



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월06일
(11) 등록번호 10-1775479
(24) 등록일자 2017년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/14 (2006.01) C08L 71/02 (2006.01)
C08L 77/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/14 (2013.01)
A61L 27/3604 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0027903
(22) 출원일자 2016년03월08일
심사청구일자 2016년03월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090049328 A*
KR100687281 B1*
KR101001855 B1
KR1020080017850 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정병문
서울특별시 은평구 진관2로 57-37, 241동 601호 (진관동, 은평뉴타운우물골)
문효정
경기도 성남시 분당구 미금로 184, 105동 703호 (구미동, 까치마을1단지대우아파트)
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

전체 청구항 수 : 총 7 항

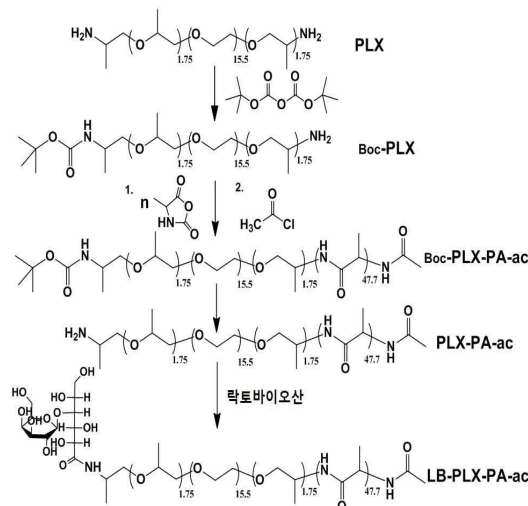
심사관 : 김재민

(54) 발명의 명칭 생리활성 온도 감응형 중합체 및 이의 3 차원 세포배양 및 조직공학으로의 용도

(57) 요약

젤-젤 전이 특성을 갖는 생리활성 온도 감응형 중합체 및 상기 생리활성 온도 감응형 중합체의 3 차원 세포배양 및 조직공학으로의 용도에 관한 것이다. 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는 락토바이오산, 갈락토즈, DOPA, 인산염, 황산염, 포스파티딜 콜린, 염산, 발프로익산, 담즙산 유도체 등의 생리활성 물질을 포함하며, 상기 생리활성 물질로 인하여 줄기세포가 특정 세포로 분화되도록 조절할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08L 71/02 (2013.01)

C08L 77/00 (2013.01)

C12N 5/0068 (2013.01)

C08L 2203/02 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049835

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 편도줄기세포 분화 성장 조절을 위한 주사형 스캐폴드 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로서 표시되는, 생리활성 온도 감응형 중합체:

[화학식 1]

A-PAG-PP;

상기 화학식 1 중,

PAG는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리부틸렌글리콜 및 이들의 공중합체를 포함하는 폴리알킬렌글리콜로서, 수평균 분자량이 200 내지 10,000 달톤이고;

PP는 분자량 200 내지 10,000 달톤의 폴리펩타이드계 고분자이고;

A는 락토바이오산, 갈락토즈, Arg-Gly-Asp (RGD), Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), DOPA, 인산염 (phosphate), 포스파티딜 콜린 (phosphatidyl choline), 엽산 (folic acid), 황산염 (sulfate), 구아니움 (guanum), 보론산 (boronic acid), 아스코르브산 (ascorbic acid), 카토제닌 (kartogenin), 발프로익산 (valproic acid), 담즙산 유도체, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 생리활성 물질을 포함하며,

상기 생리활성 온도 감응형 중합체는, 상기 생리활성 물질로 인하여 줄기세포가 특정 세포로 분화되도록 조절할 수 있는 것인,

생리활성 온도 감응형 중합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, 하이드록시프롤린, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인, 생리활성 온도 감응형 중합체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 생리활성 온도 감응형 중합체는 그의 수성 용액에서 체온 이상의 온도에서 졸-겔 전이 특성을 가지는 것인, 생리활성 온도 감응형 중합체.

청구항 6

제 1 항, 제 4 항, 및 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 줄기세포를 포함하는, 3 차원 세포배양용 지지체 (scaffold).

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 생리활성 온도 감응형 중합체에 의하여 상기 줄기세포의 특정 세포로의 분화가 조절되는 것인, 3 차원 세포배양용 지지체.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 줄기세포는 인간의 배낭, 태반, 제대, 제대혈, 피부, 말초혈액, 골수, 지방, 근육, 간, 편도, 신경조직, 골막, 태아막, 활액막, 활액, 양막, 반월상연골, 전십자 인대, 관절 연골세포, 치아, 치수, 혈관주위세포, 지주골, 슬개골하 지방괴, 비장 또는 흉선을 포함하는 간엽 줄기세포가 존재하는 조직으로 분리되거나 또는 배양된 간엽 줄기세포, 배아줄기 세포, 유도 전분화능 줄기세포, 체세포 핵치환 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인, 3 차원 세포배양용 지지체.

