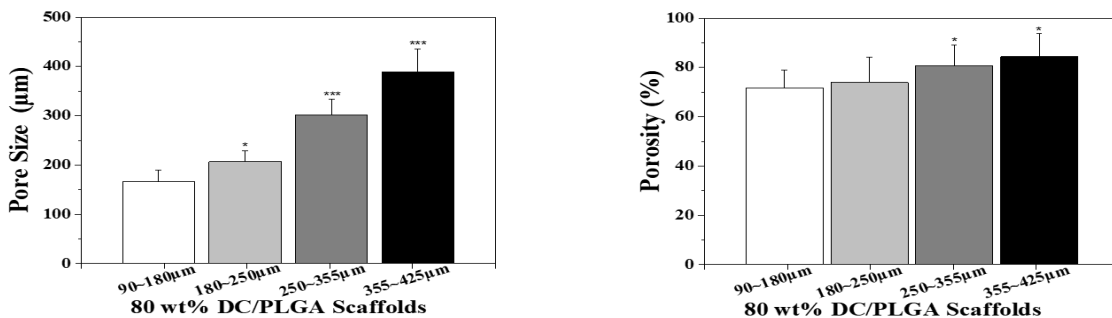


그림 22. DC/PLGA 지지체의 다공 크기 및 공극률

(다) 토끼 늑연골 세포의 증식률 측정

- DC/PLGA 지지체에서의 세포 증식률을 확인하기 위하여 제조된 지지체를 지름 7 mm, 두께 3 mm로 절단한 후 멸균하여 48well에 넣고 토끼의 늑골에서 추출한 늑연골 세포를 1×10^5 cell/scaffold로 파종함

- 세포는 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 배양액은 10% FBS와 1% antibiotics, 1% ascorbic acid을 포함한 α -MEM (Gibco)을 사용하였고 배양액은 1 ml씩 3일에 1번 갈아주었음
- 1, 3, 7, 14일 동안 세포 증식률을 측정된 결과 지지체의 다공크기가 크고, 공극률 값이 가장 높았던 355~425 μ m DC/PLGA 지지체에서 세포증식률이 가장 높은 값을 나타내었음(그림 23)

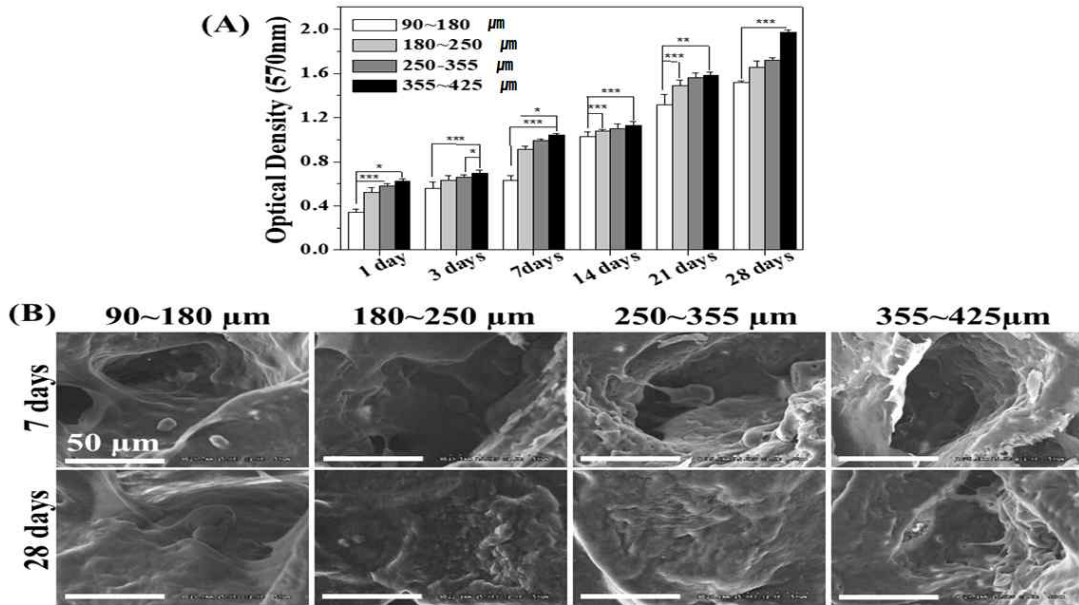


그림 23. DC/PLGA 지지체의 능연골 증식률 분석
(A) MTT assay, (B) SEM image

- β -actin, Aggrecan, Type I, II collagen에 대한 밴드의 발현도를 확인한 결과, 연골 관련 특이 유전자 발현이 355~425 μ m DC/PLGA 지지체군에서 다른군 보다 높은 발현을 보이는 것을 관찰하였음(그림 24)

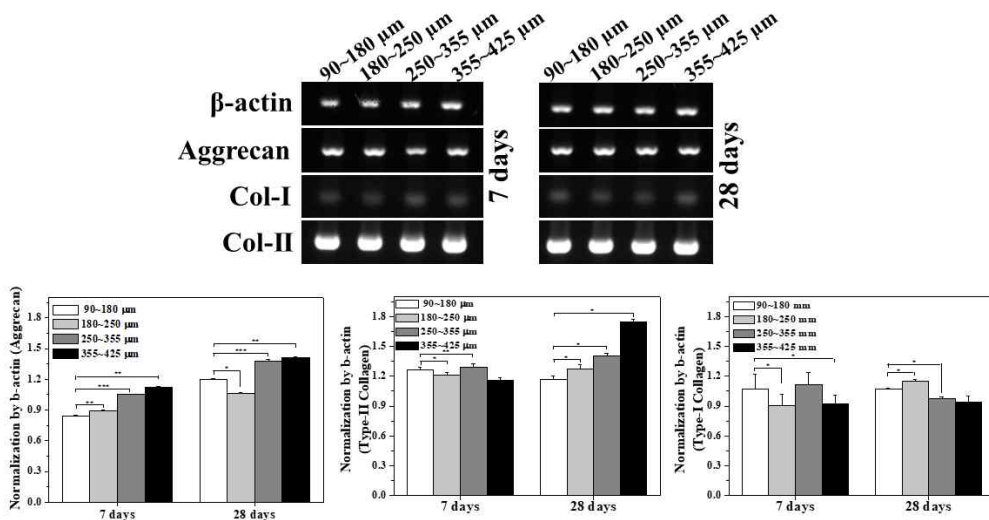


그림 24. DC/PLGA 지지체의 능연골 유전자 발현 분석

- 또한, 다공별 DC/PLGA 지지체의 염색 결과 역시, 355~425 μm DC/PLGA 지지체 군에서 시간이 지날수록 라쿠나(염색 사이 동그란 부분)와 GAG (safranin-O염색에서 붉은색으로 표시된부분)의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었음(그림 25)

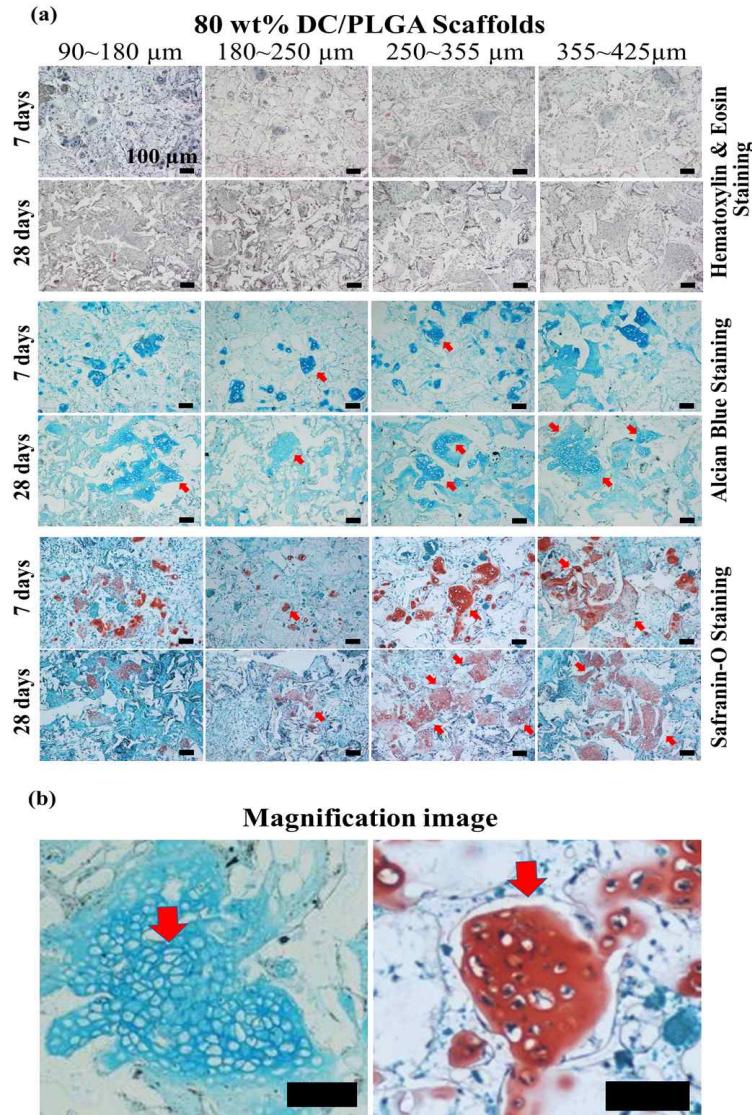


그림 25. DC/PLGA 지지체의 H&E, Alcian blue 및 Safranin-O 염색 결과(a) 및 확대 이미지(b)
(\blacktriangleright : 라쿠나 및 GAG 발현 부위)

(2) 오리발에서 추출한 콜라겐과 PLGA/HAp를 혼합한 지지체에서 골수간엽줄기세포의 골분화 능력평가

(가) 오리발에서 추출한 콜라겐과 PLGA/HAp를 혼합한 지지체 제작

- 지지체의 기계적 강도 보완 및 골 재생 능력을 향상을 위해 오리발콜라겐(DC), PLGA, HAp로 구성된 지지체를 제조함
- PLGA 1 g을 기준으로 methyl chloride (MC) 4 mL에 HAp를 0.1 g, NaCl (250~355 μm) 9 g, 그리고 각각 DC를 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 g을 혼합한 후, silicon molds (지름 7 mm, 높이 3 mm)에 채워줌

- Mold에 채워진 지지체를 Carver Press (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 사용하여 48시간동안 상온에서 60 kgf/cm²의 힘으로 압력을 가함
- 완성된 지지체에 남은 용매 및 NaCl을 제거하기 위해 증류수에 담귀 2일간 보관함
- 6시간 간격으로 증류수를 교체하며, 제조된 지지체를 -80℃에서 동결 시킨 후, 동결 건조를 행하여 수분을 모두 제거 후 완성된 지지체는 상온에서 보관함(그림 26)

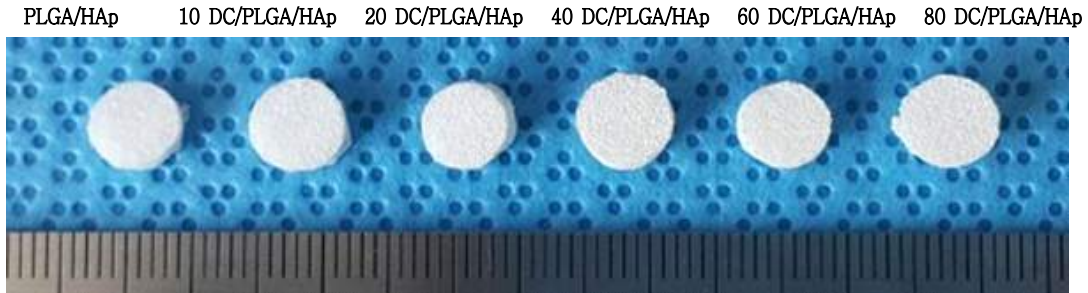


그림 26. DC/PLGA/HAp 지지체 사진

(나) 구조적 특징 분석

- 오리발 콜라겐을 포함한 PLGA/HAp 지지체의 다공 형태 확인을 위해 SEM을 이용하여 관찰함. 지지체 제조 시 사용한 NaCl의 입자 크기는 250~355 μm 임
- 모든 실험군에서 다공도의 크기는 거의 일정하였으며, 오리발 콜라겐의 함량이 높아질수록 다공 표면의 거칠기가 증가함
- 이는 첨가한 오리발 콜라겐의 양이 증가할수록 다공 주변에 분포하는 콜라겐이 많기 때문으로 확인됨(그림 27)

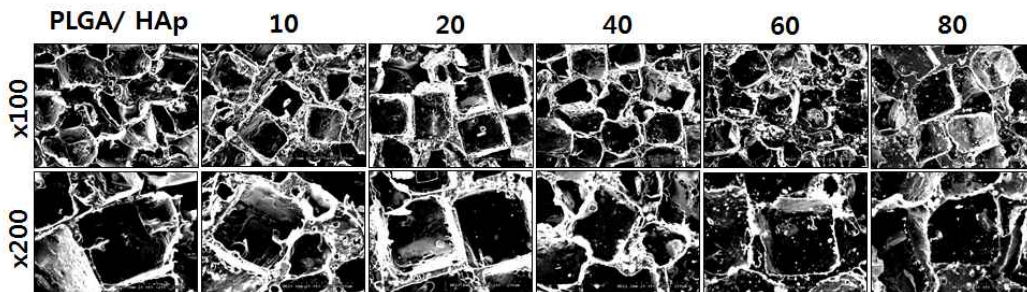


그림 27. DC/PLGA/HAp 지지체의 SEM 이미지

- 다공도 측정 결과 대조군인 PLGA 지지체에 비하여 오리발 콜라겐이 80 wt.% 함량된 지지체를 제외한 나머지 지지체에서 더 높은 다공도를 나타냈으며, 함량이 적을수록 더 많은 양의 다공을 가지는 것을 보임(그림 28)
- 오리발 콜라겐이 함유된 PLGA/HAp 지지체의 성분을 확인하기 위해서 FT-IR 분석함. 그 결과 모든 실험군에서 PLGA가 가지고 있는 carbonyl group의 고유 피크가 1750~1760 cm⁻¹사이에서 나타났으며, HAp의 특징적인 피크인 PO³⁻ 피크 값은 1000~1100 cm⁻¹에서 확인 할 수가 있었음. 또한 오리발 콜라겐의 피크인 Amide I은 1801 cm⁻¹, Amide II는 1692 cm⁻¹, Amide III를 1399 cm⁻¹에서 확인함
- 따라서 모든 실험 군이 PLGA, HAp, 오리발 콜라겐을 함유하고 있음을 확인할 수 있었음(그림 29)

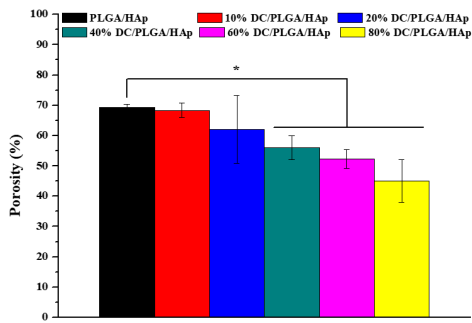


그림 28. DC/PLGA/HAp 지지체의 다공도 (** P<0.05, * P<0.5)

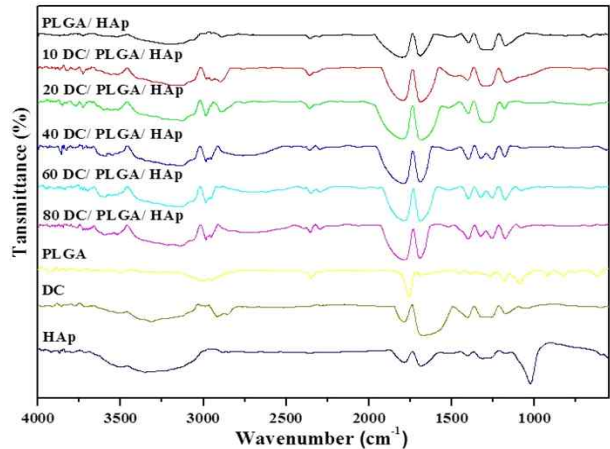


그림 29. DC/PLGA/HAp 지지체의 FT-IR 측정 결과

(다) 지지체의 초기 세포 부착도 및 세포 증식률, ALP 측정

- 지지체의 초기 세포 부착도 및 세포 증식률을 확인하기 위해 MTT assay를 진행함
- 지지체는 멸균 후 48 well에 넣고, 1×10^5 의 BMSC를 각각의 지지체에 분주함
- 1, 7, 21, 28일에 MTT 평가를 실시함
- ALP 측정 역시 MTT와 같은 조건 및 타임 포인트에서 실험을 실시함
- MTT 측정 결과 시간이 지남에 따른 개체군의 오리발 콜라겐의 함량이 증가할수록 세포증식률이 높은 것을 확인하였음(그림 30)
- ALP 측정결과 초기 1, 7일째에는 실험군간의 차이를 볼수가 없었으나, 14일 이후에는 모든 실험 군에서 오리발 콜라겐의 함량이 증가할수록 ALP값이 증가함을 확인함(그림 31)

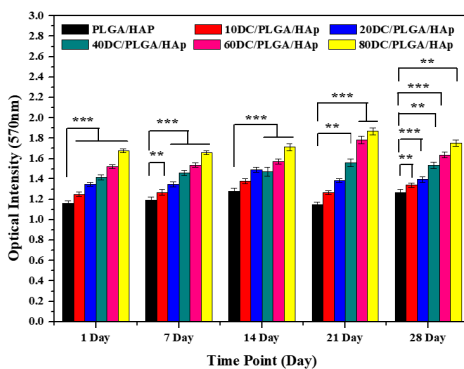


그림 30. MTT assay를 이용한 DC/PLGA/HAp 지지체에서의 세포증식률

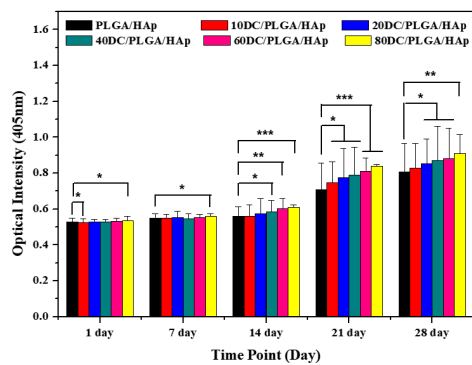


그림 31. DC/PLGA/HAp 지지체에서의 ALP 활성화 분석

(라) micro-CT 분석 및 조직학적 평가 측정

- SD rat 동물모델을 마취 후 두개골에 결손부를 제거 후 멸균된 지지체를 삽입하고 완전 봉합하여 2, 4, 8주에 지지체를 회수하여 micro-CT를 촬영함
- 지지체를 이식하지 않은 결함모델에서는 골형성이 거의 일어나지 않았지만, 지지체를 이식한 결함모델에서는 골형성이 진행되었으며, 특히 80 wt.% DC/PLGA/HAp 지지체를 이식한 결함모델에서 골형성이 가장 많이 일어남을 알 수 있었음(그림 32)

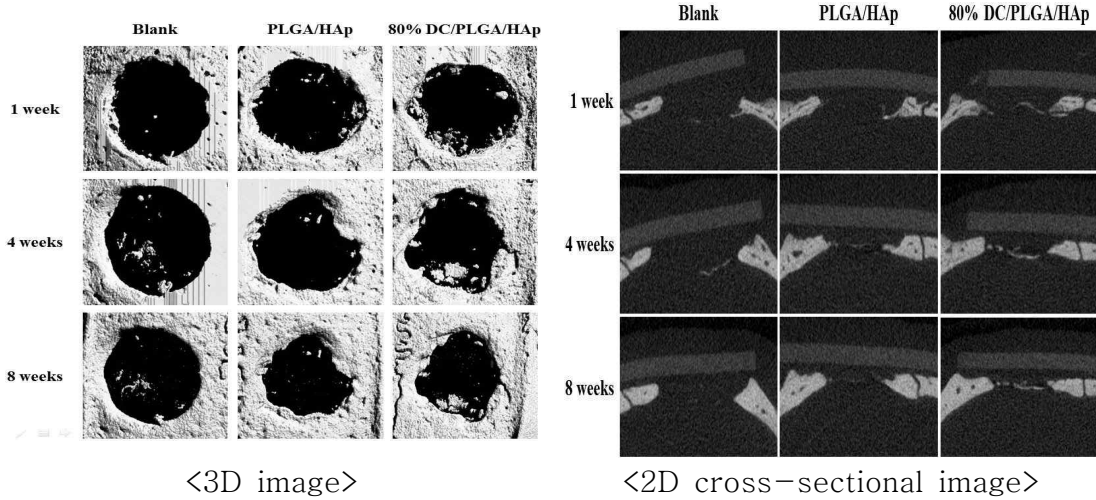


그림 32. DC/PLGA/HAp 지지체를 이식한 결함모델에서의 3D, 2D 이미지

- 정량적 분석결과, 지지체를 이식하지 않은 결함모델에서는 bone mineral density (BMD), bone volume (BV), percent bone volume (BV/TV (tissue volume))이 거의 증가하지 않았지만, 지지체를 이식한 결함모델에서는 BMD, BV, BV/TV이 증가되었으며, 특히 80 wt.% DC/PLGA/HAp 지지체를 이식한 결함모델에서 3가지 값이 가장 많이 증가함을 알 수 있었음(그림 33)

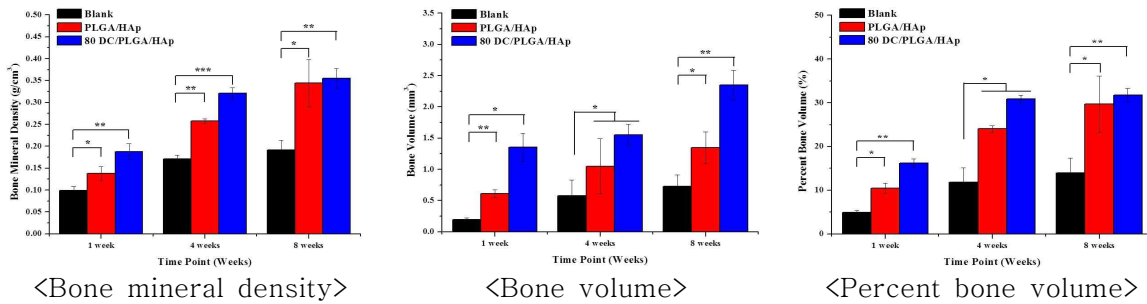


그림 33. DC/PLGA/HAp 지지체의 골 재생 능력 관찰을 위한 Micro-CT 정량 결과

- 결함모델에 이식한 지지체에서 전체적으로 조직형성이 잘 일어나고, 그리고 콜라겐 형성이 잘 이루어졌지만, 특히 80 wt.% DC/PLGA/HAp 지지체에서 조직과 콜라겐 형성이 가장 잘 이루어짐을 알 수 있었음(그림 34)

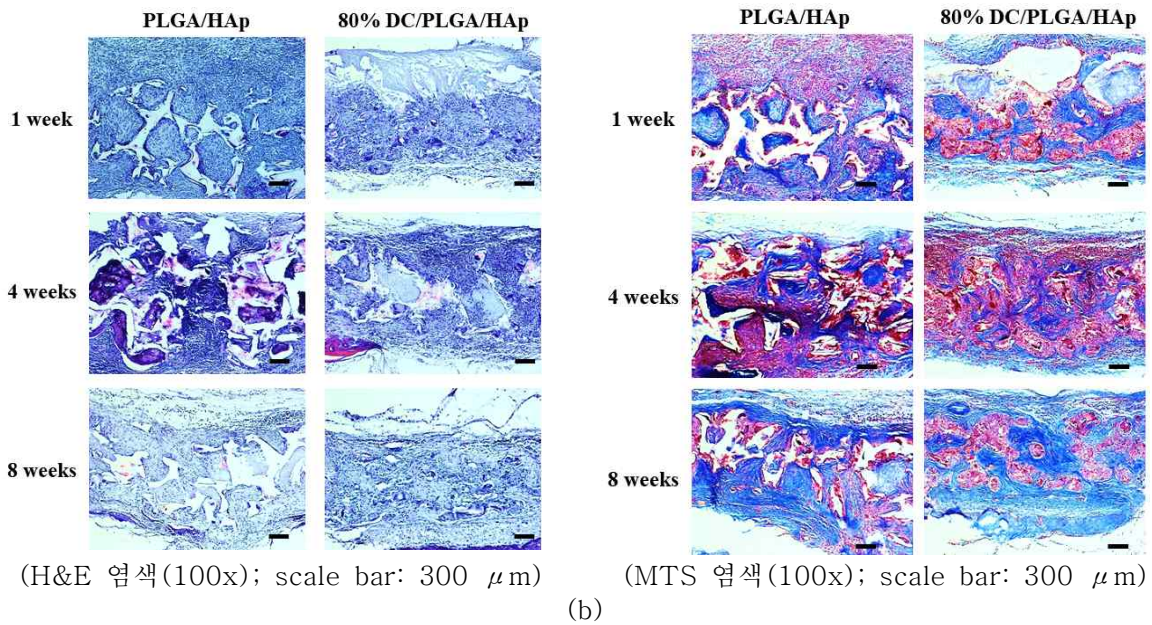
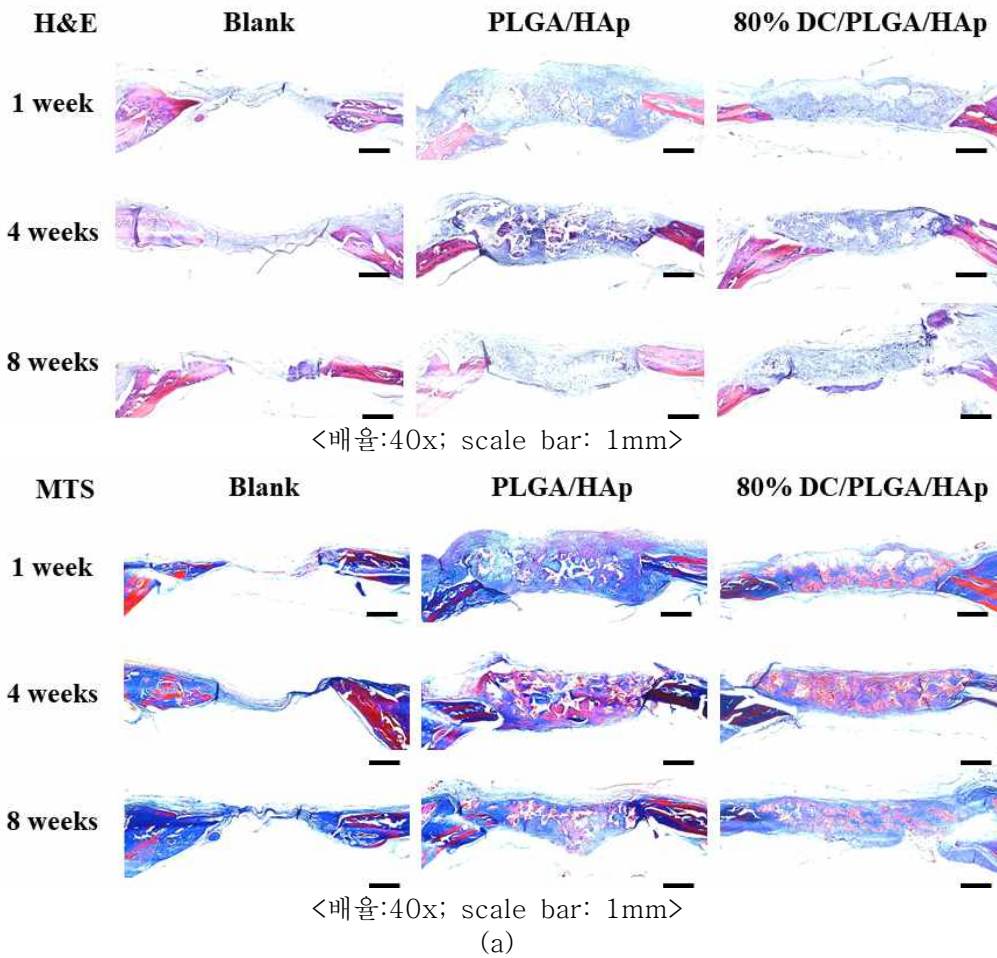


그림 34. 이식한 DC/PLGA/HAp 지지체의 H&E 및 MTS 염색을 통한 조직학적 평가
(a) 골결손부위 (b) 병변부위 확대 사진

- 결합모델에서 이식한 지지체에서 염증반응을 확인해보면, 80 wt.% DC/PLGA/HAp 지지체에서 염증세포가 PLGA/HAp 지지체보다 덜 염색되었음을 확인하여, DC를 함유한 지지체가 염증반응을 줄여준다는 것을 알 수 있었음(그림 35)

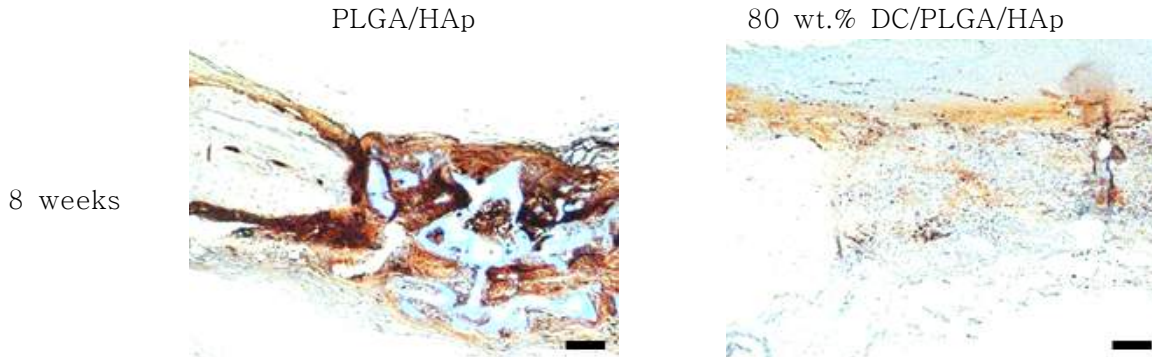


그림 35. 이식한 DC/PLGA/HAp 지지체의 ED-1 염색 결과
(100x, scale bar: 300 μ m)

2. 생리활성물질을 첨가한 오리발 유래 콜라겐 지지체의 생체적합성 평가 및 효능 평가 효과

가. 홍화씨 추출액을 함유한 오리발 콜라겐 지지체에서의 뼈 재생

- 홍화씨는 골절 치료 효능으로 널리 알려져 있으며, 동의보감에서 골염증, 골다공증, 골절에 효능이 있는 것으로 쓰여 있음
- 홍화씨앗의 유분제거를 위해 30분간 가열한 후, 증류수로 홍화씨 추출액을 추출하였음
- 3 wt.% 오리발 콜라겐 스펀지 지지체(3 wt.% DC)와 홍화씨 추출액으로 만든 콜라겐 지지체 (3 wt.% DC+H)를 제작 후 물리적 특성 평가 실시함(그림 36)

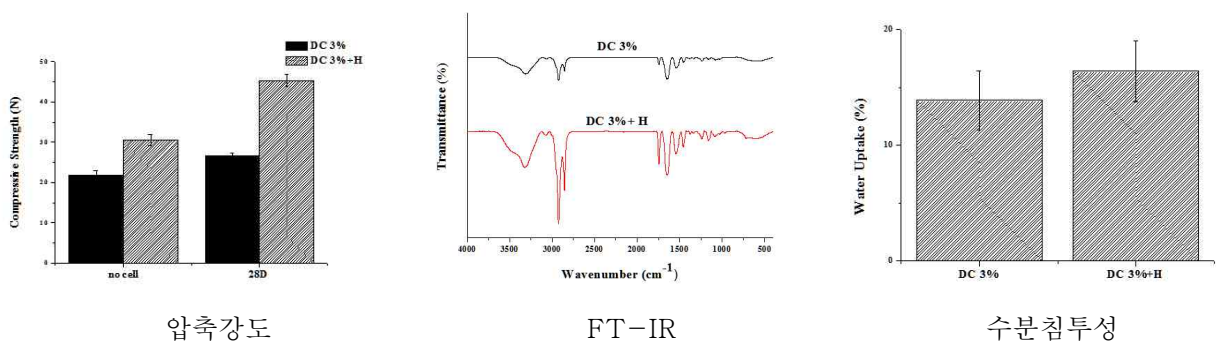


그림 36. 지지체의 압축강도, FTIR, 수분침투성 평가

- 또한 3 wt.% DC와 3 wt.% DC+H 지지체에 BMSC를 파종하여 세포의 증식 및 골분화 능력을 확인함(그림 37, 38)
- 본 연구 결과를 통해서 제작된 3 wt.% DC+H 지지체는 골 조직 재생을 위한 유도재로 활용 될 수 있을 것이라 사료됨

