



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176000

(43) 공개일자 2024년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0068 (2013.01)

C12N 5/0656 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0076370

(22) 출원일자 2023년06월14일

심사청구일자 2023년06월14일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박경민

인천광역시 연수구 해송로 70, 217동 1002호

나경석

인천광역시 부평구 후정로 7, 104동 1303호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차준용

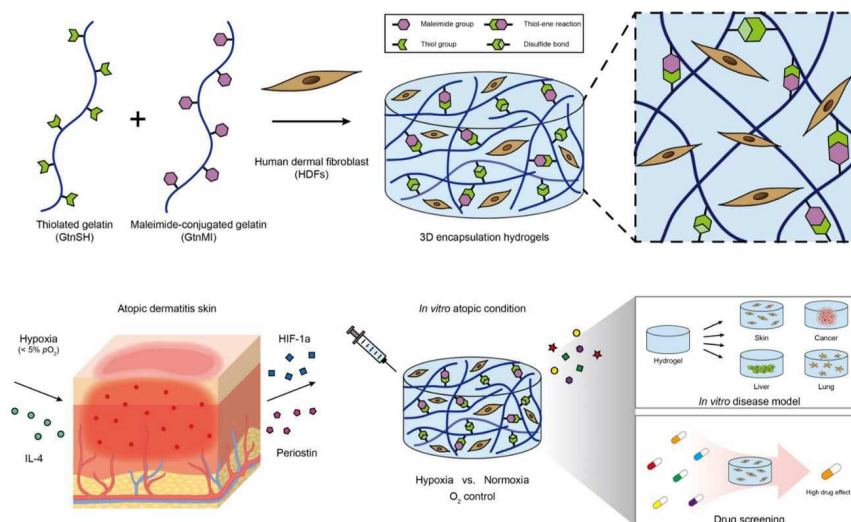
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 산소 농도 조절이 가능한 3차원 세포 배양용 하이드로젤 제조방법 및 질병 모델 제조방법

(57) 요약

본 발명은 하이드로젤을 기반으로 하여 산소 농도 조절이 가능한 아토피 피부염 모델 개발을 개발하였으며, 3차원 세포 배양과 하이드로젤 내부의 산소 농도 조절을 통해 정교한 질병 환경 모사가 가능하다는 것을 특징으로 한다. 또한 고분자의 다양한 구성 요소를 변화시켜 상전이 시간과 기계적 특성을 쉽게 제어할 수 있고, 우수한 세포 적합성을 통해 하이드로젤의 안정성도 확인하였다. 하이드로젤 기반 3차원 세포 배양과 산소 농도 조절을 통해 아토피 피부염과 관련된 인자가 발현되는 것을 확인하였고, 처리 약물에 따른 발현 변화도 확인하였다. 또한, 본 발명은 3차원 세포 배양을 통해 기존 피부 모델이 가지고 있는 제한점을 개선할 수 있고, 약물 스크리닝을 위한 플랫폼을 제공할 수 있으며, 나아가 다양한 질병 모델에 적용할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2024.08)

(72) 발명자

박창욱

서울특별시 서초구 서운로 62, 108동 2702호

김탁균

서울특별시 강남구 삼성로57길 42, 202호

김태균

서울특별시 용산구 이촌로 347, 9동 1203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711189161
과제번호	2021R1A4A5032185
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실지원사업
연구과제명	만성 가려움증 제어 아토피 피부염 치료제 개발 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711186227
과제번호	2022R1A2C1010024
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	아연 이온 방출 하이드로 젤을 이용한 내인성 조직 재생 기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

티올 작용기를 포함하는 고분자 및 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자를 혼합하여 가교시키는 단계를 포함하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계는 각각의 고분자를 용매에 녹인 용액을 혼합하는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 용매는 PBS(Phosphate Buffered Saline), 헹크 버퍼(hanks buffer), HEPES 버퍼, DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline) 버퍼 및 MOPS 버퍼 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고분자는 카르복실기 및 아민기를 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고분자는 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 헤파린(heparin), 셀룰로스(cellulose), 덱스트란(dextran), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 케라틴(keratin), 케라탄 설페이트(keratan sulfate), 더마탄 설페이트(dermatan sulfate), 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 알부민(albumin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 비트로넥틴(vitronectin), 히알루론산(hyaluronic acid), 피브리노겐(fibrinogen) 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 및 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG) 중에서 선택된 1종 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜; 및 테트로닉 시리즈(4arm-PP0-PEO);로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자인 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 티올 작용기를 포함하는 고분자는

시스타민 디하이드로클로라이드(cystamine dihydrochloride)를 상기 고분자의 카르복실기에 결합시키는 단계 및 이황화결합(disulfide bond; -S-S-)를 끊어주는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자는

6-말레이미도헥사노익엑시드(6-maleimidohexanoic acid; MHA)를 상기 고분자의 아민기에 결합시키는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤은 상기 고분자가 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)과 이황화결합(disulfide bond)에 의하여 가교되는 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

티올 작용기를 포함하는 고분자 대비 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자의 비율이 증가할수록 상전이 시간이 감소하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 티올 작용기의 당량비는 말레이미드 작용기의 당량비보다 작은 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤 내부의 산소 농도의 조절이 가능한 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의하여 제조된 세포 배양용 하이드로젤.

청구항 14

티올 작용기를 포함하는 고분자 용액 또는 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자 용액 중 어느 하나의 용액과 세포를 혼합하는 단계 및

상기 고분자 용액 중 다른 하나의 용액을 첨가하여 고분자를 가교시키는 단계를 포함하는 질병 모델 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

가교된 고분자를 성장배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 질병 모델 제조방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 산소 도 조절이 가능한 3차원 세포 배양용 하이드로젤 및 인공 질병 모델 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 하이드로젤 기반의 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법 및 이를 이용한 산소 농도 제어 3차원 인공 아토피 피부 모델/플랫폼의 개발에 관한 것이다. 보다 상세하게는 티올(thiol)기가 도입된 젤라틴 유도체(GtnSH)와 말레이미드(maleimide)기가 도입된 젤라틴 유도체(GtnMI)간의 이황화결합(disulfide bonds; -S-S-)과 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)을 통해 제작된 하이드로젤을 기반으로 산소 농도 제어를 통해 아토피 피부염 환경을 모사할 수 있는 3차원 인공 피부 모델의 개발에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 기존 인공 질병 모델들과 비교했을 때, 가교제 없이 고분자간 가교 반응을 통해 간단하고 신속하게 하이드로젤을 제조할 수 있으며, 나아가 제조 조건에 따라 하이드로젤의 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 제어할 수 있다. 또한 본 발명은 우수한 세포 적합성을 바탕으로 3차원 세포 배양 모델로서 활용할 수 있으며, 산소 농도 조절을 통해 아토피 미세환경을 모사할 수 있다는 장점이 있다.

배경 기술

[0003] 고분자 하이드로젤은 친수성 고분자의 다양한 물리화학적 가교 반응을 통해 형성된 3차원 네트워크로 우수한 생체 적합성, 기계적 순응도, 다공성 구조를 통한 높은 투과성, 우수한 세포 접착성 및 치료물질의 손쉬운 담지 등의 특징을 가진다. 이러한 특징들로 인해 in situ 가교 하이드로젤은 조직공학용 지지체, 약물/세포 전달체, 인공 조직 모델 등의 분야에 활용되어 왔다. 특히, in situ 가교 하이드로젤은 상전이 시간 또는 기계적 물성 같은 다양한 물리/화학적 특성을 조절하여 세포외기질(Extracellular matrix; ECM)의 특성을 모사할 수 있다. 우수한 세포 적합성을 기반으로 세포를 담지할 수 있기 때문에 인공 피부 모델을 포함한 다양한 조직 모델 개발에 사용되어 왔다. 이러한 in situ 가교 하이드로젤은 천연 및 합성 고분자를 이용하여 제조가 가능하며, 다양한 화학적 및 물리적 가교를 통하여 하이드로젤 형성이 가능하다.

