

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049703

(43) 공개일자 2024년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 24/04 (2006.01) A61K 35/30 (2015.01)

A61K 47/42 (2017.01) A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 24/043 (2013.01)

A61K 35/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0128494

(22) 출원일자 2022년10월07일

심사청구일자 2022년10월07일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전진평

서울특별시 은평구 진관3로 15-45 1018동 402호

김중태

강원도 춘천시 춘천로255번길 6, 302호(후평동)

윤동혁

충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

(74) 대리인

특허법인본

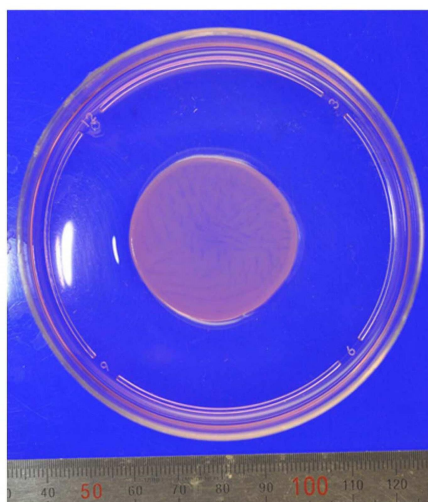
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 경도 외상성 뇌손상 후 손상된 신경세포를 대체하기 위해 사용되는 뇌 오가노이드를 동물 모델에 이식하여 생착 및 구성 세포의 생존율을 향상시키기 위한 접합 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 콜라겐 및 피브린으로 이루어지는 하이드로겔을 포함하는 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61L 24/0031 (2013.01)

A61L 24/102 (2013.01)

A61L 24/106 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345346926

과제번호 2020R1I1A3070726

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐 및 피브린으로 이루어지는 하이드로겔을 포함하는 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 0.05 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것인,

뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 피브린은 0.01 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것인,

뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 콜라겐은 상기 피브린에 대하여 2:1 내지 1:2의 부피비로 첨가되는 것인,

뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것인,

뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 접합 보조제 조성물은 ROCK 억제제를 5 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것인,

뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 신경세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에

서 유래된 것인,
뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 포함하고, 신경조직을 포함하는,
뇌손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

콜라겐 및 피브린으로 이루어지는 하이드로겔을 포함하고,
뇌손상 치료용 세포 치료제와 병용투여하기 위한,
약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,
상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것인,
약학적 조성물.

청구항 11

콜라겐과 피브리노겐을 혼합하여 하이드로겔을 제조하는 단계; 및
상기 하이드로겔과 신경조직이 포함된 배지를 교반하면서 배양하는 단계; 를 포함하는,
뇌손상 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 교반은 30 rpm 내지 90 rpm으로 수행되는 것인,
뇌손상 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,
상기 배지는 ROCK 억제제를 10 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것인,
뇌손상 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 특히 뇌 오가노이드를 경도 외상성 뇌손상에 이식하기 위한 접합보조제로서 피브린 및 콜라겐을 포함하는 하이드로겔 조성물을 제공할 수 있다.

배경 기술

[0003] 현재 세포치료제로 가장 많이 이용되는 줄기세포 중 신경줄기세포(neural stem cell)는 뉴런(neuron) 및 신경교세포(glial cell) 등으로 분화가 가능하다. 최근 설치류뿐 아니라 사람의 뇌에도 신경줄기세포의 존재가 확인되었으며 지속적으로 뇌세포의 항상성 유지 및 재생을 담당하는 것으로 밝혀졌다.

[0004] 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 치료를 위해서 다양한 기원의 신경줄기세포를 활용한 치료제 개발이 시도되고 있는데 현재 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 뇌혈관 질환 치료를 위한 치료부위로의 세포이식 및 전달방법은 뇌내 직접주사(intracerebral injection), 동맥내 주사(intra-arterial injection), 정맥내 주사(intravenously injection), 비강내 주사(Intranasal injection) 방법이 주로 사용되고 있다.