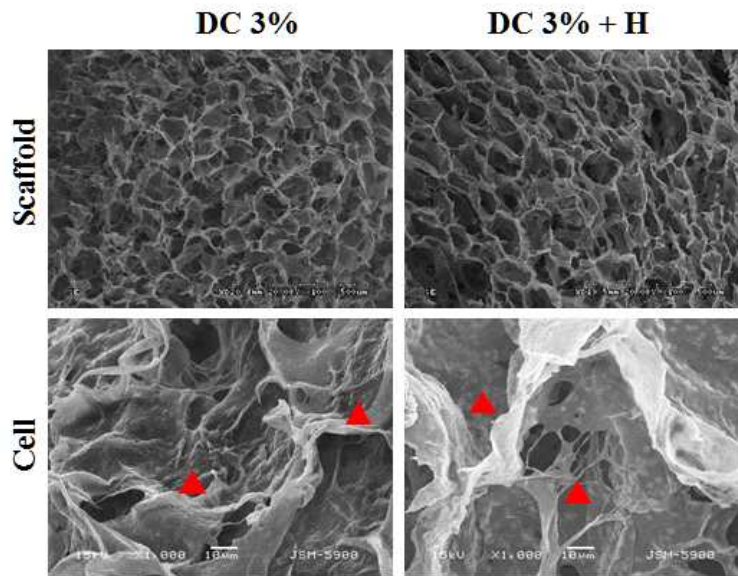


그림 37. SEM 이미지를 통한 지지체 표면 관찰, 지지체에 파종된 BMSC의 거동 확인

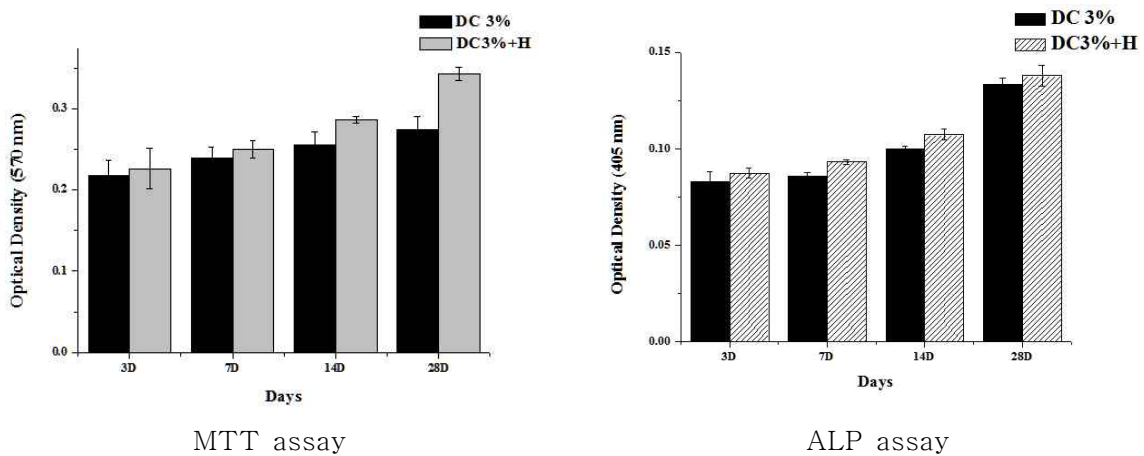


그림 38. 3 wt.% DC와 3 wt.% DC+H 지지체의 BMSC 세포 증식 및 골 분화 능력 평가

나. Quercetin을 함유한 오리발 콜라겐 지지체에서의 골수간엽줄기세포 골분화 능력 평가

- Quercetin (Qtn)은 세포를 자극시켜, 골 재생과 리모델링을 제어하는 중요한 역할을 하는 RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 생성시킨다고 알려져 있음. RANKL은 골아세포 분화를 증가시키므로, BMSC의 골분화를 돕기 위해 사용하였음(Phytomedicine, 20(8-9):683-90 (2013))
- 2 wt.% DC 수용액에 50 mM Qtn 수용액을 혼합하여, 각각 0, 25, 50, 그리고 100 μ M Qtn/DC 수용액을 제조 후, 각각의 Qtn/DC 수용액을 48-well plate에 분주하여 동결건조하여 DC 스펀지를 제조함
- 제조된 Qtn/DC 스펀지는 SBF 용액에 1일 동안 담가 HAp를 코팅하여 Qtn/DC/HAp 스펀지를 제조하였음(그림 39)

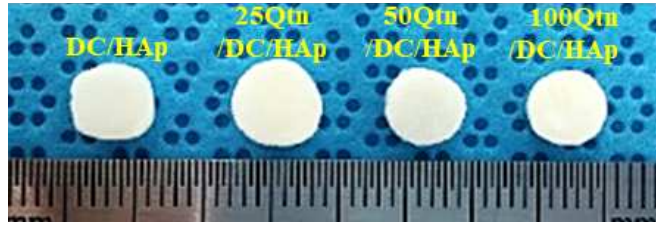


그림 39. Qtn/DC/HAp 지지체 gross image

- 각각 다른 배양 조건에서 세포를 키운 DC, DC/HAp 스펀지의 모든 군에서 세포부착과 이동이 잘 일어났으며, 그중에서도 25, 50 μ M Qtn/DC/HAp 스펀지에서 세포증식이 잘 일어났음(그림 40)

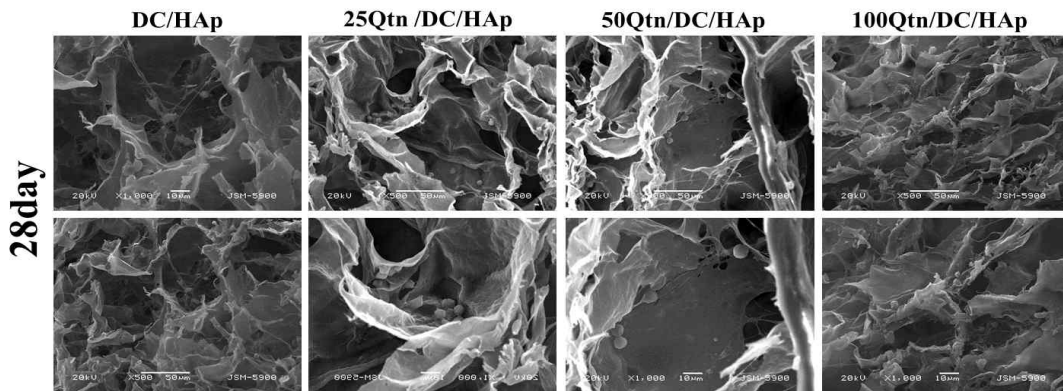


그림 40. Qtn/DC/HAp 스펀지 SEM 세포촬영

- 배양기간 동안에 세포의 증식이 전반적으로 증가하였으며, 그중에서도 25 μ M Qtn/DC/HAp 스펀지가 세포의 증식이 가장 높게 나타남을 알 수 있었음. 또한 골분화역시, 25 μ M Qtn/DC/HAp 스펀지에서 가장 높은 것을 확인 할 수 있었음(그림 41)

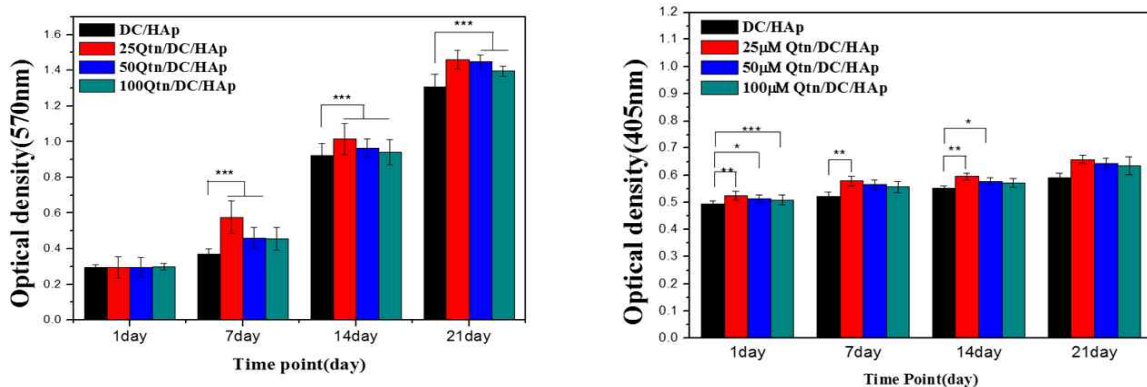


그림 41. Qtn/DC/HAp 지지체 내에서의 BMSCs세포증식능력(좌) 및 골분화능력평가(우)

다. 실리마린 (Silymarin, Smn)을 함유한 오리발 콜라겐 지지체에서의 토끼 골수 유래 줄기 세포의 파종 후 골 재생 능력 평가

- 실리마린 (Silymarin, Smn)은 *Silybum marianus* L.의 종자로부터 추출된 polyphenolic flavonoid 활성 성분으로, polyphenol계 항산화제는 암 예방과 치료약물로 주목을 받고 있으며, 간 기능 개선, 항산화, 항염증에서 효과가 있는 것으로 보고되고 있음. 또한, Smn은 골 재생에 효과가 있다고 알려져 있음
- 따라서, Smn/DC/HAp 지지체에 골수 유래줄기세포를 파종하면, 골 재생을 증진시킬 수 있다는 가정 하에 본 실험을 실시하였음
- Smn/DC/HAp 지지체는 2 wt.% DC 용액에 0, 25, 50 및 100 μ M Smn을 혼합하여, Smn/DC 스펀지를 제작한 후, HAp를 코팅하여 제조하였음(그림 42 (a))
- SEM 관찰 결과, 제조된 모든 지지체 내부에 다공이 균일하게 잘 형성됨을 알 수 있었으며, 다공의 크기는 큰 차이를 보이지 않았음(그림 42 (b))

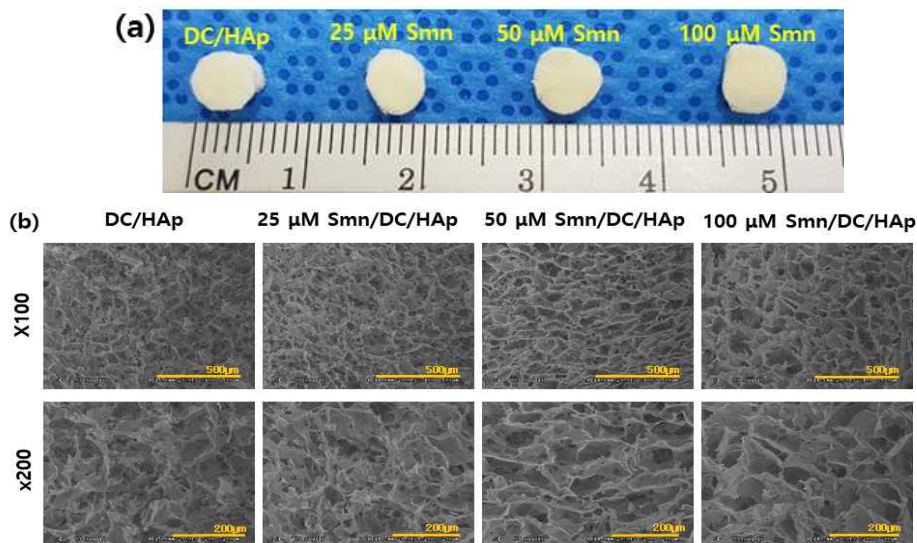


그림 42. Smn/DC/HAp 지지체의 (a) gross 이미지 및 (b) SEM 관찰 이미지

- FT-IR 결과, 제조된 지지체에 실리마린과 Hydroxyapatite가 모두 잘 배합되어 있는 것을 확인하였으며, Smn 함량이 증가함에 따라 다공성이 증가함을 알 수 있었음. 또한, 압축강도 역시 Smn 함량이 증가함에 따라 상승함을 알 수 있었음(그림 43)

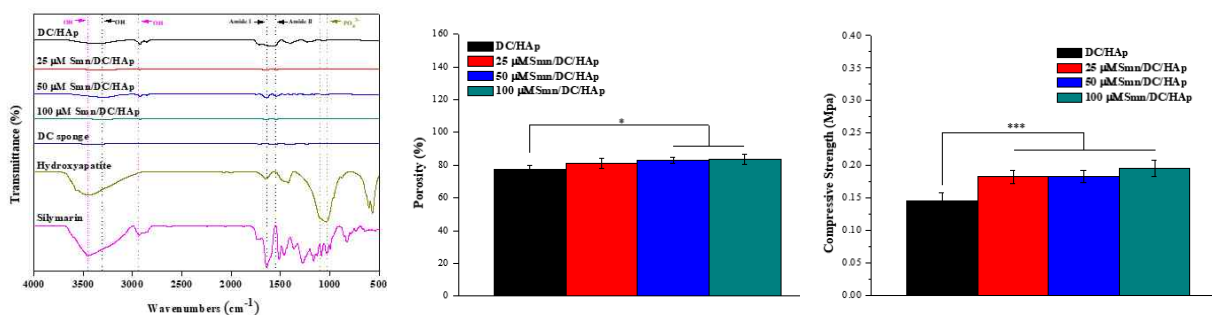


그림 43. Smn/DC/HAp의 FT-IR , 다공도 및 압축강도 분석 결과

- 그림 44.에서와 같이 모든 지지체 내부에 rBMSCs의 부착과 이동이 잘 일어남을 알 수 있었으며, ECM 또한 잘 뻗어나가는 것을 확인하였음

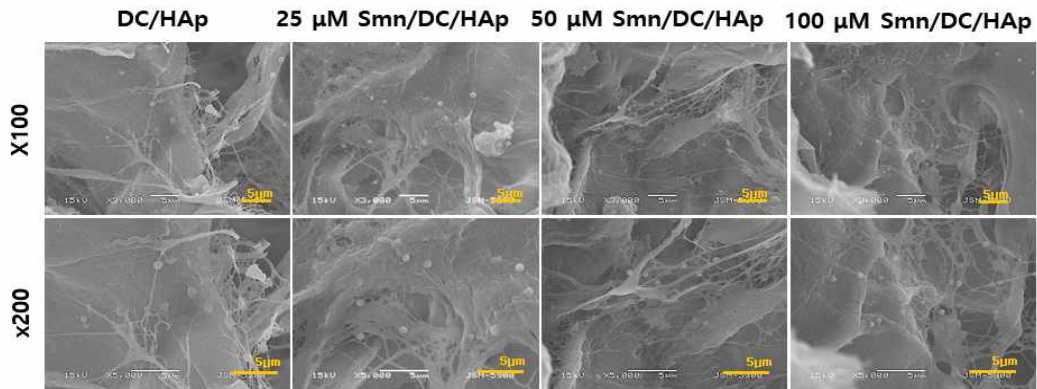


그림 44. 28일 동안 Snn/DC/HAp에서 배양한 rBMSC의 SEM 관찰 이미지

- 모든 지지체에서 rBMSC 파종 후 세포의 증식률은 시간에 따라 증가하였으며, 특히 100 μ M Snn/DC/HAp 지지체에서 세포 증식률이 가장 큰 것을 확인함. 지지체 내에서 rBMSc의 골분화 정도는 배양하는 동안에 점차 증가함을 알 수 있었으며, 100 μ M Snn/DC/HAp 지지체에서 rBMSCs의 골분화가 더 많이 진행되었음(그림 45, 46)

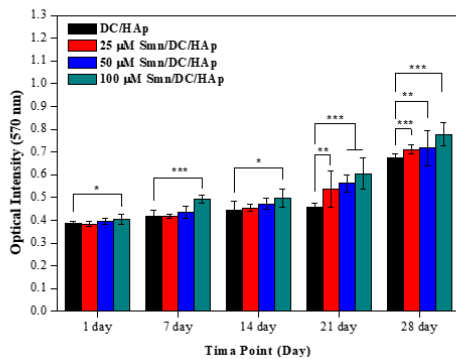


그림 45. MTT assay를 이용한 Snn/DC/HAp 지지체에서의 세포증식률

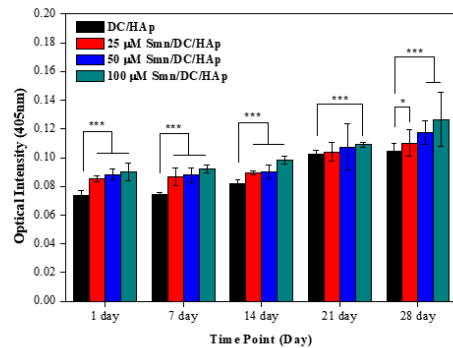


그림 46. Snn/DC/HAp 지지체에서 rBMSCs의 ALP 활성도 분석

- 모든 지지체에서 배양기간에 따라 골 분화 특정 유전자(Col I, OCN)의 발현이 증가하였고, 특히 100 μ M Snn/DC/HAp 지지체에서 가장 많은 유전자가 발현됨(그림 47)

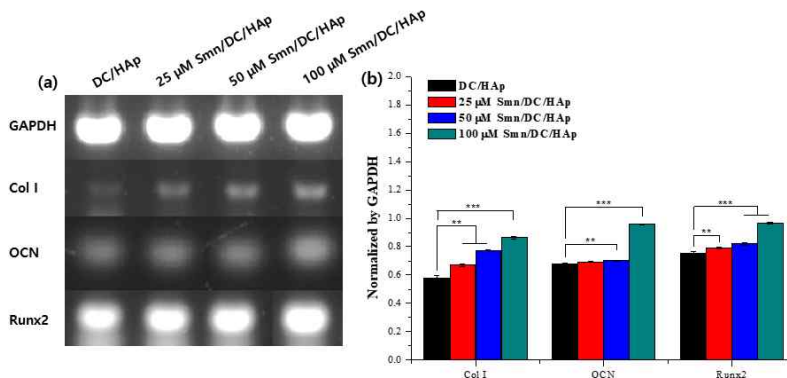


그림 47. Snn/DC/HAp 지지체에서 배양한 rBMSCs의 mRNA 발현 결과

- 뼈대체재 실험을 위한 동물 실험 모델은 다음과 같은 방법을 확립하여 실시하였음(확립법: 두개골에 직경 5.0 mm의 크레핀바를 이용하여, 골 결손부를 인위적으로 형성한 다음 준비한 지지체를 적용하고 봉합하였으며, 이식 후 기간별로 쥐를 희생시켜 micro-CT와 조직학적 분석법을 이용하여 신생골의 형성 정도를 평가함(그림 48))

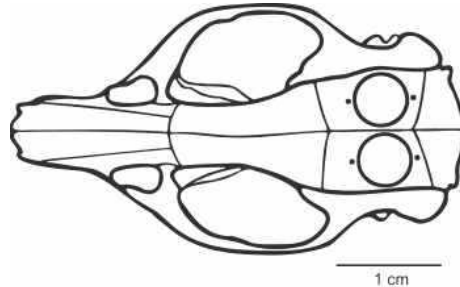


그림 48. 두개골 결손 모델 모식도

- 위와 같은 동물 실험 모델 법을 통해, SD rat을 마취 후 두개골에 결손을 만들어 제조된 지지체를 이식한 후 봉합하였음. 2, 4, 8주 후에 지지체를 적출함. 지지체를 이식하지 않은 결함모델에서는 골 형성이 거의 일어나지 않았지만, 지지체를 이식한 결함 모델에서는 골 형성이 진행되었으며, 특히 100 μ M Smn/DC/HAp 지지체를 이식한 모델에서 골 형성이 가장 많이 일어남을 알 수 있었음(그림 49)

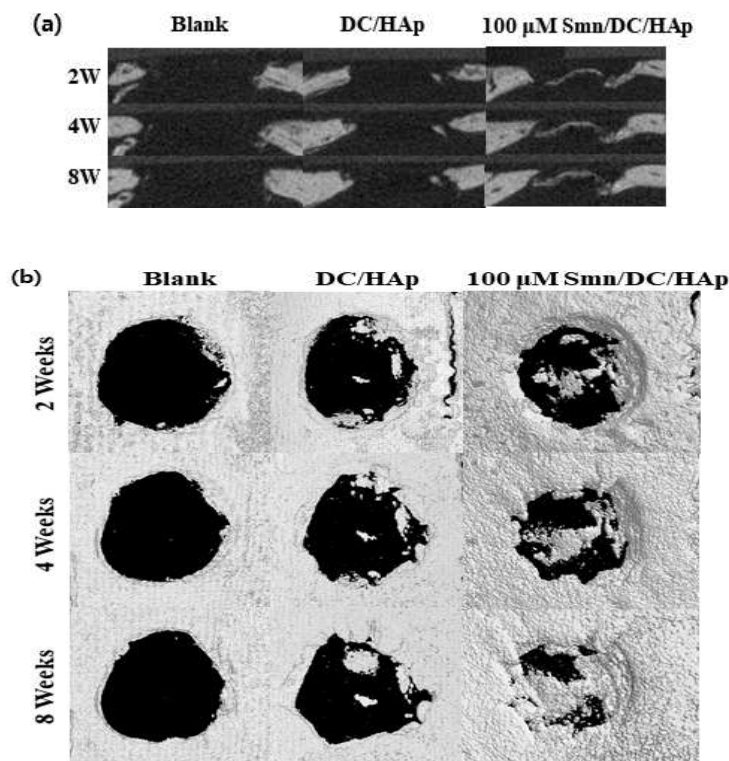


그림 49. 두개골 결손모델에 Smn/DC/HAp 지지체를 이식 후 Micro-CT로 분석한 (a) 2D, (b) 3D 이미지

- 정량적 분석결과, 지지체를 이식하지 않은 결함모델에서는 bone mineral density, bone volume, percent bone volume (BV/TV (tissue volume)), bone surface가 거의 증가하지 않았지만, 지지체를 이식한 결함모델에서는 모두 증가하였음. 특히 100 μ M Smn/DC/HAp 지지체를 이식한 모델에서 가장 높은 수치를 보여주었음(그림 50)

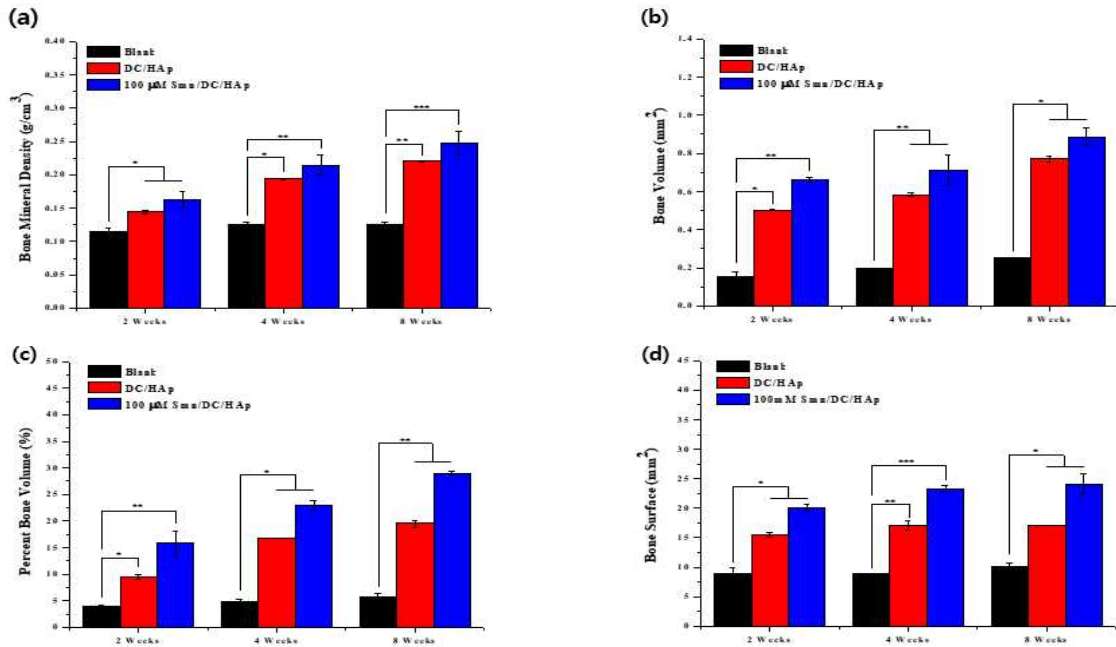


그림 50. 두개골 결손모델에 Smn/DC/HAp 지지체를 이식 후 Micro-CT로 분석한 정량적 결과

- 지지체를 이식한 결함모델에서 전체적으로 조직형성이 잘 일어나고, 콜라겐 형성 또한 잘 잘 이루어졌음. 특히 100 μ M Smn/DC/HAp 지지체를 이식한 모델에서, 가장 우수한 조직형성과 콜라겐 형성이 이루어졌음(그림 51)

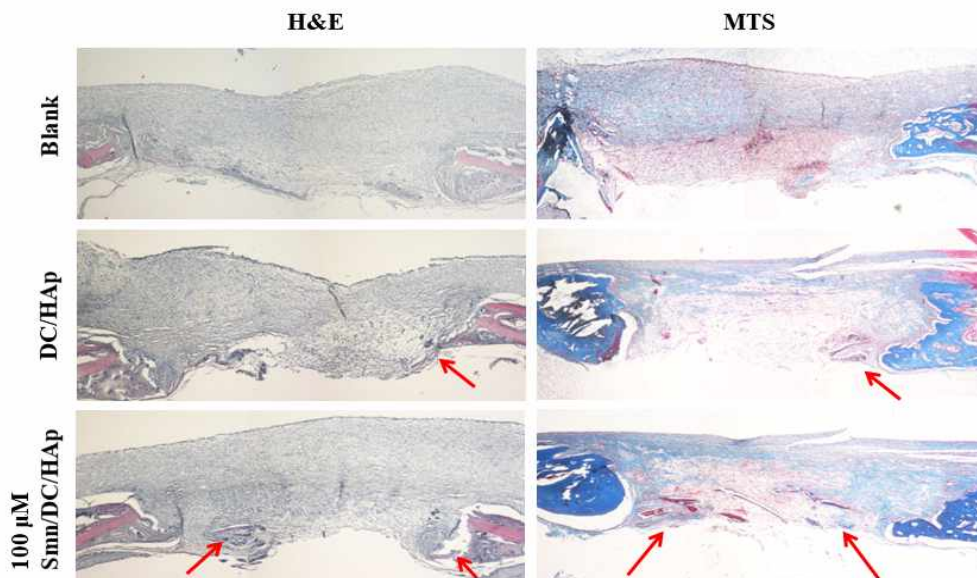


그림 51. H&E 및 MTS 염색을 이용한 조직학적 검사 이미지

3. 뼈재생용 콜라겐/HAp 지지체의 시제품 제조

가. 오리발 유래 콜라겐(DC)과 돼지 유래 콜라겐(PC)에서 토끼 골수 유래 줄기세포를 적용한 골분화 능력 평가

- 오리발 유래 콜라겐을 이용한 골 재생용 시제품(DC, DC/HAp)을 제작하기 위하여, 주관기관(세원셀론텍㈜)에서 생산한 오리발 유래 콜라겐과 기존의 상용화된 돼지 콜라겐(세원셀론텍㈜)을 이용하여, 지지체를 제작 후 물성 및 특성 분석, 동물실험 등의 비교 실험을 진행하였음

(1) 오리발 콜라겐(DC)을 이용하여 콜라겐 스펀지 제작

- 모식도와 같이 재현성 있는 스펀지를 제작하기 위한 기존의 스펀지 제작 방법(0.5 M 아세트산에 DC를 넣어 2 wt.% DC sponges를 제조함)을 사용하여 제조하였음(그림 52)

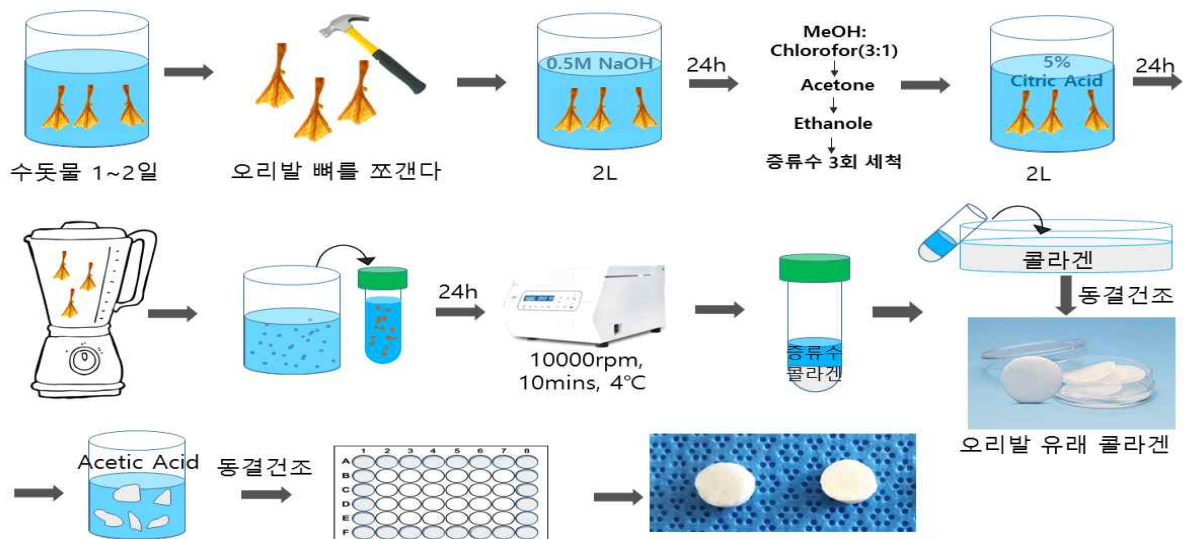


그림 52. 재현성 있는 DC 스펀지 제조 기술

- 세원셀론텍㈜에서 받은 DC를 이용하여, 2 wt.% DC sponges를 제조함. 제조된 2 wt.% DC sponges 일부를 SBF용액에 담가 HAp 코팅을 하였음. 대조군은 실험실에서 제조한 2 wt.% sponges를 이용하였음
- 실험실과 1세부 세원셀론텍㈜에서 추출한 오리발 콜라겐을 이용하여 지지체를 제작하여 비교한 결과, 실험실에서 제조한 DC sponge와 DC/HAp sponge는 수축현상으로 인해 크기가 작아졌고, 세원셀론텍에서 받은 DC로 제조한 DC sponge와 DC/HAp sponge는 수축현상 없이 모양을 유지하였음(그림 53)

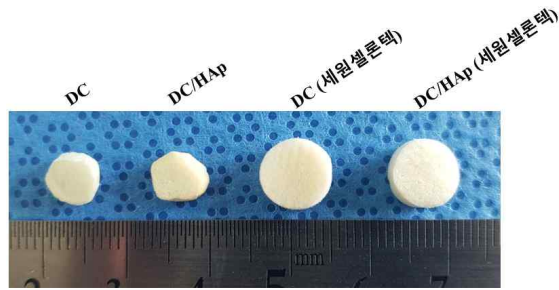


그림 53. DC/HAp 지지체 gross 이미지

(2) 시제품 제조 및 물성 평가

- 골 재생용 시제품(DC, DC/HAp)을 제작하기 위하여 세원셀론텍(주)에서 생산한 오리발 유래 콜라겐과 기존의 상용화된 돼지 콜라겐을 이용하여, 2 wt.% DC와 2 wt.% PC 스펀지를 제작한 후, HAp를 코팅하지 않은 군과 코팅한 군으로, 총 4개군(DC, DC/HAp, PC, PC/HAp, 직경 7 mm, 두께 3 mm)을 제조 및 비교 분석하였음. 육안 및 SEM 분석을 한 결과, 제조된 지지체 내부에 다공이 균일하게 잘 형성됨을 알 수 있었으며, 다공의 크기는 DC지지체가 PC지지체보다 컸으며, DC/HAp, PC/HAp의 표면에 HAp가 부착된 것을 확인하였음
- 적외선 분광기 분석법으로 측정된 결과, 콜라겐에서 나타나는 3300 cm^{-1} 에서 수산화기(-OH)와 1634 cm^{-1} 에서 Amide I, 1544 cm^{-1} 에서 Amide II가 나타났으며, 1100 cm^{-1} 근처에서 HAp의 PO_3^{3-} 피크가 관찰됨. 따라서 화학적으로 물성변화 없이 물리적으로 잘 혼합된 것을 확인하였음. 압축강도 측정 결과, DC에 비해 PC지지체의 압축강도가 큰 경향을 나타냈으며, PC, PC/HAp가 코팅되었을 때, 압축강도가 감소하였음. 지지체의 공극률은 HAp코팅을 하였을 때, 소폭 감소하는 경향을 나타냄. 전반적으로 지지체종류에 상관없이 약 80%의 공극률을 나타냄(그림 54)

