



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101488
(43) 공개일자 2013년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/56 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0099743(분할)
(22) 출원일자 2013년08월22일
심사청구일자 2013년08월22일
(62) 원출원 특허 10-2012-0022152
원출원일자 2012년03월05일
심사청구일자 2012년03월05일

(71) 출원인
(주)다림티센
서울특별시 마포구 연희로 31, 5층 (연남동)
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김송철
서울특별시 송파구 신천동 파크리오아파트 314동 803호
박시내
서울특별시 서대문구 대신동 142-6
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
원석희, 이동기, 박장규, 김민철, 박지하, 김명신

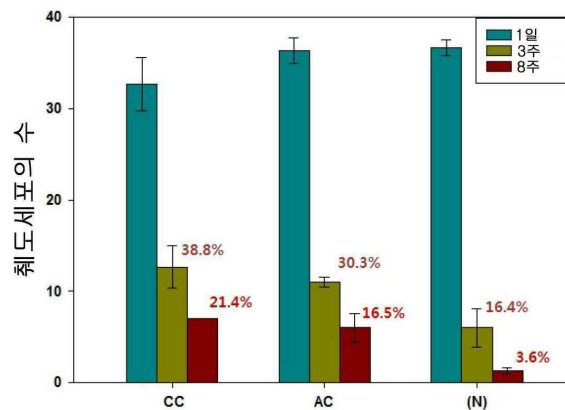
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 아텔로콜라겐을 이용한 췌도세포의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 양이온화 아텔로콜라겐을 제조한 후 이를 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법 및 췌도세포 이식용 담체를 제조하는 방법 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장을 제공한다. 본 발명에 따르면 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 수득된 양이온화 아텔로콜라겐 또는 가교화된 아텔로콜라겐 지지체를 이용하여 췌도세포의 배양시 췌도세포의 생존율 및/또는 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있고, 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 안정성이 우수한 췌도세포 이식용 담체를 제공함으로써 배양 및 이식된 췌도세포의 생존율을 높이면서 동시에 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

공선영

서울특별시 용산구 용산동5가 파크타워아파트 105
동 1703호

고재형

서울특별시 강북구 우이동 573-27

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 양이온화 아텔로콜라겐 용액을 준비하는 단계와,
- (b) 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액에 췌도세포를 접종하거나, 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액을 배양 용기에 도포하여 건조시켜 양이온화 아텔로콜라겐 지지체를 형성한 후 상기 양이온화 아텔로콜라겐 지지체 상에 췌도세포를 접종하는 단계와,
- (c) 상기 (b) 단계에서 접종된 췌도세포를 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액 내에서 또는 상기 양이온화 아텔로콜라겐 지지체 상에서 배양하는 단계를 포함하는 아텔로콜라겐을 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법.

청구항 2

- (a) 아텔로콜라겐 용액을 준비하는 단계와,
- (b) 상기 아텔로콜라겐 용액을 배양 용기에 도포하여 건조시켜 아텔로콜라겐 지지체를 형성한 후 상기 아텔로콜라겐 지지체를 가교화시킨 다음, 가교화된 아텔로콜라겐 지지체 상에 췌도세포를 접종하는 단계와,
- (c) 상기 (b) 단계에서 접종된 췌도세포를 상기 가교화된 아텔로콜라겐 지지체 상에서 배양하는 단계를 포함하는 아텔로콜라겐을 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법.

청구항 3

- 제2항에 있어서,
- 상기 (b) 단계에 있어서, 상기 아텔로콜라겐 지지체에 가교화제를 함유하는 용액을 첨가하여 반응시킴으로써 상기 아텔로콜라겐 지지체의 가교화를 유도하는 것을 특징으로 하는 아텔로콜라겐을 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법.

청구항 4

- 제3항에 있어서,
- 상기 가교화제는 EDC 또는 글루타르알데히드인 것을 특징으로 하는 아텔로콜라겐을 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아텔로콜라겐을 이용한 췌도세포의 배양방법 및 췌도세포 이식용 담체의 제조방법 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 양이온화 아텔로콜라겐을 제조한 후 이를 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법 및 췌도세포 이식용 담체를 제조하는 방법 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 양이온화 아텔로콜라겐 또는 가교화된 아텔로콜라겐 지지체를 이용하여 췌도세포의 생존율 및/또는 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높이기 위한 췌도세포의 배양방법, 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 췌도세포 이식용 담체 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장에 관한 것이다.

[0003] 추가로, 본 발명은 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 안정성이 우수한 췌도세포 이식용 담체를 제공함으로써 배양 및 이식된 췌도세포의 생존율을 높이면서 동시에 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있는 인공췌장의 제조를 위한 기반기술을 제공하는 것에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 세계적으로 당뇨병으로 고통받고 있는 환자는 전세계 인구의 5.1% 정도로 추정되고 있으며, 환자의 수도 지속적으로 증가하여 2025년에는 전세계 인구의 6.3% 정도를 차지할 것으로 예상된다. 특히, 당뇨병 환자의 사망률은 일반

국민의 3.1배에 달하며, 당뇨병으로 인해 직접 사망에 이르는 않더라도 각종 합병증 등으로 실명, 만성 신부전, 급성 뇌졸중 등의 발병률이 크게 높아지는 것으로 알려져 있다.

[0005] 당뇨병은 크게 1형 당뇨병과 2형 당뇨병으로 나뉘는데 이중 1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병이라 일컬어진다. 췌도세포는 췌장에 존재하는 섬 모양의 특수한 조직에 존재하고 췌도세포의 한 종류인 β 세포가 당대사에 필수적인 역할을 하는 인슐린을 분비하는데, 1형 당뇨병은 면역체계가 β 세포를 파괴하여 당대사에 필요한 인슐린을 생성하지 못함으로써 발생하는 일종의 자가면역질환으로 알려져 있다.

[0006] 현재까지 1형 당뇨병의 치료 방법으로는 일정 간격으로 인슐린을 주사하여 공급받거나 공여자에게서 췌장을 이식 받는 방법 등이 있으나, 현재 췌도세포 이식을 위한 세포의 분리 및 배양기술은 2-4명의 공여자로부터 얻은 췌도세포로 1명의 당뇨병 환자에게 이식할 수 있는 정도의 수준에 머물고 있으며 췌도세포의 이식이 성공적으로 이루어지더라도 이식 후의 인슐린 비의존성의 유지는 10% (이식후 5년 기준)를 넘지 못하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 즉, 1형 당뇨병 치료를 위해 사용하는 인슐린은 비용이 고가이고 환자가 일정 간격으로 적시에 주사하기에 불편한 문제가 많으며 과다 사용시 쇼크 등 신체 부작용이 심한 문제가 있다. 이에 대한 대안으로서 당뇨병 환자에게 췌도를 이식하여 치료하고자 하는 기술들이 개발되어 왔는데, 전술한 바와 같이 이식할 췌도세포의 공급이 절대적으로 부족한 점을 감안하여 본 발명이 속한 기술분야에서는 췌도세포를 대량으로 배양하는 방법과 면역 반응을 최소화하는 인공췌도 제조방법에 대한 연구가 지속되고 있다.

[0008] 한편, 췌도세포의 이식 후에 췌도세포 기능의 일부 또는 완전한 손실이 일어나게 되는데, 이와 같은 췌도세포 기능의 손실은 췌도세포를 췌장에서 분리 및 정제할 때 필연적으로 발생하는 세포외기질(Extra-cellular matrix, ECM)의 파괴가 가장 큰 원인으로 알려져 있다. 특히, 세포외기질은 세포의 부착과 이동에 필수적인 역할을 물론, 세포자극을 위한 신호전달에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이로 인해 췌도세포를 비롯한 많은 종류의 세포의 부착성과 생존을 그리고 증식을 크게 향상시킨다는 많은 보고가 있다. 따라서, 췌도세포 배양 및 이식과 인공췌도 제조방법과 관련한 기술분야에서 세포외기질은 큰 주목을 받고 있다.

[0009] 이러한 세포외기질의 중요성에 주목한 종래기술로서 대한민국 공개특허 제10-2003-0033638호는 래트의 꼬리 콜라겐(rat tail collagen)과 세포외기질(ECM) 겔을 섞은 용액에 췌도 세포를 혼합하는 방식의 인공췌도세포 제조 방법을 개시하고 있다.

[0010] 즉, 이러한 종래기술로부터 알 수 있는 바와 같이 세포외기질을 생체재료로 이용할 때 세포외기질 관련 생체재료들 중에서도 콜라겐(collagen)은 매우 중요한 생체 소재로서 사용되어 왔음을 알 수 있다. 콜라겐은 생체 내 거의 모든 조직에 분포하여 체내에 존재하는 단백질 중 1/3 가량을 차지하는 것으로 알려져 있으며, 세포의 지지 및 증식을 위한 구조체로서 세포와 결합하여 장기와 조직의 형태를 유지함으로써 생체 구조를 구축하는데 필수 불가결한 단백질로 알려져 있다.

[0011] 한편, 생체에는 피부, 인대, 골, 혈관, 양막, 심막, 심장판막, 태반, 각막 등 콜라겐이 함유되어 있는 조직은 많지만 콜라겐의 종류나 그 비율은 각 조직마다 조금씩 상이하다. 특히 제1형 콜라겐은 피부, 인대, 골 등 거의 모든 조직에 다량 포함되어 있기 때문에 조직공학에서 가장 널리 이용되고 있는 세포외기질 중 하나이다.

[0012] 또한, 콜라겐은 여러 가지 화학적 처리를 통하여 콜라겐 고유의 성질을 변화시키는 것이 가능한데, 예를 들어 일반적으로 콜라겐은 중성의 물에서는 잘 녹지 않는 반면에, 메탄올, 에탄올, 무수숙신산, 무수아세트산 등으로 변형시킨 콜라겐은 양이온화 혹은 음이온화되어 중성의 물에서도 녹게 된다.

[0013] 이러한 콜라겐의 특성과 이온화 변형기술을 이용한 종래기술로서 미국특허공보 제4,559,304호에는 콜라겐의 아미노산기와 카르복시기를 변형시켜 콜라겐을 이온화시키는 기술이 개시되어 있고(예를 들어 콜라겐을 숙신산 무수물과 반응시켜 음이온화, 콜라겐과 알콜을 반응시켜 에스테르화시켜 양이온화), 이러한 이온화된 콜라겐 상에 포유동물세포를 배양할 경우 일반 콜라겐에 비해 세포 부착이 향상되고 증식이 잘 된다는 점이 개시되어 있다. 그러나, 미국특허공보 제4,559,304호는 췌도세포 배양에 대해서는 구체적인 기술을 제공하고 있지 않으며 세포 부착과 증식에 대해서만 언급하고 있을 뿐, 췌도세포 배양에 있어서 가장 중요한 췌도 세포 생존율의 향상 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 향상에 대한 어떠한 기술적 수단도 개시하거나 암시하고 있지 않다.