[0005] 뇌 혈관 질환뿐만 아니라, 뇌손상의 경우에도 중간엽줄기세포 또는 신경줄기세포를 이용하여 동일한 접근방법을 통하여 세포를 전달이 가능하다. 하지만 일반적인 주사방법의 경우에 이식 후 손상된 조직의 가혹한 환경으로 인하여 적합하지 않은 시기에 이식한 세포의 생존율은 보장하기 어렵고, 또한 원하는 손상부위로의 세포전달이 충분하지 못한 단점이 있어, 치료효과를 얻기 위한 충분한 신경줄기세포를 환부에 전달할 필요성이 대두된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1389851호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 경도 외상성 뇌손상 후 손상된 신경세포를 대체하기 위해 사용되는 뇌 오가노이드를 동물 모델에 이식하여 생착 및 구성 세포의 생존율을 향상시키기 위한 접합 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[0010]

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 의하면, 콜라겐 및 피브린으로 이루어지는 하이드로겔을 포함하는 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물에 관한 것이다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 0.05 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

[0013] 또한 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 피브린은 0.01 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 콜라겐은 상기 피브린에 대하여 2:1 내지 1:2의 부피비로 첨가되는 것일 수 있다.

[0015] 또한 본 발명에서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명에서, 상기 접합 보조제 조성물은 ROCK 억제제를 5 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것일 수

있다.

- [0017] 또한 본 발명에서, 상기 신경세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에서 유래된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물 및 신경조직을 포함하는, 뇌손상 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 포함하고, 뇌손상 치료용 세포 치료제와 병용투여하기 위한, 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0020] 또한 본 발명에서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 포함하고, 콜라겐과 피브리노겐을 혼합하여 하이드로겔을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로겔과 신경조직이 포함된 배지를 교반하면서 배양하는 단계; 를 포함하는, 뇌손상 치료용 약학적 조성물의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명에서, 상기 교반은 30 rpm 내지 90 rpm으로 수행되는 것 뇌손상 치료용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명에서, 상기 배지는 ROCK 억제제를 10 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 조성물은 뇌 오가노이드가 뇌 손상 부위에 이식되었을 때 이식된 뇌 오가노이드의 뉴르네포 주변으로 별 아교 세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 등의 뇌 세포가 성장할 수 있도록 물리적 지지를 위한 지지체로서 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 세포 치료제와 같이 활용하여 퇴행성신경질환 및 뇌손상 치료, 특히 경도 외상성 뇌손상 치료에 적용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 다양한 양상들이 이제 도면들을 참조로 기재된다. 이하의 실시예에서, 설명 목적을 위해, 다수의 특정 세부사항들이 하나 이상의 양상들의 총체적 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 그러한 양상(들)이 이러한 특정 세부사항들 없이 실시될 수 있음은 명백할 것이다.
- 도 1은 본 발명의 실시예에 있어서 피브린과 콜라겐 하이드로겔의 물성을 나타낸 이미지이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 있어서 피브린과 콜라겐 하이드로겔의 물성을 나타낸 이미지이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 있어서 피브린과 콜라겐 하이드로겔을 뇌 조직과 배양하여 4주간 배양된 뇌 조직과 신경세포의 형태를 나타낸 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 있어서 경도 외상성 뇌손상 후 뇌 오가노이드 이식 과정을 나타낸 이미지이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 있어서 뇌 오가노이드를 경도 외상성 뇌손상 모델에 이식 후 2주 뒤 마우스의 뇌에 접합된 뇌 오가노이드를 확인한 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에 있어서 뇌 오가노이드를 경도 외상성 뇌손상 모델에 이식 후 2주 뒤 마우스의 뇌에 접합된 뇌 오가노이드에 대하여, 면역형광염색으로 위치를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원

칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

- [0031] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0032] 본 발명에서 '뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물'이란, 뇌 오가노이드를 뇌 손상 부위에 이식하였을 때 뇌 구조를 복구하고 이식된 뇌 오가노이드의 뉴런 세포 주변으로 뇌 세포가 성장할 수 있도록 물리적 지지를 위한 접합 보조제로서 사용되는 조성물을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 일 구현 예에 따르면,
- [0035] 콜라겐 및 피브린으로 이루어지는 하이드로겔을 포함하는 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 0.05 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 0.2 중량부로 포함되는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 피브린은 0.01 중량부 내지 0.4 중량부로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.05 내지 0.2 중량부로 포함되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 콜라겐은 상기 피브린에 대하여 2:1 내지 1:2의 부피비로 첨가되는 것일 수 있고 바람직하게는 1.5:1 내지 1:1.5의 부피비로 첨가되는 것일 수 있다. 본 발명에서, 상기 피브린은 피브리노겐 및 트롬빈의 반응에 의해 생성된 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 접합 보조제 조성물은 ROCK 억제제를 5 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 40 μ M 내지 60 μ M으로 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서, 상기 ROCK 억제제는 ROCK 저해제, Rho 키나제 억제제 또는 Rho 관련 단백질 키나제 억제제라고도 하며, AT-13148, BA-210, beta-Elementine, Chroman 1, DJ4, Fasudil, GSK-576371, GSK429286A, H-1152, Hydroxyfasudil, Ibuprofen, LX-7101, Netarsudil, RKI-1447, Ripasudil, TCS-7001, Thiazovivin, Verosudil(AR-12286), Y27632, Y30141, Y33075 및 Y39983을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, ROCK 경로를 억제하는 화합물이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 신경세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에서 유래된 것일 수 있다. 또한, 상기 신경세포는 뇌조직인 것일 수 있고, 상기 뇌조직은 피질(Cortex) 또는 측뇌실(lateral ventricle)에서 유래된 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 간세포 또는 모세포라고도 하며, 배아 또는 성체에 있는, 여러 종류의 조직으로 분화할 수 있는 미분화 세포이고, 전능세포(pluripotent cell)를 지칭한다. 상기 줄기세포는 남성의 생식세포인 정자와 여성의 생식세포인 난자의 수정으로 생성된 수정란에서 유래한 배아줄기세포(Embryonic stem cells), 신체 각 조직에 극히 소량만이 존재하는 성체줄기세포(Adult Stem Cell, Tissue-specific Stem Cell) 또는 유도만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs)일 수 있고, 바람직하게는 배아줄기세포인 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면,
- [0045] 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물 및 신경조직을 포함하는, 뇌손상 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 포함하고, 뇌손상 치료용 세포 치료제와 병용투여하기 위한, 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 본 발명에 기재된 질환들의 증상을 차단하거나, 그

증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

- [0047] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 상기 열거된 질환들의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, "약학적 조성물"은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0050] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001mg/kg 내지 50mg/kg 또는 0.001mg/kg 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있고 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 “개체”란, 본 발명이 예방 또는 치료하고자 하는 질환에 대하여 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 중; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적 상 상기 개체는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 “투여”란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 피부를 통해 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0054] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0055] 본 발명에서, 병용 투여(concomitant use)는 동시에 사용하거나 거의 동시에(하나씩 차례로, 또는 같은 날에 투여 등) 두 개 이상의 약물을 투여하는 것일 수 있다. 상기 병용 투여를 위한 세포 치료제란, 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 이러한 세포 치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역 세포 치료제로 분류할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서, 상기 신경세포 오가노이드를 포함하는 신경세포 손상을 치료하기 위한 세포 치료제를 제공할 수 있고, 상기 세포 치료제란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종

(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 이러한 세포 치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역 세포 치료제로 분류할 수 있다.

[0057] 본 발명의 세포 치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 및 피내 투여에서 선택된 어느 하나 이상을 제한없이 포함할 수 있다.

[0058] 상기 세포치료용 조성물은 겔폼(gelform) 형태일 수 있고, 스폰스탄(spongostan)과 같은 젤라틴 스폰지(gelatin sponge)에 한정되지 않고, 손상부위 주변의 피부(skin), 결합조직(connetive tissue) 과 같은 조직의 세포 침윤으로 부터 이식된 뇌 오가노이드를 보호할 수 있도록, 상대적으로 경도가 높은 의료용 재료일 수 있다.

[0059] 본 발명에서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것일 수 있다. 상기 아텔로콜라겐은 콜라겐의 텔로펩타이드(telopeptide)를 펩신 등으로 제거 및 분리하여 항원성이 없고 생체적 합성이 좋으며, 단기간에 대사, 흡수되는 특징이 있다.

[0060] 본 발명에서, 뇌 오가노이드는 SOX2, nestin, FOXG1, PAX6, DCX, TUJ1 및 Ki67을 발현하는 것일 수 있다.