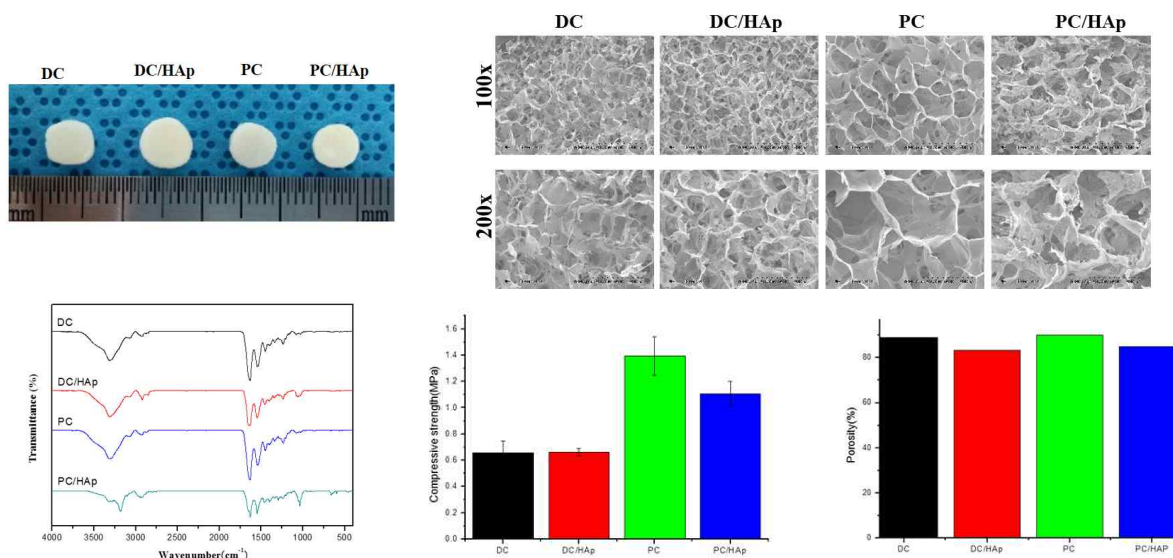


그림 54. DC, DC/HAp, PC, PC/HAp 지지체의 gross 이미지, SEM, FT-IR, 지지체 압축강도, 공극률 분석 결과

(3) 시제품의 *in vitro* 평가

- *In vitro* 상에서 세포생존률은 live and dead assay를 통해 확인하였음. 지지체에서 토끼 골수 유래 줄기세포를 파종하여 7일간 배양 후 생존률을 관찰한 결과, DC와 PC에서 높은 세포 생존률을 보였으나, HAp를 코팅한 지지체에서는 상대적으로 증식률이 낮았음(그림 55). MTT분석을 통해서도 동일한 결과를 확인하였음(그림 56, 좌)

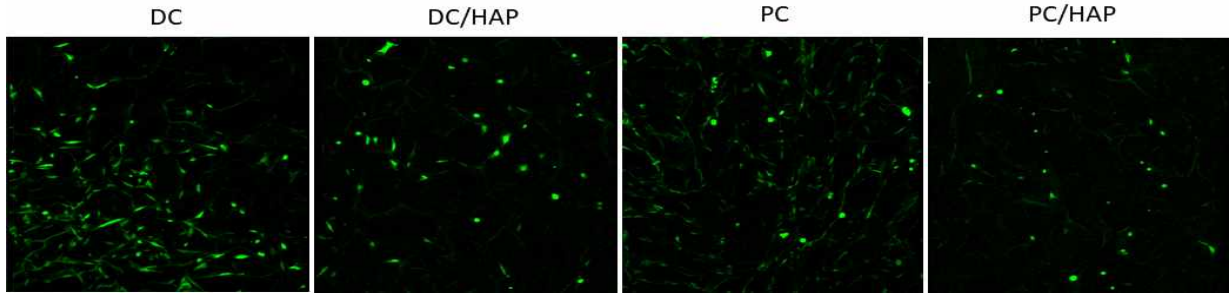


그림 55. Live & Dead cell 이미지

- 시간에 따른 골 분화 정도를 확인하기 위하여, ALP activity를 분석한 결과, DC와 PC지지체에서 골분화가 어느 정도 활성화되었지만, HAp를 코팅하였을 때, 그 활성이 뚜렷하게 증가하여 골분화가 더 잘됨을 확인할 수 있었음(그림 56, 우)

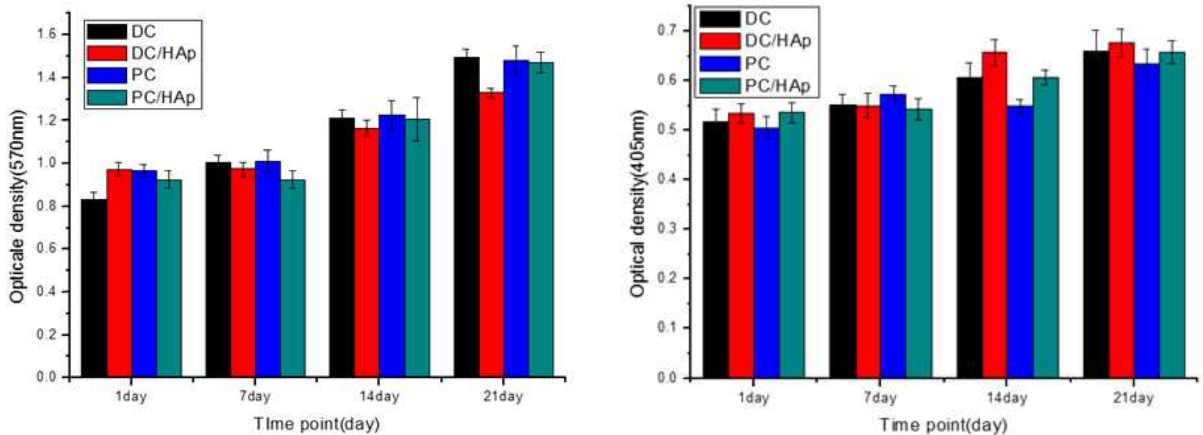


그림 56. 각 지지체에서 토끼 골수 유래 줄기세포의 세포생존률(좌, MTT assay)과 ALP 활성도(우) 분석 결과

(4) 시제품의 *in vivo* 평가

- SD-RAT의 두개골에 지지체를 이식 후, Micro-CT 분석을 통해 골 재생을 확인한 결과, 지지체를 이식하지 않은 결함모델에서는 골 형성이 거의 일어나지 않았지만, 지지체를 이식한 모델에서는 골 형성이 진행되었으며, 각 DC, DC/HAp, PC, PC/HAp 지지체 간에 큰 차이가 없었음(그림 57)

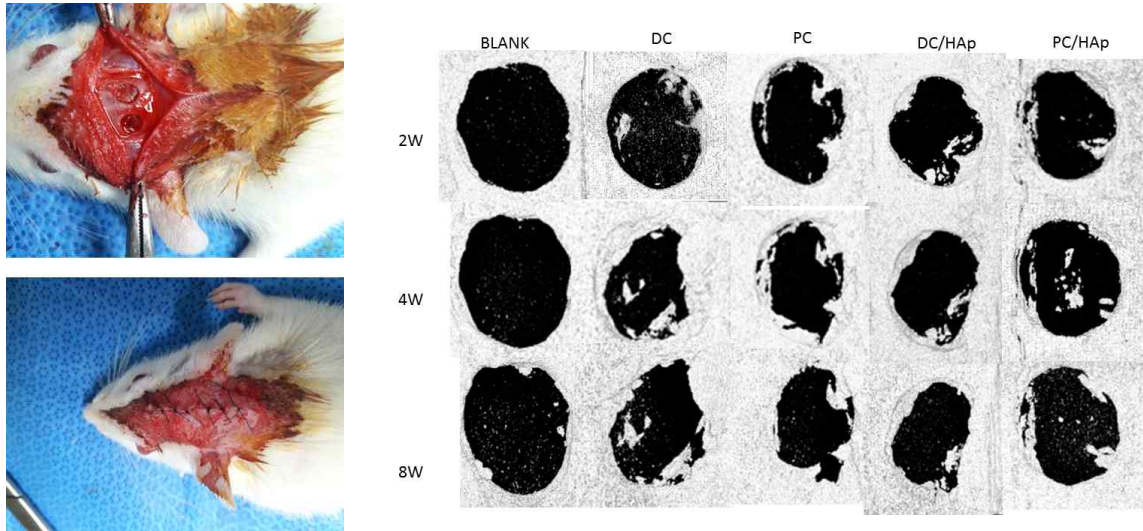


그림 57. 지지체를 이식한 결함 모델에서의 수술사진과 Micro-CT 3D 이미지

- 3D 이미지를 정량적으로 분석한 결과, 2주, 4주 8주에 DC와 PC가 대조군에 비해 높은 골 재생을 보였고, DC와 PC의 골 재생을 비교하였을 때 PC가 근소하게 높게 나타났다(그림 58)

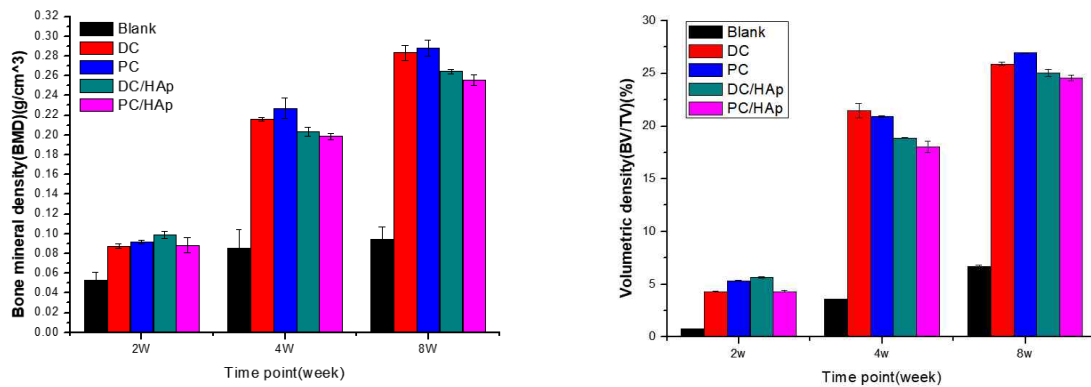


그림 58. Micro-CT로 촬영한 3D 이미지의 정량적 결과

- *In vitro*와 *in vivo* 실험을 종합하여 분석한 결과, 본 과제의 오리발 유래 콜라겐 (DC)으로 제작한 시제품은 기존에 상용화된 제품인 돼지 유래 콜라겐(PC)보다 유사하거나, 약간 높은 골 재생을 보였음. 따라서, 오리발 유래 콜라겐 (DC)으로 제작한 시제품은 골 재생용 시제품으로써의 가능성이 있다고 판단됨

2협동(한림대학교)

과제명: 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발

1. 오리발에서의 콜라겐 추출

(1) 오리발 콜라겐 추출

- 오리발로부터 비콜라겐 단백질, 지방 및 불순물 등을 제거하기 위해 오리발을 세척한 후 0.5 M NaOH에 넣고 4°C에서 24시간 동안 교반하여 지방을 제거함. 지방이 제거된 오리발을 Methanol:Chloroform (3:1), acetone, 70% Et-OH 및 증류수로 세척함. 5% citric acid에 넣고 4°C에서 48시간 동안 교반한 뒤 상층액만 수거하여 12,000 rpm, 4°C, 15분간 원심분리하여 상층액을 얻음. 얻어진 상층액을 100% Et-OH에 부어 4°C에서 48시간 동안 침전반응. 상층액을 제거하고 침전물을 수거하여 3,500 rpm, 4°C, 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거 후 침전물을 동결건조하여 최종적으로 건조된 콜라겐을 획득함(그림 1)

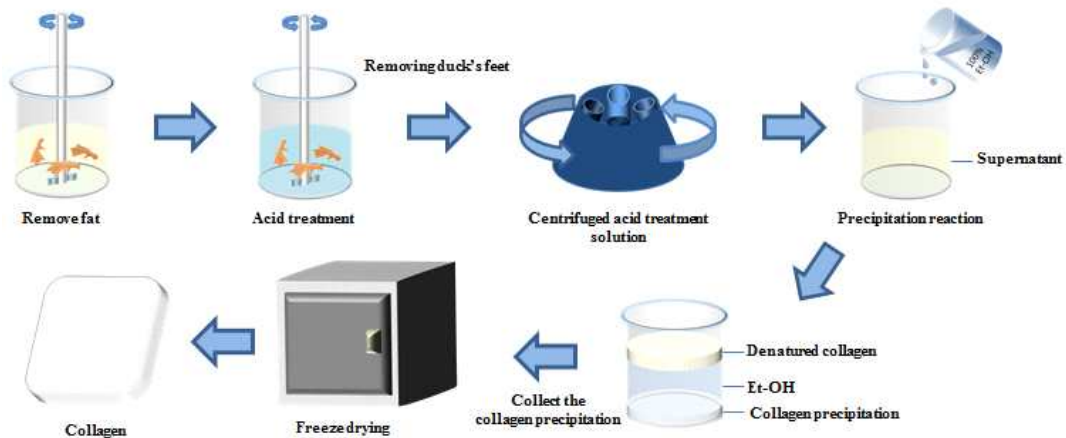


그림 1. 오리발 콜라겐 추출 과정

(2) 오리발 콜라겐 특성 분석

(가) SDS-PAGE 분석

- SDS-PAGE 분석 결과, 오리발에서 추출한 콜라겐의 조성은 분자량 110, 130 kDa의 두 개의 α -chain (α_1 , α_2)과 분자량 235 kDa의 하나의 β -chain이 나타남. 오리발 콜라겐이 Type I 콜라겐의 조성 and 유사한 것을 확인함(그림 2)

(나) Collagenase reaction 시험

- 오리발에서 추출한 콜라겐과 돼지 콜라겐에 collagenase를 1시간 동안 반응 시킨 결과, collagenase를 처리하지 않은 군에선 콜라겐 Type I 밴드가 정상적으로 나타났고, collagenase를 처리한 군에선 콜라겐 Type I 밴드가 나타나지 않고 더 낮은 분자량의 밴드가 나타남(그림 3)
- 이는 돼지 콜라겐과 같이, 오리발 추출 콜라겐도 collagenase에 의해 분해되는 콜라겐 특유의 성질을 가지고 있는 것으로 판단됨.

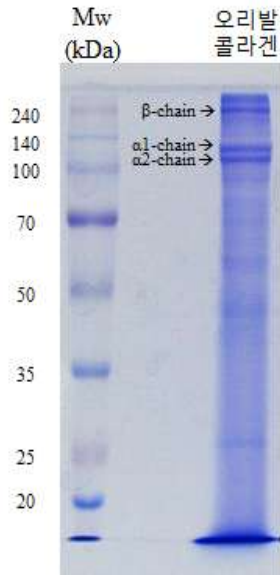


그림 2. SDS-PAGE 결과

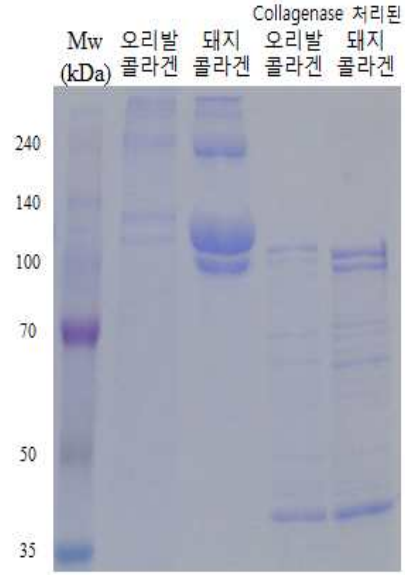


그림 3. Collagenase reaction 결과

2. 오리발 유래 콜라겐 지지체 제조

가) 스펀지 타입의 패치 제작

(1) 오리발 콜라겐 패치의 제작과정(스펀지 타입)

- 오리발 콜라겐 패치는 추출된 콜라겐을 0.5 M acetic acid에 용해시켜 4%의 오리발 콜라겐 용액으로 제작 후 4% 오리발 콜라겐 용액을 petri dish에 넣어 -80°C에서 12시간 동안 동결함. 완전히 동결된 sample을 24시간 동안 동결 건조하여 패치 내의 수분을 제거함. 수분이 제거된 오리발 콜라겐 패치의 acetic acid를 제거하기 위해 Et-OH (100, 80, 50, 30%)로 세척함. 증류수로 충분히 세척한 후 -80°C에서 12시간 동안 동결한 뒤, 동결 건조하여 오리발 콜라겐 패치를 완성(그림 4)

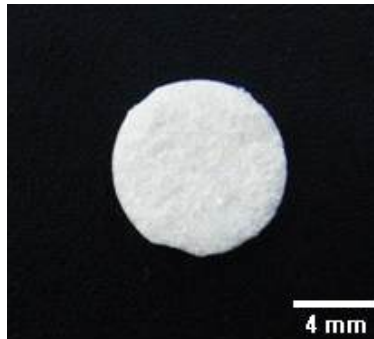


그림 4. 오리발 콜라겐 패치(스펀지 타입)

(2) 오리발 콜라겐 패치의 구조 분석

- 오리발 콜라겐 패치의 구조를 비교 확인하기 위하여 돼지 콜라겐, 실크, 오리발 콜라겐, 오리발 콜라겐/실크를 이용하여 패치를 제조한 후 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰함. 콜라겐 기반의 패치(돼지 콜라겐, 오리발 콜라겐, 오리발 콜라겐/실크)가 입체적으로 상호 연결된 공극 구조를 갖고 있는 것으로 관찰됨. 이는 고막 재생 시 세포간 물질대사 및 가스교환에 용이함. 특히 오리발 콜라겐/실크 패치는 균일한 형태의 공극과 격벽을 갖고 있는 것으로 관찰됨(그림 5)

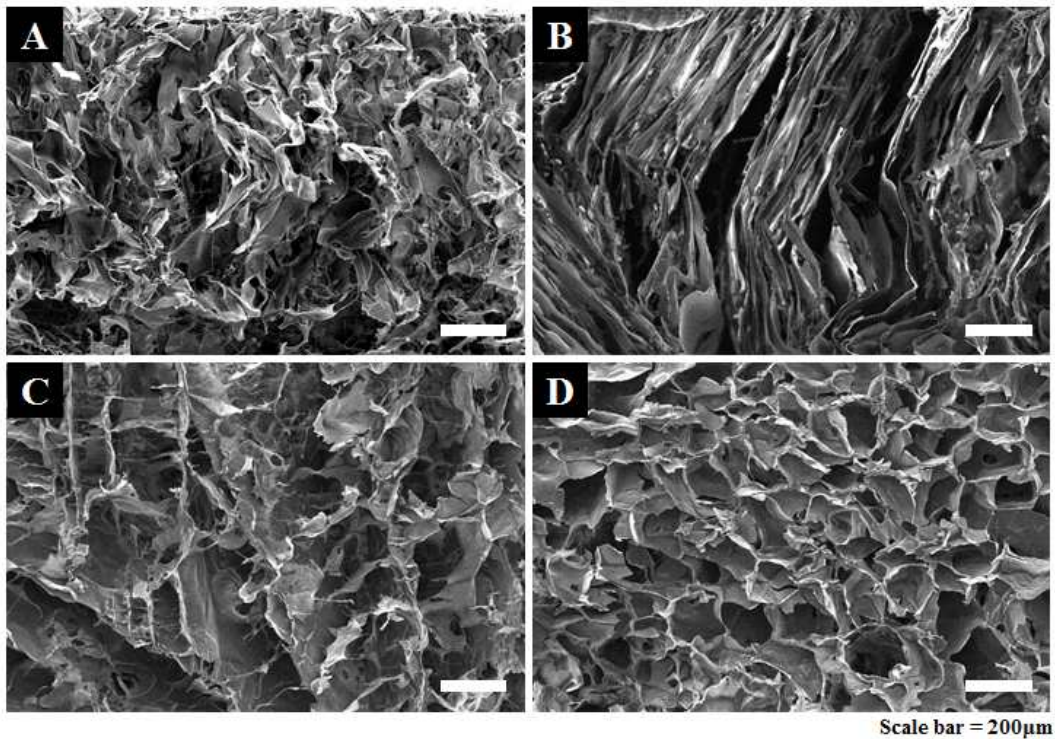


그림 5. 오리발 콜라겐 패치의 SEM 관찰 이미지

A) 돼지 콜라겐, B) 실크, C) 오리발 콜라겐, D) 오리발 콜라겐/실크

(3) FT-IR 측정

- 돼지 콜라겐, 실크, 오리발 콜라겐, 오리발 콜라겐/실크 패치의 성분을 확인하기 위하여 FT-IR 분석을 시행함. 그 결과 돼지 콜라겐 패치에서는 3316 cm^{-1} 에서 Amide A, 1634 cm^{-1} 에서 Amide I, 1550 cm^{-1} 에서 Amide II, 1237 cm^{-1} 에서 Amide III 피크 값을 나타내었고, 오리발 콜라겐 패치에서는 3292 cm^{-1} 에서 Amide A, 1628 cm^{-1} 에서 Amide I, 1555 cm^{-1} 에서 Amide II, 1233 cm^{-1} 에서 Amide III 피크 값을 나타내었음. 돼지 콜라겐과 같이 오리발 콜라겐에서도 Amide A, I, II, III의 유사한 피크 값을 확인할 수 있었음(그림 6)

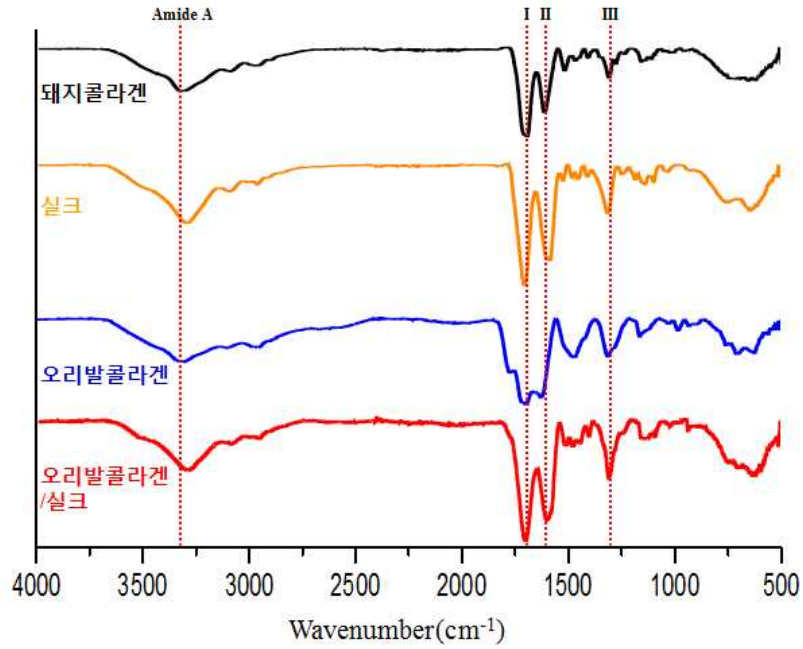
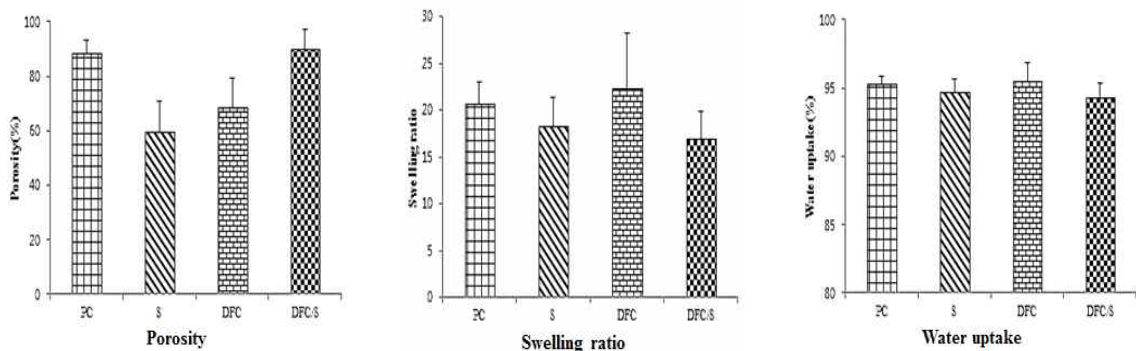


그림 6. 오리발 콜라겐 패치의 FT-IR 분석

(4) 기초 물성 테스트

- 돼지 콜라겐, 실크, 오리발 콜라겐, 오리발 콜라겐/실크 패치의 물리적 특성을 비교하기 위해 Porosity, Swelling ratio, Water uptake를 측정함. Porosity 측정 결과 돼지 콜라겐과 오리발 콜라겐/실크 패치의 공극률이 가장 높았으며, 실크와 오리발 콜라겐 패치의 공극률이 비교적 낮은 것으로 확인됨. Swelling ratio 측정 결과 돼지 콜라겐과 오리발 콜라겐 패치의 팽윤도가 높은 수치를 나타내었으며, 실크와 오리발 콜라겐/실크 패치의 팽윤도는 콜라겐 패치에 비해 비교적 낮은 수치를 나타내었음. Water uptake 측정 결과 모든 패치에서 94% 이상의 물 흡수도를 나타내었음(그림 7)



	Porcine Collagen (PC)	Silk (S)	Duck's Feet Collagen (DFC)	Duck's Feet Collagen /Silk (DFC/S)
Porosity(%)	88.55±4.66	59.92±10.80	68.89±10.18	90.30±6.86
Swelling Ratio	20.73±2.73	18.30±3.09	22.39±5.95	16.92±3.07
Water Uptake (%)	95.36±0.54	94.72±0.93	95.50±1.31	94.30±1.01

그림 7. 오리발 콜라겐 패치의 Porosity, Swelling ratio, Water uptake 측정 결과

나. Membrane 타입의 패치 제작

(1) 오리발 콜라겐 membrane 패치의 구조

- 돼지 콜라겐 membrane 패치와 오리발 콜라겐 membrane 패치의 구조를 비교 확인하기 위하여 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰함. 돼지 콜라겐 membrane 패치가 매우 매끄러운 것을 확인할 수 있었음. 오리발 콜라겐 membrane 패치도 돼지 콜라겐 membrane 패치와 유사하게 매끄러운 것을 확인할 수 있었음(그림 8)

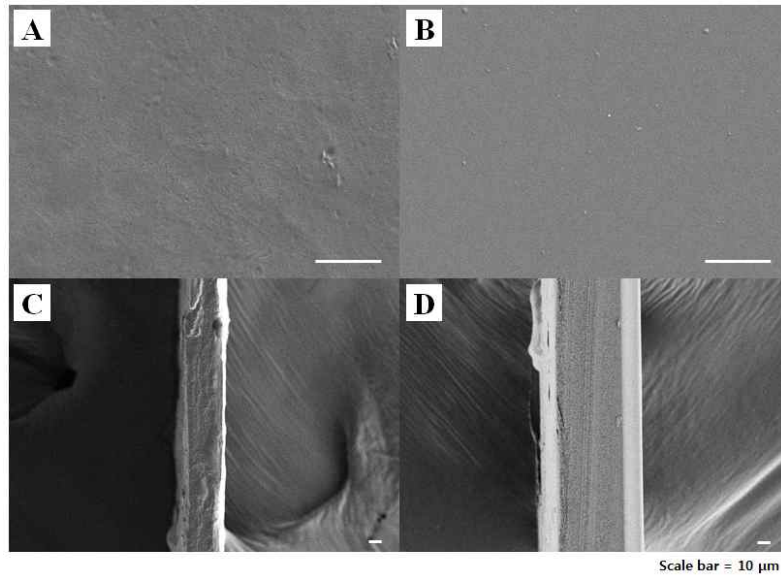


그림 8. 콜라겐 membrane SEM 관찰 이미지

A, C) 오리발 콜라겐 membrane 패치, B, D) 돼지 콜라겐 membrane 패치

(2) 오리발 콜라겐 membrane 패치 FT-IR 측정

- 오리발 콜라겐, 돼지 콜라겐 membrane 패치의 성분을 확인하기 위하여 FT-IR 분석을 시행함. 그 결과 오리발 콜라겐 membrane 패치에서는 1637 cm^{-1} 에서 Amide I, 1542 cm^{-1} 에서 Amide II, 1237 cm^{-1} 에서 Amide III 피크 값을 나타내었고, 돼지 콜라겐 membrane 패치에서는 1627 cm^{-1} 에서 Amide I, 1546 cm^{-1} 에서 Amide II, 1237 cm^{-1} 에서 Amide III 피크 값을 나타내었음

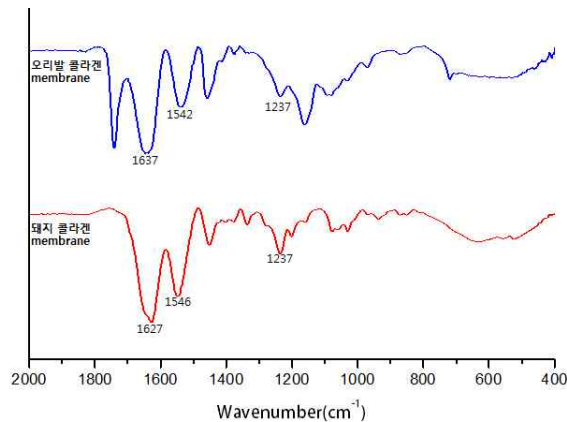


그림 9. 콜라겐 membrane FT-IR 분석 결과

(3) 인장강도

- 기계적 성질은 인공 고막의 기본적인 물리적 측면 중 하나임. 인장강도 측정 결과 오리발 콜라겐 membrane 패치의 경우 3.4 MPa의 인장 응력을 나타내었고, 돼지 콜라겐 membrane 패치의 경우 5.8 MPa의 인장 응력을 나타냄. 변형률은 오리발 콜라겐 membrane 패치는 20.8%를 나타내었고, 돼지 콜라겐 membrane은 15.8%의 변형률을 나타냄(그림 10)

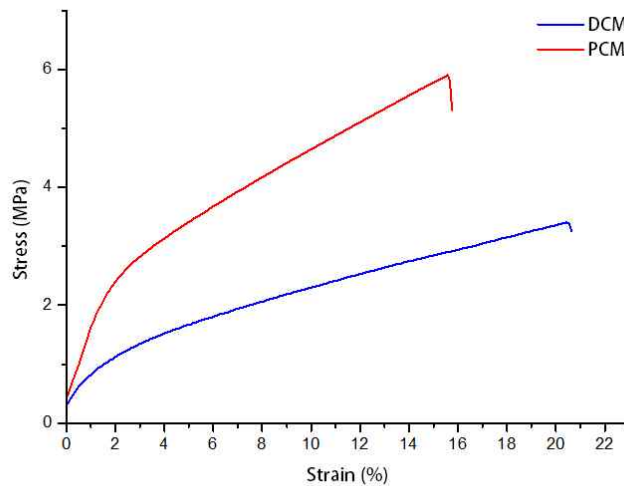


그림 10. 콜라겐 membrane 패치의 인장강도 측정 결과

3. 오리발 유래 콜라겐 지지체 생체적합성 및 고막 천공 재생 시험

가. 스펀지 타입의 패치

(1) 세포 독성 테스트 및 부착도 관찰

- 오리발 콜라겐 패치의 세포 생존율 및 독성 테스트하기 위하여 CCK-8 assay를 진행함. 오리발 콜라겐과 비교하기 위하여 각각의 패치는 지름 6 mm로 제작하여 멸균 후 96well에 넣고, cell은 NIH 3T3 cell을 사용하였으며 2×10^4 cell/ml의 cell을 각각의 패치에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하였음. Cell의 부착이 쉽도록 30분 동안 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하고 난 후 새로운 media를 $100 \mu\text{l}$ 씩 더 넣어줌. Cell media는 DMEM (10% FBS, 1% A/A)을 사용하였고, 2일에 한번씩 새로운 media로 교환하며 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 1, 5, 7일 배양함. 각각의 관찰 시기에 CCK-8 solution과 media를 1:9로 혼합한 media로 교체 후 2시간 동안 배양하면서 cell의 반응을 유도함. 반응이 완료된 solution을 각각 $100 \mu\text{l}$ 씩 새로운 96 well에 넣고 ELISA를 사용하여 450 nm의 파장에서 측정함. 측정 결과, 기간에 따라 세포의 증식을 확인함으로써 지지체의 세포 독성이 없음을 확인함. 그 중에서 오리발 콜라겐 패치의 세포 증식률이 가장 좋은 것을 확인할 수 있었음(그림 11)

