

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 5월 22일 (22.05.2020)

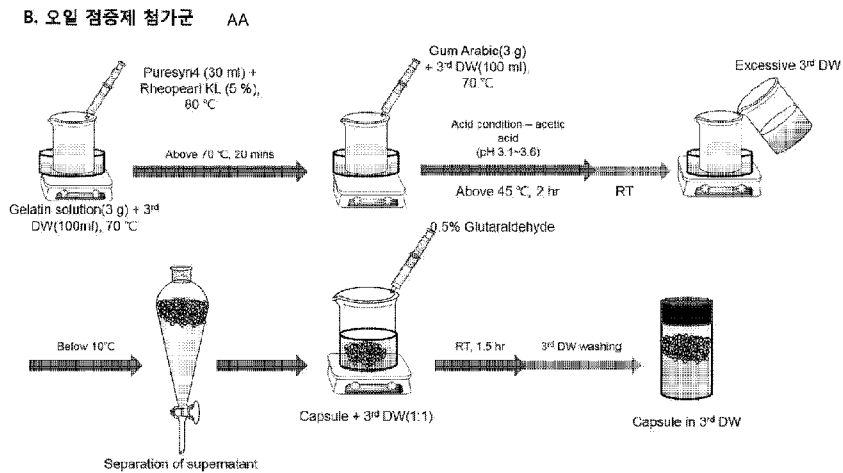


(10) 국제공개번호  
WO 2020/101460 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/095041
- (22) 국제출원일: 2019년 11월 12일 (12.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0139210 2018년 11월 13일 (13.11.2018) KR
- (71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 강선웅 (KANG, Sun Woong); 34087 대전시 유성구 노은서로142번길 67, Daejeon (KR). 심혜은 (SHIM, Hye Eun); 34074 대전시 유성구 지족로190번길 36, 105동 1602호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: CARRIER FOR CELL CULTURE COMPRISING MICROCAPSULES CONTAINING NATURAL OIL

(54) 발명의 명칭: 천연 오일을 함유하는 미세캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어



AA ... Oil thickener-added group

(57) Abstract: The present invention relates to a carrier for cell culture and, more specifically, to a carrier for cell culture and a cell culture medium composition comprising same, the carrier for cell culture comprising microcapsules which contain gelatin, a natural polymer, an oil, and an oil thickener and have improved mechanical properties. The microcapsules containing a natural oil, according to the present invention, have significantly improved mechanical properties and retention. When used as a carrier for cell culture in culturing cells, the microcapsules have the effects of improving adhesion and survival of the cells and inducing maturation of the cultured cells, and thus can be variously employed in cell culture using a carrier, co-culture systems, and the field of artificial cell structure production.



WO 2020/101460 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

---

**(57) 요약서:** 본 발명은 세포 배양용 캐리어에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하며, 기계적 물성이 향상된 미세캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어 및 이를 포함하는 세포 배양 배지 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 천연 오일을 함유하는 미세캡슐은 기계적 물성 및 유지도가 현저히 증가된 것이다. 상기 미세캡슐을 세포 배양용 캐리어로 사용하여 세포를 배양하는 경우 세포의 부착 및 생존을 향상시키며, 배양된 세포의 성숙화를 유도하는 효과를 가지고 있는바, 캐리어를 이용한 세포 배양, 공배양 시스템 및 인공 세포 구조체 제작 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 천연 오일을 함유하는 미세캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 세포 배양용 캐리어에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하며, 기계적 물성이 향상된 미세캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어 및 이를 포함하는 세포 배양 배지 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 젤라틴은 자연적으로 존재하지 않지만, 생물의 조직에 존재하는 단백질인 콜라겐을 가수분해시킴으로써 얻어지는 물질이다. 무색에 가까우며 맛이나 향이 거의 없고, 각종 식품첨가제로 다양하게 쓰인다. 분자량은 35,000~40,000 정도이며 글리신, 프롤린, 하이드록시프롤린, 글루탐산 등이 주성분이다. 생체적합성이 뛰어난 바이오 소재로 독성이 없고, 체내에서 생분해되며, 항체유도가 잘 안 되는 천연 고분자이다. 인공피부, 콘택트렌즈, 약물전달체 등 다양한 목적으로 쓰이고 있으며 그 밖의 다양한 분야에 응용이 가능한 재료이다. 또한 젤라틴은 대표적인 열 가역성 겔로 특정 온도 이상에서는 졸 상태로 존재하나 그 이하에서는 겔 형태가 된다. 특별한 가교제 없이도 물리적 겔을 형성할 수 있으나 일반적인 하이드로 겔과 마찬가지로 강도가 약한 것이 문제이다. 저온에 의해서 형성된 젤라틴 겔은 물리적 겔로, 약한 결합에 의해 만들어진 것이다. 강도를 보완하기 위해서, 가교제를 이용하는데 젤라틴의 화학적 가교에는 단백질의 아민 그룹이 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [3] 한편, 미세캡슐은 그 크기가 수  $\mu\text{m}$  내지 수백  $\mu\text{m}$ 이며, 내부(core)를 형성하는 액체상 또는 고체상의 물질을 외부(wall)를 형성하는 고분자 물질 등으로 둘러싼 초 미세입자를 의미한다. 이러한 미세캡슐은, 외부의 환경(예를 들어, 산소 또는 수분)에 대하여 코어 물질의 변성을 방지하거나, 서방형 약물 또는 방향제와 같이 물질의 전달 속도를 일정하게 유지하거나, 코어로 사용하는 재료를 액체 상태에서 고체 형태로 변환하는 데에 활용될 수 있다. 미세캡슐은 의약품, 도료, 전자산업 및 화장품 등 다양한 분야에서 사용되는 기반기술로서, 특히 의약품 및 화장품에 사용될 경우에는 약물의 초기 역가를 유지하는 가장 좋은 도구로서 사용되고 있다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [4] 이에 본 발명자들은 기계적 물성이 현저히 향상된 천연 오일을 함유하는 미세캡슐을 개발하고, 이의 용도를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [5] 따라서 본 발명의 목적은, 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를

함유하는 미세캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어 및 이를 포함하는 세포 배양 배지 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 미세캡슐을 포함하는, 세포 배양용 캐리어를 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 세포 배양용 캐리어를 포함하는, 세포 배양 배지 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [8] 본 발명에 따른 천연 오일을 함유하는 미세캡슐은 기계적 물성 및 유지도가 현저히 증가된 것이다. 상기 미세캡슐을 세포 배양용 캐리어로 사용하여 세포를 배양하는 경우 세포의 부착 및 생존을 향상시키며, 배양된 세포의 성숙화를 유도하는 효과를 가지고 있는바, 캐리어를 이용한 세포 배양, 공배양 시스템 및 인공 세포 구조체 제작 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 제조방법을 도식화한 것이다(A: 오일 점증제 무첨가시, B: 오일 점증제 첨가시).
- [10] 도 2는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [11] 도 3 및 4는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양하고, 배양된 세포를 광학현미경, 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.
- [12] 도 5는 생존/사멸 분석을 통해 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 공배양된 심근세포의 세포생존률을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [13] 도 6은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 중간엽 줄기세포로부터 분화된 심근세포를 공배양하고, 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.
- [14] 도 7은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 Hela 세포를 공배양하고, 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.
- [15] 도 8은 종래 방법으로 심근세포를 배양한 결과를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- [16] 도 9는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양한 결과를 투과전자 현미경(TEM) 및 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.
- [17] 도 10은 오일 점증제 첨가 여부에 따른 본 발명의 젤라틴 오일 캡슐의 유지도를 비교한 결과를 나타내는 도이다.
- [18] 도 11 및 도 12는 본 발명에 따른 인공 심근 구조체의 심박동수 및 박동 간격 확인 결과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 13 및 14는 본 발명에 따른 인공 심근 구조체의 기능을 검증한 결과를 나타내는 도이다.

[20] 도 15는 본 발명에 따른 인공 심근 구조체를 이용한 수축력 기반의 심장 독성 평가 결과를 나타낸 도이다.

[21] 도 16은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 다양한 세포를 공배양한 결과를 나타낸 결과를 나타낸 도이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

[22] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[23] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 미세캡슐을 포함하는, 세포 배양용 캐리어를 제공한다.

[24] 본 발명에 있어서, “캐리어”는 부착 의존성 세포의 부착 및 성장에 유용한 입자를 의미하며, 상기 캐리어는 현탁 배양에 사용하기에 충분히 작은 크기인 약 10 내지 800  $\mu\text{m}$ 일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[25] 본 발명에 있어서, “천연 고분자”는 천연에 존재하거나 생물에 의하여 생산되는 고분자 물질을 의미하며 미세캡슐 내 오일의 산화방지 및 안정화시키는 역할을 한다.

[26] 상기 천연 고분자의 예로는, 아라비아 검, 히알루론산, 구아검, 펙틴, 잔탄검, 로커스트빈 검, 타마린드 검, 트라가칸트 검, 가티 검, 메뚜기콩 검, 곤약 검, 아가, 카라기난, 펄셀라란 및 젤란 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27] 본 발명의 일 구체예에서, 젤라틴 및 천연 고분자는 1:0.1 내지 1의 중량비로 혼합되는 것이 바람직하다.

[28] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면 상기 천연 고분자는 아라비아 검인 것이 바람직하고, 아라비아 검 및 히알루론산의 혼합물인 것이 더 바람직하며, 상기 아라비아 검 및 히알루론산의 혼합물은 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합되는 것이 더욱 바람직하다.

[29] 본 발명에 있어서, 오일은 올리브유, 동백유, 피마자유, 야자유, 호호바유, 아몬드 오일, 포도씨오일, 허브 오일, 장미 오일, 코코넛 오일, 모링가 오일, 쌀겨 오일, 살구씨 오일, 해바라기 오일, 메도폼시드 오일, 아비시니안 오일 및 스쿠알란으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 오일은 스쿠알란인 것이 바람직하다. 상기 스쿠알란은 식물성 스쿠알란일 수 있다.

[30] 본 발명에 있어서, “식물성 스쿠알란”은 동물성 스쿠알란을 대신하는 천연 스쿠알란으로, 식물성 유지에서 추출된 스쿠알란에 수소를 첨가하여 제조된다. 식물성 스쿠알란은 수분의 증발을 방지하는 기능이 있으며, 이를 첨가하여 제조된 미세캡슐은 캡슐의 수분이 오랫동안 유지되는 장점을 가진다.

[31] 본 발명에 있어서, “점증제”는 용액의 점도를 증가시키는 물질로서, 점증제 또는 증점 안정제라고 불린다. 또한, 용액에 점증제를 첨가한 경우 끈적거리는 것으로 보이므로, 마치 농축된 것과 같아서 농화제라 표기하는 경우도 있다. 본 발명에서는 상기 점증제를 미세캡슐 내부에 포함된 오일의 점도를 향상시키기

- 위하여 사용하였다.
- [32] 본 발명의 구체예에서, 오일 점증제는 벤톤 겔(Bentone gel), 하이드로제네이티드폴리이소부텐(Hydrogenated Polyisobutene), 덱스트린 팔미테이트/에틸헥사노에이트 및 덱스트린 팔미테이트(dextrin palmitate)로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 덱스트린 팔미테이트인 것이 바람직하다. 상기 오일 점증제는 시판중인 벤톤 겔, 버사겔 ME750(Versagel ME750), 레오펠 TT(Rheopearl TT) 및 레오펠 KL(Rheopearl KL)로부터 선택된 1종 이상일 수도 있다.
- [33] 본 발명에 있어서 상기 오일 점증제는 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 10 중량%로 포함될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4 내지 6 중량%, 가장 바람직하게는 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 미세캡슐은 도 1의 B에 나타낸 제조방법으로 제조되는 것이 바람직하다. 구체적으로, 상기 미세캡슐은 (a) 젤라틴, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 젤라틴 용액을 제조하는 단계; (b) 천연 고분자 용액을 제조하는 단계; (c) 상기 젤라틴 용액 및 천연 고분자 용액을 혼합하는 단계; (d) 단계 (c)에서 제조된 혼합물의 pH를 조절하는 단계; 및 (e) pH가 조절된 혼합물을 냉각시키는 단계를 포함한다.
- [35] 상기 단계 (a)의 오일 점증제는 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 10 중량%로 포함될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4 내지 6 중량%, 가장 바람직하게는 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 상기 단계 (b)의 천연 고분자 용액은 아라비아 검 및 히알루론산이 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합된 혼합물인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 상기 단계 (d)에서 젤라틴 용액 및 천연 고분자 용액 혼합물의 pH를 3.1 내지 3.6으로 조절하는 것이 바람직하다.
- [38] 또한 상기 단계 (e)는 pH가 조절된 혼합물에 대하여 3 내지 5배에 달하는 증류수를 첨가한 후 교반하여 5 내지 15°C 가 되도록 냉각시키는 것이 바람직하다.
- [39] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 세포는 부착 의존성 세포인 것이 바람직하며, 심근세포, 혈관내피세포, 지방세포, 상피세포, 섬유아세포, 골아세포, 연골세포, 간세포, 자궁경부세포, 암 세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것이 더 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 지방, 제대혈, 양수 또는 양막 유래일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 상기 암 세포는 모든 종류의 암 유래 세포를 의미하는 것으로, 예를 들어, 상기 암은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 간암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암,

나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 뇌암 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[42] 본 발명에 따른 세포 배양용 캐리어는 세포의 부착 및 생존을 향상시키며, 배양된 세포의 성숙화를 유도할 수 있는 우수한 효과를 가지고 있다.

