



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월17일

(11) 등록번호 10-2228619

(24) 등록일자 2021년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0152197

(22) 출원일자 2019년11월25일

심사청구일자 2019년11월25일

(56) 선행기술조사문헌

Yu, F. et al., Polymer Chemistry (2014)
 5:1082-1090

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은아

서울특별시 강동구 올림픽로98가길 47, 1110호(암사동, 중앙하이츠아파트)

오동인

서울특별시 노원구 중계로8길 103, 115동 808호(중계동, 현대그림중계동주택조합2차(아))

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항

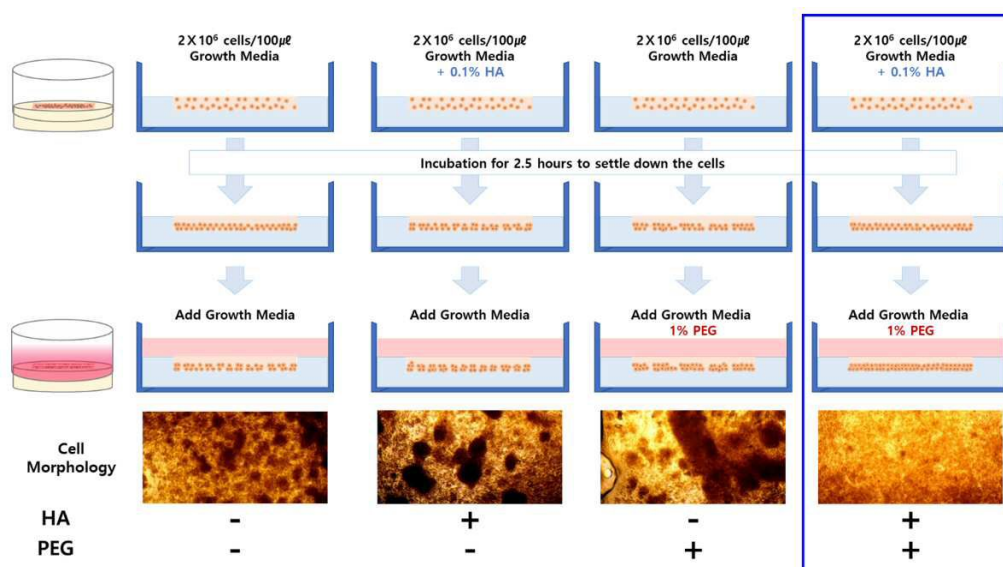
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **히알루론산 및 폴리에틸렌글리콜을 포함하여 제조된 세포 시트 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 지지체 없이 세포만으로 세포 시트를 구성하며, 별도의 적층 단계 없이도 다층으로 구성된 세포 시트를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 세포 시트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/3804 (2013.01)

A61L 27/3895 (2013.01)

C12M 25/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465026796

부처명 보건산업진흥원

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발(R&D)

연구과제명 다중물성 조직공학제제 체외배양기술과 자기공명 전자기물성영상에 의한 비파괴적

기능성 평가도구 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2018.10.01 ~ 2022.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345300432

부처명 한국연구재단(통합)

과제관리(전문)기관명 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 세포 표면개질이 줄기세포의 특성변화 및 세포 내 신호전달과정에 미치는 영향 확인

을 통한 세포치료제의 기능향상 기술개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 히알루론산이 포함된 성장배지에서 세포를 침강시켜 배양하는 단계; 및
- b) 폴리에틸렌글리콜이 포함된 성장배지를 추가하는 단계;를 포함하는, 세포 시트 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포는 표피세포, 섬유아세포, 간세포, 중배엽성 줄기세포 및 연골세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 세포 시트 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포시트는 판(plate)형인 것인, 세포 시트 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포시트는 세포의 응집이 억제된 것인, 세포 시트 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된, 세포 시트.

청구항 6

제5항의 세포시트를 포함하는, 조직 수복용 이식재.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조직은 연골, 골, 각막, 결막, 지방조직, 피부, 근육, 근막, 건, 건막, 인대, 관절낭, 점액낭 및 상피조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조직 수복용 이식재.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 지지체 없이 비부착 상태에서 세포 시트를 구성하며, 별도의 적층 단계 없이도 다층으로 구성된 세포 시트를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 세포 시트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 세포는 부착 상태를 유지하는 경우에 더 높은 활성을 나타내므로, 이식되는 세포의 활성을 극대화하기 위해서는 단일세포 형태로 수집된 현탁액 보다 세포-세포 또는 세포-기질간 결합이 유지가 되는 세포 시트 또는 스캐폴드 기반의 세포 복합체가 유리하다.
- [0003] 상기와 같은 이유로 이식 가능한 세포 시트를 형성하기 위한 다양한 기술이 개발되어 있고, 이렇게 시트 상태로 배양된 세포는 세포-세포 접촉(cell-cell contact)과 세포주위 기질 분자(pericellular matrix molecules)가 유지됨으로써 세포 활성이 높게 유지될 수 있다는 장점이 존재한다.