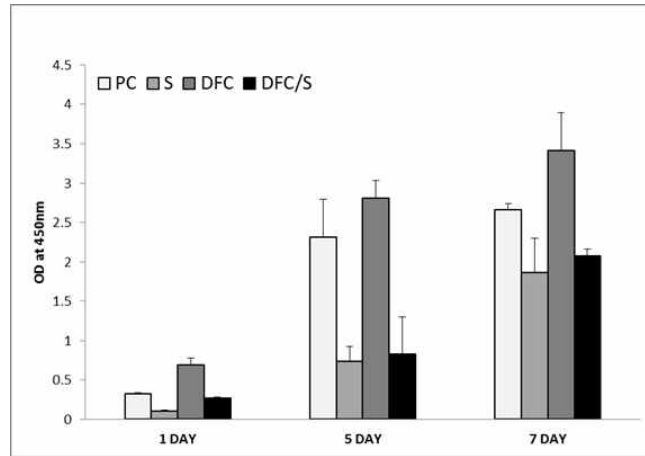


그림 11. 오리발 콜라겐 패치의 CCK-8 분석

- 오리발 콜라겐 패치에서의 세포 부착도를 확인하기 위하여 NIH 3T3 cell을 파종하여 7일 후에 SEM으로 관찰한 결과 모든 패치에서 NIH 3T3 cell이 잘 부착됨을 관찰할 수 있었음(그림 12)

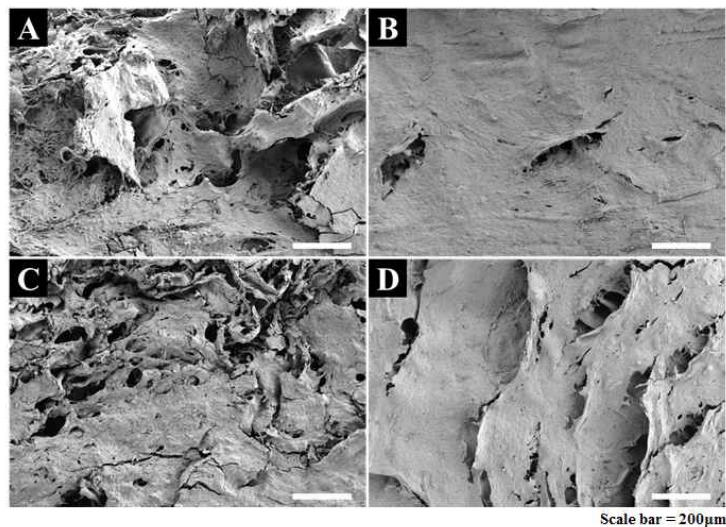


그림 12. 오리발 콜라겐 패치의 세포 부착 SEM 관찰 이미지

A) 돼지 콜라겐, B) 실크, C) 오리발 콜라겐, D) 오리발 콜라겐/실크

(2) 동물 모델을 이용한 *in vivo* test

- 본 연구에서 제작된 오리발 콜라겐 패치의 고막 재생 효과를 확인하기 위해, 고막 천공 동물 모델에서의 고막 재생 효과를 확인함. 실험동물은 SD-Rat 을 사용하였으며, 마취 후 고막에 천공을 유발 후 천공 부위에 멸균된 오리발 콜라겐 패치와 비교군으로 종이 패치를 부착시킴. 14일 동안 사육하며 2일에 한 번씩 내시경 카메라로 관찰함. 1, 3, 7, 14일 마다 고막을 적출하여 고막 천공 면적을 측정하고, H&E 염색을 통하여 관찰하였음

- 육안적 관찰 결과 오리발 콜라겐 패치가 종이에 비해 잘 부착하는 것을 관찰할 수 있었음(그림 13, 좌)
- 천공 부위를 관찰하여 천공 부위의 면적을 측정함. 3일차에서 오리발 콜라겐 패치 처리군은 44.48%, 패치를 부착시키지 않은 control 군은 16.58%, 종이 패치 처리군은 28.32%의 천공 치유 면적을 나타냄. 오리발 콜라겐 패치의 천공 치유 능력이 다른 군들에 비해 빠르고 높은 것을 관찰할 수 있음. 7일차에서는 패치를 부착시킨 모든 군에서 천공 치유가 완료되었음을 확인하였고, control도 천공 치유가 93% 완료된 것을 확인하였음(그림 13, 우)

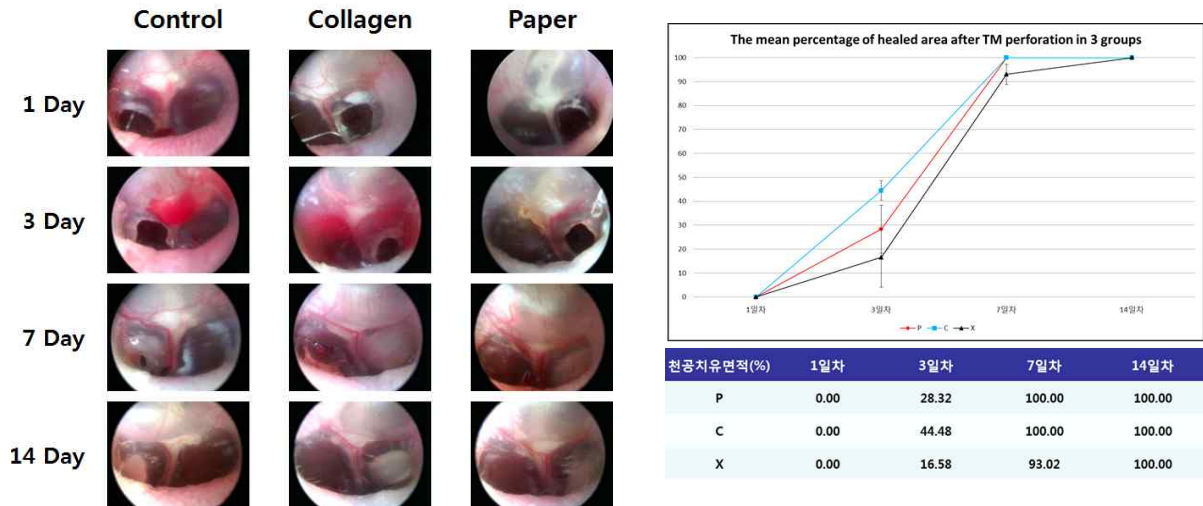


그림 13. Rat 고막 천공 모델에서 천공 치유 면적 관찰(좌) 및 측정(우)

- 고막 천공 모델 조직을 H&E로 관찰함. 1, 3, 7, 14 일째 고막 조직을 H&E로 염색한 결과에서 오리발 콜라겐 패치군이 종이 패치군보다 재생된 고막의 두께가 대체적으로 얇은 것을 확인 할 수 있었음. 고막조직 자체 치유 효과를 관찰한 결과 대체적으로 오리발 콜라겐 패치군이 종이 패치군보다 고막천공 치료의 질적 차이에서 월등히 뛰어난 것을 확인할 수 있었음. 고막은 피부층(외층), 고유층, 점막층(내층)의 3층으로 구성되어 있는데, H&E 조직 염색을 통해 관찰했을 때, 오리발 콜라겐 패치의 경우 이 3층이 균일하게 구성되어 있는데 반해, 종이 패치의 경우 3층의 구성이 불균일하며 두꺼운 것을 확인할 수 있었음. 오리발 콜라겐 패치의 경우 종이 패치에 비해 고막에 잘 부착되어 있거나 인접하여 고막의 치유가 잘 될 수 있도록 유도하고 있음(그림 14)

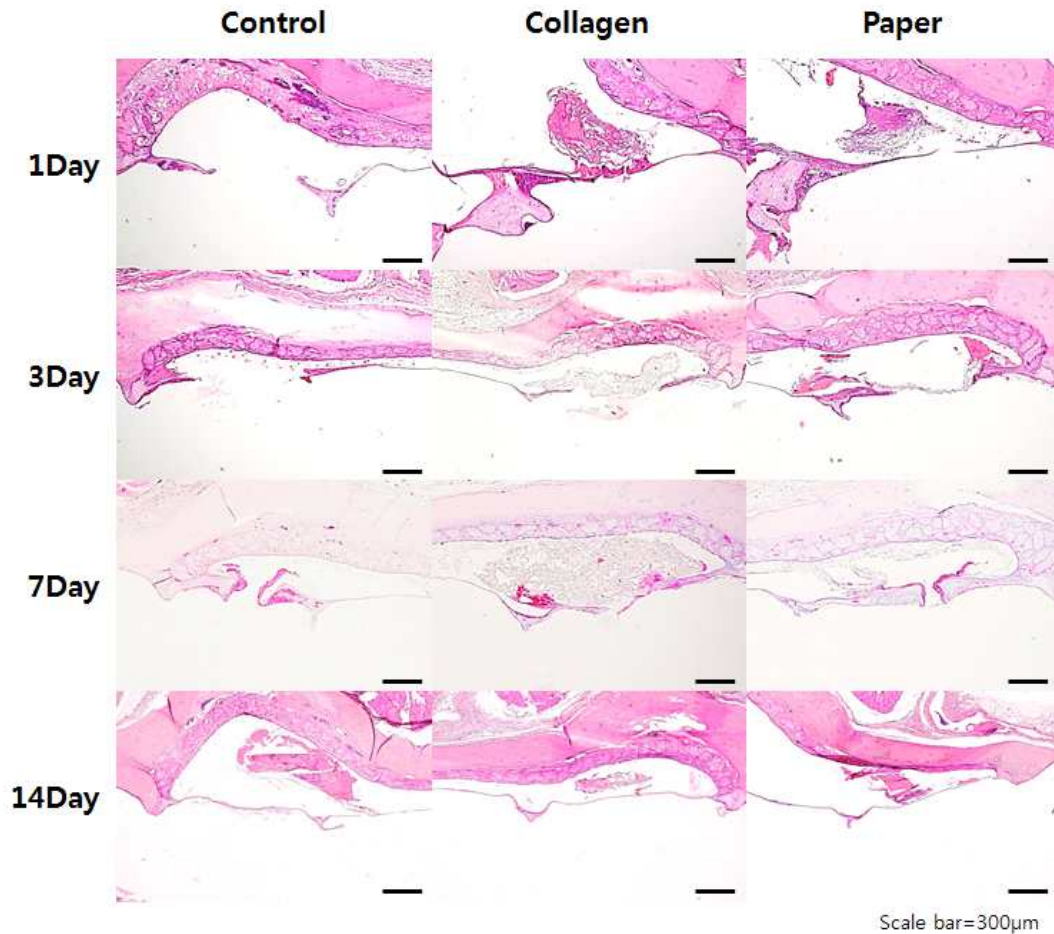


그림 14. Rat 고막 천공 모델에서 H&E stain 관찰

나. Membrane 타입의 패치

(1) 오리발 콜라겐 membrane 패치의 세포 독성

- 오리발 콜라겐 membrane 패치의 세포 독성을 테스트하기 위하여 CCK-8 assay를 진행함. 오리발 콜라겐 membrane 패치와 비교하기 위하여 종이 패치와 돼지 콜라겐 membrane 패치를 지름 6 mm로 제작하여 멸균하여 사용함. 각각의 패치는 96 well에 넣고, cell은 NIH 3T3 cell을 사용하였으며, 2×10^4 cell/ml의 cell을 각각의 패치에 100 ul씩 분주함. Cell의 부착이 쉽도록 30분 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하고 난 후 새로운 media를 100 ul씩 추가함. Cell media는 DMEM (10% FBS, 1% A/A)을 사용하였고, 2일에 한 번씩 새로운 media로 교환하며 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1, 5, 7일 배양하였음. 각각의 관찰 시기에 CCK solution과 media를 1:9로 혼합한 media로 교체한 후 2시간 동안 배양하면서 cell의 반응을 유도하였음. 반응이 완료된 solution을 각각 100 ul씩 새로운 96 well에 넣고 ELISA를 사용하여 450 nm의 파장에서 측정함. 측정 결과, 배양기간에 따라 세포 수가 증가함을 확인함으로써 membrane 패치의 세포 독성이 없음을 확인하였음(그림 15)

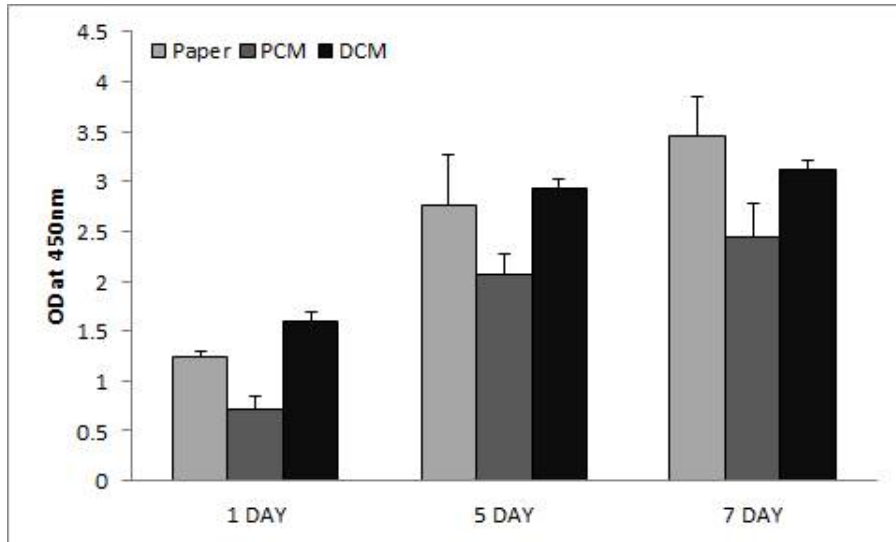


그림 15. 콜라겐 membrane 패치의 CCK-8 assay

(2) 오리발 콜라겐 membrane 패치 *in vivo* test

- 육안적 관찰 결과 종이패치는 부착은 되어 있으나 천공 부위에서 떨어져 있는 소견이 관찰되었으며, 돼지 콜라겐 membrane 패치는 천공 부위로부터 떼이거나 다른 부위 쪽으로 이동해 있는 것이 관찰됨. 반면 오리발 콜라겐 membrane의 경우 천공 외 이동이 없고 천공 부위에 잘 부착되어 있는 것을 확인함(그림 16)

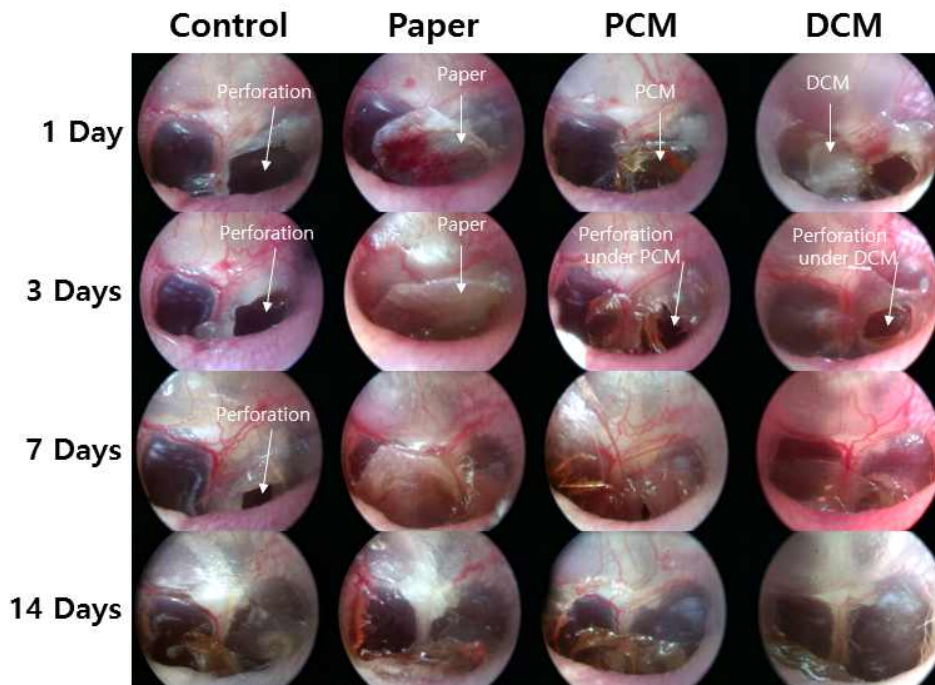


그림 16. 고막 천공 모델에서 오리발 콜라겐 membrane 패치의 고막 재생 능력 관찰

- 천공 면적 측정 그래프 결과, 천공 초기에는 돼지 콜라겐 membrane 패치나 오리발 콜라겐 membrane이 종이패치에 비해 빠른 치유 효과를 나타내고, 7일차에는 완전히 치유된 것을 확인할 수 있음. 반면 종이패치는 14일차에 천공이 치유됨(그림 17)

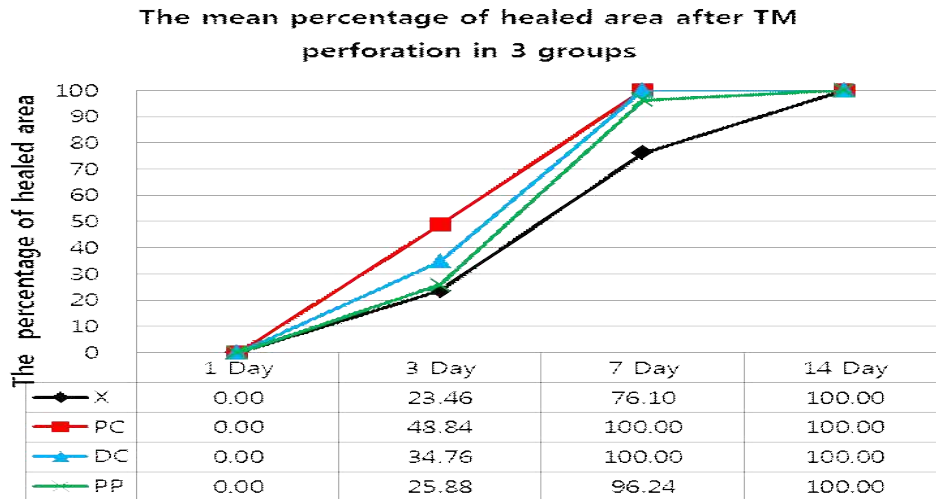


그림 17. 고막 천공 모델에서의 내시경 사진을 이용한 천공 면적 측정 결과

- 오리발 콜라겐, 돼지 콜라겐 membrane과 종이 패치의 고막 재생 효과를 확인하기 위해 고막 천공 동물 모델의 조직학적 염색으로 관찰함
- 1일째 대조군은 고막 천공이 유지되고 있으나 종이와 오리발 콜라겐에서는 패치 주변으로 조직 재생 소견이 관찰됨. 3일째 대조군 및 모든 군에서 천공이 계속 관찰되고 있으나 종이 패치의 경우 염증 소견이 관찰됨. 7일째 오리발 콜라겐군에서 다른 군에 비해 비교적 고막에 가까운 천공 재생 소견을 보임. 14일째 오리발 콜라겐 군은 완전히 재생된 고막과 종이패치 군에 비해 적은 염증 소견을 보임(그림 18)

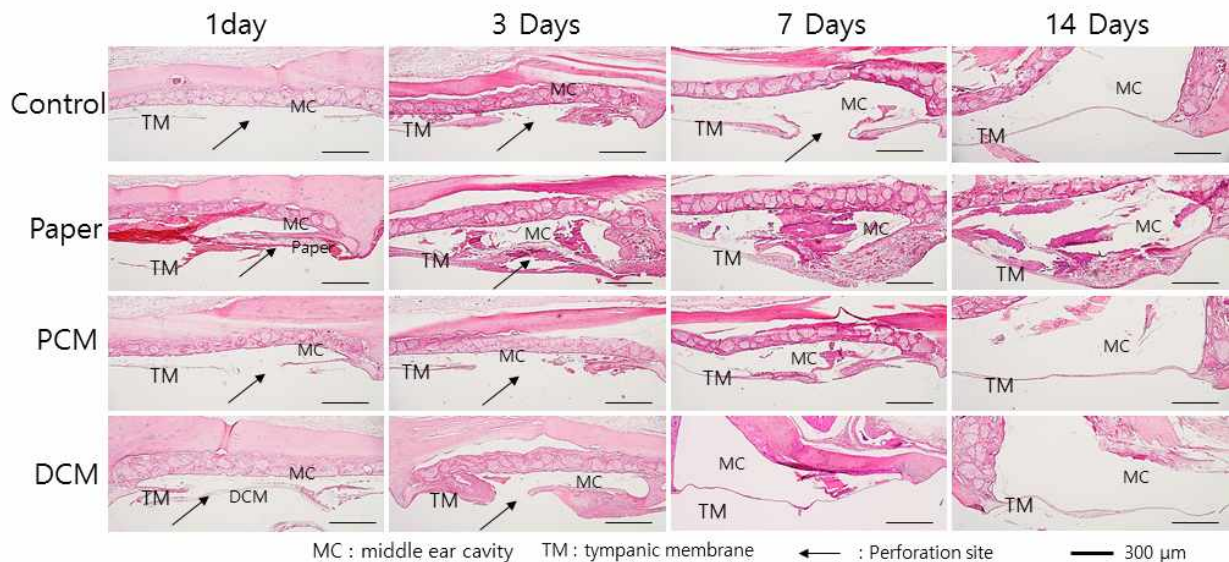


그림 18. 고막 천공에서 H&E 조직염색

- 오리발 콜라겐 membrane을 이용한 고막 패치가 기존 사용하고 있는 paper 패치에 비해 고막 천공 시 치료 효과가 우수한 것을 확인 할 수 있었으며, 고막 천공 치료용 소재로 가능성을 확인함

4. 연부 조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 지지체 제작 및 *in vitro*, *in vivo* test

오리발 유래 콜라겐을 이용하여 오리발 유래 인공 진피 대체제로 사용 가능 여부에 중점을 두고 *in vitro*, *in vivo* test를 시행함

가. 연부조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 스펀지 제작

- 오리발 유래 콜라겐 스펀지는 콜라겐을 0.5 M acetic acid에 4% (w/v)의 농도로 용해시킨 오리발 콜라겐 용액으로 제작함. 4% 오리발 콜라겐 용액을 petri dish에 넣은 후 -80℃에서 12시간 동안 동결함. 완전히 동결된 sample을 24시간 동안 동결 건조하여 스펀지 내의 수분을 제거함. 수분이 제거된 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 acetic acid를 제거하기 위해 Et-OH (100, 80, 50, 30%)로 세척함. 이 후 증류수로 충분히 세척한 후 -80℃에서 12시간 동안 동결 및 동결 건조하여 오리발 유래 콜라겐 스펀지 제조함(그림 19)

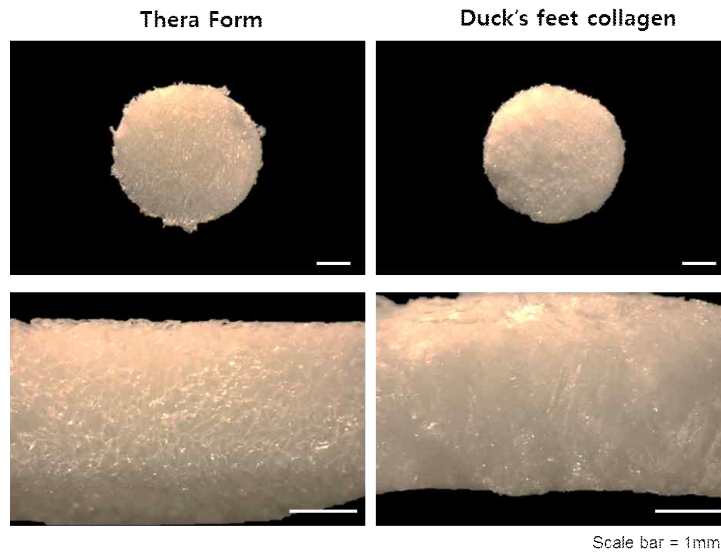
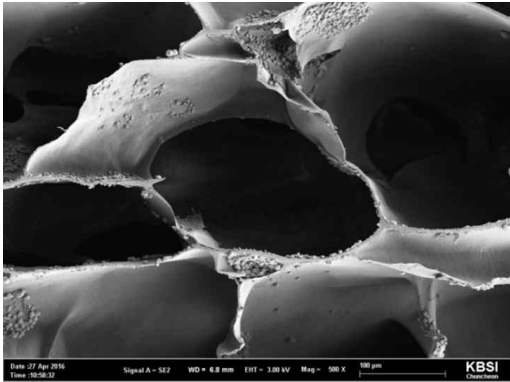


그림 19. 연부 조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 스펀지와 상용화된 콜라겐흡수성 창상피복재인 테라폼(TheraForm)

나. 연부조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 구조 분석

- 연부조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 구조를 비교 확인하기 위해 콜라겐 스펀지와 테라폼의 단면을 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰함
- 콜라겐 기반의 스펀지가 입체적으로 상호 연결된 공극 구조를 갖고 있는 것으로 관찰됨(그림 20)
- 이는 연부조직 대체물로서 세포가 지지체 내로 침투함에 따라 조직과 지지체 사이 상호작용과 세포간 물질대사 및 가스교환에 용이함. 오리발 유래 콜라겐 스펀지와 테라폼 둘 다 균일한 형태의 공극과 격벽을 갖고 있는 것으로 관찰됨

Thera Form



Duck's feet collagen

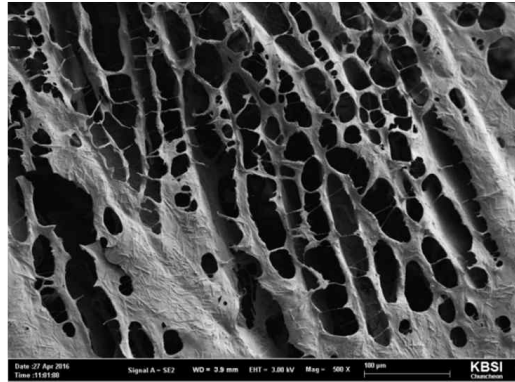


그림 20. 테라폼과 연부조직 대체용 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 SEM 관찰

다. 팽윤도 및 물흡수도

- 오리발 유래 콜라겐 스펀지와 테라폼(TheraForm)의 물리적 특성을 비교하기 위해 Swelling ratio와 Water uptake를 측정함
- Swelling ratio 측정 결과, 오리발 유래 콜라겐 스펀지가 테라폼보다 낮은 팽윤도를 갖는 것으로 나타냄(그림 21, 좌)
- Water uptake 측정 결과 테라폼은 90.76%의 물 흡수도를, 오리발 유래 콜라겐 스펀지에서는 77.59%의 물 흡수도를 나타냄(그림 21, 우)

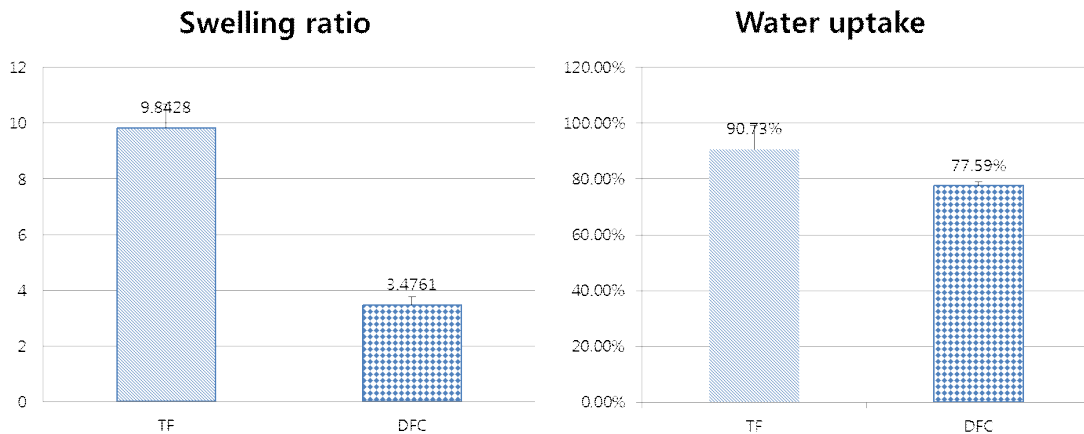


그림 21. 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC)와 테라폼(TF)의 Swelling ratio(좌), Water uptake(우)

라. 세포 독성 테스트

- 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC)와 테라폼(TF)의 세포생존률 및 세포 독성 실험을 위해 CCK-8 assay를 진행함. 각 sample을 시험할 media의 5% 무게만큼 콜라겐을 넣어준 뒤, 37°C에서 48시간동안 보관함. 녹지 않은 sample은 syringe filter를 이용해 제거해 준 뒤, 걸러진 media를 사용함. NIH 3T3 cell을 사용하여 시험하였으며, 96well plate에 각 well마다 5 x 10³ cell/ml의 cell을 분주함. Cell media는 DMEM

(10% FBS, 1% A/A)을 사용하였고, 2일에 한번씩 새로운 media로 교환하며 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1, 3, 5, 7일 동안 배양함. 각각의 관찰 시기에 CCK-8 solution과 media를 1:9로 혼합한 media로 교체 후 2시간 동안 배양하면서 cell의 반응을 유도함. 반응이 완료된 solution을 각각 100 μl씩 새로운 96 well에 넣고 ELISA를 사용하여 450 nm의 파장에서 측정함

- 기간에 따른 세포의 증식을 확인함으로써 지지체의 세포 독성이 없음을 확인하였고, 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC)의 세포증식률이 가장 좋은 것을 확인함(그림 22)

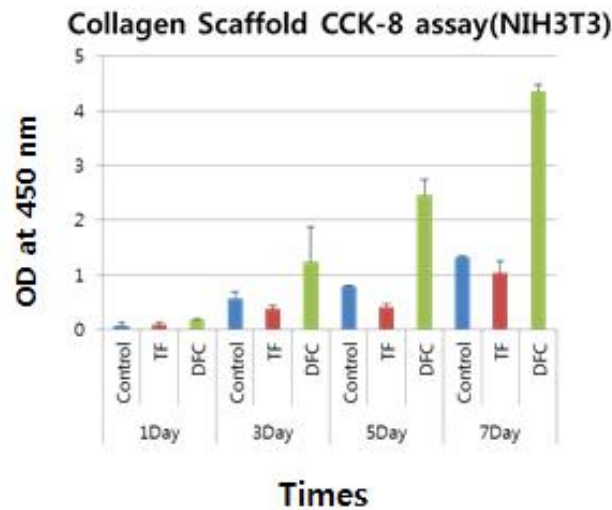


그림 22. 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC)와 테라폼(TF)의 CCK-8 분석 결과

마. 오리발 유래 콜라겐 지지체의 동물 모델을 이용한 *in vivo* test

(1) 인공 진피 동물 모델 제작

- 전층 결손 창상의 유발 및 처치: 모든 실험군은 아이소플로렌 호흡마취기를 이용하여 전신 마취시킨 후 전기 제모기로 쥐의 등 부위 털을 제거함. 실험 동물은 SD-Rat을 사용하였으며, 마취 후 베타딘으로 소독된 척부에 1 x 1 cm² 크기의 창상을 유발함. 창상이 유발된 부위에 멸균된 오리발 유래 콜라겐 스펀지와 테라폼을 삽입함. 삽입된 지지체가 고정될 수 있도록 silicon dressing제를 사용하여 suture 해준 뒤 3, 5, 7, 14, 21일간 관찰함(그림 23)



그림 23. 전층 결손 모델을 이용한 치유 효과 확인 실험 방법

- 조직학적 검사: 창상 유발 후 1, 2, 4주째에 실험동물을 안락사시켜 창상 전체가 포함된 조직을 채취하고, 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후, 창상 중양을 통과하는 절편을 취하여 탈수 시킨 후 파라핀 블록에 포매함. 조직을 5 μm 두께로 조직 절편기를 이용하여 절단한 다음 slide에 붙여 파라핀 제거 및 함수과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시함. 염색된 조직은 광학 현미경(Eclipse 80i, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰함

(가) Hematoxylin-Eosin (H&E) staining

- 동물 조직으로부터 샘플 채취하여 4% paraform aldehyde (PFA) 용액에 48시간 고정한 후, 탈수 시키고 파라핀 블록에 포매함. 채취한 조직의 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절한 후 건조시켜 파라핀 절편을 제작함. 탈파라핀 과정을 위해 60°C 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 5분간 1번, 90% 에탄올에서 5분간 1번, 80% 에탄올에서 5분간 1번, 70% 에탄올에서 5분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 5분간 세척함. Harris hematoxylin으로 3분간 반응시킨 후 물에 5분간 세척하고, Eosin으로 2분간 반응시킨 후 물에 10분간 세척함. 70% 에탄올에 3분간 1번, 80% 에탄올에 3분간 1번, 90% 에탄올에 3분간 1번, 100% 에탄올에 3분간 1번, 자일렌에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰함.

