



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0084710
(43) 공개일자 2019년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/192 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 47/46 (2017.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5176 (2013.01)
A61K 31/192 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0002787

(22) 출원일자 2018년01월09일

심사청구일자 2018년01월09일

(71) 출원인

(주)오스힐

서울특별시 구로구 가마산로 226, 4층(구로동, 고려구로빌딩)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

송해용

서울특별시 구로구 경인로 65길 16-15, 1102호 101호 (신도림동, 신도림4차e-편한세상)

김성은

서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동, 대림아크로빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 21 항

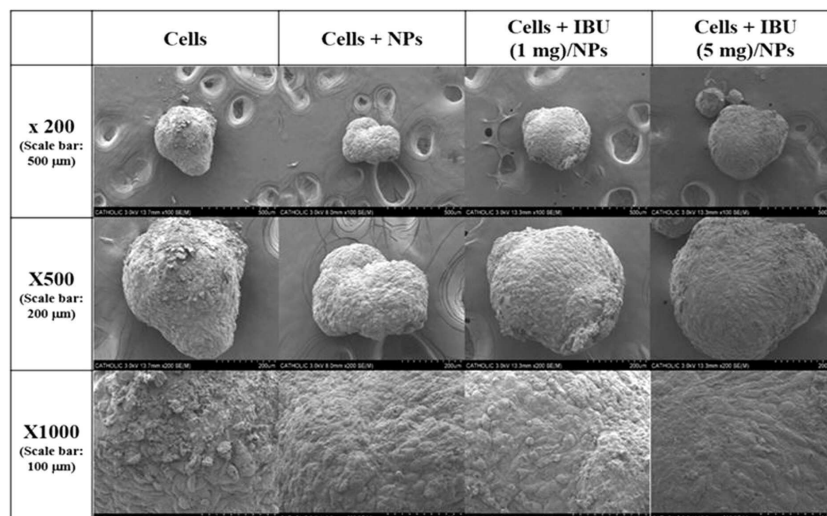
(54) 발명의 명칭 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 연부조직 질환 치료용 약물을 치료가 요구되는 환부에 효과적으로 전달할 뿐만 아니라 손상된 연부조직의 재생 및 복구에 효과적이다. 또한, 연부조직 질환 치료용 약물이 천천히 배출되기 때문에 장시간에 걸쳐 원하는 양의 약물을 환부에 전달할 수 있으면서도 우수한 재생효과를 연부조직에서 직접 발현시킬 수 있고, 생분해성 재료로 구성되기 때문에 부작용이 없다. 또한, 본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 환부의 상태에 따라 담지된 연부조직 질환 치료용 약물의 농도조절 등을 통해 약물이 배출되는 속도 및 배출되는 양을 조절할 수 있으므로 맞춤형 진료를 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 47/46 (2013.01)
A61K 9/513 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3886 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
C12N 5/0662 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)
C12N 2320/32 (2013.01)

(72) 발명자

김학준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호(두정동, 이안더센터텔)

정성철

서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)

심규식

경기도 광명시 연서로12번길 19, 201호(철산동)

이재용

경기도 광주시 행정타운로 143-38, 105동 302호(회덕동, 상록파크타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9B3063640
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발
 연구과제명 근골격계 질환 동물 모델 이용하여 줄기세포치료제 후보군 유효성 검증
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9F5030273
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발
 연구과제명 근골격계 결손/질환 동물모델 이용하여 국소형 약물전달 치료제 유효성 검증
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2017.04.01 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Sphreoid cell).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캠(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simvastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토틱렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyclosporine), 야누스 키나아제(JAK-3inhibitor), 리툭시맙(Rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 사라졸셀파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맙(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다립맘(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin), 카르토게닌(kartogenin), 데페록사민(Deferoxamine), 하파고시드(Harpagoside), 시노메닌(Sinomenine), 텔미살탄(Telmisartan), 살리드로사이드(Salidroside), 인터루킨-1ra(Interleukin-1ra), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-11(IL-11), 인터루킨-13(IL-13), 루테올린(Luteolin), 프로시아니딘(Procyanidins), 구글(Guggul), 유향(Boswellia), 덱사메타손(Dexamethasone), 이카리인(Icariin), 레스베라트롤(Resveratrol), 프로안토시아니딘(Proanthocyanidin) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 연부조직 질환 치료용 약물은 카르토게닌, 이부프로펜, 커큐민, 이카리인, 루테올린, 및 프로안토시아니딘 또는 이들 둘 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 평균 직경이 50 내지 800 nm인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노입자에는 연부조직 질환 치료용 약물이 0.5 내지 30 mg 탑재된 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 세포 집합체는 평균 직경이 50 내지 500 μm 인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

생체 내에 주입되어 상기 연부조직 질환 치료용 약물을 방출하고, 연부조직을 재생시켜 연부조직 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체.

청구항 9

(a) 연부조직 질환 치료용 약물을 유기용매에 용해시킨 후 양친매성 블록 공중합체 및 생체적합성 고분자와 교반하여, 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 함유하는 고분자 용액을 제조하는 단계;

(b) 상기 고분자 용액으로부터 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 분리하는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 수득한 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입하는 단계; 및

(d) 상기 나노입자가 주입된 줄기세포를 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 배양함으로써, 상기 줄기세포를 함유하며 균일한 직경을 가지는 스페로이드형의 3차원 세포 집합체를 형성하도록 유도하는 단계;를 포함하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

양친매성 블록 공중합체는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(mPEG-PLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(mPEG-PDLLGA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(mPEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(PEG-PDLLA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(PEG-PLLA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(PEG-PDLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(PEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드-코-글리콜라이드(PEG-PLGA), 메톡시 폴리에틸렌글리콜-b-폴리(락타이드-코-글리콜산), 메톡시 폴리에틸렌글리콜-b-폴리(카프로락톤), 폴리(L-락트산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리스티렌-b-폴리(D,L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-테트라에틸렌글리콜-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)(PEO-PPO-PEO), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(β -벤질-L-아스파르트산)(PEG-b-PBLA), 폴리(아클리산)-b-폴리스타이렌(PAA-b-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-b-폴리부타디엔(PEO-b-PBD), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리에틸렌(PEG-b-PE), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신)(PEO-p(L-Lys), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-히스티딘)(PEO-p(L-His), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-글루탐산)(PEO-p(L-Glu), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(ϵ -벤질옥시카보닐-L-라이신)(PEO-PBLL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(γ -벤질-L-글루타메이트)(PEO-PBLG), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(아스파르트산)(PEO-p(Asp), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-페닐-1-부티르산-L-아스파아마이드)(PEO-PPBA), 폴리(에틸렌포스파테이트)-b-폴리(카프로락톤)(PEEP-b-PCL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(메타아크릴산)(PEO-PMMA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(2-비닐피리디늄)(PEO-P2VP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(스티렌 설포네이트)(PEO-PSSt), 폴리(아크릴 산)-b-폴리(스티렌)(PAA-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신-이사이오피리딘)(PEO-PLDTP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-아미노산)(PEO-PLAA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(글라이신)(PEO-P(Gly) 및 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-아미노벤조에이트)(PEO-Abz)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리엔하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로

이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (a) 단계에서는 상기 양친매성 블록 공중합체와 생체적합성 고분자가 1 : 2 내지 6의 중량비로 첨가되어 교반되는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계에서의 고분자는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA) 및 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA)가 1 : 3 내지 10의 중량비로 포함된 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계에서의 고분자는 상기 연부조직 질환 치료용 약물 중량의 3 내지 30 배 중량으로 첨가하여 교반되는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계에서의 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 테트라하이드로퓨란, N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 아세트나이트릴, 및 클로로포름 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계에서의 교반은 교반기로 100 내지 300 rpm으로 30분 내지 2 시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 17

제9항에 있어서,

상기 (d) 단계에서의 세포집합체 배양용 배지는 완전배지(complete media) 또는 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 집합체의 제조방법.

청구항 18

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 분화용 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 재생용 약학 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 연부조직 질환은 건 또는 인대의 파열, 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염, 염증성 관절염, 골육종 같은 종양 질환, 결절유발관절병증, 피부질환, 척추디스크, 척추관절병증 및

척추 협착증 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Sphreoid cell) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연부조직은 뼈나 관절을 둘러싸고 있는 연한 부위 또는 그 조직으로, 뼈를 싸고 있는 막, 힘줄, 건, 인대 및 연골 등을 아우르는 말이다.

[0003] 연부조직의 손상은 외부의 충격이나 강한 비틀림, 당김, 압박, 과도한 운동, 장기간의 피로, 염증, 노화 또는 상처 등의 원인으로 발생된다. 이러한 연부조직의 손상은 외과적인 수술이나 기계적 장치를 사용하는 것에 의해 치료받을 수 있으나, 완치가 어렵고 보행 장애와 같은 생활에 심각한 불편함을 야기한다. 이러한 외과적 한계점을 극복하기 위해 자가세포나 천연연골의 이식을 통한 수술법이 개발되었으나, 이러한 방법들은 제한된 수의 세포분리, 분리 부위의 병적 상태, 분리 세포의 제한된 증식과 같은 문제가 있다.

[0004] 이에 따라, 최근 조직공학과 재생의학의 발달에 의하여 손상된 조직과 장기를 치료할 수 있는 치료방법으로 줄기세포를 이용한 세포치료방법이 대두되고 있다. 줄기세포란, 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포, 즉 '미분화'세포를 의미한다. 이러한 미분화 상태에서 적절한 조건을 맞춰주면 다양한 조직 세포로 분화할 수 있으므로 손상된 조직을 재생하는 등의 치료에 응용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포(Embryonic stem cell)와 혈구세포를 끊임없이 만드는 골수 세포와 같은 성체 줄기세포(Adult stem cell)가 있다. 성체 줄기세포는 제대혈(탯줄혈액)이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해 낸 세포로서 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포이다. 여기에는 조혈모세포(Hematopoietic Stem Cell)와 재생의학의 재료로 각광 받고 있는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 신경줄기세포(Neural Stem Cell) 등이 있다. 성체 줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강한 대신에 여러 종류의 성체 줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 장기 또는 조직을 재생할 수 있을 뿐 아니라 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있다. 또한, 성체줄기세포는 인간 배아에서 추출한 배아 줄기세포와 달리 골수나 뇌세포 등 이미 성장한 신체조직에서 추출하기 때문에 윤리논쟁을 피할 수 있는 장점이 있다.

[0005] 이에 질환 또는 염증으로 손상된 연부조직 세포의 형성 및 분화 촉진 효과, 또는 연부 조직의 재생 촉진 효과를 나타내면서 용이하게 사용할 수 있고 부작용의 문제가 없는 새로운 치료약물의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2016-0105363 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 연부조직 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 3차원 세포 집합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 상기 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기한 과제를 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Sphreoid cell)를 제공한다.
- [0011] 본 발명에 의하면, 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표지 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxopropen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simvastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토틱렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyxlosporine), 야누스 키나아제(JAK-3inhibitor), 리툭시맵(Rituximab), 토실리주맵(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맵(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다림맵(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferin), 카르토게닌(kartogenin), 데페록사민(Deferoxamine), 하파고시드(Harpagoside), 시노메닌(Sinomenine), 텔미살탄(Telmisartan), 살리드로사이드(Salidroside), 인터루킨-1ra(Interleukin-1ra), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-11(IL-11), 인터루킨-13(IL-13), 루테올린(Luteolin), 프로시아니딘(Procyanidins), 구글(Guggul), 유향(Boswellia), 덱사메타손(Dexamethasone), 이카리인(Icariin), 레스베라트롤(Resveratrol), 프로안토시아니딘(Proanthocyanidin) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명에 의하면, 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 카르토게닌, 이부프로펜, 커큐민, 이카리인, 루테올린, 프로안토시아니딘 또는 이들 둘 이상의 혼합물일 수 있다.
- [0013] 본 발명에 의하면, 상기 나노입자는 평균 직경이 50 내지 800 nm일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 의하면, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 의하면, 상기 세포 집합체는 평균 직경이 50 내지 500 μ m일 수 있다.
- [0016] 본 발명에 의하면, 상기 세포 집합체는 생체 내에 주입되어 상기 이부프로펜을 방출하고, 연부조직을 재생시켜 연부조직 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 (a) 연부조직 질환 치료용 약물을 유기용매에 용해시킨 후 양친매성 블록 공중합체 및 생체적합성 고분자와 교반하여, 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 함유하는 고분자 용액을 제조하는 단계;
- [0018] (b) 상기 고분자 용액으로부터 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 분리하는 단계;
- [0019] (c) 상기 (b) 단계에서 수득한 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입하는 단계; 및
- [0020] (d) 상기 나노입자가 주입된 줄기세포를 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 배양함으로써, 상기 줄기세포를 함유하며 균일한 직경을 가지는 스페로이드형의 3차원 세포 집합체를 형성하도록 유도하는 단계;를 포함하는 3차원 세포 집합체의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 의하면, 상기 양친매성 블록 공중합체는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(mPEG-PLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(mPEG-PDLLGA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(mPEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(PEG-PDLLAEG), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(PEG-PLLA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(PEG-PDLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(PEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드-코-글리콜라이드(PEG-PLGA), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜산), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(카프로락톤), 폴리(L-락트산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리스티렌-b-폴리(D,L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-테트라에틸렌글리콜-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)(PEO-PPO-PEO), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(β -벤질-L-아스파르트산)(PEG-b-PBLA), 폴리(아클리산)-b-폴리스타이렌(PAA-b-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-b-폴리부타디엔 (PEO-b-PBD), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리에틸렌(PEG-b-PE), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신)(PEO-