[0014] 일반적으로, 세포 배양 과정에서 세포 부착과 세포 증식이 증가한다고 하더라도 이것이 세포의 생존율 증가와 해당 세포의 기능에 대한 긍정적인 영향과의 상관관계가 있다고 단정할 수 없으며, 특히 췌도세포는 더 이상의 증식이나 분화가 일어나지 않는 약 6가지 종류의 서로 다른 세포들이 뭉쳐있는 덩어리라는 독특한 성질을 감안할 때 췌도 세포의 부착을 증가가 췌도 세포의 생존율 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비를 향상시킨다고 보

기 어려운 문제가 있다(후술하는 실시예 9 및 도 6 참조).

[0015] 따라서, 본 발명이 속한 기술분야에서는 아텔로콜라겐을 이용하여 췌도세포의 생존율과 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높이기 위한 새로운 췌도세포의 배양방법 및 안정성이 높은 인공췌장의 개발에 대한 요구는 여전히 존재한다.

[0016] 이에 본 발명자들은 췌도세포를 배양할 때 췌도세포의 생존율과 인슐린 분비량을 높이기 위한 기술 개발을 계속 거듭한 결과, 생체 내 대표적 세포외기질인 제1형 콜라겐의 면역원성을 제거한 아텔로콜라겐을 양이온화시켜 제조한 양이온화 아텔로콜라겐 지지체 또는 담체에서 배양한 췌도세포의 생존율 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성이, 일반 콜라겐 또는 음이온화 콜라겐으로 제조한 지지체 및/또는 담체에서 배양한 췌도세포의 생존율 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성 보다 월등히 우수하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 또한, 본 발명자들은 가교화된 아텔로콜라겐 지지체에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성이 가교화되지 않은 아텔로콜라겐에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성 보다 우수하다는 것도 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0017] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2003-0033638호 (2003.05.01)

(특허문헌 0002) 미국특허공보 제4,559,304호 (1985.12.17)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 양이온화 아텔로콜라겐을 제조한 후 이를 이용하여 췌도세포를 배양하는 방법 및 췌도세포 이식용 담체를 제조하는 방법 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 양이온화 아텔로콜라겐 또는 가교화된 아텔로콜라겐 지지체를 이용하여 췌도세포의 생존율 및/또는 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높이기 위한 췌도세포의 배양방법, 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 췌도세포 이식용 담체 그리고 이를 이용하여 제조된 인공췌장을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0020] 추가로, 본 발명은 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 안정성이 우수한 췌도세포 이식용 담체를 제공함으로써 배양 및 이식된 췌도세포의 생존율을 높이면서 동시에 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있는 인공췌장의 제조를 위한 기반기술을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 일실시예의 췌도세포 이식용 담체의 제조방법은, (a) 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액을 혼합하는 단계와, (b) 상기 (a) 단계에서 혼합된 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액의 혼합 용액에 췌도세포를 혼합하는 단계와, (c) 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액과의 혼합 용액에 둘러싸이면서 췌도세포가 혼합된 췌도세포 복합체를 형성하는 단계와, (d) 상기 (c) 단계에서 형성된 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액과의 혼합 용액에 둘러싸이면서 췌도세포가 혼합된 췌도세포 복합체를 킬레이팅제(chelating agent)에 침적하여, 췌도세포가 내부에 수용된 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드를 생성하는 단계를 포함한다.

[0022] 본 발명의 일실시예의 췌도세포 이식용 담체의 제조방법은, 상기 (d) 단계에서 생성된 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드에 면역 장벽(immune barrier)을 형성하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 면역 장벽에 의해 당뇨병 환자에게 이식되는 췌도세포가 환자에게서 면역반응을 유발하는 것을 방지하거나 최소화하여 치료 부작용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 췌도세포 이식용 담체에 의해 수송되는 췌도세포의 생존율을 높일 수 있다.

[0023] 예를 들어, 상기 면역 장벽은 상기 (d) 단계에서 생성된 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드를 폴리-L-리신

(Poly-L-Lysine) 용액에 침적시킴으로써 형성될 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고, 본 발명의 기술분야에서 세포 담체에 사용될 수 있는 면역 장벽이라면 어느 것이라도 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드에 적용할 수 있음은 물론이다.

[0024] 또한, 본 발명의 일실시예의 체도세포 이식용 담체의 제조방법은, 상기 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드에 직접 또는 상기 면역 장벽에 추가적인 알지네이트 코팅을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 추가적인 알지네이트 코팅에 의해 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드는 종래의 에스테르화 콜라겐 비드에 비해 안정성이 더욱 향상되어 내부에 수용된 체도세포를 배양하는 동안에 그 형태를 장기간 유지할 수 있고 이에 따라 체도세포의 환자로의 전달효과를 향상시킬 수 있는 동시에 체도세포의 생존율을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0025] 본 발명의 일실시예의 체도세포 이식용 담체의 제조방법에 있어서, 상기 킬레이팅제는 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액과의 혼합 용액 내의 양이온화 아텔로콜라겐 및 알지네이트를 킬레이팅하는 금속이온의 킬레이팅 화합물을 의미하며, 예를 들어 염화칼슘 용액일 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고, 양이온화 아텔로콜라겐 및 알지네이트를 킬레이팅할 수 있는 금속이온의 킬레이팅 화합물이라면 어느 것이라도 사용가능함은 물론이다.

[0026] 본 발명의 바람직한 일실시예의 체도세포 이식용 담체의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계에서 혼합되는 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액의 중용량 백분율농도 비율은 1:2인 것이 바람직하다.

[0027] 한편, 본 발명의 일실시예의 체도세포 이식용 담체는 예를 들어, 전술한 바와 같은 체도세포 이식용 담체의 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예의 체도세포 이식용 담체는 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드 상에 형성된 면역 장벽 (immune barrier)을 더 포함하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하기로는 상기 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드 상에 직접 형성되거나 또는 상기 면역 장벽 상에 형성된 알지네이트 코팅을 더 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 일실시예의 인공체장은 전술한 바와 같은 양이온화 아텔로콜라겐 및 알지네이트를 포함하는 비드(양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드) 형태의 체도세포 이식용 담체와, 상기 체도세포 이식용 담체 내부에 수용된 체도세포를 포함한다.

[0030] 본 발명의 일실시예의 인공체장은 상기 체도세포 이식용 담체의 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드 상에 형성된 면역 장벽(immune barrier)을 더 포함하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하기로는 상기 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드 상에 직접 형성되거나 또는 상기 면역 장벽 상에 형성된 알지네이트 코팅을 더 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 일실시예의 아텔로콜라겐을 이용하여 체도세포를 배양하는 방법은, (a) 양이온화 아텔로콜라겐 용액을 준비하는 단계와, (b) 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액에 체도세포를 접종하거나, 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액을 배양 용기에 도포하여 건조시켜 양이온화 아텔로콜라겐 지지체를 형성한 후 상기 양이온화 아텔로콜라겐 지지체 상에 체도세포를 접종하는 단계와, (c) 상기 (b) 단계에서 접종된 체도세포를 상기 양이온화 아텔로콜라겐 용액 내에서 또는 상기 양이온화 아텔로콜라겐 지지체 상에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0032] 본 발명의 일실시예의 아텔로콜라겐을 이용하여 체도세포를 배양하는 방법은, (a) 아텔로콜라겐 용액을 준비하는 단계와, (b) 상기 아텔로콜라겐 용액을 배양 용기에 도포하여 건조시켜 아텔로콜라겐 지지체를 형성한 후 상기 아텔로콜라겐 지지체를 가교화시킨 다음, 가교화된 아텔로콜라겐 지지체 상에 체도세포를 접종하는 단계와, (c) 상기 (b) 단계에서 접종된 체도세포를 상기 가교화된 아텔로콜라겐 지지체 상에서 배양하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 (b) 단계에 있어서, 상기 아텔로콜라겐 지지체에 가교화제를 함유하는 용액을 첨가하여 반응시킴으로써 상기 아텔로콜라겐 지지체의 가교화를 유도할 수 있다. 예를 들어, 가교화제는 EDC[1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide] 또는 글루타르알데히드일 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따르면 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 수득된 양이온화 아텔로콜라겐 또는 가교화된 아텔로콜라겐 지지체를 이용하여 체도세포를 효율적으로 배양할 수 있으며, 양이온화 아텔로콜라겐을 이용하여 안정성이 우수한 체도세포 이식용 담체 및 인공체장을 제공할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따르면 고순도의 아텔로콜라겐을 이온화시키는 과정을 통하여 수득된 양이온화 아텔로콜라겐 또는 가교화된 아텔로콜라겐 지지체를 이용하여 체도세포의 배양시 체도세포의 생존율 및/또는 글루코오스 의존적인 인

슐린 분비량을 높일 수 있고, 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 안정성이 우수한 웨도세포 이식용 담체를 제공함으로써 배양 및 이식된 웨도세포의 생존율을 높이면서 동시에 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 양이온화 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 이온화되지 않은 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 음이온화 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 폴리-L-리신이 형성된 배양접시 및 음성 대조군의 배양접시에서 웨도세포를 배양한 후 1주가 경과한 시점에서 배양된 웨도세포를 CKX41 올림푸스 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영한 현미경 사진이다.

도 2는 양이온화 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 이온화되지 않은 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 음이온화 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시, 폴리-L-리신이 형성된 배양접시 및 음성 대조군의 배양접시에서 웨도세포를 배양한 후 5주가 경과한 시점에서 배양된 웨도세포를 CKX41 올림푸스 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영한 현미경 사진이다.

도 3은 양이온화 아텔로콜라겐(CC), 음이온화 아텔로콜라겐(AC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC), 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)(PLL) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량을 농도값으로서 비교도시한 그래프이다.

도 4는 양이온화 아텔로콜라겐(CC), 음이온화 아텔로콜라겐(AC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC), 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)(PLL) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량을 자극 지수로서 비교도시한 그래프이다.

도 5는 양이온화 아텔로콜라겐 지지체(CC), 음이온화 아텔로콜라겐 지지체(AC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 웨도세포의 생존율을 측정하기 위하여, 웨도세포의 배양 후 1일, 3주 및 8주가 경과한 시점에서 각각의 배양 그룹의 웨도 세포 수를 계수하여 비교한 막대그래프이다.

도 6은 L929 세포에 대해 배양 후 3일째 및 7일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과와, 래트의 MSC 세포에 대해 배양 후 3일째 및 7일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 웨도세포 이식용 담체와 대조군인 알지네이트 비드에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후 1일째와 1주일째의 인슐린 분비량을 농도값으로서 비교도시한 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 웨도세포 이식용 담체와 대조군인 알지네이트 비드에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후 1일째와 1주일째의 인슐린 분비량을 자극 지수로서 비교도시한 그래프이다.

