(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 11 월 1 일 (01.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/199617 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01) *C08B 37/08* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004784

(22) 국제출원일: 2018 년 4 월 25 일 (25.04.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0052745 2017 년 4 월 25 일 (25.04.2017) KR
10-2018-0047555 2018 년 4 월 24 일 (24.04.2018) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR). 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99(궁동, 충남대학교), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 이동윤 (LEE, Dong Yun); 06000 서울시 강남구 압구정로 113, 28동 1701호(압구정동, 미성아파트), Seoul (KR). 허강무 (HUH, Kang Moo); 34134 대전시 유성구 대학로 99 (충남대학교 고분자공학과), Daejeon (KR). 김민준 (KIM, Min Jun); 05504 서울시 송파구 올림픽로35길 104, 19동 202호(신천동, 장미아파트), Seoul (KR). 박영우 (PARK, Young-Woo); 07365 서울시 영등포구 도신로29길 28, 204동 503호(영등포동, 영등포푸르지오), Seoul (KR). 오혜민 (OH, Hye Min); 42640 대구시 달서구 죽전길 72, 606(감삼동, 일광아파트), Daegu (KR).

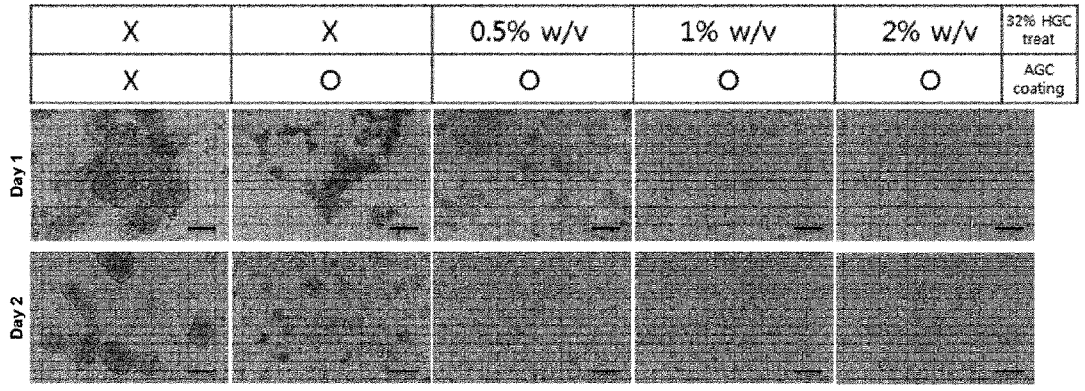
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) **Title:** PREPARATION METHOD OF HIGH-SURVIVAL RATE AND HIGH-FUNCTIONALITY ENDOCRINE CELL CLUSTER

(54) **발명의 명칭:** 고생존율 및 고기능성 내분비 세포클러스터의 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to an endocrine cell cluster of high survival rate and high functionality using a hydrophobicity-substituted glycol chitosan derivative having temperature responsiveness and a preparation method therefor. A hydrophobicity-substituted glycol chitosan derivative having temperature responsiveness according to the present invention is helpful for forming pancreatic islet cell clusters and the clusters formed are found to maintain insulin secretion capacity, as well. Accordingly, the glycol chitosan derivative is expected to find a broad spectrum of applications in the fields including the delivery of therapeutic drugs targeting pancreatic islet cells, the cultivation of pancreatic islet cells, etc.

(57) **요약서:** 본 발명은 온도 감응성을 갖는 소수성 치환시킨 글리콜 키토산 유도체를 이용한 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포클러스터 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 온도 감응성을 갖는 소수성 치환시킨 글리콜 키토산 유도체는 췌장 소도 세포 클러스터를 형성하는데 도움을 주며 형성된 클러스터는 인슐린 분비능 또한 유지함을 확인할 수 있다. 이로서, 췌장 소도 세포를 표적으로 하는 치료 약물의 전달, 및 췌장 소도 세포의 세포배양 분야 등에 폭넓게 적용될 수 있으리라 기대된다.

WO 2018/199617 A1

[다음 쪽 계속]

럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 고생존율 및 고기능성 내분비 세포클러스터의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 고생존율 및 고기능성 내분비 세포클러스터의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 체내 세포 및 조직은 아주 복잡한 3차원 구조를 상호 작용하면서 성장하고 분화, 발전해 간다. 그러나 대부분의 세포 배양은 2차원으로 된 불침투성의 평평한 평면에서 이루어지고 있다. 따라서, 2차원 세포배양은 우리 체내 세포 환경 조건을 제대로 모사하지는 못한다는 한계점을 지니고 있다.

[4] 최근에는 생체 내와 동등한 기능을 갖는 3차원 세포 조직인 스페로이드(구상체, spheroid)의 배양이 주목을 받고 있다.

[5] 암을 모사하기 위한 세포 응집(cell aggregation)을 유도하기도 하고, 당뇨 치료를 위한 인슐린의 정상분비를 유도하기 위해서 췌도 세포를 이식함에 있어 응집된 세포를 이식하는 방법 등이 쓰이고 있어 스페로이드의 대량 생산이 요구되고 있다. 또한, 줄기 세포 연구가 성숙됨에 따라 배아 줄기세포를 3차원 배양하여 각종 분화 기전의 연구에 응용하기 위한 여러 가지 방법이 시도되고 있다.

[6] 종래의 3차원 세포 배양방법으로는 현적 배양법(Hanging-drop method), PDMS 기반 패턴화된 마이크로웰(microwell) 등이 있다.

[7] 현적(hanging droplet) 배양법은 3D 세포 스페로이드(cell spheroids)를 만들고 연구하기 위해서 줄기 세포와 종양 생물학 분야에서 널리 연구되어온 기술이다. 이 기술은 췌장 소도 단일 세포를 포함하고 있는 배지 액적(droplet)에 대한 중력의 힘을 이용하여 단일 세포 사이의 상호작용을 증가시켜 세포 스페로이드 형성을 촉진하는 원리를 이용한다. 이를 췌장 소도 단일 세포에 적용하였을 때 알파, 베타, 감마 세포의 구성과 분포가 온전한 췌장 소도 세포와 유사한 세포 스페로이드가 형성되었다[Rat pancreatic islet size standardization by the “Hanging Drop” Technique, Transplantation Proceedings, 2007]. 또한 현적 배양법으로 형성된 세포 스페로이드에서 밀착 연접(tight junction)을 확인하여 세포 간 활발한 상호작용이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 이를 온전한 췌장 소도 세포를 단일 세포로 분리 및 유전자 전달 후 췌장 소도 스페로이드를 형성하였을 경우 고효율로 유전자가 전달된 세포 스페로이드를 얻을 수 있었다[Optimal formation of genetically modified and functional pancreatic islet spheroids by using hanging-drop strategy, Transplantation proceedings, 2013]. 또한, 배지 물방울에 넣은 췌장 소도

단일 세포의 수를 조절하여 세포 스페로이드의 사이즈를 조절할 수 있었고, 이를 통해 작은 사이즈의 세포 스페로이드 형성을 통한 저산소증에 의한 세포 괴사를 줄일 수 있음이 확인되었다. 이렇게 현적 배양법을 이용해 췌장 세포 스페로이드의 형성이 가능하지만, 하나의 세포 스페로이드 형성을 위해 하나의 droplet을 직접 만들어줘야 한다는 번거로움이 있다. 임상적으로 췌장 소도 세포 이식 시에는 약 10000 개의 췌장 세포 스페로이드/kg이 필요하기 때문에 환자의 몸무게에 따라 약 50-80 만개의 세포 스페로이드를 준비해야 한다. 그러나 현적 배양법으로는 대량 생산을 위한 scale-up이 어렵기 때문에 임상적 적용이 제한된다는 한계가 있다. 최근에 자동화를 통해 현적(hanging droplet)의 생산력을 향상시키는 기술이 개발되었지만, 1) 여전히 낮은 output, 2) 각 droplet이 아주 작은 부피로 인한 배지 교체의 어려움, 3) 현적(hanging droplet)의 증발을 막기 위한 저수조(water-reservoir)의 필요 등의 문제가 있다.

[8] 한편, 포토리소그래피(photolithography)를 이용한 PDMS 기반 패턴화된 마이크로웰(microwell)을 이용하여 췌장 소도 단일 세포를 췌장 소도 세포 스페로이드로 형성하는 기술이 보고되었다[Size-controlled islet-cell spheroids for geometric analysis of insulin secretion, Journal of microelectromechanical systems, 2009; Optimization of pancreatic islet spheroids using various concave patterned-films, Macromolecular research, 2012]. 먼저, SU-8 음성 감광제 (negative photoresist)를 실리콘 와이퍼에 펼쳐 소프트 베이킹 후, 패턴화된 포토마스크 (photomask)를 통해 UV 광을 조사하여 PDMS용 몰드를 제작하였다. 그 후 PDMS 용액을 넣고 가교하여 패턴화된 마이크로 웰을 만들었다. 이러한 PDMS 기반의 마이크로 웰에 췌장 소도 단일 세포를 넣고 배양하여 세포 스페로이드가 형성됨이 확인되었다. 특히, 패턴화된 마이크로 웰의 사이즈를 조절함에 따라 형성되는 췌장 소도 세포 스페로이드의 크기를 조절할 수 있었다. 또한, 이를 통해 형성된 세포 스페로이드의 인슐린 분비능과 단일세포간 상호작용이 온전한 췌장 소도 세포와 유사함이 확인되었다. PDMS 기반의 패턴화된 마이크로웰을 이용하여 세포 스페로이드를 만들 경우, 현적 배양법과 달리 비교적 쉽게 scale-up이 가능하다. 그러나 플레이트 중 패턴화된 마이크로웰 부분에서만 세포 스페로이드가 만들어지기 때문에 세포 스페로이드 형성에 참여하지 못하고 손실되는 세포 수가 크다는 한계가 있다. 또한 PDMS는 공기와 물에 대한 투과성이 있어 기포가 발생하기 쉽고 이는 세포 배양 시 문제가 될 수 있다. 또한 PDMS의 작은 소수성 생체 분자들을 흡수하는 성질은 세포 스페로이드의 형성 및 세포 신호 전달에 영향을 미칠 우려가 있다.

[9] 특히, 췌도 세포의 경우에는 소도 클러스터 상태(온전한 췌장 소도 세포)에서는 단백질 또는 유전자 전달 효율이 1% 밖에 되지 않아, 전달 효율을 높일 수 있도록 단일 세포로 분리하여 배양 처리 후 다시 클러스터를 형성할 필요가 있다. 이때, 단일 세포의 경우에는 클러스터로 형성되어 있을 때와는 달리 세포-세포 간의 정션(junction)이 깨져서 인슐린 분비에 문제가 있기 때문에 인슐린 분비 기능을

확보할 수 있도록 췌장세포의 클러스터화가 반드시 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 이에, 본 발명자들은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 췌도 세포를 단일 세포로 분리시킨 후, 다시 클러스터를 만들기 위해 온도 감응성을 갖는 소수성 치환시킨 글리콜 키토산 유도체인 헥사노일-글리콜 키토산 유도체(HGC)과 아세틸-글리콜 키토산 유도체(AGC)를 함께 사용하여 세포 스페로이드를 형성하기 위한 배양 처리 기술을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 따라서, 본 발명은 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포 클러스터의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[13]

발명의 효과

[14] 본 발명에 따른 세포 클러스터의 제조방법은 췌장 소도 세포 클러스터를 형성하는데 도움을 주며 형성된 클러스터는 인슐린 분비능 또한 유지함을 확인할 수 있는 바, 췌장 소도 세포를 표적으로 하는 치료 약물의 전달, 및 췌장 소도 세포의 세포 배양 분야 등에 폭넓게 적용될 수 있을 것이다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1는 HGC와 AGC 합성과정을 나타낸 것이다[n: 10 내지 10000의 정수임].

[17] 도 2는 HGC의 합성 결과를 나타낸 것이다.

[18] 도 3은 AGC의 합성 결과를 나타낸 것이다.

[19] 도 4a~d는 온도 감응성 졸-젤 상전이 온도 측정 결과를 나타낸 것이다.

[20] 도 5는 유변학적 온도 감응성 특성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[21] 도 6은 췌장 소도 세포의 Trypsinization을 통한 췌장 소도 단일 세포로 분리한 것을 나타낸 것이다[A: 온전한 췌장 소도 세포의 현미경 사진, B: Trypsinization 처리한 췌장 소도 단일 세포].

[22] 도 7a~c는 HGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 확인한 것으로,

[23] 도 7a는 배양 1일차, 2일차의 세포 형상 현미경 사진이며,

[24] 도 7b는 그룹별 인슐린 분비량 그래프(좌측 막대: 2.8mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양, 우측 막대: 20.2mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양)이고,

[25] 도 7c는 인슐린 자극 지수(포도당 농도에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 수치) 그래프이다.

[26] 도 8a~c는 AGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 확인한 것으로,

[27] 도 8a는 배양 1일차, 2일차의 세포 형상 현미경 사진이며,

[28] 도 8b는 그룹별 인슐린 분비량 그래프(좌측 막대: 2.8mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양, 우측 막대: 20.2mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양)이고,

[29] 도 8c는 인슐린 자극 지수(포도당 농도에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 수치) 그래프이다.

[30] 도 9a~c는 HGC 또는 AGC가 온전한 췌장 소도 세포에 미치는 영향을 확인한 것d으로,

[31] 도 9a는 배양 1일차, 2일차의 세포 형상 현미경 사진이며,

[32] 도 9b는 그룹별 인슐린 분비량 그래프(좌측 막대: 2.8mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양, 우측 막대: 20.2mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양)이고,

[33] 도 9c는 인슐린 자극 지수(포도당 농도에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 수치) 그래프이다.

[34] 도 10a~c는 HGC와 AGC를 함께 활용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 효과 확인한 것으로,

[35] 도 10a는 배양 1일차, 2일차의 세포 형상 현미경 사진이고,

[36] 도 10b는 그룹별 인슐린 분비량 그래프(좌측 막대: 2.8mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양, 우측 막대: 20.2mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양)이며,

[37] 도 10c는 인슐린 자극 지수(포도당 농도에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 수치) 그래프이다.

[38] 도 11a 내지 도 11e는 HGC의 치환율에 따른 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 효과 확인한 것으로,

[39] 도 11a는 각 그룹별 배양 1일, 2일 차 세포의 Morphology를 나타낸 것이며,

[40] 도 11b는 각 그룹별 인슐린 분비량 그래프를 나타낸 것이고(좌측 막대: 2.8mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양, 우측 막대: 20.2mM 포도당 용액에 반응하여 분비된 인슐린의 양),

[41] 도 11c는 인슐린 자극 지수(포도당 농도에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 수치)를 나타낸 것이며,

[42] 도 11d는 세포 표면에 존재하는 칼슘의 양을 파악하기 위해 Rhod-4 시약 처리를 한 세포를 confocal microscope를 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이고,

[43] 도 11e는 도 11d의 결과를 정량적 방법으로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[44]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[45] 본 발명은 세포 배양 시 아세틸-글리콜 키토산 유도체 및 헥사노일-글리콜 키토산 유도체를 사용하여 세포 스페로이드(spheroid)를 형성하는 단계를 포함하는 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포 클러스터의 제조방법에 관한 것이다.

[46] 상기 세포는 이식용 세포로서, 상기 이식용 세포는 상피세포, 섬유아세포, 골아세포, 연골세포, 심근 세포, 간세포, 인간 유래 제대혈 세포, 혈관내피전구세포(endothelial Progenitor Cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell), 중간엽 줄기세포, 심장줄기세포(cardiac stem cell) 등의 줄기세포, 근모세포(myoblast), 췌도 세포 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

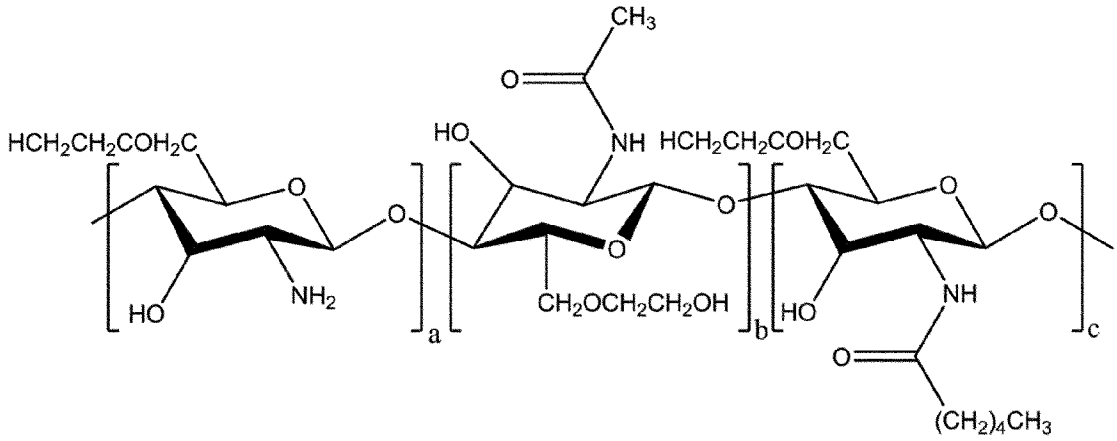
[47] 특히, 본 발명에 따른 클러스터 제조방법은 췌장 소도 단일 세포 배양에 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[48] 일반적인 세포 배양 온도인 37 ℃ 이하의 상전이 임계 온도를 갖는 본 발명에서 사용된 글리콜 키토산 유도체는 세포 배양 시 화학 가교 형성 없이 이루어지는 하이드로젤(hydrogel)을 형성하여 스페로이드 형성을 효과적으로 유도하고, 일정 크기의 스페로이드 형성 후 회수를 위해 상전이 임계 온도 미만의 온도로 감온시 다시 겔 상태에서 졸 상태로 상 변화를 하여 스페로이드의 분리가 용이하다.

[49] 상기 글리콜 키토산 유도체로는 하기 화학식 1로 표시되는 헥사노일-글리콜 키토산 유도체 또는 하기 화학식 2로 표시되는 아세틸-글리콜 키토산 유도체일 수 있다.

[50] [화학식 1]

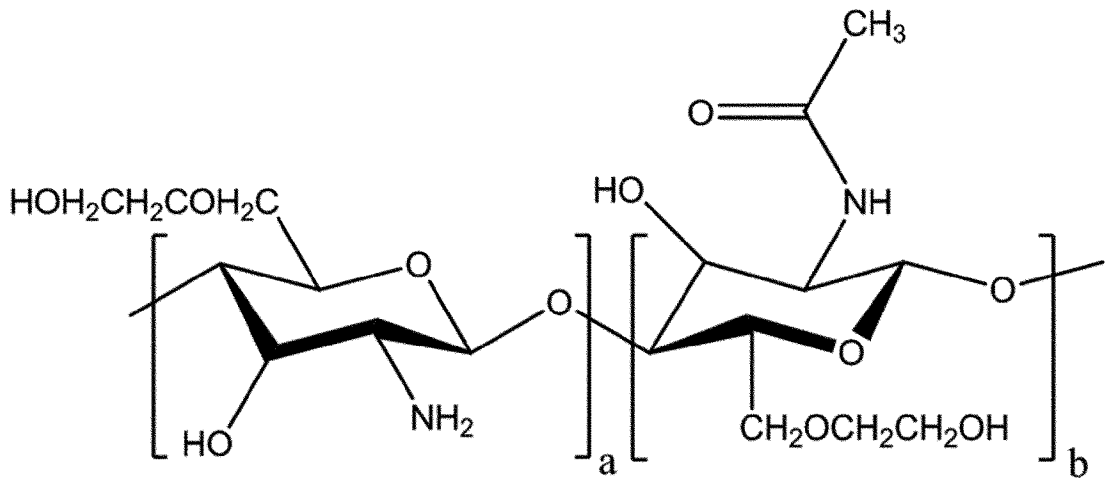
[51]



[52] 상기 화학식 1에서, a, b, c는 각각 10 내지 10000의 정수이며, 이들의 몰%는 $0.05 \leq a \leq 0.8$, $0.05 \leq b \leq 0.15$, $0.05 \leq c \leq 0.9$이다.