[43]

[44] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 세포 배양용 캐리어를 포함하는 세포 배양 배지 조성물을 제공한다.

[45] 본 발명에 있어서, “세포 배양”은 생물체의 조직으로부터 분리된 세포를 배양하는 것을 의미하며, 세포의 종류에 따라 배지의 종류, 온도 조건, 배양액 등은 공지된 바의 방법을 따른다.

[46] 본 발명의 젤라틴 오일 캡슐을 포함하는 세포 배양용 캐리어를 이용하여 세포를 배양하는 경우 세포의 부착 및 생존을 향상시키며, 배양된 세포의 성숙화를 유도하는 효과가 있다.

[47] 본 발명에 있어서, “배양 배지(culture media)”는 체외배양 조건에서 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium; CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, MEM(Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 반드시 이들로 제한되는 것은 아니다.

[48] 본 발명에 따른 세포 배양 배지 조성물은 세포 배양 시 단독으로, 또는 시판중인 세포 배양 배지에 첨가물의 형태로 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[49]

[50] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[51]

[52] **실시예 1. 젤라틴 오일 캡슐 제조**

[53] **1-1. 실험군 1**

[54] 도 1에 나타낸 바와 같은 방법으로, 젤라틴, 천연고분자 및 오일을 포함하는 미세캡슐을 제조하였다.

[55] 구체적으로, 젤라틴 용액은 젤라틴(pig, 300bloom, type A) 1.5g 및 3차 증류수 50ml를 혼합한 후 상기 혼합물을 70°C로 가열하여 젤라틴을 완전히 용해시켜 제조하였다. 천연 고분자 용액은 아라비아 검 1.5g 및 3차 증류수 50ml을 혼합한 후, 상기 혼합물을 70°C로 유지하여 아라비아 검을 완전히 용해시켜 제조하였다. 상기 젤라틴 용액에 오일로서 스쿠알란(hydrogenated poly 1-decen, puresyn4) 24g을 첨가하고, 교반기를 이용하여 40°C 이상에서 100 내지 150rpm으로 5분 동안 교반하였다. 교반된 젤라틴 용액에 상기 천연 고분자 용액을 첨가한 후 산용액(아세트산 또는 염산)으로 pH3.1 내지 3.6으로 조절하였다. 즉, 젤라틴 및 아라비아 검은 1:1 중량비로 혼합하였다. pH가 조절된 용액은 35°C 이상에서 1시간 동안 교반하였으며, 그 후 천천히 온도를 낮추어 25°C가 되도록 냉각시켰다. 추가적으로, 냉각된 용액의 4배에 달하는 양의 물을 첨가한 후 교반하여 10°C 이하로 냉각시켰다. 냉각된 용액을 분별깔대기로 옮긴 후 상층의 젤라틴 오일 캡슐을 분리하였다. 분리된 젤라틴 오일 캡슐에 0.5% 글루타알데하이드 수용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. 젤라틴 오일 캡슐이 포함된 교반물을 분별깔대기로 옮긴 후 3차 증류수로 6회 세척하였다. 완성된 젤라틴 오일 캡슐(젤라틴:아라비아검:히알루론산= 1 : 1 : 0, 실험군 1)은 3차 증류수에 넣어서 보관하였다.

[56]

[57] **1-2. 실험군 2 내지 4**

[58] 젤라틴, 아라비아 검 및 히알루론산을 혼합하여 젤라틴 오일 캡슐을 제조하였다. 보다 상세하게는, 실험군 2 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 제조하되, 아라비아 검 및 히알루론산을 표 1의 중량비로 혼합하여 제조한 천연 고분자 용액을 사용하였다.

[59] [표1]

	실험군 1	실험군 2	실험군 3	실험군 4
젤라틴	1	1	1	1
아라비아 검	1	0.9	0.5	0.1
히알루론산	0	0.1	0.5	0.9

[60]

[61] **1-3. 실험군 5 내지 11**

[62] 오일 점증제를 첨가하여 젤라틴 오일 캡슐을 제조하였으며, 오일 점증제의 종류 및 농도는 표 2에 나타내었다.

[63]

[표2]

	오일 점증제의 종류	농도(%)	온도(°C)
실험군 5	벤톤 겔(Bentone gel)	10	80
실험군 6	버사겔 ME750(Versagel ME750)	10	80
실험군 7	레오펠 TT(Rheopearl TT)	10	80
실험군 8	레오펠 KL(Rheopearl KL)	10	80
실험군 9		7	80
실험군 10		5	80
실험군 11		2	80

[64] 구체적으로, 젤라틴 용액은 젤라틴(pig, 300bloom, type A) 3g 및 3차 증류수 100ml를 혼합한 후 상기 혼합물을 70°C로 가열하여 젤라틴을 완전히 용해시켜 제조하였다. 천연 고분자 용액은 아라비아 검 3g 및 3차 증류수 100ml을 혼합한 후, 상기 혼합물을 70°C로 유지하여 아라비아 검을 완전히 용해시켜 제조하였다. 상기 젤라틴 용액에 오일로서 스쿠알란(hydrogenated poly 1-decene, puresyn4) 24.54g과 함께 각 실험군에 해당하는 오일 점증제를 표 2에 개시된 중량%(농도)의 양으로 첨가하고, 교반기를 이용하여 45°C 이상에서 100 내지 150rpm으로 5분 동안 교반하였다. 교반된 젤라틴 용액에 상기 천연 고분자 용액을 첨가한 후 산 용액(아세트산 또는 염산)으로 pH3.1 내지 3.6으로 조절하였다. pH가 조절된 용액은 35°C 이상에서 1시간 동안 교반하였으며, 그 후 천천히 온도를 낮추어 25°C가 되도록 냉각시켰다. 추가적으로, 냉각된 용액의 4배에 달하는 양의 물을 첨가한 후 교반하여 10°C 이하로 냉각시켰다. 냉각된 용액을 분별깔대기로 옮긴 후 상층의 젤라틴 오일 캡슐을 분리하였다. 분리된 젤라틴 오일 캡슐에 0.5% 글루타알데하이드 수용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. 젤라틴 오일 캡슐이 포함된 교반물을 분별깔대기로 옮긴 후 3차 증류수로 6회 세척하였다. 완성된 젤라틴 오일 캡슐은 3차 증류수에 넣어서 보관하였다.

[65]

[66] 실시예 2. 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수 측정

[67] 실험군 1 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수를 측정하였다. 구체적으로, 젤라틴 오일 캡슐을 1000 $\mu$ m의 간격을 두고 반경 20mm의 두 평판 사이에 배치하였다. 상기 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수는 상온에서 스트레인(strain)을 0.01로 고정하였으며, 0.01 - 5Hz 범위에서 rotating theometer(TA Instruments. AR 1500ex)를 이용하여 분석하였다. 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수를 특정한 결과는 도 2에 나타내었다.

- [68] 도 2에 나타낸 바와 같이, 젤라틴 오일 캡슐 제조 시, 아라비아 검의 일부를 히알루론산으로 대체하는 경우 젤라틴 오일 캡슐의 탄성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 아라비아 검 및 히알루론산을 1:1 중량비로 혼합한 실험군 3 및 1:9 중량비로 혼합한 실험군 4의 탄성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.
- [69]
- [70] **실시예 3. 젤라틴 오일 캡슐 및 심근세포 공배양**
- [71] 실시예 1에서 제조된 실험군 4의 젤라틴 오일 캡슐과 사람유래 심근세포(iCell Cardiomyocytes, CMC-100-010-001, USA, Cellular Dynamics International)를 공배양하였다. 구체적으로, 젤라틴 오일 캡슐을 세포배양체로 사용하기 위하여, 상기 캡슐을 PBS에 담근 후 5분 동안 교반하였다. 교반을 종료한 후 PBS를 교체하여 추가 교반하였으며, 이 과정을 2 내지 3회 반복하였다. 교반 종료 후 PBS를 제거한 후 플레이팅 배지(Plating Medium: Plating Medium 50%, FBS(Hyclone, SH30919.03, USA) 10%)에 젤라틴 오일 캡슐을 옮겨 24시간 동안 4°C에서 저장하였다.
- [72] 공배양을 위하여, 심근세포를 트립신으로 처리하여 단일세포로 부유시켰다. 혈청이 함유된 배지로 트립신을 불활성화 시킨 후 원심분리하여 심근세포를 수득하였다. 수득한 세포는 새 배지를 첨가하여 재부유시킨 후 계수하였다. 계수된 세포는 200 $\mu$ l의 배지에 고농도로 포함되도록 준비하였다. 15ml 코니칼 튜브에 세포배양체인 젤라틴 오일 캡슐을 옮기고, 세포배양체를 적실 정도의 배양배지를 첨가하였다. 세포배양체 및 배지가 함유된 코니칼 튜브에 준비된 심근세포를 접종한 후 배양하였다. 상기 배양은 온도 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 하룻밤(overnight) 동안 수행하였으며, 가라앉은 세포가 다시 부유될 수 있도록 15 내지 30분 간격으로 수차례 툭툭 두들겨(tap) 주었다. 배양이 완료된 심근세포-세포배양체를 세포 부착력이 낮은 배양 용기에 옮겨 광학현미경, 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. 실험군 2 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐도 상기와 같은 방법으로 심근세포-세포배양체를 관찰하였다. 심근세포-세포배양체 관찰 결과는 도 3 및 4에 나타내었다.
- [73] 도 3에 나타낸 바와 같이, 실험군 1 내지 4의 세포배양체인 젤라틴 오일 캡슐을 중심으로 심근세포가 밀집되는 것을 확인하였다. 반면에, 세포배양체를 사용하지 않은 대조군은 세포가 플레이트에 산재해있는 것을 관찰하였다.
- [74] 도 4에 나타낸 바와 같이, 실험군 1 내지 4의 세포배양체에 심근세포가 부착되었으며, 배양된 세포가 구체(sphere)를 형성한 것을 확인하였다. 특히, 세포배양체 제조 시 젤라틴, 아라비아 검 및 히알루론산을 사용한 실험군 2 내지 4의 심근세포가 성숙근세포와 유사한 형태를 나타낸다는 것을 확인하였다.
- [75]
- [76] **실시예 4. 공배양된 심근세포의 세포생존률 분석**
- [77] 실시예 1에서 제조된 실험군 4를 이용하여 공배양된 심근세포의 생존율을

확인하기 위해 배양 4일 차부터 일주일 간격으로 최대 42일 차까지 배양한 후 생존/사멸 분석(Live-dead assay)(abcam, ab65470)을 통해 확인하였다. 생존/사멸 분석은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[78] 도 5에 나타낸 바와 같이, 초록색 형광은 살아있는 세포, 붉은색 형광은 죽은 세포를 의미하는데, 접종 세포 수 또는 배양 기간에 상관없이 대부분의 세포가 살아있음을 확인하였다.

[79]

[80] 실시예 5. 젤라틴 오일 캡슐 및 중간엽 줄기세포로부터 분화된 심근세포 공배양

[81] 실시예 1에서 제조된 실험군 10의 오일점증제를 포함하는 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포(FUJIFLIM, Cellular Dynamics, iCell Cardiomyocytes)를 공배양하였다. 구체적으로, 젤라틴 오일 캡슐을 세포배양체로 사용하기 위하여, 상기 캡슐을 PBS에 담근 후 5분 동안 교반하였다. 교반을 종료한 후 PBS를 교체하여 추가 교반하였으며, 이 과정을 2 내지 3회 반복하였다. 교반 종료 후 PBS를 제거한 후 플레이팅 배지(Plating Medium: Plating Medium 50%, FBS(Hyclone, SH30919.03, USA) 10%)에 젤라틴 오일 캡슐을 옮겨 24시간 동안 4°C에서 저장하였다.