p(L-Lys), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-히스티딘) (PEO-p(L-His), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-글루탐산)(PEO-p(L-Glu), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(??-벤질옥시카보닐-L-라이신)(PEO-PBLL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(γ -벤질-L-글루타메이트)(PEO-PBLG), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(아스파르트산) (PEO-p(Asp), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-페닐-1-부티르산-L-아스파아마이드) (PEO-PPBA), 폴리(에틸렌포스파테이트)-b-폴리(카프로락톤)(PEEP-b-PCL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(메타아크릴산)(PEO-PMMA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(2-비닐피리디늄)(PEO-P2VP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(스티렌 설포네이트) (PEO-PStS), 폴리(아크릴 산)-b-폴리(스티렌)(PAA-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신-이사이오피리딘)(PEO-PLDTP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-아미노 산) (PEO-PLAA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(글라이신)(PEO-P(Gly) 및 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-아미노벤조에이트)(PEO-Abz)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0022] 본 발명에 의하면, 상기 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이드, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0023] 본 발명에 의하면, 상기 (a) 단계에서는 상기 양친매성 블록 공중합체와 생체적합성 고분자가 1 : 2 내지 6의 중량비로 첨가되어 교반될 수 있다.

[0024] 본 발명에 의하면, 상기 (a) 단계에서의 고분자는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA) 및 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA)가 1 : 3 내지 10의 중량비로 포함된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에 의하면, 상기 (a) 단계에서의 고분자는 상기 연부조직 질환 치료용 약물 중량의 3 내지 30 배 중량으로 첨가하여 교반될 수 있다.

[0026] 본 발명에 의하면, 상기 (a) 단계에서의 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 테트라하이드로퓨란, N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 아세토나이트릴, 및 클로로포름 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상일 수 있다.

[0027] 본 발명에 의하면, 상기 (a) 단계에서의 교반은 교반기로 100 내지 300 rpm으로 30분 내지 2 시간 동안 수행될 수 있다.

[0028] 본 발명에 의하면, 상기 (d) 단계에서의 세포집합체 배양용 배지는 완전배지(complete media) 또는 무혈청 배지일 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 분화용 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 재생용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 의하면, 상기 연부조직 질환은 건 또는 인대의 파열, 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염, 염증성 관절염, 골육종 같은 종양 질환, 결절유발관절병증, 피부질환, 척추디스크, 척추관절병증 및 척추 협착증 중에서 선택되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 연부조직 질환 치료용 약물을 치료가 요구되는 환부에 효과적으로 전달할 뿐만 아니라 손상된 연부조직의 재생 및 복구에 효과적이다. 또한, 연부조직 질환 치료용 약물이 천천히 배출되기 때문에 장시간에 걸쳐 원하는 양의 약물을 환부에 전달할 수 있으면서도 우수한 재생효과를 연부조직에서 직접 발현시킬 수 있고, 생분해성 재료로 구성되기 때문에 부작용이 없다. 또한, 본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 환부의 상태에 따라 담지된 연부조직 질환 치료용 약물의 농도조절 등을 통해 약물이 배출되는 속도 및 배출되는 양을 조절할 수 있으므로 맞춤형 진료를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 이부프로펜 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 투과전자현미경 이미지이다.

도 2는 이부프로펜 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 크기를 나타낸 결과이다.

도 3은 이부프로펜 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 약물 방출 거동 테스트 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 주사전자현미경 이미지이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 인 비트로 상에서 시간 경과에 따라서 염증 마커인 IL-6 및 TNF- α 와 항염증 마커인 IL-4 및 IL-10의 발현양을 측정하여 나타낸 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 인 비트로 상에서 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α 의 발현양을 측정한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 아킬레스 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 염증(pro-inflammatory) 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α 의 발현양을 측정한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 아킬레스 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 항-염증(anti-inflammatory) 마커인 IL-4, IL-10 및 IL-13의 발현양을 측정한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 회전근개 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 염증(pro-inflammatory) 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α 의 발현양을 측정한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 회전근개 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 항-염증(anti-inflammatory) 마커인 IL-4, IL-10 및 IL-13의 발현양을 측정한 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 아킬레스 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 분화(재생)(tenogenic differentiation) 마커인 collagen type I (COL1A1), decorin(DCN) 및 tenascin-C(TNC)의 발현양을 측정한 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 아킬레스 건염 동물모델에서 래빗의 건 조직으로부터 콜라겐(Hydroxyproline)의 양을 측정한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 회전근개 건염 동물모델에서 래빗의 혈액으로부터 분화(재생)(tenogenic differentiation) 마커인 collagen type I (COL1A1), decorin(DCN) 및 tenascin-C(TNC)의 발현양을 측정한 결과이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 확인하기 위하여, 회전근개 건염 동물모델에서 래빗의 건 조직으로부터 콜라겐(Hydroxyproline)의 양을 측정한 결과이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 건 자체의 치료 효과를 확인하기 위하여, 아킬레스 건염 동물모델에서 건 조직의 기계적 강도를 측정한 결과이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 건 자체 치료 효과를 확인하기 위하여, 회전근개 건염 동물모델에서 건 조직의 기계적 강도를 측정한 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체를 적용한 동물 조직을 헤마톡실린&에오신 염색법을 이용하여 조직학적으로 검사한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 집합체를 적용한 동물 조직을 트리크롬 염색법을 이용하여 조직학적으로 검사한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0036] 본 발명은 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Sphreoid cell)를 제공한다.

- [0037] 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 염기성 섬유모세포 성장인자, 혈관표시 성장인자, 인슐린 유사 성장인자, 골형성 단백질-7, 항염증활성 펩타이드(anti-inflammatory peptide), 아스피린(Aspirin), 메페남산(mefenamic acid), 디클로페낙(diclofenac sodium), 인도메타신(indomethacin), 나프록센(naproxen), 아세트아미노펜(acetaminophen), 케토프로펜(ketoprofen), 록소프로펜(loxoprofen), 피록시캄(piroxicam), 이부프로펜(ibuprofen), 심바스타틴(simvastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 카퍼펩타이드(Copper-peptide), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트라마돌(tramadol), 세레콕시브(celecoxib), 글루코사민(glucosamine), 콘드로이틴(chondroitin), 디아세린(diacerein), 메토크렉세이드(methotrexate), 사이클로스포린(cyclosporine), 야누스 키나아제(JAK-3inhibitor), 리툭시맵(Rituximab), 토실리주맵(tocilizumab), 사라졸설파피리딘(SASP), 브실라민(bucillamine), 레플로노미드(leflunomide), 인플릭시맵(infliximab), 에타넬셉트(etanercept), 아다립맵(adalimumab), 프레드니솔론(prednisolone), 안티프라민 2(antiflammin 2), 커큐민(curcumin), 설파살라진(Sulfasalazine), 락토페린(lactoferrin), 카르토게닌(kartogenin), 데페록사민(Deferoxamine), 하파고시드(Harpagoside), 시노메닌(Sinomenine), 텔미살탄(Telmisartan), 살리드로사이드(Salidroside), 인터루킨-1ra(Interleukin-1ra), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-11(IL-11), 인터루킨-13(IL-13), 루테올린(Luteolin), 프로시아니딘(Procyanidins), 구글(Guggul), 유향(Boswellia), 덱사메타손(Dexamethasone), 이카리인(Icariin), 레스베라트롤(Resveratrol), 프로안토시아니딘(Proanthocyanidin) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0038] 구체적으로, 상기 형질전환성장인자(Transforming growth factor, TGF)는 TGF-alpha, TGF-beta, TGF-beta 1, TGF-beta 2 또는 TGF-beta 3일 수 있으며, 혈소판유래성장인자(Platelet derived growth factor, PDGF)는 PDGFA, PDGFB, PDGFC 또는 PDGFD일 수 있고, 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)는 FGF2 또는 FGF-beta일 수 있고, 혈관표시성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C 또는 VEGF-D일 수 있으며, 인슐린 유사 성장인자(Insulin like growth factor, IGF)는 IGF-1 또는 IGF-2일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 특히, 바람직한 상기 연부조직 질환 치료용 약물은 카르토게닌, 이부프로펜, 커큐민, 이카리인, 루테올린, 프로안토시아니딘 또는 이들 둘 이상의 혼합물일 수 있고, 가장 바람직한 약물은 이부프로펜일 수 있다.
- [0040] 특히, 본 발명의 명세서에서, 용어 "이부프로펜"은 라세미체 및 이의 거울상 이성질체(예를 들어, 텍시부프로펜, S-(+)-ibuprofen)를 포함하는 의미로 사용된다.
- [0041] 본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 생체 내에 주입되어 연부조직 질환 치료용 약물을 지속적으로 방출(sustained release)할 수 있다. 상기 연부조직 질환 치료용 약물의 방출은 나노입자가 생체 내에서 분해되면서 배출되는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 3차원 세포 집합체로부터의 연부조직 질환 치료용 약물의 방출은 상기 나노입자를 형성하는 고분자의 종류 및 양, 또는 약물의 농도에 따라 연부조직 질환 치료용 약물의 방출량 및 방출속도가 조절될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 나노입자는 평균 직경이 50 내지 800 nm일 수 있다. 입자의 크기가 상기 범위 미만이면 담지될 수 있는 약물의 양이 너무 적어 생체 내에서 지속적으로 배출되기 어려워, 약물을 자주 투여해야하는 불편함이 있고, 입자의 크기가 상기 범위를 초과하면 나노입자의 제도가 용이하지 않다.
- [0044] 본 발명에 따른 나노입자는 각 입자 당 연부조직 질환 치료용 약물이 0.5 내지 30 mg 탑재될 수 있다. 탑재되는 약물의 양이 상기 범위 미만이면 약물의 양이 너무 적어 생체 내에서 지속적으로 배출되기 어려워, 약물을 자주 투여해야하는 불편함이 있고, 상기 범위를 초과하면 나노입자의 제도가 용이하지 않다.
- [0045] 또한, 상기 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 3차원 세포 집합체는 평균 직경이 50 내지 500 μ m일 수 있다. 세포 집합체의 크기가 상기 범위 미만이면 질환 부위에 안착하지 못하고 조직 내에서 돌아다닐 수 있고, 상기 범위를 초과하면 주사기 압이 걸려 주입하기 힘들고 세포 손실 발생 및 환자에게 거부감이 발생하는 문제점이 있다.
- [0047] 상기 3차원 세포 집합체는 생체 내에 주입되어 상기 연부조직 질환 치료용 약물을 방출하고, 연부조직을 재생시켜 연부조직 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환은 건 또는 인대의 파열, 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌,

인대염, 퇴행성 골관절염, 염증성 관절염, 골육종 같은 중앙 질환, 결절유발관절병증, 피부질환, 척추디스크, 척추관절병증 및 척추 협착증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에 따른 3차원 세포 집합체는 특히, 연부조직 세포의 형성 또는 분화를 촉진함으로써, 연부조직 질환의 예방 또는 치료에 효과적일 수 있다.

[0050] 또한, 상기 3차원 세포 집합체는 나노입자로부터의 지속적인 약물 방출을 통해 연부조직 세포를 자극함으로써 상기 3차원 세포 집합체로부터의 항염 사이토카인(anti-inflammatory cytokine) 발현을 유도하여, 연부조직 질환에서의 염증 기간을 단축하고 연부조직의 재생을 촉진할 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 연부조직 질환의 예방 또는 치료란 연부조직 세포의 형성을 촉진하거나 연부조직 세포의 분화를 촉진함으로써 연부조직의 재생을 촉진하거나, 염증을 억제하는 것일 수 있다.