[53] [화학식 2]

[54]



[55] 상기 화학식 2에서, a, b는 각각 10 내지 10000의 정수이며, 이들의 몰%는 $0.05 \leq a \leq 0.8$, $0.05 \leq b \leq 0.9$이다.

[56] 상기 화학식 1 또는 2에서의 a, b 값이 치환율을 결정하며, 바람직하기로는 스페로이드 형성 및 인슐린 분비능을 모두 고려하였을 때 헥사노일-글리콜 키토산 유도체의 치환율은 15~40%인 것이 바람직하며, 아세틸-글리콜 키토산 유도체의 치환율은 50~95%인 것이 바람직하다. 또한, 상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 중량평균 분자량이 5,000 내지 5,000,000 Da 또는 5,000 내지 1,000,000 Da의 범위에서 사용할 수 있다. 상기 아세틸-글리콜 키토산 유도체는 중량평균 분자량이 5,000 내지 5,000,000 Da 또는 5,000 내지 1,000,000 Da의 범위에서 사용할 수 있다.

[57] 특히, 췌장 소도 단일 세포 배양에 헥사노일-글리콜 키토산 유도체 단독 사용하는 경우에는 스페로이드가 불균일하게 생성되는 대신 포도당에 따른 인슐린 분비가 우수하게 나타났으며, 아세틸-글리콜 키토산 유도체 단독 사용하는 경우에는 스페로이드는 생성되지만 인슐린 분비 기능이 확인되지 않았다. 이에, 본 발명에서는 추가적으로 헥사노일-글리콜 키토산 유도체와 아세틸-글리콜 키토산 유도체를 조합 사용하여 스페로이드 생성 및 인슐린 분비 기능 모두 확보하였다.

[58] 일 구현예로, 상기 아세틸-글리콜 키토산 유도체는 세포 배양 공간의 표면에 코팅 처리하고, 상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 세포 배양 배지에 용액 상태로 첨가하는 것을 포함한다.

[59] 상기 배양 공간의 표면은 배양 용기와 세포가 접촉하는 부분을 의미한다.

[60] 이때, 배양 배지는 세포 배양에 통상적으로 사용될 수 있는 배지라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle) 배지, RPMI(Robwell Park Memorial Institute) 배지, EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium) 배지, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 배지, McCoy's 5A 배지, Hybri-Care Medium 배지, Ham's Nutrient Mixtures 배지, Ham's F-12K(Kaighn's modification of Ham's F-12) 배지, Leibovitz's L-15 Medium,

Schneider's Drosophila medium 배지, Neuralbasal medium 배지, Medium 199 배지, MethoCult medium 배지, M2 medium 배지, MCDB 131 medium 배지, Skeletal muscle cell differentiation medium 배지, YPD media 배지, ESF 921 growth media 배지, Epilife medium supplement 배지, Express Five SF Medium 배지, Lymphocytes Separation Medium 배지, keratinocyte growth medium 배지, M16 medium 배지, M9 minimal media 배지, Mammary Epithelial Growth Medium 배지, Terrific Broth medium 배지 중 하나 이상이거나, 상기 배지를 변경한 배지일 수 있다.

[61] 상기 배양 용기의 재질 및 형상 역시 세포 배양에 통상적으로 사용될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 아크릴계 수지, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 스티렌계 수지, 아크릴-스티렌계 공중합 수지, 폴리카보네이트계 수지, 폴리에스테르계 수지, 폴리비닐알코올계 수지, 에틸렌-비닐알코올계 공중합 수지, 열가소성 엘라스토머, 염화비닐계 수지, 및 실리콘 수지로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[62] 이때, 상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 0.3 내지 0.8%(w/v), 0.3 내지 3%(w/v) 또는 0.3 내지 10%(w/v)의 농도로 사용될 수 있으며 상기 아세틸-글리콜 키토산 유도체는 0.5 내지 10%(w/v) 또는 2 내지 7%(w/v)의 농도로 사용될 수 있다.

[63] 본 발명에 따른 세포 클러스터의 제조방법은 기존 3차원 세포 배양법인 현적 배양법과는 달리 손쉽게 스케일업을 통한 대량 생산이 가능하다. 또한 패턴화된 부분에서만 세포 스페로이드가 형성되는 것이 아니라, 세포 배양 공간(웰 플레이트) 상의 모든 면에서 세포 스페로이드가 형성되기 때문에 기존 PDMS-based patterned microwell 방법의 한계인 세포 손실이 크다는 점도 극복 가능하다. 더불어, 세포 친화성이 좋은 키토산을 기반으로 세포 배양을 진행하기 때문에 기포 발생, 세포 신호 전달 방해에 대한 PDMS 물질의 단점을 극복할 수 있다.

[64] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포 클러스터를 포함한다.

[65]

발명의 실시를 위한 형태

[66] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식이 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[67]

[68] **[실시예]**

[69] **1. 실험 재료 및 방법**

[70] **(1) 시약 및 시료**

[71] 글리콜 키토산은 Wako Pure Chemical Industries에서 구입하였고 DP(degree of polymerization)가 400 이상이다. 폴록사머는 BASF에서 구입하였다. 글리콜 키토산을 이용하여 N-헥사노일 글리콜 키토산을 합성하기 위해 사용한 헥사노익 무수물은 Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 글리콜 키토산의 아세틸화 반응을 위해 사용한 아세트산 무수물($AC_2O \geq 99\%$)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 용매로서 이용한 메탄올과 침전 시 이용한 아세톤은 삼전화학에서 구입하여 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 별도의 정제과정 없이 사용하였다.

[72]

[73] **(2) 실험동물**

[74] 췌장 소도 세포 분리를 위해, 7 주령의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫트 (대한 바이오 링크, 충청북도)를 사용하였다. 상기 실험 동물은 특정 병원균이 없는 조건 하, 온도 조절되는 환기된 케이지에서 사육되었고, 물과 사료에 자유롭게 접근이 가능하게 하였다. 모든 동물 실험은 한양대학교 동물 관리 및 이용 위원회(HY-IACUC-16-0087)의 승인 하에서 수행되었다.

[75]

[76] **(3) N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC) 합성**

[77] 첨부도면 도 1에 나타낸 바와 같이, N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC)을 제조하였다.

[78] 먼저, 글리콜 키토산(중량 평균 분자량 5000 Da) 3 g을 1차 증류수 375 mL에 녹였다. 글리콜 키토산이 충분히 녹았을 때 메탄올 375 mL을 첨가하고 30분 뒤 헥사노익 무수물 0.6204~1.123 mL를 첨가하여 상온에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 아세톤에 침전하고 원심분리 후 이 용액을 투석막(molecular wight cut-off 12000~14000 Da)을 이용하여 48시간 동안 투석하였고, 동결건조 과정을 통해 최종적으로 파우더 형태의 N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC)[중량 평균 분자량: 5,000~5,000,000 Da]을 얻었다.

[79]

[80] **(4) N-아세틸 글리콜 키토산(AGC) 합성**

[81] 첨부도면 도 1에 나타낸 바와 같이, N-아세틸 글리콜 키토산(AGC)를 제조하였다.

[82] 먼저, 기계적 교반 하에서 글리콜 키토산(중량 평균 분자량 5000 Da) 2 g을 1차 증류수 300 mL에 녹이고 메탄올 300 ml를 첨가하였다. 빠르게 교반하면서 아세트산 무수물(Acetic anhydride, $(CH_3CO)_2O$) 16 mL를 첨가하였다. 48시간 동안 교반시킨 후 반응 용액을 아세톤 1 L에 침전시켰다. 48시간 후 원심분리를 하여 얻어진 물질을 2일 정도 투석시켰다. 투석시킨 물질을 회수하여 동결 건조한 후 파우더 형태의 N-아세틸 글리콜 키토산(AGC)[중량 평균 분자량: 5,000~5,000,000 Da]를 얻었다.

[83]

[84] **(5) 고분자 합성 분석**

[85] 합성된 N-아세틸 글리콜 키토산과 N-헥사노일 글리콜 키토산의 화학적 조성과 구조적 특성, 치환율은 AVANCE III 600 1H-NMR (BRUCKER, GERMANY)과 FTIR (Nicolet iS 5; Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 통해 분석하였다. ^{1}H-NMR분석을 위해 각 샘플은 D_2O에 1wt%로 녹였다. 아실화된 정도(Degree of acylation)는 ^{1}H-NMR spectra를 통해 글루코피라노실 고리의 수소 피크(δ = 3.55ppm) 적분값과 N-아실화된 치환기의 수소 피크 적분값 평균을 비교하여 계산하였다. FT-IR 기기 분석은 4 cm^{-1}의 분해능에서 16회 스캔을 통해 측정하였고 800-4000 cm^{-1}의 영역에서 스펙트럼을 얻었다.

[86]

[87] **(6) 온도 감응성 특성 평가**

[88] 고분자 용액의 온도 감응성 졸-젤 전이 온도는 0.1 ℃/min로 상승시키며 가열기를 사용하여 튜브 뒤집기 방법으로 측정하였다. 고분자 용액은 4 ℃에서 증류수(DW), PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4, 0.01 M), RPMI-1640 용액에 3-5%w/v 농도로 녹여서 제조되었다. 졸-젤 전이 온도는 뒤집은 튜브에서 30초 후 흐르지 않았을 때의 온도를 기준으로 결정되었다. 이 방법을 사용하여 얻어진 졸-젤 상전이 도표는 ±1 ℃의 정밀함을 가진다.

[89]

[90] **(7) 유변학적 온도 감응성 특성 평가**

[91] 유변학적 특성은 rheometer로 점도의 변화를 측정하여 실행하였다. 20 mm 티타늄 평형 플레이트 형태인 MARS-40 rheometer(Thermo scientific)를 사용하여 0.16 ℃/min의 가열 속도로 10~45 ℃에서 측정하였다. 고분자를 RPMI-1640 용액에 3~5%w/v로 녹이고 rheometer에 적용시키고 상반을 간격 1000 ㎛로 낮추고 온도 함수로 점도(viscosity)를 측정하였다. 스트레스는 25Pa의 상수 응력으로 고정시켰다.

[92]

[93] **(8) 췌장 소도 세포의 분리 및 배양**

[94] SD 랫트의 췌장에 Collagenase-P (1 mg/ml)(Roche, Basel, Switze)를 주사하여 췌장 소도 세포 주변의 세포외 기질(Extracellular matrix)를 분해하였다. 그 후, 췌장 조직을 수득하여 37 ℃에서 15분 동안 효소반응을 추가적으로 진행하였다. Medium199(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해 효소를 세척하고, Ficoll™ Histopaque를 사용하여 밀도 차이를 만들고 가운데층에서 췌장 소도 세포만을 선택적으로 수득하였다. 추가 정제를 위하여 중력을 이용해 5분간 무거운 췌장 소도 세포는 가라앉히고 상층액을 Washing하는 Handpicking 방법을 6회 실시하였다. 이후 실험을 진행하기 전 효소 반응과 분리 과정에 의한 손상을 회복시키기 위해, 분리 된 췌장 소도 세포는 10% 우태아 혈청(FBS, Sigma)과 1% 항생제를 포함하는 RPMI-1640 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) 배지에서

37℃, 5% CO_2조건으로 하루간 배양되었다.

[95]

[96] **(9) 췌장 소도 세포의 Trypsinization**

[97] 세포 스페로이드(Spheroid) 형성 실험 진행을 위해, 췌장 소도 세포를 Trypsinization 방법으로 단일 세포화하였다. 췌장 소도 세포(600 IEQ)를 Ca^{2+}과 Mg^{2+}가 제거된 DPBS를 이용해 2번 세척 후 300 ㎕의 Tryple Express (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 용액을 첨가하여 37 ℃ Water bath에서 5분간 반응시켰다. 추가적으로 1분간 볼텍싱을 하고 FBS가 포함된 RPMI-1640 배지를 2 ml 첨가하여 반응을 멈춘 후, PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 단일 세포화된 췌장 소도 세포는 이후 HGC 또는 AGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드(Islet spherhoid) 형성 실험에 사용되었다.

[98]

[99] **(10) HGC 및 AGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성 조건 확립**

[100] HGC(치환율 36%)가 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 3가지 그룹 (1. 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, 2. HGC가 코팅된 24 웰 플레이트, 3. HGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트)으로 실험을 진행하였다. HGC 코팅을 위하여 HGC는 4%w/v으로 증류수에 녹인 뒤, 24 웰 플레이트에 200 ㎕를 넣고 12시간 동안 증발을 진행하였다. HGC 젤 형성을 위하여 HGC는 4%w/v으로 RPMI-1640 배지에 녹인 뒤, 24 웰 플레이트에 200 ㎕를 넣고 37 ℃에서 6시간 동안 반응시켰다. 각 그룹의 웰에 췌장 소도 단일 세포를 5×10^5개를 넣고 배양을 최대 2일까지 진행하였다. 췌장 소도 스페로이드의 형성은 광학 현미경(Eclipse TE2000-S, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용한 사진 촬영을 통해 확인되었다.

[101] 다음으로, 5%w/v AGC(치환율 90%)가 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 앞의 HGC와 마찬가지로 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, AGC가 코팅된 24 웰 플레이트, AGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에 대하여 췌장 소도 단일 세포를 5×10^5개를 넣고 2일간 배양을 진행하였다. 췌장 소도 스페로이드의 형성은 광학 현미경(EclipseTE 2000-S, Nikon)을 이용한 사진 촬영을 통해 확인되었다.

[102] 다음으로 HGC 또는 AGC가 온전한 췌장 소도 세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 췌장 소도 세포 5×10^5개를 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 췌장 소도 세포의 Morphology는 광학 현미경(Eclipse TE2000-S, Nikon)을 이용한 사진 촬영을 통해 확인되었다.

[103] 다음으로 HGC와 AGC를 동시에 사용하였을 때 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트, AGC를 코팅 후 RPMI-1640 배지에 0.5%w/v, 1%w/v, 2%w/v HGC를 첨가하여 배양을 진행한 그룹(HGC+AGC 그룹)에 대해

췌장 소도 단일 세포를 5×10^5개를 넣고 2일간 실험을 진행하였다. 상기 AGC를 코팅 후 RPMI-1640 배지에 0.5%w/v, 1%w/v, 2%w/v HGC를 첨가하여 배양을 진행한 그룹(HGC+AGC 그룹)은 AGC를 5% w/v로 증류수에 녹인 뒤, 24 웰 플레이트에 200 μl를 넣고 12시간 동안 증발을 진행하여 코팅한 후, RPMI-1640 배지에 1%w/v, 2%w/v, 4%w/v로 HGC를 녹인 뒤, 24 웰 플레이트에 500 μl를 넣고 추가적으로 세포가 포함된 RPMI-1640 배지 500 μl를 넣어준 뒤 배양을 진행하였다(최종 HGC의 농도: 0.5%w/v, 1%w/v, 2%w/v).

[104] 췌장 소도 스페로이드의 형성은 광학 현미경(Eclipse TE2000-S, Nikon)을 이용한 사진 촬영을 통해 확인되었다.

[105]

[106] **(11) 췌장 소도 세포 및 췌장 소도 세포** 스페로이드에 대한 인슐린 분비능 확인

[107] 췌장 소도 세포 및 췌장 소도 세포 스페로이드에 대한 인슐린 분비 효능을 확인하기 위해 포도당 자극에 의한 인슐린 분비(Glucose-stimulated insulin secretion) 어세이를 진행하였다.

[108] 먼저, 췌장 소도 세포 및 췌장 소도 세포 스페로이드를 2.8 mM 포도당을 함유한 Krebs Ringer buffered HEPES (KRBH; pH 7.4) 용액에 30분간 배양하였다. 이때, 24 웰 배양 플레이트에 KRBH 버퍼를 600 ㎕를 넣고, transwell을 올린 후 세포가 포함된 KRBH 버퍼를 추가적으로 400 ㎕ 첨가하여 배양을 진행하였다. 각 그룹의 세포들은 2.8 mM 또는 20.2 mM이 포함된 KRBH 버퍼에 30분씩 차례로 배양되었다. 배양된 버퍼의 인슐린 양은 Rat insulin ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit (Alpco Diagnostics, Salem, NG, USA)를 이용해 측정되었다. 10 ㎕의 insulin standard 또는 샘플을 인슐린에 대한 마우스 단일 클론 항체가 코팅된 96 웰 플레이트에 넣고 75 ㎕의 Working strength conjugate 버퍼를 추가 후 상온에서 2시간 동안 400 rpm의 3D 쉐이커 상에서 반응시켰다. 붙지 않은 용액은 Wash buffer를 이용해 6회 세척 후, 각각의 웰에 100 ㎕의 TMB substrate를 넣고 상온에서 15분 동안 400 rpm의 3D 쉐이커 상에서 반응을 진행하였다. 그리고 100 ㎕의 Stop solution을 넣고 기포를 제거한 뒤, 450 nm의 파장에서 플레이트 판독기(SpectraMax M2 microplate reader; Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 각 그룹에서 분비된 인슐린의 양은 그들의 DNA 양으로 나누어 보정되었다. 자극 지수(Stimulation index)는 포도당 농도의 변화에 따른 인슐린 분비량 변화 정도를 나타내는 것으로서, 세포가 얼마나 포도당 농도에 민감하게 반응하여 인슐린 분비량이 증감하는지를 알 수 있게 하는 값이며, 본 실험에서는 20.2 mM 포도당 용액에서 분비된 표준화된 인슐린의 양을 2.8 mM 포도당 용액에서 분비된 표준화된 인슐린의 양으로 나눈 값으로 구해졌다.

[109]

[110] **(12) 통계 분석**

[111] 모든 데이터는 평균 ± 평균의 표준오차(mean ± standard error of the mean)으로

표시되었다. Student's t-test 또는one-way ANOVA test (Sigma plot, Systat Software INC., SanJose, CA, USA)를 이용한 통계 분석을 수행하였고, 95% 신뢰도 기준 p 값이 0.05 보다 작은 경우 통계적 유의성을 나타내는 것으로 평가하였다.

[112]

[113] **2. 실험 결과**

[114] **(1)** HGC와 AGC의 합성

[115] 글리콜 키토산은 생체적합성이 좋지만 온도 감응성이 없어 소수성기를 부여하여 온도 감응성을 나타내는 HGC와 AGC를 합성하였다. 이 반응은 one-step reaction이며 상온에서 실험을 진행하였다. 그 과정을 도 1에 나타내었다.