[0004] 아토피 피부염은 만성 염증성 피부 질환으로 심각한 가려움증, 재발성 습진 병변, 부기, 발진 등의 특징을 가지는 가장 흔한 염증성 피부 질환이다. 아토피 피부염을 포함한 다양한 알레르기 질환에서 저산소(<5% pO₂) 환경이 나타나며, 염증성 사이토카인이 방출된다고 알려져 있다. 아토피 피부염은 복잡한 생리적 조건이 나타나며, 발병의 원인이 다양한 질병이다. 또한 환자별로 임상적인 표현형이 다양하여 정확한 예측이 어려운 상황이다. 현재까지 뚜렷한 치료 방법이 없어 환자와 가족들에게 상당한 부담을 주고 높은 의료 비용을 초래하는 질병으로 알려져 있다. 따라서, 아토피 피부염은 새로운 치료법 개발뿐만 아니라 기본적인 발병기전과 표현형 분석 및 환자 맞춤형 치료 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 아토피 피부염 질병을 연구하기 위해 다양한 in vivo, in vitro 피부 모델들이 개발되고 있으며, 이를 활용하여 화장품 및 재료의 독성평가나 약물 스크리닝 등에 활용되고 있다. 현재 많이 사용되는 모델들로는 동물 모델과 2차원 세포 배양 모델이 있으며, 동물 모델의 경우 종이 다르다는 본질적인 한계점을 가지고 있고, 2차원 세포 배양 모델은 실제 피부의 정교한 3차원 미세환경을 모사하기 어렵다는 제한점을 가진다. 이상적인 아토피 피부염 모델을 개발하기 위해서는 표피 장벽 결함, 표피 과증식, 관련 사이토카인/케모카인의 과발현 등의 복잡한 생리적 조건들을 모사해야 한다. 하지만 현재 상용화된 아토피 피부염 모델들은 인체 피부조직의 해부학적 단순 모사 수준으로, 피부 병변에서 일어나는 여러 생물학적 기전, 세포들간의 상호작용, 산소/활성산소와 같은 물

리화학적 특성과 같은 복잡한 요인들을 정교하게 모사하지 못하는 제한점이 있다.

[0006] 이에, in situ 가교 하이드로젤의 장점을 활용하여 3차원 피부 미세환경을 보다 정교하게 모사하고, 약물 스크리닝을 위한 하이드로젤 기반 인공 아토피 피부염 모델 개발의 필요성이 부각되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2022-0048917호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, in situ 가교 고분자 하이드로젤 기반의 산소 농도 제어 3차원 인공 아토피 피부염 모델을 개발하고자 한다. 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 in situ 가교 고분자 하이드로젤의 제조 방법 및 이를 사용하여 3차원 세포 배양 시스템과 산소 농도 조절을 통해 질병의 미세환경을 모사할 수 있는 플랫폼을 제공함을 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 티올(thiol, -SH) 반응기와 말레이미드(maleimide) 반응기를 갖는 천연/합성 고분자를 수용액 상태에서 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)을 유도하거나 이황화결합(disulfide bond; -S-S-)의 형성을 유도하여 in situ 가교 고분자 하이드로젤을 제공한다.

[0010] 1) 본 발명에서, 하이드로젤은 가교제 없이 티올(thiol)기가 도입된 젤라틴 유도체와 말레이미드(maleimide)기가 도입된 젤라틴 유도체 간의 가교 반응을 통해 제조한다.

[0011] 2) 고분자 합성 시 사용되는 초기 cystamine dihydrochloride/MHA/EDC/NHS의 양을 조절하여 고분자 주사슬에 도입되는 티올 반응기와 말레이미드 반응기의 함량을 조절할 수 있다.

[0012] 3) 젤라틴의 농도, 고분자의 농도 비율, 반응기의 당량비(thiol, maleimide)의 조절에 따라 하이드로젤의 상전이 시간, 기계적 강도 등과 같은 물리/화학적 특성을 쉽게 조절할 수 있는 in situ 하이드로젤 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 하이드로젤의 우수한 세포 적합성을 바탕으로 3차원 세포 배양 환경을 제공하고, 하이드로젤 내부의 산소 농도 조절을 통해 아토피 피부염과 유사한 환경을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 하이드로젤 기반의 3차원 인공 질병 모델과 약물 스크리닝을 위한 플랫폼을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 in situ 가교 하이드로젤은 가교제 없이 고분자 간 가교 반응을 통해 간단하고 신속하게 하이드로젤을 제조할 수 있고, 제조 조건에 따른 물리/화학적 특성 제어가 가능하다는 특징을 가지고 있다. 또한 하이드로젤 내부에 3차원으로 세포 배양이 가능하며, 우수한 세포 적합성 및 장기 배양이 가능하다는 특징을 가지고 있다. 하이드로젤 내부의 산소 농도 조절이 가능하며, 이를 통해 아토피 피부염 관련 인자의 발현이 유도된다는 특징을 가지고 있다.

[0016] 즉, 본 발명을 통해 기존 인공 피부 모델이 가지고 있는 제한점을 극복할 수 있으며, 3차원 배양과 산소 농도 조절을 통해 보다 정교하게 아토피 미세환경을 모사할 수 있다. 또한 물리/화학적 특성 제어와 우수한 생체적합성을 기반으로 다양한 질병 모델, 인공 조직체 제조, 약물 전달체, 새로운 치료제를 위한 약물 스크리닝 등으로 응용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 thiolated gelatin(GtnSH)의 합성 모식도이다.

도 2는 maleimide-conjugated gelatin(GtnMI)의 합성 모식도이다.

도 3은 GtnSH/GtnMI 하이드로젤 제조의 모식도이다.

도 4는 젤라틴의 농도, 고분자의 농도 비율, 반응기의 당량비(thiol, maleimide)에 따른 하이드로젤의 상전이 시간을 나타낸 그래프이다.

도 5는 젤라틴의 농도, 고분자의 농도 비율, 반응기의 당량비(thiol, maleimide)에 따른 하이드로젤의 기계적 강도를 나타낸 그래프이다.

도 6은 하이드로젤 기반 3차원 세포 배양 모식도이다.

도 7은 하이드로젤의 세포 적합성을 보여주는 도면 및 그래프이다.

도 8은 하이드로젤 in situ 산소 측정 시스템 모식도와 산소 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 산소 농도에 따른 HIF-1 α 유전자의 발현을 나타낸 그래프이다.

도 10은 산소 농도에 따른 아토피 피부염 관련 인자(Periostin) 발현 분석 도면과 그래프이다.

도 11는 추가적인 아토피 피부염 관련 인자(Tenascin-C, WNT5A, COL6A5)의 유전자 발현을 나타낸 그래프이다.

도 12는 약물 저항성 평가 모식도와 약물 농도에 따른 세포 적합성 및 아토피 피부염 관련 인자(Periostin) 발현 변화를 분석한 도면과 그래프이다.

도 13는 본 발명의 세포 배양용 하이드로젤 제조방법 및 용도 등을 나타내는 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 결과 in situ 형성 하이드로젤을 제조함과 동시에, 3차원 세포 배양과 산소 농도 조절을 통해 아토피 피부염 환경을 모사할 수 있음을 확인하였다. 또한 고분자 용액을 섞어주어 간단하게 고분자 하이드로젤을 제조함과 동시에, 제조 조건을 조절하여 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있음을 밝혀 내었다. 또한 하이드로젤 기반의 3차원 세포 배양 시스템에서 아토피 피부염 관련 인자의 발현 유도됨을 밝혀내었다.

본 발명은 티올 반응기를 갖는 천연 고분자에 말레이미드 반응기를 갖는 천연 고분자를 혼합하여 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)과 이황화결합(disulfide bond)을 유도하고, 이를 통해 in situ 세포 배양용 하이드로젤을 제조한다.

상기 세포 배양용 하이드로젤은 티올 작용기를 포함하는 고분자 및 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자를 혼합하여 가교시키는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 실시예에 따르면, 티올 작용기를 포함하는 고분자 및 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자를 혼합하여 가교시키는 단계를 포함하는 하이드로젤 제조방법을 제공한다.

상기 하이드로젤은 상기 제조방법에 의하여 제조될 수 있고, 상기 하이드로젤은 세포 배양용일 수 있다.

이하 설명되는 하이드로젤에 대한 특징은 제조방법에도 동일하게 적용될 것이다.

