



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0178660
(43) 공개일자 2024년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/06 (2006.01) A61K 35/50 (2015.01)
A61K 47/36 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 35/50 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0003710
(22) 출원일자 2024년01월09일
심사청구일자 2024년01월09일
(30) 우선권주장
1020230080416 2023년06월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 엠케이바이오텍
대전광역시 유성구 대학로 99, 207호(궁동, 충남대학교 농업생명공학관)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김민규
대전광역시 유성구 죽동로 321, 102동 2401호 (죽동, 금성백조예미지)
김은영
대전광역시 유성구 상대북용로29번길 52, 111동 1404호 (상대동, 대전아이파크시티 1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
원대규

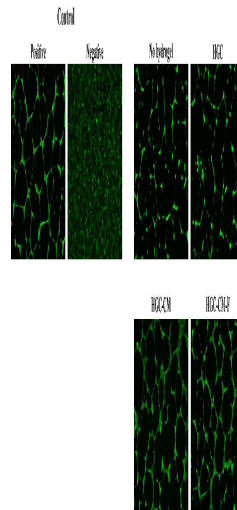
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **태반 줄기세포 배양액 및 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 태반 줄기세포 배양액 및 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 온도 변화에 의한 졸-겔 상전이 특성을 이용하여 태반 줄기세포 배양액에 포함된 엑소좀 등 치료 유효 인자의 서방형 방출을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 우수한 점막 점착성을 통해 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/7007 (2013.01)
A61P 17/02 (2018.01)

구은영

대전광역시 유성구 궁동로10번길 11, 204호(궁동, 지성빌)

(72) 발명자

김령은

대전광역시 서구 계룡로251번길 21, 작은하우스 103호

허강무

대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호(어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711199718
과제번호	2023-KOITA-RND3-2-04
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥협회
연구사업명	2023년 기업부설연구소 R&D역량강화 지원사업(내역사업3(2단계: 사업화R&D))
연구과제명	태반 줄기세포 유효 인자 및 엑소좀 기반 하이드로겔형 염증치료제
과제수행기관명	(주)엠케이바이오텍
연구기간	2023.07.01 ~ 2025.12.31

명세서

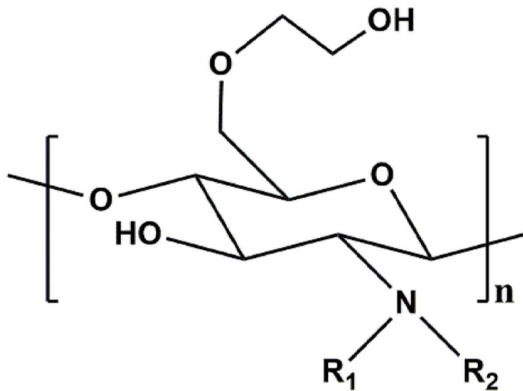
청구범위

청구항 1

태반 줄기세포 배양액 및 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 포함하는

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물:

[화학식 1]



여기서,

n 은 10 내지 1000의 정수이며,

R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R_1 은 수소인

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기인

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 태반 줄기세포 배양액은 태반 줄기세포 유래 치료 유효인자 및 엑소좀(exosome)을 포함하는

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 글리콜 키토산 유도체는 온도 변화에 따른 졸-겔 상전이 거동을 나타내는

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 태반 줄기세포는 양수, 양막 및 제대혈 중 어느 하나로부터 유래한 줄기세포인

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과가 우수한

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는

조직 재생용 바이오패치.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는

조직 재생용 주사제.

청구항 10

1) 태반 줄기세포를 소태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 배지에서 세포 밀집도(cell confluence)가 30 내지 40%에 도달할 때까지 배양하는 단계;

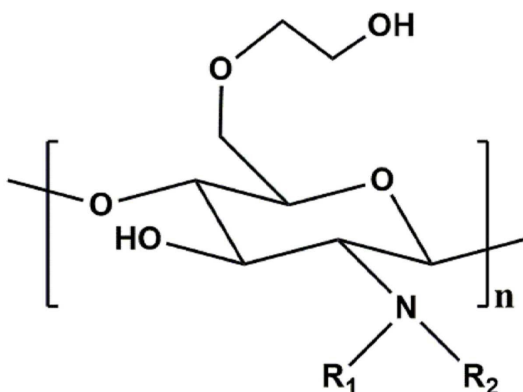
2) 상기 배지를 무혈청 배지로 교체한 후, 세포 밀집도(cell confluence)가 80 내지 90%에 도달할 때까지 배양하고, 세포 배양 상층액을 수집하는 단계;

3) 상기 상층액을 원심 분리하여 태반 줄기세포 배양액(Conditioned medium, CM)을 수득하는 단계; 및

4) 상기 줄기세포 배양액에 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 혼합하는 단계를 포함하는

조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 제조방법:

[화학식 1]



여기서,

n 은 10 내지 1000의 정수이며,

R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알킬닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 태반 줄기세포 배양액 및 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포는 자기 복제(Self-renewal)가 가능하고, 여러 종류의 세포로 분화할 수 있는 다분화능(Multipotency)을 가진 미분화 세포로서 손상된 조직 부위의 재생과 면역 환경 조절 특성 등을 가지고 있어 각종 뇌질환, 골수 이식, 척수손상, 심근질환, 근골격계 질환, 혈관 질환, 암, 당뇨병, 화상 및 피부 질환 등의 다양한 질환에서 치료제로 연구되고 있다.

[0003] 한편, 태반(Placenta)은 가장 최근에 발견되어 연구되고 있는 중간엽 줄기세포 기원조직이며, 배아의 발생과정 중 배반포가 착상하고 발생이 진행될 수 있도록 돕는 조직으로 태아를 외부 환경으로부터 보호하며 성장에 필요한 호르몬, 면역 물질, 성장인자 등을 공급해 주는 중요한 역할을 한다. 태반 유래 양수(Amniotic fluid), 양막(Amniotic membrane) 등에서 분리된 줄기세포는 태아 조직에서 유래되어 Perinatal stem cell이라고도 불리며, 중간엽 줄기세포 마커뿐만 아니라 전분화능(Pluripotency) 마커, 세포 부착 및 EGF(Epithelial growth factor), bFGF(Basic fibroblast growth factor), TGF(Transforming growth factor) α 및 β , BMP4 (Bone morphogenetic protein 4)등의 다양한 성장인자를 포함한 조직 재생 관련 마커가 발현되며 우수한 활성과 분화 능력으로 치료적 잠재성이 높은 세포 치료제로 연구되고 있다.

[0004] 구체적으로, 줄기세포 치료제는 다양한 질병과 조직 손상 등의 치료와 관련하여 적극적으로 임상연구가 진행되고 있지만, 면역거부반응, 세포독성, 낮은 생존율과 생착률, 합병증 야기 등의 문제가 제기되고 있어, 줄기세포 치료의 부작용을 해결하기 위한 안전성과 효율성 증대를 위한 기술 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 최근, 줄기세포 자체의 치료 효과 보다는 줄기세포의 측분비 효과(Paracrine effect)를 통하여 분비되는 여러 생체 활성인자들에 의해 조직 재생이 유도된다는 연구결과들이 발표되었으며, 분비 인자들 중 특히 '엑소솜'의 우수한 조직 재생 기능이 보고되면서 엑소솜을 활용한 연구에 관심이 높아지고 있다.

[0006] 상기 엑소솜(exosome)은 다양한 세포들로부터 생산되어 분비되는 소포체 중 한 종류로 30 내지 150nm의 크기로 세포와 같이 지질 이중층으로 둘러싸여 모세포로부터 유래된 생체 유래 물질을 내부에 담지 하거나 표지하여 세포 간의 신호전달역할을 통해 면역반응, 신호 전달, 항원 제시와 같은 다양한 세포 과정에서 중요한 세포간 정보 전달체로 주목을 받고 있다.

[0007] 한편, 온도감응성 하이드로겔은 단순한 화학 공정에 의한 단일 고분자 합성으로 대량 생산이 용이하고 전달체를 구성하는 생체 소재의 분해 속도를 조절하여 증식된 줄기세포를 제어된 방식으로 체내에 이식할 수 있기 때문에, 줄기세포 이식 및 투여 시 안정적으로 줄기세포의 생존 능력을 유지하며 재생을 유도할 수 있는 전달체 기술 중 하나이다.

[0008] 이에, 생체적합성 및 물성이 우수한 새로운 온도감응성 하이드로겔을 기반의 줄기세포 치료제 개발은 높은 효율로 줄기세포 및 엑소솜을 포집 및 보호하며, 최소 침습적으로 간편하게 적용하여 치료 부위에서 안정적으로 장기간 생착 및 생존을 보장할 수 있으며, 기존의 줄기세포 치료제 제형에서의 전달 효율, 안정성, 유효성의 한계를 극복할 수 있고, 다양한 바이오메디컬 응용분야로의 기술적 파급효과가 클 것으로 기대되고 있다.

[0009] 이에, 본 출원인은 태반 유래 줄기세포로부터 유래한 치료 성분 및 자연 상에서 가장 풍부한 천연 고분자 중 하나인 키토산을 기본 재료로 한 하이드로겔을 혼합한 치료제 제형을 연구하여, 합성 고분자에 비해 세포, 조직 독성이 낮고 세포 친화성이 우수하며, 저농도에서도 우수한 물성을 나타낼 수 있는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물을 개발하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-2023-0094841 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 태반 줄기세포 배양액 및 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 온도 변화에 의한 졸-겔 상전이 특성을 통해 체내 주입 시 겔화됨으로써, 태반 줄기세포 배양액에 포함된 엑소좀 등 치료 유효 인자의 서방형 방출을 유도할 수 있는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

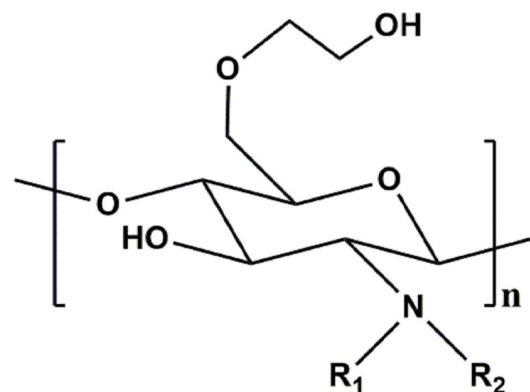
[0013] 본 발명의 다른 목적은 우수한 점막 접착성을 통해 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과를 발휘할 수 있는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 조직 재생용 바이오 패치 및 주사제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 태반 줄기세포 배양액 및 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 것이다:

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 여기서,

[0019] n은 10 내지 1000의 정수이며,

[0020] R₁ 및 R₂는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬옥시기

환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021]

구체적으로, 상기 n 은 200 내지 600의 정수인 것이다.

[0022]

구체적으로, 상기 R_1 은 수소이다.

[0023]

보다 구체적으로, 상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기이다.

[0024]

상기 태반 줄기세포 배양액은 태반 줄기세포 유래 치료 유효인자 및 엑소좀(exosome)을 포함할 수 있다.

[0025]

상기 글리콜 키토산 유도체는 온도 변화에 따른 졸-겔 상전이 거동을 나타내는 것이다.

[0026]

상기 태반 줄기세포는 양수, 양막 및 제대혈 중 어느 하나로부터 유래한 줄기세포인 것이다.

[0027]

상기 조성물은 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과가 우수한 것이다.

[0028]

본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 바이오 패치는 상기 조성물을 포함하는 것이다.

[0029]

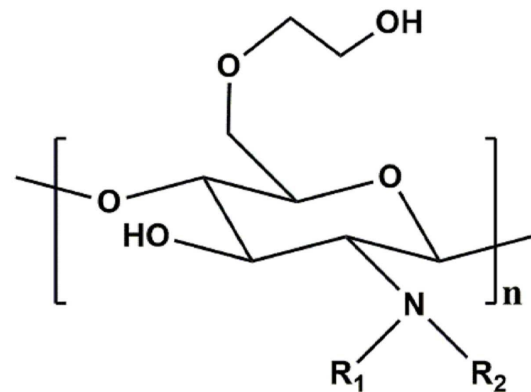
본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 주사제는 상기 조성물을 포함하는 것이다.

[0030]

본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 제조방법은 1) 태반 줄기세포를 소태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 배지에서 세포 밀집도(cell confluence)가 30 내지 40%에 도달할 때까지 배양하는 단계; 2) 상기 배지를 무혈청 배지로 교체한 후, 세포 밀집도(cell confluence)가 80 내지 90%에 도달할 때까지 배양하고, 세포 배양 상층액을 수집하는 단계; 3) 상기 상층액을 원심 분리하여 태반 줄기세포 배양액(Conditioned medium, CM)을 수득하는 단계; 및 4) 상기 줄기세포 배양액에 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 혼합하는 단계를 포함하는 것이다:

[0031]

[화학식 1]



[0032]

여기서,

[0033]

n 은 10 내지 1000의 정수이며,

[0034]

R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0036]

본 발명에서 “수소”는 수소, 경수소, 중수소 또는 삼중수소이다.

[0037]

본 명세서에서 “할로젠기”는 불소, 염소, 브롬 또는 요오드이다.