[116]

[117] **(2)** HGC의 합성 결과

[118] ^{1}H-NMR의 피크 분석을 통해 N-헥사노일 글리콜 키토산의 hexanoylation을 확인하고 기능기 또한 확인하였다. FT-IR을 통해 800~4000 cm^{-1} 범위에서 측정하여 합성된 N-헥사노일글리콜키토산의 화학적 구조를 확인해보았다. 글리콜 키토산과 합성한 N-헥사노일 글리콜 키토산의 ^{1}H-NMR의 피크를 도 2의 A에 나타내었다. ^{1}H-NMR를 찍기 위한 시료 용매로 D_2O를 사용해서 4.85 ppm에서 D_2O의 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. δ=3.55ppm에서 글루코피라노실 고리의 H2-H8 피크를 관찰하였다. 또한 NH_2가 결합되어 있는 글루코피라노실 고리의 H_2 피크는 δ= 2.6ppm에서 나타났고, δ=0.771 ppm(-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3), δ=1.199ppm(-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3), δ=1.499 ppm(-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3), δ=2.199ppm(-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3)에서는 헥사니오닐기인 -CH2-CH2-CH2-CH2-CH3의 피크를 관찰할 수 있다. δ= 0.771 ppm은 헥사노일기의 메틸기 피크이며, δ=1.199, 1.499, 2.199 ppm은 모두 헥사노일기의 메틸렌 피크이다. 피크 분석결과 N-헥사노일 글리콜 키토산의 헥사니오닐화도가 넣어준 헥사노익 무수물 양에 따라 치환율이 약 20%, 32%, 36%, 40% 정도 된 것을 확인할 수 있었다. 도 2의 B는 글리콜 키토산과 N-헥사노일 글리콜 키토산의 FT-IR 분석결과를 나타낸 것이다. FT-IR 분석결과 글리콜 키토산과 N-헥사노일 두 개의 스펙트럼에서 1655 cm^{-1}에서는 카보닐 결합(C=O)의 신축 진동을 나타내는 파장을 확인할 수 있고, 2880-2930 cm^{-1}에서 C-H 신축진동을 나타내는 파장을 확인할 수 있다. 글리콜키토산의 스펙트럼에서는 1차 아민 결합의 굽힘 진동을 나타내는 파장이 1596 cm^{-1}에서 나타났다. N-헥사니오닐레이트로아실화를 한 후에는 1596 cm^{-1}에서의 피크가 사라지고 1555 cm^{-1}에서 아미드 결합(N-H)의 굽힘 진동을 나타내는 파장이 관찰되었다.

[119]

[120] **(3) AGC의 합성 결과**

[121] ^{1}H-NMR의 피크 분석을 통해 N-아세틸 글리콜 키토산의 acetylation을 각각 확인하고 기능기 또한 확인하였다. FT-IR을 통해 800~4000 cm^{-1} 범위에서

측정하여 합성된 N-아세틸 글리콜 키토산의 화학적 구조를 확인해 보았다. 글리콜 키토산과 합성한 N-아세틸 글리콜 키토산의 ^{1}H-NMR의 피크를 도 3의 A에 나타내었다. ^{1}H-NMR를 찍기 위한 시료 용매로 D_2O를 사용해서 4.85 ppm에서 D_2O의 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. δ=3.55 ppm에서 글루코피라노실 고리의 H2-H8 피크를 관찰하였다. 또한 NH_2가 결합되어있는 글루코피라노실 고리의 H2 피크는 δ = 2.6 ppm에서 나타났고, δ = 1.89 ppm에서는 아세틸기인 $COCH_3$의 피크를 관찰할 수 있다. N-아세틸 글리콜 키토산은 아세틸기의 피크가 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 피크 분석 결과 글리콜 키틴의 N-Acetylation이 약 91% 정도 된 것을 확인할 수 있었다. 도 3의 B는 글리콜 키토산과 N-아세틸 글리콜 키토산의 FT-IR 분석결과를 나타낸 것이다. FT-IR 분석 결과 글리콜 키토산과 N-아세틸 글리콜 키토산 두 개의 스펙트럼에서 1655 cm^{-1}에서는 카보닐 결합(C=O)의 신축 진동을 나타내는 파장을 확인할 수 있고, 2880-2930 cm^{-1}에서 C-H 신축 진동을 나타내는 파장을 확인할 수 있다. 글리콜 키토산의 스펙트럼에서는 1차 아민 결합의 굽힘 진동을 나타내는 파장이 1596 cm^{-1}에서 나타났다. 글리콜키틴으로 아실화를 한 후에는 1596 cm^{-1}에서의 피크가 사라지고 1555 cm^{-1}에서 아미드 결합(N-H)의 굽힘 진동을 나타내는 파장이 관찰되었다.

[122]

[123] **(4) 온도** 감응성 졸-젤 상전이 온도 측정

[124] 글리콜 키토산은 온도 감응성이 없지만 글리콜 키토산에 소수성기를 도입해 온도 감응성을 나타낸다. 이러한 N-헥사노일 글리콜 키토산과 N-아세틸 글리콜 키토산을 튜브 뒤집기 방법으로 졸-젤 전이온도를 측정하였다. 각각의 고분자를 DW, PBS, RPMI-1640 용매에 1.5~5%w/v 농도로 녹인 후 4 ℃의 온도에서 보관하면서 충분히 용해시켰다. 18 ℃에서부터 1 ℃씩 올려 가며 50 ℃까지 졸-젤 상전이 온도를 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4를 통해 알 수 있듯이, 같은 농도에서 용매 종류가 DW, PBS, RPMI-1640 순으로 높은 온도에서 상 전이가 일어났으며, 같은 용매에서는 농도가 낮아질수록 높은 온도에서 상 전이가 일어났다. HGC의 치환율에 따라 비교하였을 때 치환도가 더 높을수록 낮은 농도에서 상 전이가 일어났다.

[125]

[126] **(5)** 유변학적 온도 감응성 특성 측정

[127] 다이나믹 유동계가 튜브를 뒤집는 방법과 비교하여 더 재현성 있고 정량적인 방법이다. N-헥사노일 글리콜 키토산과 N-아세틸 글리콜 키토산의 온도에 따른 sol-gel 거동을 조사하기 위하여 rheometer를 이용하여 점도(viscosity)를 측정하였다. 고분자는 RPMI-1640에 3~4%w/v로 녹였다. 도 5의 결과 데이터를 보면 온도가 증가함에 따라 점도 값이 일정하다가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었다. N-헥사노일 글리콜 키토산 36%(치환율) 3%w/v는 점도가 일정하게 유지되다가 25 ℃에서 급격히 증가하였고 4%w/v는 이미 젤이 된 상태로

처음부터 높은 점도 값을 보이며 온도가 증가함에 따라 점도가 급격히 증가하였다. N-아세틸 글리콜 키토산 90%(치환율) 4%w/v는 41 ℃에서 점도가 급격히 증가하기 시작하였고 5%w/v는 35 ℃에서 점도 증가를 보였다. 이 실험에서 나온 점도가 급격히 올라가는 지점 온도들은 튜브를 뒤집는 방법의 결과와 거의 일치하였다. 또한, 농도 의존성 졸-젤 전이를 나타내어 농도가 증가함에 따라 점도가 급격히 증가하는 온도가 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

[128]

[129] **(6) 췌장 소도 세포의** Trypsinization을 통한 췌장 소도 단일 세포 준비

[130] HGC와 AGC의 췌장 소도 세포 스페로이드 형성 실험 진행을 위해, 췌장 소도 세포 클러스터를 Trypsin을 이용해 단일 세포로 분리하는 과정을 시행하였다. 그 결과, 도 6의 A에 나타낸 바와 같이, 약 50-300 ㎛의 크기를 같는 췌장 소도 세포가 Trypsinization 과정 실시 후, 약 10 ㎛의 크기를 갖는 췌장 소도 단일 세포로 분리 되었다(도 6의 B). 이러한 결과는 약 1,000개의 췌장 소도 단일 세포로 구성된 췌장 소도 세포 클러스터가 트립신 효소 처리에 따른 각각의 단일 세포로 분리가 되었음을 보여주는 결과로서, 분리된 단일 세포는 이후 췌장 소도 세포 스페로이드 형성 실험에 사용되었다.

[131]

[132] **(7)** HGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성

[133] HGC가 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 평가하였다. 본 실험에서는 36%의 치환율을 가진 HGC를 이용해 4%w/v으로 실험에 사용되었다. HGC를 웰 플레이트 바닥에 코팅하는 방법과 배지에 첨가하여 젤을 형성하는 두 가지 방법으로 췌장 소도 스페로이드에 대한 효능을 확인하였다.

[134] 5×10^5개의 췌장 소도 단일 세포를 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, HGC가 코팅된 24 웰 플레이트, HGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에 2일간 배양하였다.

[135] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 모든 그룹에서 배양 1일 후 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성이 관찰되었으며, morphology는 배양 2일 후 더 뚜렷한 구형 모양을 나타내는 것을 확인하였다. 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성 수율은 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, HGC가 코팅된 24 웰 플레이트, HGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에서 각각 32.0% (160 IEQ), 18.0% (90IEQ), 23.0% (115 IEQ)로 얻어졌다.

[136] 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 인슐린 분비능을 분석하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, HGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 2.8 mM 포도당 및 20.2 mM 포도당용액에 반응하여 분비한 인슐린의 양은 각각 0.8 ± 0.1 과 1.7 ± 0.2, 0.6 ± 0.1 과 0.9 ± 0.1, 0.7 ± 0.1 과 1.9 ± 0.2, 0.5 ± 0.0 과 1.5 ± 0.2 ng/ng DNA로 확인되었다.

[137] 인슐린의 자극 지수를 계산하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, HGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 결과는 각각 2.1 ± 0.2, 1.5 ± 0.0, 2.9 ± 0.2, 2.9 ± 0.3으로 나타났다.

[138] 도 7의 결과를 종합해보면, 치환율 36%의 HGC를 사용한 경우 아무 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성 효율은 다소 떨어지지만(스페로이드가 불균일하게 형성됨), 형성된 세포 스페로이드의 인슐린 분비능이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 확인되었으며, 그 양상은 HGC 코팅 또는 HGC 젤을 사용한 두 가지 경우에서 유사하게 나타났다.

[139]

[140] **(8) AGC를 이용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성**

[141] AGC가 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 평가하였다. 본 실험에서는 5%w/v의 AGC(치환율 90%)를 이용해 실험을 진행하였다. AGC를 웰 플레이트 바닥에 코팅하는 방법과 배지에 첨가하여 젤을 형성하는 두 가지 방법으로 췌장 소도 스페로이드에 대한 효능을 확인하였다.

[142] 5×10^5개의 췌장 소도 단일 세포를 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, AGC가 코팅된 24 웰 플레이트, AGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에 2일간 배양하였다.

[143] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, HGC의 경우와 마찬가지로 모든 그룹에서 배양 1일 후 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성이 관찰되었으며, Morphology는 배양 2일 후 더 뚜렷한 구형 모양을 나타내는 것을 확인하였다.

[144] 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC 젤이 형성된 24웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 인슐린 분비능을 분석하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포의 2.8 mM 포도당 및 20.2 mM 포도당 용액에 반응하여 분비한 인슐린의 양은 각각 0.8 ± 0.1 과 2.0 ± 0.2, 0.5 ± 0.1 과 0.7 ± 0.1, 0.4 ± 0.0 과 0.5 ± 0.1, 0.6 ± 0.1 과 0.8 ± 0.1 ng/ng DNA로 확인되었다.

[145] 인슐린의 자극 지수를 계산하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC 젤이 형성된 24 웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 결과는 각각 2.5 ± 0.1, 1.3 ± 0.1,1.2 ± 0.2, 1.4 ± 0.1로 나타났다.

[146] 도 8의 결과를 종합해보면, AGC를 사용한 경우 아무 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성 효율이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 그러나 형성된 세포 스페로이드의 인슐린 분비능은

대조군과 마찬가지로 온전한 췌장 소도 세포와 비교하여 현저히 떨어지는 것으로 나타났다.

[147]

[148] **(9) HGC 또는 AGC가 온전한 췌장 소도 세포에 미치는 영향 평가**

[149] HGC는 췌장 소도 단일 세포를 이용한 스페로이드 형성에서 인슐린 분비 기능성을 향상시켰고, AGC는 스페로이드 형성 효율을 증진시켰기 때문에, HGC 또는 AGC가 온전한 췌장 소도 세포에도 어떤 영향을 주는지 확인해보았다.

[150] 본 실험에서는 4%w/v의 HGC(36% 치환율) 또는 5%w/v의 AGC(90% 치환율)를 이용해 실험을 진행하였다. 500 IEQ의 췌장 소도 세포(5×10^5개의 췌장 소도 단일 세포와 동일한 양)를 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, AGC 또는 HGC가 코팅된 24 웰 플레이트에 24시간 동안 배양하였다.

[151] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, HGC와 AGC 코팅 그룹에서의 췌장 소도 세포의 morphology가 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트에서 배양한 췌장 소도 세포와 차이가 없음이 관찰되었다.

[152] 배양된 췌장 소도 세포의 인슐린 분비능을 분석하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포의 2.8 mM 포도당 및 20.2 mM 포도당 용액에 반응하여 분비한 인슐린의 양은 각각 0.8 ± 0.1 과 2.0 ± 0.2, 1.0± 0.2 과 2.2 ± 0.4,0.8 ± 0.1 과 1.7 ± 0.2ng/ng DNA로 확인되었다.

[153] 인슐린의 자극 지수를 계산하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, HGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 배양된 췌장 소도 세포의 결과는 각각 2.5 ± 0.1, 2.3 ± 0.3, 2.2 ± 0.1로 통계적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

[154] 도 9의 결과를 정리해보면, HGC 또는 AGC가 온전한 췌장 소도 세포의 Morphology 또는 인슐린 분비 능력에 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 분석되었다.

[155]

[156] **(10) HGC와 AGC를 함께 활용한 췌장 소도 세포 스페로이드 형성**

[157] HGC와 AGC가 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 서로 다른 긍정적 효과를 보였기 때문에, 두 물질을 함께 사용하여 스페로이드 형성에 미치는 시너지 효과를 확인해보았다.

[158] 본 실험에서는 5%w/v의 AGC를 이용해 24 웰 플레이트에 코팅을 한 후 RPMI-1640 배지에 0, 0.5%w/v, 1%w/v, 2%w/v의 치환율 36% HGC를 첨가하여 5×10^5개의 췌장 소도 단일 세포를 2일간 배양하였다.

[159] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 1%w/v 이상의 HGC를 첨가한 그룹의 경우는 췌장 소도 세포 스페로이드가 형성되지 못하고, 단일 세포로 존재하는 것이 확인되었다. 그러나, 0.5%w/v HGC를 첨가하여 배양한 경우 약 50 ㎛ 이하의 작은 췌장 소도 세포 스페로이드가 형성되는 것이 관찰되었다.

[160] 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 인슐린 분비능을 분석하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 0.5%w/v의 HGC를 배지에 첨가하여 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 2.8 mM 포도당 및 20.2 mM 포도당 용액에 반응하여 분비한 인슐린의 양은 각각 0.8 ± 0.0과 2.3 ± 0.2, 0.9 ± 0.0 과 0.9 ± 0.0, 1.0 ± 0.0 과 2.5 ± 0.4 ng/ng DNA로 확인되었다.

[161] 인슐린의 자극 지수를 계산하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드, AGC를 코팅한 24 웰 플레이트에서 0.5%w/v의 HGC를 배지에 첨가하여 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 결과는 각각 2.7 ± 0.2, 1.1 ± 0.1, 2.5 ± 0.3으로 나타났다.

[162] 도 10의 결과를 종합해보면, 0.5%w/v의 HGC를 배지에 첨가하여 AGC가 코팅된 웰 플레이트에서 배양 시 인슐린 분비 효능이 온전한 췌장 소도 세포와 유사한 작은 크기의 췌장 소도 세포 스페로이드가 형성됨을 알 수 있었다.

[163]

[164] **(11)** HGC의 치환율에 따른 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 효과 확인

[165] 상기 실험들은 36%의 치환율을 가진 HGC를 이용해 진행하였고, 그 자체의 세포 스페로이드 형성 시 인슐린 분비능 향상 효과를 확인하였다.

[166] 본 실험에서는 36%와 그 이외에 다른 치환율을 가진 HGC를 이용해 췌장 소도 세포 스페로이드 형성에 미치는 영향을 비교해 보았다. RPMI-1640 배지에 치환율 20%, 32%, 36%, 40%의 HGC를 0.5%w/v로 녹여서 5×10^5개의 췌장 소도 단일 세포를 2일간 배양하였다.

[167] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 치환율이 올라갈수록 스페로이드의 크기가 작아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성 수율은 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, 치환율 20%, 32%, 36%, 40%의 HGC가 0.5%w/v으로 배지에 첨가된 24 웰 플레이트에서 각각 42.6% (213 IEQ), 61.2% (306 IEQ), 43.2% (216 IEQ), 21.2% (106 IEQ), 11.6% (58 IEQ)로 얻어졌다.

[168] 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 인슐린 분비능을 분석하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, 치환율 20%, 32%, 36%, 40%의 HGC가 0.5%w/v으로 배지에 첨가된 24 웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 2.8 mM 포도당 및 20.2 mM 포도당 용액에 반응하여 분비한 인슐린의 양은 각각 50.1 ± 6.5 와 128.7 ± 17.1, 65.7 ± 19.7 과 149.3 ± 27.0, 49.2 ± 5.0 과 135.3 ± 21.4, 91.9 ± 20.5 와 261.5 ± 21.2, 180.4 ± 26.2 과 367.1 ± 68.0, 239.3 ± 21.2 와 609.7 ± 96.8 pg/ng DNA로 확인되었다.

[169] 인슐린의 자극 지수를 계산하였을 때, 온전한 췌장 소도 세포, 아무 처리를 하지 않은 24 웰 플레이트, 치환율 20%, 32%, 36%, 40%의 HGC가 0.5%w/v으로 배지에 첨가된 24 웰 플레이트에서 만들어진 췌장 소도 세포 스페로이드의 결과는 각각 2.6 ± 0.2, 2.5 ± 0.3, 2.7 ± 0.3, 3.2 ± 0.5, 2.0 ± 0.0, 2.5 ± 0.3으로 나타났다.

[170] 도 11의 결과를 종합해보면, HGC의 치환율이 낮아질수록 세포 스페로이드의 형성 효율이 증가하였고, 모든 HGC 그룹에서 형성된 췌장 소도 세포 스페로이드의 인슐린 분비능이 온전한 췌장 소도 세포와 통계적으로 차이가 없음이 확인되었다. 추가적으로 칼슘이 세포의 tight junction 형성에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있기에 각 그룹별로 세포 표면에 있는 칼슘의 양을 측정 및 비교하기 위하여 Rhod-4 no wash calcium assay kit(abcam)를 이용하여 confocal microscope(TCS SP5, Leica)를 통해 관찰하였다.