[0052] 한편, 본 발명에 따른 상기 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 3차원 세포 집합체는 (a) 연부조직 질환 치료용 약물을 유기용매에 용해시킨 후 양친매성 블록 공중합체를 포함하는 고분자와 교반하여, 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 함유하는 고분자 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 고분자 용액으로부터 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 분리하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 수득한 나노입자를 분산시킨 세포 배양액을 줄기세포에 주입하는 단계; 및 (d) 상기 나노입자가 주입된 줄기세포를 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 배양함으로써, 상기 줄기세포를 함유하며 균일한 직경을 가지는 스페로이드형의 3차원 세포 집합체를 형성하도록 유도하는 단계;를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0053] 상기 3차원 세포 집합체의 제조방법은 먼저, (a) 연부조직 질환 치료용 약물을 유기용매에 용해시킨 후 양친매성 블록 공중합체 및 생체적합성 고분자와 교반하여, 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 함유하는 고분자 용액을 제조한다.

[0054] 상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 테트라하이드로퓨란 및 N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 아세토나이트릴 및 클로로포름 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상일 수 있고, 디메틸설폭사이드인 것이 보다 바람직하다.

[0055] 상기 양친매성 블록 공중합체는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(mPEG-PLLA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(mPEG-PDLLGA), 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(mPEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(PEG-PDLLAEG), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산(PEG-PLLA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산글리콜산(PEG-PDLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리 L-락트산글리콜산(PEG-PLLGA), 폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드-코-글리콜산(PEG-PLGA), 메톡시폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜산), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(카프로락톤), 폴리(L-락트산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리스티렌-b-폴리(D,L-락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-테트라에틸렌글리콜-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)(PEO-PPO-PEO), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(β -벤질-L-아스파르트산)(PEG-b-PBLA), 폴리(아크릴산)-b-폴리스타이렌(PAA-b-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-b-폴리부타디엔 (PEO-b-PBD), 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리에틸렌(PEG-b-PE), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신)(PEO-p(L-Lys), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-히스티딘) (PEO-p(L-His), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-글루탐산)(PEO-p(L-Glu), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(??-벤질옥시카보닐-L-라이신)(PEO-PBLL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(γ -벤질-L-글루타메이트)(PEO-PBLG), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(아스파르트산) (PEO-p(Asp), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-페닐-1-부티르산-L-아스파아마이드) (PEO-PPBA), 폴리(에틸렌포스파테이트)-b-폴리(카프로락톤)(PEEP-b-PCL), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(메타아크릴산)(PEO-PMMA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(2-비닐피리디늄)(PEO-P2VP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(스티렌 설포네이트) (PEO-PStS), 폴리(아크릴 산)-b-폴리(스티렌)(PAA-PS), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-라이신-이사이오피리딘)(PEO-PLDTP), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(L-아미노 산) (PEO-PLAA), 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(글라이신)(PEO-P(Gly) 및 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(4-아미노벤조에이트)(PEO-Abz)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 것일 수 있다.

[0056] 상기 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리(L-락트산), 폴리(D-락트산), 폴리락타이드-코-글리콜산(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리포스포진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리엔하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오

스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 생체적합성 고분자를 더 포함할 수 있다.

- [0057] 상기 (a) 단계에서는 상기 양친매성 블록 공중합체와 생체적합성 고분자가 1 : 2 내지 6의 중량비로 첨가되어 교반될 수 있다.
- [0058] 또한, 상기 (a) 단계에서의 고분자는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산(mPEG-PDLLA) 및 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA)가 1 : 3 내지 10의 중량비로 포함된 것일 수 있다.
- [0059] 상기 (a) 단계에서의 고분자는 상기 연부조직 질환 치료용 약물 중량의 3 내지 30 배 중량으로 첨가하여 교반될 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 (a) 단계에서의 교반은 교반기로 100 내지 300 rpm으로 30분 내지 2 시간 동안 교반하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] (b) 단계에서는 상기 고분자 용액으로부터 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자를 분리한다.
- [0062] 나노입자를 제조하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어 투석(dialysis), 원심분리, 세척, 동결건조 등의 과정을 통해 나노입자를 제조할 수 있다. 나노입자의 크기는 평균 직경이 50 내지 800 nm인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 200 내지 400 nm이다. 나노입자의 크기가 너무 작으면 나노입자 내부에 약물을 탑재할 수 있는 효율이 낮아지며, 나노입자의 크기가 너무 커지면 줄기세포 내에 탑재되는 나노입자의 양이 현저히 감소하기 때문에 줄기세포 내에 나노입자를 탑재할 수 있는 효율이 매우 떨어진다.
- [0063] (c) 단계에서는 상기 (b) 단계에서 수득한 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입한다.
- [0064] 상기 나노입자를 제조한 후, 세포배양액에 분산하고 이를 줄기세포에 주입한
- [0065] 다. 예를 들어, 줄기세포를 적당한 장소(예를 들어, 웰 플레이트)에 분주한 후 상기 나노입자를 분산시킨 세포 배양액을 상기 줄기세포가 분주된 곳에 주입한다.
- [0066] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 나노입자는 세포배양액 1 ml 당 나노입자를 0.5 내지 20 mg 분산시키는 것이다. 나노입자를 너무 적은 양으로 분산시킬 경우, 줄기세포에 탑재되는 나노입자의 양이 상대적으로 적으며, 이로 인해 매우 낮은 양의 골 또는 연골 형성제가 줄기세포내로 탑재되어 줄기세포 분화 효율이 매우 떨어진다. 한편, 높은 양의 나노입자를 줄기세포에 분산할 경우, 줄기세포가 탑재할 수 있는 나노입자의 양이 한계가 있으며, 일정 한계 이상은 흡수하지 않으며, 높은 농도의 나노입자를 줄기세포에 처리하게 되면, 많은 양의 나노입자를 흡수한 줄기세포의 생존율이 낮아진다.
- [0067] 본 발명에서의 세포집합체 배양용 배지는 세포의 증식을 위한 배지로서 완전배지(complete media), 무혈청배지 또는 합성배지(chemically defined media)일 수 있고, 완전배지인 것이 바람직하다.
- [0068] 본 명세서에서 용어 "완전배지"는 기본배지(basal medium) 또는 기본배지에 혈청(예를 들어, FBS(Fetal Bovine Serum))을 추가한 배지를 의미한다.
- [0069] 기본배지의 예로는 Eagle's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1(Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다. 가장 바람직하게는 DMEM이다. 배지 및 세포의 배양에 대한 일반적인 설명은, R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York에 상세하게 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0070] 상기 완전배지는 상기 혈청 외에 항생제(예를 들어, 페니실린/스트렙토마이신) 및 기타 알부민, 지질, 인슐린 등의 구성성분을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 완전배지는 바람직하게는 상기 구성성분 외에 연부조직 형성제가 추가적으로 포함되지 않은 것이다.

- [0071] 또한, 상기 무혈청배지는 혈청을 함유하지 않는 배지이고, 혈청이외의 세포 증식 인자 및 호르몬을 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 적절하게 사용될 수 있는 무혈청 배지로는 무혈청배지 ASF104(Ajinomoto Co., Inc.), 무혈청배지 SF-02(Sanko Junyaku Co., Ltd.), 무혈청배지 하이브리도마(hybridoma)-SFM(Lifetech Oriental), 무혈청배지 BIO-MPM-1(Biological Industries), 무혈청배지 EX-CELLTM302-HDP(JRH Biosciences), 무혈청배지 코스미디움 001(Cosmo Bio), 및 무혈청배지 SFM-101(Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) 등이 있다.
- [0073] 상기 줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 줄기세포를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 성체줄기세포, 보다 바람직하게는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 보다 더 바람직하게는 골수(Bone marrow), 제대(Cord) 또는 제대혈(Cord blood), 지방(Adipose), 편도(Tonsil) 유래 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있다. 본 발명의 효과면에서 가장 바람직한 것은 편도(Tonsil) 유래 중간엽 줄기세포이다.
- [0074] 이러한 방법으로 제조된 3차원 세포 집합체는 직경이 50 내지 500 μm 일 수 있다.
- [0075] 상기 3차원 세포 집합체는 2차원 세포와 비해서 세포 조작성이 용이하고 증식이 빠르며, 많은 양의 나노입자를 세포에 포집할 수 있다. 또한, 포집된 나노입자로부터의 약물 방출을 통해 세포를 자극하여 효과를 극대화하는 장점을 가지고 있다. 동물 실험에서, 2차원 세포를 주입한 경우 원하는 부위(환부)에 세포가 온전히 있지 않고 많이 이동하는 반면, 3차원 세포 집합체를 주입한 경우에는 원하는 부위에 세포가 온전히 존재하여 효과를 구체적으로 확인할 수 있었다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 분화용 조성물을 제공한다.
- [0077] 본 발명의 조성물은 연부조직 분화 배지를 이용하지 않았음에도 불구하고, 일반 세포배양액, 무혈청배지 또는 합성배지 내에서 연부조직으로 보다 효율적으로 분화할 수 있다.
- [0078] 상기 나노입자가 탑재된 줄기세포 또는 이의 3차원 세포 집합체는 나노입자를 탑재하지 않은 줄기세포 또는 이의 3차원 세포 집합체와 비교하여, 연부조직 분화 관련 아무런 물질을 함유하지 않은 세포배양액에서 배양했음에도 불구하고 연부조직 분화 배지를 이용한 경우보다 연부조직 분화 효율이 유의적으로 증가하는 것을 구체적인 사례를 통해 확인하였다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0080] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 연부조직 질환 치료용 약물이 탑재된 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 포함하는 연부조직 재생용 약학 조성물을 제공한다.
- [0081] 본 발명의 약학 조성물에 의해 예방 또는 치료되는 연부조직 질환은 건 또는 인대의 파열, 아킬레스 건염, 회전근개 건염, 슬개 건염, 염좌, 인대염, 퇴행성 골관절염 또는 염증성 관절염일 수 있다.
- [0082] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 연부조직 질환 치료용 약물 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 또는 이의 집합체를 투여한 경우, 연부조직 질환 치료용 약물만을 투여한 경우 또는 연부조직 질환 치료용 약물을 포함하는 나노입자만을 투여한 경우와 비교하여 염증인자의 발현을 감소시키거나, 항염증인자의 발현을 증가시킨다.
- [0083] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 연부조직 질환 치료용 약물을 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 또는 이의 집합체는 연부조직이 손상된지 일주일이 경과한 후에 투여한 경우에도 우수한 항염증, 건 조직 재생, 기계적 강도 증가 효과를 나타낸다.
- [0084] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 염증인자(예를 들어, $\text{TNF-}\alpha$)의 발현을 감소시키며, 바람직하게는 투여 후 5주 이상, 보다 바람직하게는 투여 후 12주 이상 염증인자의 발현을 감소시킨다.
- [0085] 본 발명에 따른 상기 3차원 세포 집합체를 유효량 투여하여 연부조직 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

- [0086] 여기에서 사용된 용어 "유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상가에 의해 생각되는 조직에, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 수 있다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 예방, 치료 또는 개선 방법에 있어서, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001 g/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0087] 본 발명에 따른 상기 3차원 세포 집합체는 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 비타민, 착색제, 중진제, 펙트산, 전해질제, 알긴산, 유기산, 탄산화제, 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0088] 상기 3차원 세포 집합체는 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0089] 상기 3차원 세포 집합체의 제제형태는 통상의 약제학적 조성물의 제제형태이면 특별히 제한은 없으나 바람직하게는 주사 가능한 액체(액상 용액)일 수 있으며, 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 1일 당 10^2 - 10^{10} 세포이다.
- [0091] 본 발명에 따르면, 상기 3차원 세포 집합체에 함유된 연부조직 질환 치료용 약물의 바람직한 농도는 1 ng/ml 내지 500 mg/ml 일 수 있으며, 환부의 경중에 따라 용이하게 달라질 수 있음은 자명한 사실이다.
- [0092] 본 발명의 약학 조성물은 인간용 또는 동물용 의약을 포함한다.
- [0093] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0094] **실시예**
- [0095] **제조예. 이부프로펜 탑재 나노입자의 제조**
- [0096] 디메틸설폭사이드 10 mL에 이부프로펜(Ibuprofen, IBU)을 10, 50 mg을 용해시킨 다음 mPEG-PDLLA(모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리 DL-락트산) 40 mg과 PLGA(폴리락타이드-코-글리콜라이드) 160 mg을 넣고 1시간 동안 200 rpm으로 교반하여 완용 시켰다. 반응 혼합물이 다 녹으면 투석막(dialysis membrane; MWCO 6,000~8,000)에 넣어 3일 동안 투석(dialysis)하고, 원심 분리한다. 상층액 제거 후, 고형분은 증류수를 사용하여 3회 세척한 뒤, 동결 건조하여 1 mL 당 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자를 제조하였다.
- [0097]
- [0098] **이부프로펜 탑재 나노입자의 표면 관찰**
- [0099] 상기 생분해성 나노입자(대조군) 및 이부프로펜 (1 mg 또는 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자를 각각 실험용 바이알(vial)에 1 mL 당 1 mg을 넣고 초음파 분쇄기 이용하여 3일 동안 분산시켜서 시료를 준비하였다. 분산된 나노입자를 100 μ L 파서 그리드(grid) 올려 12시간 상온 건조 후 투과전자현미경 촬영하였다.