[0038]

본 발명에서 “알킬”은 탄소수 1 내지 40개의 직쇄 또는 측쇄의 포화 탄화수소에서 유래되는 1가의 치환기를 의미한다. 이의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, sec-부틸, 펜틸, iso-아밀, 헥실 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0039] 본 발명에서 “알케닐(alkenyl)”은 탄소-탄소 이중 결합을 1개 이상 가진 탄소수 2 내지 40개의 직쇄 또는 측쇄의 불포화 탄화수소에서 유래되는 1가의 치환기를 의미한다. 이의 예로는 비닐(vinyl), 알릴(allyl), 이소프로펜일(isopropenyl), 2-부텐일(2-butenyl) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0040] 본 발명에서 “알키닐(alkynyl)”은 탄소-탄소 삼중 결합을 1개 이상 가진 탄소수 2 내지 40개의 직쇄 또는 측쇄의 불포화 탄화수소에서 유래되는 1가의 치환기를 의미한다. 이의 예로는 에티닐(ethynyl), 2-프로파닐(2-propynyl)등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0041] 본 발명에서 “아르알킬”은, 아릴 및 알킬이 상기한 바와 같은 아릴-알킬 그룹을 의미한다. 바람직한 아르알킬은 저급 알킬 그룹을 포함한다. 적합한 아르알킬 그룹의 비제한적인 예는 벤질, 2-펜에틸 및 나프탈레닐메틸을 포함한다. 모 잔기에 대한 결합은 알킬을 통해 이루어진다.
- [0042] 본 발명에서 “아릴”은 단독 고리 또는 2이상의 고리가 조합된 탄소수 6 내지 60개의 방향족 탄화수소로부터 유래된 1가의 치환기를 의미한다. 또한, 2 이상의 고리가 서로 단순 부착(pendant)되거나 축합된 형태도 포함될 수 있다. 이러한 아릴의 예로는 페닐, 나프틸, 페난트릴, 안트릴, 플루오닐, 다이메틸플루오레닐 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0043] 본 발명에서 “헤테로아릴”은 탄소수 6 내지 30개의 모노헤테로사이클릭 또는 폴리헤테로사이클릭 방향족 탄화수소로부터 유래된 1가의 치환기를 의미한다. 이때, 고리 중 하나 이상의 탄소, 바람직하게는 1 내지 3개의 탄소가 N, O, S 또는 Se와 같은 헤테로원자로 치환된다. 또한, 2 이상의 고리가 서로 단순 부착(pendant)되거나 축합된 형태도 포함될 수 있고, 나아가 아릴기와 축합된 형태도 포함될 수 있다. 이러한 헤테로아릴의 예로는 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 트리아지닐과 같은 6-원 모노사이클릭 고리, 페녹사티에닐(phenoxathienyl), 인돌리지닐(indoliziny), 인돌릴(indolyl), 퓨리닐(puriny), 퀴놀릴(quinolyl), 벤조티아졸(benzothiazole), 카바졸릴(carbazolyl)과 같은 폴리사이클릭 고리 및 2-푸라닐, N-이미다졸릴, 2-이속사졸릴, 2-피리디닐, 2-피리미디닐 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0044] 본 발명에서 “아릴옥시”는 RO-로 표시되는 1가의 치환기로, 상기 R은 탄소수 6 내지 60개의 아릴을 의미한다. 이러한 아릴옥시의 예로는 페닐옥시, 나프틸옥시, 디페닐옥시 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0045] 본 발명에서 “알킬옥시”는 R' O-로 표시되는 1가의 치환기로, 상기 R'는 탄소수 1 내지 40개의 알킬을 의미하며, 직쇄(linear), 측쇄(branched) 또는 사이클릭(cyclic) 구조를 포함할 수 있다. 알킬옥시의 예로는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-프로폭시, t-부톡시, n-부톡시, 펜톡시 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0046] 본 발명에서 “알콕시”는 직쇄, 분지쇄 또는 고리쇄일 수 있다. 알콕시의 탄소수는 특별히 한정되지 않으나, 탄소수 1 내지 20인 것이 바람직하다. 구체적으로, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, i-프로필옥시, n-부톡시, 이소부톡시, tert-부톡시, sec-부톡시, n-펜틸옥시, 네오펜틸옥시, 이소펜틸옥시, n-헥실옥시, 3,3-디메틸부틸옥시, 2-에틸부틸옥시, n-옥틸옥시, n-노닐옥시, n-데실옥시, 벤질옥시, p-메틸벤질옥시 등이 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 “아르알킬”은, 아릴 및 알킬이 상기한 바와 같은 아릴-알킬 그룹을 의미한다. 바람직한 아르알킬은 저급 알킬 그룹을 포함한다. 적합한 아르알킬 그룹의 비제한적인 예는 벤질, 2-펜에틸 및 나프탈레닐메틸을 포함한다. 모 잔기에 대한 결합은 알킬을 통해 이루어진다.
- [0048] 본 발명에서 “아릴아미노기”는 탄소수 6 내지 30의 아릴기로 치환된 아민을 의미한다.
- [0049] 본 발명에서 “알킬아미노기”는 탄소수 1 내지 30의 알킬기로 치환된 아민을 의미한다.
- [0050] 본 발명에서 “아르알킬아미노기”는 탄소수 6 내지 30의 아릴-알킬기로 치환된 아민을 의미한다.
- [0051] 본 발명에서 “알카노일기”는 RCO-로 표시되는 치환기로, “아실기”로도 명명한다. 상기 R은 탄소수 1 내지 29개의 알킬을 의미하며, 직쇄(linear), 측쇄(branched) 또는 사이클릭(cyclic) 구조를 포함할 수 있다. 이러한 알카노일기의 예로는 메타노일기, 에타노일기, n-프로파노일기, 이소프로파노일기, n-부타노일기, t-부타노일기, n-헥사노일기, n-옥타노일기, n-데카노일기, n-도데카노일기, 벤조일기 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0052] 본 명세서에서 “치환”은 화합물의 탄소 원자에 결합된 수소 원자가 다른 치환기로 바뀌는 것을 의미하며, 치환되는 위치는 수소 원자가 치환되는 위치 즉, 치환기가 치환 가능한 위치라면 한정하지 않으며, 2 이상 치환되는

경우, 2 이 상의 치환기는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 치환기는 수소, 중수소, 시아노기, 니트로기, 할로젠기, 히드록시기, 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 탄소수 2 내지 24의 알킬닐기, 탄소수 2 내지 30의 헤테로알킬기, 탄소수 6 내지 30의 아르알킬기, 탄소수 5 내지 30의 아릴기, 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기, 탄소수 3 내지 30의 헤테로아릴알킬기, 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 탄소수 1 내지 30의 알킬아민기, 탄소수 6 내지 30의 아릴아민기, 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아민기 및 탄소수 2 내지 24의 헤테로 아릴아민기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으나, 상기 예시에 국한되지 않는다.

발명의 효과

[0053]

본 발명은 태반 줄기세포 배양액 및 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 온도 변화에 의한 졸-겔 상전이 특성을 이용하여 태반 줄기세포 배양액에 포함된 엑소좀 등 치료 유효 인자의 서방형 방출을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 우수한 점막 접착성을 통해 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 글리콜 키토산 유도체(HGC)의 화학적 조성 및 구조적 특성을 확인한 것으로, HGC의 치환율을 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 글리콜 키토산 유도체(HGC)의 화학적 조성 및 구조적 특성을 확인한 것으로, HGC가 성공적으로 합성되었음을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 졸-겔 상전이 거동을 확인한 것으로, 온도 감응성을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 졸-겔 상전이 거동을 육안으로 관찰한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 졸-겔 상전이 거동을 유변학적으로 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 저장 탄성률을 측정한 것으로, 본 발명의 태반 줄기세포 배양액을 포함한 하이드로겔 조성물의 증가된 물성을 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 주입형 특성을 확인한 것으로, 25℃에서 shear-thinning 거동을 측정한 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 주입형 특성을 확인한 것으로, 37℃에서 recovery 특성을 측정한 것이다.

도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물과 섬유아세포를 공배양하여 섬유아세포의 증식을 확인한 결과이다.

도 10는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물과 섬유아세포를 공배양하여 섬유아세포의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물이 섬유아세포의 재생과 관련된 성장 인자에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물이 혈관 형성에 관련된 성장 인자에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 체외 상처 치유 능력을 확인한 것으로, 체외에서 섬유아세포에 상처를 내어 재생능력을 육안으로 확인한 결과이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 체외 상처 치유 능력을 확인한 것으로, 체외에서 섬유아세포에 상처를 내어 재생능력을 정량화한 결과이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 체외 혈관 형성 능력을 확인한 것으로, 혈관 형성 후 염색하여 육안으로 확인한 결과이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 체외 혈관 형성 능력을 정량화하여 확인한 것으로,

혈관 형성과 관련된 지표를 정량적으로 나타낸 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 제형 안정성을 확인한 것으로, 주입 후 37℃에서 겔 형태를 유지하고 있는 것을 관찰한 결과이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 상처 치유 능력을 확인한 것으로, 25 및 37℃에서 본 발명의 태반 줄기세포 배양액이 함유된 mucin이 혼합된 하이드로겔 조성물의 증가된 접착 특성을 나타낸 결과이다.

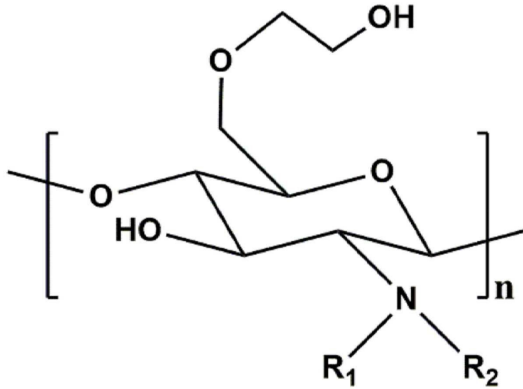
도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 상처 치유 능력을 확인한 것으로, 쥐의 등에 상처를 낸 후 2주 간 상처의 형태를 확인한 결과이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 조성물의 상처 치유 능력을 확인한 것으로, 쥐의 등에 상처를 낸 후 3일과 7일차에 쥐를 희생시켜 상처 조직을 획득한 뒤 조직을 염색하여 상처 치유 능력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0056] 열 가역적 졸-겔 전이 특성(Thermo-reversible sol-gel transition properties)을 나타내는 써모겔(Thermogel)은 졸 상태로 주사할 수 있고, 체내에서 겔화되므로 국부적 약물 전달에 적합한 제형이다. 구체적으로, 써모겔은 졸 상태에서 다양한 약물 및 세포와의 혼합이 용이하여 주입형 약물 전달체로 우수한 특성을 보이며, 생체 온도 조건에서 겔로 응고되어 약물 방출제어 및 세포 생착을 향상시킬 수 있는 장점이 있으나, 종래 써모겔은 복잡한 합성단계나 복합체 형성이 필요한 단점이 존재할 뿐만 아니라, 안정성 및 생분해성이 충분하지 못하고, 방출제어 특성에 한계가 존재하였다.
- [0057] 한편, 태반은 가장 최근 발견되어 연구되고 있는 중간엽 줄기세포의 기원조직으로, 태반에는 여러 종류의 줄기세포가 존재하며, 이들은 모체와 태아 측 근접부위에 따라 분화능력이 다르다는 연구 결과가 존재한다.
- [0058] 이 중, 특히 양수(Amniotic fluid)는 태아와 함께 생성되어 가장 빨리 채취 가능한 태반 유래 줄기세포 기원 조직으로 중간엽 줄기세포 마커뿐만 아니라, 전분화능 마커 등 다양한 성장인자를 포함한 조직 재생 관련 마커가 발현되며, 우수한 활성과 분화능력으로 치료적 잠재성이 높다고 알려져 있다.
- [0059] 이와 같은 줄기세포를 이용한 치료제 개발 분야는 이미 많은 연구 개발이 진행되고 있으며, 구체적으로 골수, 지방조직 유래 성체줄기세포 등을 이용한 연구 및 신약 개발은 비교적 활발히 이루어지고 있으나, 상기 "태반" 줄기세포를 이용한 조직 재생용 치료제 개발은 아직까지 시도된 적이 없는 상태이다.
- [0060] 이에, 본 발명자는 생체 적합성, 낮은 독성 및 점막 점착 특성과 같은 다양한 물리화학적 및 생리학적 특성이 있는 키토산에 대하여 간단한 개질을 통해 온도 가변형 하이드로겔을 제조하였다. 한편, 윤리적 문제가 적고 비침습적인 방법을 통해 채취가 용이한 태반 줄기세포에서 유래된 엑소솜 등 치료 유효인자를 상기 하이드로겔에 조합하는 연구를 진행한 결과, 졸-겔 상전이 특성을 통해 체내 주입 시 서방성 방출 효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 우수한 조직 재생 효과를 발휘할 수 있는 신규 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물을 개발하였다.
- [0061] 본 발명의 일 실시예에 따른 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 태반 줄기세포 배양액 및 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 것이다:

[0062] [화학식 1]



[0063]

[0064] 여기서,

[0065] n은 10 내지 1000의 정수이며,

[0066] R₁ 및 R₂는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어, 상기 "줄기세포(stem cell)"는 상대적으로 발생이 덜된 미분화된 세포로서 특정 조직의 세포로 분화할 수 있는 능력을 지닌 세포를 의미한다. 줄기세포는 분화 능력을 기준으로 만능줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell) 또는 단분화능 줄기세포(unipotent stem cell)로 나눌 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 기원이 되는 세포에 따라 배아 줄기세포(embryonic stem cell), 성체 줄기세포(adult stem cell) 또는 인간 체세포로부터 제조된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로 구분될 수 있다.

[0068] 구체적으로, 본 발명에 따른 줄기세포는 성체 줄기세포일 수 있으며, 상기 용어, 성체 줄기세포는 성체의 조직 또는 기관에 존재하고, 원하는 세포로 분화가 가능하며 자기복제(self-renew)를 할 수 있는 미분화된 세포를 의미한다. 일 예로, 본 발명에 따른 줄기세포는 양수, 양막 및 제대혈 중 어느 하나로부터 유래한 성체줄기세포일 수 있고, 보다 구체적으로, 상기 양수, 양막 및 제대혈 중 어느 하나로부터 유래한 중간엽 줄기세포 또는 상피 줄기세포일 수 있다.

[0069] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체는 소수성 치환기를 포함하며, 치환기로서 글리콜기, 아민기, 아세틸기 및 소수성기가 존재한다. 상기 글리콜기와 아민기는 친수성을, 아세틸기와 소수성기는 소수성을 나타내는 점에서, 본 발명에 따른 상기 글리콜 키토산 유도체는 "양친성 고분자"라 할 수 있다.

[0070] 이에 본 발명에 따른 소수성 치환기를 갖는 글리콜 키토산 유도체는 수용액 내에서 소수성기에 의해 분자 간 또는 분자 내 소수성 결합에 의한 소수성 블록으로 인해 자기 집합체를 이루어 수용액 내에서 미세 영역을 형성하고, 상기 친수성 블록이 바깥쪽으로 감싸면서 친수성기가 수용액과 직접 접촉하여 물에 용해되는 특성을 갖는다. 이에 상기 소수성 치환기를 갖는 글리콜 키토산 유도체는 높은 용해도 특성과 함께 수용액 내 나노 수준의 크기를 갖는 마이셀을 형성할 수 있는 특징이 있다.