[0004] 그러나, 단층 시트 상태로 배양된 세포 구조물은 세포 이식 등을 위하여 다루는 과정에서 구조적 손상이 쉽게 일어날 수 있다는 단점이 존재하며, 재생될 조직의 두께를 확보하기 위해서 일체성 높게 세포 시트를 다층화 하는 경우, 이를 위한 추가적인 기술이 요구되는 등의 문제점이 존재하였다.

[0005] 현재까지는 세포 자체를 주입하거나 이식하는 형태의 세포 치료제가 주를 이루고 있으나, 향후 이식가능한 조직을 체외에서 배양하여 제조하는 조직공학제제에 대한 수요의 증가로 이와 관련된 분야의 지속적인 개발이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10- 2017-0099033호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 히알루론산(hyaluronic acid, HA) 및 폴리에틸렌글리콜(Poly ethylene glycol, PEG) 처리단계를 포함하는 판형 세포 시트(cell slap)의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 판형 세포 시트(cell slap)를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 판형 세포 시트(cell slap) 및 생분해성 고분자 물질을 포함하는, 연골 수복용 이식재를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 a) 히알루론산이 포함된 성장배지에서 세포를 침강시켜 배양하는 단계; 및 b) 폴리에틸렌글리콜이 포함된 성장배지를 추가하는 단계;를 포함하는, 세포 시트 제조방법을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 상기 제조방법으로 제조되는 세포시트는 판(plate)형일 수 있다.

[0012] 본 발명에서 상기 "세포 시트(cell slap)"는 하나 이상의 세포가 층을 이루어 배열되어 있는 것을 지칭하고 그 형태는 판(plate)형 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 용어 "다층 세포 시트"는 상기 세포시트가 수직 방향으로 하나 이상 적층됨으로써 형성되는 세포시트의 집합을 지칭한다. 이하, 본 명세서에 기재되는 "세포 시트"는 단일의 층을 갖는 세포 시트 및 다층 세포 시트 모두를 지칭하는 것으로 사용되었다.

[0013] 본 발명에서 상기 "적층" 또는 "형성"은 박막층이 생성 순서대로 층층이 쌓인 것을 의미한다. 이러한 적층된 구조는 당업계에 공지된 방법에 의하여 제조된 것이면 특별히 제한하지 않는다.

[0014] 본 발명에서 상기 "히알루론산(hyaluronic acid, HA)"는 아미노산과 우론산으로 이루어지는 복잡한 다당류의 하나로, N-아세틸글루코사민과 글루쿠론산으로 이루어진 고분자 화합물이다. 눈의 초자체나 탯줄 등에 주로 존재하며, 세균의 침입이나 독물의 침투를 막는 역할을 한다. 또한 히알루론산은 각종 안과 수술의 보조제, 관절 내 주사제, 인공눈물, 상처치유 등의 목적으로 사용되는 약물로서, 자신의 무게에 300~1000배에 해당하는 수분을 함유할 수 있는 다당류의 일종으로 보습작용이 뛰어난 것으로 알려져 있으나, 본 발명에서와 같이 PEG와 함께 사용되어 세포 시트를 제조하는 방법에 관하여는 보고된 바 없다.

[0015] 본 발명에서 상기 "폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG)"는 계면활성제의 일종으로 화장품 제조시 제품을 안정적으로 유지시키고 글리세린 같은 역할을 수행하여 화장수, 크림, 샴푸 등에 다양하게 사용되는 화합 성분으로서, 본 발명에서와 같이 HA와 함께 사용되어 세포 시트를 제조하는 방법에 대해서는 보고된 바 없다.

[0016] 구체적으로, 상기 세포 시트에 사용되는 세포는 표피세포, 섬유아세포, 간세포, 중배엽성 줄기세포 및 연골세포로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 연골세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 연골세포는 토끼의 반월상연골에서 유래한 것으로서 상기 연골세포를 이용하여