[0100] 도 1은 상기 이부프로펜 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 투과전자현미경 이미지이다. 도 1을 보면, 상기 생분해성 나노입자(대조군) 및 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자가 모두 원형의 모양 및 형태를 유지하는 것을 확인하였다.

[0101] 이부프로펜 탑재 나노입자의 크기 및 표면 전위차 분석

[0102] 동적빛산란(DLS) 기기를 이용하여 생분해성 나노입자(대조군) 및 상기 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자의 크기를 측정한 결과, 직경이 200 ~ 300 nm인 것을 확인하였다. 도 2는 상기 측정한 이부프로펜 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 크기를 나타낸 것이다.

[0103] 또한, 제타전위 (Zeta potential)를 이용하여 생분해성 나노입자표면 전위차를 분석한 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 표 1을 보면, 이부프로펜(5 mg) 탑재 생분해성 나노입자의 표면 전위차가 가장 커서 이부프로펜(1 mg) 탑재 생분해성 나노입자 및 생분해성 나노입자 보다 더 많은 음전하를 띄는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

구분	NPs	IBU(1 mg)/NPs	IBU(5 mg)/NPs
Zeta potential(mV)	-8.5290±0.30	-15.68±0.26	-18.79±0.29

[0106] 나노입자의 이부프로펜 방출 거동

[0107] 상기 제조예에서 제조한 이부프로펜 탑재 나노입자의 약물방출 거동을 확인하였다. 구체적으로 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 나노입자의 시간에 따른 방출 거동을 분석하기 위하여, 각각의 나노입자 1 mg/mL를 투석막(dialysis membrane; MWCO 6,000~8,000)에 넣고 1 mL의 PBS 버퍼(pH 7.4)와 함께 37℃에서 100 rpm으로 교반하면서 시간(1시간, 3시간, 6시간, 10시간, 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일, 28일) 경과에 따른 약물 방출량을 확인하였으며, 측정 후에는 새로운 버퍼로 교환하였다. 방출되는 이부프로펜을 적외선 및 가시광선 분석기(DU-530, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 226 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이를 하기 도 3에 나타내었다.

[0108] 도 3을 보면, 초반 1일 동안, 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자로부터 이부프로펜은 21.69 ± 0.04% 방출되었고, 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자로부터는 12.15 ± 0.01% 방출되었다. 28일 동안, 이부프로펜(1 mg) 탑재 생분해성 나노입자로부터 이부프로펜은 54.19 ± 0.08% 방출되었고, 이부프로펜(5 mg) 탑재 생분해성 나노입자로부터는 30.67 ± 0.02% 방출되었다.

[0109] 즉, 이부프로펜의 농도에 의존적으로 약물의 방출량이 증가하는 것을 알 수 있다.

[0110] 실시예. 3차원 세포집합체의 제조

[0111] 0.5% 아가로스 젤이 코팅된 24-웰 플레이트에 1×10^5 편도유래줄기세포 분주 후, 나노입자(NPs), 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자(IBU(1 mg)/NPs) 또는 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자(IBU(5 mg)/NPs)가 각각 100 µg/mL의 농도로 분산된 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)]을 주입하여 나노입자(NPs), 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자(IBU(1 mg)/NPs) 또는 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자(IBU(5 mg)/NPs)가 각각 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다. 상기 제조과정을 간단히 요약하면, 나노입자가 포함된 세포배양액 안에 있는 단세포(single cell)를 웰 플레이트에 분주하고, 상기 단세포들이 세포-세포 상호작용(interaction)의해 3차원 세포 집합체를 형성하면서 나노입자를 함유하여, 나노입자가 함유된 줄기세포가 3차원 세포 집합체를 이루게 되는 것이다.

[0112] 이후, 100 파이 플레이트에서 키운 줄기세포를 트립신(trypsin)을 이용하여 플레이트에서 떼어내어 원심분리하고, 트립판블루(trypsin blue) 염색을 한 후, 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 세었다. 그리고, 1×10^5 편도유래줄기세포를 0.5% 아가로스 젤이 코팅된 24-웰 플레이트에 분주한 후, 나노입자(NPs), 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자(IBU(1 mg)/NPs) 또는 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자(IBU(5 mg)/NPs)가 각각 100

$\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 분산된 세포배양액을 추가하여, 나노입자(NPs), 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자(IBU(1 mg)/NPs) 또는 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자(IBU(5 mg)/NPs)가 각각 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다.

시험예

시험예 1. 3차원 세포 집합체 내에 포함되어 있는 나노입자의 양 측정

상기 실시예에서의 이부프로펜 탑재 나노입자를 함유하는 3차원 세포 집합체가 제조된지 각각 1일, 3일 및 7일 이후에, 상기 3차원 세포 집합체 내에 포함되어 있는 나노입자(NPs) 또는 이부프로펜(1 mg 또는 5 mg) 탑재 나노입자(IBU/NPs)의 양(개수)을 유세포 분석기를 이용하여 측정하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	1 day		3 days		7 days	
	개수	백분율(%)	개수	백분율(%)	개수	백분율(%)
NPs	256,181	48.54 ± 0.82	305,154	54.86 ± 1.05	337,745	63.16 ± 0.62
IBU(1 mg)/NPs	269,190	47.85 ± 0.87	315,493	56.09 ± 0.06	339,838	63.54 ± 0.29
IBU(5 mg)/NPs	276,348	49.13 ± 1.39	316,726	56.31 ± 3.06	339,395	63.45 ± 0.68

상기 표 2를 보면, 3차원 세포 집합체 내에 포함되어 있는 나노입자(NPs) 또는 이부프로펜(1 mg 또는 5 mg) 탑재 나노입자의 함유량은 시간이 지날수록 점차적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

시험예 2. 3차원 세포 집합체의 표면 관찰

실시예에 따라 3차원 세포 집합체를 제조하고 1일 후에, 각각의 3차원 세포 집합체를 2.5% 글루타알데하이드 용액에 넣고 4°C에서 1일 동안 고정하였다. 그 후 에탄올 50%에서 10분간 반응시키고 에탄올 50% 용액을 제거한 후, 에탄올 60%를 넣어서 10분간 반응시켰다. 이 같은 반응을 70%, 80%, 90%, 100%로 순차적으로 진행하였다. 그리고, 세포 안 수분을 제거하고 3일 동안 동결건조 후 주사전자현미경으로 관찰하였으며, 상기 주사전자현미경 이미지를 도 4에 나타내었다.

도 4를 보면, 표면에 아주 작게 나노입자가 있는 것을 확인하여 3차원 세포 집합체 안에 나노입자가 성공적으로 탑재된 것을 확인할 수 있었다.

시험예 3. 3차원 세포 집합체의 항염 효과 확인(인 비트로)

염증 마커 또는 항염 마커 유전자의 발현 분석을 통해 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 항염 효과를 평가하였다.

실시예에서 제조된 3차원 세포집합체에 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) $1 \mu\text{g/mL}$ 을 분주한지 1일, 3일, 7일 및 14일 이후에 3차원 세포집합체의 배지를 파이펫 에이드(pipet aid)를 이용하여 e-tube에 모았으며, ELISA kit를 이용해서 상기 배지에 포함되어 있는 염증(pro-inflammatory) 마커(IL-6 및 TNF- α)와 항염(anti-inflammatory) 마커(IL-4 및 IL-10)의 발현양을 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5를 보면, 이부프로펜 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체는 시간이 지날수록 염증(pro-inflammatory) 마커의 발현양은 감소하고, 항염 마커의 발현양은 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체는 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자를 함유한 경우보다 항염 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

시험예 4. 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과 확인(인 비트로)

염증 마커 유전자의 발현 분석을 통해 실시예에 따른 3차원 세포 집합체의 염증억제 효과를 평가하였다.

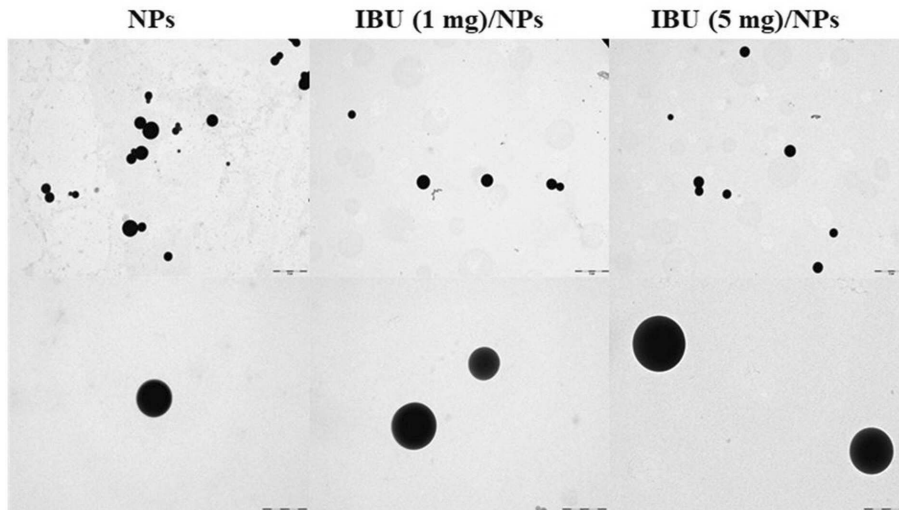
- [0128] 실시예에서 제조된 3차원 세포집합체에 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 1 $\mu\text{g/mL}$ 을 분주하고, 1일 및 3일 후에 상기 3차원 세포집합체가 발현하는 염증(pro-inflammatory) 마커(MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α)의 발현양을 측정하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0129] 도 6을 보면, 이부프로펜 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체는 시간이 지날수록 염증 마커의 발현량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 이부프로펜(5 mg) 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체는 이부프로펜(1 mg) 탑재 나노입자를 함유한 경우보다 염증 마커의 발현양이 더욱 감소하여 항염 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0130] **시험예 5. 동물모델을 이용한 3차원 세포 집합체의 효능 확인**
- [0131] 콜라게네이즈(Collagenase, 50 mg/mL) 용액을 토끼 아킬레스 건 또는 회전근개 건에 각각 50 μL 씩 주입한 후, 아킬레스 건염 및 회전근개 건염 유발 동물 모델을 제조하였다.
- [0132] 콜라게네이즈 주입 1주 후, 8 일째 되는 날 3차원 세포집합체, 나노입자 함유 3차원 세포집합체 또는 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체를 아킬레스 건염 및 회전근개 건염 유발된 동물모델에 각각 주입하여 항염증, 건 조직 재생 및 기계적 강도증가에 대한 효능을 검증하였다. 대조군 및 실험군은 아래와 같다.
- [0133] (a) 양성 대조군(정상군; control)
- [0134] (b) 음성 대조군(콜라게네이즈 처리군; collagenase)
- [0135] (c) 실험 1군(콜라게네이즈 처리군 + 3차원 세포집합체 주입; cells)
- [0136] (d) 실험 2군(콜라게네이즈 처리군 + 세포집합체/나노입자 주입; NPs)
- [0137] (e) 실험 3군(콜라게네이즈 처리군 + 세포집합체/이부프로펜(1mg) 탑재 나노입자 주입; IBU(1mg)/NPs)
- [0138] (f) 실험 4군(콜라게네이즈 처리군 + 세포집합체/이부프로펜(5mg) 탑재 나노입자 주입; IBU(5mg)/NPs)
- [0139] (g) 실험 5군(콜라게네이즈 처리군 + 세포집합체/이부프로펜(5mg) 용액 주입; IBU(5mg) solution)
- [0140] **시험예 5.1. 아킬레스/회전근개 건염 동물모델에서 염증 마커 발현양 측정**
- [0141] 콜라게네이즈를 주입하여 준비한 아킬레스 건염 또는 회전근개 건염 동물모델에 상기 control, collagenase, 실험 1군 내지 5군을 각각 주입한 후, 상기 콜라게네이즈를 주입한지 1주 내지 5주가 지난 실험동물의 복대동맥으로부터 혈액을 채취하여 채취된 혈액을 이용하여 염증(pro-inflammatory) 마커(MMP-3, MMP-13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α) 및 항 염증(anti-inflammatory) 마커(IL-4, IL-10, 및 IL-13)를 real-time PCR를 이용하여 측정하여 도 7 내지 도 10에 나타내었다.
- [0142] 도 7은 상기 아킬레스 건염 동물모델인 래빗의 혈액으로부터 염증(pro-inflammatory) 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α 의 발현양을 측정한 결과이고, 도 8은 상기 래빗 혈액으로부터 항-염증(anti-inflammatory) 마커인 IL-4, IL-10 및 IL-13의 발현양을 측정한 결과이다.
- [0143] 도 9는 상기 회전근개 건염 동물모델인 래빗 혈액으로부터 염증(pro-inflammatory) 마커인 MMP3, MMP13, COX-2, ADAMTS-5, IL-6 및 TNF- α 의 발현양을 측정한 결과이고, 도 10은 상기 래빗 혈액으로부터 항-염증(anti-inflammatory) 마커인 IL-4, IL-10 및 IL-13의 발현양을 측정한 결과이다.
- [0144] 상기 도 7 내지 10을 통해, 이부프로펜 (1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체와 이부프로펜 (5 mg) 용액 처리된 3차원 세포집합체 주입된 동물에서 채취된 혈액에서 시간이 지날수록 염증 마커 감소 추세를 보였으며, 항 염증 마커는 증가되는 것을 확인하였다. 한편, 나노입자 함유 3차원 세포집합체(NPs) 및 3차원 세포집합체(Cells)만 주입한 동물에서 채취된 혈액에서는 시간이 지날수록 염증 마커는 증가되었으며 항 염증 마커는 떨어지는 것을 확인하였다.
- [0145] **시험예 5.2. 아킬레스/회전근개 건염 동물모델에서 건 분화(재생) 마커 발현양 및 콜라겐 양 측정**