[82] 상기 세포배양체 및 배지가 함유된 코니칼 튜브에 심근세포를 접종한 후 배양하였다. 상기 배양은 온도 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 하룻밤(overnight) 동안 수행하였다. 접종된 세포가 세포배양체 표면에 골고루 도포되었는지 확인하기 위하여 DiI 및 DiD로 심근세포를 염색하고 2번에 걸쳐 시딩한 후, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[83] 도 6에 나타낸 바와 같이, 실험군 10의 오일점증제로 레오펠 KL(텍스트린 팔미테이트)이 포함된 젤라틴 오일 캡슐에 심근세포가 빈 부분 없이 모든 표면에 골고루 잘 부착됨을 확인하였다.

[84]

[85] 실시예 6. 젤라틴 오일 캡슐 및 자궁 경부암 세포 공배양

[86] 실시예 1에서 제조된 실험군 10의 오일점증제를 포함하는 젤라틴 오일 캡슐과 Hela 세포(ATCC)를 공배양하였다. 실험 과정은 실시예 3과 동일하게 진행하였다. 세포 부착 2일 후, 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[87] 도 7에 나타낸 바와 같이, 실험군 10의 오일점증제로 레오펠 KL이 포함된 젤라틴 오일 캡슐에 Hela 세포가 정상적으로 부착됨을 확인하였다.

[88] 이상의 실험을 통해 본 발명에 따른 오일점증제가 포함된 젤라틴 오일 캡슐은 다양한 세포의 배양을 위한 캐리어로 활용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[89]

[90] 실시예 7. 투과전자현미경을 이용한 공배양된 심근세포 관찰

[91] 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 실시예 1에서 제조된 실험군 4로 공배양된 심근세포를 관찰하였다. 구체적으로, 실험군은 실시예 3-1와 동일한 방법으로 심근세포를 공배양하여 준비하였으며, 대조군은 종래 알려진 방법으로

심근세포를 배양하였다. 배양된 심근세포를 투과전자현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 8 및 9에 나타내었다.

[92] 도 8 및 9에 나타낸 바와 같이, 대조군은 미성숙 심근세포가 다수 관찰되었다. 반면에 실험군은 성숙된 세포가 다수 관찰되었으며, 배양된 세포가 구체(sphere)를 형성하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 젤라틴 오일 캡슐을 세포배양체로 이용하는 것이 구체를 형성하는 것뿐만 아니라, 심근세포가 성숙되는 것을 확인하였는바, 구형의 심근세포는 인공 심근 구조체로 이용될 수 있다.

[93]

[94] 다음으로 공배양된 심근세포의 세포내 소기관의 성숙 정도를 확인하기 위하여, 투과전자현미경으로 관찰하였다. 구체적으로, 2.5 % 글루타르알데히드(in PBS)를 사용하여 4°C의 저온환경에서 고정하였다. 고정된 세포는 0.1M 인산염 완충액(pH7.4)으로 10~20분 수세하였다. 후고정으로 1% OsO<sub>4</sub> (osmic acid)로 약 1시간 동안 반응을 진행하고, 다시 0.1M 인산염 완충액(pH7.4)으로 수세하였다. 샘플 내의 수분을 제거하기 위해 50%, 70%, 80%, 95% 100%의 에틸알코올을 저농도에서 고농도로 5분 이내로 탈수를 진행하였다. 초박절편기(Ultra Microtome)를 이용하여 1 μm로 자른 후, 슬라이드 글라스에 옮겨 핫 플레이트(80°C)에서 신전시키면서 부착 및 고정시켰다. 전자염색을 거친 후 관찰하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[95] 도 9에 나타낸 바와 같이, 배양 후 2주에서는 약간의 근원섬유(myofibriles)와 미토콘드리아가 관찰되었고, 5주차부터 2주차와 비교하여 성숙한 미토콘드리아 및 근원 섬유가 관찰되었다. 또한, 성숙한 심근세포에서 볼 수 있는 다핵세포와 견고한 정선(Junction)이 형성됨을 확인하였다.

[96]

[97] 실시예 8. 오일 점증제 첨가에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 특성 비교

[98] 실험군 5 내지 11의 젤라틴 오일 캡슐의 점성, 형태 및 에멀전 형성 여부를 비교하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[99]

[표3]

	점성(상온에서)	형태	에멀전형성	기타
실험군 5	낮음	입자형성 되고, 뿌연 갈색	-	점성이 매우 낮음
실험군 6	낮음	투명함	-	
실험군 7	높음	뿌옇고, 요변성(thixotropic)의 겔 형성	-	
실험군 8	매우 높음	뿌옇고 단단한 겔 형성	-	점성이 너무 높음
실험군 9	높음	뿌옇고 단단한 겔 형성	무	에멀전 형성 효율 낮음.
<b>실험군 10</b>	<b>높음</b>	<b>뿌옇고 단단한 겔 형성</b>	<b>유</b>	<b>적절함</b>
실험군 11	낮음	뿌옇고 단단한 겔 형성	유	점성 증진 효과 낮음

[100] 표 3에 나타낸 바와 같이, 오일 점증제의 첨가에 따라 젤라틴 오일 캡슐의 특성이 변화한 것을 알 수 있다. 특히, 5% 농도의 레오필 KL(텍스트란 팔미테이트)를 오일 점증제로 이용한 실험군 10의 젤라틴 오일 캡슐이 상온에서 점성이 높으며, 뿌옇고 단단한 겔을 형성할 뿐만 아니라, 에멀전을 형성하는 것을 알 수 있다.

[101]

[102] 실시예 9. 오일 점증제 첨가 여부에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 유지도 비교

[103] 물리적 조건 하에서 오일 점증제를 첨가하지 않은 실험군 4와 오일 점증제를 첨가한 실험군 10의 유지도를 비교하였다. 구체적으로, 상기 각각의 젤라틴 오일 캡슐에 바늘을 이용하여 부분적인 압력을 가하였다. 압력이 가해진 젤라틴 오일 캡슐의 유지 정도를 관찰하였다. 젤라틴 오일 캡슐의 유지도 비교 결과는 도 10에 나타내었다.

[104] 도 10에 나타낸 바와 같이, 오일 점증제를 첨가한 실험군 10은 부분적인 압력을 가하였음에도, 부드러운 상태를 유지하며 터지지 않는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 지속적인 자극으로 터진 후에도 젤라틴 오일 캡슐 내부의 오일이 퍼지지 않고, 그 모양을 유지하는 것을 확인하였다. 반면에, 오일 점증제를 첨가하지 않은 실험군 4는 가해진 압력으로 인해 터지는 것을 알 수 있으며, 젤라틴 오일 캡슐 내부의 오일이 유출되어 퍼지는 것을 확인하였다. 상기 결과는 젤라틴 오일

캡슐 제조 시 오일 점증제를 첨가하는 것이 제조된 캡슐의 유지도를 향상시킨다는 것을 의미한다. 또한, 오일 점증제를 첨가한 젤라틴 오일 캡슐은 캡슐이 터진 후에도 내부의 오일이 그 형태를 유지하는바, 이를 이용하여 세포를 배양하는 경우 젤라틴 오일 캡슐이 손상되더라도, 배양중인 세포에 산소가 지속적으로 공급될 수 있다는 것을 알 수 있다.

[105]

[106] 실시예 10. 인공 심근 구조체의 심박동수 및 박동 간격 확인

[107] 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양할 경우 세포가 성숙화된다는 것을 확인하였으며, 구체를 형성하는 심근세포는 인공 심근 구조체로 이용할 수 있음을 확인하였다. 배양된 심근세포가 인공 심근 구조체로 이용될 수 있음을 증명하기 위하여, 실시예 1에서 제조된 실험군 4를 이용하여 공배양된 심근세포의 심박동수 및 박동 간격을 확인하였다. 구체적으로, 배양 4일 차부터 일주일 간격으로 최대 42일 차까지 인공 심근 구조체의 1분당 심박동수와 박동 간격을 동영상 촬영을 통하여 측정하였다. 심박동수 및 박동 간격 확인 결과 도 11에 나타내었다.

[108] 도 11에 나타낸 바와 같이, 배양 초반에는 다소 박동 간격이 2 내지 4초 사이로 일정하지 못하고 박동 또한 느렸으나, 배양 후 21일부터 박동 간격이 일정해지는 것을 확인할 수 있었다.

[109]

[110] 다음으로, 실시예 1에서 제조된 실험군 10의 오일점증제를 포함하는 젤라틴 오일 캡슐을 이용하여 동일한 방법으로 심근세포를 배양한 후, 박동 여부를 확인하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[111] 도 12에 나타낸 바와 같이, 배양 21일 및 43일 차에 심근 세포의 박동을 확인한 결과, 규칙적이고 안정적으로 박동 간격이 나타남을 확인하였다. 특히, 오일점증제가 포함되지 않은 경우, 실험 중간에 젤라틴 캡슐이 터지는 경우가 발생하였지만(배양 43일째에 수득율 약 35%), 본 발명에 따른 오일점증제를 포함하는 젤라틴 오일 캡슐의 경우, 배양 43일까지 터지는 현상이 발견되지 않고 안정하게 유지됨을 확인하였다.

[112]

[113] 실시예 11. 인공 심근 구조체의 기능 검증

[114] 상기 실험 과정을 통해 확립한 본 발명에 따른 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양하여 제조된 인공 심근 구조체의 기능을 검증하기 위하여, 최대 탈분극 속도( $V_{max}$ ), 박동수(Beat rate), 재분극 시간(APD90), 최대전압크기(Total amplitude)를 확인하였다.

[115] 구체적으로, 2D 또는 젤라틴 오일 캡슐 배양 환경에 따른 hiPSC-CM의 전기생리학적 성숙도를 패치클램프 방법으로 분석하였다. 패치클램프 기록을 위해 1, 3 및 5주간 2D 또는 젤라틴 오일 캡슐 배양 환경에서 배양한 hiPSC-CM을

16mm 커버글라스에 옮기고 2 내지 3일 유지한 후, 도립현미경에 설치한 패치클램프용 레코딩 챔버에 옮겨 활동전압을 측정하였다. 상기 활동전압 측정은 저항이 2 내지 3 M $\Omega$ 인 유리미세전극을 세포막에 밀착한 후 전세포 기록조건(conventional whole-cell patch configuration)으로 활동전압을 측정하였으며, 생리학적 온도(37°C)가 유지되는 환경에서 자발적인 수축을 보이는 세포를 선택하였다. 활동전압의 기록에 사용한 챔버 용액의 조성구분과 유리미세전극용액의 조성구분은 다음과 같다.

[116]

[117] - 챔버용액: 3.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, pH 7.4 NaOH로 보정함.

[118] - 유리미세전극용액: 25 mM KCl, 120 mM K-아스파르트산염(K-aspartate), 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MgATP, pH 7.2 KOH로 보정함.

[119]

[120] 패치클램프 증폭기(Axopatch 1D, Axon Instrument, Ca, USA) 및 아날로그-디지털 변환기(Digidata-1550, Axon Instrument)와 pClamp 11(Axon Instrument) 프로그램을 이용하여 활동전압을 기록하였다. 활동전압의 특성은 Clampfit 11(Axon Instrument) 프로그램을 활용하여 최대탈분극속도(V<sub>max</sub>), 박동수(Beat rate), 재분극 시간(APD90), 최대전압크기(Total amplitude)를 분석하였으며, 그 결과는 도 13에 나타내었다. 추가적으로 박동수 및 재분극 시간을 분석한 결과를 도 14에 나타내었다.

[121] 도 13에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 함께 배양된 심근세포는 최대 탈분극 속도가 종래 2D 방법으로 배양한 세포보다 낮고 규칙적인 것을 알 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 함께 배양된 심근세포의 박동수, 재분극 시간 및 최대전압크기를 보아, 상기 세포의 성숙화가 이루어졌음을 알 수 있다.

[122] 도 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 함께 배양된 심근세포는 배양 1주차에서 재분극 시간이 짧고, 박동수가 균일하지 않았으나, 배양 3주차에서, 박동수 및 재분극 시간이 모두 증가하였다. 이와 대조적으로, 종래 2D 방법으로 배양한 세포는 배양 시작 1주차 및 3주차의 변화가 거의 없음을 확인하였다. 상기 결과는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 함께 심근세포를 배양하면, 배양된 심근세포가 성숙화된다는 것을 의미한다. 따라서 젤라틴 오일 캡슐을 이용하여 심근세포를 공배양하여 제조된 인공 심근 구조체는 이를 구성하는 각각의 세포가 유사한 박동수 및 재분극 속도를 가지는바, 실제 심근 구조와 매우 유사하며, 오가노이드로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

[123]

[124] 또한, 추가적으로 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양하여 제조된 인공

심근 구조체에 다양한 약물을 처리한 후 수축력을 확인하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

- [125] 도 15에 나타낸 바와 같이, 약물 반응 조건에서 심장박동을 관찰한 결과 베라파밀(verapamil) 125nM을 처리한 군에서 심장 박동이 느려지고 다소 불규칙해지는 것을 확인할 수 있었으며, 이소프리트레놀(Isopreterenol) 10nM을 처리한 군에서는 심장박동은 빨라지고, 수축력은 강하게 변하는 것을 관찰하였다. 또한, 니페디핀(Nifedipine) 100nM을 처리한 군에서는 심장 박동은 느리게 변하고, 수축력도 약해지는 것을 확인하였다. 이를 통해, 인공으로 제작한 본 발명에 따른 인공 심근 구조체(심장 오가노이드)에서도 사람에서 나타나는 약물의 효과와 같은 반응을 측정할 수 있어 보다 정확한 약물의 심장 독성 반응을 예측할 수 있음을 확인하였다.