도 8은 본 발명의 웨도세포 이식용 담체인 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드의 내부에 수용된 웨도세포와, 대조군 담체인 알지네이트 비드의 내부에 수용된 웨도세포에 대해 FDA/PI 염색을 수행한 후 형광현미경으로 촬영한 사진이다.

도 9는 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐(CLEC), 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐(CLSC), 가교화된 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)(CLNC), 양이온화 아텔로콜라겐(EC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량을 농도값으로서 비교도시한 그래프이다.

도 10은 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐(CLEC), 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐(CLSC), 가교화된 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)(CLNC), 양이온화 아텔로콜라겐(EC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 웨도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량을 자극 지수로서 비교도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본

발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌은 본 발명에 참고로서 통합된다.

실시예 1: 양이온화 아텔로콜라겐 및 음이온화 아텔로콜라겐의 제조

우선, 이온화되지 않은 아텔로콜라겐은 당업계에 널리 알려진 동물조직의 전처리 과정, 텔로캡타이드 제거 및 아텔로 콜라겐의 추출 과정을 통해 제조한다(예를 들어 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0125772호 참조).

실시예 1-1: 양이온화 아텔로콜라겐 제조방법

본 발명의 일실시예의 채도세포의 배양 및 채도세포 이식용 담체의 제조에 사용되는 양이온화 아텔로 콜라겐의 제조방법은 다음과 같다.

① 70~90% 에탄올(또는 메탄올)에 1~5 중량%에 해당하는 아텔로 콜라겐(대한민국 공개특허공보 제10-2011-0125772호에 기술된 방법에 따라 분리정제된 것 또는 상업적으로 구입가능한 것 모두 사용가능)을 넣은 분산액에 0.5~1M 초산(acetic acid) 또는 0.1~0.5M HCl을 넣어 pH 2~4로 조절한 후 4℃에서 4~10일 동안 교반한다.

② 상기 ①번 과정에서 얻은 아텔로 콜라겐 분산액을 0.1~0.5M NaOH를 이용하여 pH를 7.4로 조정한 후 원심분리하여 침사만 얻는다.

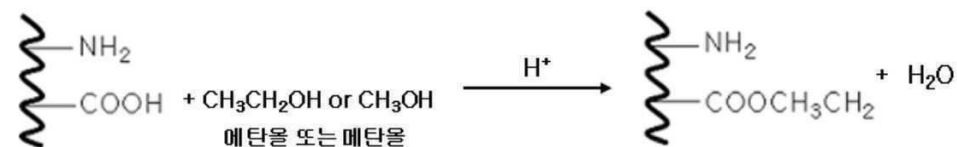
③ 상기 ②번 과정에서 얻은 침사를 1g당 10~100mL 정도의 비율의 정제수에 교반한 후 투석 멤브레인(dialysis membrane)에 넣어 정제수(dialysis buffer) 내에서 투석(dialysis)을 실시한다.

④ 16~24시간 동안 교반한 후 정제수(dialysis buffer)를 교체하고, 그 후에는 3~5시간 마다 정제수(dialysis buffer)를 3~12번 교체한다.

⑤ 상기 ③번 과정 및 ④번 과정을 통해 투석된 양이온화 아텔로 콜라겐 침사를 -70℃에서 30시간 이상 동결건조하고, 동결건조된 양이온화 아텔로 콜라겐을 얻는다.

전술한 바와 같은 제조공정을 통해 아텔로 콜라겐이 양이온화되는 반응을 나타내는 반응식은 다음과 같다.

반응식 1



한편, 기존의 방법을 이용한 양이온화 아텔로 콜라겐 제조방법에서는 수율과 순도 향상을 위해 단순히 정제수를 이용한 투석만을 수행하는 반면에, 본 발명의 일실시예의 양이온화 아텔로콜라겐 제조방법에서는 에탄올 또는 메탄올에 아텔로 콜라겐을 넣은 아텔로 콜라겐 분산액을 중성화시키고, 원심분리하여 침사만을 얻은 후 투석 멤브레인을 이용하여 투석을 수행하여 순도 및 수율을 향상시켰다.

실시예 1-2: 대조군인 음이온화 아텔로콜라겐 제조방법

한편, 본 발명의 양이온화 아텔로콜라겐을 이용한 채도세포의 배양방법 및 채도세포 이식용 담체의 우수성을 입증하기 위해 비교대상이 되는 대조군으로서 음이온화 아텔로콜라겐을 다음과 같은 과정에 따라 제조하였다.

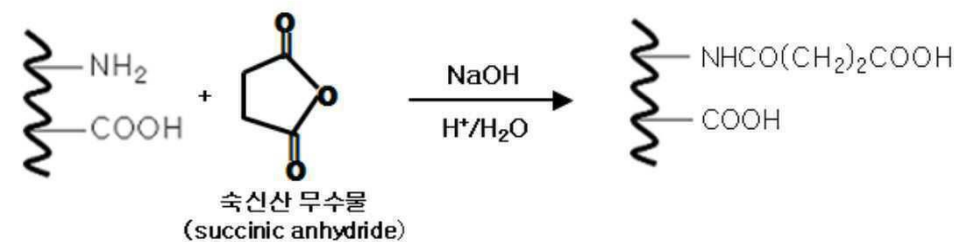
① 0.1M 초산 용액에 0.002~0.01 중량%에 해당하는 아텔로 콜라겐(대한민국 공개특허공보 제10-2011-0125772호에 기술된 방법에 따라 분리정제된 것 또는 상업적으로 구입가능한 것 모두 사용가능)을 넣고 4℃에서 1~2일간 교반시켜 아텔로 콜라겐을 용해시킨다.

② 상기 ①번 과정에서 얻은 아텔로 콜라겐 용액에, 상기 ① 과정에서 첨가한 아텔로 콜라겐 1g당 0.8~1.3g 정도의 비율로 숙신산 무수물(succinic anhydride)을 넣고, 10분 동안 0.05~1M NaOH를 이용하여 pH를 9~10 근처

로 유지시킨다.

- [0054] ③ 상기 ②번 과정에서 얻은 용액을 4℃에서 30분 동안 교반시킨다.
- [0055] ④ 상기 ③번 과정에서 교반한 용액을 0.05~1M NaOH를 이용하여 10분 동안 pH를 9~10근처로 유지시킨다.
- [0056] ⑤ 상기 ④번 과정에서 얻은 용액을 4℃에서 30분 동안 교반시킨다.
- [0057] ⑥ 상기 ⑤번 과정에서 교반한 용액을 0.05~1M NaOH를 이용하여 10분 동안 pH를 9~10근처로 유지시킨다.
- [0058] ⑦ 상기 ⑥번 과정에서 얻은 용액을 4℃에서 20분 동안 교반시킨다.
- [0059] ⑧ 상기 ⑦번 과정에서 교반한 용액을 0.05~1M NaOH를 이용하여 10분 동안 pH를 9~10근처로 유지시킨다.
- [0060] ⑨ 상기 ⑧번 과정에서 얻은 용액을 4℃에서 10분 동안 교반시킨다.
- [0061] ⑩ 상기 ⑨번 과정에서 교반한 용액을 0.05~1M NaOH를 이용하여 pH 9~10으로 조절한다.
- [0062] ⑪ 상기 ⑩번 과정에서 얻은 용액을 3~7M HCl을 이용하여 pH 4.03으로 조절하여 음이온화 아텔로콜라겐 침사를 형성시키고, 4℃에서 15분 동안 교반한다.
- [0063] ⑫ 상기 ⑪번 과정에서 교반한 용액을 원심분리하여 음이온화 아텔로콜라겐 침사를 얻는다.
- [0064] ⑬ 상기 ⑫ 과정에서 얻은 아텔로콜라겐 침사에, 상기 ①번 과정에서 첨가한 아텔로 콜라겐 1g당 20mL 정도의 비율로 3~7M HCl을 이용하여 pH 4.03으로 조절된 증류수를 첨가하고, 4℃에서 15분 동안 교반하여 세정한다.
- [0065] ⑭ 상기 ⑬번 과정에서 얻은 용액을 원심분리하여 세정된 음이온화 아텔로콜라겐 침사를 얻는다.
- [0066] ⑮ 상기 ⑬번 과정과 ⑭번 과정을 한번 더 반복하여 얻은 세정된 음이온화 아텔로콜라겐 침사를 -70℃에서 30시간 동안 동결건조하여 최종적으로 음이온화 아텔로콜라겐을 얻는다.
- [0067] 전술한 바와 같은 제조공정을 통해 아텔로 콜라겐이 음이온화되는 반응을 나타내는 반응식은 다음과 같다.

반응식 2



[0070] 한편, 기존의 방법을 이용하여 음이온화 콜라겐을 제조할 경우 숙신산 무수물의 pH가 너무 낮아도 또는 너무 높아도 용해되지 않는 문제가 있다. 숙신산 무수물은 pH가 9~10 정도일 때 용해가 가장 잘 되며 pH가 11이상이 될 경우에는 용해가 되지 않는다. 본 발명자들은 아텔로 콜라겐과 숙신산 무수물의 반응에 따라 pH가 변화되면 숙신산 무수물의 용해도가 떨어져 반응속도가 떨어지고 수율이 낮아지는 문제점을 감안하여 이들 반응용액의 pH를 반복하여 9~10으로 유지하는 공정(상기 ③~⑪ 과정)을 도입하였다.

[0071] 즉, 전술한 바와 같은 음이온화 아텔로콜라겐 제조방법에서는 저온에서 일정 시간 동안 아텔로 콜라겐과 숙신산 무수물의 반응물을 교반한 후 교반한 용액을 일정 시간 동안 pH 9~10으로 유지함으로써 숙신산 무수물의 용해가 잘 일어나도록 하여 음이온화 반응을 촉진하였다.

실시예 2: 콜라겐 지지체 상에서의 체도세포의 배양

[0073] 본 발명의 양이온화 아텔로콜라겐을 이용한 체도세포 배양방법의 우수성을 확인하기 위해 다음과 같은 과정에 따라 콜라겐 지지체 상에서 체도세포를 배양하였다.