청구항 9

제 1 항, 제 4 항, 및 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 줄기세포를 포함하는, 조직공학용 지지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 줄-젤 전이 특성을 갖는 생리활성 온도 감응형 중합체 및 상기 생리활성 온도 감응형 중합체의 3 차원 세포배양 및 조직공학으로의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 특정 세포 종류로의 줄기세포의 분화 조절은, 줄기세포 기반의 조직공학과 세포 치료법의 핵심 과제이다. 과학자들은 이러한 목적을 달성하기 위해 적극적으로 다양한 화학적, 생물학적, 기계적 접근을 개발해왔다. 첫 번째로, 알킬, 인산염, 그리고 카복실산 같은 관능기를 지지체에 결합하여 줄기세포의 지방화, 골화, 그리고 연골화를 각각 촉진하였다. 두 번째로, 작은 분자 (small molecules) 또는 성장인자와 그들의 복합 혼합물을 줄기세포의 특정 분화를 위해 시행착오를 겪으며 발굴해왔다. 예를 들어, 형질전환성장인자 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), 덱사메타손 (dexamethasone), 그리고 아스코르브산은 중간엽 줄기세포의 연골화 분화를 촉진하는데 효과를 보여주었다. 세 번째로, 줄기세포의 분화는 지지체의 기계적 성질에 민감하다. 다양한 경도의 세포배양 매트릭스의 사용에 의해, 지방화, 연골화, 골화 분화가 조절될 수 있다. 국소접착을 통한 세포역학 신호변환은 매질의 경도에 민감하게 줄기세포의 분화를 촉진한다. 또한, 나노패턴의 표면, 제한된 면적, 그리고 나노파이버나 나노시트를 혼합한 지지체는 줄기세포의 선택적인 분화를 촉진하기 위해 제안되었다. 하지만, 줄기세포의 선택적 분화를 촉진하는 주사 가능한 in situ-젤화 생리활성 3 차원 지지체는 줄기세포 치료를 위한 임상 가능성에도 불구하고 많이 연구되지 않았다.

[0003] 한편, 수용액 중에서 줄-젤 전이 반응을 나타내는 것으로 현재까지 보고된 고분자는, 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜-폴리에틸렌글리콜의 폴록사머 (poloxamer), 폴리 N-이소프로필아크릴아미드 및 이의 공중합체, 폴리에틸렌글리콜/폴리(락타이드/글리콜라이드), 폴리에틸렌글리콜/폴리프로필렌프말레이트, 키토산/글리세롤 인산염, 폴리포스파젠, 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤, 폴리에틸렌글리콜/폴리알라닌, 폴리에틸렌글리콜/폴리(알라닌/페닐알라닌) 등이 있다. 이들 고분자의 수용액은 상온 또는 그 이하의 온도에서는 용액 또는 졸 상태로 존재하지만, 체온 (37℃) 근처의 온도에서는 수화젤로 전이가 일어나므로, 이러한 고분자는 의약 전달 및 조직공학 재료로 이용될 수 있을 것으로 유력시되고 있다. 즉, 졸 (sol) 상태에서 의약 또는 세포와 혼합한 후에

피하 또는 근육 주사를 통하여 체내에 투입하여 원하는 부위에서 수화젤 (depot)이 순간적으로 만들어지도록 함으로써, 약물을 서서히 방출하거나 세포가 자라서 조직이 재생되도록 할 수 있다. 이러한 생분해성 재료는 외과적 수술 없이 임플란트 (implant)를 만들거나, 단순한 마이크로 필터를 통하여 졸 상태에서 살균하는 것이 가능하다.