(나) Masson' s trichrome (MT) staining

- 탈파라핀 과정을 위해 60°C 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 5분간 1번, 90% 에탄올에서 5분간 1번, 80% 에탄올에서 5분간 1번, 70% 에탄올에서 5분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 5분간 세척함. 60°C Bouins (IMEB, USA) 용액에 1시간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, Hematoxylin (IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Biebrich scarlet-acid fuchsin (IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Phosphomolybdic-phosphotungstic acid (IMEB, USA)로 10분간 1번, Aniline blue stain solution (IMEB, USA)으로 10분간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, 70% 에탄올에 3분간 1번, 80% 에탄올에 3분간 1번, 90% 에탄올에 3분간 1번, 100% 에탄올에 3분간 1번, 자일렌에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰함

(2) 피부 재생 능력 관찰 치유 면적 비교

- 본 연구에서 제작된 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC)의 진피 재생 효과를 확인하기 위해, 완전피부 결손 모델에서의 진피 재생 효과를 확인함.
- 육안적 관찰 결과, 대조군(Control)은 창상 치유 과정에서 피부 수축현상이 심하게 발생되어 흉터가 생긴 것을 확인할 수 있었고, 테라폼(Thera Form) 처리군은 5일 이후 지지체가 녹아 피부 수축현상이 발생하는 것을 확인할 수 있었음. 지지체가 빠르게 녹아서 피부 재생이 정상적으로 잘 이루어지지 않은 것을 알 수 있음
- 반면에 오리발 유래 콜라겐 스펀지군은 전 기간 동안 지지체가 녹지 않고 구조를 잘

유지하고 있었으며, 이로 인해 치유 면적은 다른 군과 큰 차이가 없으나 창상이 치유되는 동안 피부 수축현상이 생기지 않은 것을 확인할 수 있었음(그림 24)

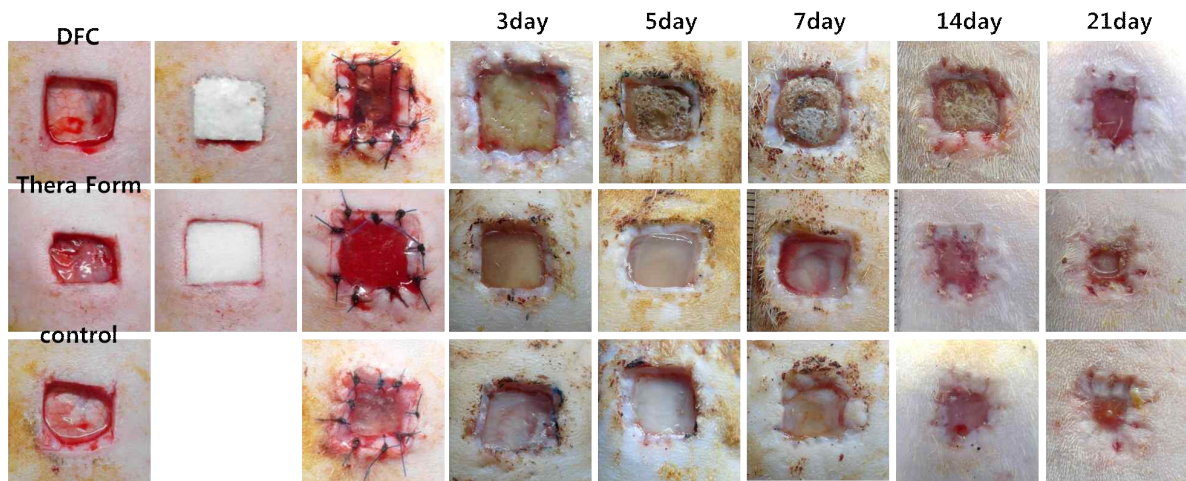


그림 24. 피부 결손 모델에서 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 진피 재생 능력 관찰 (대조군(Control), 테라폼(TheraForm), 오리발 유래 콜라겐 스펀지(DFC))

- 피부 결손 부위를 기간별로 관찰하여 치유 면적을 측정함
- 14일차까지 테라폼 처리군에서는 43.48%, 대조군에서는 50.51%, 오리발 유래 콜라겐 스펀지 처리군은 51.25%로 테라폼 처리군이 가장 빠른 치유면적을 나타내었고, 오리발 콜라겐이 가장 늦은 치유면적을 나타냄
- 21일차에서는 테라폼 처리군이 35.08%, 대조군이 36.07%, 오리발 유래 콜라겐 스펀지 처리군이 29.51%로 창상 초기에는 오리발 유래 콜라겐 스펀지 처리군이 다른 군에 비해 비교적 늦은 치유 능력을 가졌지만, 치유 후기로 갈수록 다른 군에 비해 빠르게 치유되는 것을 확인할 수 있음(그림 25)

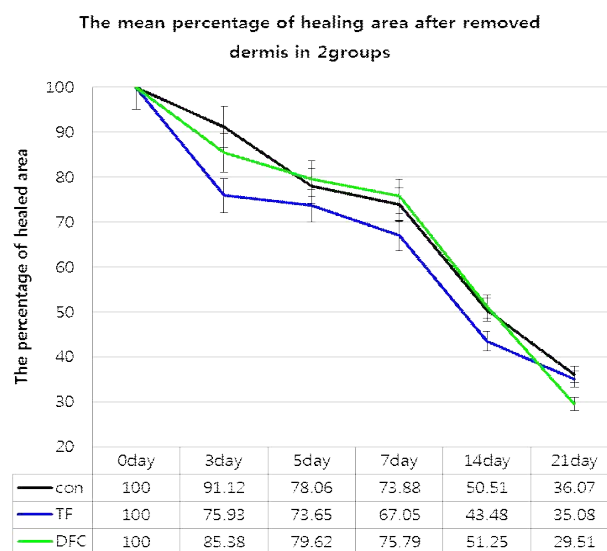


그림 25. 피부 결손 모델에서 창상 치유 면적 측정 그래프 (대조군: Con, 테라폼: TF, 오리발 유래 콜라겐 스펀지: DFC)

- Rat 피부 결손 모델 조직을 H&E 염색으로 관찰함. 3, 5, 7, 14, 21일째 피부 창상 인공진피 조직을 H&E로 염색한 결과에서 오리발 유래 콜라겐 스펀지군(DFC)이 TheraForm (TF)군에 비해 치유된 조직이 대체로 원래 피부층 만큼의 두께를 갖는 것을 확인할 수 있음
- 조직학적 소견상 DFC군은 대조군에 비해 빠르고, TF와는 유사한 창상 치유 효과를 보였음(그림 26, x10배)

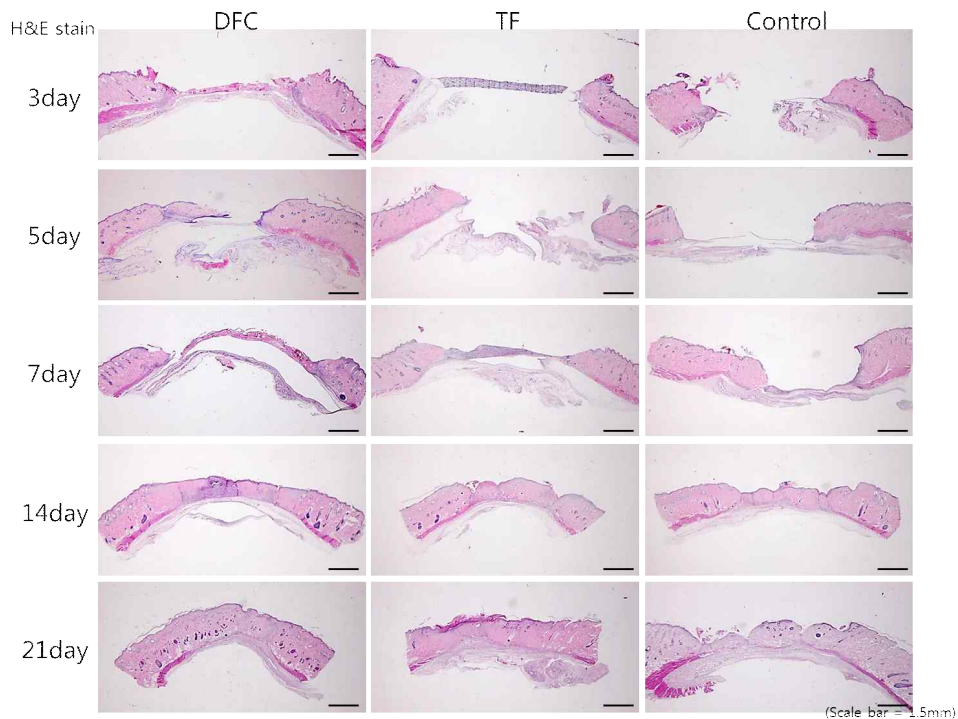


그림 26. Rat 피부 결손 모델에서 H&E 조직학적 염색 결과
(대조군: Con, 테라폼: TF, 오리발 유래 콜라겐 스펀지: DFC, 배율: x10)

- 특히 x20 확대 이미지에서는 창상 변연부와 이식편 사이의 주변 조직 재생과정에서 5일째 DFC군에서 TF군보다 미세 혈관이 이식편내로 자라 들어가는 것을 확인할 수 있었음. 21일째 창상 소견상, DFC군에서 재생된 상피 및 진피의 수축 및 구축 소견 없이 비교적 정상조직과 유사하게 재생이 이루어졌음(그림 27)

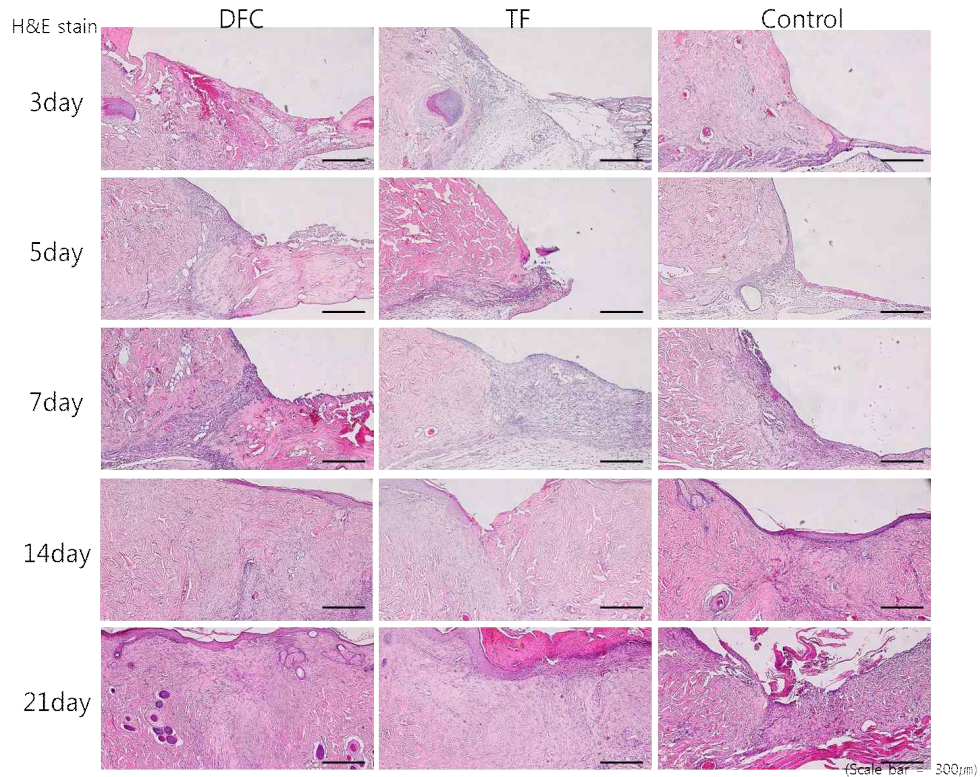


그림 27. Rat 피부 결손 모델에서 H&E 조직학적 염색 관찰 결과
(대조군: Con, 테라폼: TF, 오리발 유래 콜라겐 스펀지: DFC, 배율: x20)

- Rat 피부 결손 모델 조직을 Masson' s Trichrome 염색으로 관찰함
- 3, 5, 7, 14, 21일째 피부 창상 인공진피 조직을 MT로 염색한 결과, 오리발 콜라겐의 경우 창상 치유가 전체적으로 진행된 21일째 상태에서 재생 부위의 콜라겐 침착 소견을 통해, 조직이 일정하게 재생되는 것을 확인 할 수 있었음. 이는 창상이 재생된 상태에서 흉터를 적게 만드는 소견을 보였음(그림 28, 29)

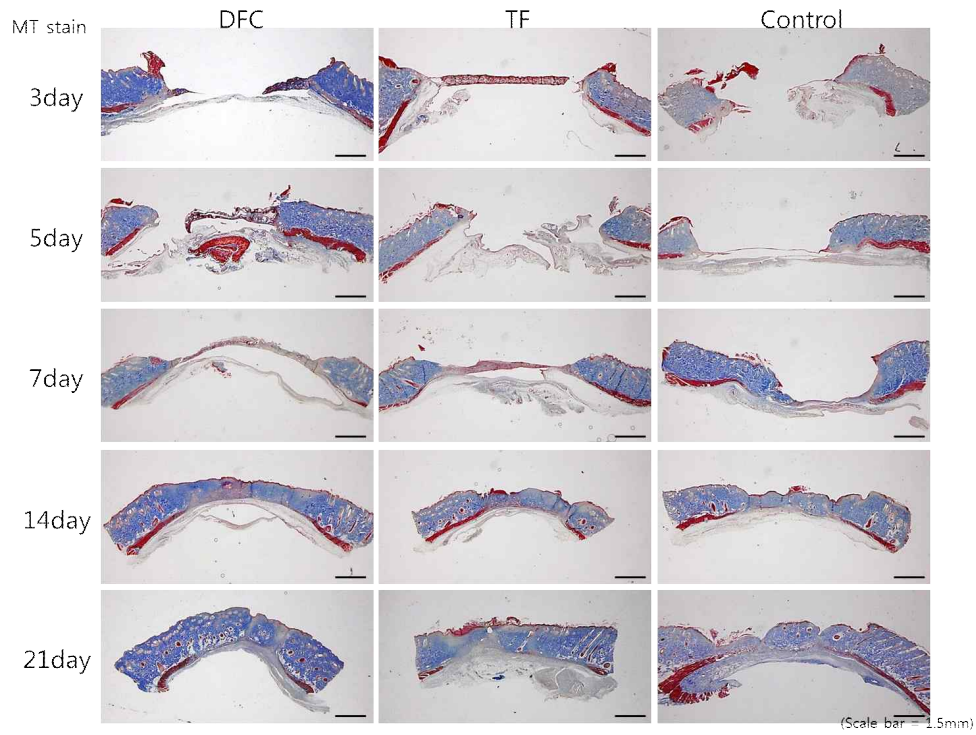


그림 28. Rat 피부 결손 모델에서 Masson' s Trichrome (MT) 조직학적 염색 관찰
(대조군: Con, 테라폼: TF, 오리발 유래 콜라겐 스펀지: DFC, 배율: x10)

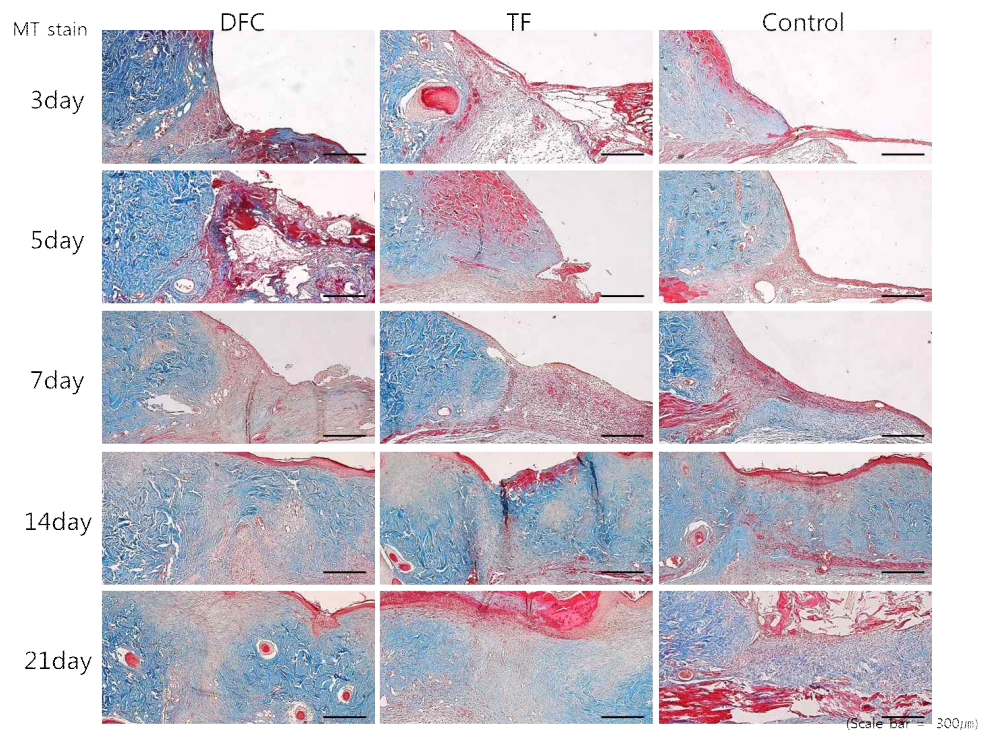


그림 29. Rat 피부 결손 모델에서 Masson' s Trichrome (MT) 조직학적 염색 관찰
(대조군: Con, 테라폼: TF, 오리발 유래 콜라겐 스펀지: DFC, 배율: x20)

- 오리발 콜라겐의 경우 상품화된 돼지 콜라겐에 비해 생체 친화력이 우수하며, 특히 생체 내에서 흡수율 및 분해도가 낮음. 이는 기존 제품에 문제점인 짧은 시간 내에 흡수 및 분해되어 흉터를 유발하는 특성을 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 생각됨. 이러한 오리발 콜라겐의 특성으로 진피 대체용으로 개발 가능성이 높을 것으로 생각됨

5. 오리발 유래 콜라겐을 이용한 지혈제 개발

가. 오리발 유래 콜라겐 지혈제 제작

- 0.1 M HCl에 3%의 농도로 오리발 유래 콜라겐을 용해한 용액 40 ml를 petri dish에 넣은 후 -80°C 에서 24시간 동안 동결함. 완전히 동결된 지지체를 24시간 동안 동결건조하여 지지체 내의 수분을 제거함. 오리발 콜라겐 지혈제를 가교하기 위해 0.25% glutaraldehyde (95% 에탄올에 희석된)에 침지시켜 실온에서 24시간 동안 반응시킴. 증류수로 세척 후 0.1 M Glycine에 24시간 침지 후 증류수에 세척 및 동결 건조하여 지혈제용 지지체를 획득함. 실크/오리발콜라겐 지지체는 1:1 비율로 혼합해서 제작함. 실크 피브로인 지지체는 6%의 실크 피브로인 용액 40 ml을 petri dish에 넣은 후 -80°C 에서 24시간 동안 동결함. 완전히 동결된 지지체를 24시간 동안 동결건조하여 지지체 내의 수분을 제거함. 동결건조된 지지체의 가교를 위해 Et-OH (100, 90, 80, 70 and 50%)로 세척함. 증류수로 추가 세척 후 동결 건조하여 지지체를 완성함
- 지혈제용 오리발 유래 콜라겐 스펀지의 구조를 비교 확인하기 위해 콜라겐 스펀지, 실크 피브로인 스펀지, 콜라겐/실크 피브로인 혼합 스펀지와 Avitene (기 상용화 제품)의 단면을 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰함. 모든 지지체들은 입체적으로 상호 연결된 공극 구조를 갖고 있는 것으로 관찰되었고, 콜라겐/실크 지지체의 공극 크기가 크다는 것을 확인함(그림 30). 지지체에서 나타나는 공극 크기 및 구조의 차이는 지혈제로서의 혈액의 흡수 및 지혈 효과 차이를 기대할 수 있음

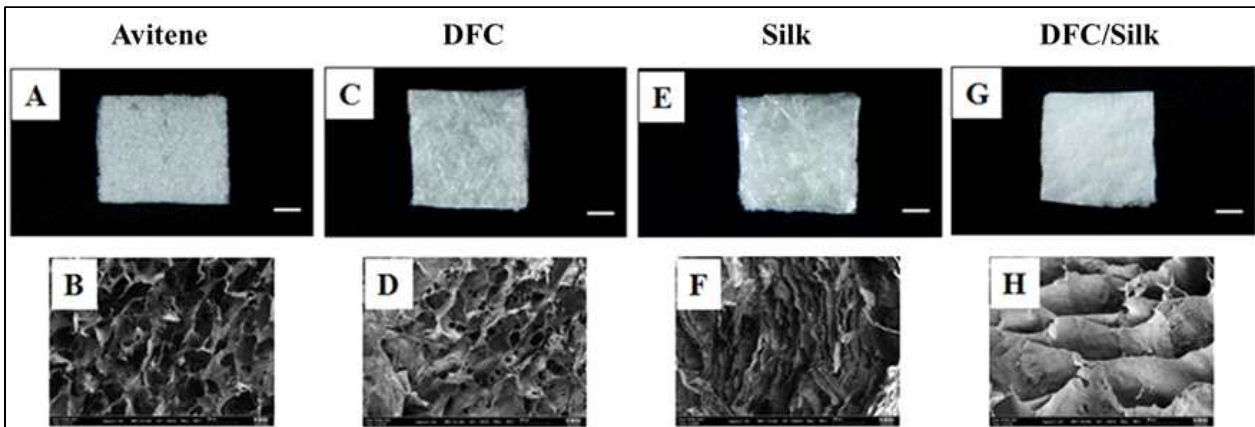


그림 30. 오리발 유래 콜라겐을 이용한 지혈제 제형 관찰

(A) Avitene, (C) Duck's feet collagen (DFC), (E) Silk and (D) DFC/Silk (Scale Bar: 1 mm). SEM images of (B) Avitene (D) Duck's feet collagen (DFC), (F) Silk and (H) DFC/Silk

나. In Vitro 평가

(1) 기초 물성 평가

(가) FTIR 측정

- 오리발 콜라겐, 실크 피브로인, 콜라겐/실크 지지체, Avitene의 성분을 확인하기 위하여 FT-IR 분석을 시행함. 그 결과 오리발 콜라겐 지지체는 1650 cm^{-1} 에서 Amide I, 1553 cm^{-1} 에서 Amide II 피크 값을 나타내었고, Avitene은 1653 cm^{-1} 에서 Amide I, 1547 cm^{-1} 에서 Amide II 피크 값을 나타내었음. Silk는 1628 cm^{-1} 에서 Amide I, 1520 cm^{-1} 에서 Amide II, 콜라겐/실크는 1629 cm^{-1} 에서 Amide I, 1523 cm^{-1} 에서 Amide II 피크 값을 나타내었음. 즉 화학적으로 물성변화 없이 물리적으로 잘 혼합된 것을 확인하였음(그림 31)

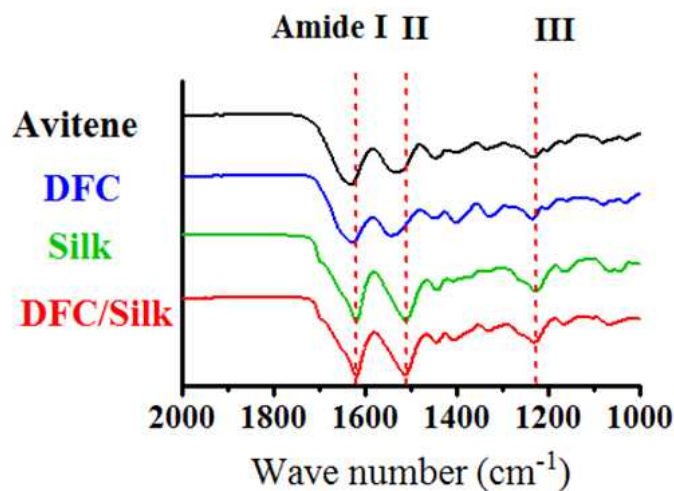


그림 31. 오리발 유래 콜라겐 지지체의 FTIR 분석

(나) 공극률 및 물 흡수도

- 지혈제의 공극률은 액체 치환법(liquid displacement process)을 이용하여 측정함. 일정 부피의 증류수(V_1)에 지혈제를 10 분 동안 침지한 후 지혈제가 침지된 증류수의 부피를 확인함(V_2). 침지되어있던 지혈제를 제거한 후 남은 증류수의 부피를 측정함(V_3). 이때 공극률은 아래 식으로 계산하여 측정함

$$P (\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100$$

- 각 지혈제의 물 흡수도를 확인하기 위하여 건조상태의 지혈제의 무게를 측정함 후 (W_d), 지혈제를 증류수에 3 시간 동안 침지함. 충분히 침지된 지혈제 표면의 증류수를 제거한 후 무게를 측정함(W_s). 이때 팽윤도와 물 흡수도는 아래 식으로 계산하여 측정함

$$\text{Water uptake}(\%) = (W_s - W_d) / W_s \times 100$$

- 각 지지체의 공극률을 측정함 결과, 콜라겐/실크 지지체에서 가장 높은 공극률을 보임(73.79 ± 5.38). 실크 피브로인의 첨가에 따라 콜라겐 지지체에서의 공극률 영향을 받음(그림 32, A)

- 물 흡수도의 경우, 모든 지지체서의 90% 이상의 수치를 보이고 있으며, 각 지지체 간의 뚜렷한 차이는 보이지 않음(그림 32, B)

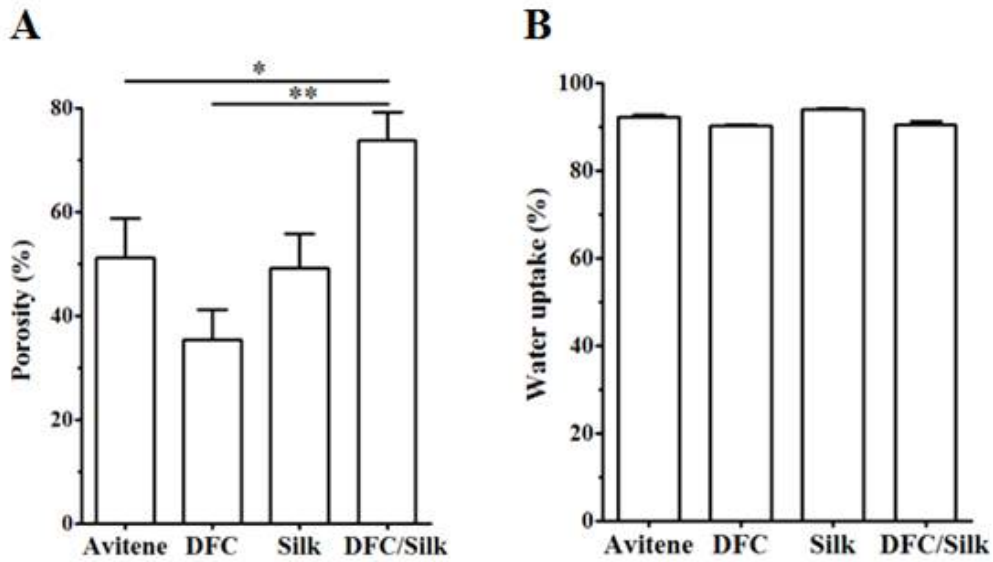


그림 32. 오리발 유래 콜라겐 지지체의 (A) 공극률, (B) 물 흡수도

(다) 분해도

- 지지체가 생체 내에서 체액과 반응하여 분해되는 속도와 구조의 변화 등을 관찰하기 위해 *in vitro* 상에서 분해도 실험을 실시하여 육안적 관찰함. 1 x 1 cm² 크기의 지지체를 생리식염수(또는 효소가 포함된 버퍼)에 침지하여 상온에서 0 시간, 3 시간, 24 시간 후 각 지지체의 크기와 생리식염수의 혼탁 정도를 통하여 분해되는 정도를 관찰함
- 그 결과 모든 지지체에서 24시간 이내 PBS 용액에서의 분해되어 혼탁해지는 현상이 나타나지 않음(그림 33)

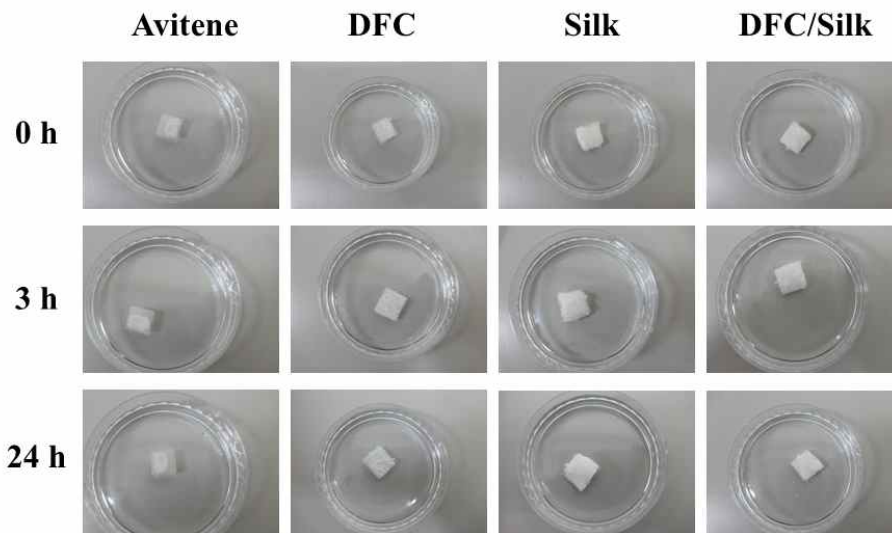


그림 33. PBS 용액에서의 분해도 현상

(2) 세포독성실험을 통한 안전성 평가

- 멸균된 지혈제를 직경 8 mm의 원형으로 규격화 한 다음 NIH 3T3 세포를 1개의 well에 2×10^4 개의 밀도로 접종함. 지혈제를 Transwell culture system의 바닥부분에 위치시킴. 그 후 transwell culture system을 세포 배양 배지에 옮긴 후 1, 3, 5일간 배양하고 용출물의 세포 독성은 CCK-8 분석법을 이용하여 분석함
- 그 결과 시간에 따른 세포의 증식이 증가함을 확인함으로써 지지체의 세포 독성이 없음을 확인함(그림 34)