표 1

순번	마커	서열번호
1	SOX2	서열번호 1
2	Nestin	서열번호 2
3	FOXG1	서열번호 3
4	PAX6	서열번호 4
5	DCX	서열번호 5
6	TUJ1	서열번호 6
7	Ki67	서열번호 7

[0061]

[0062] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0064] 본 발명의 또 다른 구현 예에 의하면,

[0065] 본 발명에 따른 뇌 오가노이드 이식을 위한 접합 보조제 조성물을 포함하고, 콜라겐과 피브리노겐을 혼합하여 하이드로겔을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로겔과 신경조직이 포함된 배지를 교반하면서 배양하는 단계; 를 포함하는, 뇌손상 치료용 약학적 조성물의 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0066] 본 발명에서, 상기 교반은 30 rpm 내지 90 rpm으로 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 50 rpm 내지 70 rpm에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0067] 본 발명에서, 상기 배지는 ROCK 억제제를 10 μ M 내지 70 μ M 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 10 μ M 내지 60 μ M 농도로 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 ROCK 억제제는 1일 동안 2시간마다 상기 ROCK 억제제를 포함하는 배지를 교환하고, 이후 3일 동안 1일 1회 상기 ROCK 억제제를 포함하는 배지를 교환하여, 총 4일 동안 상기 ROCK 억제제를 투여하는 것일 수 있다.

[0069] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다. 또한, 실시예에 사용되는 뇌 오가노이드는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 또는 성체줄기세포 유래 신경세포로 구성된 세포응집 형태 일 수 있다.

[0071] [실시예1] 피브린과 콜라겐으로 이루어진 하이드로겔의 조성

[0073] 도 1 및 도 2는 본 발명의 실시예에 있어서 피브린과 콜라겐 하이드로겔의 물성을 나타낸 이미지이다.

[0074] 피브린의 조성은 피브리노겐과 트롬빈으로 구성된다. 구체적으로는 1 유닛의 트롬빈과 피브리노겐을 혼합하여 0.05%에서 0.2%의 피브린을 제작하였다. 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen) 0.5%를 사용하여 0.2%에서 0.4% 농도의 콜라겐 조성을 가지도록 제조하였다. 상기 피브린과 콜라겐을 혼합하여 하이드로겔 농도를 조절하였다.

[0076] [실시예2] 뇌조직 배양을 통한 피브린/콜라겐 하이드로겔의 세포 보호 효과

[0078] 도 3은 본 발명의 실시예에 있어서 피브린과 콜라겐 하이드로겔을 뇌 조직과 배양하여 4주간 배양된 뇌 조직과 신경세포의 형태를 나타낸 이미지이다.

[0079] 상기 실시예1의 하이드로겔과 뇌조직을 배양하여 하이드로겔의 세포보호 및 증식 효과를 확인하였다. 뇌 조직 배양 0일째 50 μ M ROCK 억제제(Y27632)가 첨가된 배지를 2시간 마다 2회 교환하고, 이후 3일 동안 1일 1회 50 μ M ROCK 억제제(Y27632)가 첨가된 배지로 교환하여 뇌 세포 보호 및 증식에 있어서 영향을 평가하였다. 상기 배양은 인큐베이터에 회전식 셰이커를 이용하여 분당 60 rpm으로 배지를 교반하여 배양하였다.

[0081] [실시예3] 경도 외상성 뇌손상 치료 효과를 위한 뇌 오가노이드 이식

[0083] 도 4는 본 발명의 실시예에 있어서 경도 외상성 뇌손상 후 뇌 오가노이드 이식 과정을 나타낸 이미지이다.

[0084] 도 5는 본 발명의 실시예에 있어서 뇌 오가노이드를 경도 외상성 뇌손상 모델에 이식 후 2주 뒤 마우스의 뇌에 접합된 뇌 오가노이드를 확인한 사진이다.

[0085] 도 6은 본 발명의 실시예에 있어서 뇌 오가노이드를 경도 외상성 뇌손상 모델에 이식 후 2주 뒤 마우스의 뇌에 접합된 뇌 오가노이드에 대하여, 면역형광염색으로 위치를 확인한 결과이다.

[0086] 먼저, 마우스를 이용하여 경도 외상성 뇌손상 모델을 제작하였으며, 손상 후 1주간의 회복기를 두었다. 뇌 오가노이드 이식 3일전 면역억제제인 사이클로스포린 A(cyclosporine A) 10mg/mL를 복강내 투여하여 이식 거부반응을 대비하였다. 다음으로 도 4와 같이, 수술 1주일 뒤, 손상부위의 뇌 조직을 제거한 후 1x PBS로 3회 세척한 후 뇌 오가노이드를 병변부위에 이식하였다. 이식한 후 피브린/콜라겐 혼합 용액을 뇌 오가노이드가 덮이도록 분주하였다. 10분간 겔화 과정을 거친 다음 젤라틴 스폰지(gelatin sponge)로 뇌 오가노이드 및 피브린/콜라겐 하이드로겔을 덮는다.