[0071] 이에, 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 상기 용해도 특성 및 마이셀 형성 특성을 이용하여 특정 약물을 포함하여 약물 전달을 위한 전달체로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 하기 살필 바와 같이 온도 변화에 따른 졸-겔 상전이 특성을 통해 체내 주입 후, 겔로 상전이됨으로써 약물의 우수한 서방성 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있는 것이다.

[0072] 구체적으로, 상기 글리콜 키토산 유도체에 포함되어 체내 전달될 수 있는 약물은 특별히 한정되지 않으며, 친수성, 소수성 및 난용성 약물을 모두 포함하는 것으로, 해당 분야의 공지된 약물인 한 모두 포함하는 것으로 정의

한다.

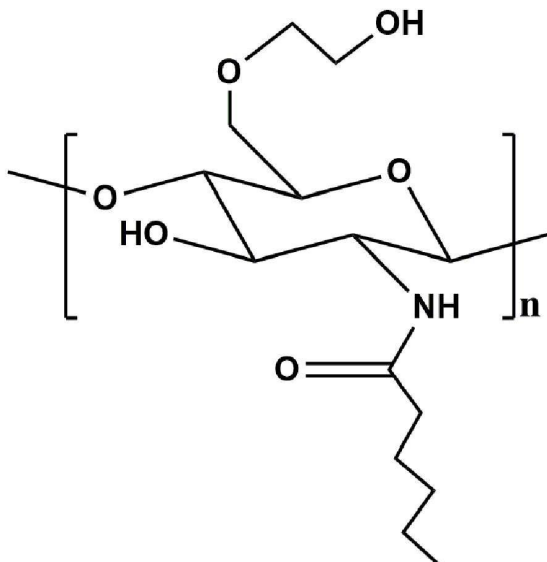
[0073] 상기 약물 중, 수용성 약물로는 인산베타메타존, 인산텍사메타존, 인산프레드니졸론, 숙신산, 프레드니졸론, 숙신산히드로코르티존, 반코마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 숙신산클로람페니콜, 라타목세프, 세프피롬, 카루모남, 인산클린다마이신 및 아바카비르 등이 있으며, 소수성 및 난용성 약물로는 에난트산 테스토스테론, 프로피온산테스토스테론, 테스토스테론, 에스트라디올, 발레르산에스트라디올, 벤조산에스트라디올, 아세트산텍사메타존, 베타메타존, 디프로피온산베타메타존, 발레르산베타메타존, 아세트산프레드니졸론, 시클로스포린, 타크롤리무스, 파클리탁셀, 염산이리노테칸, 시스플라틴, 메소트렉세이트, 카르모푸르, 테가푸르, 독소루비신, 클라리스로마이신, 아즈트레오남, 세프니딜, 날리딕산, 오픈록사신, 노르플록사신, 케토프로펜, 플루르비프로펜, 플루르비프로펜악세틸, 클로로프로마진, 다이아제팜, 니페디핀, 염산니카르디핀, 베실산아무로디핀, 칸테사르탄실렉세틸, 아시클로비르, 비다라빈, 에파비렌즈, 알프로스타딜, 디노프로스톤, 유비데카레논, 비타민 A (레티놀), 비타민 D, 비타민 E 및 비타민 K 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 구체적으로, 상기 R_1 은 수소이다.

[0075] 보다 구체적으로, 상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기이다.

[0076] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것이다:

[0077] [화학식 2]



[0078]

[0079] 여기서,

[0080] n 은 10 내지 1000의 정수이다.

[0081] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체의 알카노일기의 치환도는 25 내지 45%인 것이며, 보다 구체적으로는, 35 내지 40% 일 수 있다. 상기 치환도의 범위에서 우수한 졸-겔 상전이 거동을 나타낼 수 있으며, 상기 범위를 벗어나는 경우 가역적인 졸-겔 상전이 특성이 발휘되지 않을 수 있다.

[0082] 구체적으로, 상기 치환도는 "헥사노일기"의 치환도(degree of hexanoylation, DH)일 수 있다.

[0083] 상기 태반 줄기세포 배양액은 태반 줄기세포 유래 치료 유효인자 및 엑소좀(exosome)을 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 태반 줄기세포 배양액은 낮은 산소 농도 하에서 태반 줄기세포를 배양함으로써 획득될 수 있는 것으로, 상기 낮은 산소 농도는 통상적인 대기하에서의 평균 산소 농도인 약 20%보다 낮은 농도일 수 있다. 구체적으로, 상기 낮은 산소 농도는 10% 이하, 0.1 내지 10%, 0.1 내지 8%, 0.1 내지 5%, 0.1 내지 4%, 1 내지 10%, 1 내지 8%, 1 내지 5%, 1 내지 4%, 2 내지 10%, 2 내지 8%, 2 내지 5% 또는 2 내지 4%일 수 있다. 또한, 상기 배양은 1 내지 80시간, 1 내지 70시간, 1 내지 60시간, 1 내지 50시간, 10 내지 80시간, 10 내지 70시간, 10 내지 60시간, 10 내지 50시간, 20 내지 80시간, 20 내지 70시간, 20 내지 60시간, 20 내지 50시간, 30 내지 80시간, 30 내지 70시간, 30 내지 60시간, 30 내지 50시간, 40 내지 80시간, 40 내지 70시간, 40 내지 60시간

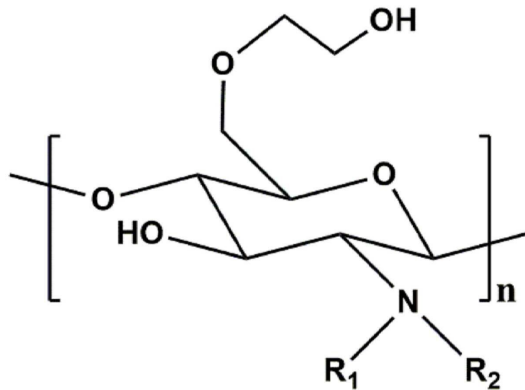
또는 40 내지 50시간 동안 수행될 수 있다.

- [0085] 상기와 같이 배양된 줄기세포 배양액은 통상적인 조건에서 배양된 배양액과 비교하여, 엑소좀 등의 치료 유효인자를 더 높은 수준으로 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 하이드로겔 조성물은 태반 줄기세포 배양액에 포함되는 엑소좀 등의 치료 유효인자에 의해 목적하는 조직 재생 효과를 나타낼 수 있는 것이다.
- [0086] 한편, 상기 "치료 유효인자"는 상기 태반 줄기세포 배양액에 포함되어 있는 것으로, 상기 엑소좀을 제외한 재생 관련 성장인자로, EGF 및/또는 VEGF일 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니며, 태반 줄기세포 배양액 내에 포함되어 조직 재생 효과를 나타내는 인자인 한 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 상기 글리콜 키토산 유도체는 온도 변화에 따른 졸-겔 상전이 거동을 나타내는 것이다.
- [0088] 즉, 상기 글리콜 키토산 유도체는 본 발명 조성물에 있어서, "온도 감응성 하이드로겔 조성물"의 기본 원료로, 상기 "온도 감응성 하이드로겔"이란 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 고분자로서 특정 온도에서 가역적인 졸-겔 상전이(sol-gel phase transition)가 일어나는 고분자를 의미한다. 본 발명의 일 실시예 또는 실험예에 따르면 상기 하이드로겔 조성물은 실온에서 액체 상태로 존재할 수 있다. 상기 실온은 예컨대 20 ℃ 내지 30 ℃, 20 ℃ 내지 28 ℃, 20 ℃ 내지 26 ℃, 20 ℃ 내지 25 ℃, 22 ℃ 내지 30 ℃, 22 ℃ 내지 28 ℃, 22 ℃ 내지 26 ℃, 22 ℃ 내지 25 ℃, 24 ℃ 내지 30 ℃, 24 ℃ 내지 28 ℃, 24 ℃ 내지 26 ℃, 24 ℃ 내지 25 ℃, 또는 25 ℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 실온의 범위 내에서 허용 가능한 온도의 오차 범위를 모두 포함할 수 있다. 또한, 상기 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 체온에서 졸-겔(sol-gel) 전이를 통해 하이드로겔 상태로 변형이 일어날 수 있다. 상기 체온은 예컨대 33 ℃ 내지 40 ℃, 33 ℃ 내지 39 ℃, 33 ℃ 내지 38 ℃, 33 ℃ 내지 37 ℃, 35 ℃ 내지 40 ℃, 35 ℃ 내지 39 ℃, 35 ℃ 내지 38 ℃, 35 ℃ 내지 37 ℃, 36 ℃ 내지 40 ℃, 36 ℃ 내지 39 ℃, 36 ℃ 내지 38 ℃, 36 ℃ 내지 37 ℃, 또는 37 ℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 체온의 범위 내에서 허용 가능한 온도의 오차 범위를 모두 포함할 수 있다.
- [0089] 구체적으로, 본 발명의 상기 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 20 내지 28℃에서 졸 상태로 존재하며, 29 내지 40℃에서 졸-겔 전이를 통해 하이드로겔 상태로 상 전이가 일어나는 것이다.
- [0090] 구체적으로는, 본 발명의 상기 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 겔화 온도(T_{gel})은 25 내지 36 ℃ 범위인 것이다. 한편, 바람직하게는 상기 겔화 온도는 29 내지 34 ℃ 일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 29.2 내지 31.6 ℃의 범위인 것이다.
- [0091] 바람직하게는, 본 발명 하이드로겔 조성물은 25℃ 조건에서의 저장 탄성률(A)에 대한 37℃ 조건에서의 저장 탄성률(B)의 값(B/A)이 5 내지 8.5인 것이다. 즉, 본 발명 조성물의 B/A 값이 상기 범위에 의할 경우, 우수한 졸-겔 상 전이 특성을 나타내어 제형 안정성 및 서방성 효과를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 이를 통해 본 발명의 목적인 조직 재생 효과를 극대화시킬 수 있는 것이다.
- [0092] 다만, 상기 범위 미만이거나 상기 범위를 초과할 경우 가역적 졸-겔 상전이 효과가 미미할 수 있다.
- [0093] 본 발명은 앞서 설명한 바와 같이, 알카노일기의 치환도가 25 내지 45%인 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 것이며, 본 발명의 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 겔화 온도(T_{gel})가 25 내지 36 ℃인 것이다.
- [0094] 즉, 본 발명 조성물은 상기와 같은 치환도 범위 및 겔화 온도 범위를 동시에 만족하여, 우수한 졸-겔 상 전이 특성을 발휘할 수 있는 특징이 있는 것이다. 이를 통해 본 하이드로겔 조성물의 제형 안정성 및 체내 유효성분의 서방성 효과를 발휘할 수 있으며, 궁극적으로는 본 발명에서 목적하는 조직 재생 효과를 극대화시킬 수 있는 것이다.
- [0095] 보다 바람직하게는, 본 발명의 온도 감응성 하이드로겔 조성물은 25℃ 조건에서의 저장 탄성률(A)에 대한 37℃ 조건에서의 저장 탄성률(B)의 값(B/A)이 5 내지 8.5인 것으로, 이에 의할 경우, 졸-겔 상전이 특성을 보다 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0096] 상기 태반 줄기세포는 양수, 양막 및 제대혈 중 어느 하나로부터 유래한 줄기세포인 것이다.
- [0097] 구체적으로는, 상기 태반 줄기세포는 양수 유래 줄기세포로, 바람직하게는 양수 유래 중간엽줄기세포인 것이다.
- [0098] 양수는 엑소좀이 풍부한 체액으로, 양수 유래 줄기세포 또한 여러 줄기세포 기원 중 세포 당 많은 양의 엑소좀을 생산할 수 있는 장점이 있다. 상기 양수 줄기세포 유래 엑소좀은 HGF, TGF β 등을 운반하여 면역 억제 작용

에 관여한다는 결과와 급성 간부전, 복부 대동맥류 및 망막 염증 등에서 염증인자를 감소시키고 항염증인자(IL-10)의 발현을 증가시킴으로써 염증 손상으로부터 조직을 보호하는 것으로 알려져 있다.