- [0146] 콜라게네이즈를 주입하여 준비한 아킬레스 건염 또는 회전근개 건염 동물모델에 상기 control, collagenase, 실험 1군 내지 5군을 각각 주입한 후, 상기 콜라게네이즈를 주입한지 1주 내지 5주가 지난 실험동물의 복대동맥으로부터 혈액을 채취하고, 채취된 혈액을 이용하여 건 분화(재생)(tenogenic differentiation) 마커(collagen type I(COL1A1), decorin (DCN) 및 tenascin-C(TNC))의 발현양과 실험군 주입 4주 후의 콜라겐(Hydroxyproline) 양을 측정하여 건 자체의 재생 여부를 확인하였다. 건 분화(재생) 마커는 real-time PCR를 이용하여 측정하였으며, 아킬레스 건 및 회전근개 건에서 콜라겐 양은 Hdydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 이용하여 측정하여 도 11 내지 도 14에 나타내었다.
- [0147] 도 11은 상기 아킬레스 건염 동물모델인 래빗 혈액으로부터 분화(재생)(tenogenic differentiation) 마커인 collagen type I (COL1A1), decorin(DCN) 및 tenascin-C(TNC)의 발현양을 측정한 결과이고, 도 12는 상기 래빗 아킬레스 건으로부터 콜라겐(Hydroxyproline)의 양을 측정한 결과이다.
- [0148] 도 13은 상기 회전근개 건염 동물모델인 래빗 혈액으로부터 분화(재생)(tenogenic differentiation) 마커인 collagen type I (COL1A1), decorin(DCN) 및 tenascin-C(TNC)의 발현양을 측정한 결과이고, 도 14는 상기 래빗 회전근개 건으로부터 콜라겐(Hydroxyproline)의 양을 측정한 결과이다.
- [0149] 상기 도 11 및 도 13을 보면, 이부프로펜(1 및 5 mg) 탑재 나노입자 함유 3차원 세포집합체 및 이부프로펜 (5 mg) 용액 처리된 3차원 세포집합체 주입된 동물에서 채취된 혈액에서 시간이 지날수록 건 분화(재생) 마커의 발현양이 증가되는 경향을 보였습니다.
- [0150] 또한, 도 12 및 도 14를 보면 콜라겐 (Hydroxyproline) 양 또한 건 분화(재생) 마커와 같은 결과를 보였다.
- [0151] 특히, 이부프로펜 (1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체 및 이부프로펜 (5 mg) 용액 처리된 3차원 세포집합체 중, 이부프로펜 (5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체가 주입된 래빗에서 건 분화(재생)이 월등히 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0152] 시험예 5.3. 아킬레스/회전근개 건염 동물모델에서의 기계적 특성 측정
- [0153] 콜라게네이즈를 주입하여 준비한 아킬레스 건염 또는 회전근개 건염 동물모델에 상기 control, collagenase, 실험 1군 내지 5군을 각각 주입한 후, 상기 실험군을 주입한지 4주가 지난 후 사멸한 동물의 건 조직의 기계적 강도(Stiffness 및 Tensile strength)를 측정하여 도 15 및 도 16에 나타내었다.
- [0154] 도 15는 아킬레스 건염 동물모델에서 건 조직의 기계적 강도를 측정한 결과이고, 도 16은 회전근개 건염 동물모델에서 건 조직의 기계적 강도를 측정한 결과이다.
- [0155] 도 15 및 도 16을 보면, 이부프로펜 (1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체 및 이부프로펜 (5 mg) 용액 처리된 3차원 세포집합체 주입된 조직에서는 기계적 강도 증가 경향을 보였다.
- [0156] 특히, 이부프로펜 (1 및 5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체 및 이부프로펜 (5 mg) 용액 처리된 3차원 세포집합체 주입된 동물에서 얻은 조직 중, 이부프로펜 (5 mg) 탑재 생분해성 나노입자 함유 3차원 세포집합체 주입된 랫트의 건 조직에서 기계적 강도가 월등히 증가되는 것으로 확인할 수 있었다.
- [0157] 시험예 5.4. 아킬레스/회전근개 건염 동물모델 조직의 조직학적 검사 결과
- [0158] 콜라게네이즈를 주입하여 준비한 아킬레스 건염 동물모델에 상기 control, collagenase, 실험 1군 내지 5군을 각각 주입한 후, 상기 실험군을 주입한지 4주가 지난 후 상기 동물을 치사시킨 다음, 건 조직을 적출하여 10% 포르말린으로 2주 동안 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 절편(5 μ m)을 준비한 뒤, 헤마톡실린&에오신(Hematoxylin & eosin, H&E) 염색법과 트리크롬 (Trichrome, TRI)염색법으로 염색하여 도 17 및 도 18에 나타내었다.
- [0159] 도 17은 상기 동물 조직을 헤마톡실린&에오신 염색법을 이용하여 조직학적으로 검사한 결과를 나타낸 것이고, 도 18은 상기 동물 조직을 트리크롬 염색법을 이용하여 조직학적으로 검사한 결과를 나타낸 것이다.
- [0160] 도 17 및 도 18을 보면, Collagenase 실험군과 나노입자(NPs) 실험군에는 염증 세포가 많은 반면 이부프로펜(5 mg) 탑재 생분해성 나노입자는 정상군에 가깝게 재생된 것을 확인할 수 있었다.