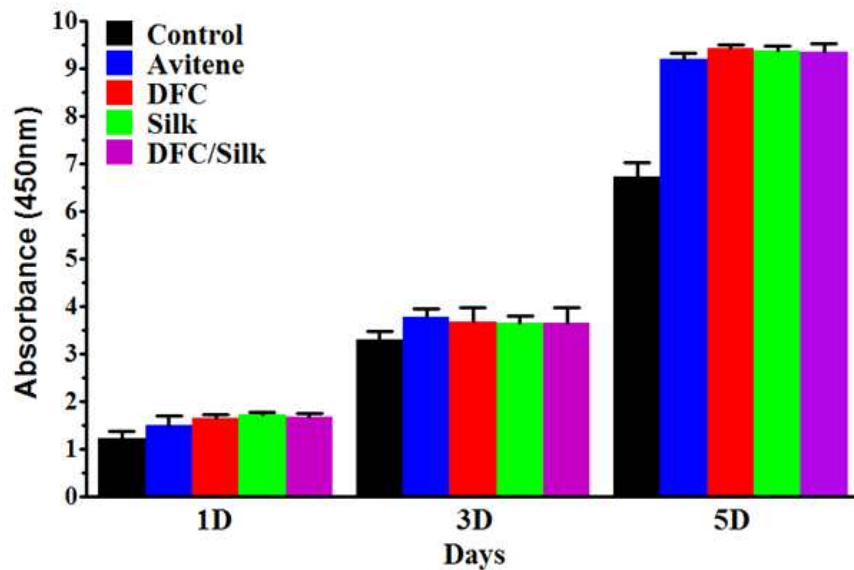


그림 34. 오리발 유래 콜라겐 지혈제의 CCK-8 분석

(3) 지혈제의 혈액 응고 확인

- 지혈제($0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$)에 0.2 ml citrated blood를 떨어뜨리고 0.2 M CaCl_2 (20 ul)을 첨가하여 혈액을 응고시켜 37°C , 30 rpm 조건으로 흔들어주면서 10분간 배양 후 25 ml 물을 넣어 응고되지 않은 혈액을 용해함. 그 중 200 ul를 96 well plate에 옮겨서 540 nm에서 흡광값(D_s)을 측정함. Negative control로는 0.2 ml 전혈을 25 ml 물에 녹인 흡광값(D_o)을 사용함. 혈액응고지수(Blood Clotting Index: BCI)는 다음과 같이 계산함

$$\text{BCI} = D_s / D_o$$

- BCI 지수가 낮을수록 혈액 응고 능력이 높은 것을 나타냄. BCI 확인 결과, 콜라겐/실크 지지체에서 낮은 수치(0.03 ± 0.003)를 나타냈음. 콜라겐, 실크 단독 지지체보다 혼합된 지지체에서 높은 혈액 응고 능력을 보였으며, 실크 첨가 유무가 혈액 응고 능력에 영향을 미치는 것으로 보여짐
- Avitene과 콜라겐/실크 혼합 지지체의 혈액 응고 능력을 시간별로 관찰하여 비교한 결과, 콜라겐/실크 지지체에서의 혈액 응고 능력이 월등히 뛰어남을 확인(그림 35)

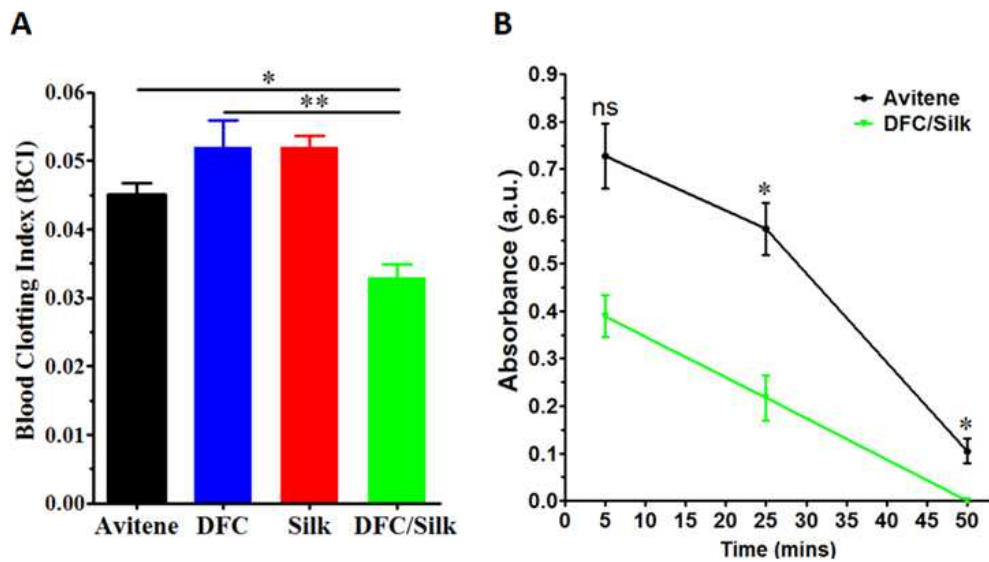


그림 35. 오리발 유래 콜라겐 지혈제의 혈액 응고 실험
(A) 각 지지체의 BCI 지수, (B) whole blood clotting kinetics

다. *In Vivo* 평가

지혈 실험은 체중 250 ~ 300 g의 수컷 Sprague-Dawley 중 백서를 실험동물로 사용함. 동물실은 25 ± 1°C의 온도로 조절하고, 명암은 주야 12 시간 자동 조절함. 또한 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 함. 모든 실험동물은 이소플로렌 호흡마취기를 이용하여 전신 마취시킨 후, 각각의 백서의 편측 서혜부를 절개하여 대퇴 정맥을 노출시킨 후 수술용 매스를 이용해 혈관을 절단하여 출혈을 유발함. 1 x 1 cm² 크기의 지혈제를 출혈부위에 덮고 5 N의 일정한 압력을 가하기 위해 인장 압축 시험기(Digital Push Pull Gauge, SUNDOO, China)를 이용하여 30 초간 눌러 지혈 효과를 관찰함(그림 36)

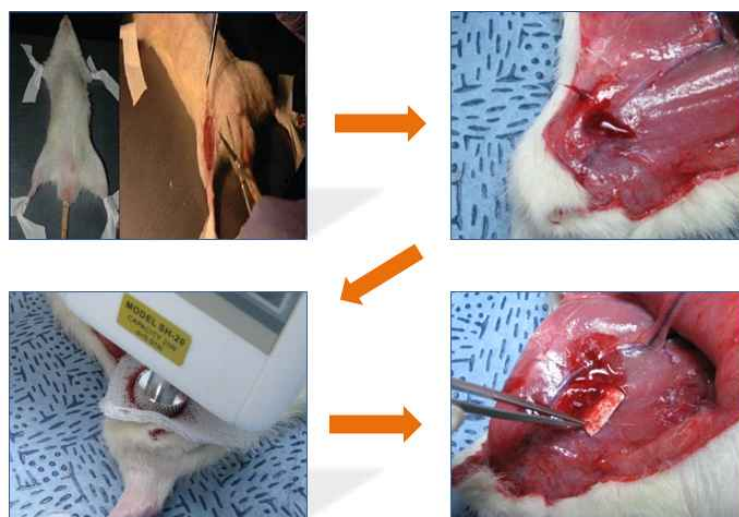


그림 36. 혈관 출혈 모델에서의 지혈 효과 테스트 방법

- Avitene의 경우 출혈이 완전히 멈추고, 출혈 부위에 혈흔이 남지 않음을 확인하였으나, 콜라겐, 실크 피브로인 지지체에서는 출혈이 완전히 멈추지 않고 혈흔이 남아 있음을 확인함
- 콜라겐/실크 지지체의 경우, 출혈이 멈추었을 뿐 아니라 출혈부위도 깨끗하였음. 이는 앞선 혈액 응고 능력 확인 실험과 동일한 결과임. 콜라겐 지지체에 실크를 첨가하면 지혈효과를 증대시키는 것을 확인함(그림 37)

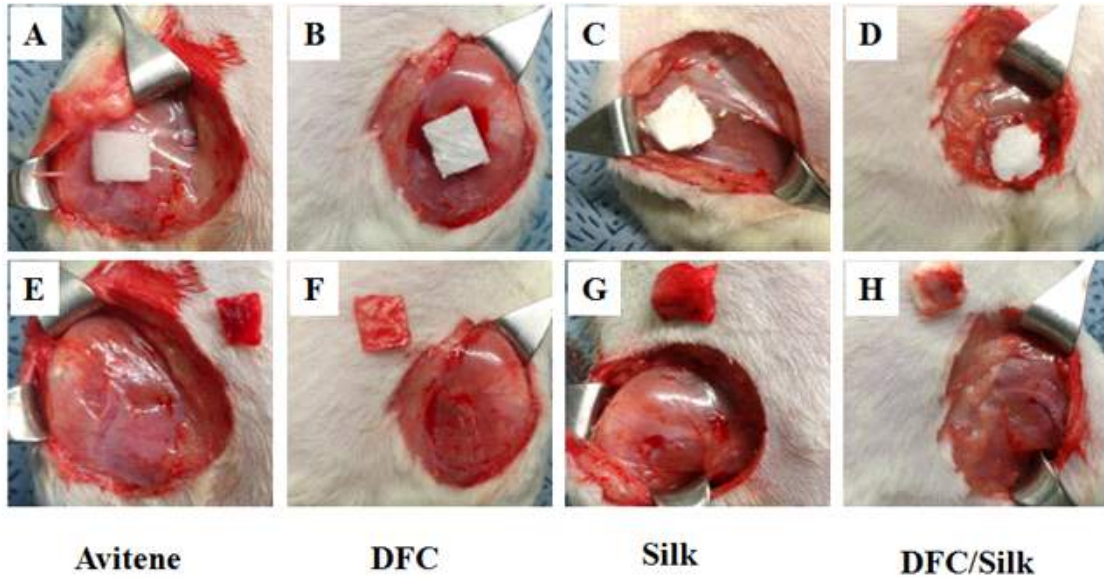


그림 37. 오리발 유래 콜라겐 지혈제의 동물 모델에서의 지혈 효과 확인

- 오리발 콜라겐 지지체는 상품화된 콜라겐 지지체와 비교해볼 때 유사한 세포 친화력 및 물성을 확인함. 실크를 첨가하였을 경우 혈액 응고 능력 및 지혈효과가 증가하는 것으로 나타남. 이러한 오리발 유래 콜라겐 지지체를 이용하여 지혈제용으로 개발 가능성이 높을 것으로 판단됨

6. 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 평가 및 효능 평가

(1) 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 제작

- 오리발 유래 콜라겐을 이용한 창상피복재용 시제품을 제작하여 시제품의 물성 분석, 세포 독성 평가(*in vitro*) 및 동물 모델을 이용한 비임상 시험(*in vivo*)을 수행함
- (주)세원셀론텍에서 생산한 오리발 유래 콜라겐을 이용하여 지지체를 제작함
- 오리발 유래 콜라겐을 0.1 M HCl에 3%의 농도로 용해한 용액 40 ml를 petri dish에 넣은 후 -80°C 에서 24시간 동안 동결함. 완전히 동결된 지지체를 24시간 동안 동결건조하여 지지체 내의 수분을 제거함. 오리발 콜라겐 지지체를 가교하기 위해 0.25% glutaraldehyde (95% 에탄올에 희석된)에 침지시켜 실온에서 24시간 동안 반응시킴. 증류수로 3회 세척 후 0.1 M Glycine에 24시간 침지 후에 증류수로 3회 세척 후 동결 건조하여 지지체를 제조함

- 창상피복재용 오리발 유래 콜라겐 지지체의 구조를 비교 확인하기 위해 기존 콜라겐 지지체 제품인 콜라덤의 단면을 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰함
- 지지체는 입체적으로 상호 연결된 공극 구조를 갖고 있는 것으로 관찰됨(그림 38)
- 이는 창상피복재로서 창상의 삼출물 흡수 및 습윤환경 유지가 용이함. 오리발 유래 콜라겐 지지체는 비교적 더 균일한 형태의 공극과 격벽을 갖고 있는 것으로 관찰됨

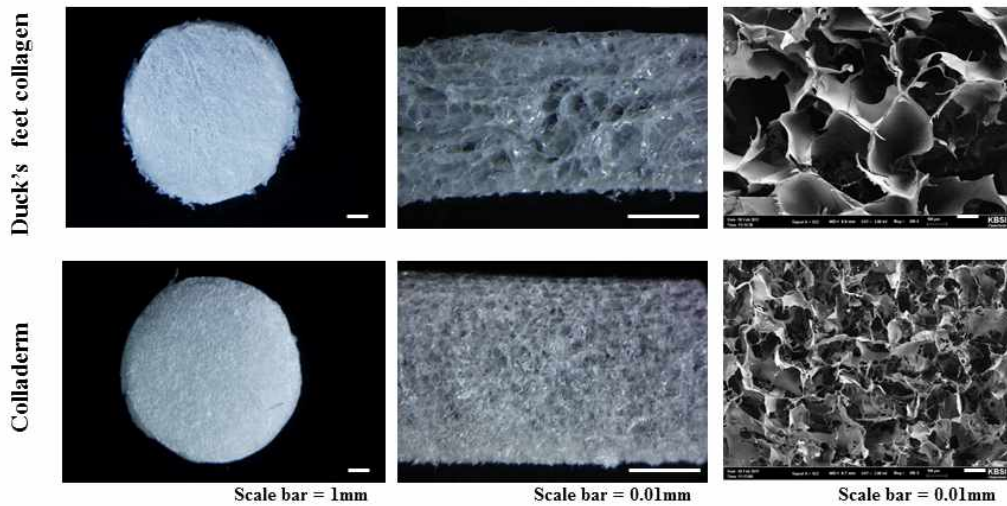


그림 38. 콜라덤(Colladerm)과 오리발 유래 콜라겐 지지체의 SEM 관찰 이미지

(2) 시제품의 성능 평가(*in vitro*)

(가) 공극률

- 지지체의 공극률은 액체 치환법(liquid displacement process)을 이용하여 측정함. 일정 부피의 증류수(V_1)에 지지체를 10 분 동안 침지한 후 지혈체가 침지된 증류수의 부피를 확인함(V_2). 침지되어있던 지지체를 제거한 후 남은 증류수의 부피를 측정함(V_3). 이때 공극률은 아래 식으로 계산하여 측정함

$$P (\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100$$

(나) 팽윤도 및 물 흡수도

- 각 지지체의 팽윤도 및 물 흡수도를 확인하기 위하여 건조상태의 지지체 무게를 측정 후(W_d), 지지체를 증류수에 3 시간 동안 침지시킴. 충분히 침지된 지지체 표면의 증류수를 제거한 후 무게를 측정하였음(W_s). 이때 팽윤도와 물 흡수도는 아래 식으로 계산하여 측정함

$$\text{Swelling ratio} = (W_s - W_d) / W_d$$

$$\text{Water uptake} (\%) = (W_s - W_d) / W_s \times 100$$

(다) 인장강도

- 지지체의 강도를 알아보기 위해 범용 테스트 기계(QM100S, Qmesys, Korea)를 이용하여 인장 강도를 측정함. 각 조성마다 5개의 시편을 준비하였고, 시료의 크기는 $20 \times 25 \text{ mm}^2$ 로 하였음. 인장강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 10 mm/min 로 수행하였음
- 콜라덤과 오리발 유래 콜라겐 지지체의 공극률은 각각 57%, 64%, 팽윤도는 24, 29

로 콜라덤이 약간 높은 것으로 나타났지만, 물흡수도(96%)의 경우 거의 같은 값을 나타냈음. 인장강도는 오리발 유래 콜라겐 지지체가 높은 것을 확인하였음(그림 39)

- 위와 같은 물성 분석 결과로부터 오리발 유래 콜라겐 지지체의 창상피복재용으로써 사용가능한 물성을 가지고 있음을 확인함

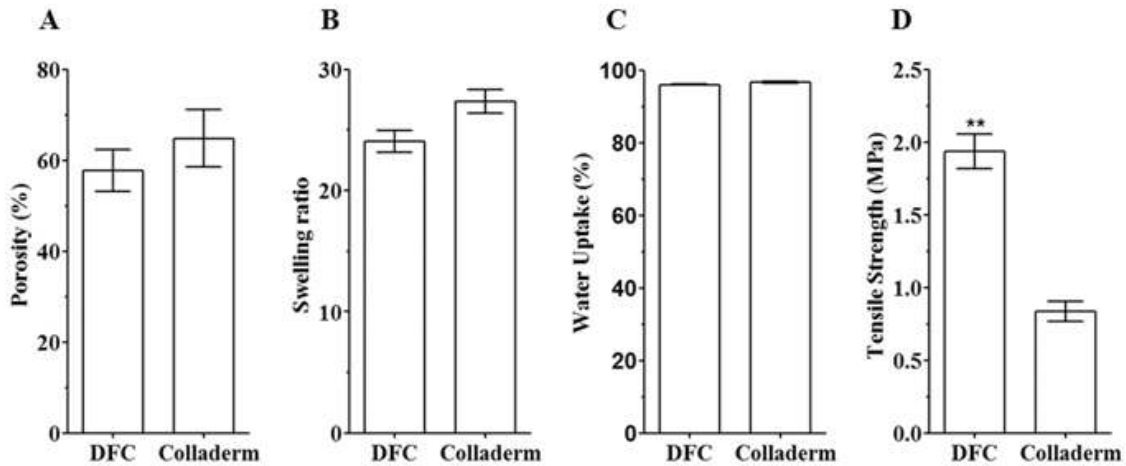


그림 39. 콜라덤(Colladerm)과 오리발 유래 콜라겐 지지체의 물성 관찰 결과

(A) 공극률, (B) 팽윤도, (C) 물흡수도, (D) 인장강도

(라) 분해도

- 지지체가 생체 내에서 체액과 반응하여 분해되는 속도와 구조 변화 등을 관찰하기 위해 *in vitro* 상에서 분해도 실험을 실시하여 육안으로 관찰함. 1 x 1 cm² 크기의 시제품을 PBS에 침지하여 상온에서 0 시간, 3 시간, 24 시간 후 각 지지체의 크기와 생리식염수의 혼탁 정도를 통하여 분해되는 정도를 관찰함
- 그 결과 두 지지체에서 24시간 내 PBS 용액 내에서의 분해 현상은 나타나지 않았음(그림 40)

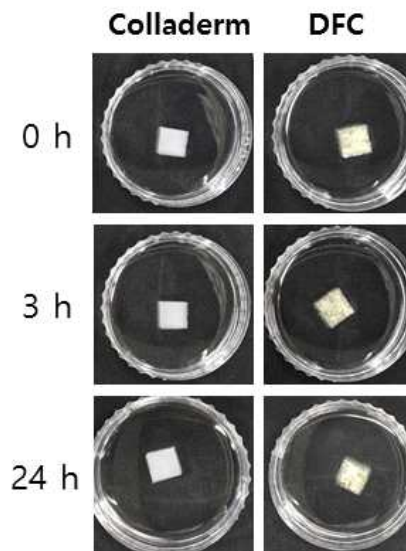


그림 40. PBS 용액에서의 분해도 현상 결과

(마) 용출물 세포독성실험

- 지지체를 직경 8 mm의 원형으로 규격화 한 다음 NIH 3T3 세포를 1개의 well 당 2×10^4 개의 밀도로 접종함. 시제품을 Transwell culture system의 바닥부분에 위치시킴. 그 후 transwell culture system을 세포 배양 배지에 옮긴 후 1, 3, 5일간 배양함. 용출물의 세포 독성은 CCK-8 분석법을 이용하여 분석함
- 그 결과 기간에 따른 세포의 증식 증가를 확인함으로써 지지체의 세포 독성이 없음을 확인함(그림 41)

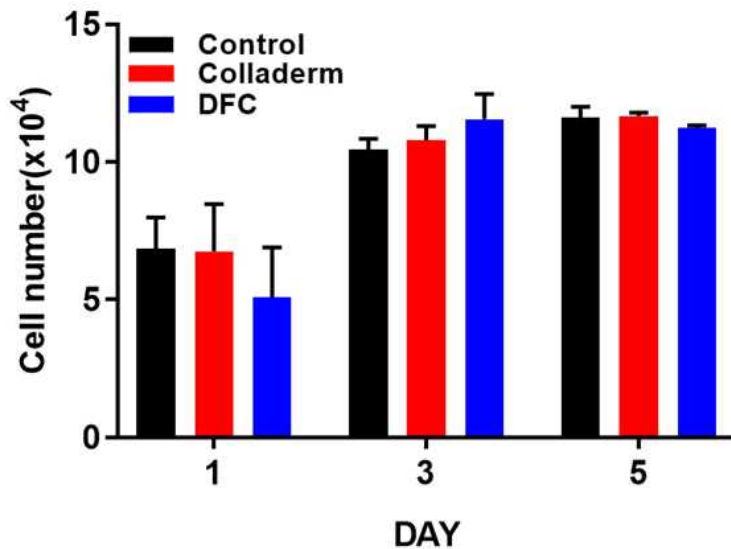


그림 41. 오리발 유래 콜라겐 지지체의 CCK-8 분석 결과

(3) 비임상 시험(동물 모델)을 통한 시제품의 효능 평가(*In vivo*)

- 모든 실험군은 아이소플로렌 호흡마취기를 이용하여 전신 마취시킨 후 전기 제모기로 쥐의 등 부위 털을 제거함. 실험동물은 SD-Rat을 사용하였으며, 마취 후 베타딘으로 소독된 부위에 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 창상을 유발함. 창상이 유발된 부위에 지지체를 삽입함. 삽입된 지지체가 고정될 수 있도록 silicon dressing제를 사용하여 suture 해준 뒤 3, 5, 7, 14, 21일간 관찰함
- 피부 결손 부위를 기간별로 관찰하여 치유 면적을 측정함
- 14일차까지 콜라덤 처리군이 다른 군보다 빠르게 창상 면적이 줄어드는 것으로 관찰되나, 피부 수축현상이 보임. 오리발 유래 콜라겐 처리군은 콜라덤보다 치유 속도는 조금 느리지만 피부 수축 현상 없이 재생된 피부가 창상 부위를 덮는 것을 관찰함
- 21일차에서는 콜라덤과 오리발 유래 콜라겐의 창상 면적이 대조군보다 줄어드는 것으로 관찰되었으며, 오리발 유래 콜라겐에서 보다 정상적인 피부 조직 형태를 보임. 창상 초기에는 오리발 유래 콜라겐 지지체 처리군이 다른 군에 비해 비교적 낮은 치유 능력을 가졌지만, 치유 후기로 갈수록 콜라덤에 비해 비교적 피부 수축 없이 빠르게 치유되는 것을 확인할 수 있었음(그림 42)

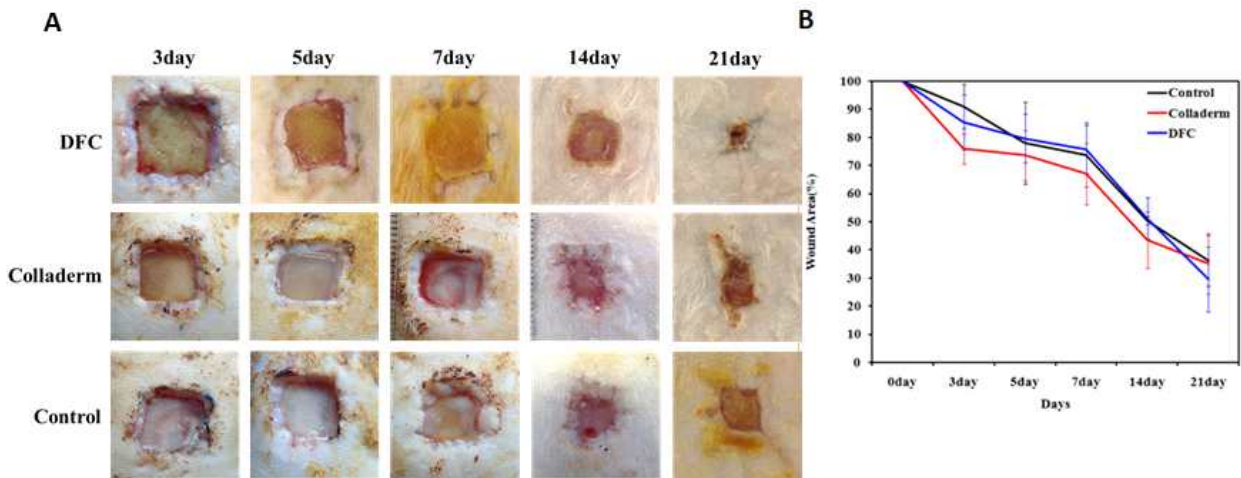


그림 42. 피부 결손 모델에서 오리발 유래 콜라겐 지지체의 진피 재생 능력 관찰
(A) 육안적 관찰, (B) 면적 측정

- Rat 피부 결손 모델 조직을 H&E 염색으로 관찰함. 3, 5, 7, 14, 21일째 피부 조직을 H&E로 염색한 결과에서 오리발 유래 콜라겐 지지체군(DFC)과 콜라덤군에서 치유된 조직이 대체로 원래 피부층 만큼의 두께를 갖는 것을 확인할 수 있음
- 조직학적 소견상 DFC 군에서 대조군에 비해 빠른 창상 치유 효과를 보이거나 콜라덤과는 유사한 결과를 보임(x10배). 7일째 DFC 처리군은 주변조직으로부터의 세포가 지지체 내로 침투하는 것이 관찰되는 반면 콜라덤 지지체에서는 확인되지 않음. 14일째 창상 변연부와 이식편 사이 주변 조직과의 재생과정에서 DFC 군에서 콜라덤 군보다 다수의 미세 혈관이 이식편 내로 자라 들어가는 것을 확인할 수 있었음. 21일째 창상 소견상, DFC 군에서 재생된 상피 및 진피의 수축 및 구축 현상 없이, 비교적 정상조직과 유사하게 재생이 이루어진 소견을 보임. 이는 창상 치유 기간 동안 DFC 지지체가 적절히 구조를 유지하여 분해 현상으로 인한 피부 수축이나 흉터 형성을 줄인 것으로 판단됨(그림 43)

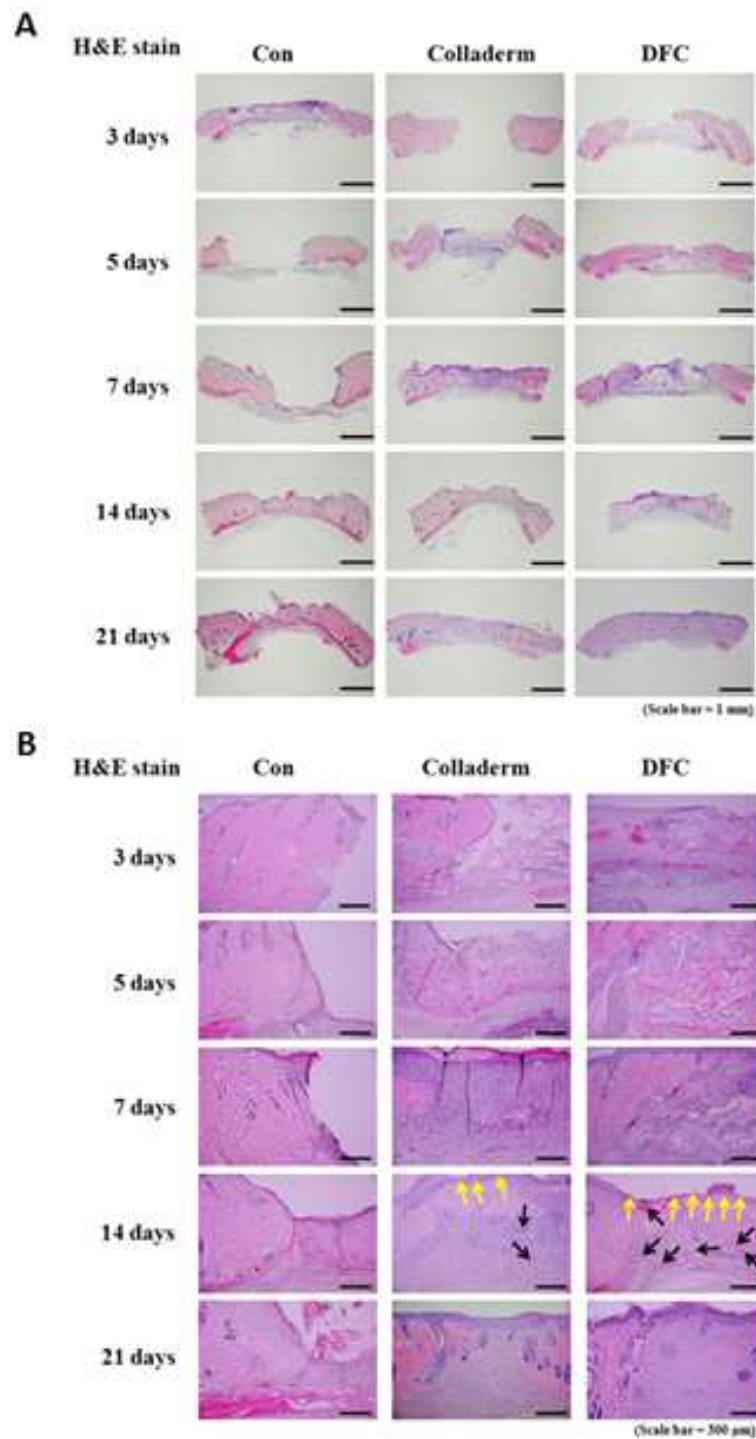


그림 43. Rat 피부 결손 모델에서 H&E 조직학적 염색 관찰 결과

(A) x10, (B) x20 (yellow arrow: 재생된 피부층, black arrow: 혈관 구조)

- Rat 피부 결손 모델 조직을 Masson's Trichrome 염색으로 관찰함
- 3, 5, 7, 14, 21일째 피부 창상 조직을 MT로 염색한 결과, 7일차에 오리발 유래 콜라겐 지지체 처리군(DFC)에서 콜라겐 침착이 관찰되었으며, 14일과 21일차에는 콜라덴과 DFC 처리군에서 콜라겐 침착이 관찰되었음. DFC의 경우 전체적으로 창상 치유

가 완전히 진행된 21일째 상태에서 콜라겐 침착 소견이 확인된 것을 통해 일정한 배열로 재생되고 있음을 확인하였음. 이는 창상이 재생된 상태에서 흉터를 적게 만드는 소견을 보임(그림 44)

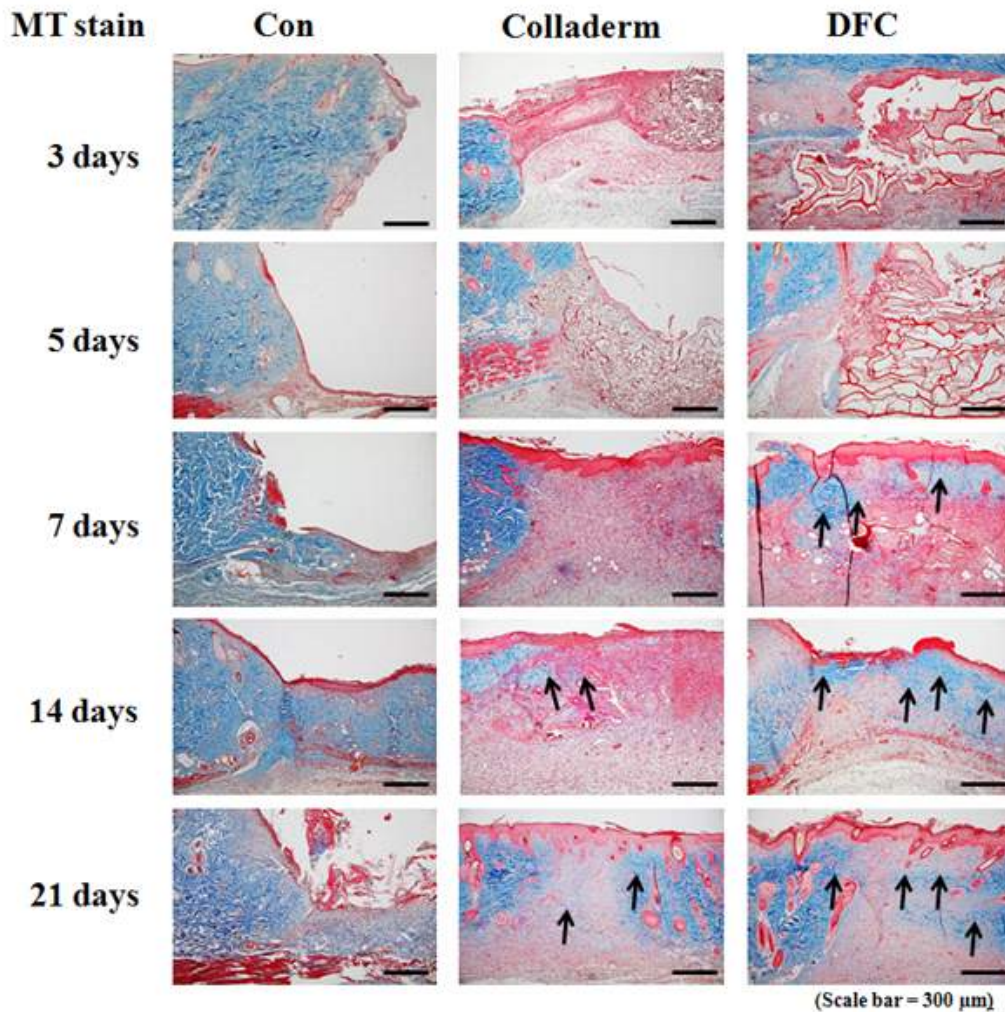


그림 44. Rat 피부 결손 모델에서 Masson' s Trichrome(MT) 조직학적 염색 관찰 결과 (대조군: Con, 콜라덤(Colladerm), 오리발 유래 콜라겐 지지체: DFC), (black arrow: 콜라겐)