[171] 그 결과, 치환율 20%인 HGC를 사용한 그룹에서 형광의 세기가 가장 높게 관찰이 되었다. 췌장 소도 세포 스페로이드의 형성 효율과 인슐린 분비능을 모두 고려하였을 때 치환율 20%의 HGC를 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 확인되었다.

청구범위

[청구항 1] 세포 배양 시 아세틸-글리콜 키토산 유도체 및 헥사노일-글리콜 키토산 유도체를 사용하여 세포 스페로이드(spheroid)를 형성하는 단계를 포함하는 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 아세틸-글리콜 키토산 유도체는 세포 배양 공간의 표면에 코팅하고,
상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 세포 배양 배지에 첨가하는,
내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 0.3 내지 3%(w/v)의 농도로 사용되는 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 4] 제 2 항에 있어서,
상기 아세틸-글리콜 키토산 유도체는 0.5 내지 10%(w/v)의 농도로 사용되는 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

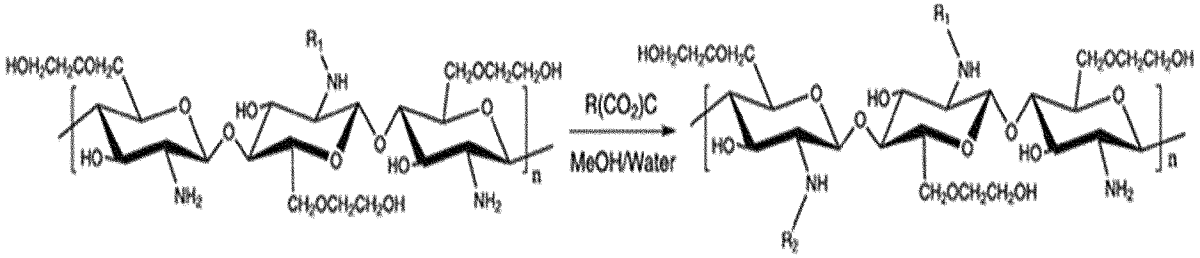
[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 세포는 이식용 세포인 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 이식용 세포는 줄기세포, 췌도 세포, 상피세포, 섬유아세포, 골아세포, 연골세포, 심근 세포, 간세포, 인간 유래 제대혈 세포, 혈관내피전구세포(endothelial Progenitor Cell) 및 근모세포(myoblast)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 헥사노일-글리콜 키토산 유도체는 치환도가 15 내지 40%인 내분비 세포 클러스터의 제조방법.

[청구항 8] 청구항 1의 방법에 의해 제조된 고생존율 및 고기능성의 내분비 세포 클러스터.

[도1]



Glycol chitosan

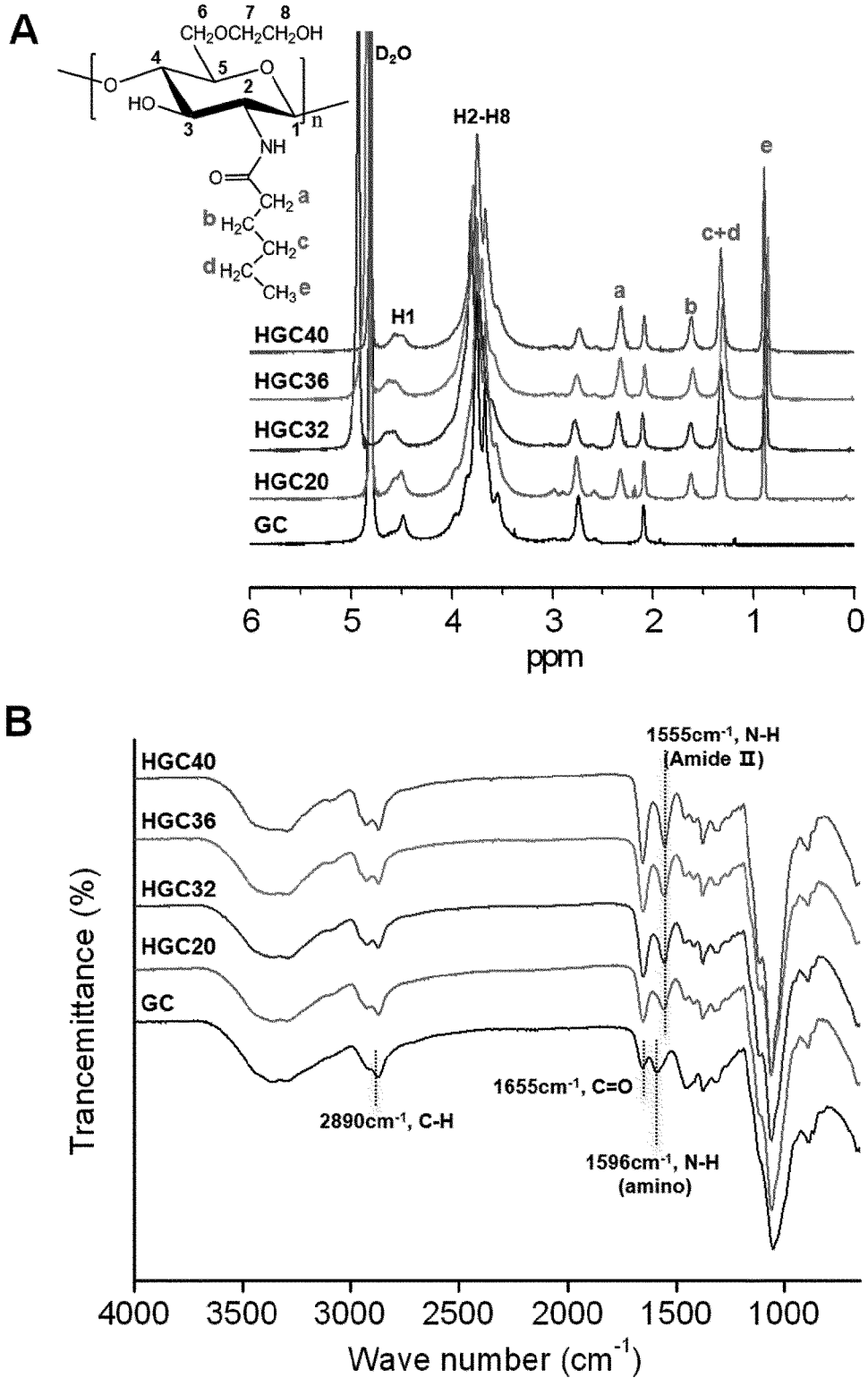
N-acyl glycol chitosan

R_1 = —H or —C(=O)—CH_3 *N*-Acetyl glycol chitosan (AGC)

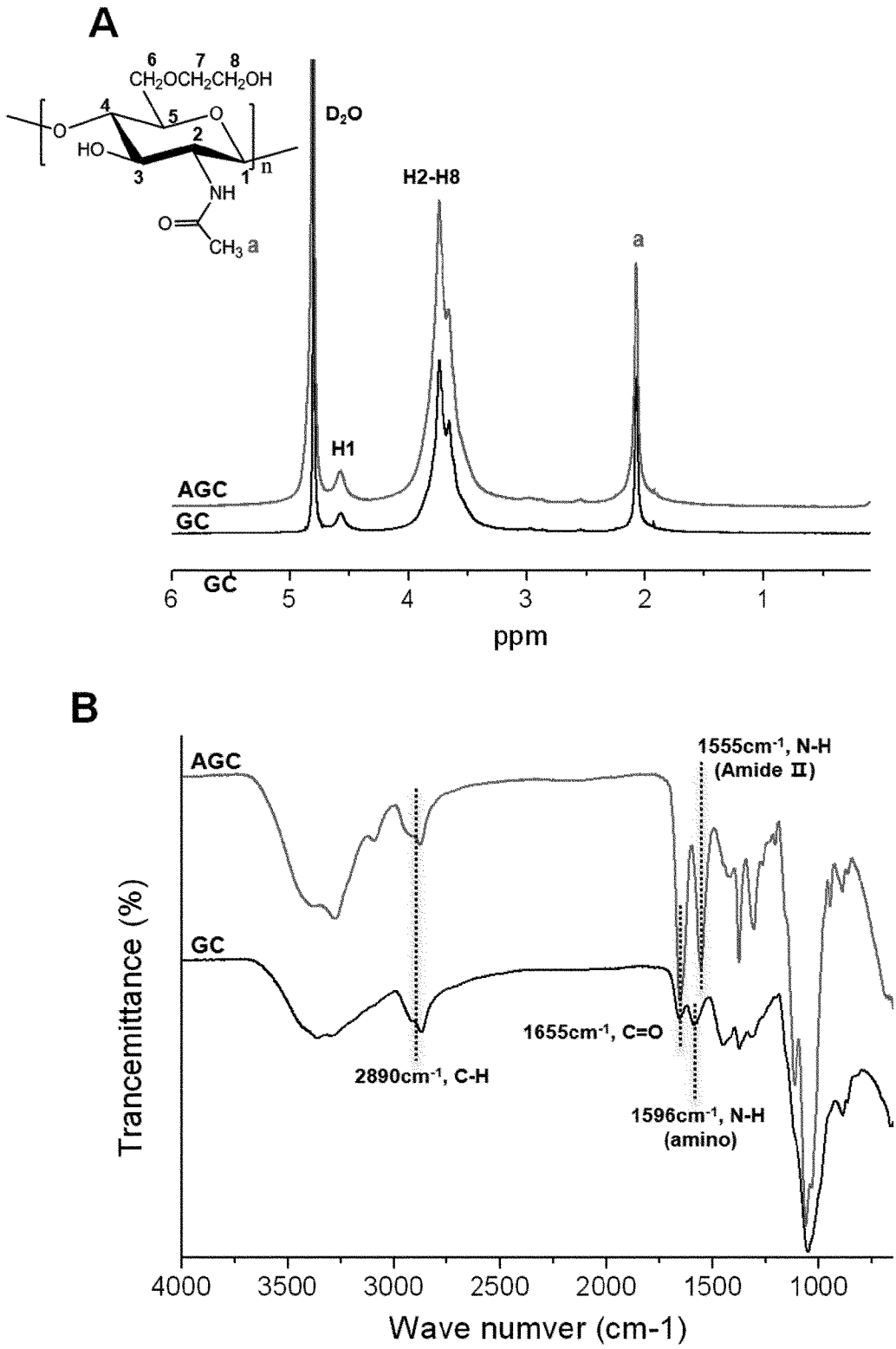
R_2 = —H or —C(=O)—CH_3 *N*-Acetyl glycol chitosan (AGC)

—C(=O)—$(CH_2)_4CH_3$ *N*-Hexanoyl glycol chitosan (HGC)

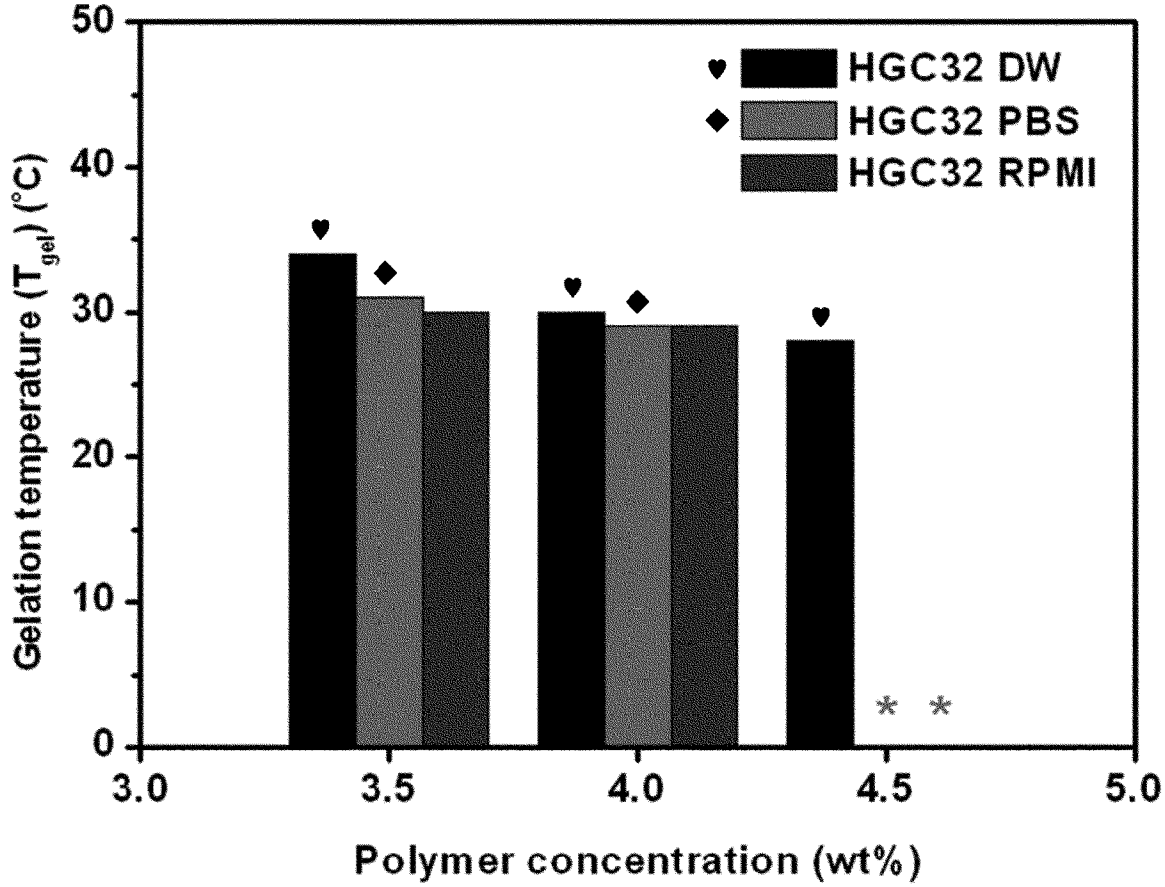
[도2]


A
6 7 8
CH2OCH2CH2OH
4
5
O
2
HO
3
1
n
NH
O
CH2 a
b H2C
CH2 c
d H2C
CH3 e
D2O
H2-H8
e
c+d
a
b
H1
HGC40
HGC36
HGC32
HGC20
GC
6 5 4 3 2 1 0
ppm
B
HGC40
HGC36
HGC32
HGC20
GC
1555cm-1, N-H
(Amide II)
1655cm-1, C=O
2890cm-1, C-H
1596cm-1, N-H
(amino)
Trancemittance (%)
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000
Wave number (cm-1)

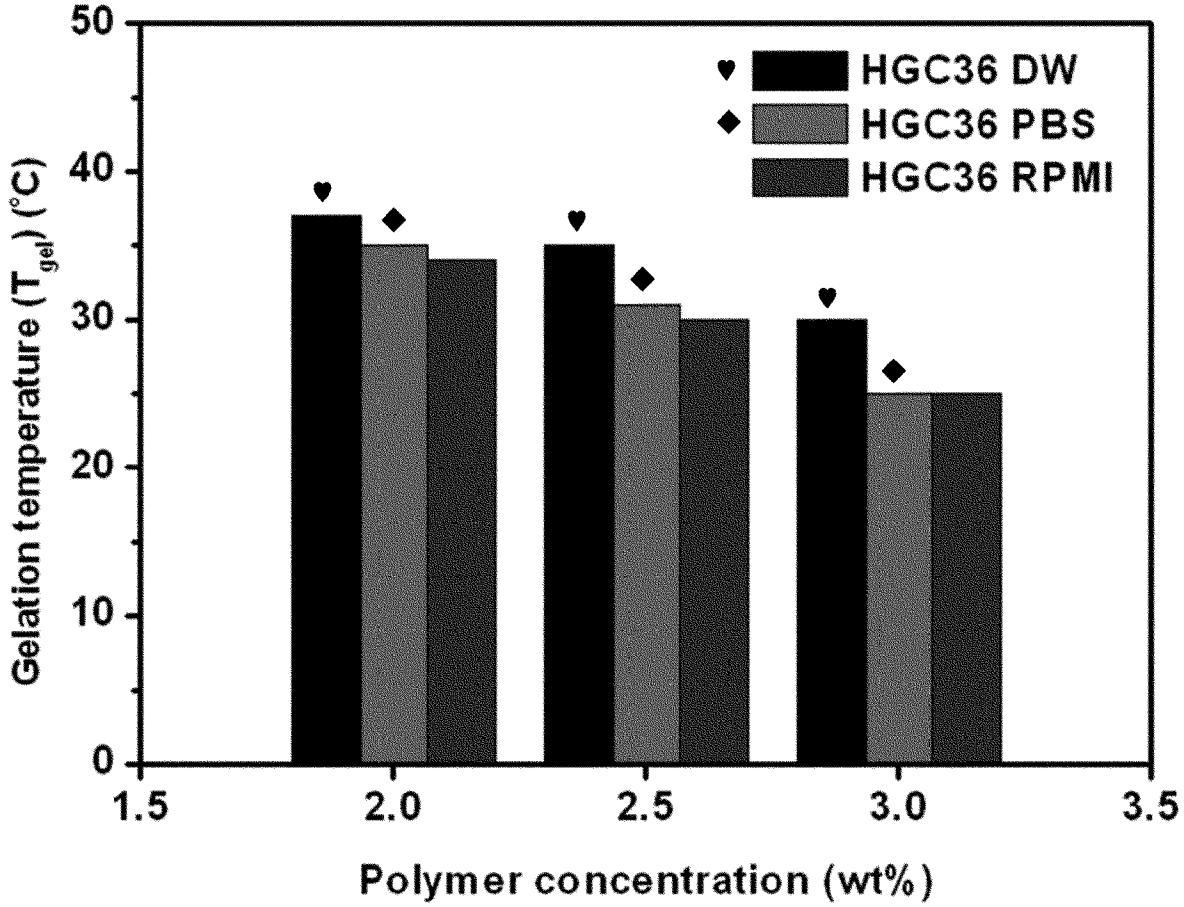
[도3]


A
6 7 8
CH2OCH2CH2OH
4
5
O
2
HO
3
1
n
NH
O
CH3 a
D2O
H2-H8
a
H1
AGC
GC
GC
6
5
4
3
2
1
ppm
B
AGC
GC
1555cm-1, N-H
(Amide II)
1655cm-1, C=O
2890cm-1, C-H
1596cm-1, N-H
(amino)
Trancemittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wave numver (cm-1)