구체적으로 상기 단계는 각각의 고분자를 용매에 녹인 용액을 혼합하는 방법으로 수행되고, 상기 고분자를 용해하기 위한 용매는 PBS(Phosphate Buffered Saline), 헵크 버퍼(hanks buffer), HEPES 버퍼, DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline) 버퍼 및 MOPS 버퍼로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 고분자는 카르복실기 및 아민기를 포함하는 것을 특징으로 한다.

따라서 상기 티올 작용기를 포함하는 고분자는 시스타민 디하이드로클로라이드(cystamine dihydrochloride)를 상기 고분자의 카르복실기에 결합시키는 단계 및 이황화결합(disulfide bond; -S-S-)를 끊어주는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 상기 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자는 6-말레이미도헥사노익시드(6-maleimidohehexanoic acid; MHA)를 상기 고분자의 아민기에 결합시키는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조될

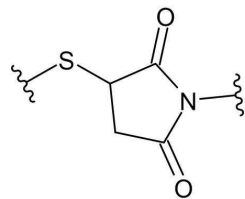
수 있다.

[0029] 도 1을 참조하면, 티올 반응기를 갖는 젤라틴 유도체는 젤라틴(gelatin)에 시스타민 디하이드로클로라이드(cystamine dihydrochloride)를 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC)/엔-히드록시숙시니미드(N-Hydroxysuccinimide; NHS) 반응을 통해 젤라틴의 카르복실기에 결합시키며, DL-디티오스레이톨(DL-dithiothreitol; DTT)를 첨가하여 이황화결합(disulfide bond; -S-S-)를 끊어주어 티올기를 갖는 고분자 주사슬을 제조한다. 상기 고분자 주사슬은 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 헤파린(heparin), 셀룰로스(cellulose), 덱스트란(dextran), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 케라틴(keratin), 케라탄 설페이트(keratan sulfate), 더마탄 설페이트(dermatan sulfate), 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 알부민(albumin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 비트로넥틴(vitronectin), 히알루론산(hyaluronic acid), 피브리노겐(fibrinogen) 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 도 2를 참조하면, 말레이미드 반응기를 갖는 젤라틴 유도체(GtnMI)는 젤라틴(gelatin)에 6-말레이미도헥사노익 엑시드(6-maleimidohehexanoic acid; MHA)를 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo diimide; EDC)/엔-히드록시숙시니미드(N-Hydroxysuccinimide; NHS) 반응을 통해 젤라틴의 아민기에 결합시켜 말레이미드기를 갖는 고분자 주사슬을 제조한다. 상기 고분자 주사슬은 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 헤파린(heparin), 셀룰로스(cellulose), 덱스트란(dextran), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 케라틴(keratin), 케라탄 설페이트(keratan sulfate), 더마탄 설페이트(dermatan sulfate), 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 알부민(albumin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 비트로넥틴(vitronectin), 히알루론산(hyaluronic acid), 피브리노겐(fibrinogen) 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 및 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG) 중에서 선택된 1종 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜; 및 테트로닉 시리즈(4arm-PP0-PEO);로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 도 3을 참조하면, 티올기를 갖는 고분자 주사슬과 말레이미드기를 갖는 고분자 주사슬을 혼합하여 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)과 이황화결합(disulfide bond)을 유도하여 in situ 가교 하이드로젤을 제조할 수 있다.



[0033] 상기 티올-엔 반응에 의하여 와 같은 결합이 유도될 수 있다.

[0034] 상기 in situ 하이드로젤은 젤라틴 농도, 고분자 농도 비율, 반응기의 당량비를 조절하여 상전이 시간, 기계적 강도와 같은 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있다는 장점을 가지며, 우수한 세포 적합성을 바탕으로 장기간 3차원 세포 배양이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한 하이드로젤 내부의 산소 농도 조절을 통해 아토피 피부염의 미세환경을 모사할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

[0035] 또한 티올 작용기를 포함하는 고분자 대비 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자의 비율이 증가할수록 상전이 시간이 감소하는 것을 특징으로 한다.

[0036] 또한 상기 티올 작용기의 당량비는 말레이미드 작용기의 당량비보다 작은 것을 특징으로 하며, 티올 작용기의 당량비가 작을수록 상전이 시간이 감소하는 것을 특징으로 한다.

[0037] 상기 하이드로젤은 내부의 산소 농도의 조절이 가능한 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 티올 작용기를 포함하는 고분자 용액 또는 말레이미드 작용기를 포함하는 고분자 용액 중 어느 하나의 용액과 세포를 혼합하는 단계 및 상기 고분자 용액 중 다른 하나의 용액을 첨가하여 고분자를 가교시키는 단계를 포함하는 질병 모델 제조방법을 제공한다. 상기 질병 모델은 인공 질병 모델일 수

있고, 상기 세포는 질병 특성을 갖는 세포일 수 있다.

[0039] 상기 질병 모델 제조방법은 상기 가교된 고분자를 성장배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0040] 또한 본 발명은 하이드로젤 기반의 3차원 인공 질병 모델과 약물 스크리닝을 위한 플랫폼을 제공한다.

[0041] 상기 인공 질병 모델은 면역 질환 모델(아토피 피부염, 알레르기, 천식, 비염), 피부 염증 모델, 심혈관계 질환 모델, 신경계 질환 모델, 근골격계 질환 모델, 종양 모델 및 감염 질환 모델로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 약물 스크리닝은 펩타이드 또는 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 상기 펩타이드 또는 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장 호르몬(human growth hormone; hGH), 돼지성장 호르몬(porcine growth hormone; pGH), 백혈구 성장인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF), 적혈구 성장인자(erythropoietin; EPO), 대식세포 성장인자(macrophage colony-stimulating factor; M-CSF), 종양 괴사인자(tumor necrosis factor; TNF), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF), 혈소판유도 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF), 인터페론- α , β , γ (interferon- α , β , γ), 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2), 칼시토닌, 신경 성장인자(nerve growth factor; NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(luteinizing hormone-releasing hormone; LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(thyrotropin-releasing hormone; TRH), 엔지오스타틴, 엔도스타틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스트인, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 상기 항균제는 미노사이클린, 테트라사이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시사이클린, 티에나마이신, 세팔로 스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 카나마이신, 파로모마이신, 미크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세포탁심, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소티어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오 스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노 루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 상기 항염증제는 아세트아미노펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메 타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0050] <실시예 1> 재료 준비

[0051] 젤라틴(type A from porcine skin, >300 bloom), 시스타민 디하이드로클로라이드(cystamine dihydrochloride), 6-말레이미도헥사노익엑시드(6-maleimidohexanoic acid; MHA), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC), 엔-히드록시숙시니미드 (N-Hydroxysuccinimide; NHS) 및 DL-디티오스레이톨(DL-dithiothreitol; DTT)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 염화수소 (1N hydrochloric acid) 용액은 Daejung(Siheung, Gyeonggi)으로부터 구입하였고, 투석막(dialysis membrane bag, molecular weight cutoff = 3500 Da)은 Spectrum Laboratories(Rancho Dominguez, CA, USA)로부터 구입하였다. 또한 인산염 완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS)는 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

- [0052] 중수소 산화물(deuterium oxide; D₂O)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 5,5' -티오-비스(2-니트로벤조산)(5,5' -Dithio-bis(2-ni-trobenzoic acid), Ellman's reagent)은 Thermo Scientific(Rockford, IL, USA)으로부터 구입하였다.
- [0053] 인간 진피 섬유아세포(human dermal fibroblasts; HDFs)는 Lonza(Walkersville, MD, USA)로부터 구입하였다. DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), 태아 소 혈청(fetal bovine serum; FBS), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S) 및 0.25% 트립신-EDTA(trypsin-EDTA)는 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.
- [0054] Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, 페리오스틴 다클론항체(Periostin Polyclonal Antibody) 및 인간 페리오스틴 ELISA 키트(Human Periostin ELISA kit)는 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 재조합 인간 IL-4(Recombinant Human IL-4)는 PeproTech(Cranbury, NJ)로부터 구입하였고, 프라이머(GAPDH, HIF-1α, Periostin, Tenascin-C, WNT5A, COL6A5)는 Cosmogenetech(Seongdong-gu, Seoul)으로부터 구입하였다. Donkey Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Flour 488은 Abcam(Cambridge, UK)으로부터 구입하였고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; DAPI) 용액은 Molecular Probes(Eugene, OR)로부터 구입하였다. 또한 덱사메타손(dexamethasone)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.
- [0055] 다른 화학 물질 및 용매들은 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0057] **<실시예 2> 티올(thiol)이 결합된 젤라틴 유도체 합성 및 구조 분석 (도 1)**