- [0099] 이에, 본 발명은 기존 조직 재생 치료 용도로 잘 이용되지 않은 태반 줄기세포를 이용하고, 그 중 엑소좀이 풍부한 양수로부터 유래한 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함함으로써, 상기 엑소좀 등의 치료 유효인자의 우수한 조직 재생 특성을 이용하는 점에 특징이 있는 것이다.
- [0100] 한편, 상기 태반 줄기세포는 인간 또는 말과 동물 유래 태반 줄기세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 말과 동물 유래 태반 줄기세포일 수 있다.
- [0101] 상기 "말과 동물"이란, 말과(Equidae; Genus Eaus)에 속하는 포유류 동물로, 말, 당나귀, 노새, 그레이얼룩말, 산얼룩말, 얼룩말아속의 과가, 아시아 야생당나귀, 아프리카 야생당나귀, 캄당나귀, 타르판, 프세발스키말, 시리아 당나귀, 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종 등이 이에 속한다.
- [0102] 상기 조성물은 세포생장인자의 증가, 혈관 형성 및 상처 치유 효과가 우수한 것이다.
- [0103] 즉, 본 발명 하이드로겔 조성물은 줄-겔 상전이 특성이 우수한 글리콜 키토산 유도체를 이용하여, 체내 주입 시, 우수한 제형 안정성 및 점막 접착성을 나타낼 수 있으며, 상기 조성물에 포함된 태반 유래 줄기세포 배양액 및 이에 포함된 엑소좀 등 치료 유효인자의 작용으로 세포생장인자를 증가시키고, 혈관을 형성시킴, 상처 치유 효과를 발휘함으로써, 궁극적으로 조직 재생 효과를 나타낼 수 있는 것이다.
- [0104] 바람직하게는 본 발명 하이드로겔 조성물에 포함되는 태반 줄기세포 배양액은 고분자인 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체 농도에 대하여 1 내지 10%의 농도 범위로 포함되는 것으로, 다시 말해, 태반 줄기세포 배양액 및 상기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체는 0.01:1 내지 0.1:1의 농도비로 포함되는 것이다.
- [0105] 즉, 태반 줄기세포 배양액 및 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체가 상기 농도비로 포함되는 경우, 글리콜 키토산 유도체가 발휘하는 줄-겔 상 전이 특성을 우수하게 유지하여 줄기세포 배양액의 서방성 효과를 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명이 목적하는 조직 재생 효과를 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0106] 다만, 상기 농도비의 범위를 초과하는 경우, 상대적으로 글리콜 키토산 유도체의 비율이 작아져 줄-겔 상 전이 특성을 저해하고 서방성 효과를 떨어뜨릴 수 있으며, 상기 농도비 범위 미만일 경우, 태반 줄기세포 배양액의 비율이 작아져 조직 재생 효과를 충분히 발휘하지 못할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 바이오 패치는 상기 조성물을 포함하는 것이다.
- [0108] 상기 "바이오 패치"는 얇은 시트 또는 필름 형상으로서 바람직하게는 박막 형상을 가질 수 있으며, 피부나 인체의 장기 등 인체 부위의 어느 곳이든 부착하여 생물학적 기능을 활성화하고 세포의 증식이나 분화 등이 가능하도록 생물학적, 치료학적, 의학적 기능성을 가진 패치를 의미한다. 본질적으로는 패치의 주성분은 세포가 배양되어 있으면서 패치 재질은 생분해성을 가지므로 인체에서 분해되어 소멸되는 형태를 가진다.
- [0109] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 주사제는 상기 조성물을 포함하는 것이다.
- [0110] 구체적으로, 주사 투여 방식은 정맥 주사, 피하 주사, 피내 주사, 근육 주사, 점적 주사 등이 있으나 특별히 한정되는 것은 아니다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산 에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있으나, 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0111] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 조직 재생용 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 제조방법은 1) 태반 줄기세포를 소태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 배지에서 세포 밀집도(cell confluence)가 30 내지 40%에 도달할 때까지 배양하는 단계; 2) 상기 배지를 무혈청 배지로 교체한 후, 세포 밀집도(cell confluence)가 80 내지 90%에 도달할 때까지 배양하고, 세포 배양 상층액을 수집하는 단계; 3) 상기 상층액을 원심 분리하여 태반 줄기세포 배양액(Conditioned medium, CM)을 수득하는 단계; 및 4) 상기 줄기세포 배양액에 하기 화학식 1로 표시되는 글리콜 키토산 유도체를 혼합하는 단계를 포함하는 것이다:

[0112] [화학식 1]



[0113]

[0114] 여기서,

[0115] n은 10 내지 1000의 정수이며,

[0116] R₁ 및 R₂는 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 24의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 7 내지 30의 아르알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아르알킬아미노기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴옥시기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알카노일기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0117] 한편, 상기 4) 단계의 혼합하는 단계를 거친 후, 3 내지 5일 동안 동결 건조한 후, DPBS에 용해시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0119] 한편, 통계 분석은 Graphpad Prism 프로그램을 통해 수행되었으며, 최소 3번의 복제가 수행되었다. T-test는 growth kinetic을 위한 분석에 사용되었으며, 일원 ANOVA는 세포 증식 능력 및 세포 생존력에 대한 분석에 사용되었다. 통계적으로 유의한 데이터는 위 첨자로 표시하였다.

[0120] [제조예]

[0121] 글리콜 키토산 유도체(HGC)의 합성

[0122] 글리콜 키토산(Glycol Chitosan, GC)을 증류수에 녹인 용액과 메탄올을 1:1의 중량비로 혼합하여, GC 용액을 준비하였다. 준비한 GC 용액에 hexanoyl anhydride를 반응몰비(hexanoic anhydride/glucosamine residue) 0.39로 첨가하여 치환율을 조절하였다. 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응시킨 후, 반응 용액을 아세톤에 침전하였다. 침전된 물질은 원심분리를 이용하여 수집한 후, 이를 다시 증류수에 녹여 투석막을 이용해 투석하였고, 동결건조(Dry-freezing)를 통하여 파우더 형태의 HGC를 최종적으로 수득하였다.

[0123] 대만 줄기세포 배양액의 제조

[0124] 양수 샘플은 임신이 확인된 암말의 분만 시 양막낭 파열 전, 18 G를 장착한 50 cc 주사기로 획득하여 50 ml 시험관으로 옮긴 후, 약 4 °C를 유지한 채로 평균 약 3시간 내에 실험실로 운반하였다.

[0125] 채집한 양수는 100 μM cell strainer를 사용하여 거른 후에 5% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS(Phosphate Buffered Saline)과 1:1로 섞은 뒤 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하였으며, 회수한 펠렛은 다시 5 % 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS를 이용 세척 및 원심분리하는 과정을 2회 진행하여 단핵세포를 분리함을 통해, 말 양수 유래 중간엽줄기세포를 수득하였다.

[0126] 세포 배양 접시에 passage 7 이하의 상기 말 양수 유래 중간엽줄기세포를 1.5 x 10⁶ 세포/150mm로 세포가 성장

하는 데 필요한 소 태아 혈청이 함유된 DMEM 배지에서 배양하고, 다음날 밀집도(confluence)가 30%일 때 치료적 목적으로 사용하기 위하여 혈청이 제거된 무혈청 배지로 완전히 교체하였다. 무혈청 배지로 교체 후, 48시간 안에 세포 밀집도가 80%가 되었을 때 수집하였다. 수집된 상층액에 대하여 몇 차례의 원심분리 과정을 거쳐 죽은 세포와 세포 파편을 제거하여 최종적으로 본 발명의 태반 줄기세포 배양액(조정 배지, Conditioned medium, CM)을 수득하였다.

[0127] 한편, 상기 혈청이 함유된 배지(Serum media)로는 15 % FBS, 1 % 페니실린-스트렙토마이신, 및 1 % 글루타맥스가 첨가된 DMEM(Modified Eagle's medium) 배지(Gibco)를 사용하였으며, 무혈청 배지(Serum free media)로는 하기 표 1의 조성으로 구성된 배지를 사용하였으며, 선택적으로, 하기 표 2의 첨가제를 추가하여 사용하였다.

표 1

성분	양(mL)	농도	구입처
Base			
DMEM/F-12(Ham)	462.5		Gibco
Penicillin/Streptomycin	5		Gibco
Buffering agent			
Hepes solution	5	10 mM	Sigma
Sodium pyruvate	5	1 mM	Sigma
Polyamines			
Putrescine	0.5	0.1 μ M	Sigma
Hormones			
Progesterone	0.5	0.2 μ M	Sigma
Triiodothyronine	0.5	0.5 μ M	Sigma
Thyroxine	0.5	0.45 μ M	Sigma
Compound			
Insulin-Transferrin-Selenium(ITS)	5	1 %	Gibco
Vitamin			
Glutamax	5	1 %	Gibco
Amino acid			
L-Glutamine	5	2 mM	Sigma
Growth factors			
EGF	0.2	10 ng/mL	Sigma
bFGF	0.025	10 ng/mL	Sigma

표 2

성분	농도	구입처
SR3(Serum replacement 3)	N/A	Sigma
PVP	10 %	Sigma
Albumin	2 %	Sigma
Fibronectin	1 μ g/mL	Sigma
Silk fibroin	0.05 %	Sigma
Spirulina	1~10%	Sigma

[0130] 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 제조

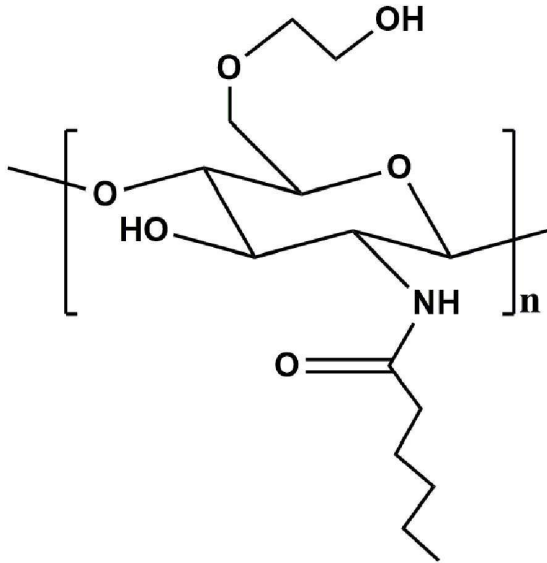
[0131] 본 발명의 글리콜 키토산 유도체(HGC) 및 태반 줄기세포 배양액(Conditioned medium, CM)를 함유한 온도 감응성 하이드로겔(써모겔) 조성물은 글리콜 키토산 유도체(HGC) 및 태반 줄기세포 배양액(CM)을 물리적으로 혼합하여 제조하였다.

[0132] 실시예 1

[0133] 상기 제조된 글리콜 키토산 유도체(HGC) 파우더를 DPBS 용액(pH 7.4, 0.01 M)에 2wt%(w/v)의 농도로 녹여 HGC 온도 감응성 하이드로겔(HGC 써모겔)을 제조하였다.

- [0134] 실시예 2
- [0135] 글리콜 키토산 유도체(HGC) 파우더를 태반 줄기세포 배양액(CM)에 2wt%로 용해하여 HGC-CM 온도 감응성 하이드로겔(HGC-CM 써모겔)을 제조하였다.
- [0136] 실시예 3
- [0137] 글리콜 키토산 유도체(HGC) 파우더를 태반 줄기세포 배양액(CM)에 2wt%로 용해한 후, 3일 동안 동결건조를 통하여 파우더 형태의 HGC-CM-F 시료를 수득하였다. 상기 파우더 형태의 시료를 다시 상기 DPBS 용액에 2wt%(w/v)의 농도로 용해시켜 HGC-CM-F 온도 감응성 하이드로겔(HGC-CM-F 써모겔)을 제조하였다.
- [0138] 비교예
- [0139] 태반 줄기세포를 배양한 조정배지가 아닌, 15%의 FBS(Fetal Bovine Serum (Gibco 16000-044)) 및 1%의 P/S(Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL, Gibco 15140-122))을 포함하는 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco 11995-073)) 세포 배양액을 준비한 후, 이에 상기 글리콜 키토산 유도체(HGC) 파우더를 혼합하여 Control 그룹으로 사용된 HGC-M hydrogel을 제조하였다.
- [0140] [실험예]
- [0141] 글리콜 키토산 유도체의 화학적 조성 및 구조 특성 분석
- [0142] $^1\text{H-NMR}$ 분석
- [0143] 공명주파수 600MHz에서 얻은 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에 의해 상기 HGC의 치환율과 화학적 조성 및 구조적 특성을 분석하였다. 각 샘플은 용매 D_2O 에 녹였고, 4.85 ppm의 D_2O 피크를 기준 피크로 설정하였다.
- [0144] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 글리콜 키토산의 글루코피라노실(Glucopyranosyl) 고리의 수소 피크가 3.2 내지 4.0ppm에서 나타났고, 글리콜 키토산에 도입된 hexanoyl group에 대응하는 특성 피크들이 각각 0.8, 1.3, 1.6 및 2.3ppm에서 관찰되었다. 한편, 글리콜 키토산 및 hexanoyl group의 통합된 수소 피크를 상대적으로 비교함으로써 degree of hexanoylation(DH)이 $38.5 \pm 0.4\%$ 인 글리콜 키토산 유도체(HGC)가 합성된 것을 확인하였다.
- [0145] ATR-FTIR 분석
- [0146] ATR-FTIR 스펙트럼을 통한 화학적 및 구조적 특성 분석을 진행하였다. 샘플은 동결건조한 후 파우더 형태로 얻어진 글리콜 키토산 유도체(HGC)를 사용하였으며, 기기의 스펙트럼은 750 내지 4000cm^{-1} 주파수 범위에서 4cm^{-1} 의 분해능, 32회 스캔을 통해 측정하였다.
- [0147] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, -OH group의 신축 진동 피크가 3300cm^{-1} 에서 나타났고, 동일 영역에서 N-H 신축 진동 피크가 겹쳐 나타난 것을 확인하였다. 한편, 2890cm^{-1} 에서의 흡수 피크는 HGC의 $-\text{CH}_3$ 와 $-\text{CH}_2-$ 의 C-H 신축 진동에 의해 나타났으며, 1655cm^{-1} 및 1555cm^{-1} 에서 흡수 띠의 존재는 각각 HGC의 카보닐 신축 진동과 아미노아세틸기의 아마이드 II 굽힘 진동에 해당한다.
- [0148] 따라서, 헥사노일화 후, 아마이드 II 띠가 나타나는 것을 보아, 본 발명의 하기 화학식 2의 글리콜 키토산 유도체(HGC)가 성공적으로 합성되었음을 알 수 있다:

[0149] [화학식 2]



[0150]

[0151] 여기서,

[0152] n은 200 내지 600의 정수이다.

[0153] 온도 감응성 하이드로겔 조성물의 졸-겔 상전이 거동 확인

[0154] 상기 실시예 1 내지 3의 하이드로겔 조성물의 온도감응성 졸-겔 상전이 거동을 승온 과정과 함께 tube inverting 방법으로 측정하였다. 졸-겔 상전이 온도는 invert한 tube에서 30초간 관찰하였을 때 흐르지 않는 온도를 기준으로 정하였다.

[0155] 그 결과, 도 3 및 4에서 확인할 수 있듯이 본 발명의 글리콜 키토산 유도체 HGC(2wt%) 수용액은 온도가 증가함에 따라 소수성 상호작용에 의해 졸 상태에서 겔 상태로 상전이를 보임을 확인하였으며, 태반 줄기세포 배양액(CM)이 loading된 HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔(2wt%)에서도 비슷한 sol-gel 상전이가 보임을 확인하였다. 한편, Control group인 HGC-M hydrogel에서는 다른 group에 비해 높은 온도 범위에서 겔화 온도(T_{gel})를 보임을 확인하였다.

[0156] 유변학적 졸-겔 상전이 거동 확인

[0157] 졸-겔 상전이 거동을 유변학적으로 확인하기 위해 회전식 레오미터를 사용하여 측정하였다. 졸-겔 상전이 온도는 10℃에서 50℃까지 1℃/min의 승온 속도로 1Hz frequency로 frequency sweep method을 이용하여 분석하였다.

[0158] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이, HGC 써모겔, HGC-M 하이드로겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F(2wt%) 써모겔의 온도에 따른 storage modulus(G')과 loss modulus(G'')의 변화를 통해 각각의 시료의 졸-겔 상전이를 확인하였다.