판형 세포 시트(cell slap)을 제조하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0018] 상기 세포 시트에 사용되는 세포는 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 “인간 전분화능 줄기세포(Pluripotent stem cells, PSCs)”는 인체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm), 외배엽(ectoderm) 모두로 분화할 수 있는 분화능을 지닌 줄기세포를 의미하는 것으로서, 상기 인간 전분화능 줄기세포는 다양한 질환치료를 위한 임상시험, 새로운 약물개발, 독성평가, 질환모델링 및 초기 배아발생 연구를 위해 매우 유용한 재료로 평가받고 있다.
- [0020] 구체적으로, 상기 세포 시트는 세포의 응집이 억제된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 세포 시트는 비부착 상태에서 별도의 지지체(scaffold) 없이 형성된 것을 특징으로 하며, 이렇게 형성된 세포 시트는 세포의 응집이 현저히 억제되어 스페로이드(spheroid)가 거의 나타나지 않고, 배양액 내에서 바닥에 침강한 그대로 세포가 시트 형태를 유지하는 것을 확인하였다(실험예 1, 도 2 내지 4).
- [0022] 이러한 결과는 배양액 내에 존재하는 히알루론산(HA) 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 차별적 작용에 의해 세포의 거동을 조절함으로써 세포응집에 의한 스페로이드(spheroid) 형성 경향성을 변화시켰기 때문이며, 하이드로겔의 특성을 가지는 히알루론산(HA)이 배지 성분을 고르게 분포시키면서 세포 간 결합을 유지하는 반면에 배지에 포함된 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 세포에 대해 척력을 나타내므로 배지에 포함된 PEG와 세포 사이 계면을 최소화하려는 힘이 발생하여 판형 세포 시트(cell slap)의 형태가 유지되는 것으로 보인다.
- [0023] 본 발명에서 상기 “하이드로겔”은 물을 대량으로 포함할 수 있는 물질이며, 산소, 물, 수용성 영양물, 효소 및 사이토카인 등의 폴리펩티드 등의 세포 생존에 필요한 물질, 노폐물 등을 쉽게 전염 이동시킬 수 있는 재료 또는 형태이며, 일반적으로 생체 적합성인 것을 의미한다. 하이드로겔의 형상이나 형태로는 세포 시트에 통합할 수 있다면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 미립자, 과립 형태, 필름 형태, 튜브형, 디스크상, 망상, 메쉬 형상, 다공질 모양, 현탁 상태 혹은 분산형 등 다양한 모양 또는 형태의 것이 사용될 수 있다. 그 중에서도 콜로이드 입자를 함유하는 수용액을 고상화한 결과가 되는 하이드로겔 입자가 바람직하다. 위의 하이드로겔의 성질을 가진 것이면 어느 재료로 이루어지는 입자도 이용할 수 있다. 예를 들어, 폴리아크릴아미드(polyacrylamide), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리히드록시에틸 메타아크릴레이트(polyhydroxyethyl methacrylate), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 폴리유산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic acid) 및 폴리에틸렌글리콜(poly ethylene glycol)등의 수용성, 친수성, 또는 물 흡수성 합성 고분자; 및 다당류, 단백질, 및 핵산 등을 화학 가교한 하이드로겔로 이루어진 입자이다. 다당류로는 히알루론산(hyaluronic acid) 및 콘드로이친 황산(chondroitin sulfate) 등의 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan), 전분, 글리코젠, 아가, 펙틴, 섬유소 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한 단백질로 콜라겐 및 그 가수 분해물인 젤라틴, 프로테오글리칸(proteoglycan), 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 라미닌(laminin), 엔탁틴(entactin), 테나신(tenascin), 트롬보스폰딘(thrombospondin), 폰빌레브란트인자(von Willebrand factor), 오스테오폰틴(osteopontin), 피브리노젠(fibrinogen) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로는 생체 적합성이면서 생체 내에서 세포에 의해 분해되는 재료로 이루어지는 입자가 본 발명에 적합하며, 가장 구체적으로는 히알루론산 및 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다.
- [0024] 구체적으로, 상기 세포 시트는 다층의 세포로 구성될 수 있고, 상기 다층을 구성하는 각 세포층은 세포층 간 일체성이 유지되면서 구조적 연속성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 기존의 세포 시트는 보통 지지체 기반으로 형성되는데, 이렇듯 지지체 기반으로 형성된 세포시트는 지지체 내부 세포의 분포가 균일하게 형성되기 어려우며, 지지체가 차지하는 부피만큼 세포 밀도가 낮아지므로 이식 시 전달되는 세포 수의 효율이 낮다는 문제가 존재하였다. 또한, 잔존하는 지지체가 점차적으로 분해되면서 구조적 변형과 조직 연속성의 변화가 생길 수 있다는 문제점이 공존하였다.
- [0026] 한편, 상기와 같은 문제점에도 불구하고 지지체 없이 2D 배양을 통해 단층의 세포로 구성된 세포시트는 강도가 약해서 찢어지기 쉽고 핸들링이 어렵다는 단점이 존재하며, 단일층의 세포로 구성되므로 이식용으로 사용시 고농도의 세포 전달이 어렵다는 한계점이 존재하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 세포 밀도를 높이고자 다층 구조를 형성하려는 시도가 있었으나, 다층구조를 형성하는 과정이 복잡하고 100% 층간 일체성을 구현하기가 어렵다는 한계점이 존재하였다.
- [0027] 고농도로 세포를 시딩(seeding)하여 다층의 세포 구조를 형성하는 경우 단위면적 당 높은 수의 세포를 전달할 수 있으나, 고농도로 시딩된 세포들이 국소적으로 응집하여 스페로이드(spheroid)를 형성하게 되므로 균일한 두

깨와 구조적 연속성을 가지는 세포시트를 형성할 수가 없다는 한계점이 존재하였다.