- [0004] 그러나 상기 폴록사머, 즉, 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜-폴리에틸렌글리콜의 경우, 20 내지 30 중량%의 수용액으로부터 만든 수화젤이라도 1 일 내지 3 일 이내에 대부분 용해되어 젤의 형태를 유지하지 못하기 때문에, 의약전달/조직 공학의 소재로서는 제한이 되어왔다.
- [0005] 한편, 썬머젤 (thermogel)은 온도가 증가하면 졸-젤 변이를 보이는 고분자 수용액으로서, 썬머젤의 특성은 고분자의 친수성과 소수성의 미세한 균형에 의해 나타난다. 약물 또는 세포는 고분자 수용액을 보통 37℃와 같이 따뜻한 환경이 되도록 열을 가했을 때, 수화젤이 된다. 젤 생성에 있어서 간단한 절차와 온화한 조건 때문에, 썬머젤은 세포 및 줄기세포를 위한 유망한 지지체로 제안되었다.
- [0006] 미국 특허 제6,117,949호, 제6,201,072호, 및 제6,841,617호는 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리에틸렌글리콜/폴리락타이드 또는 폴리글리콜라이드 및 이들의 의학적 응용을 기술하고 있다.
- [0007] 미국 공개 특허 제 20060018949호는, 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리에틸렌글리콜/폴리프로필렌프말레이트 및 이들의 의학적 응용을 기술하고 있다.
- [0008] 미국 특허 공개 공보 제20050020808호는, 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리포스파젠을, 미국 특허 제6,344,488호는 키토산/글리세롤 인산염 및 이들의 의학적 응용을 기술하고 있다.
- [0009] 미국 특허 공개 공보 제20040077780호는, 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리에틸렌글리콜/ #2 종류 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드 공중합체 및 이들의 의학적 응용을 광범위하게 기술하고 있다.
- [0010] 대한민국 특허 공개 공보 제2002-0023441호는, 졸-젤 상전이를 일으키는 이소프로필아크릴아미드 공중합체 및 이를 이용한 혈관 폐색을 기술하고 있다.
- [0011] 미국 특허 공보 20050175573 A1은, 폴록사머를 우레탄 또는 유레아의 화학결합을 이용하여 다중 공중합 폴록사머 (multiblock poloxamer) 제조를 특징으로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본원은, 졸-젤 전이 특성을 갖는 생리활성 온도 감응형 중합체 및 상기 생리활성 온도 감응형 중합체의 3 차원 세포배양 및 조직공학으로의 용도를 제공하고자 한다.
- [0013] 지금까지의 온도 감응성 썬머젤은 수동형 지지체로서 세포 및 줄기세포의 지지체 역할을 하였다. 그러나, 본원에서 제시하는 바와 같이, 세포 표면의 수용체의 기질을 썬머젤에 도입함으로써 줄기세포를 해당 특정 세포로 분화를 유도하는 연구는 아직 보고되지 않았다.
- [0014] 본원은, 세포 표면 수용체 기질이 결합된 썬머젤을 주사 가능한 생리활성 3 차원 지지체로서 응용하는 것에 대한 것으로, 이는 폴리펩타이드 썬머젤에 생리활성 분자를 결합함으로써 줄기세포를 특정세포로 선택적으로 분화하는 방법을 제시함에 독창성이 있다. 이는 기존의 다양한 단분자를 세포배양액에 첨가함으로써 줄기세포를 특정 세포로 분화시키는 방법에서 진일보한 것이다.
- [0015] 특히, 썬머젤은 주사형 조직공학 소재로서 매우 주목을 받고 있으며, 본원은 썬머젤에 특정 분자를 결합함으로써 줄기세포를 특정 세포로 분화를 유도하는 것은 주사형 조직공학에서 매우 중요한 방법이 된다.
- [0016] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본원의 제 1 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 생리활성 온도 감응형 중합체를 제공한다:
- [0018] [화학식 1]