[0159] G' 과 G'' 이 교차하는 cross over 지점을 겔화 온도로 보았을 때, HGC 써모겔, HGC-M 하이드로겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔의 T_{gel} 은 각각 $32.6 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$, $35.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, $30.7 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 및 $30.4 \pm 1.2^{\circ}\text{C}$ 에서 관찰되었다.

[0160] 결과적으로 기존 써모겔인 HGC뿐만 아니라 HGC에 태반 줄기세포 배양액(CM)을 loading한 시료에서도 졸-겔 상전이 거동인 써모겔의 특성을 보임을 확인하였다.

[0161] 저장 탄성률 평가

[0162] 저장 탄성률을 분석하기 위해 회전식 레오미터를 사용하였다. 각 하이드로겔을 플레이트에 로딩하고, 25℃ 및 37℃에서 1Hz의 일정한 frequency로 측정하였다.

[0163] 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있듯이, 25℃ 및 37℃ 모두 단독 HGC 써모겔보다 태반 줄기세포 배양액(CM)을 포함하는 HGC-CM 써모겔, HGC-CM-F 써모겔의 storage modulus 값이 증가됨을 확인하였다. 이는 CM이 물리적으로

혼합됨으로써 추가 단백질과 같은 유효 인자들과의 상호작용에 의해 modulus 값이 증가된 것을 의미한다고 할 것이다.

[0164] 또한, HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F(2wt%) 써모겔의 storage modulus 값은 각각 25℃보다 37℃에서는 조금 더 증가된 storage modulus를 나타냄을 확인하였으며, 이는 상온에서 졸 상태인 하이드로겔이 상전이가 일어나 체온과 비슷한 37℃에서는 겔 상태가 되어 나타난 결과에 해당한다고 할 것이다.

[0165] 주입형 특성 평가

[0166] HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔의 주입형 특성은 회전식 레오미터로 측정하였다. 25℃ 및 37℃에서 shear rate에 따른 viscosity를 측정함으로써 shear-thinning 거동과 recovery 특성을 확인하였다.

[0167] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있듯이, 25℃에서 shear rate가 증가함에 따라 viscosity가 감소하는 바람직한 shear-thinning 거동을 보였으며 이는 주입형 하이드로겔로서 적용할 수 있음을 확인한 결과이다. 한편, Recovery 특성은 37℃에서 shear rate를 번갈아 주었을 때 viscosity를 회복하는 것으로 평가하였다. 이러한 recovery test를 4회 반복하였을 때, 도 8에서 확인할 수 있듯이 우수한 탄성 회복을 나타냄을 확인하였다.

[0168] 하이드로겔 타입별 증식능력 및 생존율 확인

[0169] HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔을 섬유아세포와 공배양 하여 섬유아세포의 증식과 생존율을 세포 계수기를 사용하여 확인하였다.

[0170] 그 결과, 도 9 및 10에서 확인할 수 있듯이, HGC-CM 써모겔에서 공배양하지 않거나(No hydrogel), HGC 써모겔과 공배양한 그룹과 비교하여 HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔에 의할 경우 더 많은 섬유아세포가 증식한 것을 확인할 수 있었으며(도 9), 생존율은 모든 그룹에서 큰 차이를 나타내지 않음을 확인하였다(도 10).

[0171] 성장인자의 변화 확인

[0172] 세포 배양 접시에 섬유아세포를 배양하고, 밀집도가 100%일 때 200ul 피펫팁을 이용하여 상처를 내었으며, 트랜스 웰에 No-hydrogel, HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔을 삽입하고 무혈청 배지에서 48시간 동안 추가적으로 배양하였다. 한편, Control로는 0.05% FBS를 함유한 starvation medium에서 키운 세포를 사용하였다.

[0173] 섬유아세포와 48 시간 공배양 이후, 상층액을 모아 효소면역측정법을 통해 상피세포성장인자(Epidermal growth factor, EGF)와 혈관내피세포성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 변화를 확인하였다.

[0174] 그 결과, 도 11 및 도 12에서 확인할 수 있듯이, 세포재생인자(도 11)와 혈관내피세포성장인자(도 12)가 HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔과 공배양 하였을 때 EGF, VEGF가 모두 증가하는 것을 확인하였다.

[0175] 체외 상처 치유 능력 확인

[0176] 세포 배양 접시에 섬유아세포를 배양하고, 밀집도가 100%일 때 200ul 피펫팁을 이용하여 상처를 내었다. 이후, 무혈청 배지에서 트랜스 웰을 이용하여 No-hydrogel, HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔과 공배양 하였으며, 0, 12, 24, 36, 48시간 마다 확인하여 상처가 회복되는 정도를 확인하였으며, 구체적으로, imageJ 프로그램을 이용하여 그 면적을 측정하여 평가하였다.

[0177] 그 결과, 도 13 및 14에서 확인할 수 있듯이, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔과 공배양을 한 그룹의 경우 세포의 이동이 빠르게 나타나 체외 상처 치유 능력이 높은 것으로 확인되었으며, 특히 시간이 지날수록 그 차이가 유의적으로 빠르게 나타남을 확인하였다.

[0178] 혈관 형성 능력 확인

[0179] 세포 배양 접시에 인간 태줄 정맥 내피 세포가 혈관으로 분화할 수 있도록 도와주는 Matrigel을 처리한 뒤, 인간 태줄 정맥 내피 세포를 무혈청 배지에서 No-hydrogel, HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔과 공배양시켜 혈관으로 분화하는지 여부를 확인하였다. 배양 24 시간 후, Calcein 염색을 통해 혈관으로 분화를 확인하였으며, 혈관과 관련된 지표는 imageJ 프로그램을 이용하여 측정하였다.

[0180] 그 결과, 도 15 및 16에서 확인할 수 있듯이 혈관으로 분화를 한 것을 육안으로 확인할 수 있었으며(도 15), 혈관 형성과 관련된 중요한 지표인 node, junction, segment, mesh(도 16)의 수가 본 발명의 써모겔과 공배양함으로써 유의적으로 증가함을 확인하였다. 한편, HGC-CM 써모겔과 공배양하였을 때 증가 효과가 특히 우수함을 확

인하였다.

[0181] **제형 안정성 확인**

[0182] 하이드로겔의 주입 후 제형 안정성을 평가하기 위해 HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔 2wt% 로 제조된 각 써모겔을 주사기를 이용하여 37℃에서 필터페이퍼에 압출하고, 그 성상을 비교하였다.

[0183] 그 결과, 도 17에서 확인할 수 있듯이, control group인 조정 배지(CM)는 37℃에서 주입 후에도 제형을 유지하지 못하고 졸 상태를 나타내는 반면(도 17(A)), HGC 써모겔(도 17(B)), HGC-CM 써모겔(도 17(C)) 및 HGC-CM-F 써모겔(도 17(D))은 써모겔 특성을 가져 겔 상태의 제형 안정성을 유지함을 확인하였다.

[0184] **점막 접착성 확인**

[0185] 유변학적 측정을 통해 하이드로겔의 점막 접착성을 평가하였다. HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔의 점막 접착 특성을 확인하기 위해 각각의 하이드로겔과 하이드로겔/mucin 혼합물을 준비하였다. 25℃ 및 37℃에서 측정하였으며, $\Delta G'$ 는 하이드로겔과 mucin 사이의 상호작용을 나타내는 저장 탄성률로 계산하였다.

[0186] 그 결과, 도 18에서 확인할 수 있듯이, 각각의 샘플은 25℃ 및 37℃에서 모두 $\Delta G' > 0$ 을 나타내었다. 조정 배지(CM)가 함유된 HGC-CM 써모겔, HGC-CM-F 써모겔은 단독 HGC 써모겔에 비해 더 높은 $\Delta G'$ 을 나타냈다.

[0187] 또한, 25℃ 및 37℃에서 $\Delta G'$ 값을 비교하여 써모겔의 온도에 따른 점막 접착 특성을 관찰하였다. 도 18에서 확인할 수 있듯이, 모든 써모겔은 25℃보다 37℃에서 더 높은 $\Delta G'$ 값을 나타내어 주입 후 상처 치유 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0188] **체내 상처 치유 능력 확인**

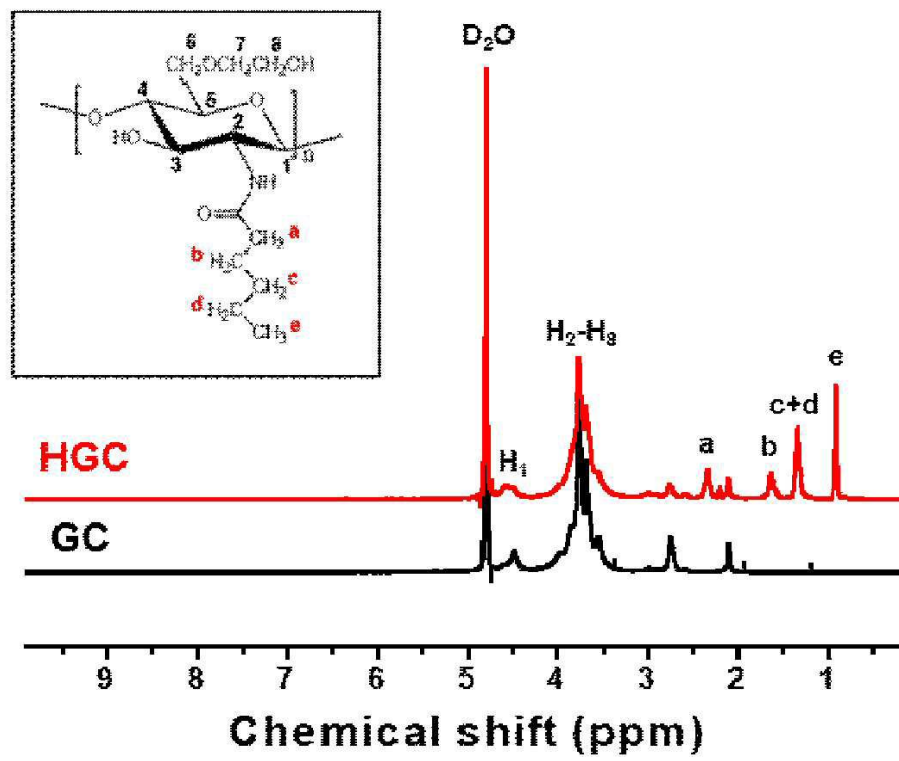
[0189] 체내에서 상처 치유 능력을 확인하기 위하여 상처 치유 모델 쥐를 이용하여 실험을 진행하였다. 마취제를 복강내 투여하여 쥐를 마취시킨 후 등의 피부에 biopsy punch를 이용하여 같은 크기의 상처를 내주었다. 상처에 각 그룹의 No-hydrogel, HGC 써모겔, HGC-CM 써모겔 및 HGC-CM-F 써모겔을 도포하여 주었으며, 그 결과를 0, 3, 7, 10, 14일 차에 확인하였다. 한편, 3일 및 7일 차에는 쥐를 희생시켜 얻은 조직을 염색하여 재생피화와 육아조직의 재생 및 섬유화를 확인하였다.

[0190] 그 결과, 도 19 및 20에서 확인할 수 있듯이, HGC-CM 써모겔과 HGC-CM-F 써모겔을 도포하여 주었을 경우, 체내 상처 치유(도 19)와 재생피화(도 20)가 빠르게 나타나는 것을 확인할 수 있다.

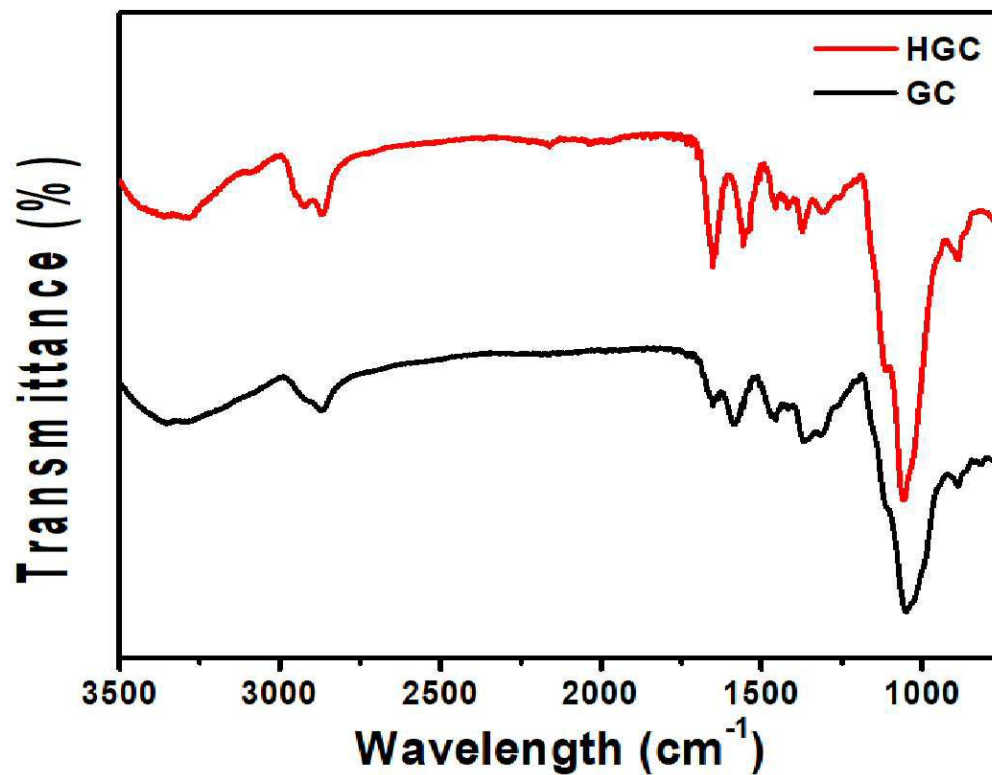
[0192] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