- [0028] 반면, 본 발명의 세포 시트는 지지체 없이도 다층의 세포로 구성된 세포밀도가 높은 시트를 형성함으로써 세포 전달 효율이 높으며, 조직재생에 유리함을 확인하였다(실험예 5, 도 6). 또한, 세포 시트의 형성 과정에 지지체가 불필요하므로 지지체의 분해과정에서 일어나는 구조변형의 우려가 없어 구조적 안정성이 높고, 코팅이 아닌 배지의 조성을 통해 세포의 거동을 제어하므로 특별히 다른 공정 추가 없이 기존의 세포를 다루는 공정과 동일하여 적용이 쉽다는 장점이 존재한다.
- [0029] 본 발명의 세포 시트는 비부착 조건에서 세포 시트의 형성을 유도하므로 세포와 기질 간 상호작용 등에 크게 제한되지 않으며, 배양용기의 표면 처리가 불필요하므로 3D 프린팅 등을 이용한 다양한 재료의 배양 용기 구성이 가능하다는 장점이 존재한다. 나아가, 본 발명의 세포 시트는 적층 과정이 없이도 다층의 세포로 구성된 세포 구조물 형성이 가능함에 따라, 적층에 의한 다층구조가 아니므로 구조적 안정성이 높아지고, 적층 과정을 생략할 수 있어 공정이 단축되고 세포층이 그 자체로 두껍게 형성되어 보다 안정적인 핸들링이 가능한 것을 확인하였다(실험예 4, 도 5).
- [0030] 본 발명의 다른 측면은 상기 제조방법으로 제조된 세포 시트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 세포 시트를 포함하는, 조직 수복용 이식재를 제공한다.
- [0032] 구체적으로, 상기 조직은 연골, 골, 각막, 결막, 지방조직, 피부, 근육, 근막, 건, 건막, 인대, 관절낭, 점액낭 및 상피조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 더욱 구체적으로는 연골을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 세포 시트에 사용되는 세포는 인간 전분화능 줄기세포로부터 목적하는 조직의 세포로 분화된 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 “조직 수복(tissue repair)”은 조직의 재생(regeneration)과 치유(healing)을 모두 포함하는 개념으로 사용될 수 있으며, 재생(regeneration)은 손상된 세포와 동일한 조직 구성으로 손상부위를 재구성하는 것을 의미하고, 치유(healing)는 손상된 조직에 덧붙이는(patch) 섬유증식형 반응을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 상기 “조직 수복용”이란, 손상된 조직의 수복을 위한 용도라면 그 종류를 제한하지 않고, 연골 손상, 근육 또는 건의 손상뿐 아니라 미용용 필러 용도, 성형용 보형물 용도 등을 모두 포함하는 것을 의미할 수 있다.
- [0036] 연골 및 연조직은 손상된 후 스스로 재생 또는 치유되지 않기 때문에, 다른 조직과 달리 조직의 성장을 촉진하는 방법은 적용하기 부적합하고, 이식을 통한 치료법이 효과적인 것으로 알려져 있다.
- [0037] 본 발명의 “조직 수복용 이식재”는 연골, 골, 각막, 결막, 지방조직, 피부, 근육, 근막, 건, 건막, 인대, 관절낭, 점액낭 등과 같이 조직이 손상된 경우에 물리적인 물성을 이용하여 손상된 부위를 채움으로써, 결손 또는 함몰 부위의 손상을 치료하고 본래 부피로 회복시키는 조성물을 의미하는 것으로, 상기와 같은 목적으로 사용되는 조성물이라면 그 실시 형태에 제한되지 않고 적절히 변경하여 적용 가능하다.
- [0038] 본 발명의 세포 시트는 별도의 지지체를 포함하지 않으면서도 고농도의 세포로 구성되어 이식된 조직 부위의 치료 및 재생 효과가 우수함을 확인하였는 바(도 6), 상기 세포 시트를 포함하는 조직 수복용 이식재는 높은 조직 재생 효율을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명의 세포 시트 제조방법은 지지체 없이 비부착 상태에서 세포 시트를 형성하는 것이 가능하며, 별도의 코팅 처리 없이 탈착하여 핸들링이 가능한 것을 특징으로 한다. 또한, 별도의 적층 과정 또는 다층화 과정을 거치지 않고도 단위면적당 높은 수의 세포를 이식할 수 있는 세포 시트를 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 히알루론산(hyaluronic acid, HA) 및 PEG(폴리-에틸렌글리콜)를 이용하여 세포 시트를 제조하는 방법을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 2는 24시간 배양 후의 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 제조 방법으로 제조된 세포 시트의 세포 응집(cell aggregate) 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 응집체(nodule) 개수를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 응집체(nodule) 크기를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 1의 세포 시트를 PLA(Poly Lactic Acid) 메쉬에 부착하는 과정을 나타낸 것이다.

도 6은 세포시트를 샌드위치 형태로 PLA 메쉬에 부착한 후 2, 3주간 연골분화를 유도하고, 형성된 조직의 형태와 기질 형성 여부를 조직학적 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 실시예 1의 세포 시트, B: 콜라겐 젤 시트 표면에 고농도로 시딩된 세포 시트).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] 실시예 1. HA 및 PEG를 이용한 세포 시트(Cell slap)의 제조 방법

[0044] 히알루론산(hyaluronic acid, HA) 및 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG)를 이용하여 세포 시트를 제조하는 방법을 도 1에 간략히 도시하였다.