- [0019] A-PAG-PP;
- [0020] 상기 화학식 1 중, PAG는 폴리알킬렌글리콜이고; PP는 분자량 200 내지 10,000의 폴리펩타이드계 고분자이고; A는 락토바이오산, 갈락토즈, Arg-Gly-Asp (RGD), Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), DOPA, 인산염 (phosphate), 포스파티딜 콜린 (phosphatidyl choline), 엽산 (folic acid), 황산염 (sulfate), 구아니움 (guanum), 보론산 (boronic acid), 아스코르브산 (ascorbic acid), 카토제닌 (kartogenin), 발프로익산 (valproic acid), 담즙산 유도체, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 생리활성 물질을 포함함.
- [0021] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 세포 및/또는 줄기세포를 포함하는, 3 차원 세포배양용 지지체 (scaffold)를 제공한다.
- [0022] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 세포 및/또는 줄기세포를 포함하는, 조직공학용 지지체 (scaffold)를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본원의 일 구현예에 따르면, 생체 적합성을 지니는 폴리에틸렌글리콜과, 폴리펩타이드 물질을 이용하여 생리활성 온도 감응형 중합체를 제조할 수 있다. 본원의 일 구현예에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체는 일정한 농도 이상인 경우 특정 온도 이하에서는 수용액으로 존재하지만, 그 이상의 온도에서는 수화젤로 전이가 일어날 수 있으므로, 3 차원 세포배양 매체, 또는 조직공학용 지지체로서 응용될 수 있다. 특히, 본원의 일 구현예에 따른 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는, 졸 (sol) 상태에서 의약 또는 세포와 혼합된 뒤에, 주사를 통하여 체내에서 투입되어 원하는 부위에서 수화젤이 순간적으로 만들어지도록 함으로써, 약물을 서서히 방출하거나 세포가 자라서 조직이 재생되도록 할 수 있다.
- [0024] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는, 외과적 수술 없이 임플란트 (implant)를 만들 수 있으며, 단순한 마이크로 필터를 통하여 졸 상태에서 살균하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은, 본원의 일 실시예에 있어서, LB-PLX-PA-ac의 락토바이오산-결합된 생리활성 복합체 (bioactive polymer)의 합성 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2의 (a) 내지 (c)는, 본원의 일 실시예에 있어서, PLX, Boc-PLX-PA-ac, PLX-PA-ac, 및 LB-PLX-PA-ac의 ¹H-NMR 스펙트럼(a), LB-PLX-PA-ac의 FTIR 스펙트럼(b), 및 PLX-PA-ac 및 LB-PLX-PA-ac의 수용액 (0.05 wt%)으로부터 현상된 PLX-PA-ac 및 LB-PLX-PA-ac의 TEM 이미지(c)이다 (스케일 바= 200 nm).
- 도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, PLX, Boc-PLX-PA-ac, PLX-PA-ac, 및 LB-PLX-PA-ac의 젤 투과 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 4는, 본원의 일 실시예에 있어서, PLX-PA-ac의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 5의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, LB-0%, LB-5%, 및 LB-20%의 썬더젤의 4℃ 및 37℃에서의 저장 탄성율 (storage modulus)(a) 및 SEM 이미지(b)를 나타낸 것이다 (스케일 바=10 μm).
- 도 6의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, LB-0%, LB-5%, 및 LB-20% 시스템에서 3 차원 배양 동안의 세포 이미지들(a) 및 3 차원 배양 동안 0 일로 표준화된 세포의 수를 나타낸 그래프(b)이다.
- 도 7a는, 본원의 일 실시예에 있어서, HNF4α mRNA의 간세포 바이오 마커의 발현을 나타내는 그래프이다.
- 도 7b는, 본원의 일 실시예에 있어서, ALB mRNA의 간세포 바이오 마커의 발현을 나타내는 그래프이다.
- 도 7c는, 본원의 일 실시예에 있어서, ASGR mRNA의 간세포 바이오 마커의 발현을 나타내는 그래프이다.
- 도 7d는, 본원의 일 실시예에 있어서, 23 일에서 시간 형광 강도에서 염색된 세포의 수에 따른 형광 이미지의 반정량적 분석 (semi-quantitative analysis)을 나타낸 그래프이다.
- 도 7e는, 본원의 일 실시예에 있어서, HNF4α에 대한 23 일에서의 면역형광 이미지이다.
- 도 7f는, 본원의 일 실시예에 있어서, ALB에 대한 23 일에서의 면역형광 이미지이다.
- 도 7g는, 본원의 일 실시예에 있어서, ASGR에 대한 23 일에서의 면역형광 이미지이다.

도 8의 (a) 내지 (c)는, 본원의 일 실시예에 있어서, TMSC로부터 분화된 세포들의 간 생물학적 기능을 확인하기 위한 알부민 분비(a) 및 요소 생성(b)을 나타낸 그래프 및 ICG 흡수를 나타내는 이미지(c) 이다 (스케일 바=15 μm). 별표(*)는 상기 시스템의 유의성 ($p<0.05$)을 나타내며, 상기 바의 별표 (*)는 LB-0% 3 차원 배양 시스템과 비교한 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 “연결”되어 있다고 할 때, 이는 “직접적으로 연결”되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 “전기적으로 연결”되어 있는 경우도 포함한다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0031] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0033] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [0035] 본원의 제 1 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 생리활성 온도 감응형 중합체를 제공한다:
- [0036] [화학식 1]
- [0037] A-PAG-PP;
- [0038] 상기 화학식 1 중, PAG는 폴리알킬렌글리콜이고; PP는 분자량 200 내지 10,000 달톤 (Da)의 폴리펩타이드계 고분자이고; A는 락토바이오산, 갈락토즈, Arg-Gly-Asp (RGD), Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), DOPA, 인산염 (phosphate), 포스파티딜 콜린 (phosphatidyl choline), 엽산 (folic acid), 황산염 (sulfate), 구아니움 (guanum), 보론산 (boronic acid), 아스코르브산 (ascorbic acid), 카토제닌 (kartogenin), 발프로익산 (valproic acid), 담즙산 유도체, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 생리활성 물질을 포함함.
- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는, 상기 생리활성 물질로 인하여 줄기세포가 특정 세포로 분화되도록 조절할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 담즙산 유도체는 TUDCA (tauroursodeoxycholic acid)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 물질은 줄기세포를 특정 세포로 분화되도록 조절할 수 있는 물질이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 락토바이오산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 락토바이오산은 4-O- β -갈락토피라노실-D-글루콘산 (4-O- β -galactopyranosyl-D-gluconic acid)로, 갈락토스와 글루콘산의 이당류로서, 간세포의 표면에 있는 아시알로당단백질수용체 (asialoglycoprotein receptor, ASGR)에 높은 결합 친화성을 가지고 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 물질로 인하여 상기 온도 감응형 중합체가 체내에서 안정하게 머무