- [0058] 젤라틴 250mg을 3차 증류수(deionized water; DIW) 125mL에 용해시킨 후, 이 용액에 cystamine dihydrochloride를 DIW 2.5mL에 용해시킨 용액과 10분 동안 혼합하였다. 이후 EDC 및 NHS를 DIW 2.5mL에 용해시키고 혼합하였다. 2시간 동안 반응한 후, DTT를 DIW 5mL에 용해시킨 용액을 혼합물에 넣어 반응시킨다. 24시간 동안 반응한 후, 반응된 혼합물을 투석막에 넣고, 2.5일 동안 5mM HCl용액과 1mM HCl용액에 하루씩 교체하였다. 진공 여과를 통해 얻은 용액을 동결 건조하여 티올이 결합된 젤라틴 유도체(thiolated gelatin; GtnSH) 고분자를 수득하였다.
- [0059] GtnSH에 도입된 티올의 양을 엔엠알(¹H-NMR)과 엘만 분석(Ellman's assay)을 이용하여 정성, 정량적으로 측정하였다.
- [0060] 정성 분석을 위해 GtnSH 6mg을 D₂O 600 μL로 녹인 후 NMR tube에 넣어 측정하였다. 측정 결과, 2.8 ppm과 3.5 ppm에서 cystamine peak의 형성을 통해 젤라틴에 티올기가 도입되었음을 확인하였다.
- [0061] 정량 분석을 위해 시스테인(L-cystein)을 표준 곡선으로 사용하였다. 농도별 시스테인(L-cystein) 용액과 1mg/mL GtnSH 용액 100 μL를 엘만 시약 용액(Ellman's reagent solution) 100 μL와 혼합한 후 빛을 차단하여 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 흡광 검출기를 이용해 405nm에서 흡광도를 측정하고 시스테인 표준곡선을 통해 GtnSH 내의 티올 함유량을 계산하였다. cystamine dihydrochloride/EDC/NHS/DTT의 도입량을 조절하여 티올 함유량을 평균 86.89~165.83 μmol/g(폴리머)까지 조절이 가능하였다.

[0063] **<실시예 3> 말레이미드(maleimide)가 결합된 젤라틴 유도체 합성 및 구조 분석 (도 2)**

- [0064] 말레이미드가 결합된 젤라틴 유도체는 젤라틴 250mg을 DPBS 50mL에 용해시킨 후, 이 용액에 MHA를 DPBS 120mL에 용해시킨 용액과 빛을 차단하여 10분 동안 혼합하였다. 이후 EDC 및 NHS를 DPBS 5mL에 용해시키고 혼합하고, 24시간 동안 빛을 차단하여 반응을 진행하였다. 반응된 혼합물을 투석막에 넣고, 3일 동안 DIW를 3번씩 교체하였다. 진공 여과를 통해 얻은 용액을 동결 건조하여 말레이미드가 결합된 젤라틴 유도체(maleimide-conjugated gelatin; GtnMI) 고분자를 수득하였다.
- [0065] GtnMI에 도입된 말레이미드의 양을 엔엠알(¹H-NMR)과 엘만 분석(Ellman's assay)을 이용하여 정성, 정량적으로 측정하였다.
- [0066] 정성 분석을 위해 GtnMI 6mg을 D₂O 600 μL로 녹인 후 NMR tube에 넣어 측정하였다. 측정 결과, 3.0 ppm에서 젤라틴의 primary amine peak가 감소하고, 6.8 ppm에서 maleimide peak의 형성을 통해 젤라틴에 말레이미드기가

도입되었음을 확인하였다.

[0067] 정량 분석을 위해 6-말레이미도헥사노익엑시드(6-maleimidohehexanoic acid; MHA)을 표준 물질로 시스테인(L-cystein)을 티올-엔 반응 기질 물질로 사용하였다. 50 μ L의 농도별 MHA용액과 1mg/mL GtnMI 용액에 각 50 μ L의 0.04 mg/mL 시스테인(L-cystein) 용액을 혼합한 후 10분 동안 빛을 차단하여 상온에서 티올-엔 반응을 유도한다. 반응 후 엘만 시약 용액(Ellman's reagent solution) 50 μ L와 혼합한 후 20분 동안 빛을 차단하여 상온에서 반응시켰다. 흡광 검출기를 이용해 405nm에서 흡광도를 측정하고 말레이미드 표준곡선을 통해 GtnMI 내의 말레이미드 함유량을 계산하였다. MHA/EDC/NHS의 도입량을 조절하여 말레이미드 함유량을 평균 47.54~102.57 μ mol/g(폴리머)까지 조절이 가능하였다.

[0069] <실시예 4> GtnSH/GtnMI 하이드로젤 형성 (도 3)

[0070] GtnSH 및 GtnMI 고분자를 DPBS에 각각 녹인 용액을 추가적인 가교제 없이 단순 혼합하여 하이드로젤을 제조하였다.

[0072] <실험예 1> 하이드로젤의 상전이 시간 측정 (도 4)

[0073] 하이드로젤의 상전이 시간을 분석하기 위해 바이알 틸팅 방법(vial tilting method)을 이용하여 평가하였다. 1) GtnSH와 GtnMI 비율을 1:1로 고정하고 젤라틴의 최종 농도를 6, 10, 14 중량%로 변화시켜 측정하였다. 2) 젤라틴의 최종 농도를 10 중량%로 고정하여 고분자의 농도 비율을 GtnSH:GtnMI를 3:7, 5:5, 7:3으로 변화시켜 측정하였다. 3) 젤라틴의 최종 농도를 10 중량%로, GtnSH:GtnMI 비율을 5:5로 고정하였으며, 반응기(티올기, 말레이미드기)의 당량비를 1/2, 1로 조절하여 측정하였다. 보다 상세한 하이드로젤의 제조 조건은 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

표 1

하이드로젤	GtnSH 농도 (wt%)	GtnMI 농도 (wt%)	최종 농도 (wt%)
G3MI3	3	3	6
G5MI5	5	5	10
G7MI7	7	7	14
G3MI7	3	7	10
G7MI3	7	3	10

[0074]

표 2

GtnSH 당량비	Cytamine dihydrochloride (mg)	EDC (mg)	NHS (mg)	DTT (mg)
GtnSH 1/2	225.3	96	58	308.5
GtnSH 1	450.5	192	116	617

[0075]

표 3

GtnMI 당량비	MHA (mg)	EDC (mg)	NHS (mg)
GtnMI 1/2	105.6	115.1	80.6
GtnMI 1	211.2	230.1	161.1

[0076]

[0077]

실험결과, 고분자의 다양한 조건들을 조절하여 상전이 시간을 10~130초까지 조절이 가능하였다. 1) 젤라틴의 최종 농도가 증가할수록 상전이 시간이 감소하였다. 이는 고분자의 양이 증가함에 따라 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)과 이황화결합(disulfide bond)의 형성이 촉진되기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것이다.

[0078]

2) GtnMI의 비율이 증가할수록 상전이 시간이 감소하였다. 이는 말레이미드기의 비율이 증가할수록 티올-엔 반응 속도가 빨라지기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0079]

3) 반응기의 당량비가 증가할수록 상전이 시간이 감소하였다. 이는 고분자 반응기의 양이 증가함에 따라 티올-엔 반응과 이황화결합의 형성이 촉진되기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것이다. 또한 말레이미드 반응기의 양이 증가할수록 티올-엔 반응 속도가 빨라지기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0081]

<실험예 2> 하이드로젤의 기계적 강도 분석 (도 5)

[0082]

하이드로젤의 기계적 강도를 평가하기 위해 레오미터(rheometer)를 이용하여 분석하였다. 1) GtnSH와 GtnMI 비율을 1:1로 고정하고 젤라틴의 최종 농도를 6, 10, 14 중량%로 변화시켜 측정하였다. 2) 젤라틴의 최종 농도를 10 중량%로 고정하여 고분자의 농도 비율을 GtnSH:GtnMI를 3:7, 5:5, 7:3으로 변화시켜 측정하였다. 3) 젤라틴의 최종 농도를 10 중량%로, GtnSH:GtnMI 비율을 5:5로 고정하였으며 반응기(티올기, 말레이미드기)의 당량비를 1/2, 1로 조절하여 측정하였다. 보다 상세한 하이드로젤의 제조 조건은 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

[0083]

실험결과, 고분자의 다양한 조건들을 조절하여 기계적 강도를 90~1500 Pa까지 조절이 가능하였다. 1) 젤라틴의 최종 농도가 증가함에 따라 기계적 강도가 증가하였다. 이는 고분자의 양이 증가할수록 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)과 이황화결합(disulfide bond)의 형성이 촉진되어 가교도가 증가하였기 때문이다.