[0045] 구체적으로, 사방이 막힌 사각형의 웰에 바닥 표면을 폴리-HEMA(폴리(2-하이드록시에틸 메트아크릴레이트))로 코팅하여 세포의 결합을 방지하였다.

[0046] 웰 바닥 표면과 세포의 결합이 방지된 상태에서 계대 수 3~5 사이의 토끼 반월상연골 유래의 연골세포를 1mg/ml 히알루론산(HA)을 포함하는 성장배지에 $2 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ 의 농도로 시딩(seeding)하고, 2.5시간 배양하여 세포층이 균일하게 가라앉도록 유도하였다. 이 때, 상기 성장배지는 α -MEM(alpha-Minimum Essential Medium, Gibco Invitrogen)배지에 5% 우태아 혈청(Fetal bovine serum: FBS, Lonza), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, Welgene), 2mM L-글루타민(Welgene), 10^{-8} M 덱사메타손(dexamethasone, Sigma Aldrich) 및 10^{-4} M 아스코르빅산(ascorbic acid, Sigma Aldrich)를 첨가하여 제조하였다.

[0047] 이후, 1% 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함하는 성장배지를 추가하여 배양함으로써 실시예 1의 세포 시트를 제조하였다.

[0048] 비교예 1. 성장배지만을 처리한 세포 시트의 제조

[0049] 실시예 1과 모든 조건을 동일하게 유지하되, 히알루론산(HA) 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)를 첨가하지 않는 점을 달리하여 상기 실시예 1의 제조 방법으로 비교예 1의 세포 시트를 제조하였다.

[0050] 비교예 2. HA만을 처리한 세포 시트의 제조

[0051] 상기 실시예 1의 제조 방법을 이용하여 비교예 2의 세포 시트를 제조하되, 히알루론산(HA)을 포함한 성장배지를 이용하는 것은 실시예 1과 동일하게 유지하고, 2.5시간 배양 후 폴리에틸렌글리콜(PEG)를 포함하지 않는 성장배지를 첨가함으로써 비교예 2의 세포 시트를 제조하였다.

[0052] 비교예 3. PEG만을 처리한 세포 시트의 제조

[0053] 실시예 1과 모든 조건을 동일하게 유지하되, 최초에 토끼 반월상연골 유래의 연골세포를 시딩할 때 히알루론산(HA)을 첨가하지 않은 성장배지를 이용함으로써 비교예 3의 세포 시트를 제조하였다.

[0054] 상기 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 제조 방법을 도 1에 간략히 도시하였다.

[0055] 실험예 1. HA 및 PEG의 포함여부에 따른 세포 시트의 형태 분석

[0056] 히알루론산(HA) 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 포함여부에 따른 세포 시트의 형태를 분석하기 위하여, 상기 제조 방법으로 제조한 세포 시트가 세포 응집(cell aggregate) 현상 없이 균일한 두께의 표면을 가지는지 여부를 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 제조 방법으로 제조된 세포 시트를 대상으로 배양상태를 유지

하면서 24시간 후의 세포 응집(cell aggregate) 정도를 확인하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0058] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 최초 세포 시딩(seeding)시 1mg/ml 농도의 히알루론산(HA) 포함 여부 및 배지 추가 시 1% PEG가 배지에 포함되는지 여부가 각각 세포의 응집 정도에 크게 작용하는 것을 확인하였다.

[0059] 구체적으로, HA 및 PEG 모두 포함되지 않은 비교예 1은 배양 24시간 후 일반적인 스페로이드(spheroid) 형성 조건과 유사하게 낮은 밀도의 스페로이드가 다수 형성되었고, 세포 시딩 시에 HA가 포함된 비교예 2의 경우 비교적 밀도가 높은 스페로이드(spheroid)를 형성하는 경향성이 높게 나타났으며, HA 없이 PEG 포함 배지만 추가된 비교예 3의 경우에는 세포의 응집이 무질서하게 일어나 거대한 스페로이드를 형성하는 것이 관찰되었다.

[0060] 반면, HA가 포함된 조건에서 세포를 시딩하고 PEG가 포함된 배지를 추가한 실시예 1의 경우 세포의 응집이 최소한으로 억제되어 스페로이드가 나타나지 않았고, 배양액 내에서 바닥에 침강한 그대로 세포가 시트 형태를 유지하여 비교적 균일한 두께를 유지하는 것을 확인하였다.

[0061] 이러한 결과는 배양액 내에 존재하는 두 가지 하이드로겔 성분의 차별적 작용에 의해 세포의 거동을 조절함으로써, 세포 응집에 의한 스페로이드 형성 경향성을 변화시켰기 때문인 것으로 보인다.

[0062] 즉, 하이드로겔의 특성을 가지는 HA가 배지 성분을 고르게 분포시키면서 세포 간 결합을 유지하는 반면, 배지에 포함된 PEG가 세포에 대해 척력을 나타내므로 배지에 포함된 PEG와 세포 사이 계면을 최소화하려는 힘이 발생하여 세포 시트(cell slap)의 형태가 유지되는 것으로 보인다.