를 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 생리활성 물질이 락토바이오산인 경우, 체내에서 약 2 주간 안정하게 머무를 수 있으며, 체내에서 분해 시 pH가 산성을 띄지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0043] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리알킬렌글리콜은 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리부틸렌글리콜 및 이들의 공중합체를 포함하며, 수평균 분자량이 약 200 내지 약 10,000 달톤 (Da)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0044] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리알킬렌글리콜은 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜 및/또는 폴리부틸렌글리콜이 에스테르, 카보네이트, 펩타이드, 또는 우레탄을 포함하는 작용기로 연결된 공중합체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리알킬렌글리콜은 수평균 분자량이 약 200 내지 약 10,000 달톤, 약 200 내지 약 8,000 달톤, 약 200 내지 약 6,000 달톤, 약 200 내지 약 4,000 달톤, 약 200 내지 약 2,000 달톤, 약 200 내지 약 1,000 달톤, 약 500 내지 약 10,000 달톤, 약 500 내지 약 8,000 달톤, 약 500 내지 약 6,000 달톤, 약 500 내지 약 4,000 달톤, 약 500 내지 약 2,000 달톤, 약 500 내지 약 1,000 달톤, 약 1,000 내지 약 10,000 달톤, 약 1,000 내지 약 8,000 달톤, 또는 약 1,000 내지 약 6,000 달톤, 약 1,000 내지 2,000 달톤, 또는 약 5,000 내지 10,000 달톤인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0045] 또한, 상기 폴리알킬렌글리콜 (PAG)은 블록 공중합체일 수 있으며, 대표적인 블록 공중합체로는 ABA형 블록 공중합체가 있으며, 온도 감응성 수화젤을 형성할 수 있는 고분자로서 ABA형보다 더 복잡한 형태의 블록 공중합체도 많은 사례가 알려져 있다.

[0046] 수화젤을 형성할 수 있는 ABA형 블록 공중합체는 대개 친수성 블록 또는 분절 (segment)과 소수성 블록 또는 분절을 함께 갖추고 있다. 승온 시 수화젤을 형성하는 온도 감응성 고분자는, 대부분 화학 가교를 포함하고 있지 않아서 온도에 따라 가역적으로 젤을 형성 또는 해체하며, 높은 온도에서 수화젤을 형성하는 원동력은 고온 하에서 소수성 상호작용의 크기 증가이다. 이러한 고분자들은 대개 자기 조립하고 물리적 가교를 형성한다.

[0047] 수화젤을 형성할 수 있는 유기 고분자에 관하여는 이 분야에 잘 알려져 있으므로 여기서 더 이상 상술하지는 않는다. 이 분야의 당업자라면 약물 전달용 중합체의 구체적인 용도에 맞추어 적절한 상전이 온도에서 상전이하고, 수화젤 상태로 유지되는 온도 영역이 적절한 범위에 있는 고분자를 전술한 종류의 공중합체 중에서 선택하고, 필요한 경우 변형하여 설계할 수 있을 것이다.

[0048] 예를 들어, 상기 블록 공중합체의 예로서, 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜-폴리에틸렌글리콜 (PEG-PPG-PEG) 3 블록 공중합체가 있다. 시판되는 이 3 블록 공중합체로는 독일 BASF 사의 Pluronic F68 (Poloxamer P188, 상표명)이 있는데, 그 평균 조성은 (EG)₈₀-(PG)₂₇-(EG)₈₀ (분자량 8,400)이다. 플루로닉 F68은 미국 식품의약청 (FDA)에서 인간에게 사용을 승인한 생적합성, 생흡수성 고분자이다.