[126]

[127] 실시예 12. 다양한 세포를 이용한 인공 세포 구조체 제작

- [128] 젤라틴 오일 캡슐과 다양한 세포를 공배양하여 인공 세포 구조체를 제작하였다. 보다 상세하게는, 랫트 신생아 유래 심근세포(Rat neonatal cardiomyocyte), 인간 지방 유래 줄기세포(human adipose derived stem cell), 인간 제대혈 유래 내피 전구 세포(human cord blood derived endothelial progenitor cell) 및 토끼 연골 세포(Rabbit chondrocyte)를 이용하여 각각의 인공 세포 구조체를 제작하였다. 제작된 랫트 신생아 유래 심근세포, 인간 지방 유래 줄기세포, 인간 제대혈 유래 내피 전구 세포의 인공 세포 구조체는 투과전자현미경으로 관찰하였으며, 토끼 연골 세포의 인공 세포 구조체는 면역조직화학염색을 통해 관찰하였다. 제작된 인공 세포 구조체는 도 16에 나타내었다.

- [129] 도 16에 나타낸 바와 같이, 랫트 신생아 유래 심근세포, 인간 지방 유래 줄기세포, 인간 제대혈 유래 내피 전구 세포 및 토끼 연골 세포 모두 젤라틴 오일 캡슐에 부착되어 배양되었으며, 최종적으로 구형의 인공 세포 구조체를 형성하는 것을 확인하였다.

[130]

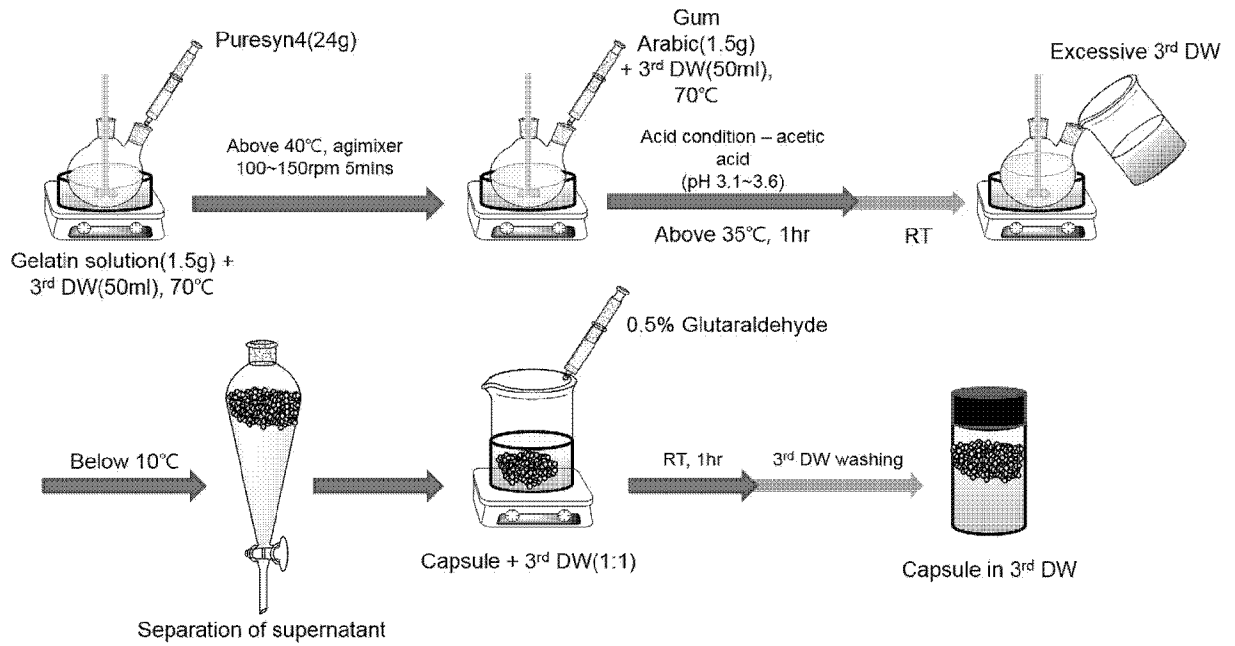
- [131] 종합적으로 본 발명자들은 미세 캡슐을 개발하였으며, 상기 미세 캡슐 제조 시 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 혼합하여 제조하는 경우 기계적 물성이 현저히 향상된다는 것을 확인하였다. 또한, 상기 미세캡슐을 이용하여 세포를 배양하는 경우 세포의 부착 및 생존을 향상시키며, 배양된 세포의 성숙화를 유도하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 미세 캡슐은 캐리어를 이용한 세포 배양, 공배양 시스템 및 인공 세포 구조체 제작 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

## 청구범위

- [청구항 1] 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 미세캡슐을 포함하는, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 젤라틴 및 천연 고분자는 1:0.1 내지 1의 중량비로 혼합되는 것인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,  
상기 천연 고분자는 아라비아 검 및 히알루론산을 혼합한 것인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,  
상기 아라비아 검 및 히알루론산은 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합되는 것인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 오일은 올리브유, 동백유, 피마자유, 야자유, 호호바유, 아몬드 오일, 포도씨오일, 허브 오일, 장미 오일, 코코넛 오일, 모링가 오일, 쌀겨 오일, 살구씨 오일, 해바라기 오일, 메도폼시드 오일, 아비시니안 오일 및 스쿠알란으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,  
상기 오일 점증제는 벤톤 겔(Bentone gel),  
하이드로제네이티드폴리이소부텐(Hydrogenated Polyisobutene), 텍스트린 팔미테이트/에틸헥사노에이트 및 텍스트린 팔미테이트(dextrin palmitate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,  
상기 오일 점증제는 상기 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함되는 것인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,  
상기 세포는 부착 의존성 세포인 것인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,  
상기 부착 의존성 세포는 심근세포, 혈관내피세포, 지방세포, 상피세포, 섬유아세포, 골아세포, 연골세포, 간세포, 자궁경부세포, 암세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 세포 배양용 캐리어.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 세포 배양용 캐리어를 포함하는, 세포 배양 배지 조성물.

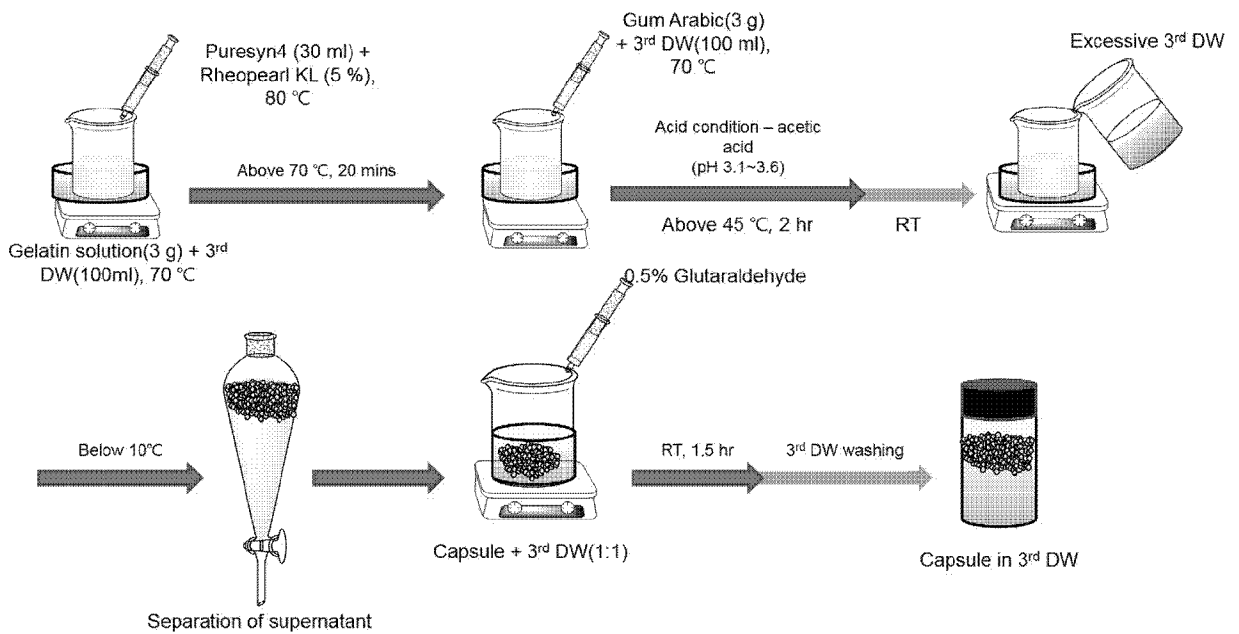
[도 1a]

## A. 오일 점증제 무첨가군

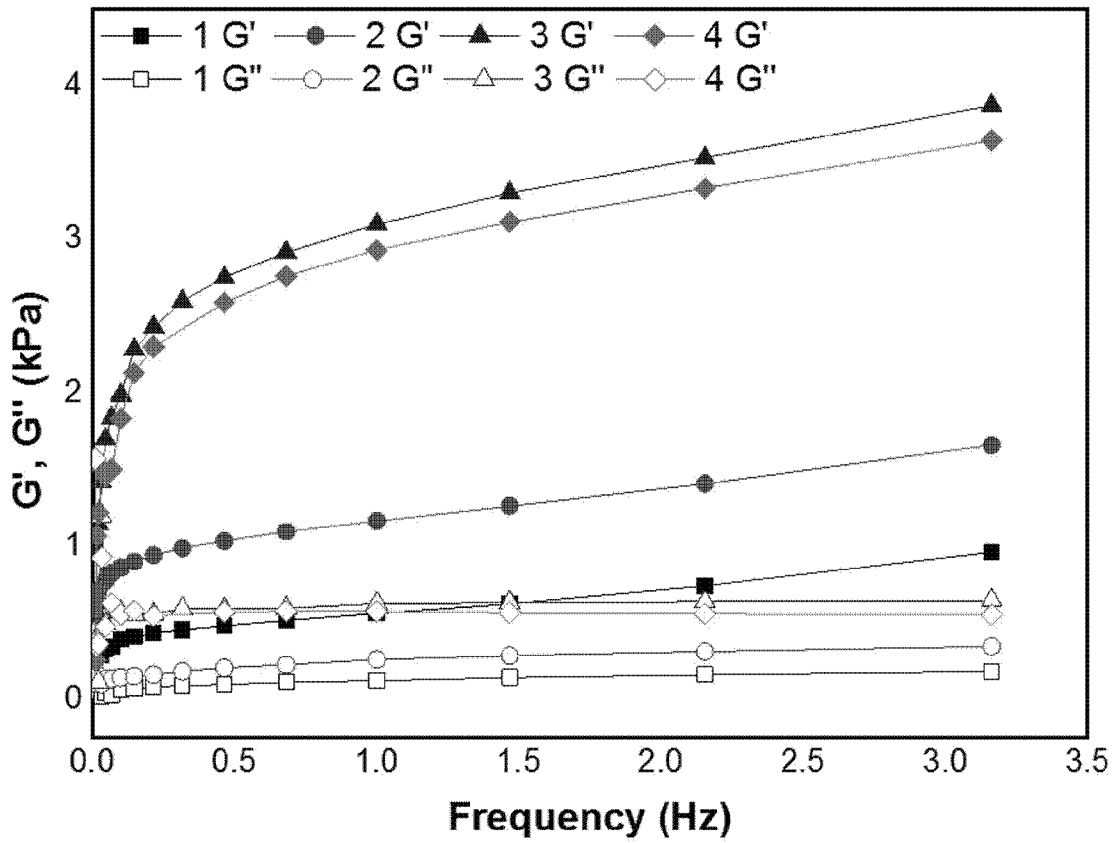


[도 1b]