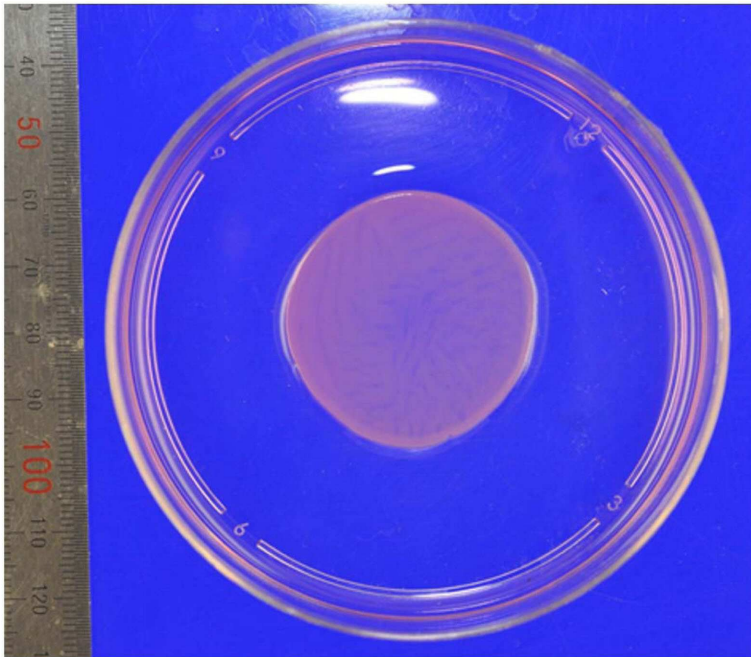
[0087] 그 결과, 도 5 및 도 6에서와 같이 오가노이드가 잘 생착된 것을 확인할 수 있었다.

[0089] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0090] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