[0063] 실험예 2. HA 및 PEG의 포함여부에 따른 응집체(nodule) 형성 정도 확인

[0064] 상기 실험예 1과 동일한 방법을 통하여 HA 및 PEG의 포함여부에 따른 응집체(nodule) 형성 정도를 확인하기 위하여 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 응집체(nodule) 개수 및 크기를 관찰하고, 개수를 확인한 결과를 도 3에, 크기를 확인한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0065] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 비교예 1에서 형성된 응집체의 개수가 가장 많았고, 비교적 큰 스페로이드가 형성되는 히알루론산 단독 처리군(비교예 2)과 세포 응집이 무질서하게 일어나는 PEG 단독 처리군(비교예 3)에서는 비교예 1에 비해 형성된 응집체의 개수가 낮게 나타난 것을 확인하였으며, HA 및 PEG 모두를 처리한 실시예 1에서 형성된 응집체의 수가 가장 적은 것을 확인하였다.

[0066] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 비교예 1과 HA 및 PEG를 모두 처리한 실시예 1의 응집체 크기가 비교예 2 및 3보다 현저히 작은 것을 확인하였다.

[0067] 상기한 결과를 종합하여 볼 때, HA 및 PEG를 모두 처리한 실시예 1의 경우에 형성되는 응집체의 수가 가장 적고 크기도 가장 작은 것을 확인하였는 바, 이러한 결과는 종래에 존재하던 기술적 한계를 극복하기 위한 매우 중요한 내용에 해당하는 것이다.

[0068] 기존의 단일 세포층 기반의 세포 시트는 물리적 강도가 약하고, 이식용으로 사용하는 경우 세포 농도가 낮다는 한계점이 존재하였다. 이러한 단일 세포층 기반의 세포시트의 한계점을 극복하기 위하여 다층의 세포로 구성된 세포 시트 및 이의 제조 방법이 요구되었으나, 고농도로 세포를 시딩함으로써 다층의 세포로 구성된 세포 시트를 형성하려는 시도는 세포의 농도가 높아질수록 응집이 많이 발생하여 다수의 스페로이드(spheroid)를 형성하게 되는 문제점을 해결하지 못하였다. 때문에 다층의 세포로 구성된 세포 시트를 제조하기 위하여는 별도의 적층 과정을 거치는 것이 요구되어 구조적으로 불안정하고 공정이 길어진다는 단점이 존재하였다.

[0069] 그러나, 본 발명의 HA 및 PEG를 포함하는 세포 시트의 제조 방법을 이용하면 과도한 스페로이드가 형성되는 문제를 해결할 수 있으므로 별도의 적층 과정 없이도 다층의 세포로 구성된 세포 시트의 제조가 가능해질 수 있다.

[0070] 실험예 3. HA 및 PEG를 포함하여 제조된 세포 시트의 사용성 확인

[0071] 상기 실시예 1에서 제조된 세포 시트를 사용함에 있어, 기존 세포시트 제조방법으로 제조된 세포시트의 사용 과정에 존재하던 한계점 및 불편함을 극복했는지를 확인하였다.

[0072] 기존의 지지체를 사용하여 세포 시트를 제조하는 경우에는 별도의 처리 과정 없이는 세포 시트를 깔끔하게 분리하기 어려우며, 나아가 지지체의 분해 또는 지지체로부터 분리하는 과정에서 세포 시트의 구조 변형 및 조직 연속성의 변화 가능성이 존재하였다.

[0073] 또한, 기존의 단일세포층 기반의 세포시트의 경우 강도가 약해서 찢어지기 쉽고 별도의 핸들링 도구 없이는 핸

들링하기 어렵다는 단점이 존재하였으며, 다층 구조를 형성하는 경우에는 그 과정이 매우 복잡할 뿐만 아니라 100% 층간 일체성을 구현하기 어렵고, 균일한 두께와 구조적 연속성을 가지는 세포시트를 형성하는 것이 불가능하였다.

[0074] 본 발명의 세포 시트는 지지체 없이 비부착 조건에서 형성되며, 별도의 적층 과정 없이도 다층의 세포로 구성되어 충분히 두껍게 형성되는 것을 특징으로 하는 바, 이러한 내용을 확인하기 위하여 실시예 1의 세포 시트를 PLA(Poly Lactic Acid) 메쉬에 부착하는 과정을 시연하였다(도 5).

[0075] 도 5에 나타난 바와 같이, 세포 시트를 PLA 메쉬보다 넓게 형성한 뒤, 콜라겐이 코팅된 PLA 메쉬의 앞뒤로 둘러 부착시킴으로써 연골분화용 복합체를 형성하였다.

[0076] 이때, 실시예 1의 세포 시트는 별도의 지지체 없이 비부착 조건에서 형성되었으므로 세포 스크래퍼(cell scraper)만으로 일정한 두께를 가진 균일한 세포시트의 분리가 가능하였다.