도면1



도면2



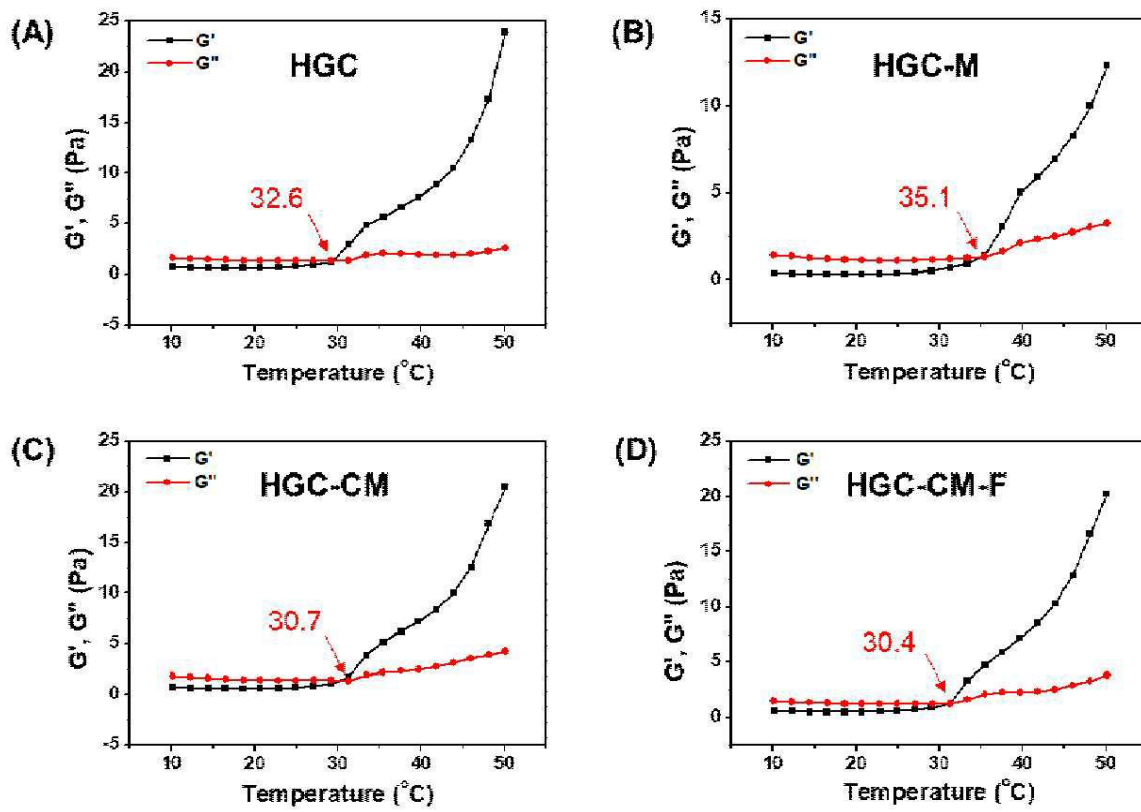
도면3

Samples	Polymer Conc. (wt%)	Sol-Gel transition (°C)	
		T _{gel} ^a	T _{gel} ^b
HGC	2.0	32.0±0.5	32.6±0.9
HGC-M	2.0	36.5±0.5	35.1±0.1
HGC-CM	2.0	30.0±0.5	30.7±0.5
HGC-CM-F	2.0	29.0±0.5	30.4±1.2