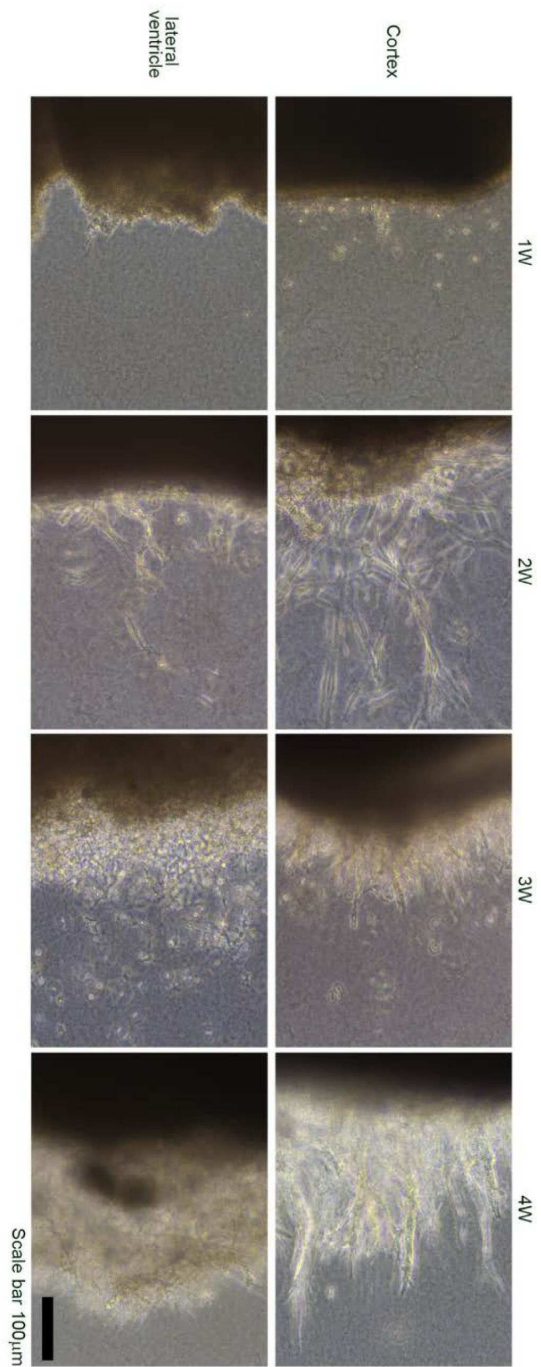
도면1



도면2



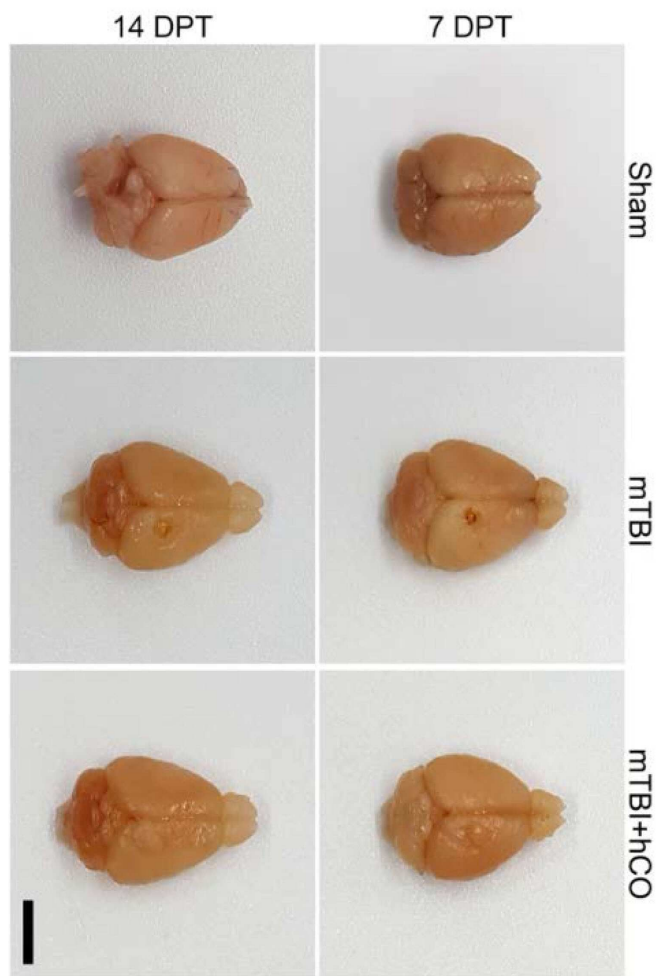
도면3



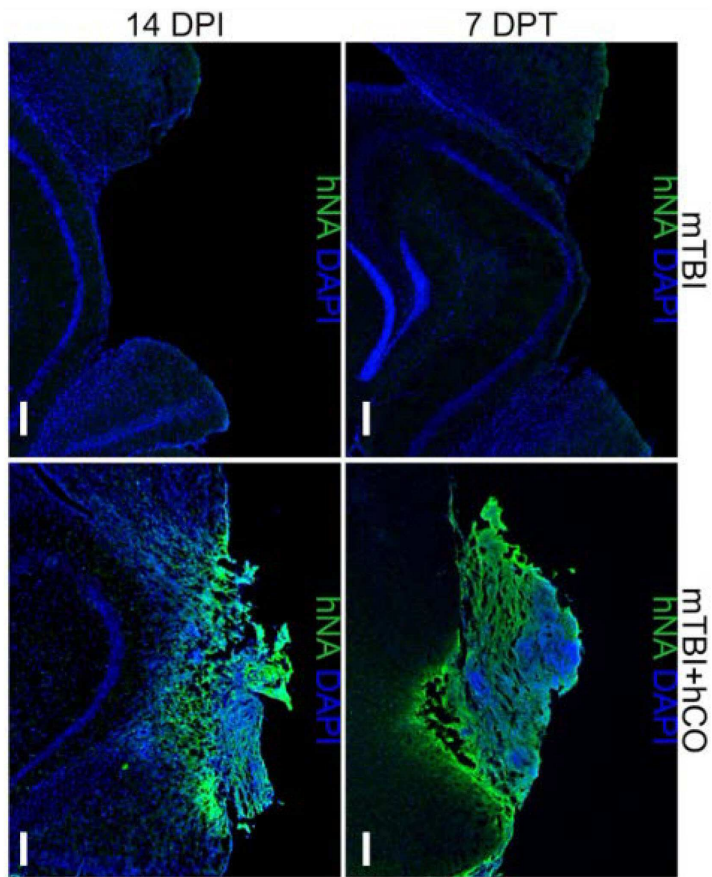
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.