[0077] 또한, 분리된 세포 시트는 다층의 세포로 구성되어 충분히 두껍게 형성되었기 때문에, 별도의 핸들링 도구 없이 핀셋만으로도 찢어지지 않고 핸들링 하는 것이 가능한 것을 확인하였다.

[0078] 즉, 본 발명의 세포 시트 제조방법으로 제조된 세포 시트는 지지체 없이 비부착 조건에서 형성된 것으로서, 별도의 적층 과정 없이 자체적으로 다층의 세포 구조를 형성함으로써 구조적으로 안정할 뿐만 아니라 균일한 두께 및 구조적 연속성을 가지는 것을 확인하였다.

[0079] **실험예 5. HA 및 PEG를 포함하여 제조된 세포 시트의 기질형성 효과 확인**

[0080] 본 발명의 제조방법으로 제조된 세포 시트의 기질형성 효과를 확인하기 위하여, PLA 메쉬에 샌드위치 형태로 세포 시트를 부착시키고 메쉬 양쪽 표면의 세포가 서로 결합하여 하나의 조직으로 일체화 되는지 여부와 연골 분화 시 기질형성 효능을 확인하였다.

[0081] 구체적으로, 콜라겐 젤 시트 표면에 고농도로 시딩된 세포 시트 및 상기 실시예 1의 세포시트를 샌드위치 형태로 PLA 메쉬에 부착한 후 2, 3주간 연골분화를 유도하였다. 이후, 형성된 조직의 형태와 기질 형성 여부를 조직학적 염색을 통해 확인하였다(도 6).

[0082] 구체적으로, 고정된 조직을 5~7 μ m의 두께로 파라핀 절단(paraffin section)하고 건조시킨 뒤 헤마톡실린/에오신 염색(H&E, Hematoxylin & Eosin staining)을 수행 후 고해상도 광학현미경으로 관찰하여 조직의 형태를 확인하였다. 사프란인 O 염색(Safranin O staining)을 통한 연골 특이적 기질의 형성여부를 확인하기 위하여 Weigert's 헤마톡실린으로 5분간 핵을 염색 후 증류수로 10분간 세척하였다. 70% 에탄올 용액에 담가 조직을 에탄올 용액에 적응시킨 후 0.02% 패스트그린(fast green)으로 5분간 염색하고 1% 아세트산으로 세척하였다. 0.1% 수성 사프란인 O를 이용하여 5분간 염색 후 70%, 80%, 90%, 100% 알코올에 차례로 적응시켜 조직을 탈수하고 자일렌에 넣어 적응시킨 뒤 플라스틱 마운팅 용액(mountant)으로 마운팅하였다.

[0083] 트리크롬 염색(Trichrome staining)법으로 섬유상 기질단백질을 염색함으로써 콜라겐 젤 시트의 잔존여부를 확인하기 위하여, Weigert's 헤마톡실린으로 10분간 핵을 염색 후 증류수로 10분간 세척하고 비에브리치 진홍색 산 레드 폭신(Biebrich scarlet acid redfuchsin) 수용액으로 5분간 세포질을 염색하였다. 아닐린블루(Anilin blue)로 섬유상 기질을 염색 후 1% 아세트산으로 염색을 고정하고 70%, 80%, 90%, 100% 알코올에 차례로 적응시켜 조직을 탈수하고 자일렌에 넣어 적응시킨 뒤 플라스틱 마운팅 용액(Permount, Fisher Chemical)으로 마운팅하였다. 모든 시약은 별도의 표시가 없는 한 시그마알드리치(Sigma Aldrich)의 제품을 사용하였다.

[0084] 그 결과 도 6A에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 세포 시트로부터 형성된 조직은 가운데에 위치하는 PLA 메쉬로 침투 후 서로 결합하여 하나의 조직을 형성하였으며, 연골특이적 기질의 형성이 우수하게 일어남을 확인하였다.

[0085] 반면, 도 6B에 나타난 바와 같이, 콜라겐 젤 시트를 이용하여 형성한 세포시트는 콜라겐 표면에 시딩된 세포가 PLA 메쉬 내부로 침투하거나 이동하는 정도가 현저하게 낮아 PLA 메쉬를 경계로 두 개의 분리된 층을 형성하였다. 또한, 실시예 1의 세포 시트와 비교할 때 연골성 기질의 형성 정도가 매우 낮았고, 세포가 시딩된 콜라겐 젤 시트가 계속해서 잔존하는 것을 확인하였다(트리크롬 염색결과).