[0084]

2) GtnSH와 GtnMI의 비율이 5:5일 때, 기계적 강도가 증가하였다. 이는 GtnSH와 GtnMI의 비율을 1:1로 반응시켰을 때, 기를 가진 고분자 사슬(GtnSH)과 말레이미드기를 가진 고분자 사슬(GtnMI) 간의 티올-엔 반응(thiol-ene reaction) 반응이 촉진되어 가교도가 증가하게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0085]

3) 앞서 진행한 엘만 분석을 통해 티올기와 말레이미드기의 함유량을 각각 정량 분석하였을 때, GtnSH(1/2)와 GtnMI(1)에서 각각 평균 86.89 $\mu\text{mol/g}$ (폴리머)와 102.57 $\mu\text{mol/g}$ (폴리머)의 반응기 함유량 측정되었다. 이를 통해 thiol기의 양과 maleimide기의 양이 1:1로 반응한다는 것을 확인하였다. 실험결과, 고분자에 함유된 반응기(thiol:maleimide)의 양을 1:1로 반응시켰을 때, 가장 높은 기계적 강도가 측정되었다. 이는 thiol기와 maleimide기의 비율이 1:1일 때, 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)이 촉진되어 가교도가 증가하게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0087]

하이드로젤 상전이 시간 분석과 기계적 강도 측정을 통해 3차원 세포 배양에 적합한 하이드로젤 조건을 선정하였다. 하이드로젤 조건은 GtnSH(1/2) (5 중량%), GtnMI(1) (5 중량%)로 고정하고 실험 진행하였다.

[0089]

<실험예 3> 하이드로젤을 이용한 3차원 세포 배양(3D encapsulation)(도 6)

[0090]

하이드로젤의 3차원 세포 담지 능력을 평가하고, 배양 조건을 최적화하기 위해 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast; HDFs)를 3차원 세포 배양(3D encapsulation)을 진행하였다.

[0091] 3차원 세포 배양은 HDFs 세포 현탁액을 GtnMI 용액(5 중량%)과 먼저 섞어준 후에, GtnSH 용액(5 중량%)과 섞어서 젤이 되기 전에 세포가 담지된 하이드로젤을 제조하였다. 20분의 하이드로젤 안정화 시간 후에 DMEM 성장 배지를 추가하여 세포를 배양하였다. 실험에 사용된 세포의 농도는 2.0×10^6 cells/mL이며, 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포가 담지된 하이드로젤은 직접 로딩(direct loading) 방법과 디스크 유형(disk type) 방법으로 제작하였다.

[0092] 직접 로딩 방법은 HDFs/GtnSH/GtnMI 혼합물 120 µL를 48웰-플레이트에 주입하여 제작하였다. 디스크 유형 방법은 HDFs/GtnSH/GtnMI 혼합물 60 µL를 1mL 주사기에 주입하여 디스크 모양의 하이드로젤을 제작하고, 20분의 안정화 시간 후에 48웰-플레이트에 띄워 배양하였다. 보다 상세한 3차원 세포 배양 조건은 표 4에 나타내었다.

표 4

3차원 배양 조건						
하이드로젤 제조 방법	DMEM 배지용량 (µL)	GtnSH 농도 (wt%)	GtnMI 농도 (wt%)	용매	하이드로젤 용량 (µL)	세포 밀도 (cells/mL)
Direct loading	500	5	5	DPBS	120	2.0×10^6
Disk type					60	

[0093]

[0094] 실험 결과, 세포가 담지된 하이드로젤은 최대 14일동안 분해없이 세포의 형태를 유지하였다. 이는 하이드로젤이 3차원 세포 배양에 적합한 환경을 제공할 수 있으며, 장기간 배양할 수 있음을 확인하였다.

[0096] <실험예 4> 하이드로젤의 세포 적합성 평가 (도 7)

[0097] 하이드로젤의 세포 적합성 평가를 위해, 디스크 유형(disk type) 방법으로 3차원 세포 담지 하이드로젤을 제작한 후에, 세포 독성 평가를 수행하였다. 3차원 세포 배양은 37°C, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 각각 1일과 3일 동안 배양 후 Live/dead 분석을 통해 하이드로젤의 세포 독성을 평가하였다. Live/dead 분석은 사멸된 세포는 붉은색으로, 살아있는 세포는 초록색으로 염색되어 세포 독성 유무를 평가하는 방법이다.

[0098] 실험 결과, 광학 현미경 사진과 Live/dead 사진을 통해 대부분의 세포가 살아있는 것이 관찰되었고, 정량 결과를 통해 모든 산소 그룹에서 80% 이상의 세포 생존율을 보임을 확인하였다. 상기 하이드로젤의 세포적합성이 우수함을 확인하였다.

[0100] <실험예 5> 하이드로젤의 in situ 산소 측정 시스템과 산소 농도에 따른 실시간 산소 측정 결과 (도 8)

[0101] 하이드로젤 내부의 산소 농도를 조절할 수 있는지 확인하기 위해 in situ 산소 측정 시스템을 통해 실시간으로 산소 농도를 측정하였다.

[0102] 실시간 산소 측정은 산소센서 패치를 진공 그리스를 사용하여 48웰-플레이트 중앙 바닥에 부착하고, 직접 로딩(direct loading) 방법으로 3차원 세포 담지 하이드로젤을 제작하였다. 비침습적 산소 센서와 산소 제어 배양기(0%~21% pO₂)를 사용하여 3일 동안 실시간으로 산소 농도를 측정하였다.

[0103] 실험 결과, 21% 조건에서 하이드로젤 내부의 산소 농도는 11%~13% pO₂로 유지되었다. 반면 5% 조건에서는 배양 8시간 후부터 산소 농도가 5% pO₂ 이하로 유지됨을 확인하였다. 이를 통해 산소 제어 배양기로 하이드로젤 내부의 산소 농도를 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0105] <실험예 6> 산소 농도에 따른 HIF-1α 유전자 발현 분석(도 9)

[0106] 하이드로젤 내부의 저산소(<5% pO₂) 환경이 유도되는지 확인하기 위해 산소 농도에 따른 저산소증 유도 인자 1 알파(hypoxia-inducible factor 1 alpha; HIF-1a) 발현 분석을 수행하였다.

[0107] HIF-1a 발현 분석은 직접 로딩(direct loading) 방법으로 하이드로젤을 제작하고, 48웰-플레이트에서 배양하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 각각 6시간과 24시간 동안 배양 후 RNA 추출을 진행하였다. RNA 추출은 배양한 하이드로젤을 균질화기(homogenizer)로 파쇄하고 Tri-RNA 시약을 사용하여 RNA를 분리하였다. 이후에 역전사를 통해 cDNA를 합성하고, qRT-PCR 분석을 통해 HIF-1a를 정량 분석하였다. cDNA의 양을 정규화하기 위해 GAPDH를 대조군으로 사용하였고, 유전자 발현의 상대적 배수 변화는 비교 Ct 방법을 사용하여 계산되었다. 사용된 프라이머의 서열은 표 5에 나타내었다.