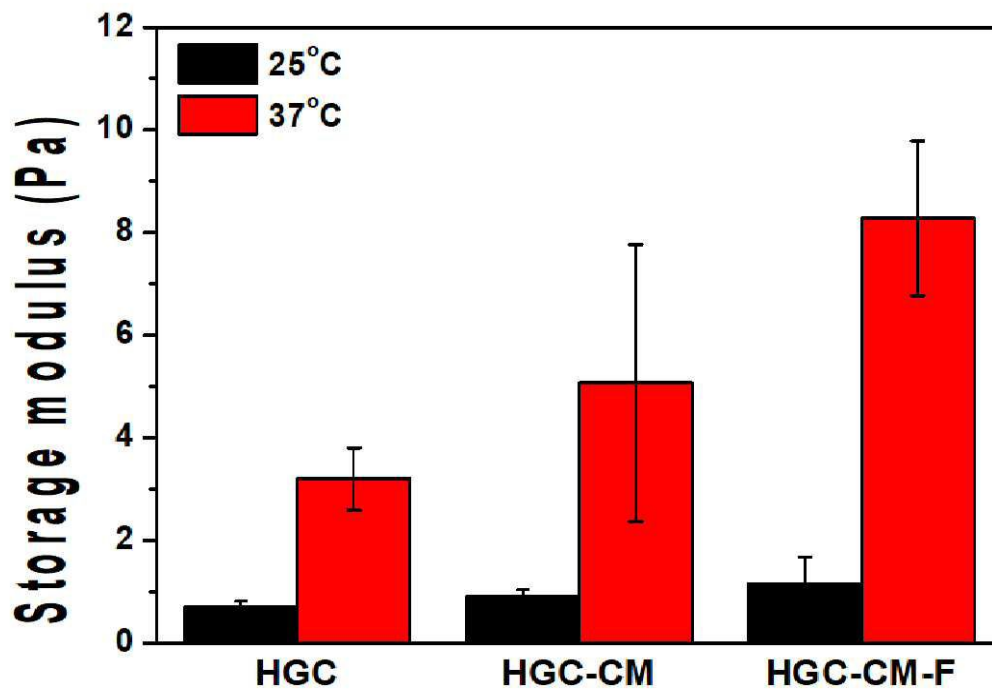
도면4

Samples	Temperature	
	20°C	37°C
HGC		
HGC-M		
HGC-CM		
HGC-CM-F		

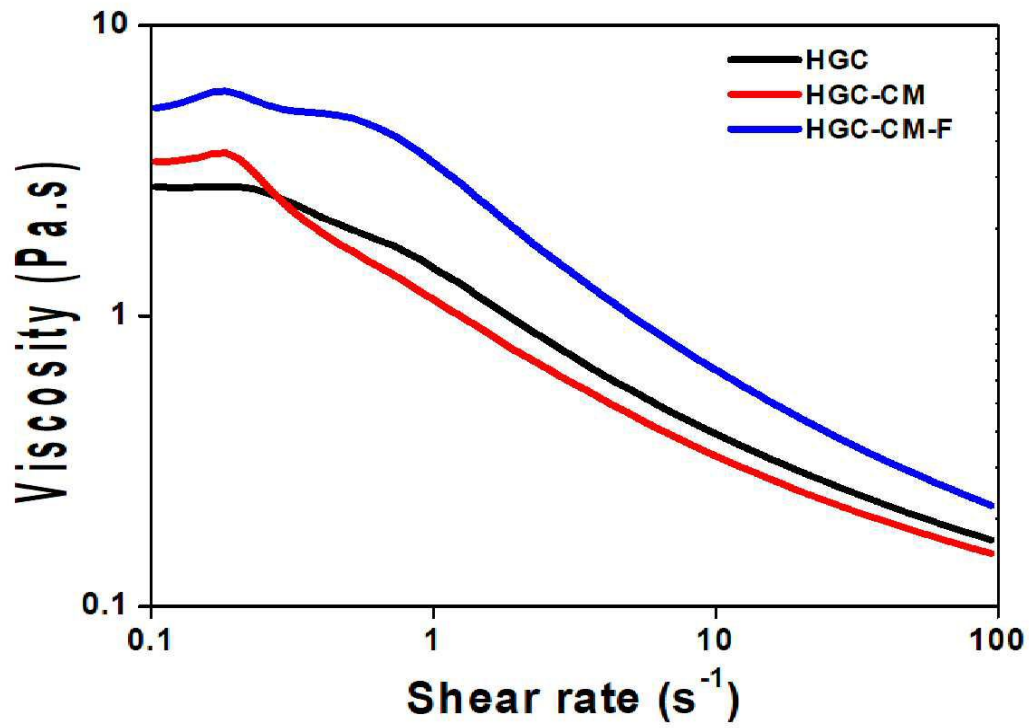
도면5



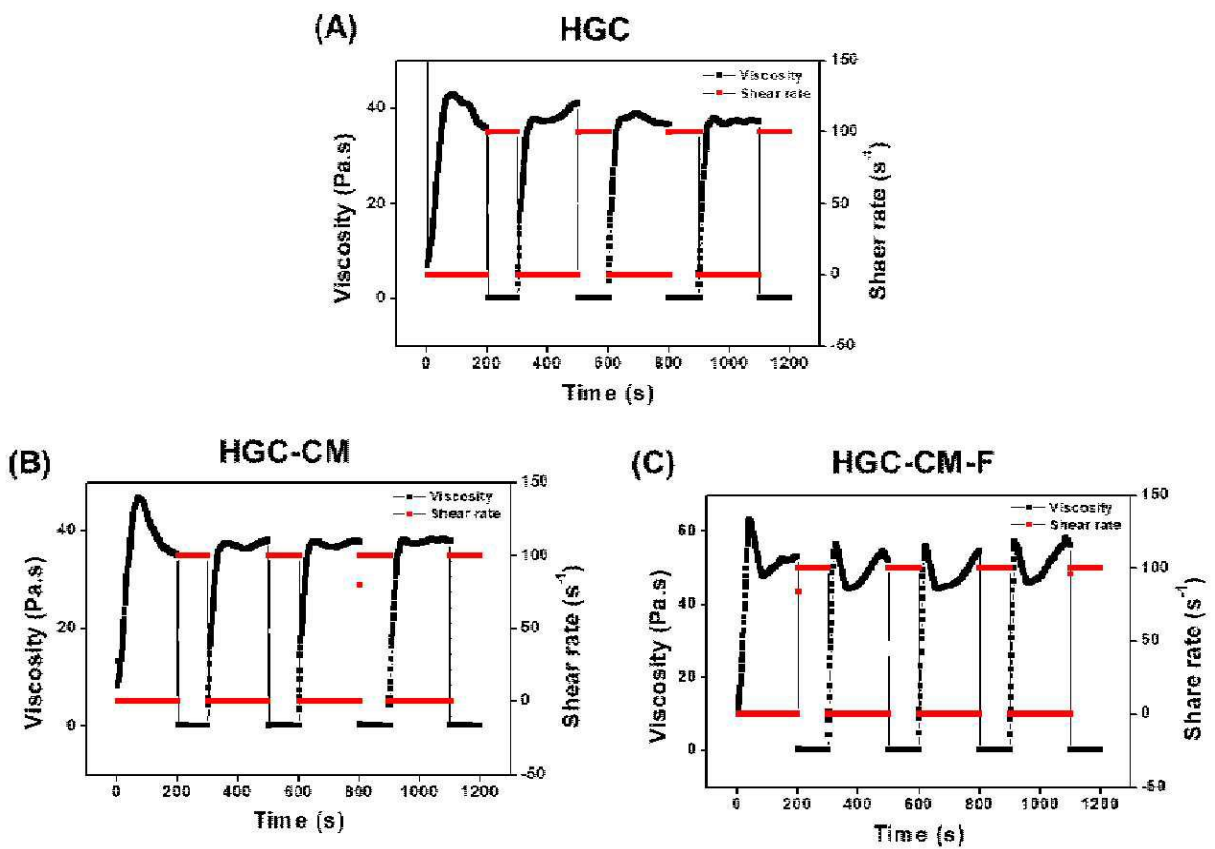
도면6



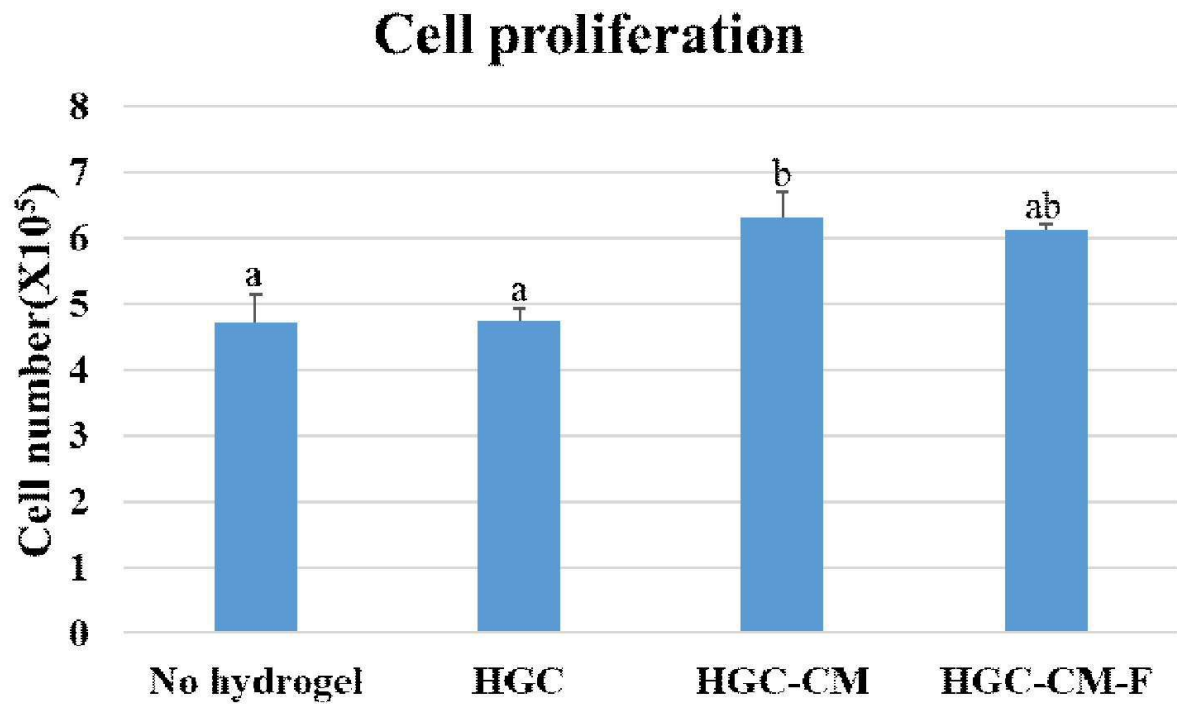
도면7



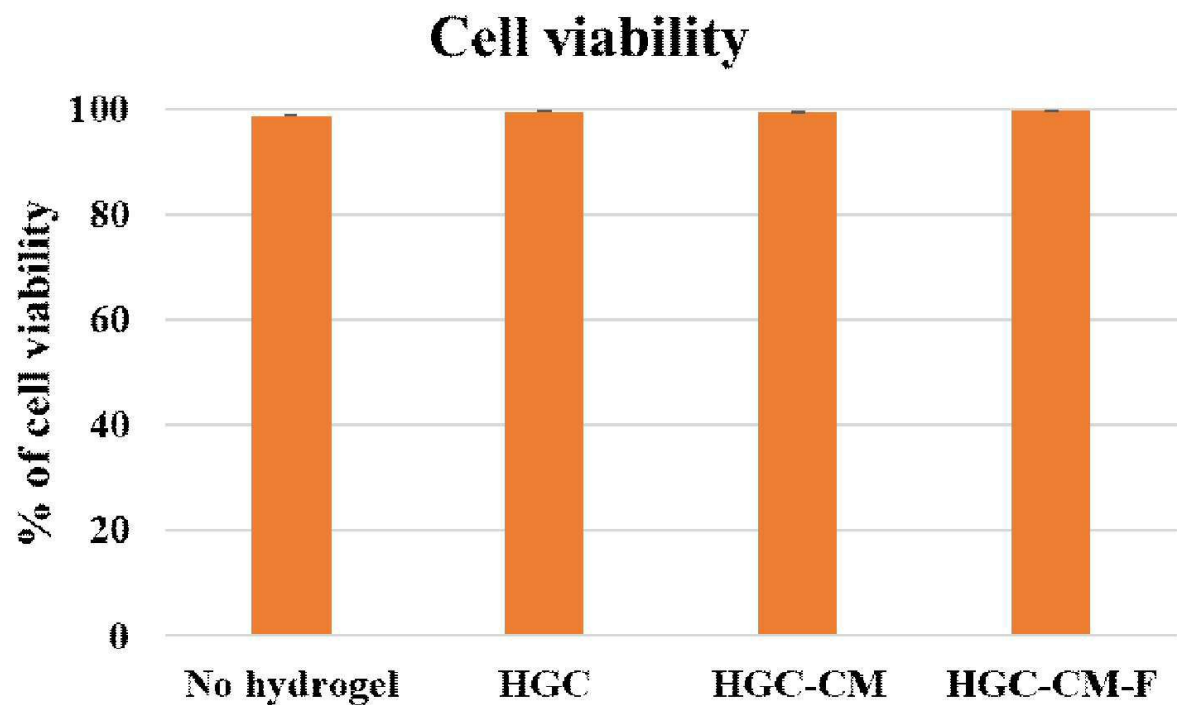
도면8



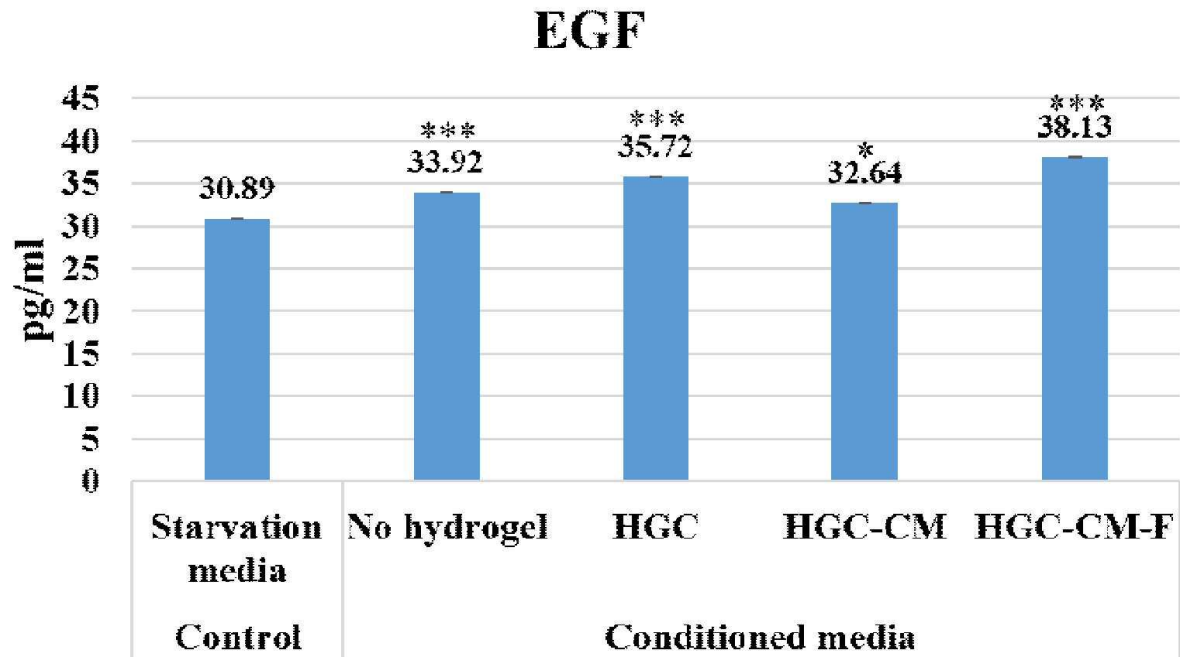
도면9



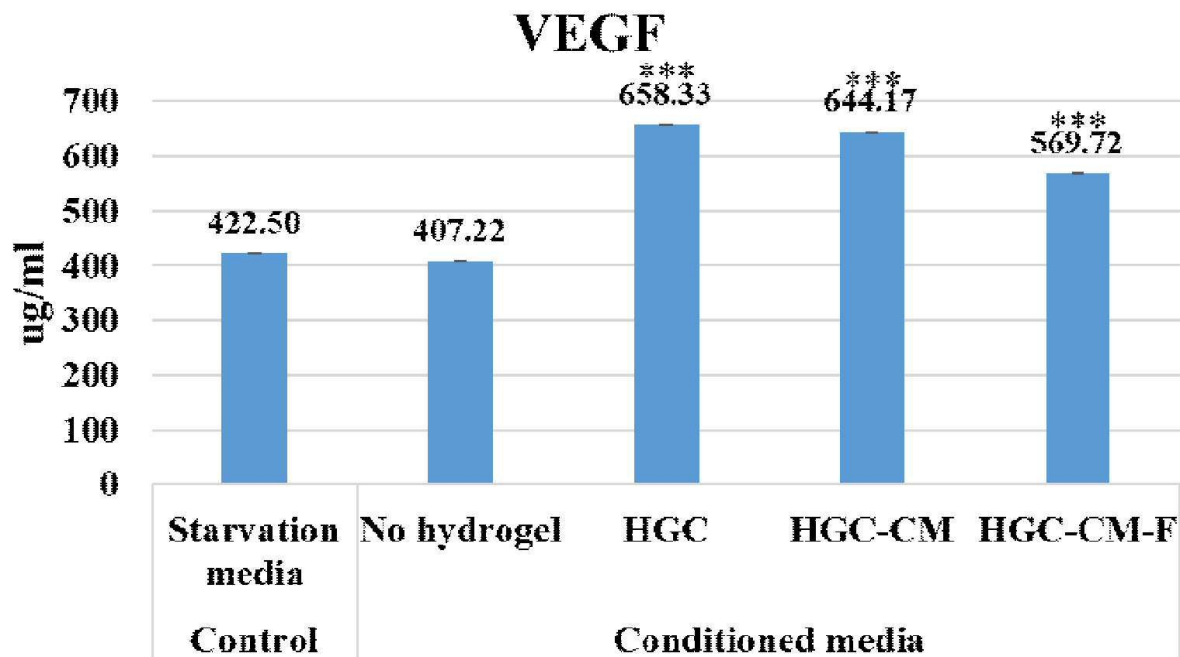
도면10



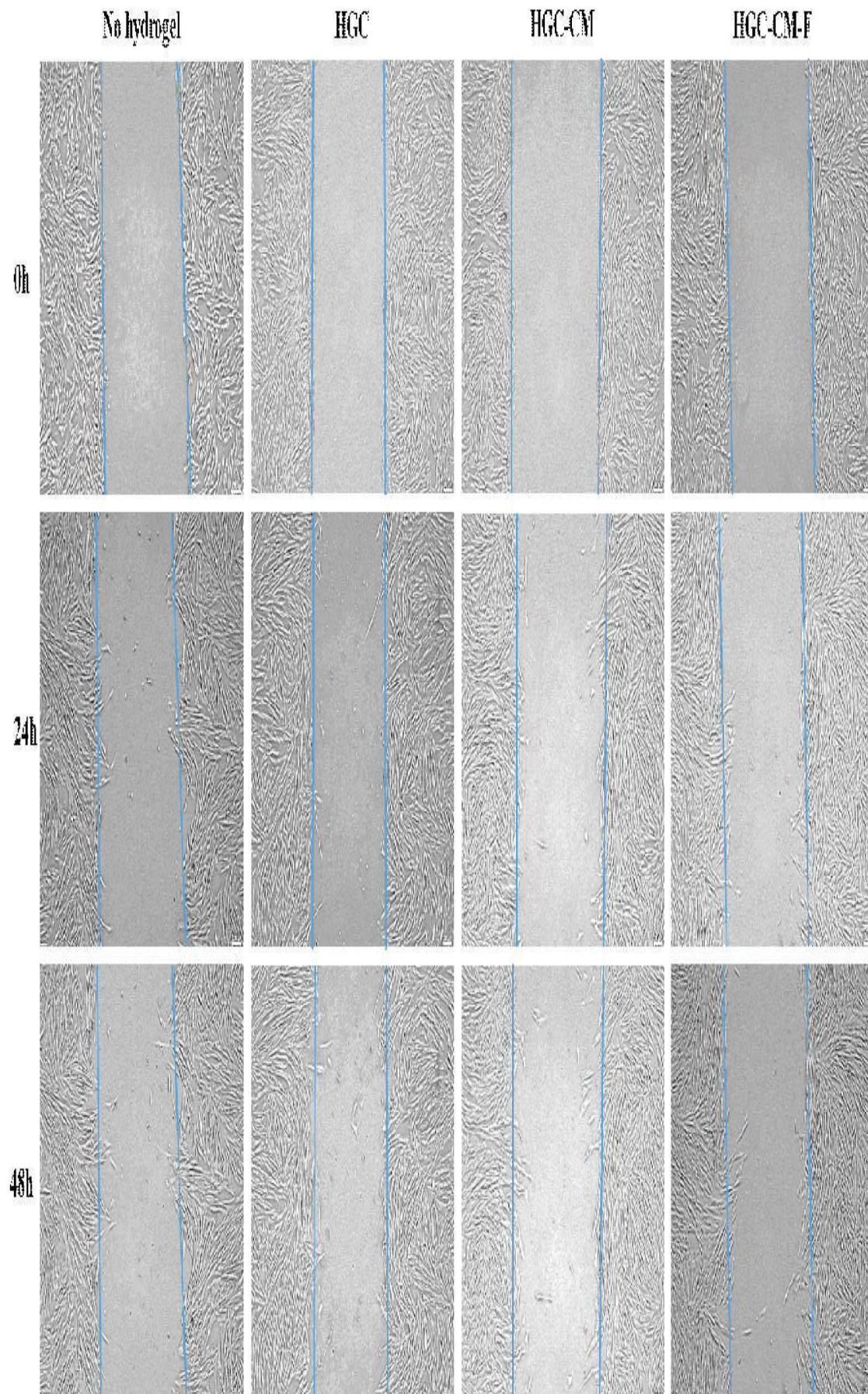