[0086] 상기한 결과로부터, HA 및 PEG를 포함하여 제조한 본 발명의 세포 시트는 콜라겐 젤 시트 등의 별도 지지체 없이 형성된 것으로서, 높은 세포 밀도를 가져 세포 전달 효율이 높고 조직재생에 유리할 뿐만 아니라, 완벽한 일체성을 가지고 높은 구조적 연속성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0087] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

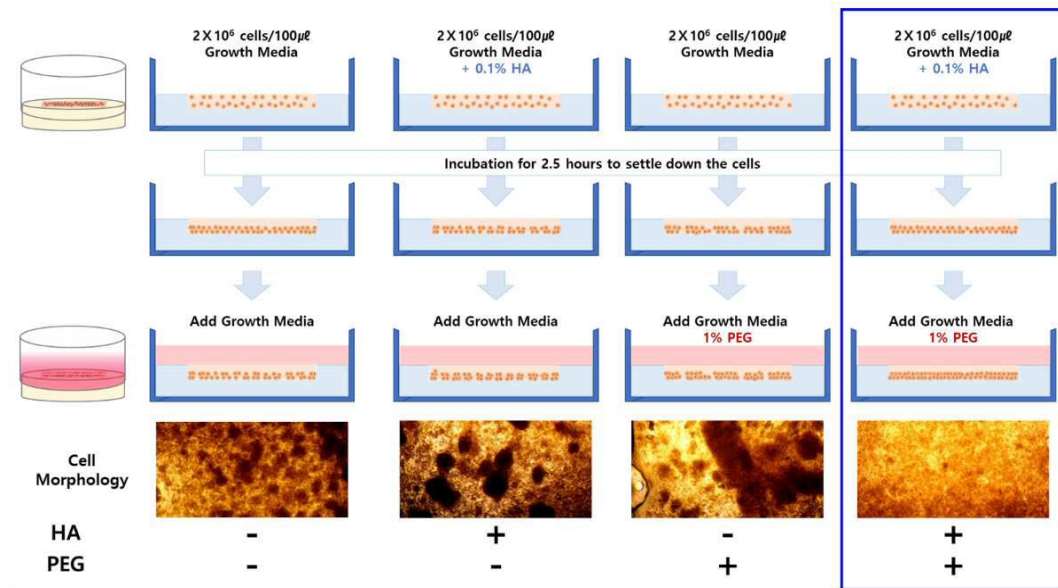
의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0088]

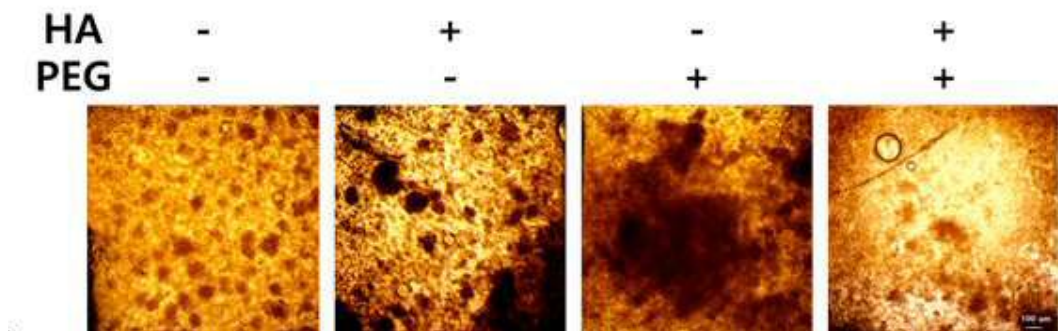
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

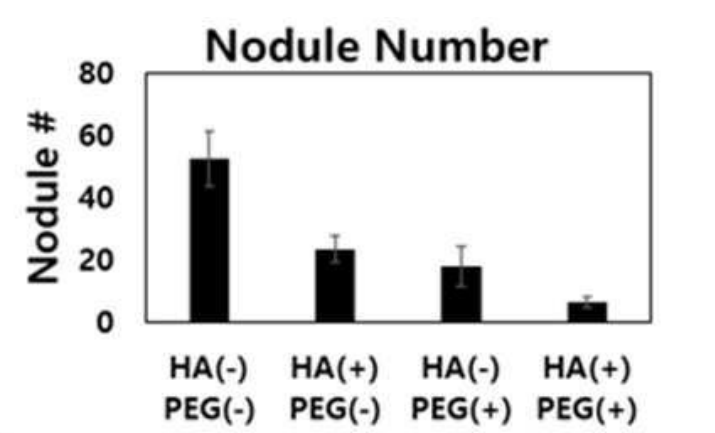
도면1



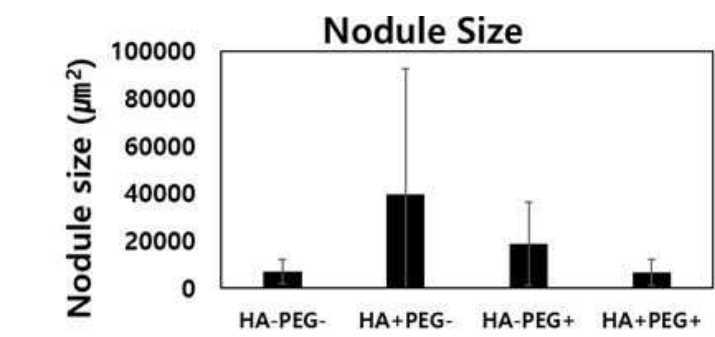
도면2



도면3



도면4



도면5



도면6