- [0074] ① 1.5 중량%의 제1형 아텔로콜라겐 현탁액(이온화되지 않은 아텔로콜라겐 현탁액)(대한민국 공개특허공보 제 10-2011-0125772호에 기술된 방법에 따라 분리정제된 것 또는 상업적으로 구입가능한 것 모두 사용가능하며 이후 기술되는 실시예에서 동일), 양이온화 아텔로콜라겐 용액(실시에 1-1에 따라 제조된 것이며 이후 기술되는 실시예에서 동일), 그리고 음이온화 아텔로콜라겐 용액(실시에 1-2에 따라 제조된 것이며 이후 기술되는 실시예에서 동일)을 제조하여 pH 7.4로 조정한다.
- [0075] ② 상기 ①번 과정에서 제조된 아텔로콜라겐 현탁액, 양이온화 아텔로콜라겐 용액 및 음이온화 아텔로콜라겐 용액을 각각 멀티 웰(multi-well) 배양접시에 도포하여 완전히 건조시킨다.
- [0076] ③ 위에서 분리한 췌도세포 50여개를 계수하고, 이들을 상기 ②번 과정에서 배양접시에 형성된 양이온화 아텔로콜라겐 지지체, 아텔로콜라겐 지지체, 그리고 음이온화 아텔로콜라겐 지지체에 접종(seeding)시킨 후 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 RPMI-1640 배양액을 1ml씩 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 배양한다. 또한, 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)이 처리된 배양접시와 아무 것도 처리하지 않은 음성 대조군(Negative control)의 배양접시에도 위와 동일하게 췌도세포를 접종하고 배양한다. 그리고, 배양 접시에서의 췌도 세포의 배양을 관찰한다.
- [0077] 도 1은 전술한 바와 같은 과정으로 췌도 세포를 배양한 후 1주가 경과한 시점에 배양접시에서 배양된 췌도세포를 CKX41 올림푸스 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영한 현미경 사진으로서, 음성 대조군의 배양접시(Negative Control), 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)이 처리된 배양접시 그리고 음이온화 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양 접시 상에서 배양된 췌도세포들은 터지면서 사멸되기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0078] 또한, 도 2는 배양 후 5주가 경과한 시점에 배양접시에서 배양된 췌도세포를 CKX41 올림푸스 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영한 현미경 사진으로서, 음이온화 아텔로콜라겐(Anionized Collagen) 지지체가 형성된 배양 접시와 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)이 처리된 배양접시 상에서 배양한 췌도세포의 경우 음성 대조군과 비슷하게 대부분의 췌도세포들이 사멸한 것을 관찰할 수 있었으나, 양이온화 아텔로콜라겐(Cationized Collagen) 지지체가 형성된 배양 접시와 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(Native collagen) 지지체가 형성된 배양 접시 상에서 배양한 췌도세포는 많은 수가 아직 그 형태를 유지하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0079] 따라서, 이온화된 아텔로콜라겐 지지체 상에서 일반 세포의 배양이 잘 이루어지는 것과는 대조적으로, 췌도세포는 음이온화 아텔로콜라겐으로 제조한 지지체 상에서는 배양이 잘 이루어지지 않고 대부분 사멸하는 반면에 양이온화 아텔로콜라겐으로 제조한 지지체 상에서는 그 형태를 유지하면서 높은 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0080] **실시에 3: 글루코오스 자극을 통한 췌도세포의 인슐린 분비 유도**
- [0081] 본 발명의 양이온화 아텔로콜라겐을 이용한 췌도세포 배양방법의 우수성을 확인하기 위해 다음과 같은 과정에 따라 콜라겐 지지체 상에서 췌도세포를 배양하고 콜라겐 지지체 상에서 배양된 췌도세포의 인슐린 분비를 유도하였다.
- [0082] ① 상기 실시에 2의 과정에 따라 배양하고 하루가 지난 췌도세포(총 5가지 종류)의 배양액만을 취하여 버린 후, KRHB (Kreb's and Ringer's HEPES Bicarbonate, pH 7.4) 완충액을 가하여 세척하고 세척에 사용된 KRHB 완충액만을 버린다.
- [0083] ② 다시 KRHB 완충액 1ml를 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 췌도세포를 30분간 배양한 후 KRHB 완충액만을 취하여 버리고 3.3mM의 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액 1ml를 가한다. 그리고 나서 37℃의 CO₂ 배양기에서 췌도세포를 1시간 동안 배양한 후 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액을 취해 냉동보관한다.
- [0084] ③ 또한, 췌도세포에 20mM의 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액 1ml를 가하고 37℃의 CO₂ 배양기에서 췌도세포를 1시간 동안 배양한 후 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액을 취해 냉동보관한다.
- [0085] ④ 그리고, 췌도세포에 1ml의 RPMI-1640 배양액을 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 췌도세포를 6일간 배양한 후 전술한 바와 같은 ②번 과정 및 ③번 과정의 글루코오스 자극을 반복하고, 이후에는 글루코오스 자극을 1주일 단위로 수행하되 총 8주간 반복한다.

[0086] **실시예 4: GSI (Glucose Stimulation Index)의 측정**

[0087] 실시예 2에 따라 각각 배양된 총 5가지 종류의 췌도세포를 실시예 3에 따라 글루코오스로 자극한 후 글루코오스의존적인 인슐린 분비 활성을 측정하였다.

[0088] 실시예 3에서 ②번 과정 및 ③번 과정에 따라 글루코오스 자극 후 취한 완충액을 1/100으로 희석한 시료를 이용하여 인슐린 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 수행하였다.

[0089] 도 3에는 양이온화 아텔로콜라겐(CC), 음이온화 아텔로콜라겐(AC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC), 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)(PLL) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 췌도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량이 농도값으로서 비교도시되어 있다. 또한 도 4에는 양이온화 아텔로콜라겐(CC), 음이온화 아텔로콜라겐(AC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC), 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine)(PLL) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 췌도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량이 자극 지수로서 비교도시되어 있다.

[0090] 이러한 도 3 및 도 4의 결과에 따르면, 배양 1일차의 췌도세포의 인슐린 분비는 비슷한 수준이었고, 배양 1주차의 췌도세포의 인슐린 분비는 무처리(음성 대조군)(N)의 배양접시에서 배양된 췌도 세포에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로 폴리-L-리신(PLL), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC), 양이온화 아텔로콜라겐(CC) 및 음이온화 아텔로콜라겐(AC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도세포 순서였다. 그러나 무처리의 음성 대조군과 폴리-L-리신 상에서 배양한 췌도세포의 인슐린 분비는 글루코오스 비의존적인 양상을 보여주었다.

[0091] 또한, 배양 2주차의 췌도세포의 인슐린 분비는 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로 양이온화 아텔로콜라겐(CC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹, 폴리-L-리신 상에서 배양한 췌도 세포 그룹 순서였다. 그러나, 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC)이 처리된 배양접시에서 배양한 췌도 세포 그룹의 인슐린 분비는 글루코오스 비의존적인 양상을 보여주었다.

[0092] 그리고, 배양 4주차의 췌도세포의 인슐린 분비는 양이온화 아텔로콜라겐(CC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹에서 가장 높게 나타났고, 다음이 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹이었다. 그러나, 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹의 인슐린 분비는 글루코오스 비의존적인 양상을 보여주었다.

[0093] 이러한 결과들을 종합할 때, 양이온화 아텔로콜라겐(CC)이 처리된 배양접시에서 배양된 췌도 세포 그룹 만이 전체 배양기간 동안 일정 수준의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비를 보여주었음을 확인할 수 있었고, 이로부터 아텔로콜라겐을 양이온화시켜 제조한 양이온화 아텔로콜라겐 지지체에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성이, 일반 아텔로콜라겐 또는 음이온화 아텔로콜라겐으로 제조한 지지체에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성 보다 월등히 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[0094] **실시예 5: 가교화된 콜라겐 지지체 상에서의 췌도세포의 배양**

[0095] 본 발명의 가교화된 아텔로콜라겐을 이용한 췌도세포 배양방법의 우수성을 확인하기 위해 다음과 같은 과정에 따라 가교화된 콜라겐 지지체 상에서 췌도세포를 배양하였다.

[0096] ① 1.5 중량%의 제1형 아텔로콜라겐 현탁액(이온화되지 않은 아텔로콜라겐 현탁액), 양이온화 아텔로콜라겐 용액, 그리고 음이온화 아텔로콜라겐 용액을 제조하여 pH 7.4로 조정한다.

[0097] ② 상기 ①번 과정에서 제조된 아텔로콜라겐 현탁액, 양이온화 아텔로콜라겐 용액 및 음이온화 아텔로콜라겐 용액을 각각 멀티 웰(multi-well) 배양접시에 도포하여 완전히 건조시킨다.

[0098] ③ 95% 에탄올에 EDC를 200mM의 농도로 녹이고, 이로부터 얻은 혼합용액을, 상기 ②번 과정에서 멀티 웰 배양접시에 도포·건조되어 형성된 각각의 아텔로 콜라겐 지지체에 1ml씩 분주한 뒤 4℃에서 24시간 동안 반응시켜 아텔로 콜라겐 지지체의 가교화를 유도한다.

[0099] ④ 상기 ③번 과정 완료 후 상기 멀티 웰 배양접시를 1X PBS로 10회 세척하여 에탄올 및 EDC를 제거한다.

[0100] ⑤ 위에서 분리한 췌도세포 50여개를 계수하고, 이들을 상기 ③번 과정을 통해 형성된 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐 지지체, 가교화된 아텔로콜라겐 지지체(이온화되지 않은 것), 그리고 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐

지지체에 접종(seeding)시킨 후 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 RPMI-1640 배양액을 1ml씩 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 배양한다. 또한, 비교를 위해 양이온화 아텔로콜라겐 및 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)이 각각 코팅된 배양접시와 아무 것도 처리하지 않은 음성 대조군(Negative control)의 배양접시에도 위와 동일하게 채도세포를 접종하고 배양한다(단, 숙신산 무수물에 의해 제조된 음이온화 아텔로콜라겐을 가교화하지 않고 코팅한 배양접시에서 채도세포를 배양하는 경우는 배양액에 의해 음이온화 아텔로콜라겐 코팅이 녹아 없어져서 실험 대상에서 제외함).

[0101] **실시예 6: 글루코오스 자극을 통한 채도세포의 인슐린 분비 유도**

[0102] 본 발명의 가교화된 아텔로콜라겐을 이용한 채도세포 배양방법의 우수성을 확인하기 위해 다음과 같은 과정에 따라 콜라겐 지지체 상에서 채도세포를 배양하고 콜라겐 지지체 상에서 배양된 채도세포의 인슐린 분비를 유도하였다.

[0103] ① 상기 실시예 5의 과정에 따라 배양하고 하루가 지난 채도세포(총 6가지 종류)의 배양액만을 취하여 버린 후, KRHB (Kreb's and Ringer's HEPES Bicarbonate, pH 7.4) 완충액을 가하여 세척하고 세척에 사용된 KRHB 완충액만을 버린다.

[0104] ② 다시 KRHB 완충액 1ml를 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 채도세포를 30분간 배양한 후 KRHB 완충액만을 취하여 버리고 3.3mM의 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액 1ml를 가한다. 그리고 나서 37℃의 CO₂ 배양기에서 채도세포를 1시간 동안 배양한 후 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액을 취해 냉동보관한다.