[0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, 하이드록시프로린, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 체내에서 아미노산으로 분해되므로 pH에 영향을 미치지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 in-vitro 제조 시 분해되지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는 일정 농도 이상일 경우, 그의 수성 용액에서 체온 이상의 온도에서 졸-젤 전이 특성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0053] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는 체온 이상의 온도에서 수화젤로의 전이가 일어나고, 체내에서 안정하게 유지되는 특성을 가지므로 3 차원 세포배양용 지지체로서 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0054] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체는 체온 이상의 온도에서 수화젤로의 전이가 일어나고, 체내에서 안정하게 유지되는 특성을 가지므로 조직공학용 지지체로서 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0056] 본원의 제 2 측면은, 상기 본원의 제 1 측면에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 세포 및/또는 줄기세포를 포함하는, 3 차원 세포배양용 지지체 (scaffold)를 제공한다. 본원의 제 2 측면에 따른 3 차원 세포배양용 지지체 (scaffold)에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0057] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체에 의하여 상기 줄기세포의 특정 세포로의 분화가 조절되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0058] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포는 배아 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 편도 줄기세포, 간 세포, 심장 줄기세포, 심근 세포, 내피 세포, 또는 섬유 아세포를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0059] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 인간의 배낭, 태반, 제대, 제대혈, 피부, 말초혈액, 골수, 지방, 근육, 간, 편도, 신경조직, 골막, 태아막, 활액막, 활액, 양막, 반월상연골, 전십자 인대, 관절 연골세포, 치아, 치수, 혈관주위세포, 지주골, 슬개골하 지방과, 비장 또는 흉선을 포함하는 간엽 줄기세포가 존재하는 조직으로 분리되거나 또는 배양된 간엽 줄기세포, 배아줄기 세포, 유도 전분화능 줄기세포, 체세포 핵치환 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0060] 본원의 일 구현예에 있어서, 생리활성 물질이며 특별한 수용체 기질인 락토바이오산 (lactobionic acid, LB)를 도입하여 폴리펩티드 기반의 써머젤의 3 차원 세포배양용 지지체를 디자인할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0061] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 물질은 줄기세포를 특정 세포로 분화되도록 조절할 수 있는 물질이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 락토바이오산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 락토바이오산은 4-O- β -갈락토피라노실-D-글루콘산 (4-O- β -galactopyranosyl-D-gluconic acid)로, 갈락토스와 글루콘산의 이당류로서, 간세포의 표면에 있는 아시알로당단백질수용체 (asialoglycoprotein receptor, ASGR)에 높은 결합 친화성을 가지고 있다.
- [0062] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 물질이 결합된 생리활성 온도 감응형 중합체는, 간 표적지향 의약 전달 시스템과 간세포를 위한 초대세포배양 시스템에 응용될 수 있다.
- [0064] 본원의 제 3 측면은, 상기 본원의 제 1 측면에 따른 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된 세포 및/또는 줄기세포를 포함하는, 조직공학용 지지체 (scaffold)를 제공한다. 본원의 제 3 측면에 따른 조직공학용 지지체 (scaffold)에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 3 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0065] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체를 포함하는 조직공학용 지지체는 졸 상태에서 세포와 혼합된 뒤에 피하 또는 근육 주사를 통하여 체내에 투입될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체를 포함하는 조직공학용 지지체는 체내에 투입되어 원하는 부위에서 수화젤이 순간적으로 만들어짐으로써, 세포가 자라서 조직이 재생되도록 유도할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0066] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조직공학용 지지체는 외과적 수술 없이 임플란트를 생성할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 조직공학용 지지체는 생분해능을 가진 물질로 인하여, 외과적 수술 없이 임플란트를 생성할 수 있으며, 마이크로 필터를 이용하여 졸 상태에서 살균될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0067] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조직공학용 지지체는, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체 내에 혼입된, 콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 편도줄기세포, 간 세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포, 및 섬유아세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0068] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생리활성 이온성 온도 감응형 중합체는 주사형 조직공학 재료로서 응용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 생리활성 온도 감응형 중합체의 졸-젤 전이 특성을 이용하여 특정 연골 부위에 주사함으로써, 간 재생 능력을 극대화 할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0069] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기

위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **[실시예]**

[0072] **재료**

[0073] 폴리프로필렌 글리콜-폴리에틸렌 글리콜-폴리-프로필렌 글리콜 비스(2-아미노프로필 에테르) [Poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly-(propylene glycol) bis(2-aminopropyl ether)], (PLX; M.W. = 900 달톤), 디-tert-부틸 옥시카보네이트 (di-tert-butyl oxycarbonate, Boc₂O), 아세틸 클로라이드 (acetyl chloride), N,N-디메틸 포름아마이드 (N,N-dimethyl formamide), 트리에틸아민 (triethylamine), 및 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르포리늄 클로라이드 [4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMTMM]는 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입한 대로 사용되었다. L-알라닌의 N-카르복시 무수물 (L-알라닌 NCA) (Onsolution, Korea)은 구입한 대로 사용되었다. 톨루엔 (Daejung, Korea)은 사용 전에 나트륨으로 증류되었다. 디메틸 에테르 (Daejung, Korea) 및 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic acid, Acros, USA)은 구입한 대로 사용되었다. 클로로포름 (Daejung, Korea)은 사용 전에 황산 마그네슘 무수물로 처리되었다.