- 오리발 콜라겐 지지체와 상품화된 돼지 콜라겐(콜라덤)의 물성 및 생체적합성 시험 결과를 비교했을 시 거의 유사한 결과를 보였음. 동물 모델에서의 창상 치유 효과는 시제품에 의한 치유 효과가 더 좋은 것으로 확인됨. 이러한 오리발 콜라겐 지지체를 이용하여 창상피복재용으로 상용화가 가능할 것으로 판단됨

1. 오리발에서 추출한 콜라겐과 PLGA를 혼합한 지지체에서 골 분화능 평가

가. 80 wt.% DC/PLGA 지지체 제작

- 지지체의 기계적 강도 보완 및 골 재생 능력 향상을 위해 오리발콜라겐(DC), PLGA로 구성된 지지체를 제조함
- PLGA 1 g을 기준으로 methyl chloride (MC) 4 mL에 NaCl (250 ~ 355 μm) 9 g, 그리고 DC 0.8 g을 혼합 후, silicon molds (지름 3 mm, 높이 3 mm)에 채워줌
- Mold에 채워진 지지체를 Carver Press (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 사용하여 48시간동안 상온에서 60 kgf/cm²의 힘으로 압력을 가함
- 완성된 지지체에 남은 용매 및 NaCl을 제거하기 위해 증류수에 2일간 침지함
- 6시간 간격으로 증류수를 교체하며, 제조된 지지체를 -80°C에서 동결 및 동결 건조하여 지지체를 제조 후 상온에서 보관함(그림 1)

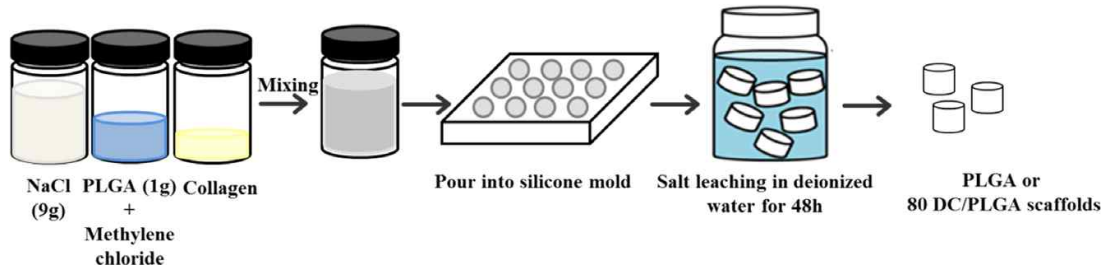


그림 1. PLGA와 80 wt.% DC/PLGA지지체 제조 그림

나. *In vivo*에서 지지체의 골 재생 효과 확인

- 본 연구에서 제작된 80 wt.% DC/PLGA 지지체의 골재생 효과를 확인하기 위해, rat calvaria defect 동물 모델에서의 골 재생 효과를 확인함
- 실험 동물은 SD-Rat 쥐를 사용하였으며, 마취 후 두개골에 지름 4 mm의 원형의 결손부를 제거함(그림 2)

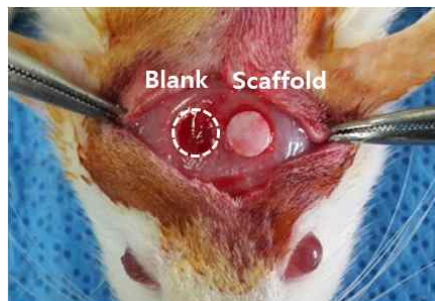


그림 2. 랫 두개골 결손모델에 지지체 이식모습

- 제거된 부위에 PLGA, 80 wt.% DC/PLGA, PLGA+BMSC, 80 wt.% DC/PLGA+BMSC (지름 4 mm, 높이 0.5 mm) 지지체를 삽입 하고 피부조직을 봉합 하였음
- 이 후 8주간 사육하여 2, 4, 8 주차 마다 Micro-CT를 촬영함
- Micro-CT 2차원 사진의 결과를 통해 제작된 지지체 주변의 골재생을 관찰하였으며, PLGA 지지체와 DC/PLGA 지지체를 비교하였을 때 DC/PLGA 지지체의 골 재생능이 훨씬 뛰어난 것을 관찰하였음
- 지지체에 BMSC를 파종한 군과 파종하지 않은 군을 비교하였을 때, BMSC를 파종한 지지체군이 지지체만 이식한 군보다 골 재생능이 훨씬 뛰어난 것을 관찰하였음. 이는 BMSC 자체가 골재생에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있음(그림 3)

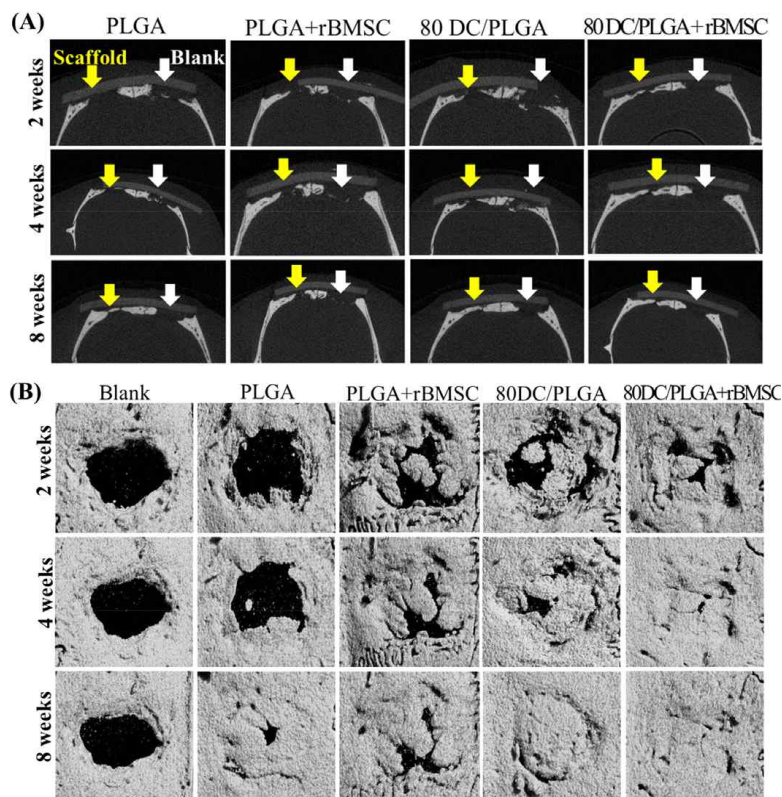


그림 3. Micro-CT의 (A) 단면 및 (B) 3D 이미지

- Micro-CT 결과를 토대로 BMD(bone mineral density), BV (bone volume), percent bone volume 값을 측정함
- BMD 값에서 PLGA 지지체에 비해 PLGA/DC 지지체가 더 높은 BMD 값을 나타냄
- 또한 BMSC를 파종하였을 때도 PLGA/DC 지지체가 높은 값을 나타냈으며 8주차로 갈수록 그 값은 증가하는 것을 보임. 따라서 골 내 미네랄양이 증가하는 것을 확인함
- BV와 percent bone volume 그래프 값 또한 BMD와 유사한 형태를 나타냄. 따라서 BMSC를 파종한 PLGA/DC 지지체가 가장 높은 골 재생도를 나타내었음(그림 4)
- 결과적으로 본 연구에서 제작된 DC/PLGA 지지체는 추가 연구와 개선사항을 종합하여 볼 때 앞으로 조직 재생용 지지체뿐만 아니라 정형외과적 조직 재생 유도제 및 골 이식재 등으로 활용 될 수 있을 것으로 판단됨

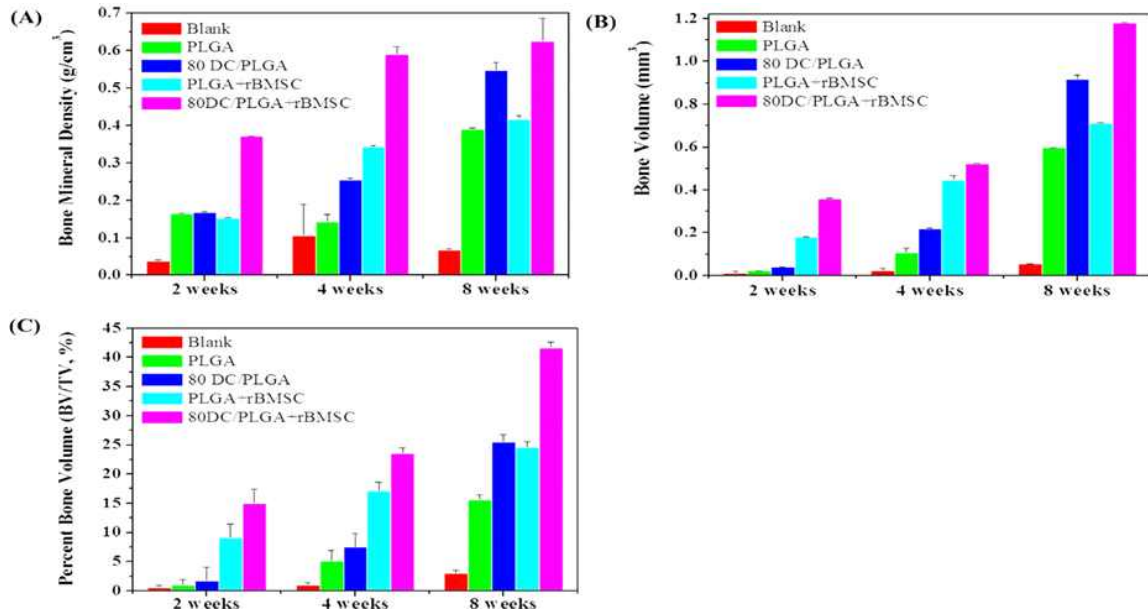


그림 4. micro-CT 분석

(A) bone mineral density, (B) bone volume, (C) percent bone volume

2. 오리발 콜라겐을 이용하여 골모세포의 증식 적합성 평가

가. Cell Proliferation assay

- MTT assay를 진행하여 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 그리고 144 h에서의 세포 증식을 비교하였음
- Duck collagen 0.1 ~ 0.5 wt.%를 제조하여 plate well에 도말 후 세포를 접종시켜 24 h 간격으로 144 h까지 오리발 콜라겐의 세포증식 검사 결과 0.1 wt.%에서 0.3 wt.%까지 접종한 세포들의 증식율이 증가하였으며, 0.4 wt.%, 0.5 wt.%에서는 세포의 증식율이 감소함(그림 5)

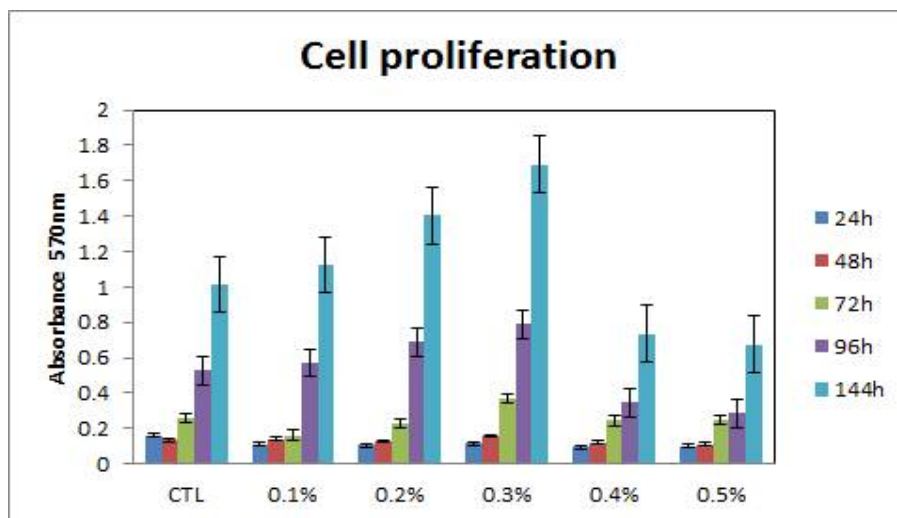


그림 5. 오리발 콜라겐의 세포 증식율 시험 결과

나. ALP activity assay

- ALP activity assay를 진행하여 3 day, 7 day, 14 day의 결과를 확인함
- 조건 별로 0.1 wt.% ~ 0.3 wt.%까지는 3, 7, 14 day에서 꾸준히 증가하는 양상을 보였으나 0.4 wt.%, 0.5 wt.% 콜라겐 지지체에서는 ALP activity가 control 보다 감소하는 경향을 나타냄(그림 6)

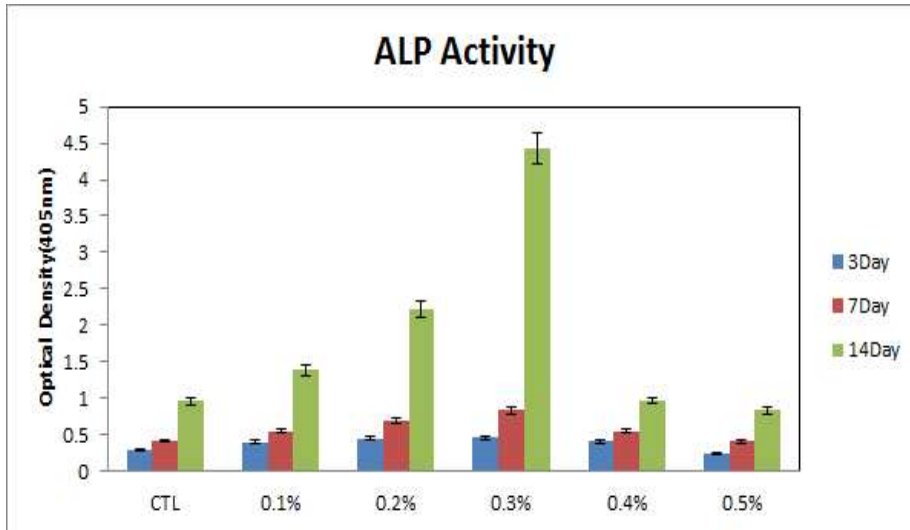


그림 6. 오리발 콜라겐 지지체에서 골모세포의 ALP activity 분석 결과

다. Migration assay

- Migration assay에서는 plate low chamber 아래 바닥에 오리발 콜라겐을 도말 후 세포주를 upper chamber에 접종 시켜 세포가 콜라겐으로 얼마만큼의 이동이 일어나는지 확인함
- 세포 접종 24 h 후에 실험을 진행한 결과 control에서 0.1, 0.2, 0.3 wt.%으로 갈수록 이동하는 세포가 증가하는 결과를 보였으며 0.4, 0.5 wt.%의 콜라겐이 도말된 경우 세포 이동의 증가가 비교적 적음을 확인함(그림 7)

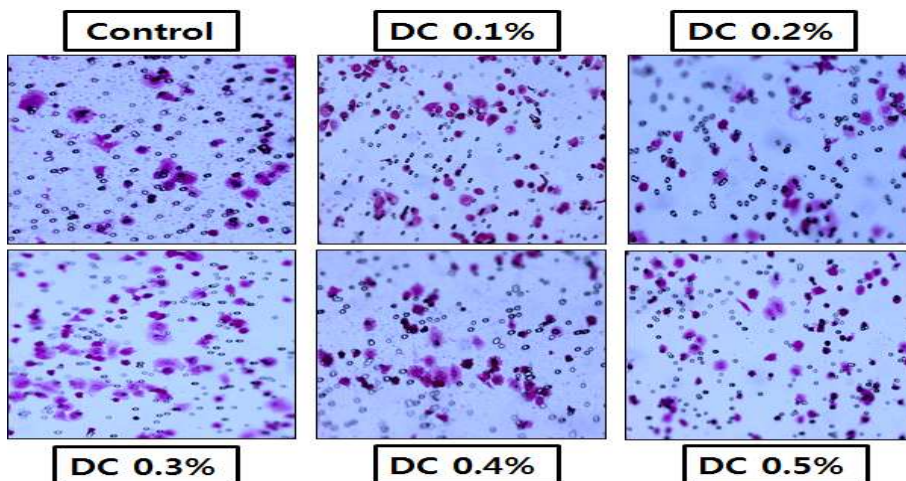


그림 7. 오리발 콜라겐 지지체에서 골모세포의 migration assay 결과

라. Cytoskeleton (Actin Filament)

- 오리발 콜라겐에 접종시킨 MC3TC-E1 cell의 세포골격을 확인하기 위해서 Rhodamine phalloidin을 세포에 염색하여 확인한 결과, actin 구조가 전체적으로 잘 발현되었음을 확인함(그림 8)

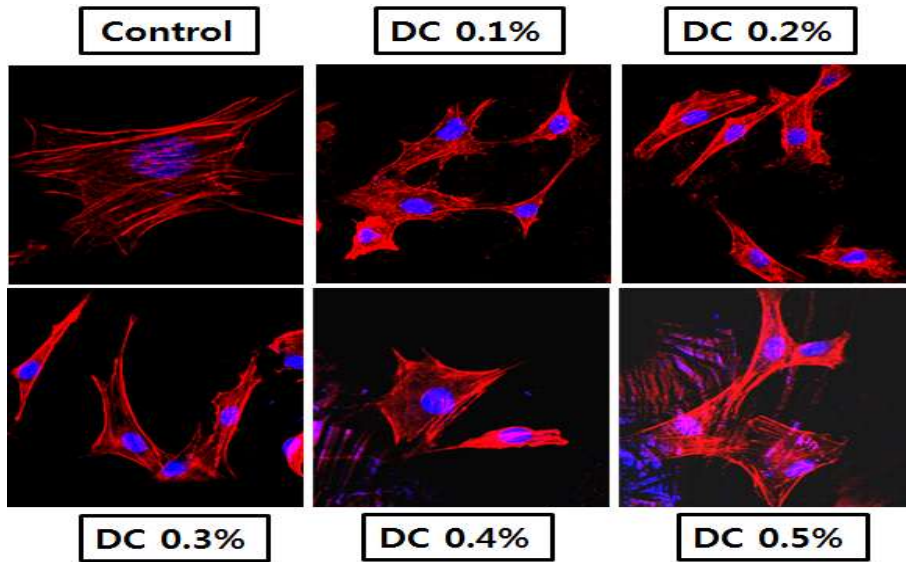


그림 8. 오리발 콜라겐 지지체에서 배양한 골모세포의 Cytoskeleton 확인 결과

마. Real Time PCR

- Osteoblast Maker의 발현을 확인하기 위해서 collagen type I, Osteopontin, Osteocalcin의 발현을 시험한 결과, control군보다 0.1 ~ 0.3 wt.%의 콜라겐 지지체에서 배양한 세포에서 발현이 증가하는 양상을 보였으며, 0.4 wt.%, 0.5 wt.%의 콜라겐 지지체에서 배양한 세포에서는 오히려 감소하는 경향을 보임(그림 9)
- 따라서 세포의 부착 및 증식 정도는 0.1 ~ 0.3 wt.%의 콜라겐 지지체에서 적합하였음

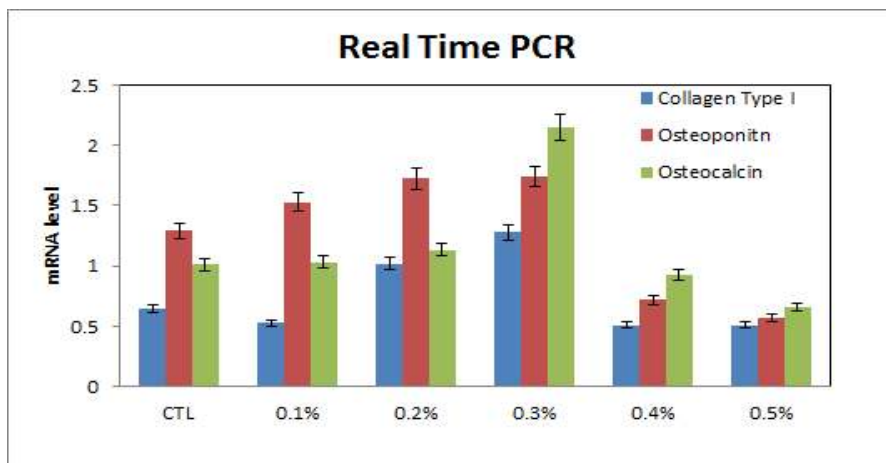


그림 9. 오리발 콜라겐에서 배양한 골모세포의 Osteoblast Maker의 발현 결과

3. 오리발 콜라겐 지지체에서 골모세포 증식 적합성 평가

가. Cell Proliferation and Alkaline phosphotase activity

- MTT assay를 진행하여 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 그리고 144 h에서의 세포 증식을 비교하였음
- Duck collagen (2 wt.%)를 제조하여 plate well에 도말 후 세포를 접종시켜 24 h 간격으로 144 h까지 오리발 콜라겐 지지체에서 세포증식 검사 결과, 대조군에 비해 접종한 세포의 증식율이 증가하였음(그림 10. 좌)
- ALP activity assay를 진행하여 7 day, 10 day, 14 day의 결과를 확인함
- Duck collagen (2 wt.%)를 제조하여 plate well에 도말 후 세포를 접종시킨 결과 7, 10, 14 day에서 꾸준히 증가하는 양상을 확인함(그림 10. 우)

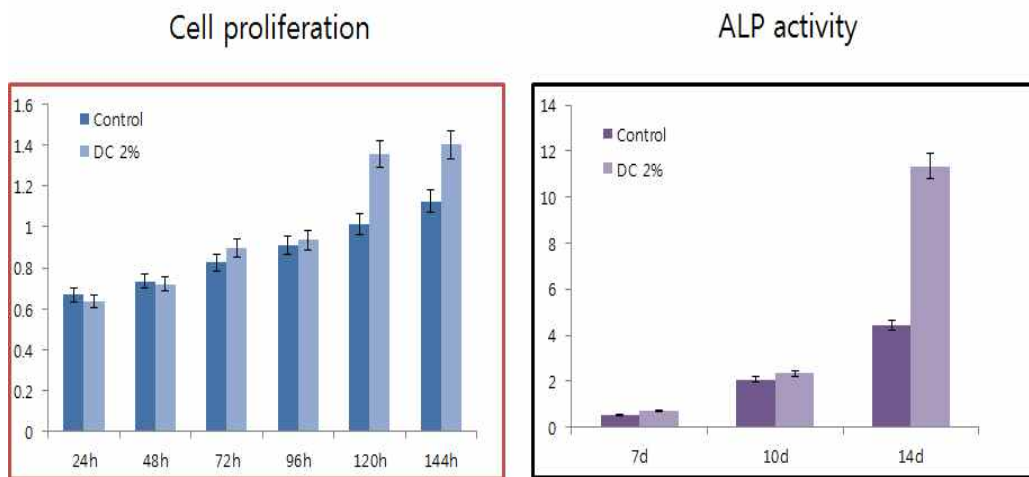


그림 10. 오리발 콜라겐 지지체에서 골모세포의 Cell Proliferation(좌)와 Alkaline phosphotase activity(우)

나. Real Time PCR and Cell double stain

- 오리발 콜라겐 지지체에서 7일간 배양한 세포는 RNA level에서 대조군 대비 ALP, Collagen type I, Runx 2 gene의 발현이 증가하는 것을 확인하였음(그림 11, 좌)
- Cell double stain 결과 control 대비 살아있는 세포가 오리발 콜라겐 지지체에서 많음을 육안으로 확인하였음(그림 11, 우)

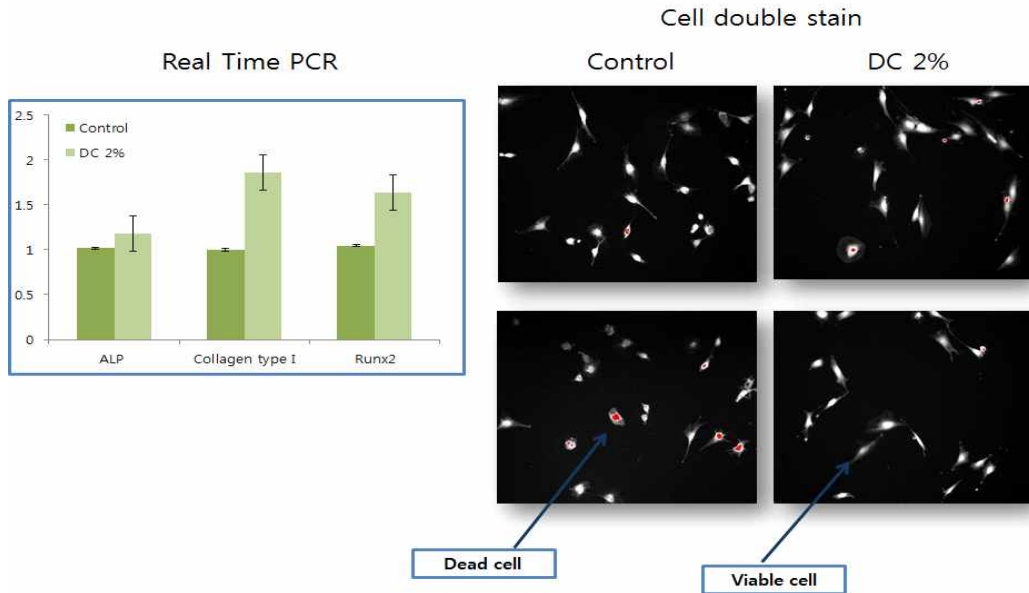


그림 11. 오리발 콜라겐 지지체에서 배양한 골모세포의 Real Time PCR (좌) 및 Cell double stain (우) 결과

다. Migration assay

- Migration assay에서는 Plate low chamber 아래 바닥에 오리발 콜라겐으로 도말한 후 세포주를 upper chamber에 접종 시켜 세포가 콜라겐으로 얼마나 이동하는지 확인 하였음
- 세포 접종 6 h, 24 h 후에 실험을 진행한 결과 control 보다 2 wt.% 오리발 콜라겐에서 이동하는 세포가 증가하였음(그림 12)

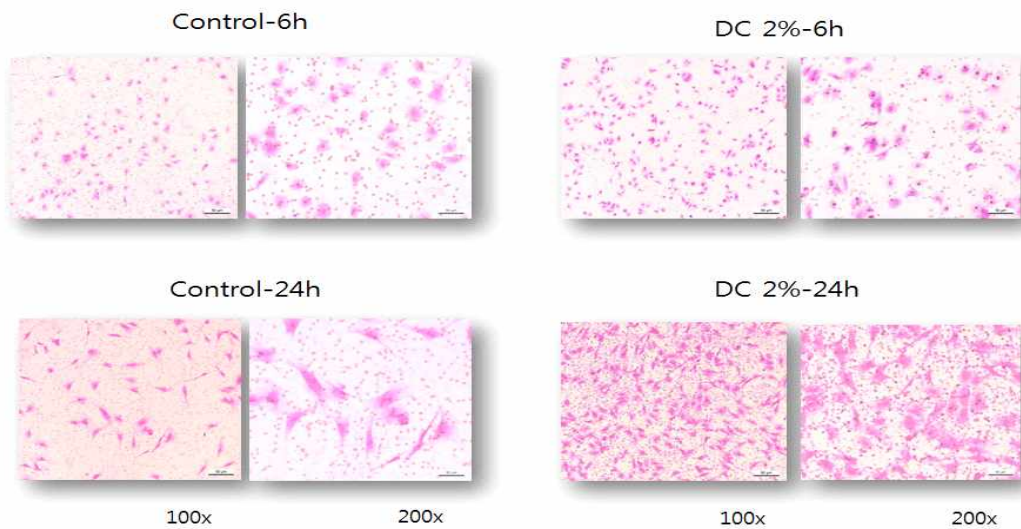


그림 12. 오리발 콜라겐 지지체(2 wt.%)에서 골모세포의 migration assay 결과

제4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
○ 최종 성과목표 대비 달성도			
구분	평가의 착안점 및 기준	가중치(%)	달성도(%)
1차년도 (2014)	오리 유래 콜라겐을 이용한 천연/HAp 생체소재원천기술 개발	20	100
	뼈재생 유도를 위한 최적 환경 조건 확립	20	100
	오리발 유래 콜라겐을 이용한 고막 재생용 지지체	20	100
	오리발 콜라겐 분리 방법 위한 프로토콜 정립 여부	20	100
	분리 단계에서 콜라겐의 특성 분석 시험방법 정립 여부	20	100
2차년도 (2015)	뼈재생용 콜라겐/HAp지지체의 생체적합성 평가 및 효능평가	30	100
	오리발 유래 콜라겐 연부 조직 대체재 개발	30	100
	분리된 콜라겐의 정립된 시험기준 만족 여부	10	100
	콜라겐 분리 생산 설비 구축 및 적격성 진행 여부	10	100
	콜라겐/HAp 지지체의 생물학적 적합성 확립	20	100
3차년도 (2016)	뼈대체재 실험을 위한 동물 모델 확립	20	100
	오리발 유래 콜라겐 생체 재료 시제품 개발	30	100
	콜라겐 원료화 여부	30	100
	뼈재생용 콜라겐/HAp 지지체의 시제품 제조	30	100

○ 연차별 성과목표 대비 달성도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차년도 (2014)	1세부(세원셀론텍) 오리발 유래 고순 도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용 한 의료용 원료 개 발	오리발 콜라겐 분리 공정 정립	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 분리 최적 조건 확립 • 콜라겐 시험 기준 마련 	100
		Pilot-scale 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 생산수준 규모 확대 위한 기준 설정 • 생산 수율 검증 	100
	1협동(전북대학교) 오리발 유래 콜라 겐 바이오오피와 근 골격계용 의료용 생체 재료 개발	오리발 유래 콜라겐을 이용한 천연 /HAp 생체소재원천기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 콜라겐/HAp 하이브리드 지지체를 제 작하여 최적 조건 확립 • 콜라겐 함량 및 다공조건 확립 	100
		뼈재생 유도를 위한 최적 환경 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 최적 재생 구조 개발 • 콜라겐/HAp 하이브리드 지지체의 최 적화 	100
	2협동(한림대학교) 오리발 유래 콜라 겐을 이용한 이비 인후과용 의료용 생체 재료 개발	오리발 유래 콜라겐을 이용한 고 막 재생용 지지체 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 필름 형태의 지지체를 이용한 생물학적 안전성 실험 • 동물 모델을 이용한 <i>in vivo</i> test 	100
2차년도 (2015)	1세부(세원셀론텍) 오리발 유래 고순 도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용 한 의료용 원료 개 발	1) 오리발 콜라겐 분리 공정 개선 및 pilot scale 설비 구축	<ul style="list-style-type: none"> • 공정 개선 및 특허 출원 • Pilot scale 설비 구축 완료 	100
		2) 오리발 유래 콜라겐의 생물학적, 물리화학적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 특성 분석 • 조류 바이러스 불활화 시험 완료 • 돼지 콜라겐과 비교 분석 	
	3) PCPC 및 DMF 자료 구성	<ul style="list-style-type: none"> • 국제화장품 원료집 등재 • DMF 등록 기초 자료 확립 		
2협동(전북대학교) 오리발 유래 콜라 겐 바이오오피와 근 골격계용 의료용 생체 재료 개발	뼈재생용 콜라겐/HAp지지체의 생체 적합성 평가 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> • 1세부에서 확보한 오리발 콜라겐을 이용하여 콜라겐/HAp 지지체 제작 • 지지체에서 BMSC 세포의 형태학적 분석(MTT, SEM 분석) • <i>In vitro, vivo</i>를 통한 조직학적 분석(H&E, MT Staining), 염증반응 평가 	100	
		2협동(한림대학교) 오리발 유래 콜라 겐을 이용한 이비 인후과용 의료용 생체 재료 개발	오리발 유래 콜라겐 연부 조직 대체 재개발	<ul style="list-style-type: none"> • 스펀지 형태의 지지체를 이용한 생물 학적 안전성 실험 • 동물 모델을 이용한 <i>in vivo</i> test
3차년도 (2016)	1세부(세원셀론텍) 오리발 유래 고순 도 콜라겐의 대량 생산 및 이를 이용 한 의료용 원료 개 발	오리발 콜라겐의 원료화	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 콜라겐 대량 생산 체계 구축 및 밸리데이션 • 콜라겐의 원료 기준 정립 • 오리발 콜라겐 의약품 원료 등재 • 화장품 원료 사업화 	100