[0105] ③ 또한, 채도세포에 20mM의 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액 1ml를 가하고 37℃의 CO₂ 배양기에서 채도세포를 1시간 동안 배양한 후 글루코오스를 포함하는 KRHB 완충액을 취해 냉동보관한다.

[0106] ④ 그리고, 채도세포에 1ml의 RPMI-1640 배양액을 가하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 채도세포를 6일간 배양한 후 전술한 바와 같은 ②번 과정 및 ③번 과정의 글루코오스 자극을 반복하고, 이후에는 글루코오스 자극을 1주일 단위로 수행하되 총 4주간 반복한다.

[0107] **실시예 7: GSI (Glucose Stimulation Index)의 측정**

[0108] 실시예 5에 따라 각각 배양된 총 6가지 종류의 채도세포를 실시예 7에 따라 글루코오스로 자극한 후 글루코오스의 의존적인 인슐린 분비 활성을 측정하였다.

[0109] 실시예 6에서 ②번 과정 및 ③번 과정에 따라 글루코오스 자극 후 취한 완충액을 1/100으로 희석한 시료를 이용하여 인슐린 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 수행하였다.

[0110] 도 9에는 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐(CLEC), 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐(CLSC), 가교화된 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)(CLNC), 양이온화 아텔로콜라겐(EC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 채도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량이 농도값으로서 비교도시되어 있다. 또한 도 10에는 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐(CLEC), 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐(CLSC), 가교화된 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)(CLNC), 양이온화 아텔로콜라겐(EC), 이온화되지 않은 아텔로콜라겐(NC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 채도세포에 대하여 저농도(3.3mM) 및 고농도(20mM)의 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량이 자극 지수로서 비교도시되어 있다.

[0111] 이러한 도 9 및 도 10의 결과에 따르면, 가교화된 양이온화 아텔로콜라겐 지지체(CLEC), 가교화된 음이온화 아텔로콜라겐 지지체(CLSC) 및 가교화된 아텔로콜라겐 지지체(이온화되지 않은 것)(CLNC)가 형성된 배양접시에서 배양된 채도세포의 인슐린 분비가 가교화되지 않은 양이온화 아텔로콜라겐(EC) 또는 아텔로콜라겐(이온화되지 않은 것)(NC)이 코팅된 배양접시에서 배양된 채도세포의 인슐린 분비 보다 전반적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 경향은 고농도 글루코오스로 채도세포를 자극한 경우 배양 4주차에서 더욱 확연하게 나타났다.

[0112] 이러한 결과들을 종합할 때, 가교화된 아텔로콜라겐 지지체가 형성된 배양접시에서 배양된 채도 세포 그룹에서 전체 배양기간 동안 높은 수준의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비를 보여주었음을 확인할 수 있었고, 이로부터

가교화된 아테로콜라겐 지지체에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성이, 가교화되지 않은 아테로콜라겐에서 배양한 췌도세포의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 활성 보다 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[0113] **실시예 8: 췌도세포 생존율의 측정 및 비교**

[0114] 도 1 및 도 2에서 췌도세포는 음이온화 아테로콜라겐으로 제조한 지지체 상에서는 배양이 잘 이루어지지 않고 대부분 사멸하는 반면에 양이온화 아테로콜라겐으로 제조한 지지체 상에서는 그 형태를 유지하면서 높은 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었는데, 이를 생존율로 정량화하는 작업을 본 실시예에서는 수행하였다.

[0115] 즉, 본 실시예에서는 양이온화 아테로콜라겐 지지체(CC), 음이온화 아테로콜라겐 지지체(AC) 및 음성대조군(negative control)(N) 상에서 각각 배양한 췌도세포의 생존율을 측정하기 위하여, 췌도세포의 배양 후 1일, 3주 및 8주가 경과한 시점에서 각각의 배양 그룹의 췌도 세포 수를 계수하여 비교하였다. 그 결과를 도 5에 막대 그래프로 도시하였다. 도 5에 도시된 바와 같이 양이온화 아테로콜라겐 지지체(CC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹은 배양 후 3주째에 38.8%의 생존율을 나타낸 반면에, 음이온화 아테로콜라겐 지지체(AC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹의 경우는 30.3% 그리고 음성 대조군의 경우는 16.4%의 생존율을 나타내어 양이온화 아테로콜라겐 지지체(CC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹이 높은 생존율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0116] 또한, 배양 후 8주째에 양이온화 아테로콜라겐 지지체(CC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹은 21.4%의 생존율을 나타낸 반면에, 음이온화 아테로콜라겐 지지체(AC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹의 경우는 16.5% 그리고 음성 대조군의 경우는 3.6%의 생존율을 나타내어 양이온화 아테로콜라겐 지지체(CC) 상에서 배양된 췌도 세포 그룹은 비교대상의 췌도 세포 그룹에 비해 높은 생존율을 나타낼 뿐만아니라 장기간 배양시에도 췌도 세포의 생존율을 일정 수준 이상으로 유지시킬 수 있었다. 따라서, 본 발명의 양이온화 아테로콜라겐을 이용한 췌도세포의 배양 방법 및 후술하는 췌도세포 이식용 담체는 당뇨병 치료를 위해 췌도 세포를 이식할 경우 췌도세포의 공급이 부족한 종래기술의 문제점을 해결할 수 기술임을 재차 확인할 수 있었다.

[0117] **실시예 9: 이온화 콜라겐이 세포의 증식에 미치는 영향 확인**

[0118] 본 실시예에서는 양이온화 아테로콜라겐 지지체 상에서 배양한 췌도세포의 생존율 향상 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 향상과 관련하여 양이온화 아테로콜라겐이 모든 종류의 세포에 대해 동일하게 미치는 효과인지 아니면 세포특이적으로 미치는 효과인지를 확인하는 실험을 다음과 같이 수행하였다.

[0119] **(1) 이온화 콜라겐의 코팅**

[0120] ① 1.5% 중량의 제1형 아테로콜라겐 현탁액, 양이온화 아테로콜라겐 용액 그리고 음이온화 아테로콜라겐 용액을 제조하여 pH 7.4로 조정한다.

[0121] ② 상기 ①번 과정에서 제조된 아테로콜라겐 현탁액, 양이온화 아테로콜라겐 용액 및 음이온화 아테로콜라겐 용액을 각각 멀티 웰(multi-well) 배양접시에 도포하여 완전히 건조시킨다.

[0122] ③ 95%의 에탄올에 용해시킨 200mM EDC 용액을 상기 ②번 과정에서 준비된 멀티 웰(multi-well) 배양접시의 각각의 웰에 분주 후 24시간 동안 처리하여 콜라겐의 가교화를 유도한다.

[0123] ④ 1X PBS 완충액으로 상기 ③번 과정에서 처리된 각각의 웰을 10회 세척하여 EDC와 에탄올을 제거한다.

[0124] ⑤ 상기 ④번 과정이 완료된 멀티 웰 배양접시를 자외선으로 1시간 동안 살균 처리한다.

[0125] **(2) 세포의 배양 및 MTT 어세이**

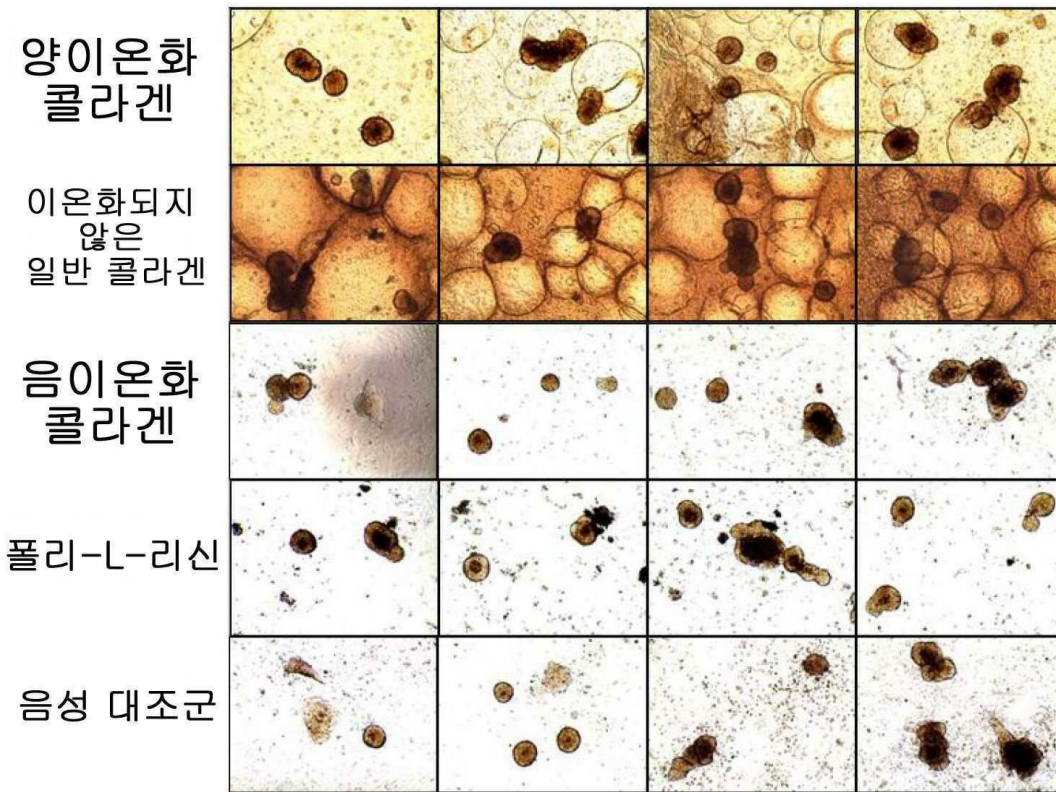
[0126] ① 상기 (1)번 과정에서 준비된 배양접시와 조직 배양액이 처리된 배양접시(도 6에서 기호 "C"로 표시)에 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast)인 L929 세포(0.8×10^4 개)와 래트의 MSC 세포(0.8×10^4 개)를 접종(seeding)하여 각각 3일 및 7일 동안 배양한다.