표 5

유전자	프라이머 서열(5' → 3')	
	인간	
GAPDH	Fw	GGG AGC CAA AAG GGT CAT CAT CTC
	Rv	GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC
HIF-1a	Fw	GTT TAC TAA AGG ACA AGT CAC C
	Rv	TTC TGT TTG AAG GGA G
Periostin	Fw	CAG AGA AAT CCC TCC ATG AAA
	Rv	CAG GAG CTC TTT CAA GTC TGC
Tenascin-C	Fw	TCC CAG TGT TCG GTG GAT CT
	Rv	TTG ATG CGA TGT GTG AAG ACA
WNT5A	Fw	TAC GAG AGT GCT CGC ATC CTC A
	Rv	TGT CTT CAG GCT ACA TGA GCC G
COL6A5	Fw	CAG TAC AGC GAC GAG TTT CAC
	Rv	AGT AGG TCC TAT GAG CCT CCT

[0108]

[0109] 실험 결과, HIF-1a의 발현은 5%에서 6시간 동안 배양한 조건에서 증가하였다. 반면 5%에서 24시간 동안 배양한 조건에서는 HIF-1a의 발현이 감소함을 확인하였다. 그 이유는 HIF-1a가 초기 저산소 환경에서 과발현되는 유전자로 6시간에는 초기 발현이 증가하고 저산소 환경에 적응한 후에는 발현이 감소하기 때문이다. 이를 통해 3차원 세포 배양된 하이드로젤이 아토피 피부 조직의 저산소 환경을 모사할 수 있으며, HIF-1a의 초기 발현을 통해 하이드로젤 내부에 저산소 환경이 유도되었음을 확인하였다.

[0111] <실험예 7> 산소 농도에 따른 아토피 피부염 관련 인자(Periostin) 발현 분석(도 10)

[0112] 3차원 세포 배양 하이드로젤이 아토피 피부염의 미세환경을 모사할 수 있는지 평가하기 위해 아토피 피부염 관련 인자인 페리오스틴(Periostin) 발현 분석을 진행하였다. 아토피성 피부염에서는 T세포가 외부 알레르겐에 의해 자극을 받으면 IL-4/IL-13과 같은 사이토카인이 발현되고 피부 섬유아세포에서 페리오스틴의 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3차원 세포 배양 후 5% 및 21% 산소 조건에서 IL-4를 농도별(0, 25, 50ng/mL)로 처리하여 페리오스틴의 발현을 분석하였다. 페리오스틴의 발현은 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR), 면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining), 효소 면역 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 통해 정성, 정량적으로 분석하였다. 보다 상세한 실험 조건은 표 6에 나타내었다.

표 6

그룹	산소 농도 (%)	IL-4 농도 (ng/mL)
21 %_0	21	0
21 %_25		25
21 %_50		50
5 %_0	5	0
5 %_25		25
5 %_50		50

[0113]

[0114]

(1) qRT-PCR에 의한 페리오스틴 유전자 발현 분석

[0115]

페리오스틴 유전자 발현 분석은 직접 로딩(direct loading) 방법으로 하이드로젤을 제작하고, 48웰-플레이트에서 24시간 배양하였다. 이후 IL-4를 농도별(0, 25, 50ng/mL)로 처리하고 24시간 동안 배양 후 RNA 추출을 진행하였다. 위와 동일한 방법으로 RNA 추출 후 qRT-PCR을 통해 페리오스틴 발현 정량 분석하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 배양하였다. 사용된 프라이머의 서열은 표 5에 나타내었다.

[0116]

실험결과, 5% 및 21% 산소 농도 모두, 0ng/mL 그룹에 비해 IL-4 처리 그룹(25, 50ng/mL)에서 페리오스틴의 발현이 증가하였다. 그러나 처리된 IL-4의 농도에 따라서는 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 이후의 페리오스틴 발현 분석 실험에서는 IL-4 처리 농도를 25ng/mL로 고정하여 실험을 진행하였다. IL-4가 처리된 그룹에서만 페리오스틴의 발현이 증가한 것을 통해 IL-4가 섬유아세포를 자극하여 페리오스틴의 발현을 유도하였다는 것을 확인하였다.

[0118]

(2) 면역 형광 염색에 의한 페리오스틴 유전자 발현 분석

[0119]

페리오스틴 면역 염색은 디스크 유형(disk type) 방법으로 하이드로젤을 제작하고, 48웰-플레이트에서 24시간 배양하였다. 이후 IL-4를 농도별(0, 25ng/mL)로 처리하고 24시간 동안 배양 후 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액으로 고정하였다. 이후 0.1% Triton X-100 용액 200 μL로 20분 동안 투과시키고, 단백질을 차단하기 위해 1% BSA 용액 200 μL를 처리하고 1시간 동안 4℃에서 배양하였다. 페리오스틴 다클론 항체(perioestin polyclonal antibody) (1:100 희석)를 1차항체로 처리하여 4℃에서 밤새 배양하였고, 세척 후에, Alexa Fluor 488-접합 당나귀 항-토끼 2차 항체 (1:500 희석)를 처리하여 25℃에서 4시간 동안 배양하였다. 세포 핵은 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)용액을 15분 동안 처리하여 면역 형광 염색을 진행하였다. 페리오스틴은 초록색으로, 핵은 파란색으로 염색되어 페리오스틴의 발현을 확인하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser scanning microscope)을 사용해 페리오스틴의 발현을 3차원으로 정성 분석하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0120]

실험결과, IL-4가 처리된 그룹(25ng/mL)에서 핵 주변에 페리오스틴이 염색된 것이 관찰되었다. 이를 통해 페리오스틴이 발현된 것을 정성적으로 확인하였다.

[0122]

(3) ELISA에 의한 페리오스틴 유전자 발현 분석

[0123]

페리오스틴 단백질 발현 분석은 직접 로딩(direct loading) 방법으로 하이드로젤을 제작하고, 48웰-플레이트에서 24시간 배양하였다. 이후 IL-4를 농도별(0, 25ng/mL)로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에 콜라게나아제(collagenase)를 2시간 처리하여 하이드로젤을 분해하고, 단백질을 추출 완충용액을 사용하여 세포 용해물을 추출하였다. 인간 페리오스틴 ELISA 키트를 사용하여 페리오스틴 단백질 발현량을 정량 분석하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0124]

실험결과, 페리오스틴 단백질 발현은 IL-4가 처리된 그룹(25ng/mL)에서만 증가하였다. 0ng/mL 그룹은 최소 검출

한계 이하로 측정되어 단백질이 검출되지 않는 것을 확인하였다. 또한 저산소(<5% pO₂) 환경에서 페리오스틴 단백질의 발현이 유의미하게 증가함을 확인하였다.

[0126] 요약하면, 저산소(<5% pO₂) 환경과 IL-4를 처리한 그룹(25ng/mL)에서 페리오스틴의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 3차원 세포 배양 하이드로젤 조건이 IL-4 처리와 산소 농도 조절을 통해 아토피 피부염의 미세환경을 모사할 수 있음을 확인하였다. 이는 하이드로젤 기반의 3차원 세포 배양 시스템이 인공 아토피 피부염 모델로써 가능성을 가지고 있음을 의미한다.

[0128] **<실험예 8> 추가적인 아토피 피부염 관련 인자(Tenascin-C, WNT5A, COL6A5) 분석(도 11)**

[0129] 추가적인 아토피 피부염 관련 인자를 분석하기 위해 Tenascin-C, WNT5A, COL6A5 발현 분석을 수행하였다. 3차원 세포 배양 후 5% 및 21% 산소 조건에서 IL-4를 농도별(0, 25, 50ng/mL)로 처리하여 Tenascin-C, WNT5A, COL6A5의 발현을 분석하였다.

[0130] 유전자 발현 분석은 위와 동일한 방법으로 세포 배양 진행하였고, RNA 추출 후에 qRT-PCR을 통해 정량 분석하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5%/21% O₂ 조건 하에서 배양하였다. 사용된 프라이머의 서열은 표 5에 나타내었다.

[0131] 실험결과, Tenascin-C의 발현은 5% 및 21% 산소 농도 모두, 0ng/mL 그룹에 비해 IL-4 처리 그룹(25, 50ng/mL)에서 증가하였다. 그러나 처리된 IL-4의 농도에 따라서는 유의미한 차이가 나타나지 않았다. WNT5A와 COL6A5는 IL-4처리 농도에 따라 유전자 발현에 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 아토피 피부염과 관련된 인자들을 추가 분석 진행하였고, 하이드로젤 기반의 3차원 세포 배양 시스템이 아토피 피부염 환경을 모사할 수 있음을 확인하였다.