[0075] **LB-PLX-PA-ac 합성**

[0076] PLX의 아미노 관능기는 Boc₂O를 이용하여 부분적으로 보호되었다. 요약하면, PLX (18.0 g, 20.0 mmole)는 톨루엔 무수물 (250 mL)에서 용해되었으며, 잔류한 물은 50 mL의 최종 부피까지 공비 증류 (azeotropic distillation)에 의해 제거되었다. 그 후, 메틸렌 클로라이드 중 용해된 Boc₂O (5.24 g, 24.0 mmole)는 메틸렌 클로라이드 중 용해된 PLX에 적가되었다. 상기 반응 혼합물은 15°C에서 12 시간 동안 교반되었으며, 그 후 디에틸 에테르로 침전되었다. 상기 생성물은 Boc-PLX와 적은 양의 Boc-PLX-Boc을 함유하였다. Boc-PLX의 분리 는 이 단계에서 수행되지 않았다.

[0077] 50 mL의 최종 부피까지 톨루엔 (200 mL)를 이용한 Boc-PLX 및 Boc-PLX-Boc를 둘다 함유하는 상기 생성물 (5.0 g)의 공비 증류 이후, L-알라닌 NCA (15.0 g, 130.4 mmole) 및 클로로포름/N,N-디메틸포름아마이드 무수물 (v/v으로 9/1, 500 mL)이 40°C에서 상기 반응 혼합물에 추가되었다. 상기 혼합물은 질소 무수물 조건 하에서 24 시간 동안 40°C에서 교반되었다. Boc-PLX-PA는 디에틸 에테르로의 침전에 의하여 고체로서 단리되었으며, 상기 Boc-PLX-Boc는 용액으로 제거되었다.

[0078] 모노 아미노 말단기를 가진 Boc-PLX-PA (5.0 g, 1.2 mmole)는, 클로로포름 중 아세틸 클로라이드 (0.13 mL, 1.8 mmole)와 반응되었다. 트리에틸아민 (0.25 mL, 1.8 mmole)은 촉매로서 사용되었다. 상기 반응은 Boc-PLX-PA-ac를 합성하기 위해 15°C에서 12 시간 동안 수행되었다. 상기 반응물은 디에틸 에테르로의 침전에 의해 단리되었으며, 잔류 용매는 진공 하에 제거되었다.

[0079] 물 중 트리플루오로아세트산 (0.65 M, 100 mL)이 클로로포름(100 mL)에 용해된 Boc-PLX-PA-ac (4.8 g, 1.1 mmole)에 첨가되었으며, 상기 반응 혼합물은 6 시간 동안 15°C에서 교반되었다. NaOH 수용액으로 7.0까지 pH의 조정 이후, 상기 중합체는 1000 달톤의 컷오프 분자량을 갖는 막을 이용하여 물에서 투석되었고 동결 건조되었다. PLX-PA-ac의 반응물은 70% 수율로 수득되었다.

[0080] 락토바이오산 (lactobionic acid, LB) 부분은 DMTMM 커플링 반응에 의하여 PLX-PA-ac에 혼입되었다. PLX-PA-ac (3.0 g, 0.7 mmole)는 물에 용해되었다. DMTMM (0.3 g, 1.1 mmole) 및 LB (0.4 g, 1.1 mmole, Sigma-Aldrich, USA)가 상기 반응 플라스크에 주입되었다. 상기 반응물은 1000 달톤의 컷오프 분자량을 갖는 막을 이용한 투석에 의해 정제되었으며 동결 건조되었다. 상기 LB-PLX-PA-ac는 90% 수율로 수득되었다.

[0082] **¹H-NMR 분광 분석**

[0083] PLX, Boc-PLX-PA-ac, PLX-PA-ac, 및 LB-PLX-PA-ac (500 MHz NMR 분광기; Varian, USA)의 ¹H NMR 스펙트럼은 상기 반응의 진행을 확인하고 상기 중합체의 조성 및 평균 분자량 (M_n)을 결정하기 위해 사용되었다. CF₃COOD는 NMR 용매로서 사용되었다.

[0085] **젤 투과 크로마토그래피 (GPC)**

[0086] 굴절률 검출기 (R1750F, Younglin, Korea)를 구비한 젤 투과 크로마토그래피 시스템 (SP930D, Younglin, Korea)이 상기 중합체들의 분자량 및 분자량 분포를 수득하기 위해 사용되었다. N,N-디메틸 포름아마이드는 용

출 용매로서 사용되었다. 400 내지 16,900 달톤의 분자량 범위의 폴리에틸렌 글리콜은 분자량 기준으로 사용되었다. OHPAK SB-802.5QH 컬럼 (Shodex)이 사용되었다.