## B. 오일 점증제 첨가군

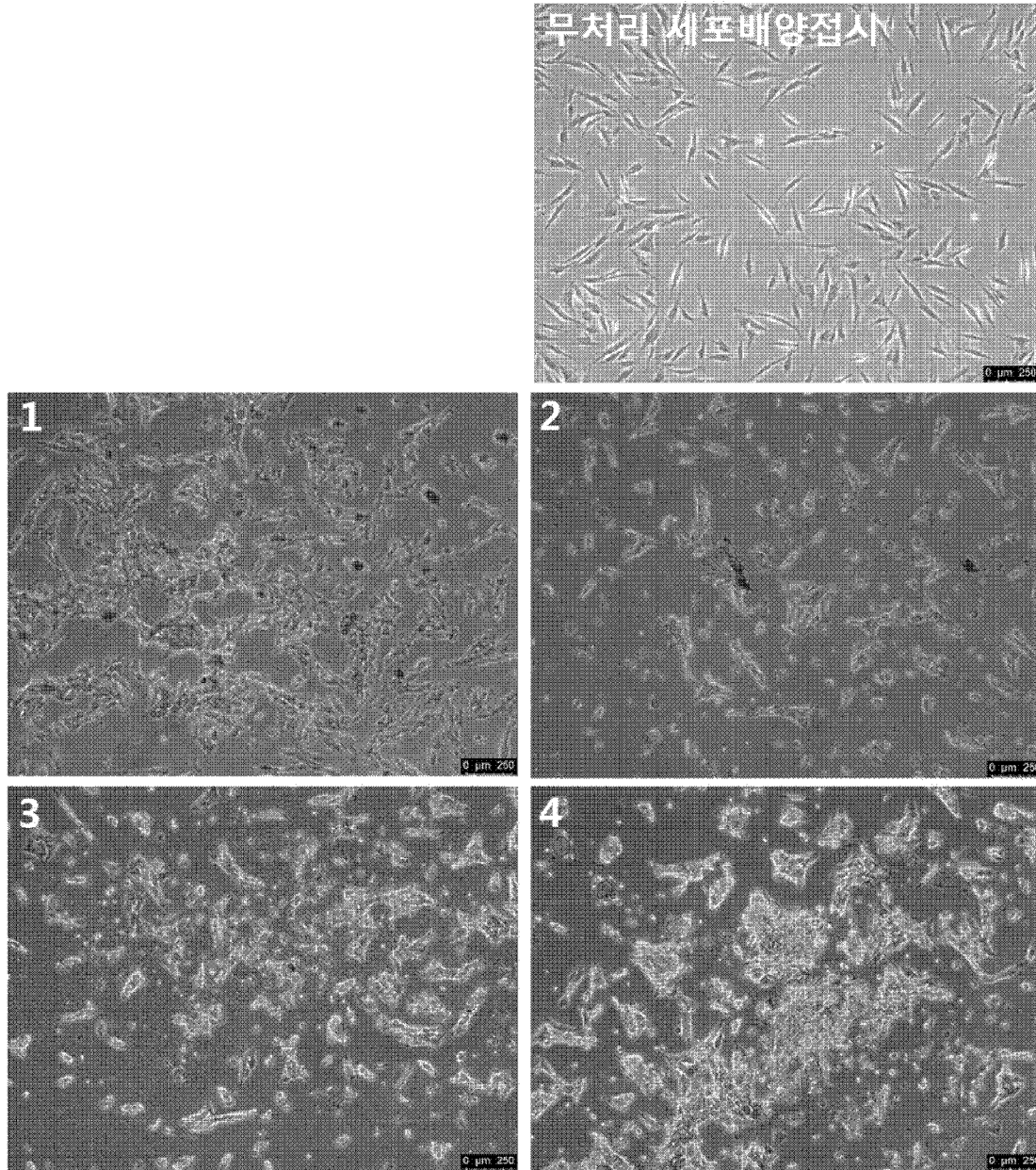


[도2]

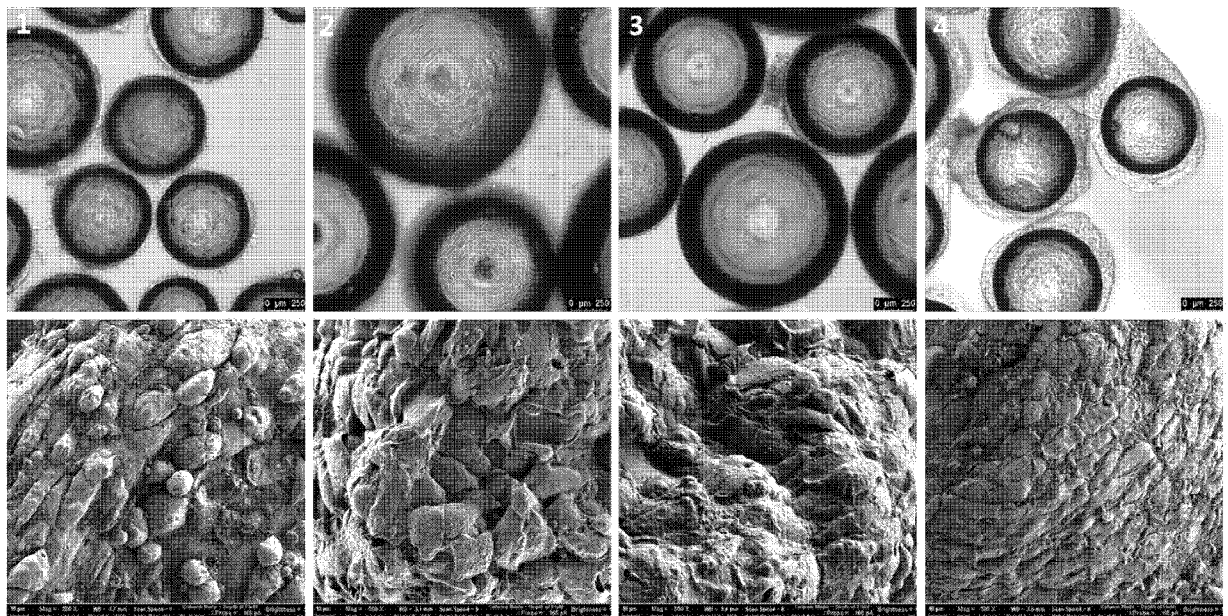


Mechanical properties. Frequency of 0.01 to 5 Hz,  
Strain of 0.01% at 24°C

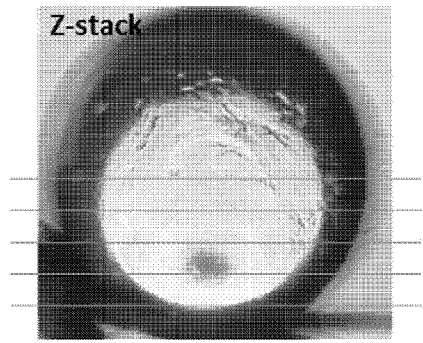
[도3]



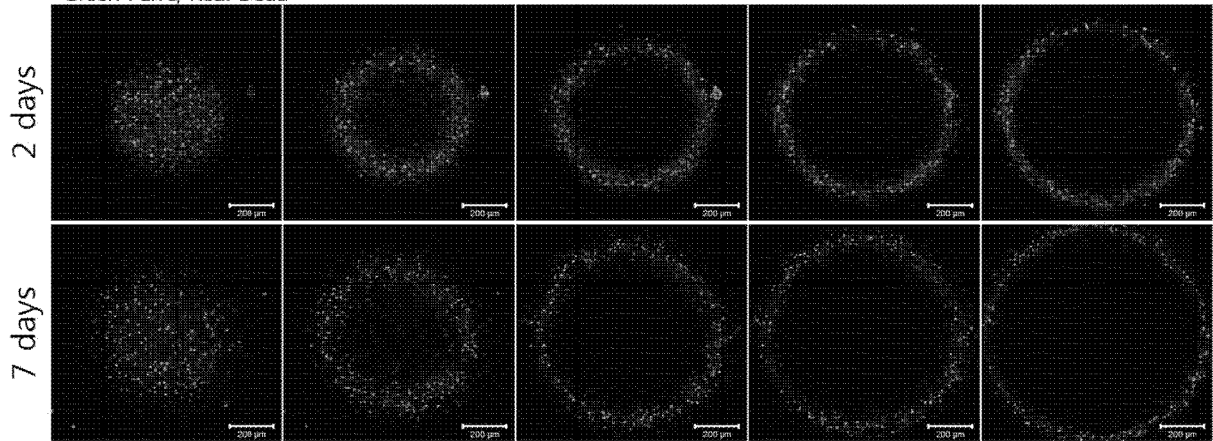
[도4]



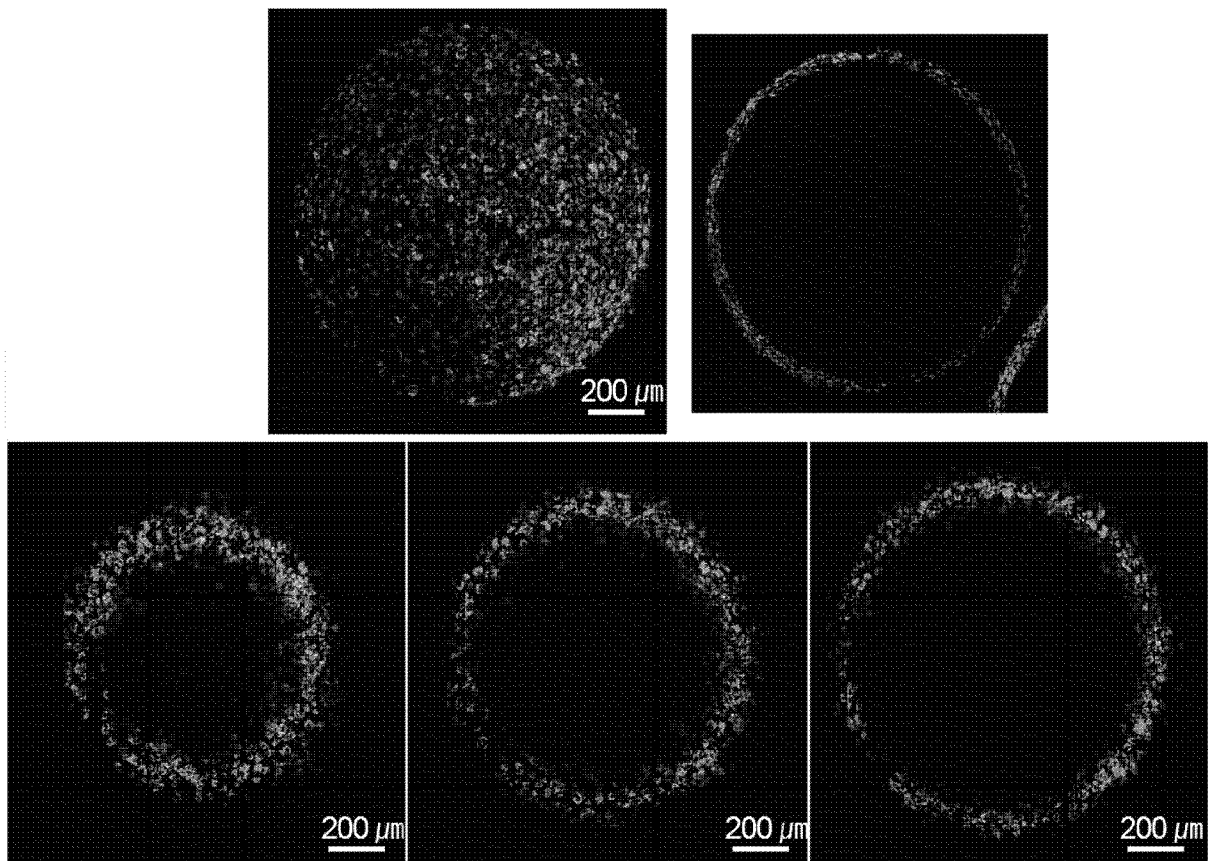
[도5]