[0133] **<실험예 9> 약물 저항성 평가(도 12)**

[0134] 하이드로젤 기반의 아토피 피부염 모델이 약물 스크리닝 모델로써 활용할 수 있는지 평가하기 위해 약물 저항성 평가를 수행하였다. 실험에 사용한 약물은 스테로이드계 약물인 텍사메타손으로 보습제와 함께 현재 아토피 피부염 치료제로 가장 많이 사용되는 약물이다. 따라서 3차원 세포 배양 후에 IL-4와 텍사메타손 약물을 처리하여 페리오스틴의 발현 변화를 분석하였다.

[0136] 먼저 처리한 약물 농도에 따른 세포 적합성을 평가하기 위해 Live/dead 분석을 통해 약물의 세포 독성을 평가하였다. Live/dead 분석은 앞서 진행한 세포 적합성 평가와 동일한 디스크 유형(disk type) 방법으로 세포 배양 진행하였고, 텍사메타손을 농도별(0, 100 μM)로 처리하여 3일 배양 후에 세포 생존율을 분석하였다.

[0137] 실험 결과, Live/dead 사진과 정량 결과를 통해 모든 그룹에서 80% 이상의 세포 생존율이 나타났고, 약물 농도에 따른 세포 독성이 없음을 확인하였다.

[0139] 약물 저항성 평가는 직접 로딩(direct loading) 방법으로 3차원 세포 배양 후 5% 산소 조건에서 IL-4를 25ng/mL 처리하여 페리오스틴의 발현을 유도하였다. 그리고 텍사메타손을 농도별(0, 100 μM)로 처리하여 3일 배양 후에 페리오스틴의 발현 변화를 분석하였다.

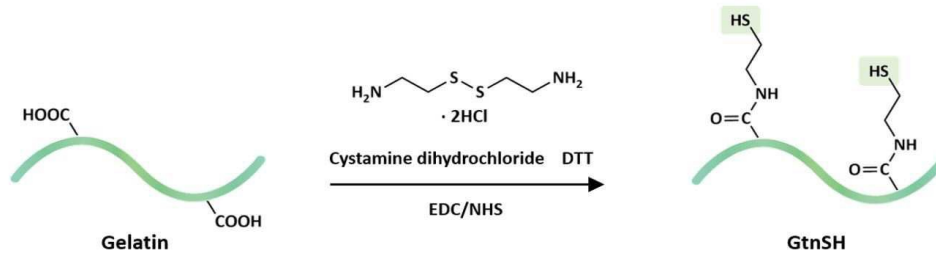
[0140] 유전자 발현 분석은 위와 동일한 방법으로 세포 배양 진행하였고, RNA 추출후에 qRT-PCR을 통해 정량 분석하였다. 3차원 세포 배양은 37℃, 5% CO₂, 5% O₂ 조건 하에서 배양하였다. 사용된 프라이머의 서열은 표 5에 나타내었다.

[0141] 실험 결과, 텍사메타손이 처리된 그룹(100 μM)에서만 페리오스틴의 발현이 유의미하게 감소하였다. 이는 약물을 처리함으로써 페리오스틴의 발현이 억제되었음을 의미하며, 하이드로젤 기반의 3차원 세포 배양 시스템이 약물 스크리닝 모델로써 활용 가능성이 있음을 확인하였다.

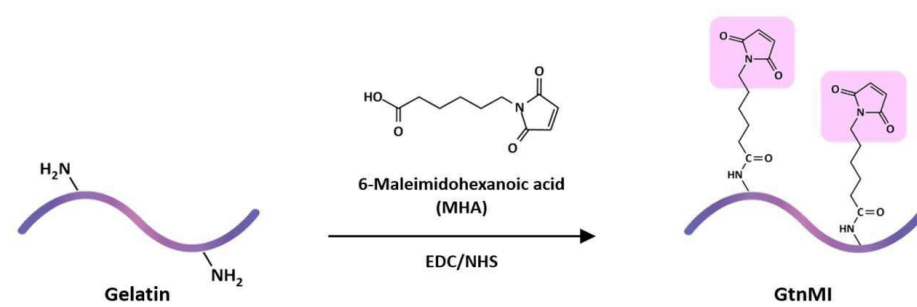
[0143] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