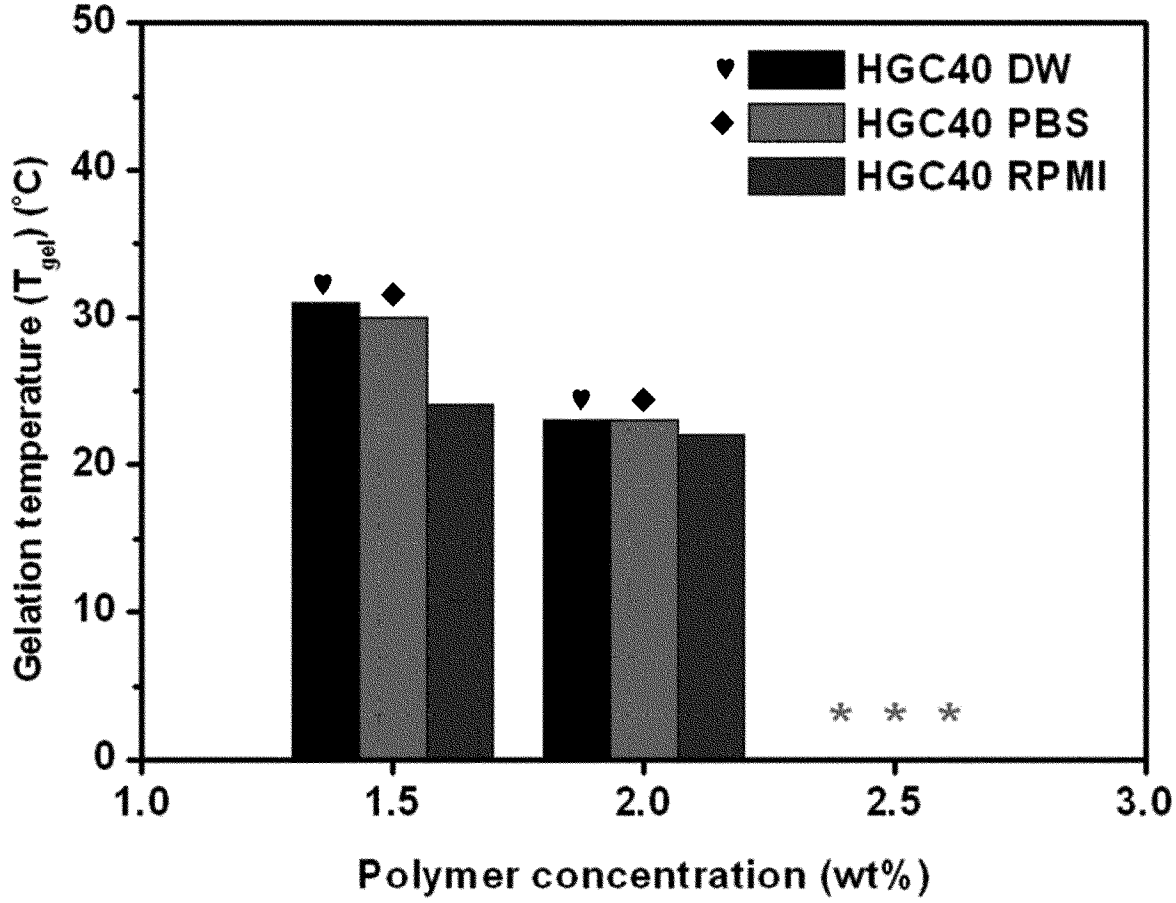
[도4a]


HGC32 DW
HGC32 PBS
HGC32 RPMI
Gelation temperature (T_{gel}) (°C)
Polymer concentration (wt%)
0
10
20
30
40
50
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0

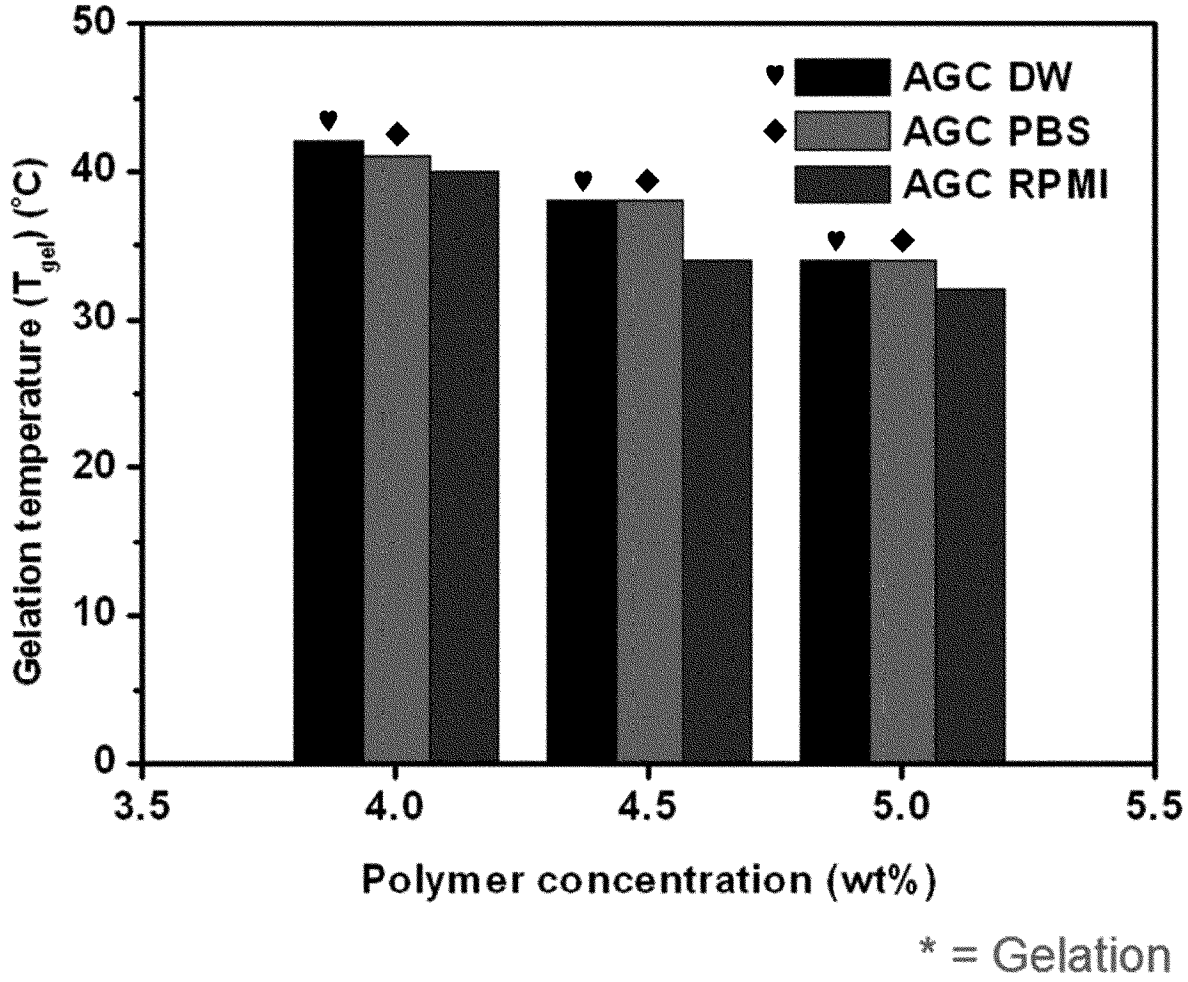
[도4b]


HGC36 DW
HGC36 PBS
HGC36 RPMI
Gelation temperature (T_{gel}) (°C)
Polymer concentration (wt%)
0
10
20
30
40
50
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5

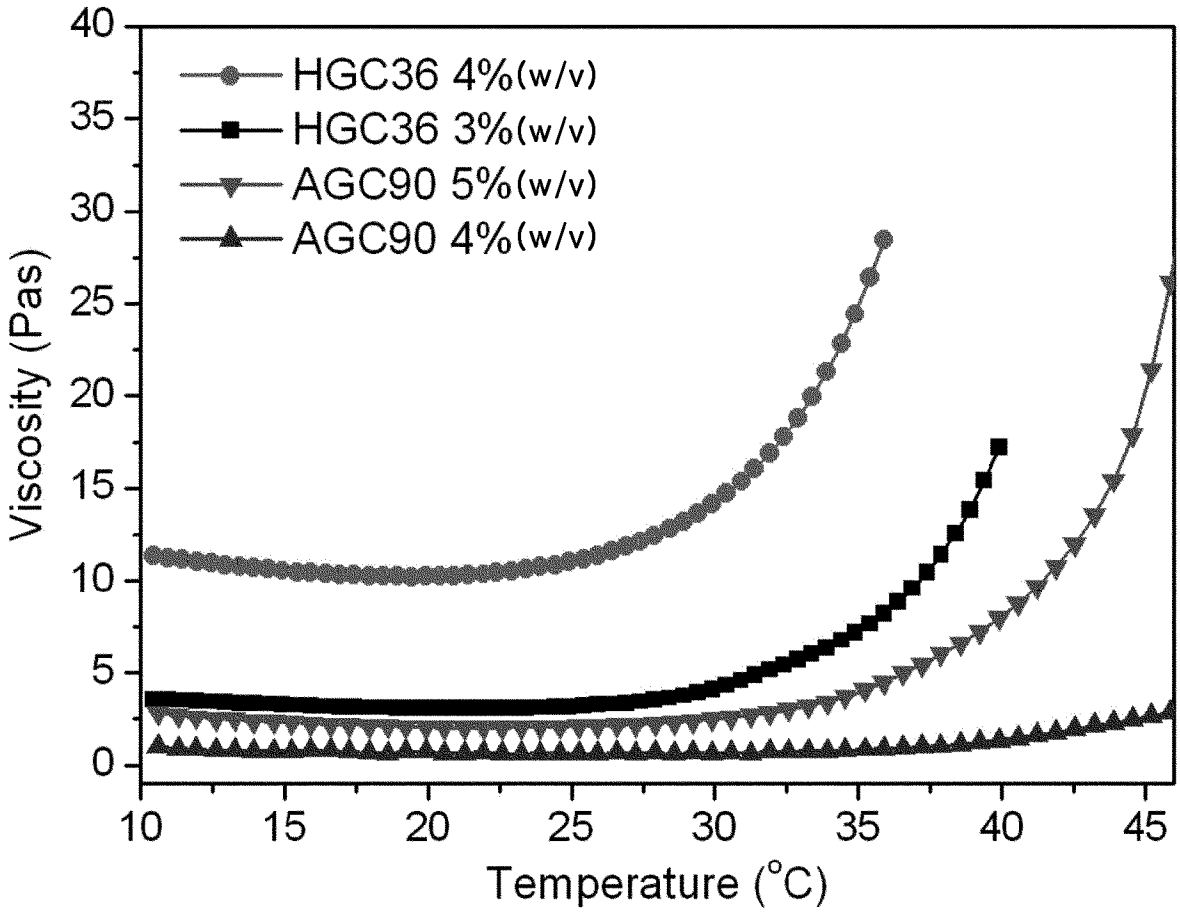
[도4c]


HGC40 DW
HGC40 PBS
HGC40 RPMI
Gelation temperature (T_{gel}) (°C)
Polymer concentration (wt%)
0
10
20
30
40
50
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
* * *

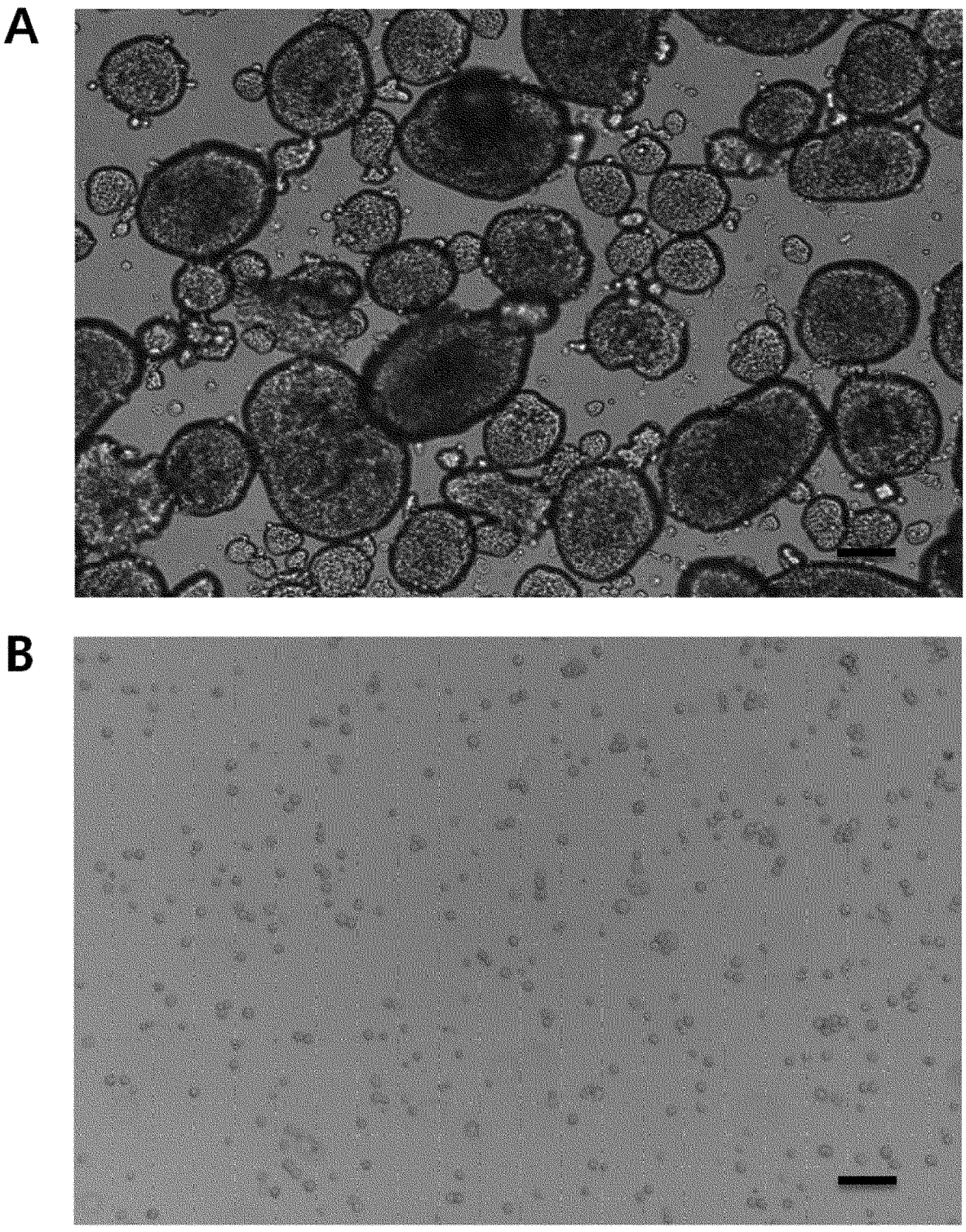
[도4d]


50
40
30
20
10
0
Gelation temperature (T_{gel}) (°C)
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
Polymer concentration (wt%)
AGC DW
AGC PBS
AGC RPMI
* = Gelation

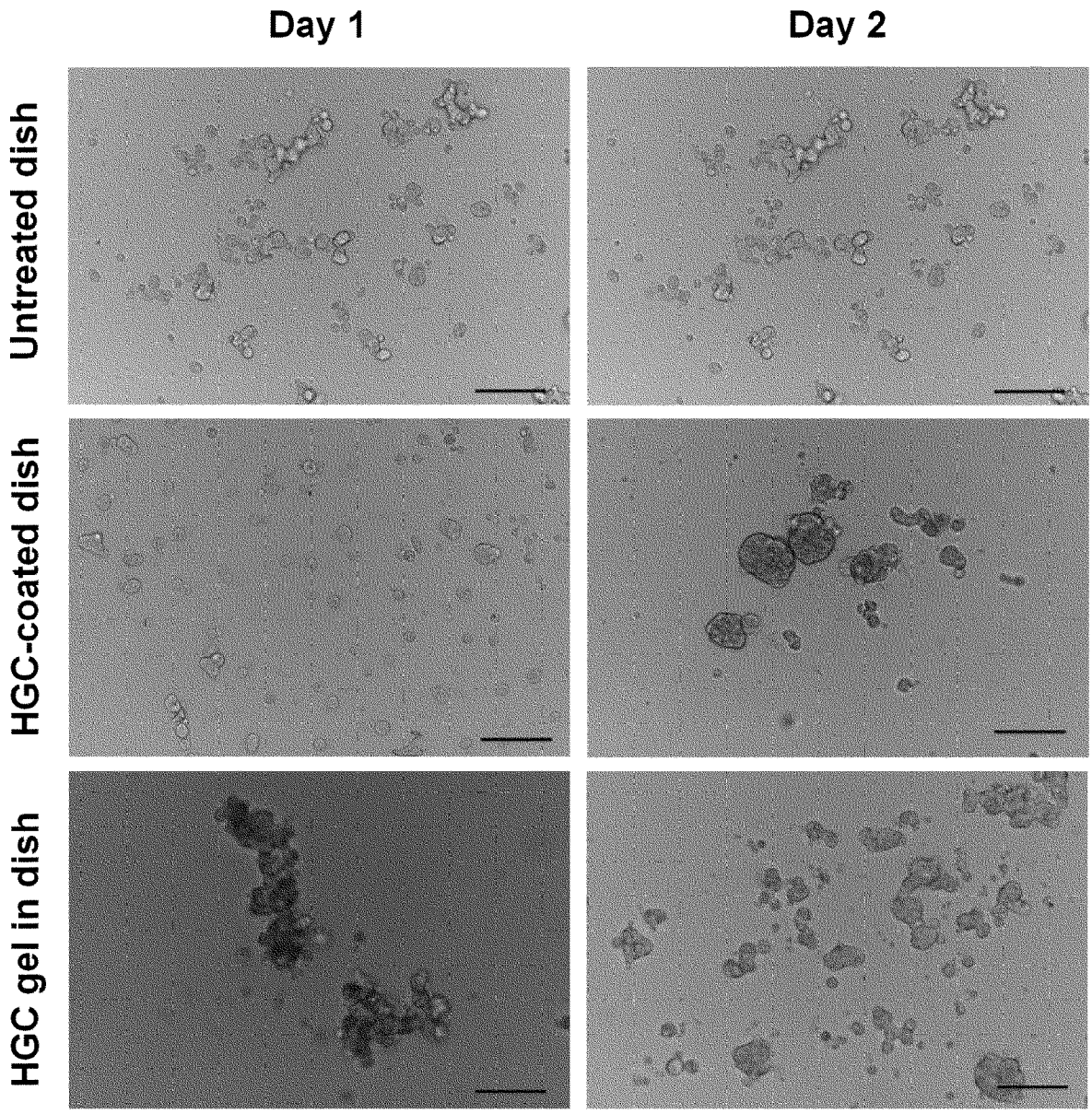
[도5]


HGC36 4%(w/v)
HGC36 3%(w/v)
AGC90 5%(w/v)
AGC90 4%(w/v)
Viscosity (Pas)
Temperature (°C)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
10
15
20
25
30
35
40
45