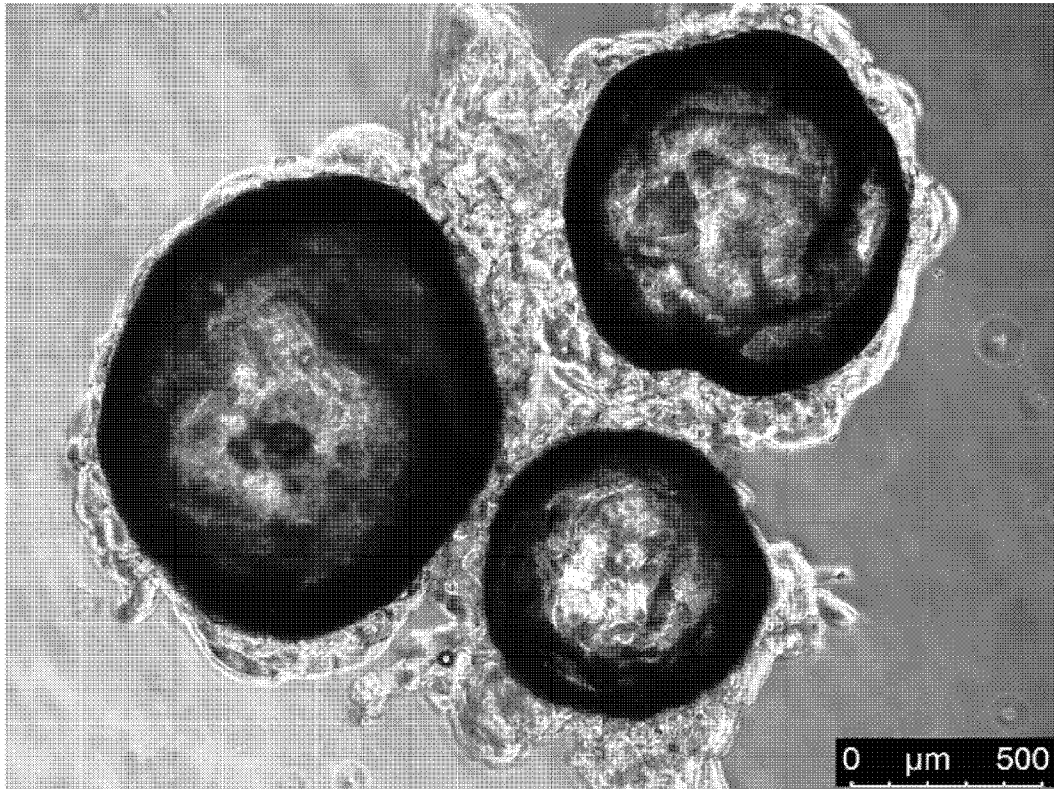
Live-dead assay를 통한 Squalene 표면에 부착된 심근세포의 세포 생존을 확인 (Z-stack, Confocal)  
Green : Live, Red: Dead



[도6]

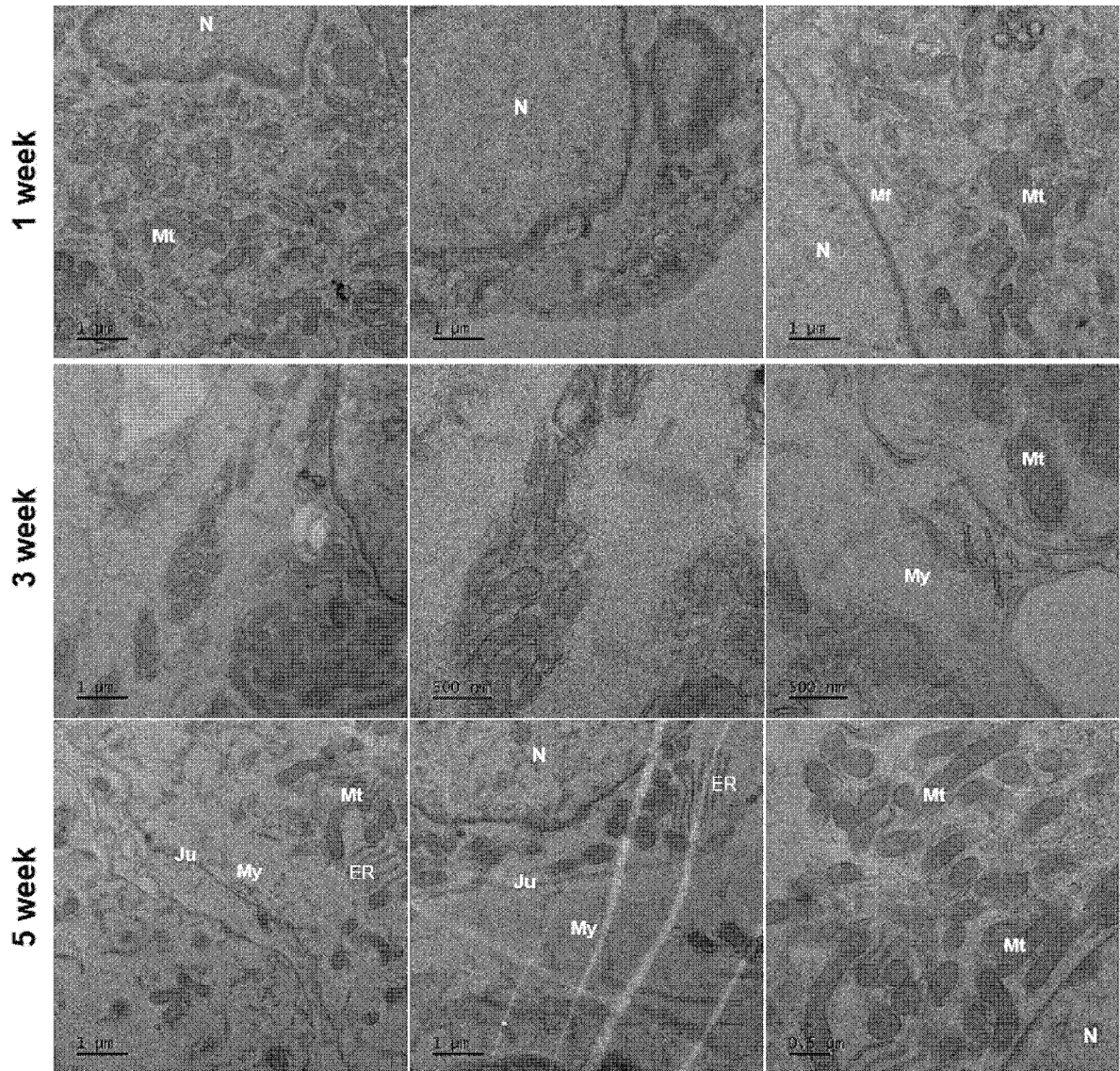


[도7]

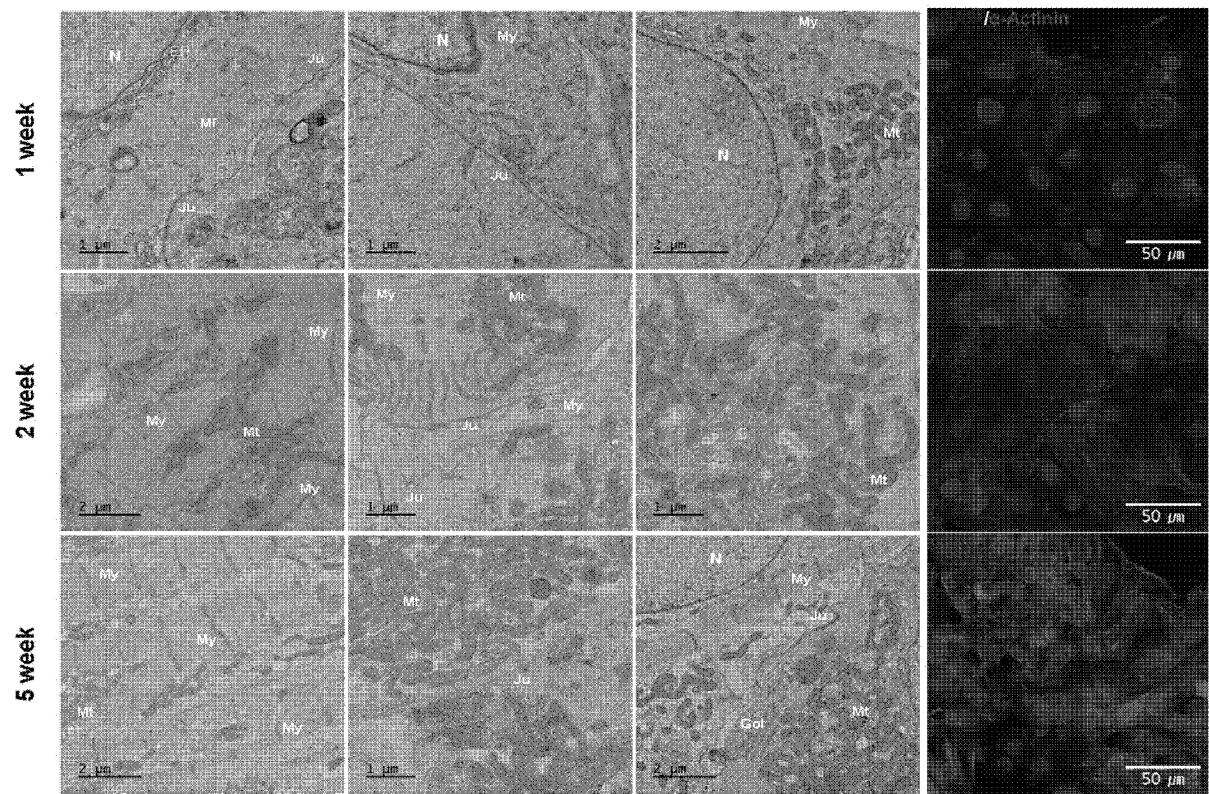


[도8]

2D culture

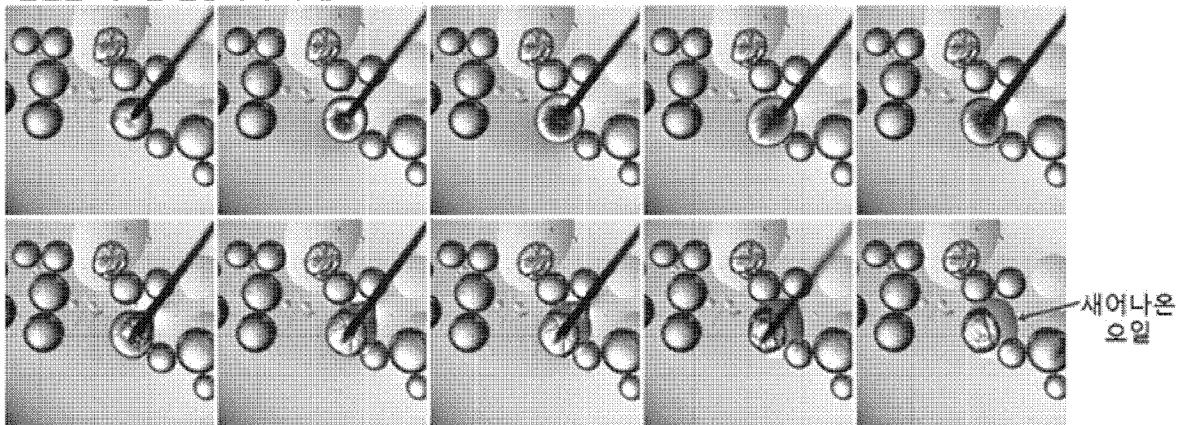


[도9]

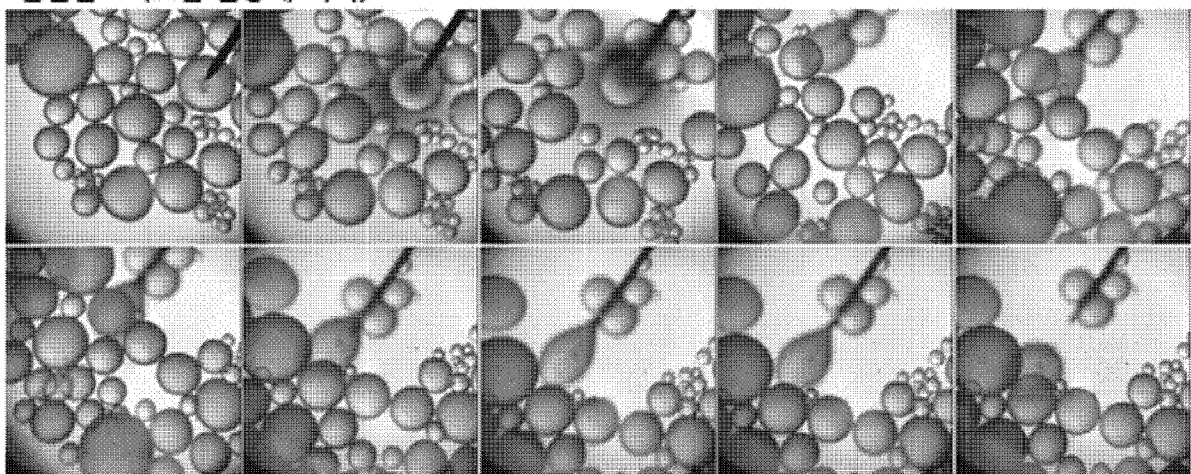


[도10]