[0161] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도면

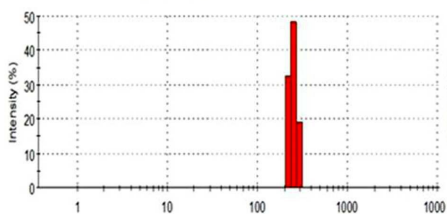
도면1



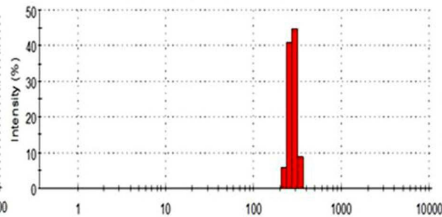
도면2

• DLS Results

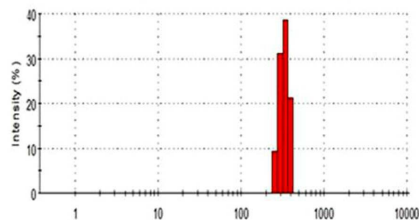
NPs =
 247.7 ± 9.42 nm



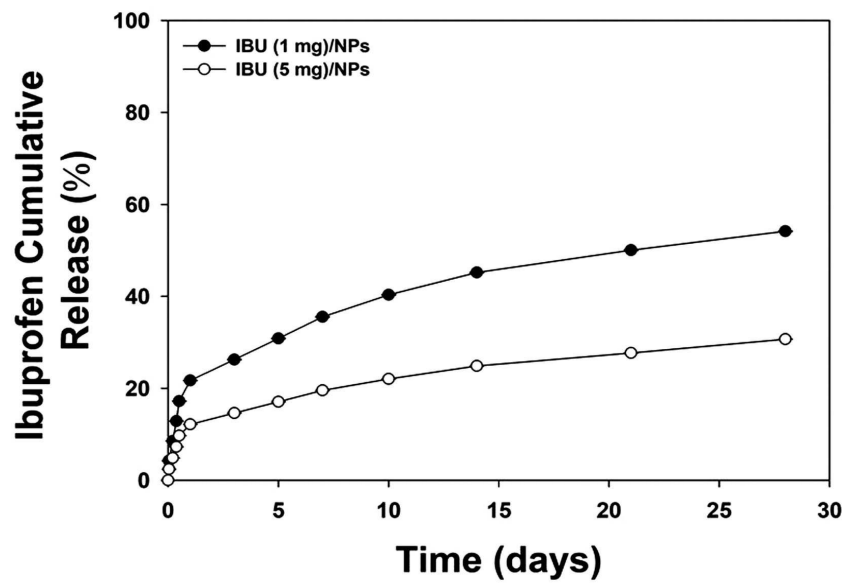
IBU(1 mg)/NPs =
 283.9 ± 11.45 nm



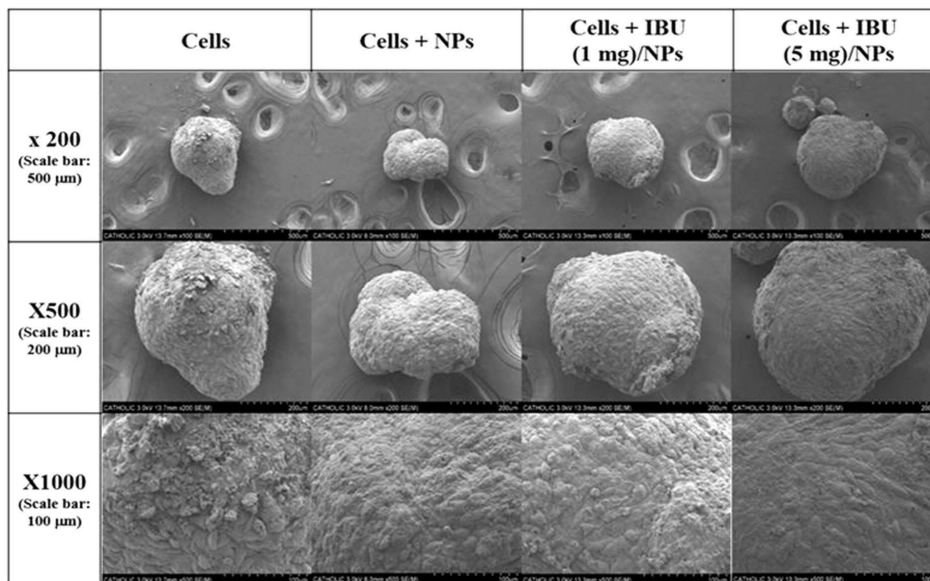