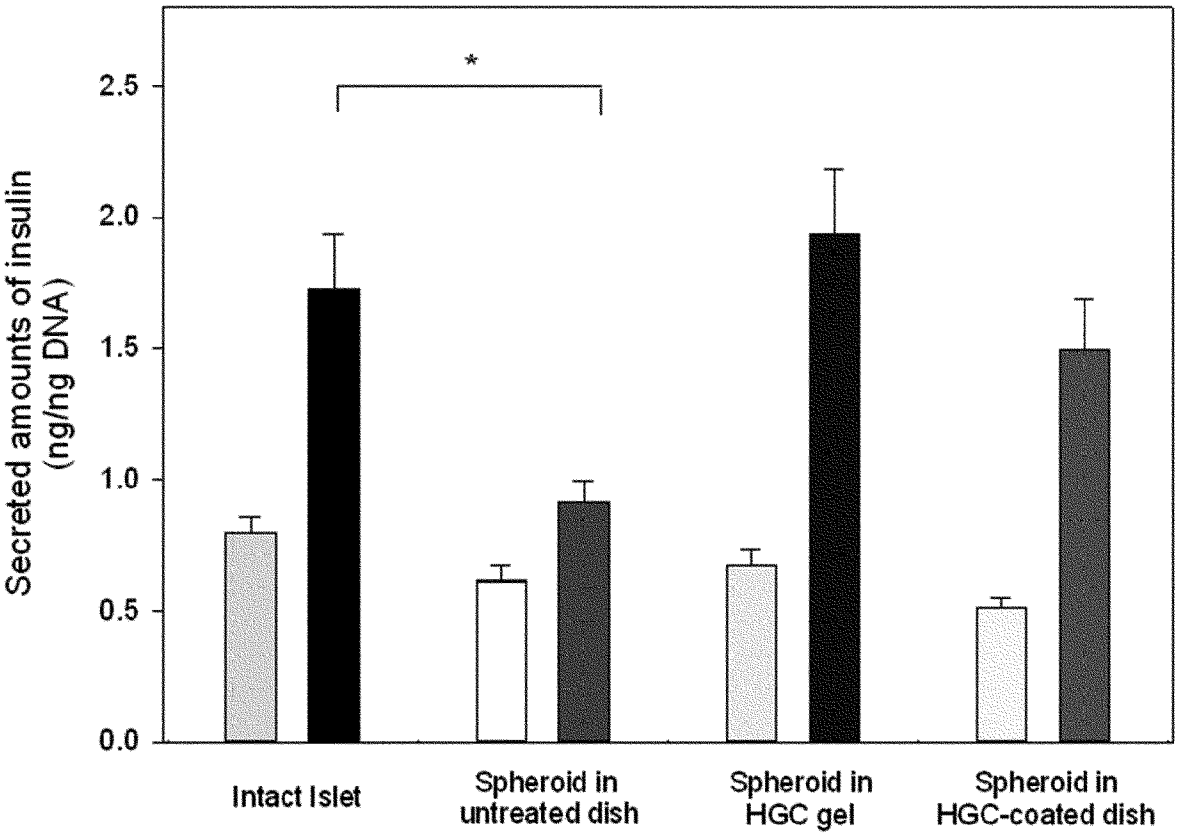
[도6]



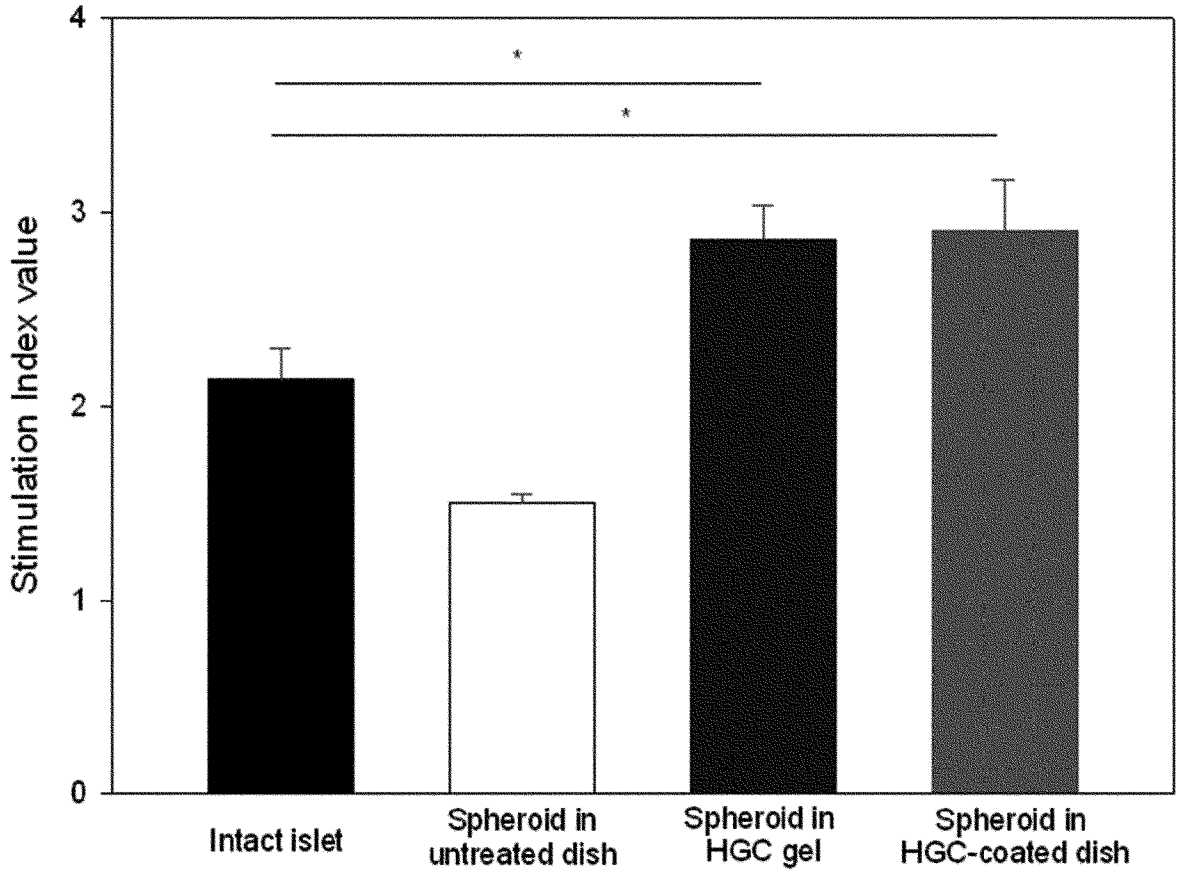
[도7a]



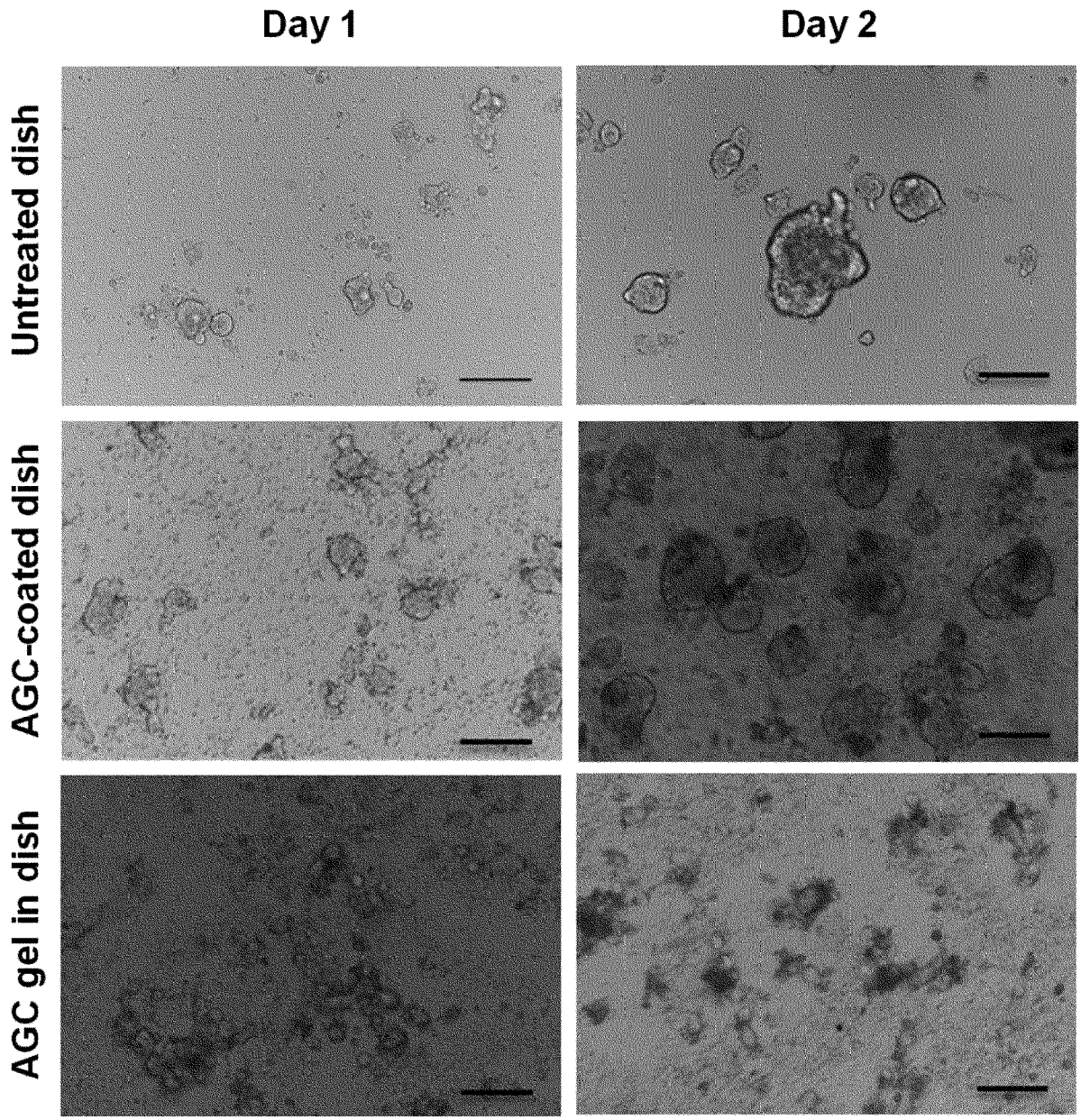
[도7b]


Secreted amounts of insulin (ng/ng DNA)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Intact Islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in HGC gel
Spheroid in HGC-coated dish

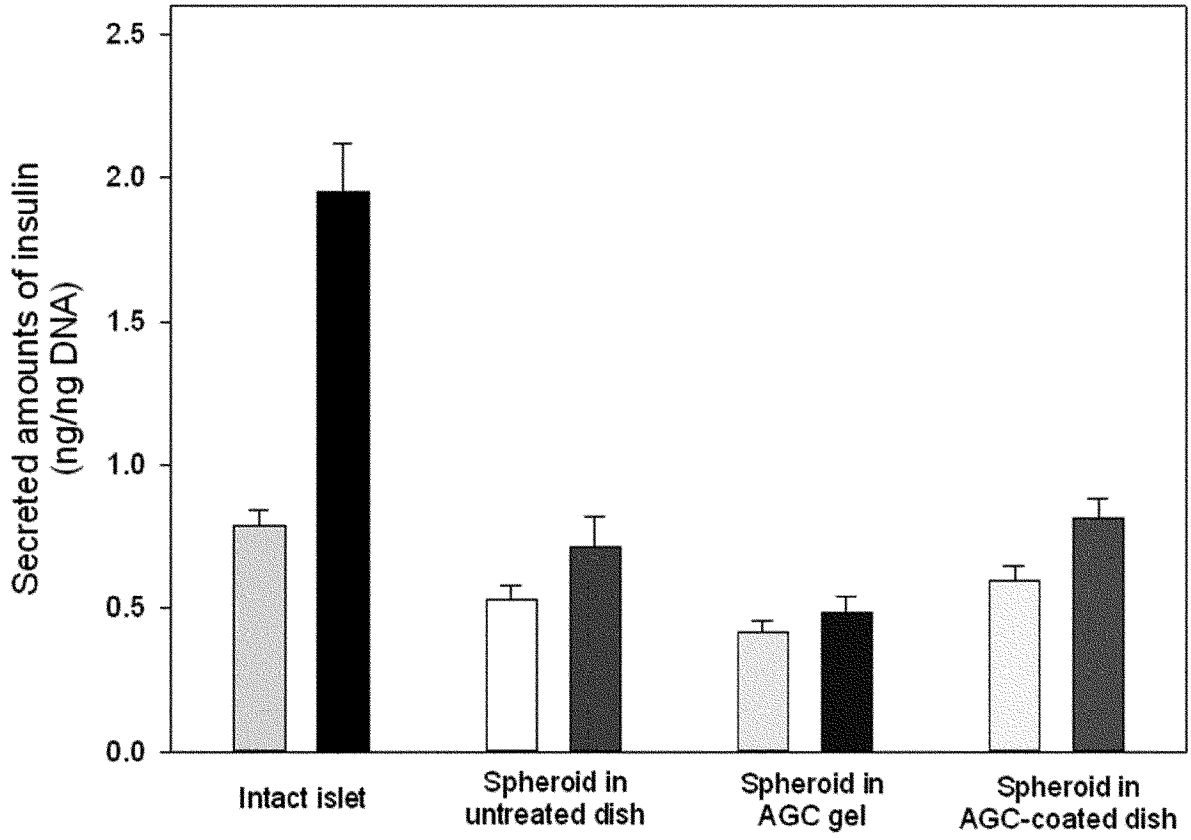
[도7c]


Stimulation Index value
4
3
2
1
0
*
*
Intact islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in HGC gel
Spheroid in HGC-coated dish

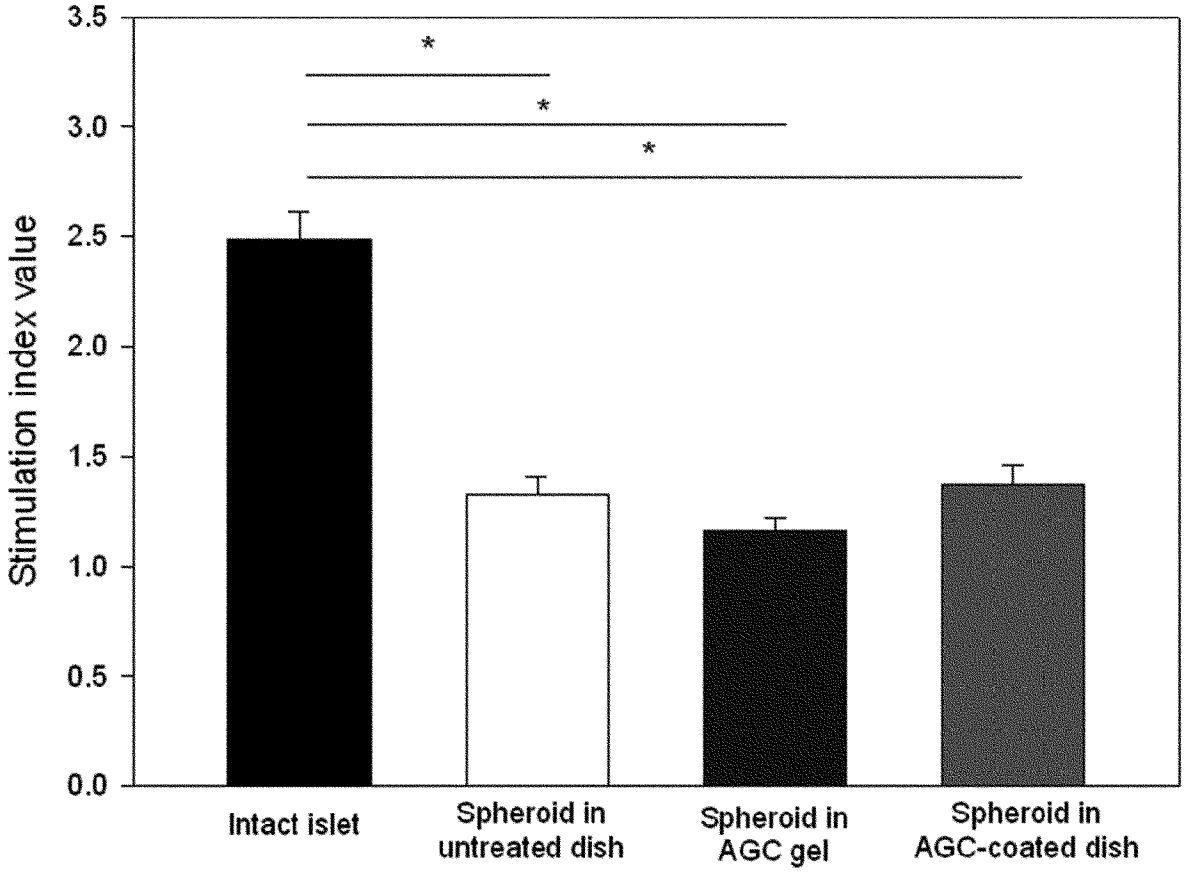
[도8a]



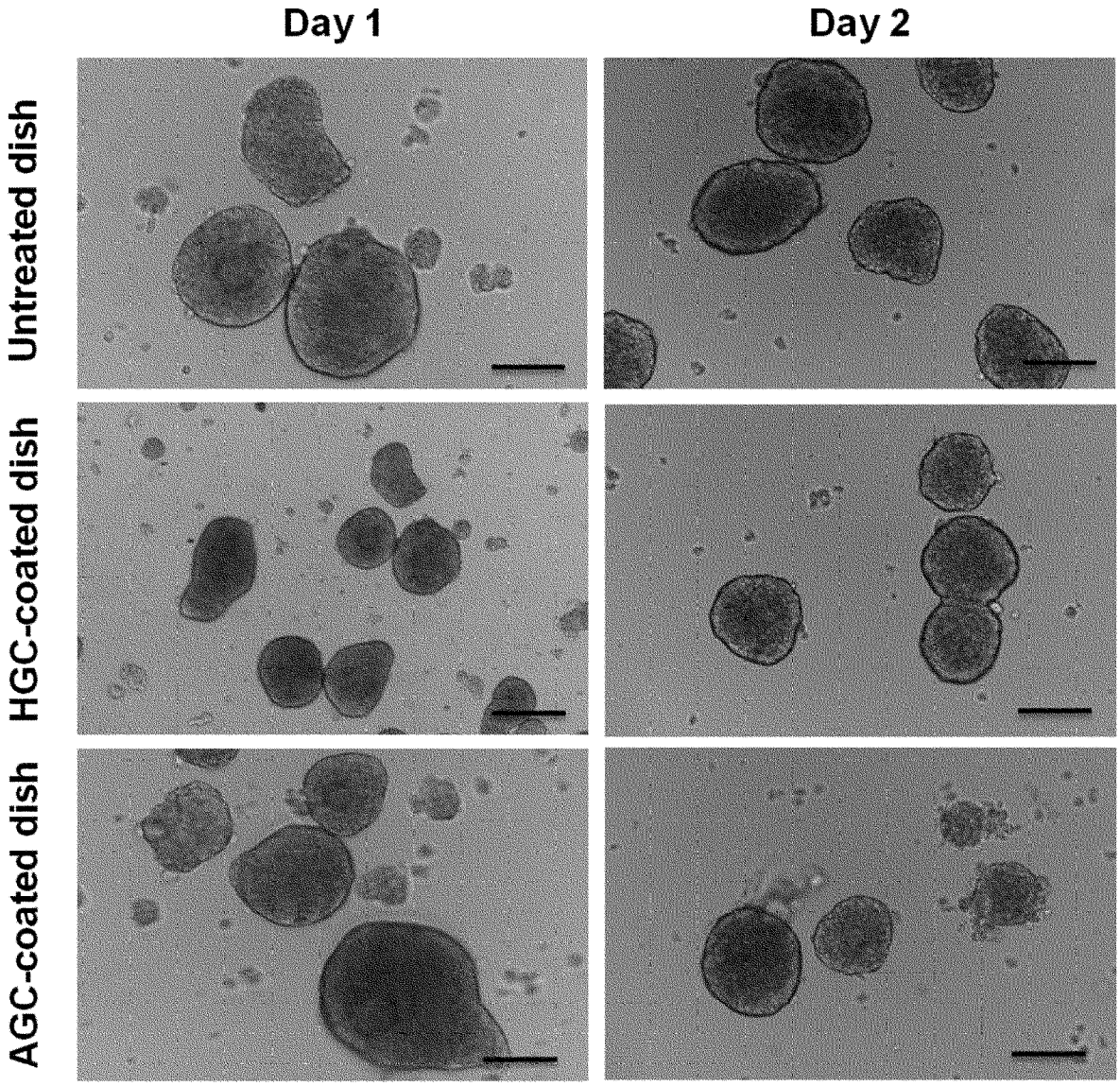
[도8b]