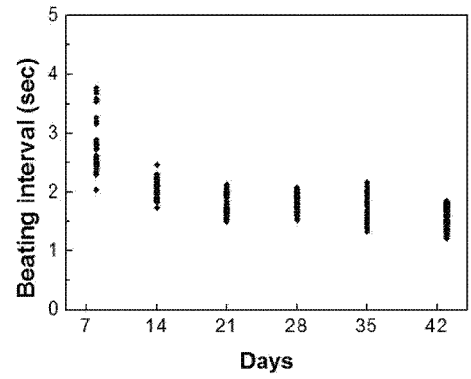
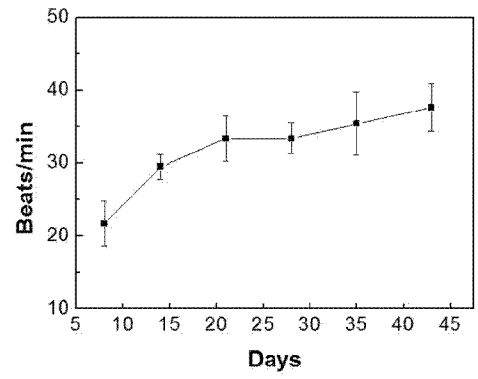
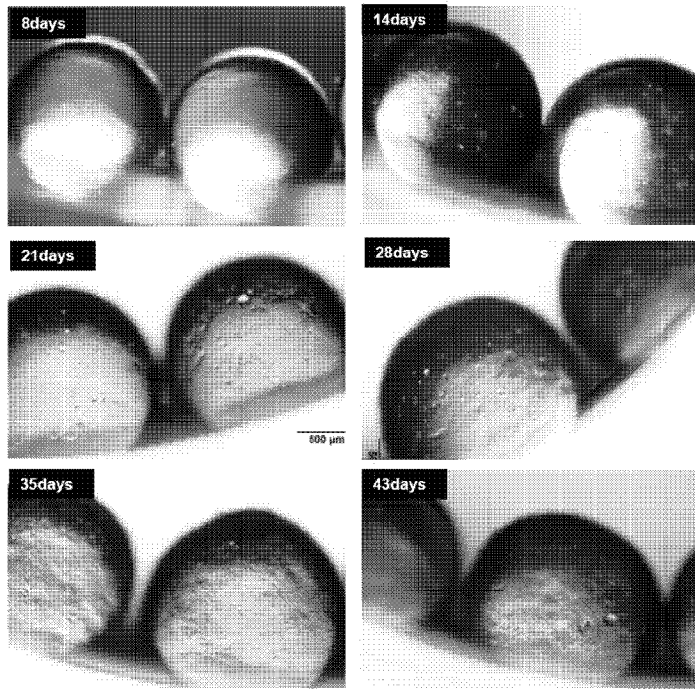
실험군 4(오일 점중제 무처리)



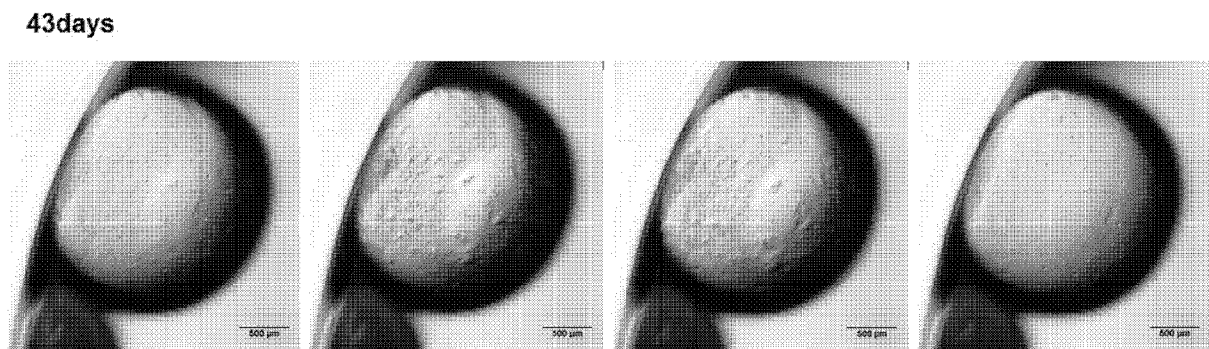
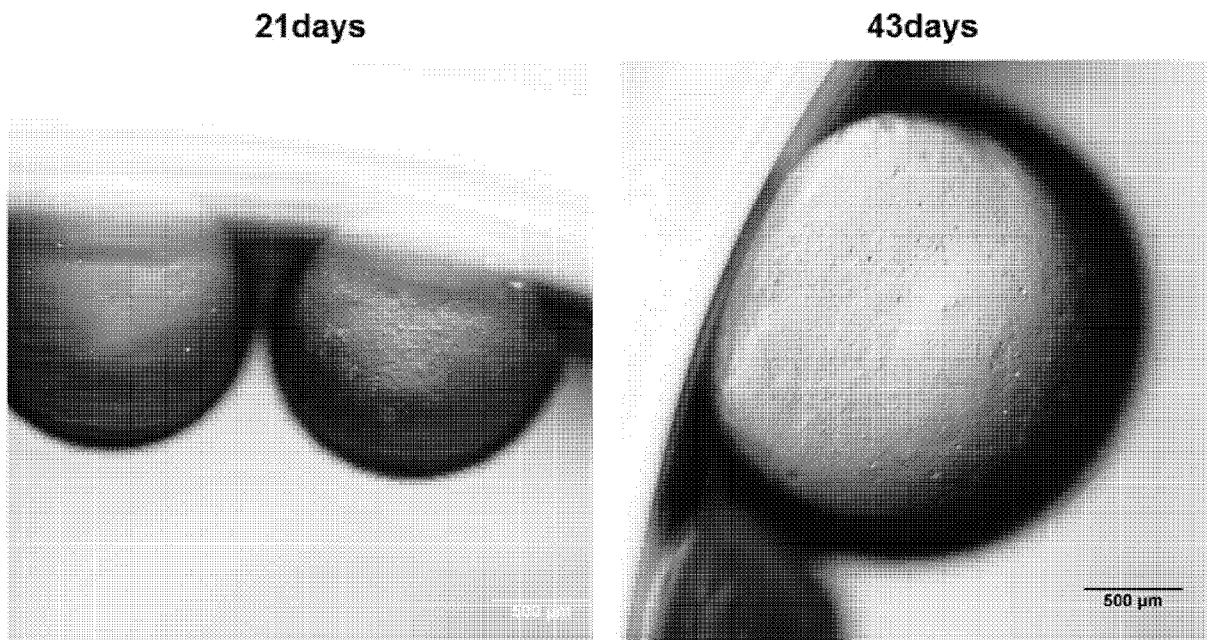
실험군 10(오일 점중제 처리)



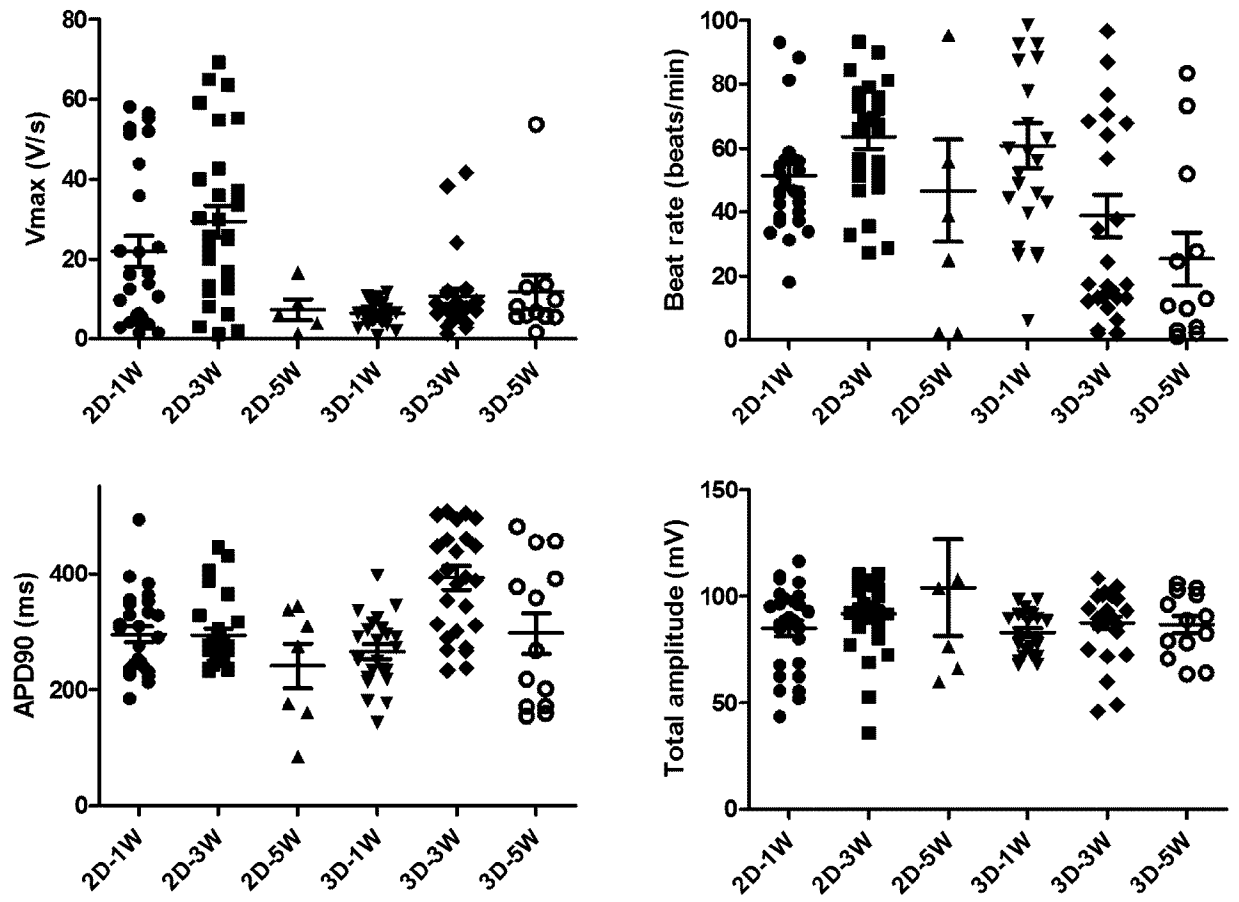
[도11]



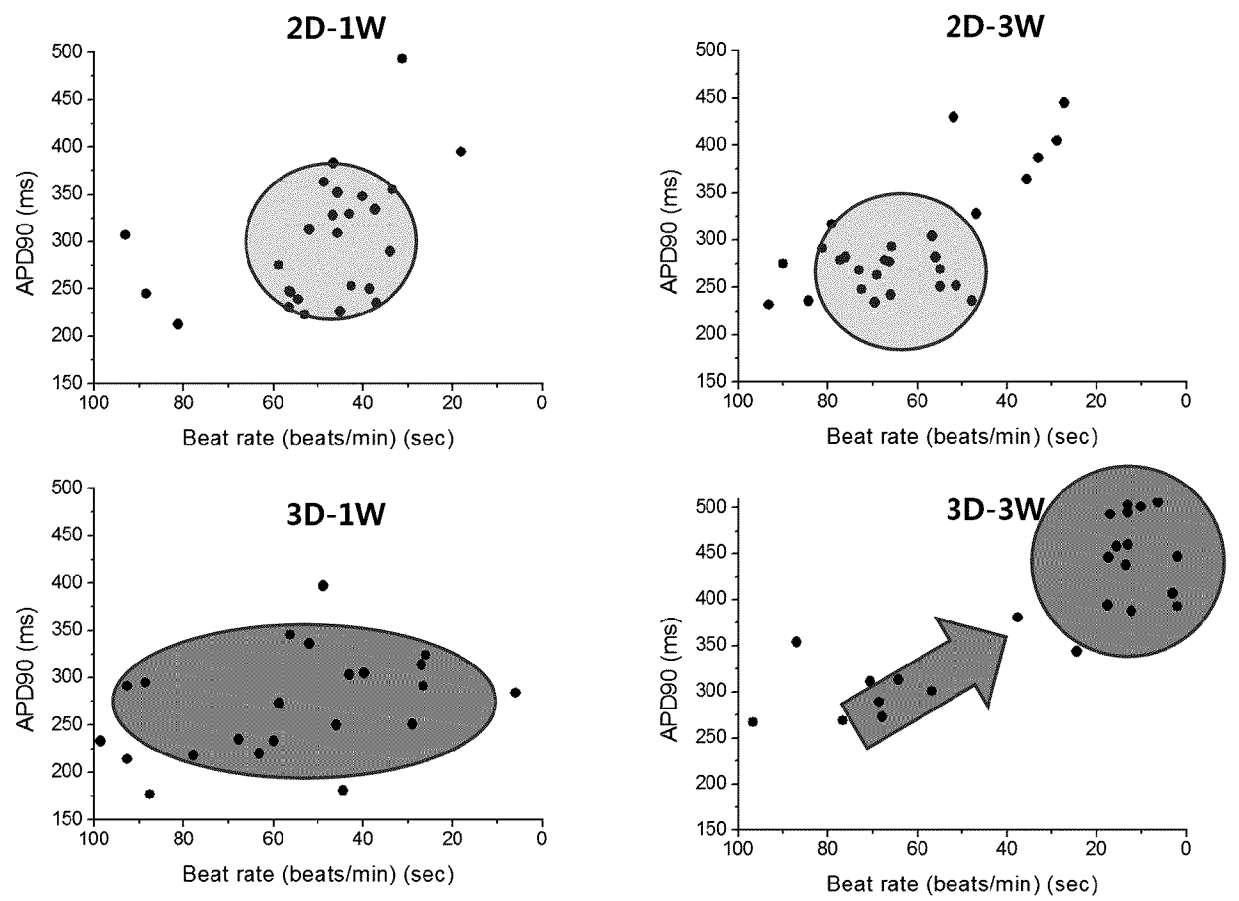
[도12]