- [0127] ② 1X PBS 완충액에 용해시킨 MTT 시약 (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 5mg/ml)을 배양액의 1/10 비율로 첨가한 후 37℃에서 4시간 배양한다.
- [0128] ③ 배양액을 제거한 후 1ml의 DMSO를 가하여 반응 생성물을 녹여내고, 540nm에서 L929 세포 및 래트의 MSC 세포에 대해 배양 후 3일째 및 7일째 흡광도를 측정하여 MTT 어세이를 수행한다.
- [0129] 그 결과는 도 6에 도시된 바와 같다($n=4$, $\text{mean} \pm \text{SE}$, $* p < 0.05$). 도 6의 a는 L929 세포에 대해 배양 후 3일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과이고, 도 6의 b는 L929 세포에 대해 배양 후 7일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과이다. 또한, 도 6의 c는 래트의 MSC 세포에 대해 배양 후 3일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과이고, 도 6의 d는 래트의 MSC 세포에 대해 배양 후 7일째 흡광도를 측정한 MTT 어세이 결과이다.
- [0130] 상기 MTT 어세이 결과에 따르면, L929 세포는 배양 시간이 경과할 수록(배양 후 7일째) 음이온화 아텔로콜라겐 필름(AC) 상에서 세포의 증식이 저해되었으나, 양이온화 아텔로콜라겐 필름(CC)과 일반 아텔로콜라겐 필름(NC) 상에서의 세포 증식의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(도 6의 b 참조). 반면에, 래트의 MSC 세포는 배양 시간이 경과할 수록(배양 후 7일째) 음이온화 아텔로콜라겐 필름(AC) 상에서 배양한 경우 양이온화 아텔로콜라겐 필름(CC) 및 일반 아텔로콜라겐 필름(NC) 상에서 배양할 때보다 세포 증식이 증가됨을 확인할 수 있었다(도 6의 d 참조).
- [0131] 즉, L929 세포와 래트의 MSC 세포는 이온화된 아텔로콜라겐 필름 상에서 배양한 후 7일째의 증식결과가 서로에 대해 완전히 다른 것을 보여주었는데, L929 세포는 다른 아텔로콜라겐 필름(CC, NC)에 비해 음이온화 아텔로콜라겐 필름(AC) 상에서 증식이 저해되었으나, 래트의 MSC 세포는 다른 아텔로콜라겐 필름(CC, NC)에 비해 음이온화 아텔로콜라겐 필름(AC) 상에서 증식이 증가됨을 확인할 수 있었고, 이로부터 세포 증식은 세포특이적인 팩터(factor)이고 세포 생존율과 직접적인 상관관계를 나타내지 않는다는 것을 유추할 수 있었다.
- [0132] 결국, 세포 배양 과정에서 세포 부착과 세포 증식이 증가한다고 하더라도 이것이 세포의 생존율 증가와 해당 세포의 기능에 대한 긍정적인 영향과의 상관관계가 있다고 단정할 수 없기 때문에, 본 발명이 속한 기술분야에서는 세포특이적인 팩터인 세포 증식의 관점이 아닌 체도세포의 생존율과 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량의 증가의 관점에서 새로운 체도세포의 배양방법 및 안정성이 높은 체도 세포 이식용 담체의 개발이 필요하다고 할 수 있다.
- [0133] **실시예 10: 양이온화 아텔로콜라겐을 이용한 체도세포 이식용 담체의 제조방법**
- [0134] 본 실시예에서는 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 안정성이 우수한 체도세포 이식용 담체를 다음과 같은 과정에 따라 제조하였다.
- [0135] ① 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액을 혼합하여 그 농도가 각각 1%(w/v) 및 2%(w/v)가 되는 혼합용액을 제조한 후 이 혼합 용액에 체도세포를 혼합한다. 또한, 양이온화 아텔로콜라겐 용액과 알지네이트 용액을 혼합하여 그 농도가 각각 0.5%(w/v) 및 2%(w/v)가 되는 혼합 용액을 제조한 후 이 혼합 용액에 체도세포를 혼합한다. 그리고, 대조군으로 준비한 2% 알지네이트 용액에 체도세포를 혼합한다.
- [0136] ② 양이온화 아텔로콜라겐 및 알지네이트 혼합 용액에 체도세포가 혼합된 체도 세포 복합체를 작은 방울로 만든 후, 10mM의 HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid)와 2mM의 염화칼륨을 포함하는 100mM의 CaCl_2 용액에 떨어뜨려 5분간 침적시켜 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드를 생성한다. 또한, 대조군인 2% 알지네이트 용액에 체도세포가 혼합된 세포 복합체도 동일한 방식으로 처리하여 알지네이트 비드를 생성한다.
- [0137] ③ 상기 ②번 과정에서 생성된 비드를 KRH 완충용액(Krebs-Ringer-HEPES-glucose-glutamine buffer)에 1분간 세척하고, 다시 이 비드를 0.1% 폴리-L-리신(Poly-L-Lysine) 용액에 10분간 침적시킨 후 Ca^{2+} 이온이 없는 KRH 완충용액에 3분간 3회 세척한다.
- [0138] ④ 상기 ③번 과정에 의해 처리된 비드를 0.2% 알지네이트 용액에 5분간 침적시킨 후 알지네이트의 액화를 위하여 1mM의 EGTA를 포함하는 Ca^{2+} 이온이 없는 KRH 완충용액에 10분간 방치한 다음, KRH 완충용액에 3회 세척하여 본 발명의 일실시예의 체도세포 이식용 담체와 대조군 담체를 완성한다.

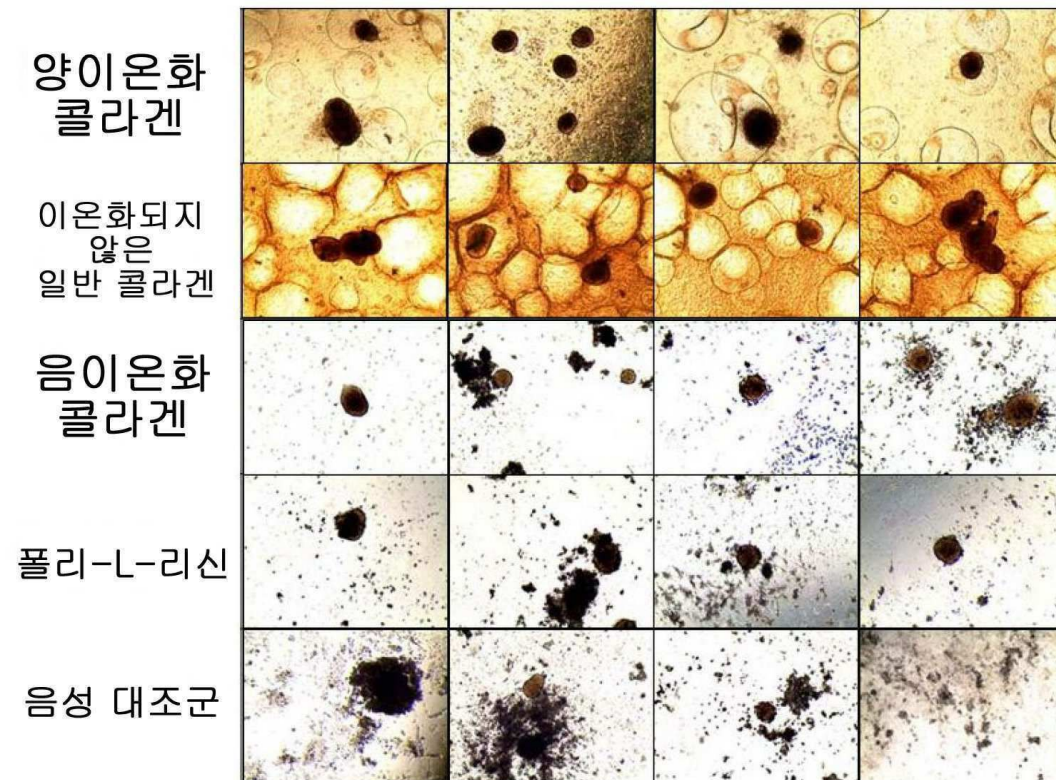
- [0139] **실시예 11: 본 발명의 췌도세포 이식용 담체의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 향상과 췌도세포 생존율 증가 확인**
- [0140] 본 발명의 췌도세포 이식용 담체에서의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 향상과 췌도세포 생존율 증가를 확인하기 위해, 실시예 10에 따라 제작된 본 발명의 일실시예의 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트를 포함하는 췌도세포 이식용 담체 및 대조군 담체인 알지네이트 비드를 10%의 FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제를 포함하는 RPMI1640 배양액에 배양하였다.
- [0141] 우선, 본 발명의 췌도세포 이식용 담체에서의 글루코오스 의존적인 인슐린 분비 향상을 확인하기 위해, 실시예 3과 같이 글루코오스 자극실험을 수행하여 인슐린 분비량 및 글루코오스 의존적인 인슐린 분비를 확인하였다. 그 결과는 도 7a 및 도 7b에 도시된 바와 같다.
- [0142] 즉, 본 발명의 일실시예의 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트를 포함하는 췌도 세포 이식용 담체의 혼합 비드와 대조군 담체인 알지네이트 비드 내에서 췌도세포를 배양하였고, 배양 후 1일째 그리고 1주일째에 실시예 4와 같이 글루코오스 자극 후의 인슐린 분비량을 측정하였다. 도 7a의 인슐린 분비 농도 결과와 도 7b의 글루코오스 자극 지수 결과에서 확인되는 바와 같이, 대조군 담체인 알지네이트 비드에 비해 본 발명의 췌도세포 이식용 담체인 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드 내에 수용된 췌도세포에서 인슐린 분비량이 전체적으로 증가하였으며, 양이온화 아텔로콜라겐의 함량이 증가할 수록 고농도 글루코오스의 자극에 대한 인슐린 분비량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0143] 다음으로, 본 발명의 췌도세포 이식용 담체의 췌도세포 생존율 증가 효능을 확인하기 위해, FDA/PI 염색을 수행하였다. FDA/PI 염색은 죽은 세포와 살아 있는 세포를 현미경으로 관찰하기 위해 수행되는 것으로 당업계에 잘 알려진 염색방법이다. 본 실시예에서는 아세톤에 녹여진 0.05mg/ml의 FDA(Fluorescein diacetate)와 PBS 용액에 녹여진 0.05mg/ml의 PI(Propidium iodide)를 사용하였는데, 세포 배양액에 20 μ l의 PI를 첨가한 후 30초간 잘 흔들어 섞어준 다음, 20 μ l를 FDA를 첨가하여 30초간 잘 흔들어 섞어주었다. 그리고 나서, PBS로 2회 세척하였고 형광현미경(Leica, CM1850)으로 촬영하였다. 살아 있는 췌도세포는 FDA/PI 염색에 의해 녹색을 발광하게 되며, 죽은 췌도세포는 FDA/PI 염색에 의해 적색을 발광하게 된다.
- [0144] 도 8은 본 발명의 췌도세포 이식용 담체인 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드의 내부에 수용된 췌도세포와, 대조군 담체인 알지네이트 비드의 내부에 수용된 췌도세포에 대해 FDA/PI 염색을 수행한 후 형광현미경으로 촬영한 사진을 도시하고 있다. 도 8의 사진에서 확인되는 바와 같이, 대조군 담체인 알지네이트 비드에 비해 본 발명의 췌도세포 이식용 담체인 양이온화 아텔로콜라겐/알지네이트 비드의 내부에 수용된 췌도세포에서 상대적으로 녹색이 많고 적색이 적은 것으로 확인되어 살아 있는 췌도 세포의 비율이 높은 것을 관찰할 수 있었다.
- [0145] 결국, 이와 같은 실험결과들을 종합할 때, 본 발명에 따른 양이온화 아텔로콜라겐과 알지네이트를 포함하는 췌도세포 이식용 담체는 안정성이 우수할 뿐만아니라 배양 및 이식된 췌도세포의 생존율을 높이면서 동시에 글루코오스 의존적인 인슐린 분비량을 높일 수 있는 장점이 있다고 할 수 있다.
- [0146] 이상 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