Secreted amounts of insulin (ng/ng DNA)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Intact islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in AGC gel
Spheroid in AGC-coated dish

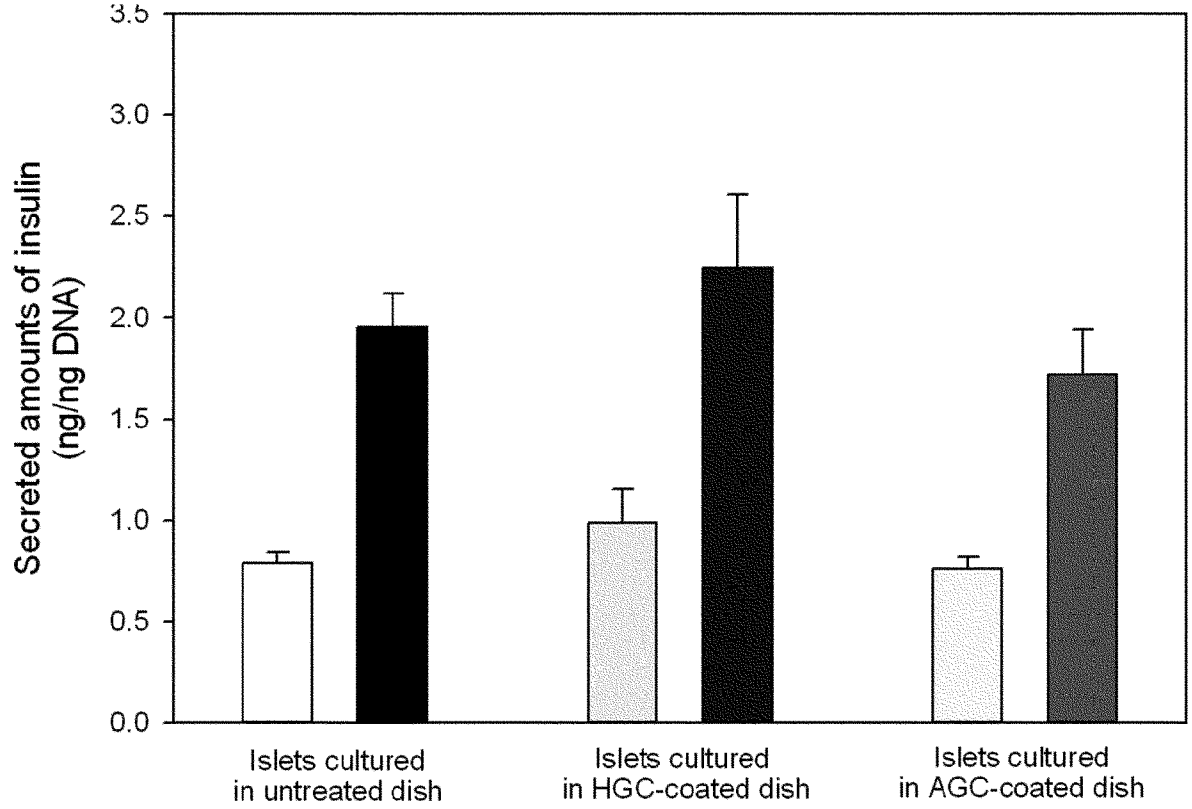
[도8c]


Stimulation index value
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
Intact islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in AGC gel
Spheroid in AGC-coated dish

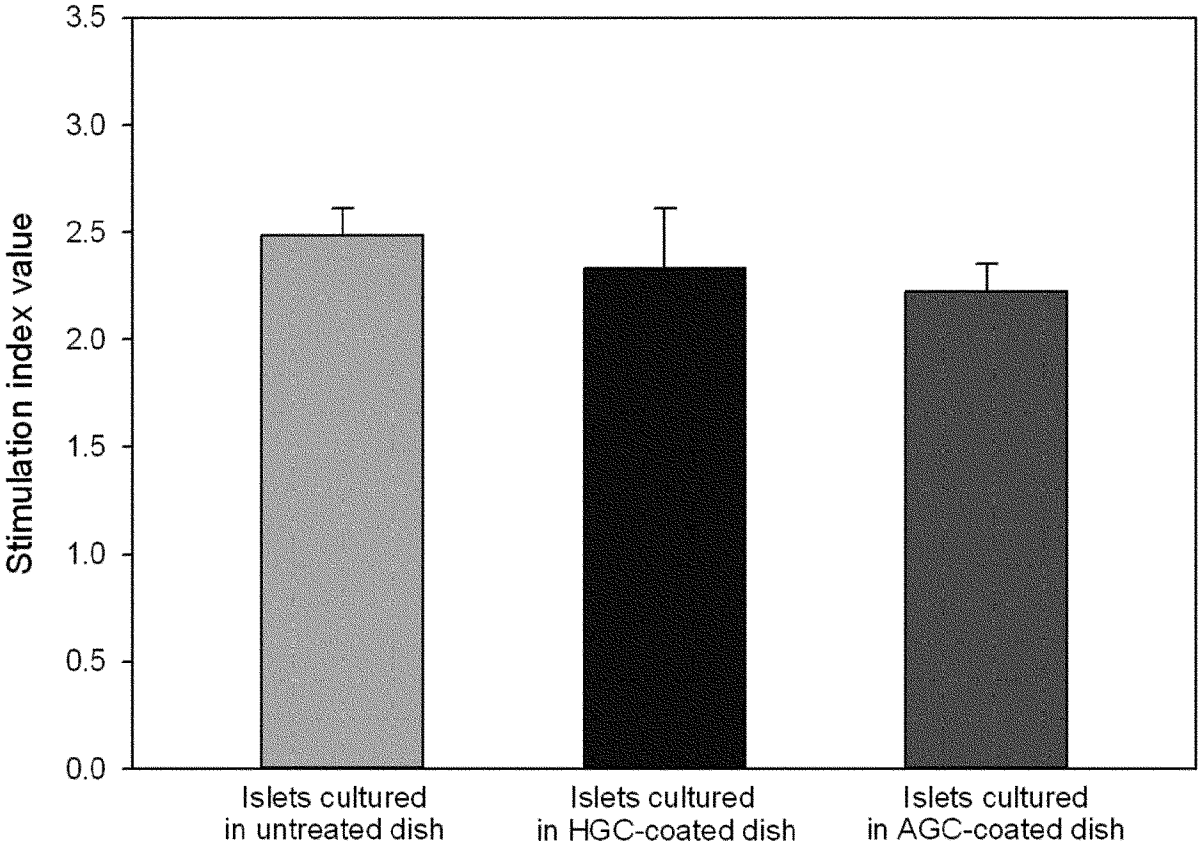
[도9a]



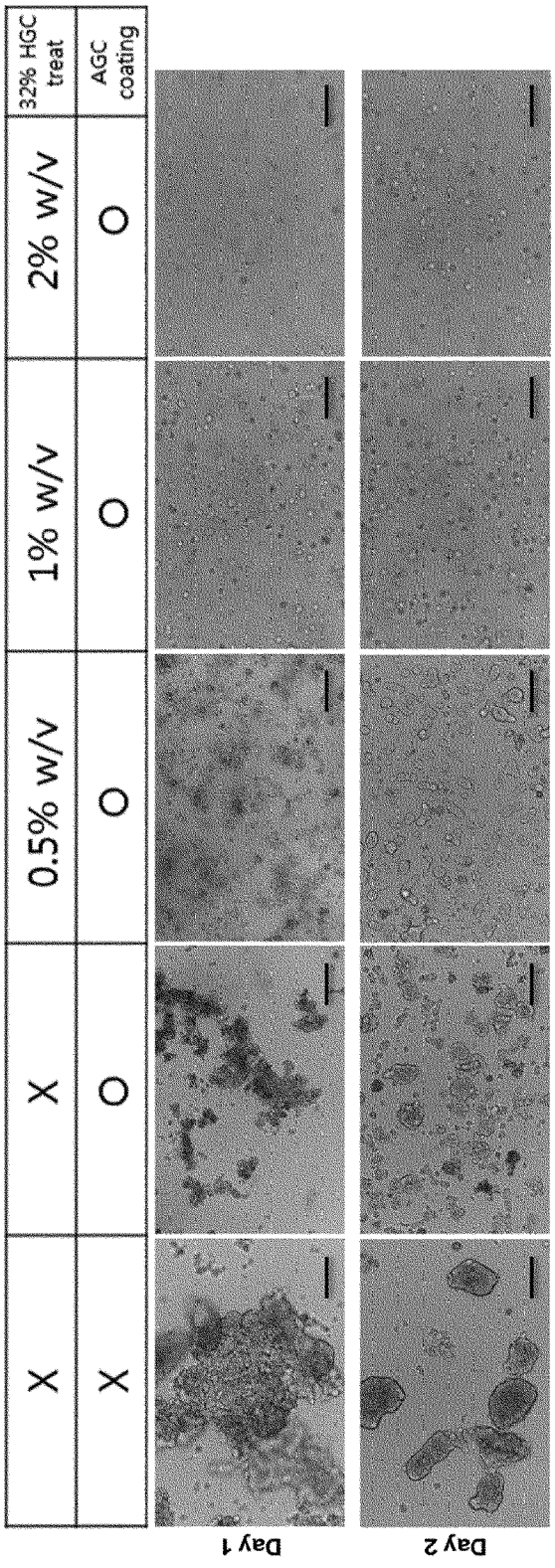
[도9b]


Secreted amounts of insulin (ng/ng DNA)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Islets cultured in untreated dish
Islets cultured in HGC-coated dish
Islets cultured in AGC-coated dish

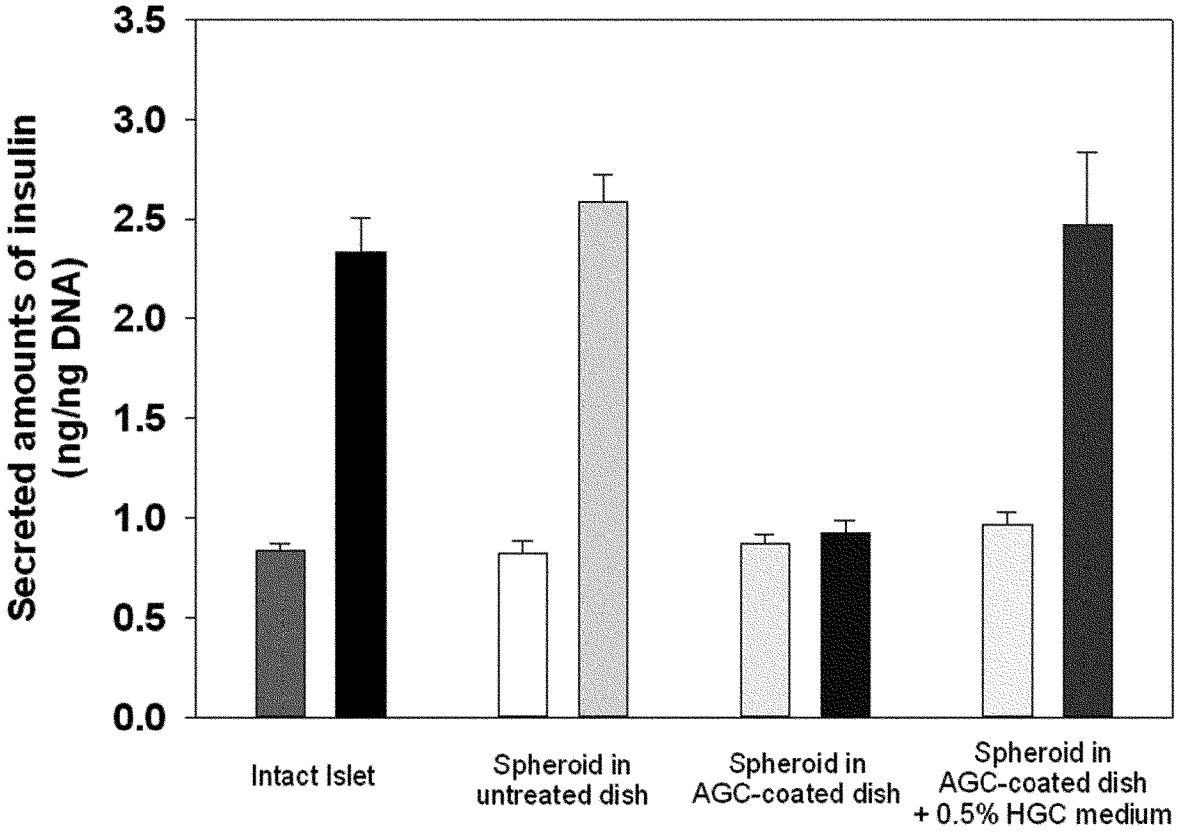
[도9c]


Stimulation index value
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Islets cultured in untreated dish
Islets cultured in HGC-coated dish
Islets cultured in AGC-coated dish

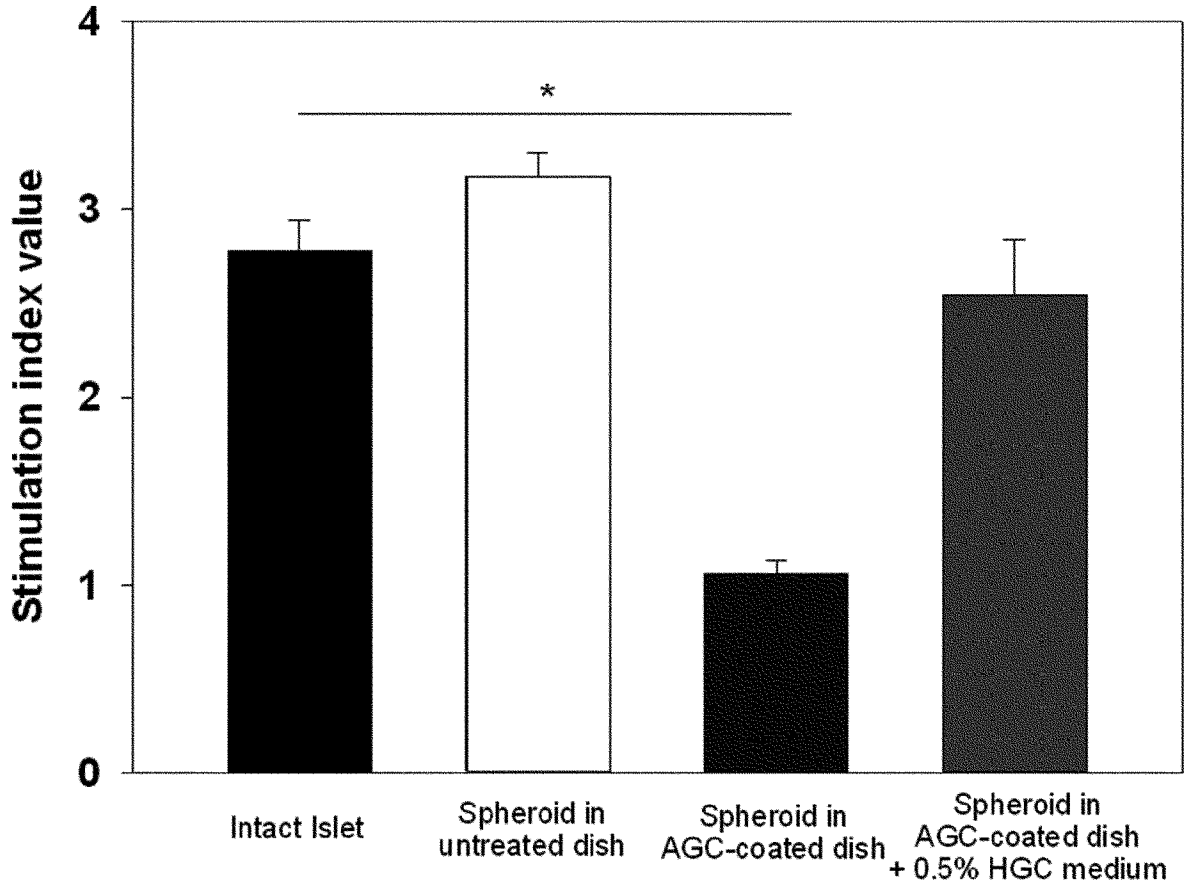
[도10a]



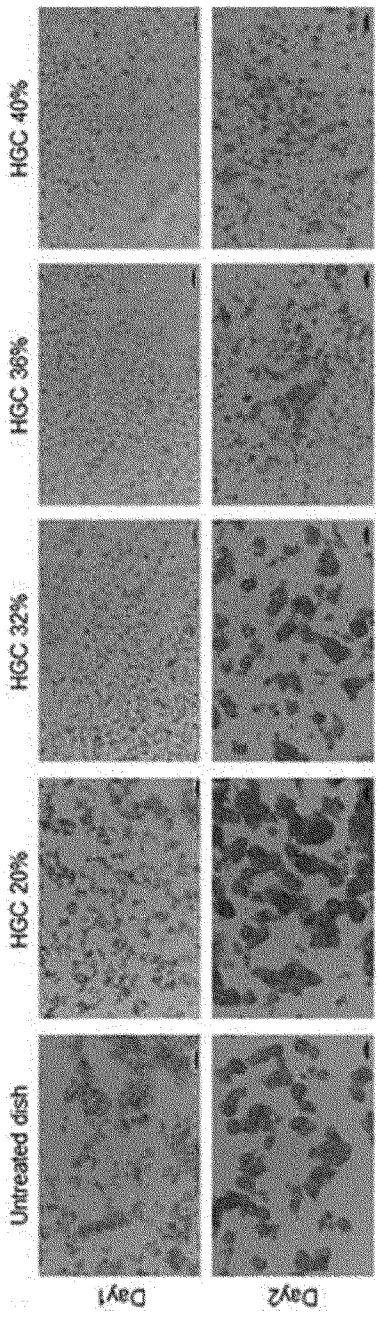
[도10b]


Secreted amounts of insulin (ng/ng DNA)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Intact Islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in AGC-coated dish
Spheroid in AGC-coated dish + 0.5% HGC medium