1협동(전북대학교) 오리발 유래 콜라겐 바이오뼈와 근골격계용 의료용 생체 재료 개발	1) 뼈대체제 실험을 위한 동물 모델 확립 2) 뼈재생용 콜라겐/HAp 지지체의 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> • 뼈대체제 실험을 위한 동물 실험 모델 확립 • 재현성있는 지지체 제조 기술 확립 및 시제품 제조 • 전임상시험을 위한 뼈대체제 모형개발 • 시제품의 성능 평가 	100
2협동(한림대학교) 오리발 유래 콜라겐을 이용한 이비인후과용 의료용 생체 재료 개발	1) 오리발 유래 콜라겐을 이용한 지혈제 개발 2) 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 생체적합성 평가 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 오리발 유래 콜라겐 지혈제 제작 • <i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> 평가 • 오리발 유래 콜라겐 생체 재료 제작 • 시제품의 성능평가(<i>in vitro</i>) • 비임상 시험(동물 모델)을 통한 시제품의 효능 평가 (<i>in vivo</i>) • 조직학적 검사 	100

4-2. 관련분야 기여도

○ 사회적 기여도

- 고령화로 인한 노인 인구가 급증하고 있으며, 노인층은 콜라겐의 신진대사가 둔해짐으로써 노화가 빨라지거나 질병 및 만성 질환의 회복이 느려지고 있음. 또한 골질환 및 이비인후과 질환 환자의 증가와 삶의 질 향상에 따른 콜라겐 충전제의 요구량은 증가 추세에 있음
- 본 연구에서 사용한 오리발 추출 콜라겐은 축산 폐기물의 활용 및 비용 절감 효과 그리고 환경 오염 감소 뿐 아니라 생체 재료로서의 우수성을 가지고 있음. 또한 돼지나 소 유래 콜라겐보다 값싼 가격으로 대량 생산이 가능한 장점들을 가지고 있음. 따라서 이를 활용한 인공뼈, 인공고막 및 동물 실험 대체제 등의 활용 연구는 재생 의학 측면에서 사회적 기여도가 높다고 할 수 있음

○ 기술적 기여도

- 손상된 고막, 연골, 골 조직 등에 응용될 수 있는 기반기술을 개발하여 조직공학적인 치료 효과를 가져 올 수 있는 원천기술을 확보함(관련 기술 특허 출원/등록 및 논문 발표 완료)
- 오리발 콜라겐의 상용화 생산기술을 선점하여 가격 경쟁력에 의한 국내외 의료용 고분자 소재 분야에서 국제 경쟁력을 향상함(국내 유일 오리발 콜라겐 생산 기술 및 설비 확보)
- 이렇게 개발된 지지체는 다른 세포와 결합시켜 여타 생명과학 분야에 응용할 수 있으며, 바이오 관련기업과 기술협약을 통해 좀 더 발전된 세포치료에 응용 가능함

○ 경제적 기여도

가. 농가 소득 경제 증가 기여도

- 국내 오리농가의 경제적 여건이 나빠짐에 따라 농가의 소득을 증가시키기 위하여, 폐기되는 오리발에서 콜라겐을 추출하고, 이를 연구용, 화장품 제조용 그리고 의료용 재료로 제작하여 고부가 가치를 창출할 수 있는 기술과 시설을 구축하였음

- 의료용 콜라겐이 1g당 40만원임을 가정하면 축산부산물인 오리발에서 966조원이라는 천문학적인 부가가치를 얻을 수 있으며, 의료용 생체 재료 및 제품을 제작, 판매하게 된다면 경제적 파급 효과는 기하급수적으로 증가 가능함. 과제 종료 후에도 지속적인 기술 개발을 통해 의료용 오리발 콜라겐을 상용화할 예정임

나. 국가 소득 경제 증가 기여도

① 종교적 신념의 제한이 없는 새로운 콜라겐

- 소/돼지 동물 유래의 원료나 제품은 종교적인 신념이나 관습 등으로 인해 기피하거나 수출이 불가능한 국가들이 있음
- 이슬람교 국가인 사우디아라비아의 경우는 기본 법률표준으로 EU 표준을 밀접하게 준용하고 있지만, 이슬람 법률을 준수함에 있어 EU 표준보다 상위개념으로 두어 법규를 운용하고 있음. 특히, 사우디아라비아 화장품 법규에는 이슬람법에 따라, 돼지 파생물의 사용에 대해 엄격히 금지된다고 구체적으로 명기되어 있음
- 동물 유래의 원료와 제품은 단일 원료로써 세계시장의 보편적 접근이 어려움이 있으며, 특히, 이슬람교와 힌두교 그리고 유대교는 돼지와 소 유래의 원료를 금기시하기 때문에 전세계의 약 40% 인구(약 27억)에 대한 시장 공략에 어려움이 있음
- 하지만 오리발 유래의 콜라겐은 종교적 신념으로부터 제한을 받지 않기 때문에 수출 제한 지역으로 판매하여 국가 경제 소득 증가에 이바지할 수 있음

② 안전성 문제가 개선된 콜라겐

- 지금까지 의료용 목적의 콜라겐은 주로 소나 돼지로부터 얻어져 왔지만, 광우병 발병 이후로 어류나 기타 가축에서 유래하는 콜라겐이 주목을 받아 화장품이나 건강식품의 원료로서 이용이 검토되고 있음. 이는 사람으로부터 진화적으로 멀리 떨어져 있는 하등척추동물인 어류나 기타 가축에서 사람과 공통되는 감염증이 비교적 발견되어 있지 않고, 소나 돼지의 콜라겐에 비하여 안전성이 높기 때문임
- 오리발로부터 추출한 콜라겐은 기존의 동물 유래 콜라겐보다 안전성 측면에서 뛰어나다는 평가를 받고 있기 때문에 기존의 콜라겐들이 갖는 문제점들을 개선할 수 있음. 결과적으로 세계적인 콜라겐 시장에서 주로 판매되고 있는 소, 돼지 유래 콜라겐을 오리발 콜라겐으로 대체함으로써 국가 경제 소득 증가에 이바지할 수 있음

제5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

○ 사업종료 후 기술개발의 발전 방향

가. 사업종료 후의 본 연구단의 운영계획

- 본 과제의 주목적인 세계 최초의 오리발 유래 생체 소재 개발을 위하여 각각의 참여기관에서는 상업화와 함께 임상연구 등의 연구수행을 위하여 대학/병원/기업 차원의 추가 연구를 계획 중임
- 본 사업이 완료되는 2019년도 이후에는 각 기관의 과제 연구비를 확충하여 본 연구를 집중지원 할 계획임
- 전북대학교는 전라북도 생물산업진흥원, 한림대학교는 강원도의 지자체 연구기관과 함께 사업화에 매진을 수행할 예정임
- 사업종료 후에도 본 연구와 관련이 되는 교육 및 연구 과제의 지속적인 성과창출을 위하여 농림부당국/지자체/각 참여기관과의 관계를 지속적으로 유지할 것이며 합리적이고도 유기적인 네트워크를 통하여 지속적으로 공동연구 및 교육을 지속할 예정임

나. 사업종료 후 본 연구의 연구비 확충계획

- 국내외에서 농림수산부를 비롯하여 지경부, 중기청, 보건복지부, 지자체 등에 과제를 신청하여 지속적인 조기 상용화를 획책할 것임
- 특히 가톨릭의대와 한림의대에서는 그간의 임상 중개연구 경험을 바탕으로 조기 상업화를 위한 “임상중개연구”의 모델을 발굴하여 농림수산부의 모델 케이스가 되도록 매진할 것임
- 세원셀론텍(주)을 주관으로 국내유관기업들과도 유기적인 관계를 돈독하게 하여 생체 소재 뿐만이 아니라 화장품용, 식품 소재용 등으로 조기 상용화에 일관하게 함
- 또한 정형외과 근골격계 질환/이비인후과/안면성형 재건 계통 뿐 만이 아니라 오리발 유래 고순도 콜라겐은 유용한 조직공학/재생의학 연구에 있어서 모든 영역으로 확장하여 글로벌화에 지속적인 투자를 하게 할 것임
- 본 사업이 완료되는 2019년도 이후에는 각 기관의 과제 연구비를 확충하여 본 연구를 집중지원할 계획임

제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
○	<p>2002년 대만의 한 병원에서 시행된 임상 연구로서 laminectomy에 Avitene™ Ultrafoam (콜라겐 기반 지지체) 사용 시 기존에 methylprednisolone을 일반용량으로 경막외 80 mg, 피하주사로 40 mg을 적용하던 것(그룹 A)을 1/3 용량으로 줄여서 경막외 40 mg만 적용(그룹 B)하고 동일한 효과를 얻을 수 있는지 비교 연구를 수행함. 이 연구의 결과, 통증 경감 효능과 안전성 측면에서 Avitene™ Ultrafoam을 사용하면 methylprednisolone의 용량을 1/3로 줄여도 다른 부작용의 증가 없이 수술 후 동일한 회복 효과를 얻을 수 있다는 것을 입증함. 따라서, 이 임상 연구를 통해 Avitene™ Ultrafoam을 사용함으로써 steroid 사용량을 줄일 수 있다는 결론을 내림</p>
○	<p>2016년 싱가포르 대학교에서는 catecholamines와 Ca²⁺를 포함하는 콜라겐의 전기방사에 의한 골과 유사한 복합체 제조에 대한 연구를 진행함. 연구에 따르면 제작한 지지체에 human fetal osteoblasts를 배양했을 때, TCP에서 배양했을 때보다 osteocalcin, osteopontin 및 bone matrix 단백질의 세포 부착, 침투, 증식, 분화 및 골 형성 발현이 우수한 것을 확인함</p>
○	<p>2016년 이란의 테헤란 의과대학에서는 골 조직 공학을 위해 젤라틴/콜라겐 및 생체 활성 유리 섬유를 이용, 전기방사로 지지체를 제작함. 젤라틴/콜라겐 겔, 서브 마이크론 45s5bg 섬유를 함유한 젤라틴/콜라겐 지지체, 구리이온을 포함하는 젤라틴/콜라겐 지지체 제작하여, 인간 골아 세포 유사 세포주 SaOS-2의 성장 및 생존력을 조사한 결과, BG구조에 구리 이온을 함유하는 지지체가 다른 지지체와 비교하여 생존력과 세포의 성장이 더 우수하다는 것을 확인하였음. 또한, 비 세포독성을 가지고 표면이 세포의 부착, 성장, 생존 및 골 재생에 이상적이라는 것을 확인함</p>
○	<p>2016년 미국 UCLA 대학 연구팀은 뼈재생을 위한 나노 입자 mineralized 콜라겐 glycosaminoglycan 지지체를 제조 후 토끼의 두개골에 특정 사이즈의 결함에 이식하여, 줄기세포나 성장인자 없이 치유를 유도하는 실험을 진행함. 실험 결과 골 형성 유도 메커니즘이 분화 동안 초기 BMP-2 와 -9, 후기 BMP-4의 BMP 수용체 신호 전달의 증가를 따른다는 것을 확인하였음. 따라서 나노 입자 mineralized 콜라겐 glycosaminoglycan 지지체는 뼈 재생을 위한 지지체로 적용 가능함</p>
○	<p>2017년 미국 미시간 대학교에서는 골 조직 공학을 위해 자기 조립을 통한 그래핀옥사이드와 나노 하이드록시아파타이트로부터 3차원 다공성 지지체를 제조하여 골 결손 치유에 대한 연구를 진행. 제작된 지지체는 rBMSCs의 증식, ALP활성 및 골 형성 유전자 발현을 유의적으로 향상시키는 것을 확인하였으며, <i>in vivo</i> 실험을 통해 20% nHA 지지체에서 향상된 콜라겐 침착, 세포 증식 및 새로운 골 형성을 확인하였음</p>

○ 2017년 캐나다의 치과대학에서 임플란트 부위의 재 흡수성 콜라겐 멤브레인을 사용하여, 치주 및 골다공증 치료에 대한 연구를 진행함. 기존의 비흡수성 멤브레인과 비교하여 뼈결합 깊이 감소 및 결합 뼈의 충전효과를 임상으로 확인함. 수술 후 초기 상처 치유단계 동안 결합 공간으로의 상피세포의 내성장을 방지하고, 상피 조직 결합 및 팽창율을 비교하였을 때, 기존의 polytetrafluoroethylene (e-PTFE) membranes과 비교하여 우수함을 입증함

제7장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 보안등급: 일반과제	

제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
- 해당사항없음 -								

제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호 D-11

-전북대학교-

□ 안전점검 및 정밀안전진단

구 분	점 검 내 용	점검주기	점검주체
안전점검	일상점검 다음 각호의 사항을 육안으로 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상유무 2)보호장비의 관리실태를 육안으로 점검	매일 1회	연구실 책임자
	정기점검 다음 각 호의 사항을 장비를 이용하여 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 설비기능의 이상유무 2)보호장비의 관리실태	매년 1회	연구주체의 장
정밀안전진단	외관 육안점검 및 점검장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전보건과 관련된 사항을 진단·평가	2년마다 1회	연구주체의 장

□ 연구활동종사자 보험가입

○ 업무개요

연구실 안전 환경 조성에 관한 법률 제14조에(보험가입) 의거 과학기술분야 연구활동 종사자의 연구활동 중 안전사고 발생 시 적정보상을 위하여 연구활동종사자를 수익자로 하는 상해보상보험(공제)을 매년 가입

○ '16~' 17 보험가입 내용

- 가입대상: 13,888명(대학생:11,273명, 대학원생:2,224명, 수료후논문연구생:391명)

※ 연구원, 연구보조원, 박사후연수연구원(Post-Doc.) 및 연구소(센터) 또는 각종 연구인프라구축사업단 등에서 연구과제 수행 등을 위하여 자체 채용한 연구(보조)원 등은 「산업재해보상보험법」에 의거 의무적으로 산재보험에 가입하여야 하므로 가입대상에서 제외하고, 필요시 각 채용기관별 예산으로 자체 가입

- 보장한도

구 분	사 망	후유장해	부상/질병
'16년 계약기준	200,000천원	200,000천원	30,000천원

- 보장기간 : '16. 9. 16. 16시 ~ '17. 9. 16. 16시(1년)

- 보상내용 : 연구활동중에 발생한 사고로 인한 부상·질병·신체장해·사망 등

□ 건강검진

○ 업무개요

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 시행규칙 제10조(정밀안전진단의 실시)에 의거 유해물질 및 유해인자를 취급하는 연구활동종사자에 대해 안전한 연구활동 보장 및 질

병예방을 위하여 일반 및 특수건강검진을 실시

- 검진대상 : 유해물질 및 유해인자를 취급하는 상시 연구활동종사자
 - 「산업안전보건법」 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자(181종)
- 시행주기
 - 일반건강검진 : 연1회<직장가입자는 해당검진 년도 제외>
 - 특수건강검진 : 유해인자별 검진주기에 따라 수검
- 검진기관 : 「산업안전보건법」에 따른 특수건강진단기관

□ 안전교육

구 분	정기교육			신규교육	
대상	-대학(원)생 2~3학년 -연구(보조)원			-대학(원)생 1학년 -신규채용된 연구(보조)원	
시행시 기	상반 기	집합	2월	신입생 O.T	2월
		온라인	1~6월		상반기
	하반 기	집합	8월	하반기	10월
		온라인	7~12월		
방 법	집합, 온라인			집합	

□ 사전유해인자분석 실시

- 실시근거 : 연구실안전환경 조성에 관한 법률 제5조
- 실시내용 : “사전유해인자위험분석”이란 연구개발활동 시작 전 유해인자를 미리 분석하는것으로 연구실책임자가 해당 연구실의 유해인자를 발굴하고 사고예방 등을 위하여필요한 대책을 수립하여 실행하는 일련의 과정
- 실시대상 실험실
 - 「화학물질관리법」 제2조제7호에 따른 유해화학물질 취급
 - 「산업안전보건법」 제39조에 따른 유해인자 취급
 - 「고압가스 안전관리법 시행규칙」 제2조제1항제2호에 따른 독성가스 취급
- 실시시기 : 연구실에서 수행하는 연구/프로젝트, 실험, 실습 등 시작 전 사전유해인자분석보고서 작성 제출
- 작성방법 :
 - 연구실 사전유해인자위험분석 실시에 관한 지침 [별지 제1호서식]을 작성
 - www.labs.go.kr 회원가입하여 서식을 작성 후 연구실안전관리센터로 제출

□ 주무 부서 : 전북대학교 연구실안전관리센터

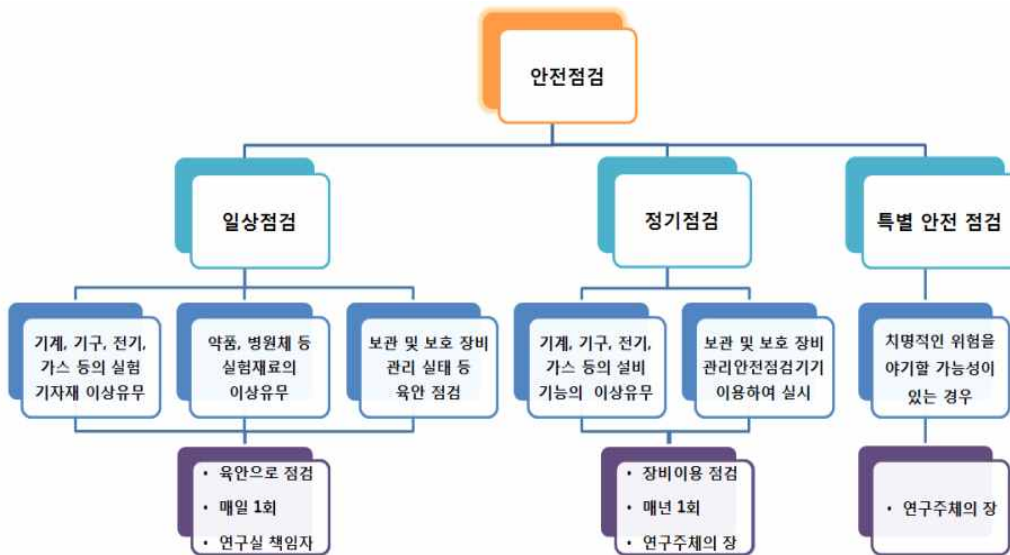
-한림대학교-

1) 기술적 위험 요소 분석

본 연구진은 국가연구개발사업 수행에 따른 안전조치 이행계획 등과 관련하여, 대학본부의 관리를 따르고 있으며, 연구활동에 필요한 모든 제반사항을 관리하고 노후시설 및 실험실 환경안전 개선에 힘쓰고 있으므로, 기술적 위험 요인은 없음

2) 안전 관리 대책

2-1) 실험실 안전 점검 및 정밀 안전 진단



- 점검 내용 : 외관 육안점검 및 점검 장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전조건과 관련된 사항을 진단 및 평가
- 점검주기 : 2년마다 1회
- 점검주체 : 연구주체의 장

2-2) 보험가입

- 실험실안전사고에 대비하여 실험실종사자 및 시설물 등에 대하여 보험에 가입

2-3) 안전교육

- 실험실 안전 점검 및 정밀 안전진단을 정기적으로 실시하며 연구자들의 보험가입이 되어 있으며 안전교육을 정기적으로 실시하고 있음

구 분	실시주체	실시시기	교육내용
집체교육	연구실 책임자	매월 1시간 이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실 안전환경 법령에 관한 사항 · 연구실 내 유해 위험요인에 관한 사항 · 안전분야별 총 23차시

제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	자외선을 이용한 콜라겐 필름의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 콜라겐 필름 및 콜라겐 필름을 이용하여 제조된 생체재료	세원셀론텍(주)	출원인	대한민국	-	2015.06.03.	단독	-
2	특허	콜라겐의 수득율을 높이는 방법	세원셀론텍(주)	출원인	대한민국	-	2015.11.23.	단독	-
3	특허	오리발 유래 콜라겐이 함유된 하이브리드 콜리식재와 그 제조방법	전북대학교 산학협력단	발명인	대한민국	-	2016.12.28.	단독	-
4	특허	고막재생용 콜라겐 패치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고막재생용 콜라겐 패치	한림대학교 산학협력단	발명인	대한민국	-	2017.09.07.	단독	-
5	국제 인증	국제 화장품 원료집 등재	세원셀론텍(주)	등재자	국제	-	2016.04.25.	-	INCI Monograph ID: 592
6	국제 인증	FDA 원료의약품 신고제도 등록	세원셀론텍(주)	등재 소유자	미국	-	2017.03.28.	-	DMF 등재 번호: 031659
7	논문	Skin Regeneration Using Duck's Feet Derived Collagen and Poly(vinyl alcohol) Scaffold	전북대학교 산학협력단	주저자	MACROMOLECULAR RESEARCH	1.405	2016.04.01.	중복	SCI
8	논문	Inflammatory Response Study of Gellan Gum Impregnated Duck's Feet Derived Collagen Sponges	전북대학교 산학협력단	주저자	Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition	1.900	2016.10.09.	중복	SCI
9	논문	In vivo Bone Regeneration Evaluation of Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffolds in Rat Calvarial Defect	전북대학교 산학협력단	주저자	MACROMOLECULAR RESEARCH	1.405	2017.11.01.	단독	SCI
10	논문	Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering	한림대학교 산학협력단	공동저자	International journal of biological macromolecules	3.671	2016.04.01.	단독	SCI
11	논문	Application of a Collagen Patch Derived from Duck Feet in Acute Tympanic	한림대학교 산학협력단	공동저자	Tissue Engineering and	1.169	2017.06.01.	단독	SCI

		Membrane Perforation			Regenerative Medicine				
12	논문	Novel transparent collagen film patch derived from duck's feet for tympanic membrane perforation	한림대학교 산학협력단	공동저자	Journal of biomaterials science. Polymer edition.	1.9	2017.09.01.	단독	SCI
13	논문	Fabrication and characterization of the porous duck's feet collagen sponge for wound healing applications	한림대학교 산학협력단	공동저자	Journal of biomaterials science. Polymer edition.	1.9	2017.08.01.	단독	SCI

제11장. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당사항없음	

제12장. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. 강정옥 (2001). 바이러스의 정량법. 대한임상미생물학회지 4(1): 1~4.		
2. 권중호 (2010). 조사식품의 안전성과 이해.		
3. 김광훈, et al. (2014). 감마선 멸균기술을 이용한 의약외품의 무균보증수준(SAL 10 ⁻⁶) 확보 및 세포독성 평가. Journal of Radiation Industry 8(2): 133~140.		
4. 농림축산식품부 (2014). 조류인플루엔자 긴급행동지침: 1~393.		
5. 문치웅 (2009). 맨드라미 추출물을 함유하는 바이러스로 인한 인간 질환의치료 및 예방용 조성물.		
6. 배정은, et al. (2010). 바이러스 안전성이 보증된 무세포 소 양막 생물창상피복재 제조 공정 개발. J. Microbiol. Biotechnol 38(4): 420~427.		
7. 백성인, et al. (2010). 의료기기에 사용되는 콜라겐의 평가 가이드라인 개발. Biomaterials Research 14(1): 10~18.		
8. 식품의약품안전처 (2014). 동물 유래 의약품 바이러스 안전성 평가 가이드라인. B1-2014-2-013.		
9. 식품의약품안전평가원 (2009). 콜라겐이 함유된 의료기기 평가가이드라인. 09-1.		
10. 식품의약품안전평가원 (2013). 동물 유래성분 원재료 사용 의료기기의 바이러스 불활화 처리공정 가이드라인.		
11. 조류질병학교수협의회 (2012). 조류질병학.		
12. 한국 오리협회. 축산물 수급 동향과 전망, 오리 사육 동향 및 종오리 입식 동향. URL http://www.koreaduck.org		
13. 농림축산식품부. 오리고기 수급 동향. URL http://www.mafra.go.kr		
14. 한국농수산물유통공사. 국가별 오리고기 수입량 및 점유율. URL http://www.at.or.kr		
15. 외교통산부. FTA별 오리고기 관세 변화. URL http://www.mofa.go.kr		
16. 한국바이오산업협회 (2006). 콜라겐과 관련 제품 개발 현황 및 기술 수준		
17. ASTM (2011). Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)1. F2212-11.		
18. CPMP/BWP (1996). Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses		
19. Diaz-Llopis, M., et al. (2013). Alternative ultraviolet A lamp for corneal collagen crosslinking. Clin Ophthalmol 7: 557~559.		
20. EMEA (1998). Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin.		
21. Gelse, K., et al. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55(12): 1531~1546.		
22. Hashim, P., et al. (2014). Isolation and Characterization of Collagen from Chicken Feet. International Journal of Biological 8(3): 238~242.		

23. Huda, N., et al. (2013). Preliminary Study on Physicochemical Properties of Duck Feet Collagen. *International Journal of Poultry Science* 12(10): 615~621.
24. Ignjatovic, J. and S. Sapats (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech* 19(2): 493~508.
25. ISO (2003). Medical devices Quality management systems Requirements for regulatory purposes. ISO 13485.
26. ISO (2007). Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives. Part 2: Controls on sourcing, collection and handling. ISO 22442-2.
27. ISO (2007). Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives. Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents. ISO 22442-3.
28. JAMES RIGG, R. and H. SCHALLER (1992). Duck Hepatitis B Virus Infection of Hepatocytes Is Not Dependent on Low pH. *JOURNAL OF VIROLOGY* 66(5): 2829~2836.
29. Lee, K. I., et al. (2012). Inactivation of enveloped and non-enveloped viruses in the process of chemical treatment and gamma irradiation of bovine-derived grafting materials. *Xenotransplantation* 19(6): 365~369.
30. Lin, Y. K. and D. C. Liu (2006). Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry* 94: 621~625.
31. Metreveli, N., et al. (2006). Mechanisms of the Influence of UV Irradiation on Collagen and Collagen-Ascorbic Acid Solutions. *International Journal of Photoenergy* 1~4.
32. Parenteau-Bareil, R., et al. (2011). Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. *Acta Biomater* 7(10): 3757~3765.
33. Park, S. J., et al. (2007). Isolation of duck hepatitis virus and development of its live attenuated vaccine by duck embryo liver cell culture. *Lab Anim Res* 23: 257~263.
34. Qayyum, R., et al. (1999). Effect of Physico-chemical Factors on Survival of Newcastle Disease Virus. *International Journal of Agriculture & Biology* 1(1/2): 42~44.
35. Ruppach, H. (2014). Log10 reduction factors in viral clearance studies. *bioprocessing journal* 12(4): 24~30.
36. Sakudo, A., et al. (2010). Sterilization and Disinfection by Plasma.
37. Singh, P., et al. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry* 124: 97~105.
38. Skierka, E. and M. Sadowska (2007). The influence of different acids and pepsin

on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry* 105: 1302~1306.

39. Swayne, D. E. (2013). *Disease of Poultry*.
40. Weadock, K. S., et al. (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen–fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Materials Research* 32: 221~226.
41. WHO (2004). Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. 924.
42. Zhao, Y. H. and Y. J. Chi (2009). Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnology* 8(2): 254~258.
43. X. Ren, V. Tu, D. Bischoff, D.W. Weisgerber, M.S. Lewis, D.T. Yamaguchi, T.A. Miller, B.A. Harley, J.C. Lee (2016). Nanoparticulate mineralized collagen scaffolds induce in vivo bone regeneration independent of progenitor cell loading or exogenous growth factor stimulation. *Biomaterials* 89: 67~78.
44. Z. Sheikh, J. Qureshi, A.M. Alshahrani, H. Nassar, Y. Ikeda, M. Glogauer, B. Ganss (2017) Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology* 105(1): 1~12.
45. R. Cholas, S. K.I Padmanabhan, F. Gervaso, G. Udayan, G. Monaco, A.Sannino, A. Licciulli (2016). Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. 63(1): 499~505.
46. M.M. Villa, L. Wang, J. Huang, D.W. Rowe, M. Wei (2016). Improving the permeability of lyophilized collagen–hydroxyapatite scaffolds for cell–based bone regeneration with a gelatin porogen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104(8): 1580~1590.
47. D.B. Bhuiyan, J.C. Middleton, R. Tannenbaum, T.M. Wick (2016). Mechanical properties and osteogenic potential of hydroxyapatite–PLGA–collagen biomaterial for bone regeneration. *Journal of biomaterials science, Polymer edition* 27(11): 1139~1154.
48. T. Kawai, O. Suzuki, K. Matsui, Y. Tanuma, T. Takahashi, S. Kamakura (2017). Octacalcium phosphate collagen composite facilitates bone regeneration of large mandibular bone defect in humans. *J Tissue Eng Regen Med* 11(5): 1641~1647.
49. C. Dhand, S.T. Ong, N. Dwivedi, S.M. Diaz, J.R. Venugopal, B. Navaneethan, M.H. Fazil, S. Liu, V. Seitz, E. Wintermantel, R.W. Beuerman, S. Ramakrishna, N.K. Verma, R. Lakshminarayanan (2016). Bio–inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 104: 323~338.
50. E. Sharifi, M. Azami, A.M. Kajbafzadeh, F. Moztarzadeh, R. Faridi–Majidi, A. Shamousi, R. Karimi, J. Ai (2016). Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue

engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 59: 533~541.

51. B.B. Nguyen, R.A. Moriarty, T. Kamalidinov, J.M. Etheridge, J.P. Fisher (2017). Collagen hydrogel scaffold promotes mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 105(4): 1123~1131.
52. C. Arakawa, R. Ng, S. Tan, S. Kim, B. Wu, M. Lee (2017). Photopolymerizable chitosan–collagen hydrogels for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 11(1): 164~174.
53. The PewForum On Religion Public Life (2013). Population by religion. URL <http://www.pewforum.org>
54. MedMarket Diligence (2010). LLC. Market Research Reports.
55. Frost & Sullivan. Global Industry Analysis Inc. (2013). Collagen and HA–based Biomaterials, A Global Strategic Business Report.
56. Global Regenerative Medicine Market (2014). A New Era in Human Health to Resolve Unmet Medical Needs
57. Gu–In Jung, Ji–Sun Kim, Ju–Hyeon Choi, and Jae–Hoon Jun (2010). The trend and prospect of biomaterials in the biomedical engineering field. *KIC news*. 13(6): 18~36.
58. Annika Rickne, Anna Sandstrom (2009). Swedish possibilities within tissue engineering and regenerative medicine. VINNOVA. Swedish Governmental Agency for Innovation Systems.
59. Cell Therapy (2008). A Jain PharmaBiotech Report.
60. Parenteau–Bareil R., Gauvin R., Berthod F. (2010). Collagen–Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3:1863.
61. Silva T.H., Moreira–Silva J., Marques A.L., Domingues A., Bayon Y., Reis R.L. (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Mar Drugs* 12:5881~5901.
62. Song J.E., Tripathy N., Shin J.H., Lee D.H., Park C.H., Khang G. (2016). Skin regeneration using duck' s feet derived collagen and poly (vinyl alcohol) scaffold. *Macromolecular Research* 24:359~365.
63. Lv Q., Cao C., Zhang Y., Man X., Zhu H. (2004). The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. *J Mater Sci Mater Med* 15:1193~1197.
64. Seyednejad H., Imani M., Jamieson T. (2008). Seifalian AM. Topical haemostatic agents. *Br J Surg* 95(10):1197~1225.
65. O'Shaughnessy B.A., Schafernack K.T., DiPatri A.J., Jr., Goldman S., Tomita T. (2006). A granulomatous reaction to Avitene mimicking recurrence of a medulloblastoma. Case report. *J Neurosurg* 104(1 Suppl):33~36.
66. Nakajima M., Kamei T., Tomimatu K., Manabe T. (1995). An intraperitoneal

tumorous mass caused by granulomas of microfibrillar collagen hemostat (Avitene). Arch Pathol Lab Med 119(12):1161~1163.

67. Kitamura K., Yasuoka R., Ohara M., Shimotsuma M., Hagiwara A., Yamane T., et al. (1995). How safe are the xenogeneic hemostats? Report of a case of severe systemic allergic reaction. Surg Today 25(5):433~435.

68. Tzu-Yung Chen Efficacy of Topical Microfibrillar Collagen Mixed with Steroid.

69. Hormone and Morphine for Postoperative Pain Control during.

70. Lumbar Laminectomy (2002). A Preliminary Report. Chang Gung Med J 25(2):81~88.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.