도면

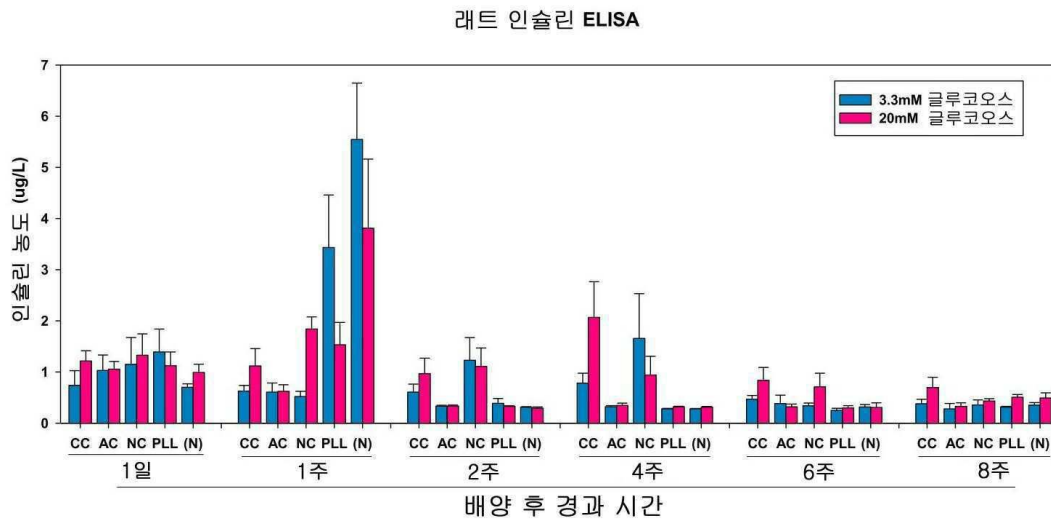
도면1



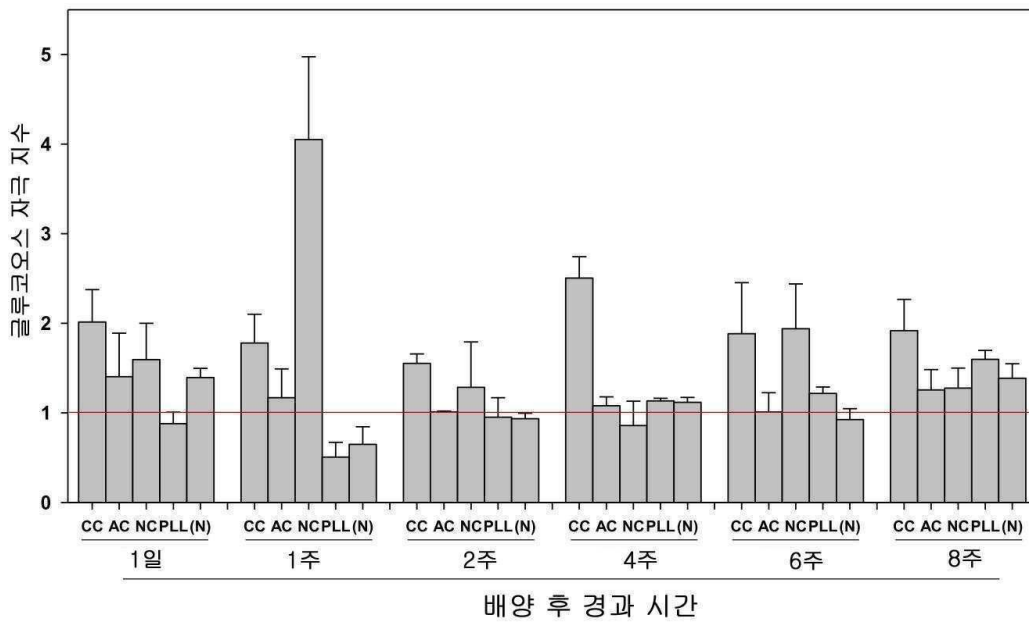
도면2



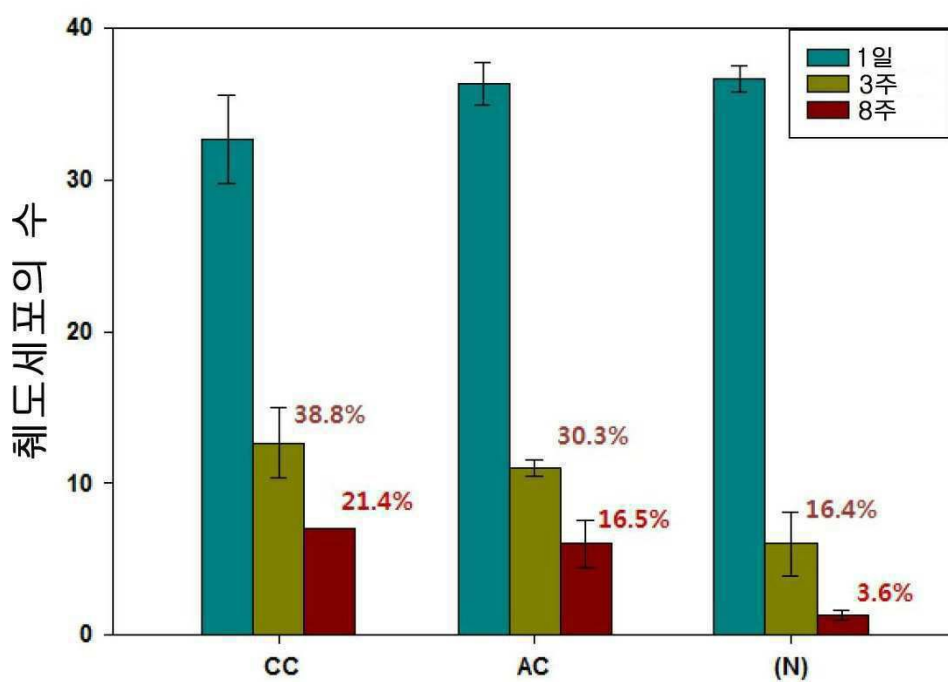
도면3



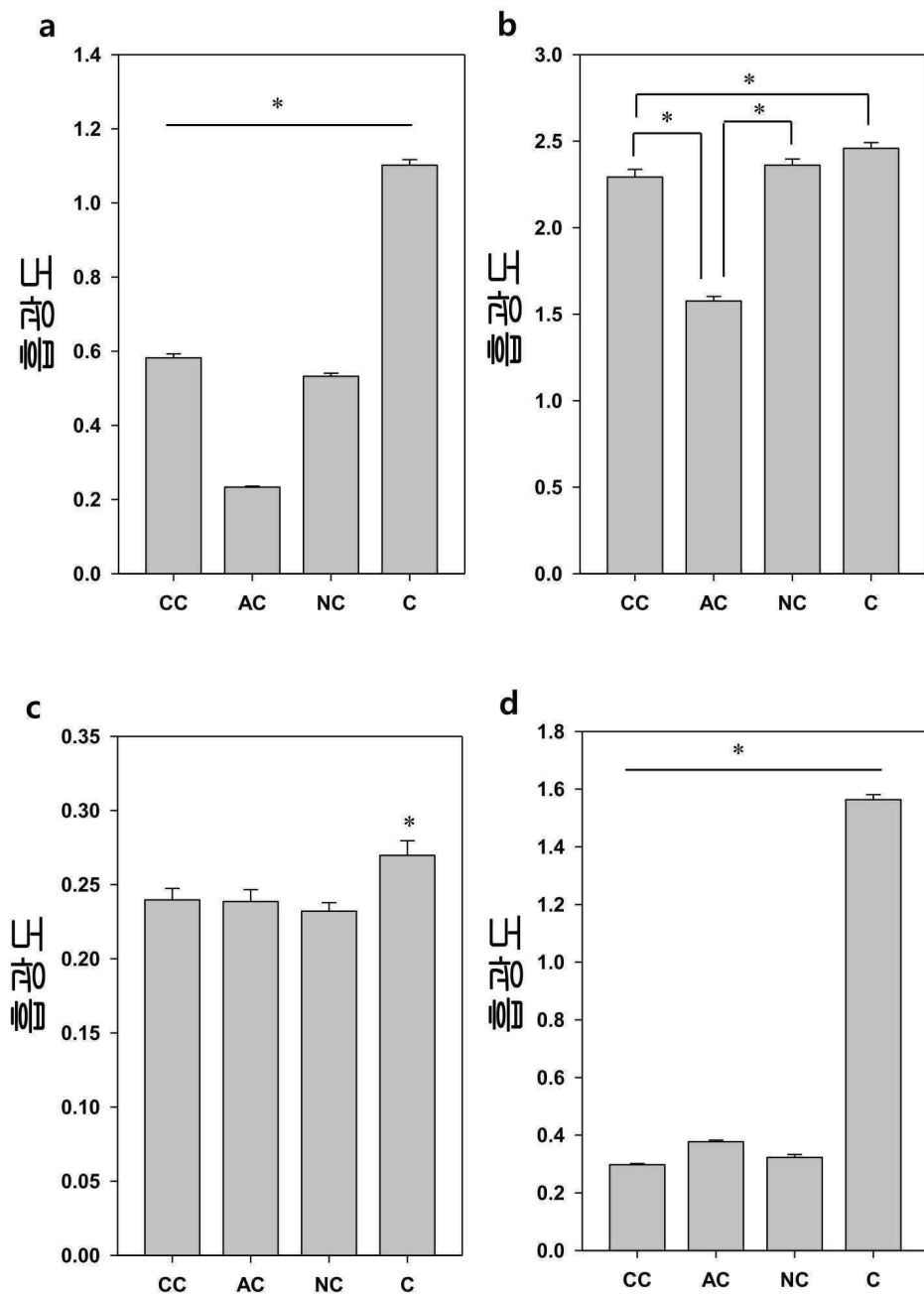
도면4