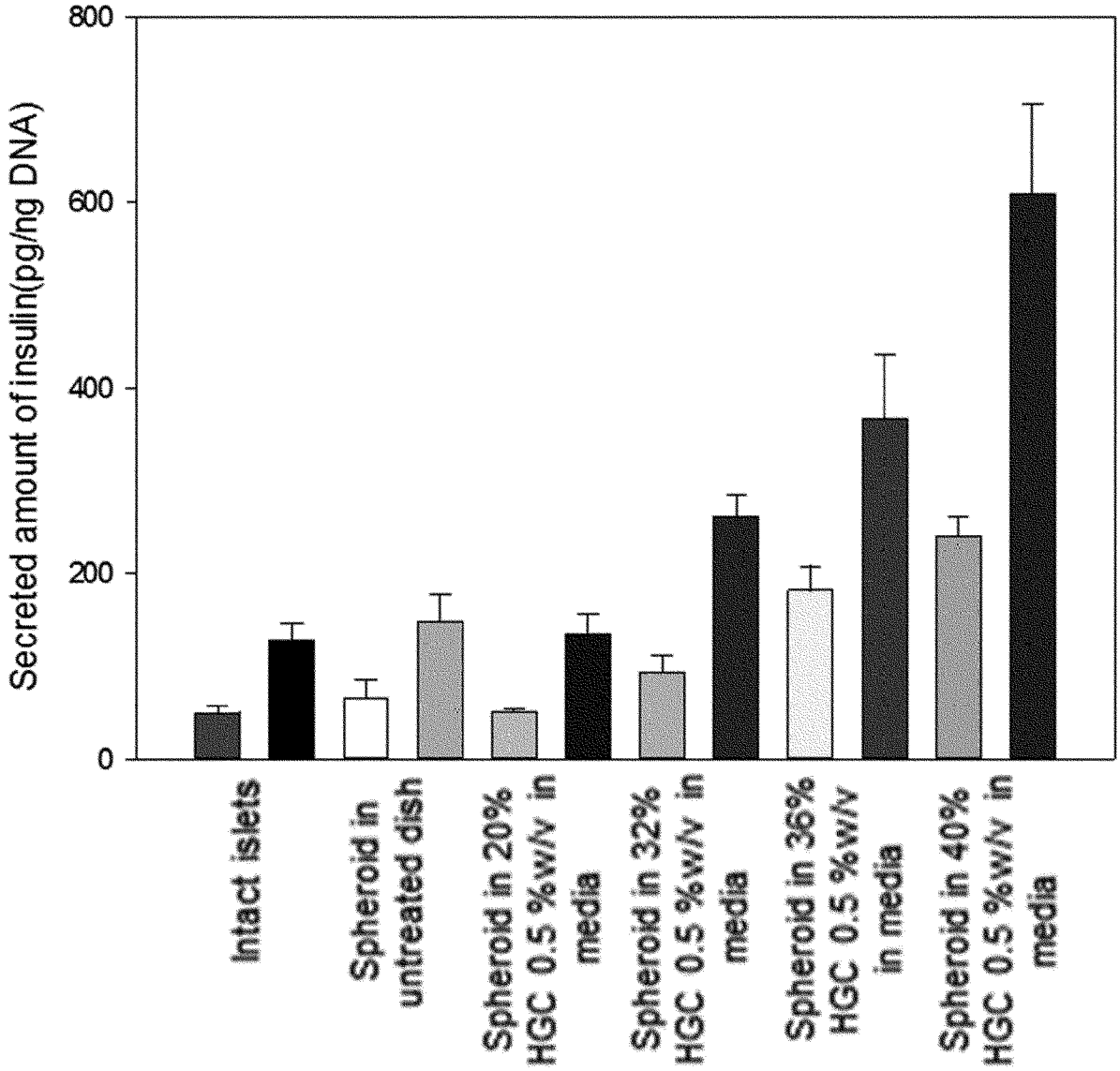
[도10c]


Stimulation index value
4
3
2
1
0
*
Intact Islet
Spheroid in untreated dish
Spheroid in AGC-coated dish
Spheroid in AGC-coated dish + 0.5% HGC medium

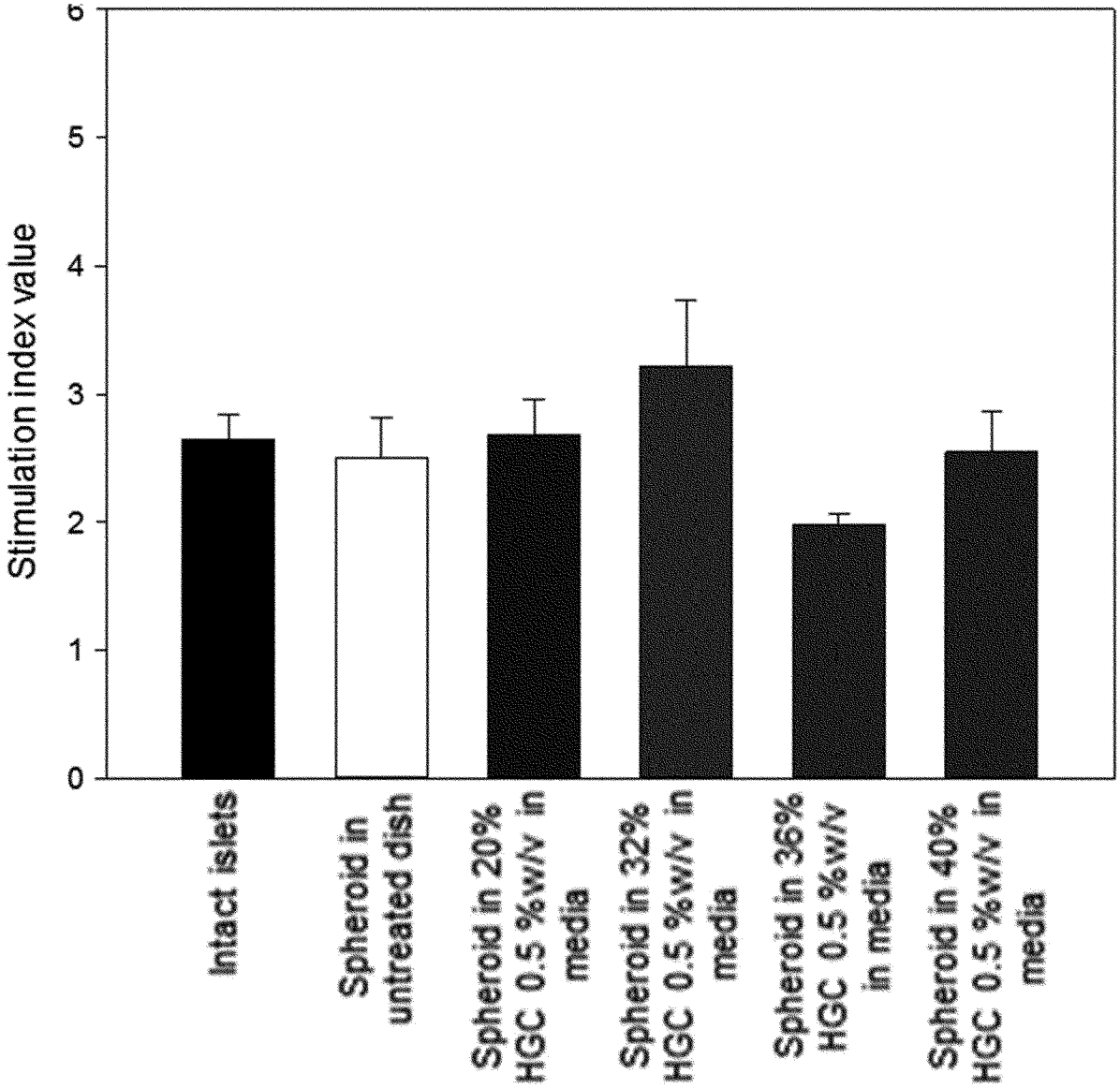
[도11a]



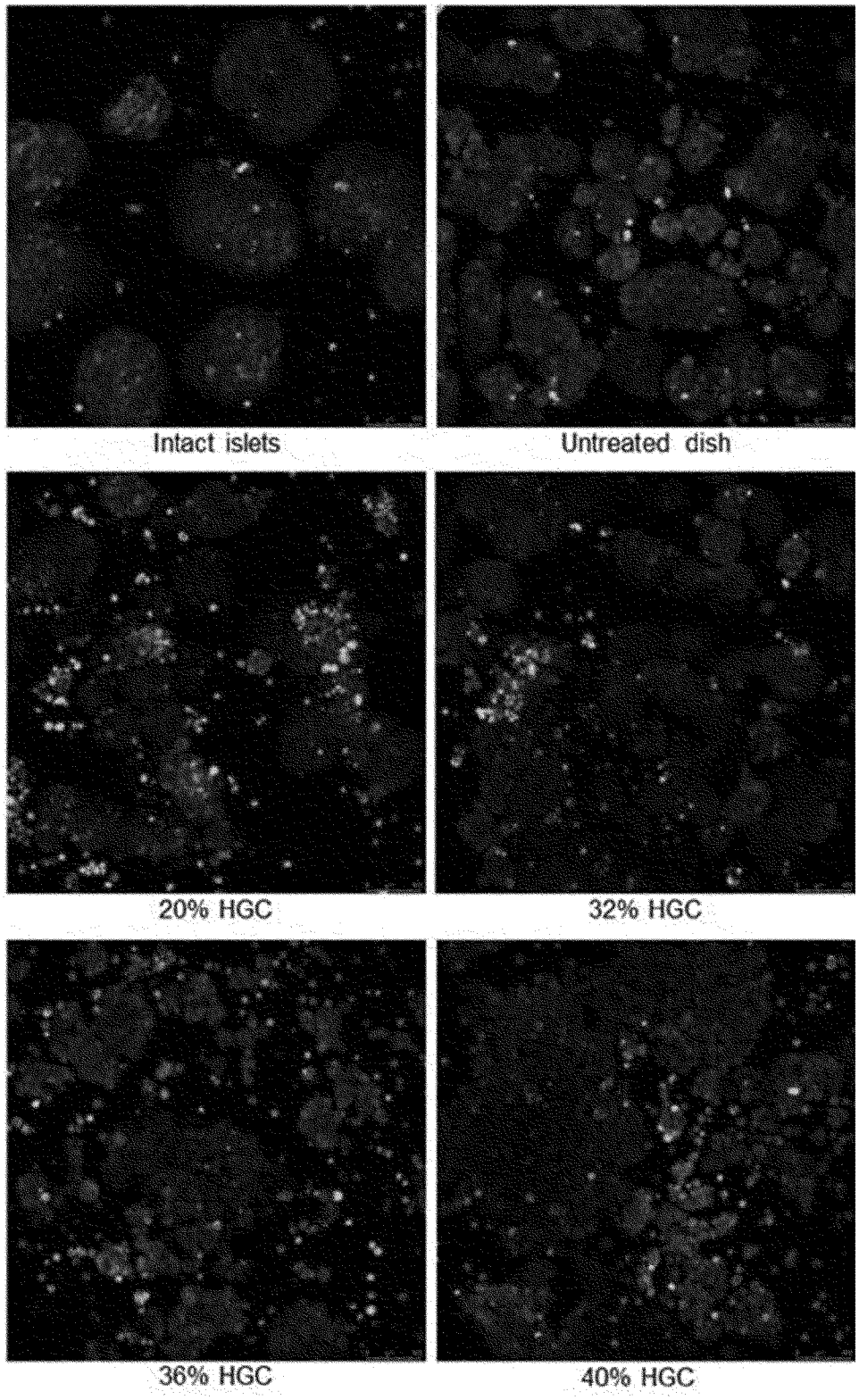
[도11b]


Secreted amount of insulin(pg/ng DNA)
800
600
400
200
0
Intact islets
Spheroid in untreated dish
Spheroid in 20% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 32% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 36% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 40% HGC 0.5 %w/v in media

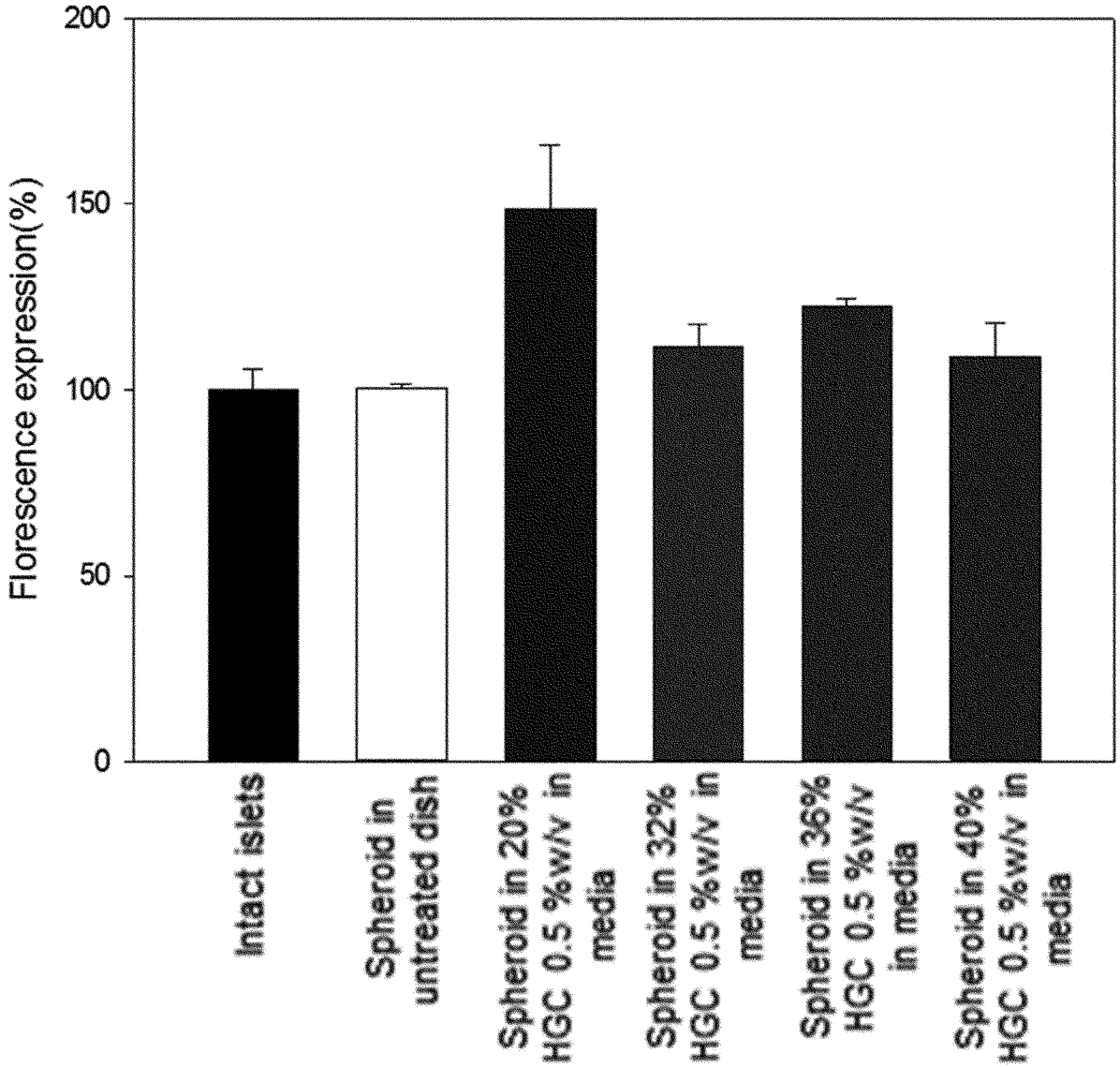
[도11c]


Stimulation index value
0
1
2
3
4
5
6
Intact islets
Spheroid in untreated dish
Spheroid in 20% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 32% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 36% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 40% HGC 0.5 %w/v in media

[도11d]



[도11e]


Florescence expression(%)
200
150
100
50
0
Intact islets
Spheroid in untreated dish
Spheroid in 20% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 32% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 36% HGC 0.5 %w/v in media
Spheroid in 40% HGC 0.5 %w/v in media

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/004784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i, C08B 37/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; A61K 35/39; C12M 3/00; C08B 37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: acetyl-glycol chitosan derivative, hexanoyl-glycol chitosan derivative, cell spheroid, endocrine cell cluster

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0064896 A (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 20 June 2012 See paragraphs [0040], [0070], [0087]-[0106]; claims 1-11.	1-8
Y	KR 10-2016-0027669 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY et al.) 10 March 2016 See paragraphs [0042], [0061]-[0063]; claims 7-9.	1-8
A	YOU, Ho Seon et al., "Synthesis of N-acetylated Glycol Chitosans and Their Thermo-sensitive Sol-gel Transition Properties", Polymer(Korea), 2016, vol. 40, no. 2, pages 328-335 See the entire document.	1-8
A	CHO, Myeong Ok et al., "Bioinspired Tuning of Glycol Chitosan for 3D Cell Culture", NPG Asia Materials, 2016, vol. 8, thesis no. e309 (inner pages 1-10) See the entire document.	1-8
A	KR 10-2015-0124690 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 06 November 2015 See the entire document.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 AUGUST 2018 (27.08.2018)	**27 AUGUST 2018 (27.08.2018)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/004784

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0064896 A	20/06/2012	KR 10-1289023 B1	23/07/2013
KR 10-2016-0027669 A	10/03/2016	JP 2017-526373 A	14/09/2017
		KR 10-1647793 B1	12/08/2016
		US 2017-0275586 A1	28/09/2017
		WO 2016-036011 A1	10/03/2016
KR 10-2015-0124690 A	06/11/2015	KR 10-1596369 B1	22/02/2016
		WO 2015-167253 A1	05/11/2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/004784

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i, C08B 37/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/071; A61K 35/39; C12M 3/00; C08B 37/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아세틸-글리콜 키토산 유도체, 헥사노일-글리콜 키토산 유도체, 세포 스페로이드, 내분비 세포 클러스터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0064896 A (한양대학교 산학협력단) 2012.06.20 단락 [0040], [0070], [0087]-[0106]; 청구항 1-11 참조.	1-8
Y	KR 10-2016-0027669 A (충남대학교산학협력단 등) 2016.03.10 단락 [0042], [0061]-[0063]; 청구항 7-9 참조.	1-8
A	유호선 등, `N-아세틸화 글리콜 키토산의 합성과 온도감응성 졸-젤 전이 특성' Polymer(Korea), 2016, 40권, 2호, 페이지 328-335 전체 문헌 참조.	1-8
A	CHO, MYEONG OK 등, `Bioinspired tuning of glycol chitosan for 3D cell culture` NPG Asia Materials, 2016, 8권, 논문번호 e309 (내부 페이지 1-10) 전체 문헌 참조.	1-8
A	KR 10-2015-0124690 A (서울대학교산학협력단) 2015.11.06 전체 문헌 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 08월 27일 (27.08.2018)	2018년 08월 27일 (27.08.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/004784

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0064896 A	2012/06/20	KR 10-1289023 B1	2013/07/23
KR 10-2016-0027669 A	2016/03/10	JP 2017-526373 A	2017/09/14
		KR 10-1647793 B1	2016/08/12
		US 2017-0275586 A1	2017/09/28
		WO 2016-036011 A1	2016/03/10
KR 10-2015-0124690 A	2015/11/06	KR 10-1596369 B1	2016/02/22
		WO 2015-167253 A1	2015/11/05