도면11



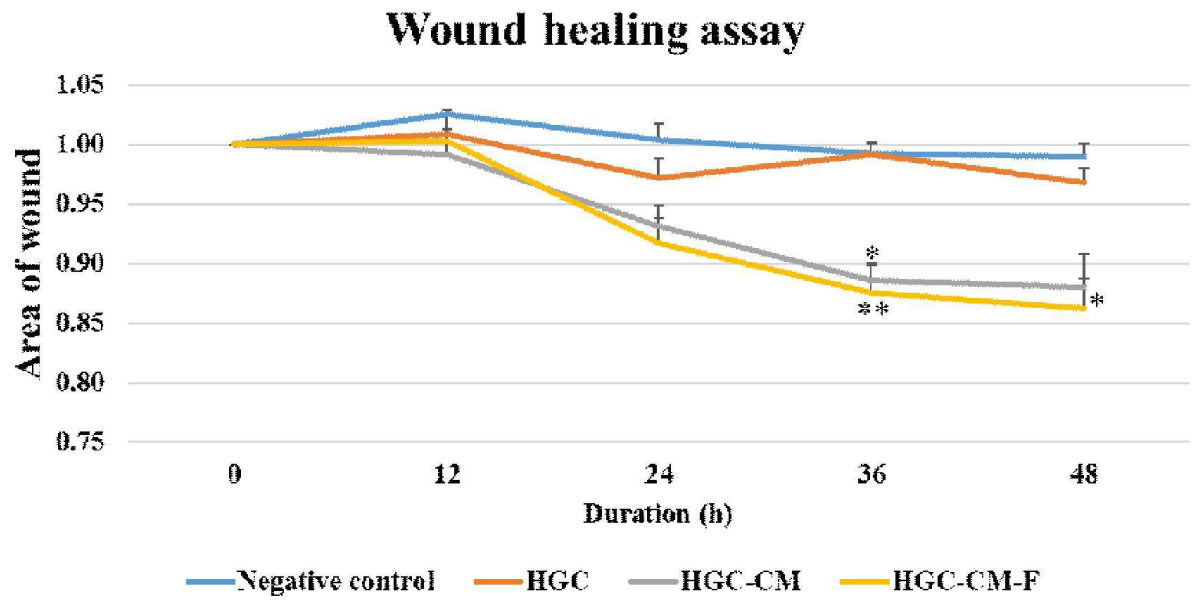
도면12



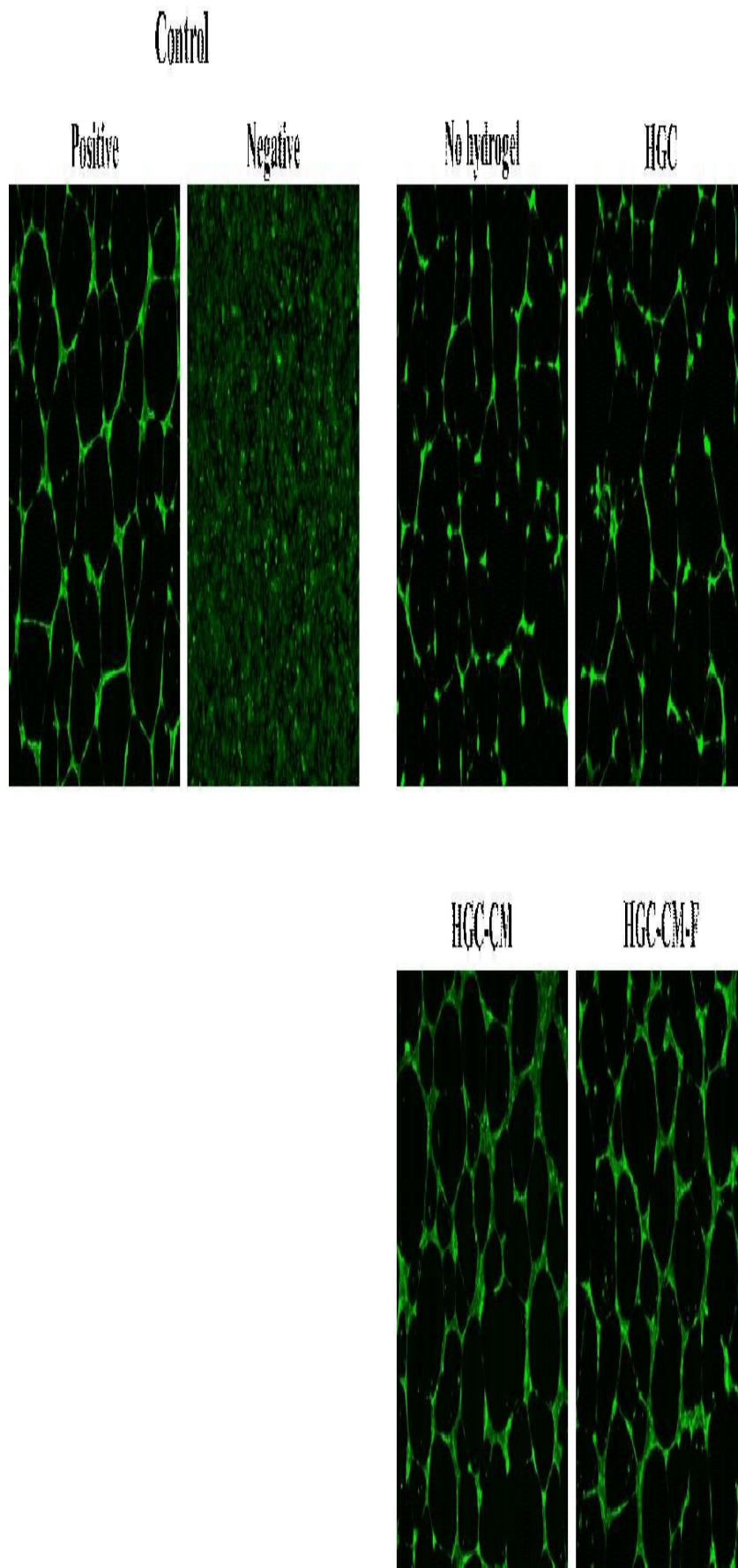
도면13



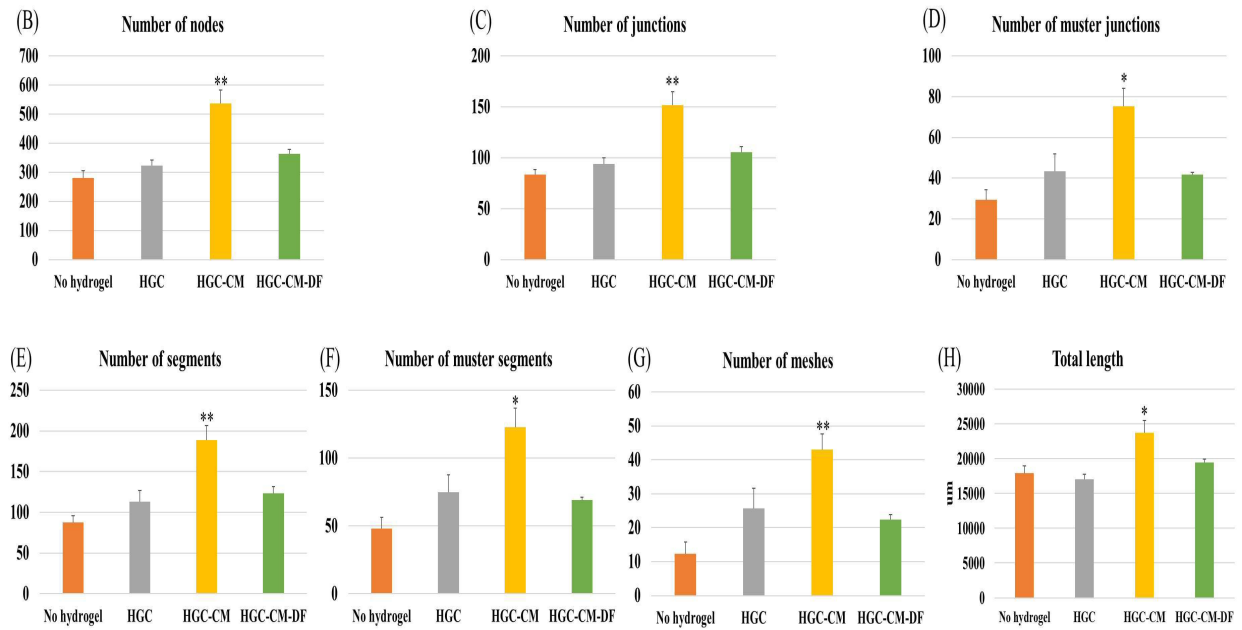
도면14



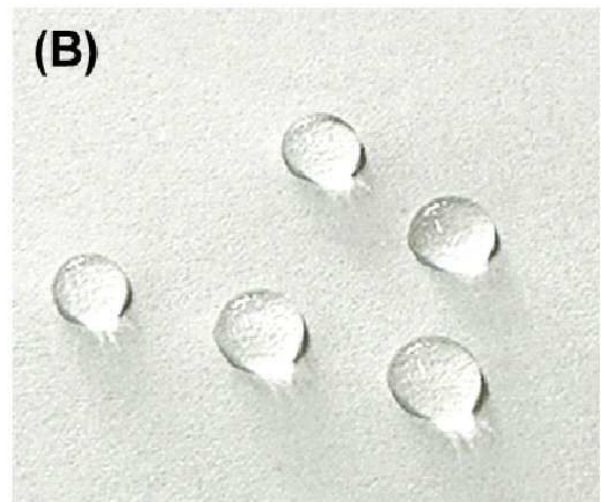
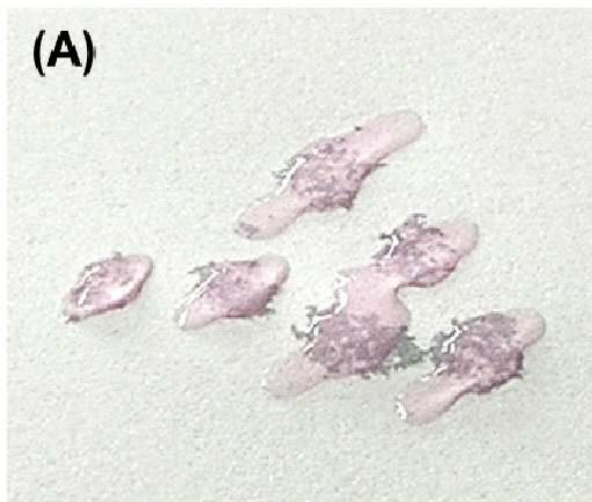
도면15



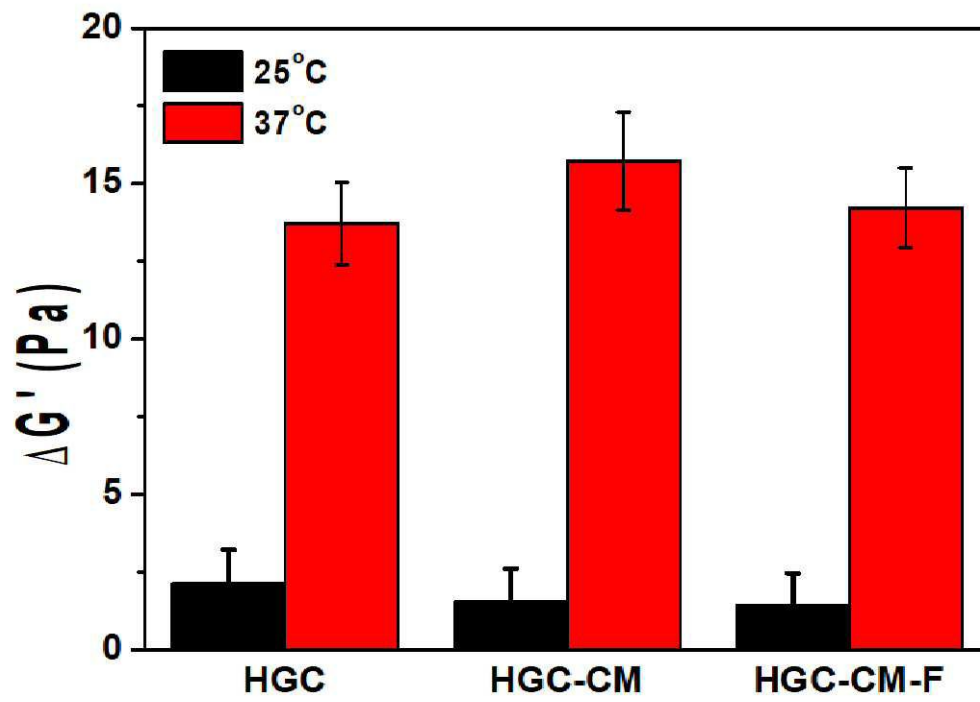
도면16



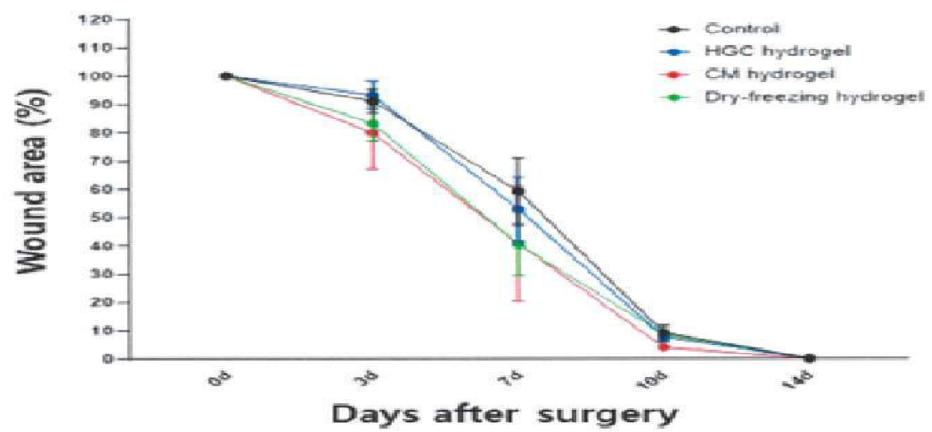
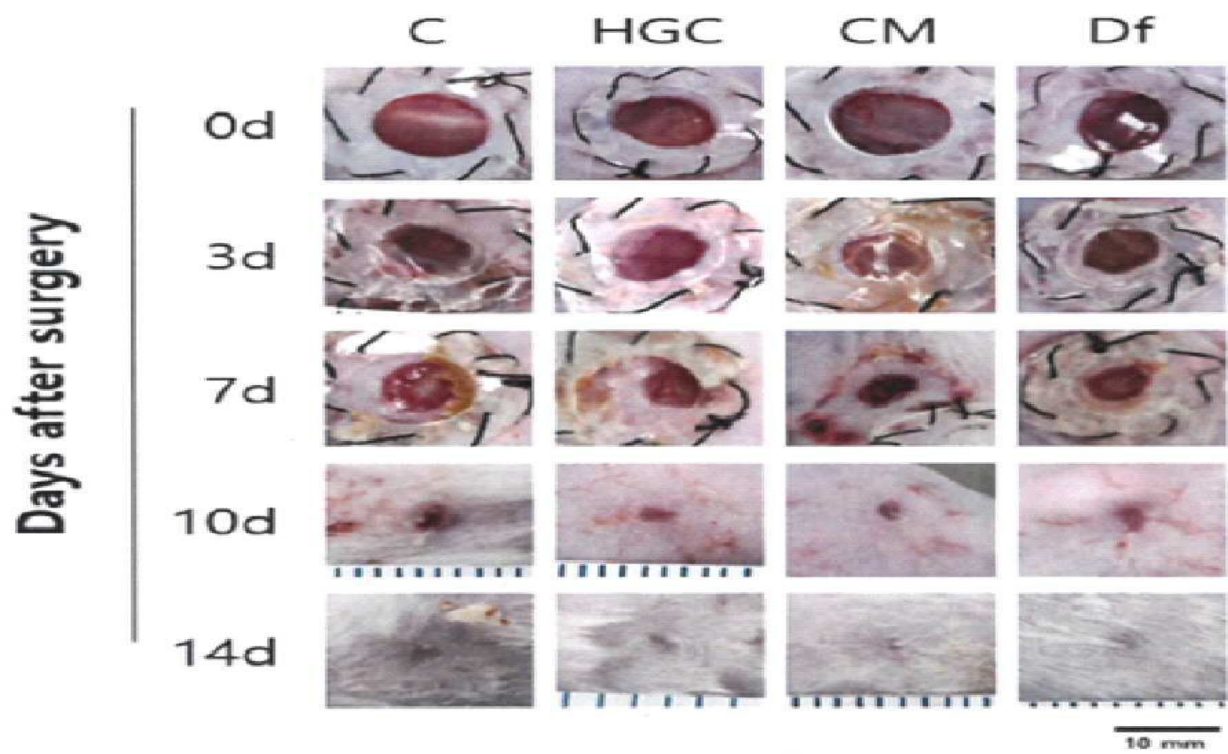
도면17



도면18



도면19



도면20