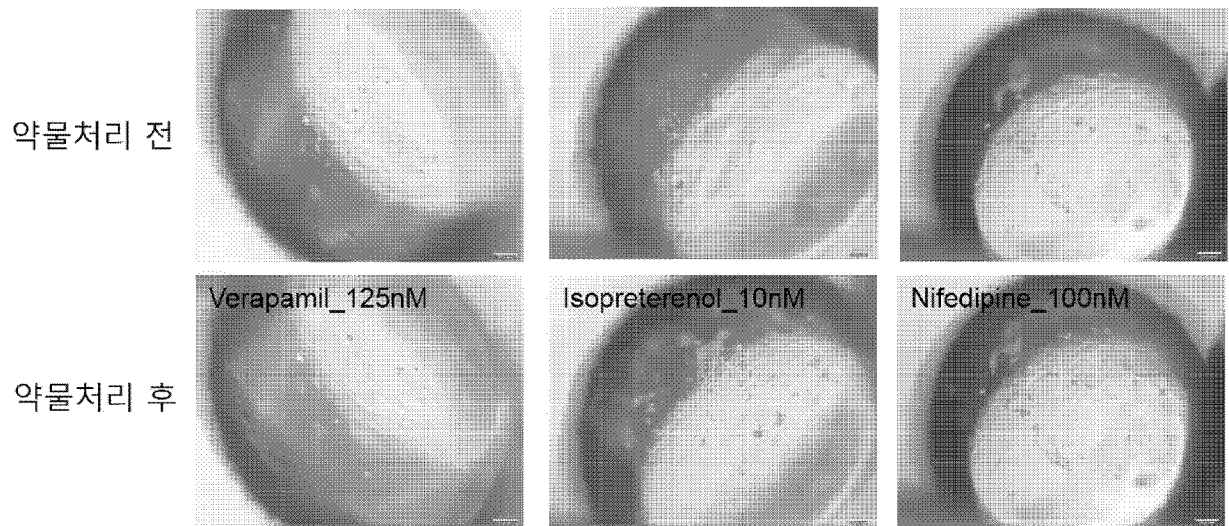
[도 13]



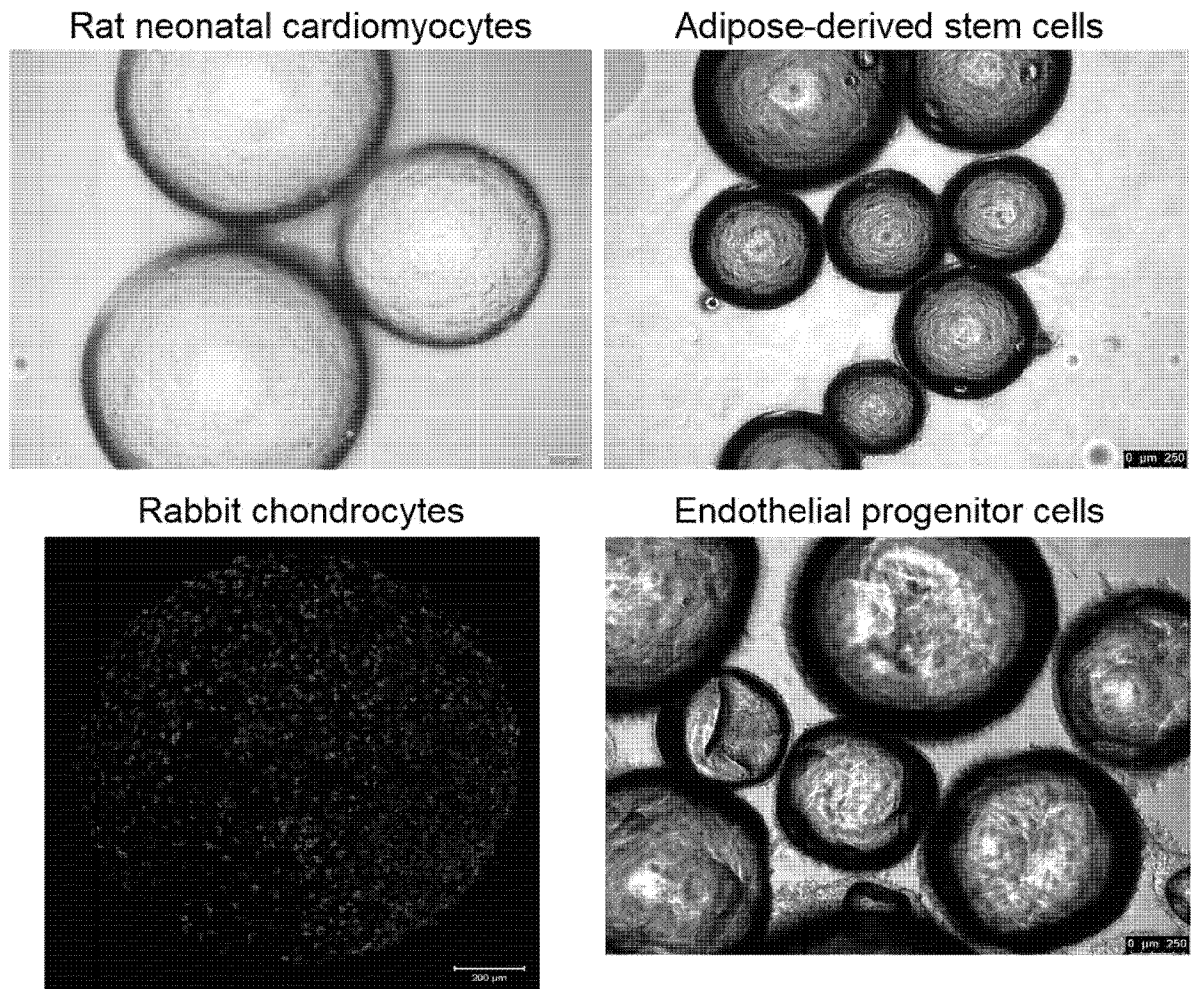
[도 14]



[도15]



[도16]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/095041

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i*

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00; A61K 47/34; A61K 9/16; A61K 9/50; B01J 13/08; C12M 3/00; C12M 3/04; C12N 11/02; C12N 5/077

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above  
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: carrier, microcapsule, cell culture, gelatin, oil, thickener

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1485094 A (INSTITUTE OF PROCESS ENGINEERING, CHINA ACADEMY OF SCIENCES) 31 March 2004 See pages 5, 7-8; claims 1, 5, 10.	1-10
Y	US 5693343 A (REID, Robert H. et al.) 02 December 1997 See column 1; claims 1-3.	1-10
Y	CN 1641017 A (ANIMAL INST., CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 20 July 2005 See abstract; claims 1, 3.	1-10
A	US 5051304 A (DAVID, Jacky et al.) 24 September 1991 See the entire document.	1-10
A	JP 2007-215519 A (FUJIFILM CORP.) 30 August 2007 See the entire document.	1-10

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

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

Date of the actual completion of the international search

03 MARCH 2020 (03.03.2020)

Date of mailing of the international search report

03 MARCH 2020 (03.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,  
 Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2019/095041**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 1485094 A	31/03/2004	None	
US 5693343 A	02/12/1997	CN 1188408 A	22/07/1998
		EP 0681478 A1	15/11/1995
		EP 0817619 A1	14/01/1998
		EP 0818034 A2	14/01/1998
		EP 0818034 B1	02/07/2008
		JP 4070239 B2	02/04/2008
		KR 10-0429327 B1	31/07/2004
		KR 10-0511215 B1	09/05/2006
		KR 10-1998-703429 A	05/11/1998
		KR 10-1998-703518 A	05/11/1998
		US 2003-0082193 A1	01/05/2003
		US 2003-0129233 A1	10/07/2003
		US 2003-0161889 A1	28/08/2003
		US 2005-0074813 A1	07/04/2005
		US 2010-0074913 A1	25/03/2010
		US 5417986 A	23/05/1995
		US 5470311 A	28/11/1995
		US 5705197 A	06/01/1998
		US 5762965 A	09/06/1998
		US 5892337 A	06/04/1999
		US 5970426 A	19/10/1999
		US 6217911 B1	17/04/2001
		US 6309669 B1	30/10/2001
		US 6410056 B1	25/06/2002
		US 6447796 B1	10/09/2002
		US 6528097 B1	04/03/2003
		US 6844010 B1	18/01/2005
		US 6855331 B2	15/02/2005
		US 6902743 B1	07/06/2005
		US 6939546 B2	06/09/2005
		US 7033608 B1	25/04/2006
		US 7604811 B1	20/10/2009
		WO 91-13595 A1	19/09/1991
		WO 92-19263 A1	12/11/1992
		WO 94-21289 A1	29/09/1994
		WO 97-26869 A1	31/07/1997
		WO 97-28525 A2	07/08/1997
		WO 98-32427 A1	30/07/1998
CN 1641017 A	20/07/2005	None	
US 5051304 A	24/09/1991	EP 0273823 A1	06/07/1988
JP 2007-215519 A	30/08/2007	None	

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12N 5/00; A61K 47/34; A61K 9/16; A61K 9/50; B01J 13/08; C12M 3/00; C12M 3/04; C12N 11/02; C12N 5/077

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

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 캐리어(carrier), 미세캡슐(microcapsule), 세포 배양(cell culture), 젤라틴(gelatin), 오일(oil), 점증제(thickener)

**C. 관련 문헌**

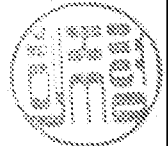
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CN 1485094 A (INSTITUTE OF PROCESS ENGINEERING, CHINA ACADEMY OF SCIENCES) 2004.03.31 페이지 5, 7-8; 청구항 1, 5, 10 참조	1-10
Y	US 5693343 A (REID, ROBERT H. 등) 1997.12.02 컬럼 1; 청구항 1-3 참조.	1-10
Y	CN 1641017 A (ANIMAL INST., CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2005.07.20 요약; 청구항 1, 3 참조.	1-10
A	US 5051304 A (DAVID, JACKY 등) 1991.09.24 전체 문헌 참조.	1-10
A	JP 2007-215519 A (FUJIFILM CORP) 2007.08.30 전체 문헌 참조.	1-10

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  
 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌  
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 03월 03일 (03.03.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 03월 03일 (03.03.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 1485094 A	2004/03/31	없음	
US 5693343 A	1997/12/02	CN 1188408 A EP 0681478 A1 EP 0817619 A1 EP 0818034 A2 EP 0818034 B1 JP 4070239 B2 KR 10-0429327 B1 KR 10-0511215 B1 KR 10-1998-703429 A KR 10-1998-703518 A US 2003-0082193 A1 US 2003-0129233 A1 US 2003-0161889 A1 US 2005-0074813 A1 US 2010-0074913 A1 US 5417986 A US 5470311 A US 5705197 A US 5762965 A US 5892337 A US 5970426 A US 6217911 B1 US 6309669 B1 US 6410056 B1 US 6447796 B1 US 6528097 B1 US 6844010 B1 US 6855331 B2 US 6902743 B1 US 6939546 B2 US 7033608 B1 US 7604811 B1 WO 91-13595 A1 WO 92-19263 A1 WO 94-21289 A1 WO 97-26869 A1 WO 97-28525 A2 WO 98-32427 A1	1998/07/22 1995/11/15 1998/01/14 1998/01/14 2008/07/02 2008/04/02 2004/07/31 2006/05/09 1998/11/05 1998/11/05 2003/05/01 2003/07/10 2003/08/28 2005/04/07 2010/03/25 1995/05/23 1995/11/28 1998/01/06 1998/06/09 1999/04/06 1999/10/19 2001/04/17 2001/10/30 2002/06/25 2002/09/10 2003/03/04 2005/01/18 2005/02/15 2005/06/07 2005/09/06 2006/04/25 2009/10/20 1991/09/19 1992/11/12 1994/09/29 1997/07/31 1997/08/07 1998/07/30
CN 1641017 A	2005/07/20	없음	
US 5051304 A	1991/09/24	EP 0273823 A1	1988/07/06
JP 2007-215519 A	2007/08/30	없음	