IBU(5 mg)/NPs =
 322.8 ± 8.21 nm



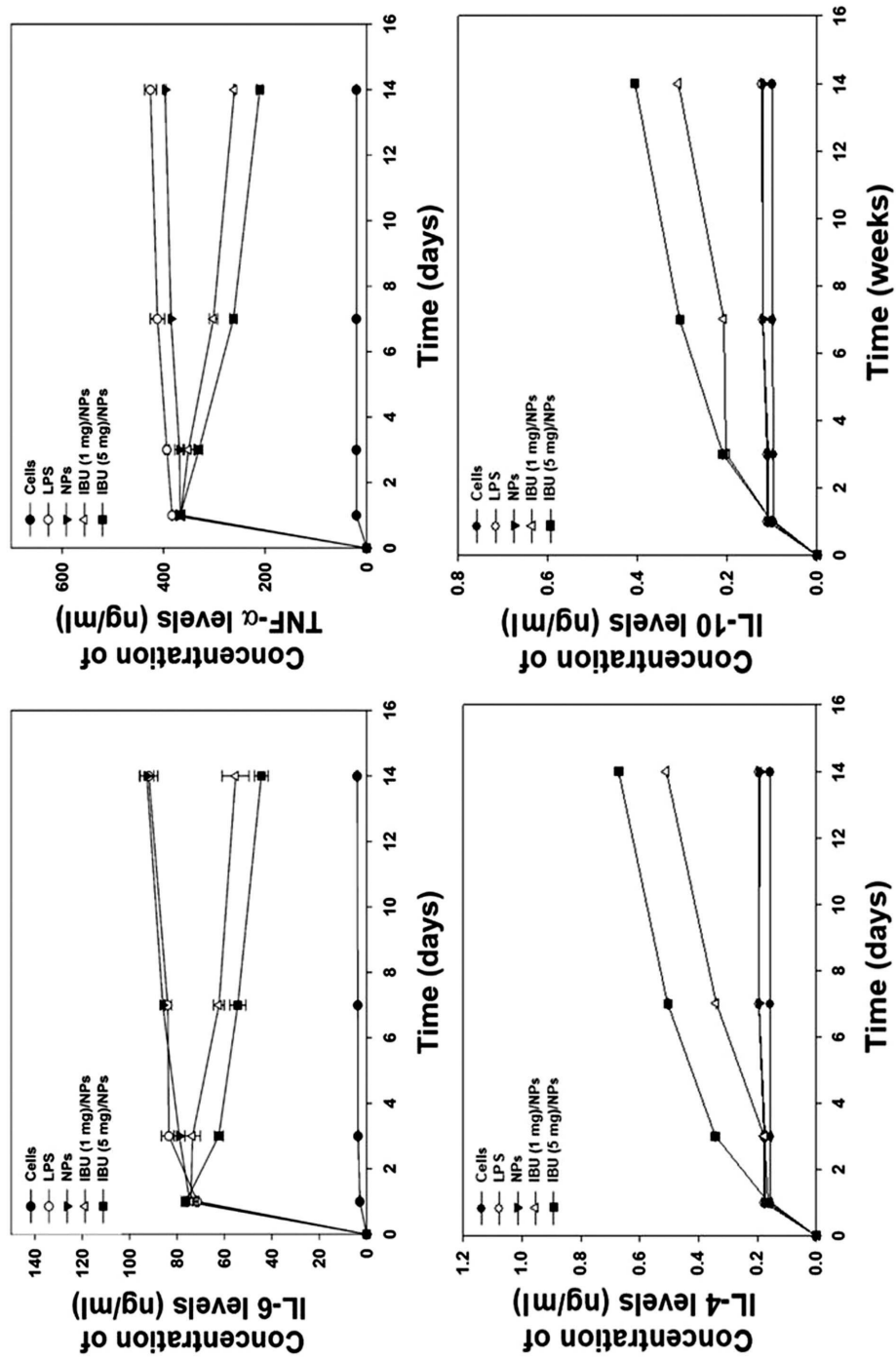
도면3



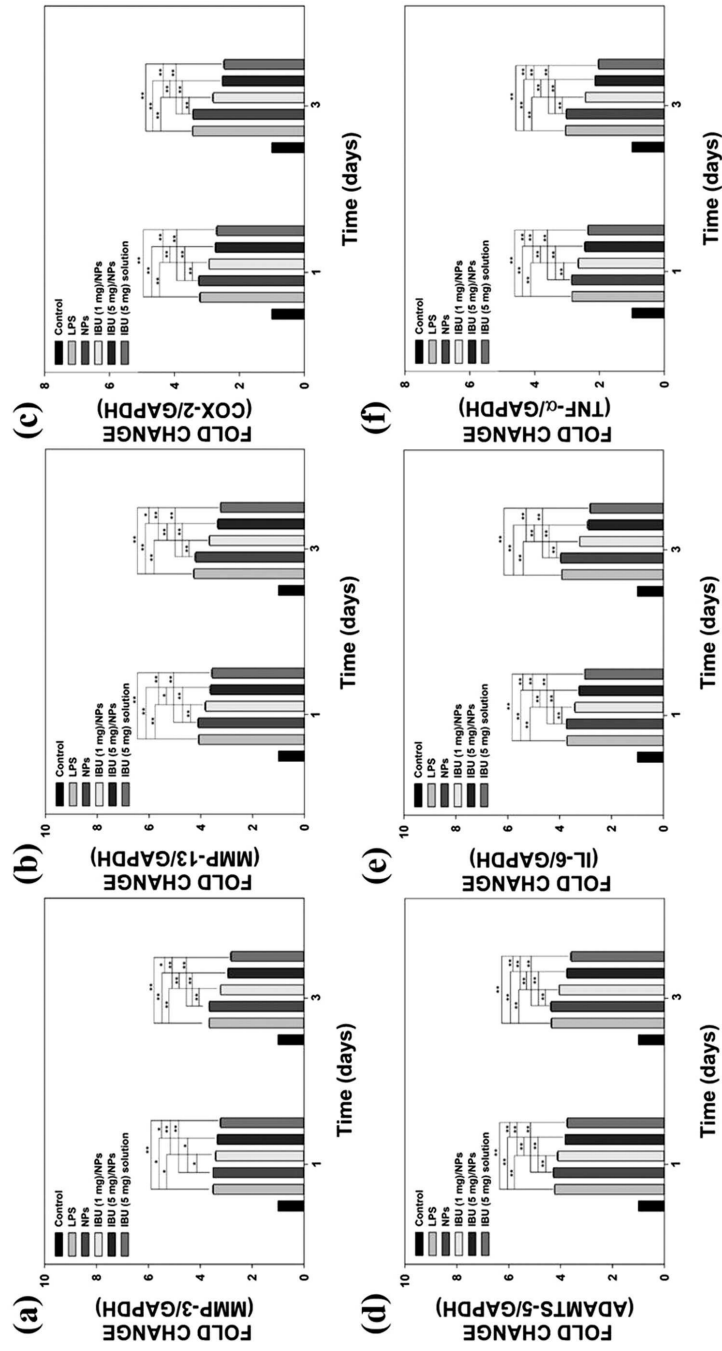
도면4



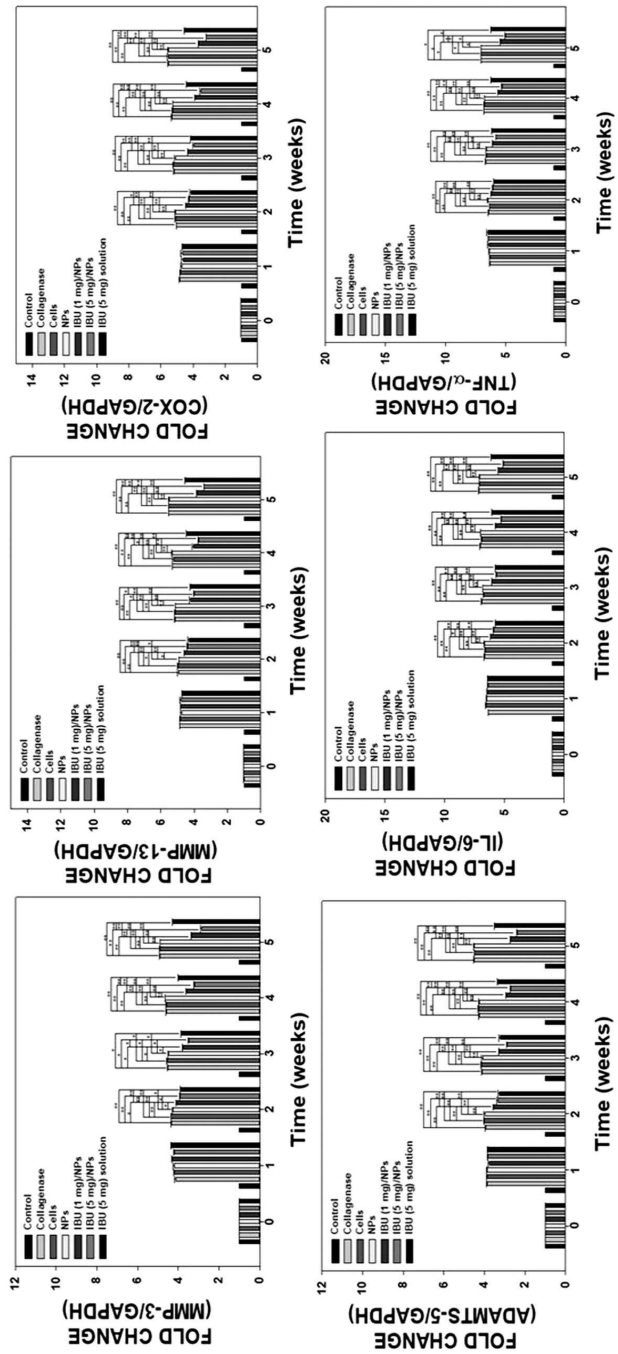
도면5



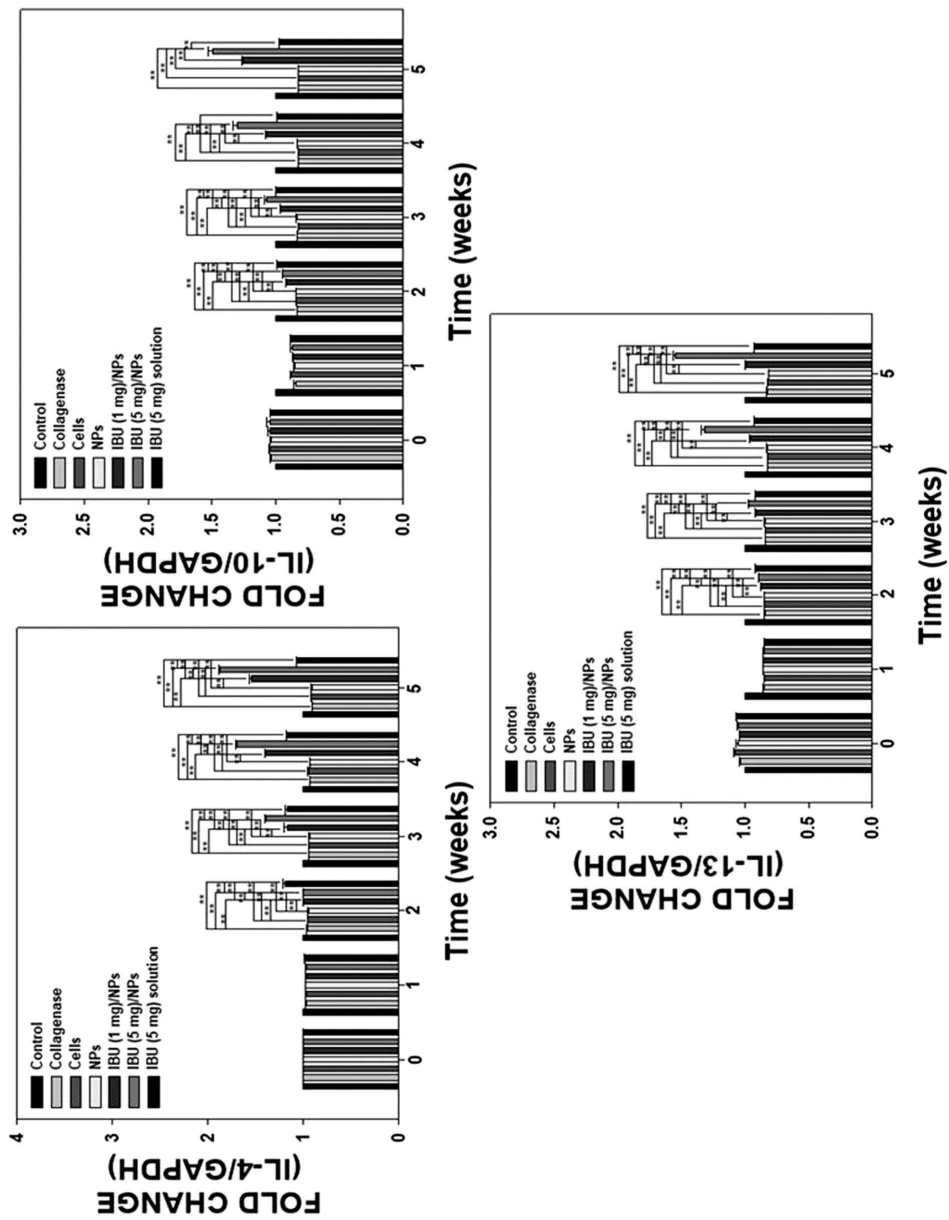
도면6



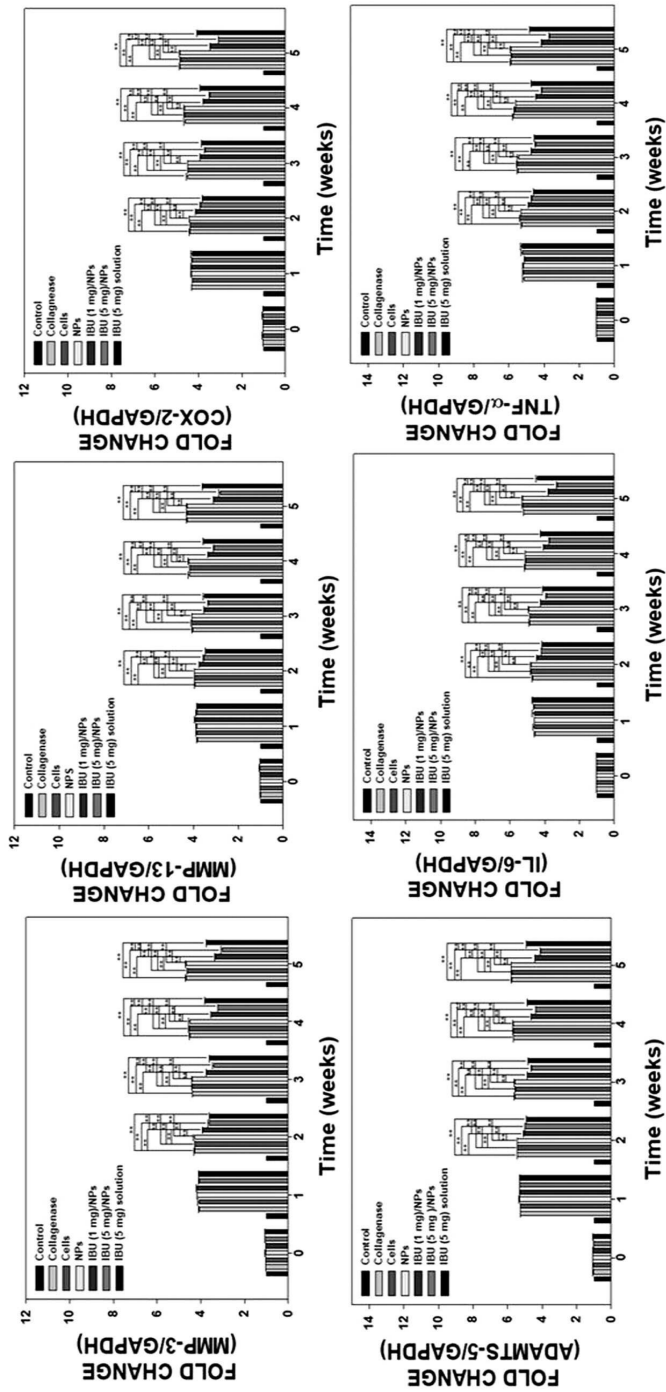
도면7



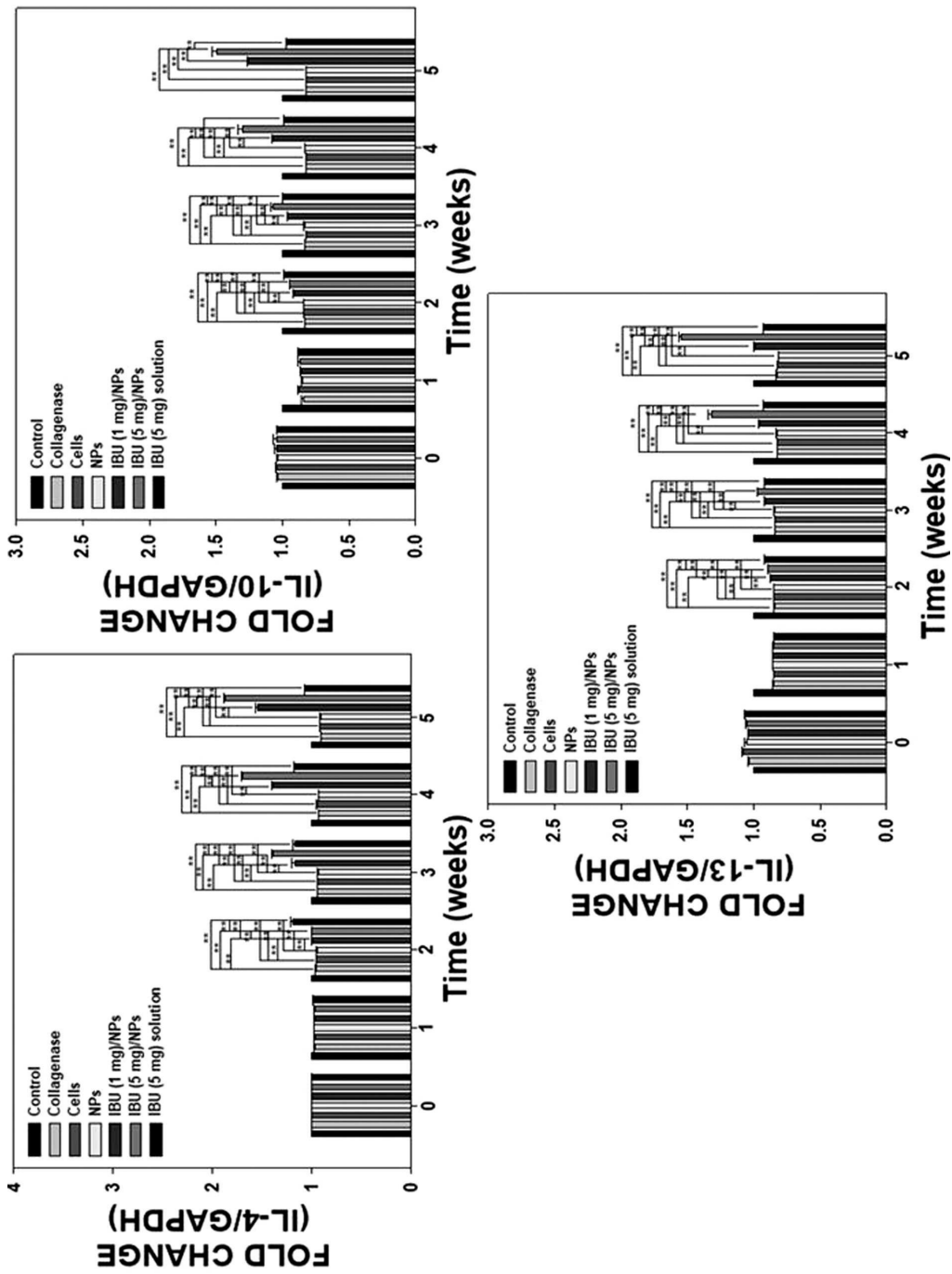
도면8



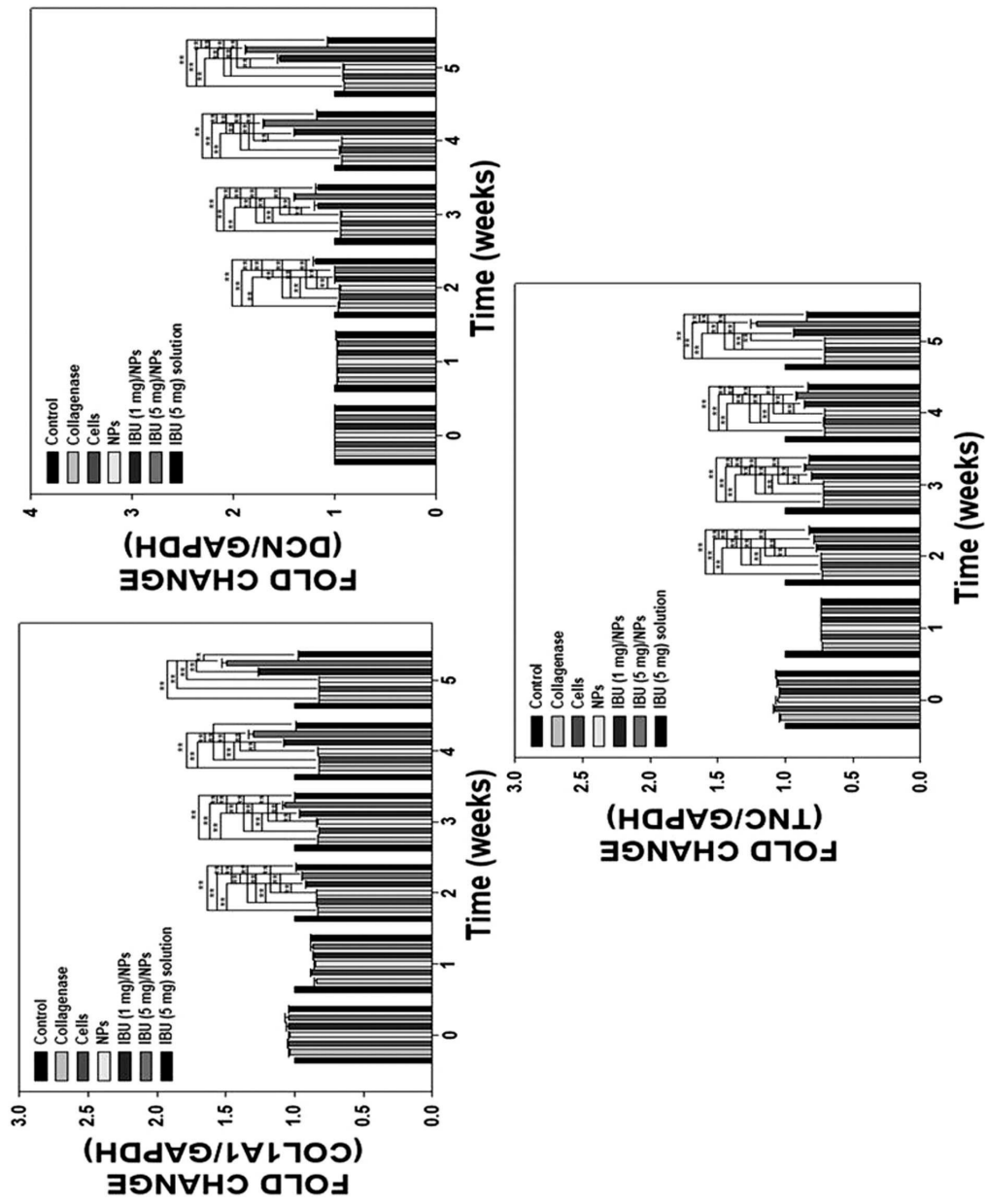