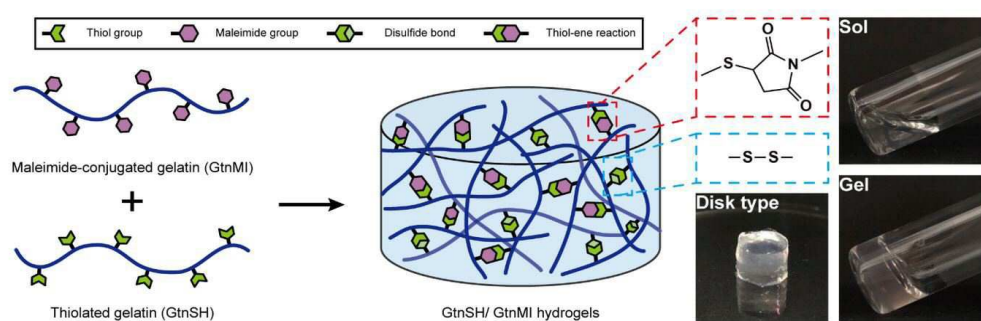
도면1



도면2

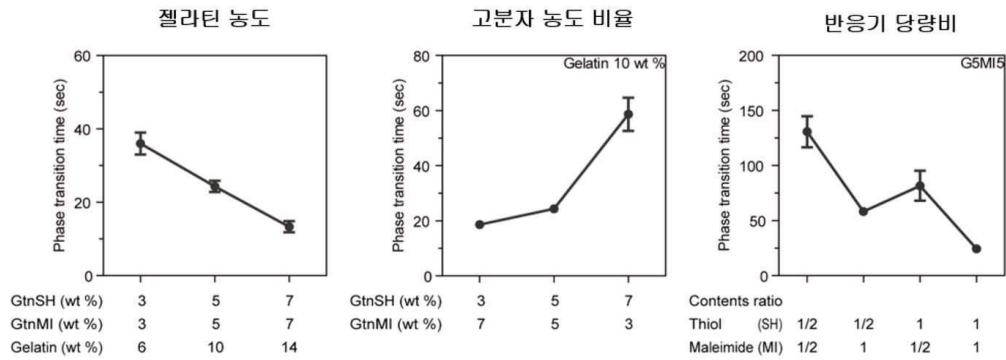


도면3



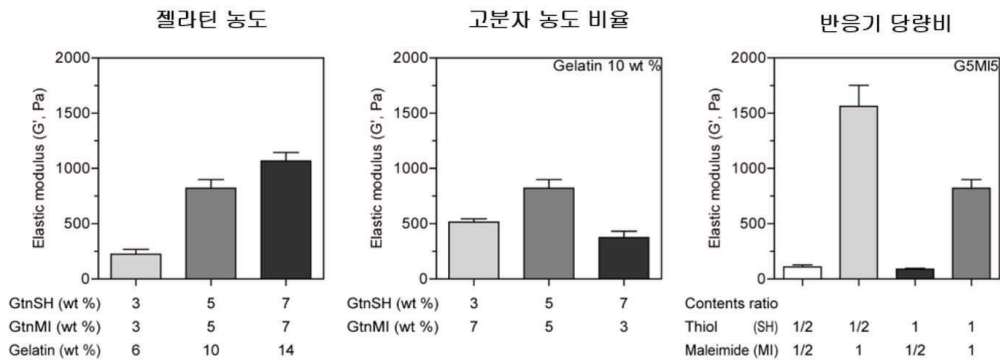
도면4

하이드로젤의 상전이 시간 측정

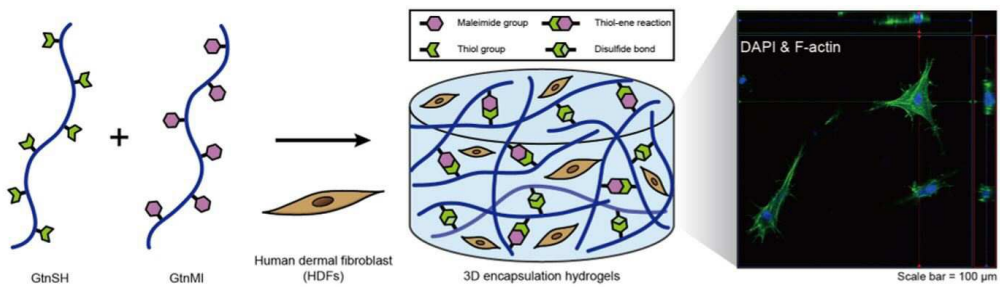


도면5

하이드로젤의 기계적 강도 측정

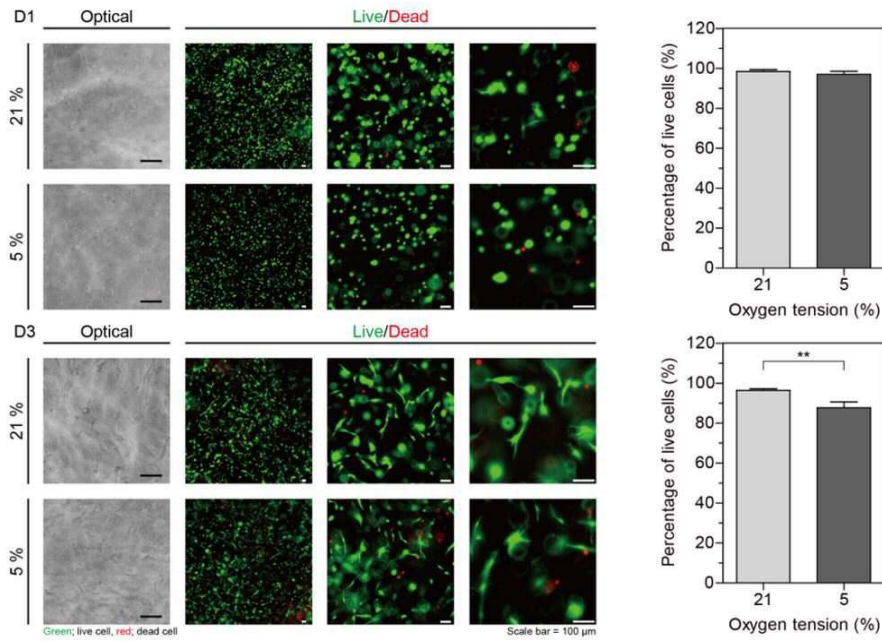


도면6



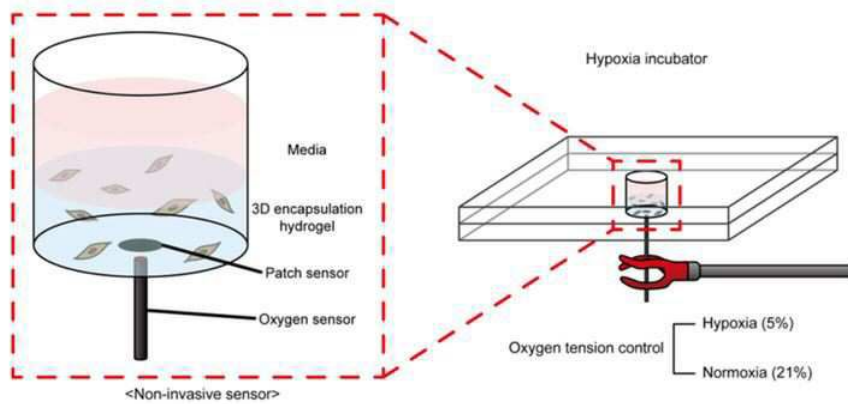
도면7

하이드로젤의 세포 적합성 평가

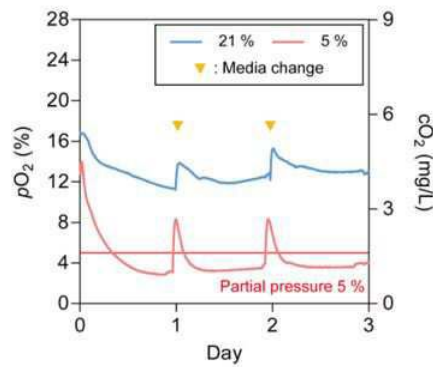


도면8

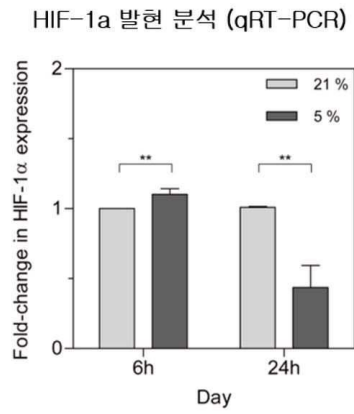
하이드로젤 in situ 산소 측정 시스템



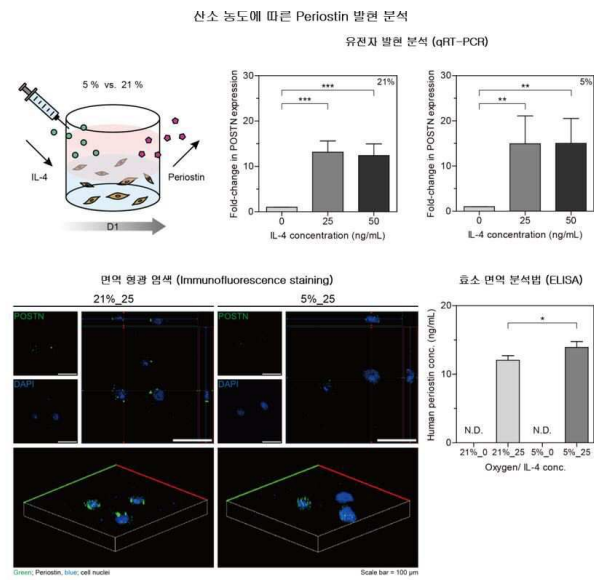
산소 측정 결과



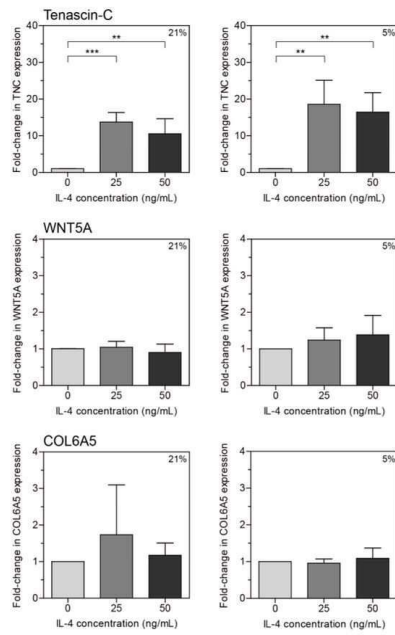
도면9



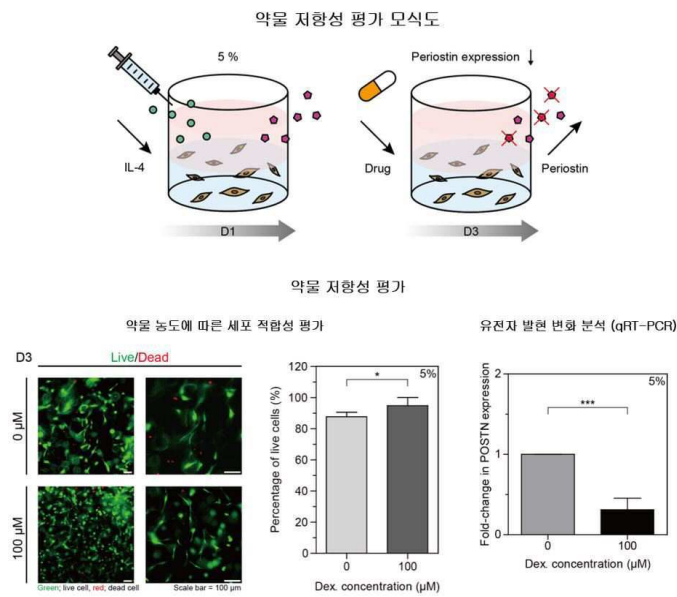
도면10



도면11



도면12



도면13