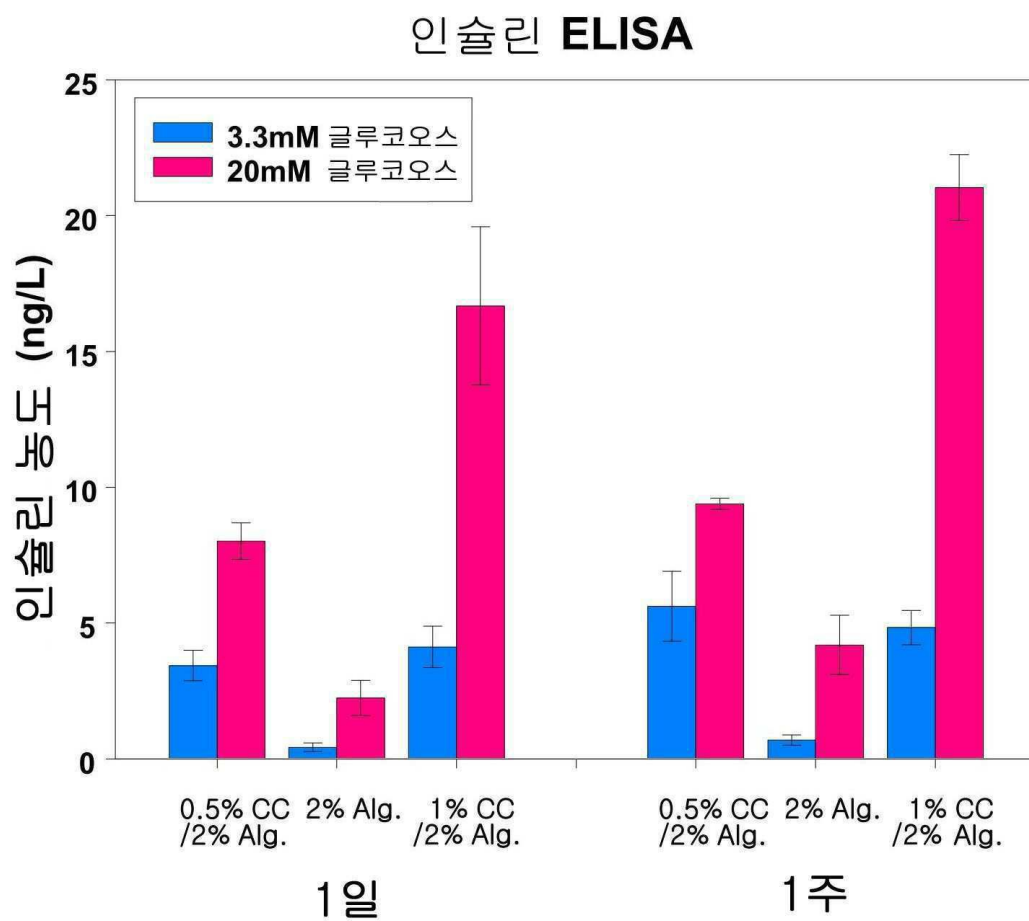
도면5



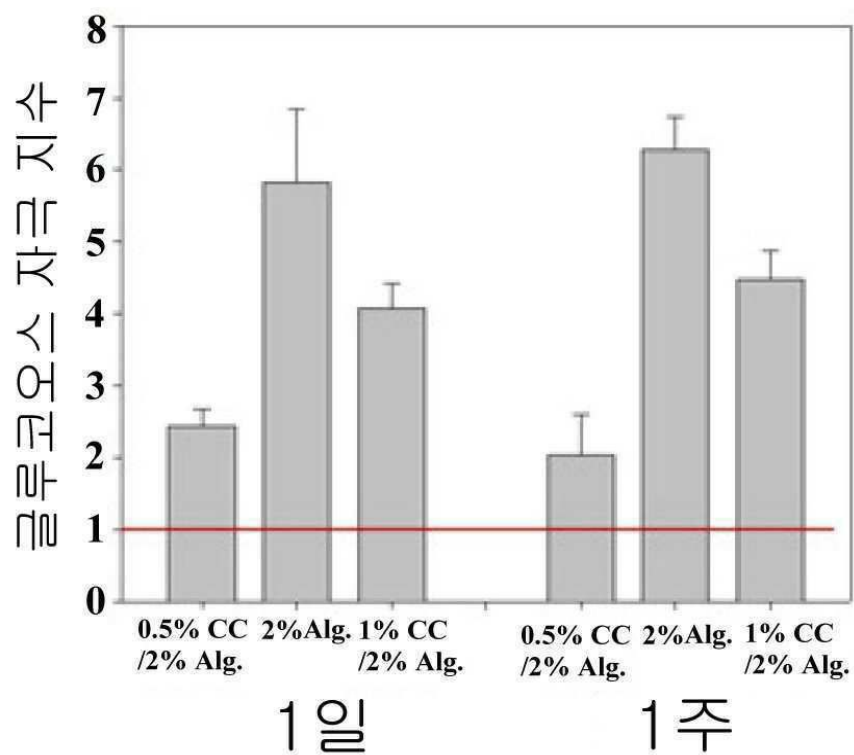
도면6



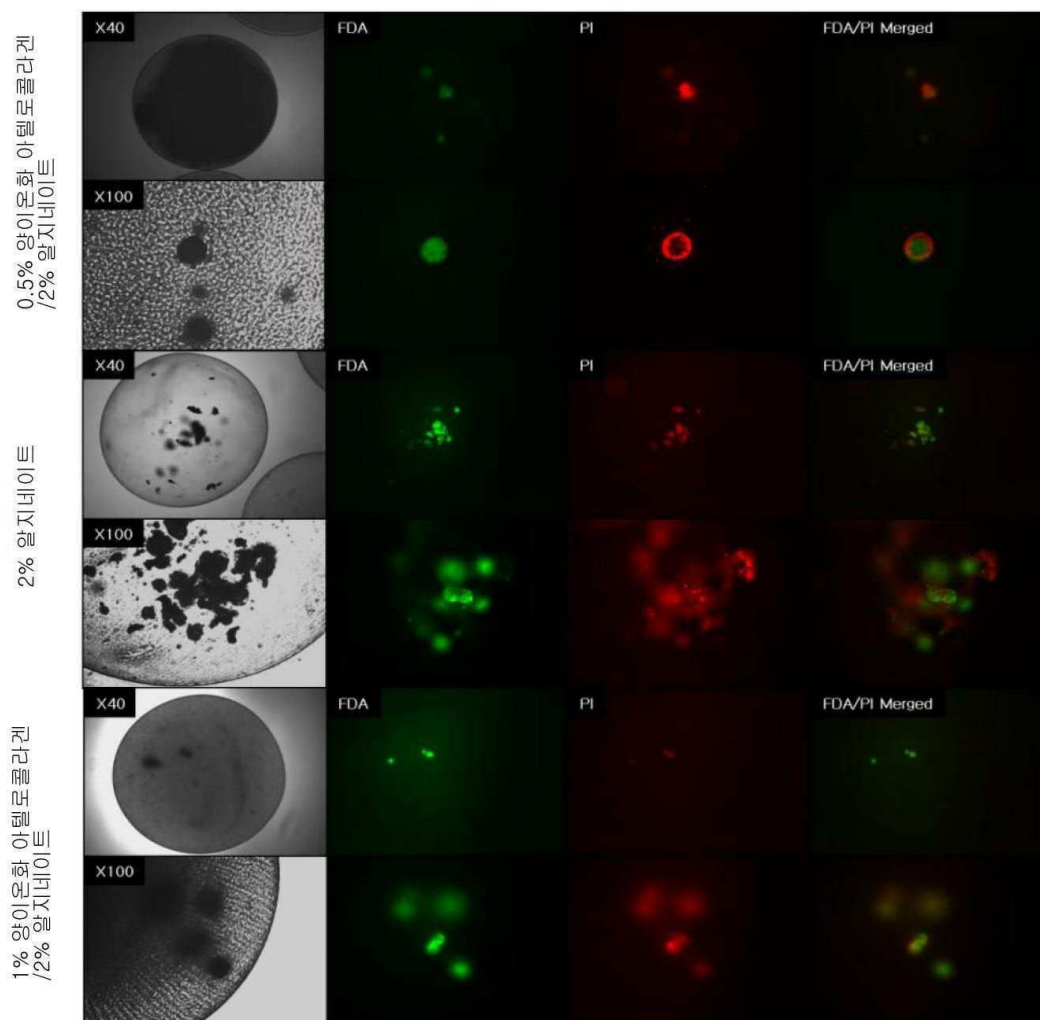
도면7a



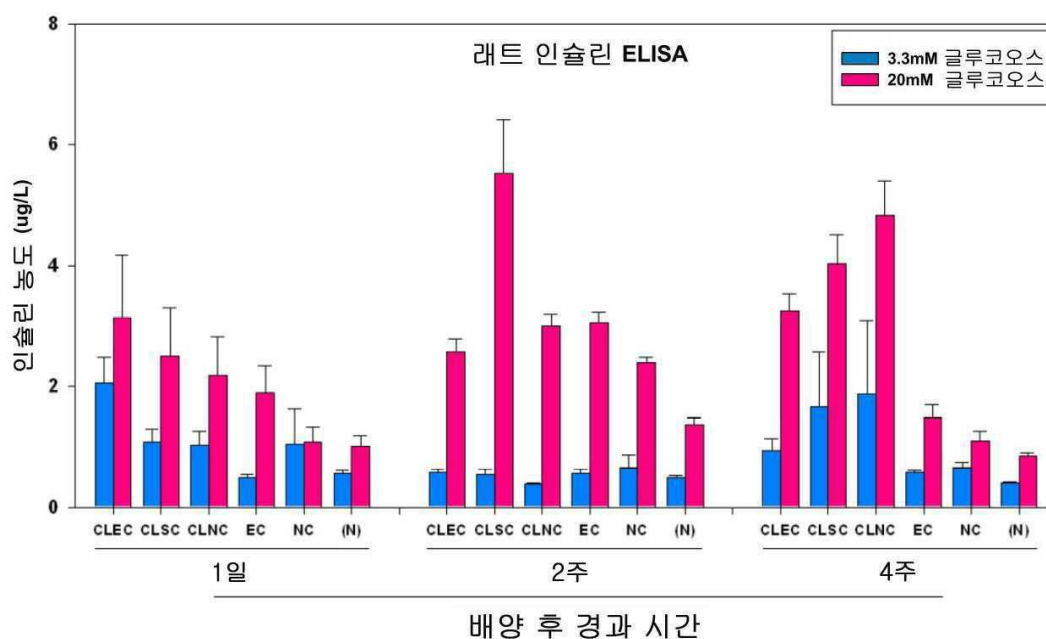
도면7b



도면8



도면9



도면10