도면9



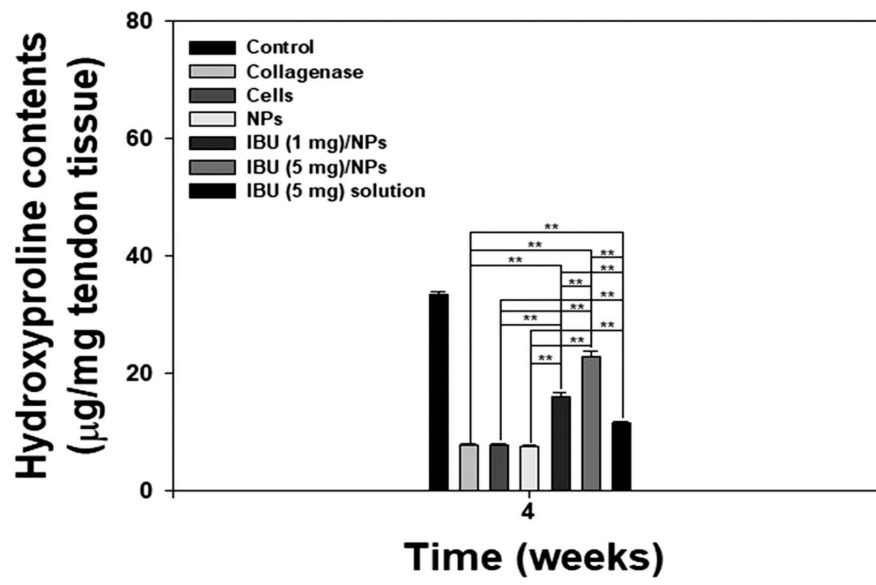
도면10



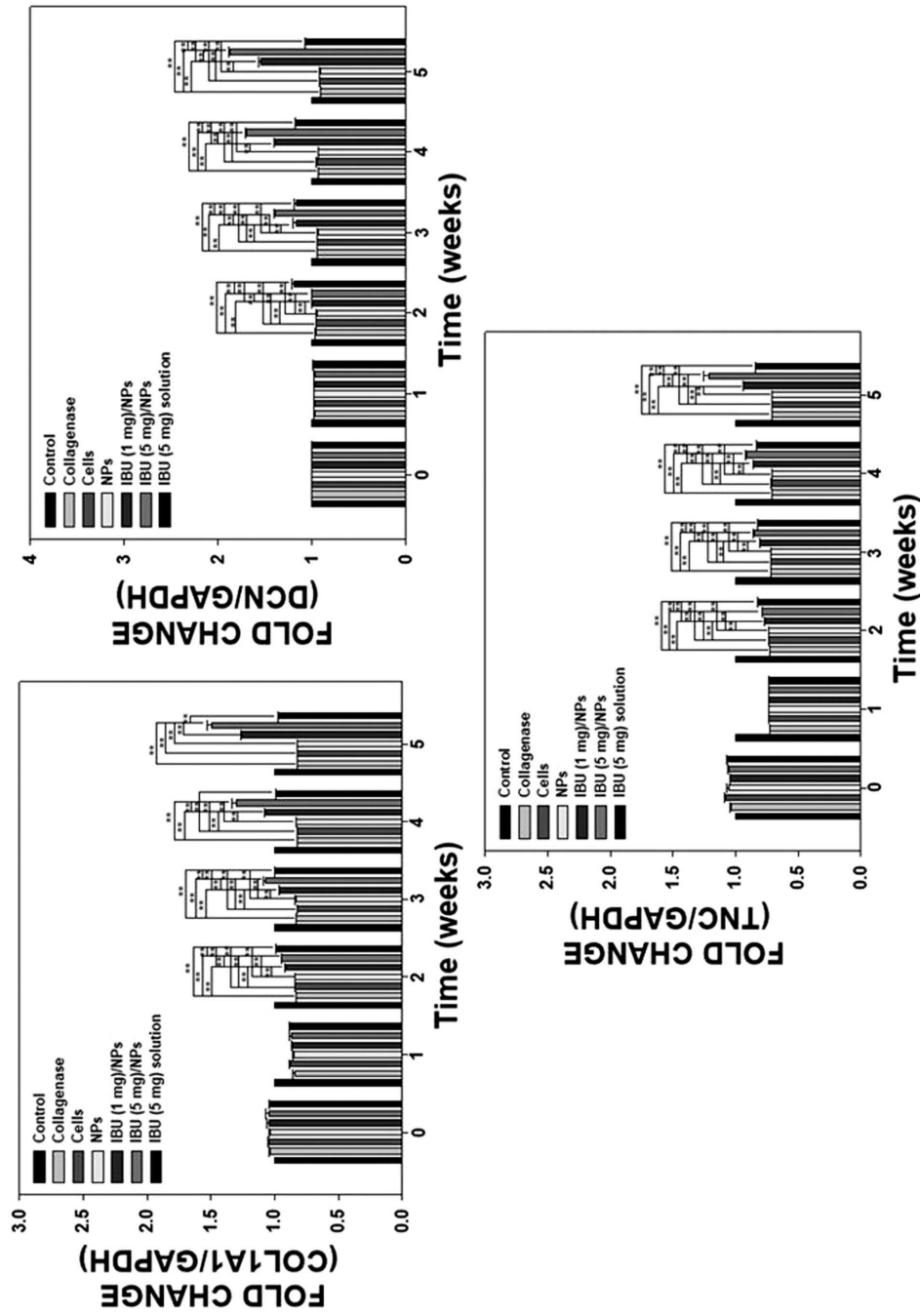
도면11



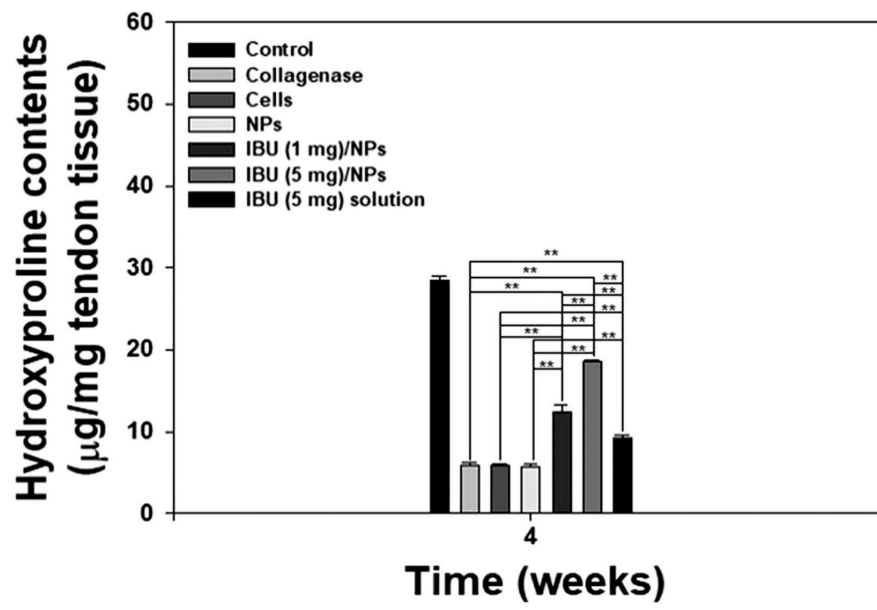
도면12



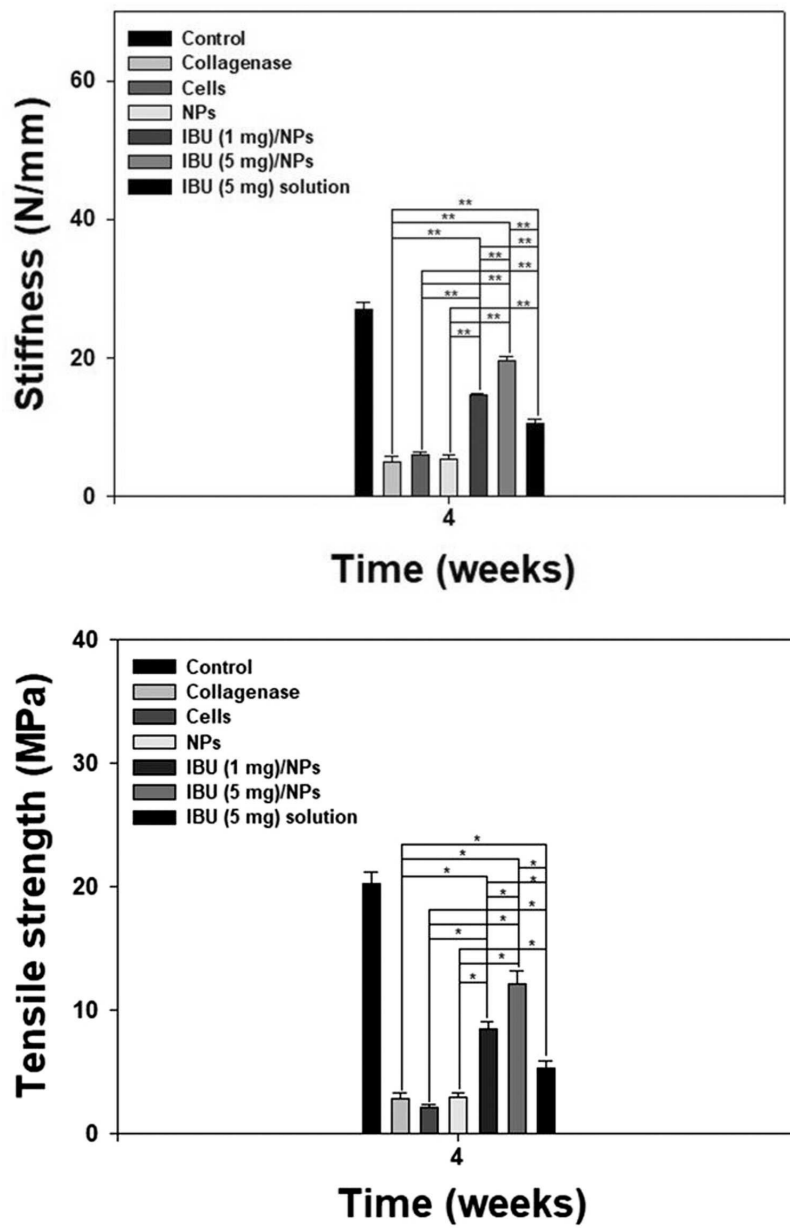
도면13



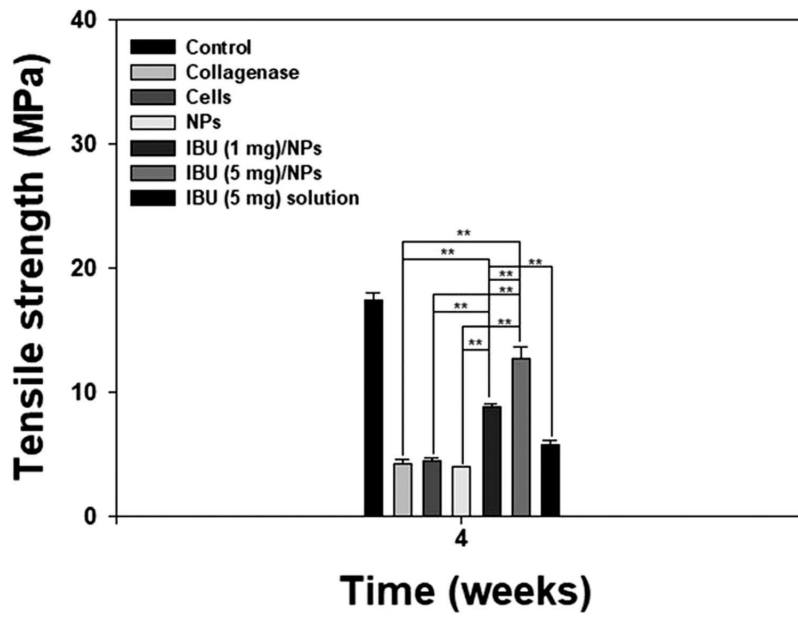
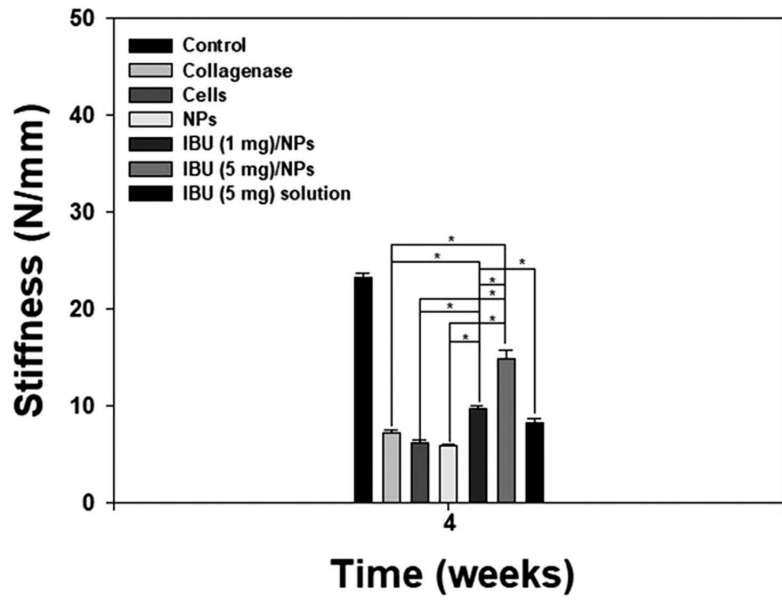
도면14



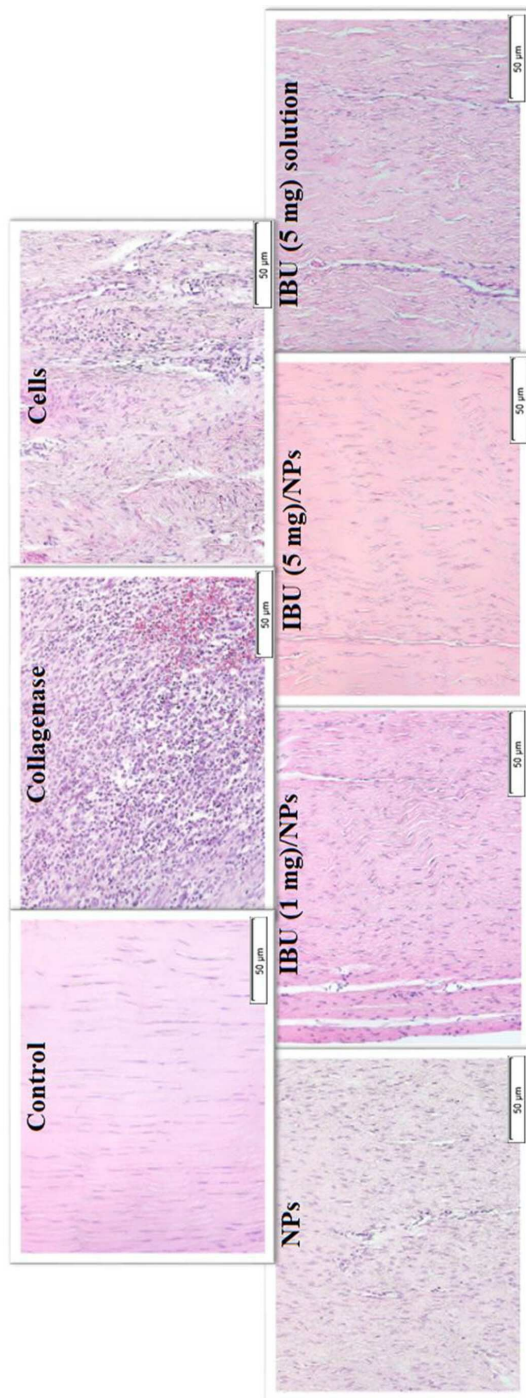
도면15



도면16



도면17



도면18