[0088] **FTIR 분광 분석**

[0089] PLX-PA-ac 및 LB-PLX-PA-ac 수용액 (D₂O 중 6.0 wt%)의 FTIR 스펙트럼 (FTIR 분광광도계 FTS-800; Varian)이 37℃에서 조사되었다. 해상도는 2.0 cm⁻¹이었다. 상기 아미드 피크의 데콘볼루션 (deconvolution)은 1600-1700 cm⁻¹의 스펙트럼 범위에서 수행되었다. 상기 데콘볼루션된 스펙트럼은 상기 펩타이드의 2 차 구조를 분석하기 위해 XPEAKS 프로그램으로 피팅되었다. 아미드 I 밴드는 XPEAKS 프로그램에 의해 분석되었으며, 1656, 1646, 및 1635/1624 cm⁻¹에서의 피크는 각각, α-헬릭스, 랜덤 코일, 및 β-시트를 의미한다.

[0091] **투과 전자 현미경 (TEM)**

[0092] PLX-PA-ac 및 LB-PLX-PA-ac 수용액 (0.05 wt%)은 탄소 그리드 상에 배치되었고 과량의 용액은 필터 페이퍼로 닦아냈다. 상기 그리드는 24 시간 동안 20℃에서 공기-건조되었다. 상기 현미경 이미지들은 200 kV의 과속 전압으로 JEM-2100F (JEOL)을 이용하여 획득되었다.

[0094] **동력학적 분석**

[0095] PLX-PA-ac에 대하여 0.0, 5.0, 및 20.0 wt%의 LB-PLX-PA-ac를 함유하는 PLX-PA-ac 수용액 (6.0 wt%)의 탄성율이 4℃ 및 37℃에서 동력학적 레오메트리 (dynamic rheometry) (레오미터 RS 1; Thermo Haake, Germany)에 의해 조사되었다. 상기 중합체 수용액은 0.5 mm의 간격을 갖는 25 mm 직경의 평행한 판 사이에 배치되었다. 또한, 구입한 그대로의 MatrigelTM의 탄성율은 비교를 위해 4℃ 및 37℃에서 조사되었다. 상기 동력학적 분석 동안, 상기 샘플들은 물 증발을 최소화하기 위해 물에 적신 솜을 구비한 챔버 내에 배치되었다. 데이터는 조절된 응력 (stress) (4.0 dyne/cm²) 및 1.0 rad/s의 진동수 (frequency) 하에서 수집되었다.

[0097] **주사 전자 현미경 (SEM)**

[0098] 37℃에서 in-situ 형성된 상기 젤 [LB-0%, LB-5%, LB-20%, 및 MatrigelTM (M)]의 SEM 이미지들은 젤을 액체 질소 (-196℃)로 쿨링하고 이어서 동결-건조함으로써 획득되었다. SEM 이미지들은 전계 방출 주사 전자 현미경 (FE-SEM) 장비 (JSM-6700F, JEOL Ltd., Japan)를 이용하여 획득되었다.

[0100] **간세포 분화에 대한 TMSC의 3 차원 (3D) 세포 배양**

[0101] TMSC는 이화여자대학교 목동 병원 (서울, 한국)에서 상기 대학의 윤리적 지침에 따라 11 세 여성 기증자 (IRB 승인 코드: ETC 11-53-02)의 구개 편도선 (palatine tonsils)으로부터 분리되었다. 상기 기증자로부터 사전 동의를 얻은 후에, 상기 편도선은 편도선 수술 (tonsillectomy)에 의해 상기 환자로부터 수집되었다. 세포들은 5% CO₂ 분위기 하에서 10% (v/v) 소 태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS, Hyclone, USA), 1.0%(v/v) HycloneTM 페니실린/스트렙토마이신 용액, 및 1.0%(v/v) Gibco[®] 항생제-항암제 용액으로 보충된 고 포도당 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Hyclone, USA)에서 5 패시지 (passage) 동안 37℃에서 2 D로 폴리스티렌 배양 플레이트에서 배양되었다. 3 차원 배양 시스템의 제조에 앞서, PLX-PA-ac 수용액 (6.0 wt%, 0.1 mL/well)이 상기 세포들이 상기 배양 플레이트의 하부로 직접 부착되는 것을 방지하기 위해 37℃에서 웰에 주입되었다. PLX-PA-ac/LB-PLX-PA-ac 용액 (6.0 wt%; 100/0, 95/5, 80/20; 0.2 mL/well)에 현탁된 TMSC (패시지 6, 3.11 x 10⁵ cells/well)는 37℃에서 (SPLInsertTM, SPL, USA와 함께) 24-웰 배양 플레이트에 주입되었다. 상기 시스템들은 각각, LB-0%, LB-5%, 및 LB-20%으로 지정되었다. 상기 코드의 숫자는 LB-PLX-PA-ac 함량을 나타낸다. MatrigelTM (M) (BD bioscience, USA)은 비교 목적으로 3 차원 배양 시스템 대조군으로서 사용되었다.

[0102] 상기 중합체 수용액의 졸-젤 전이에 의하여, TMSC는 37℃에서 하이드로젤에서 in situ 캡슐화되었다. TMSC의 3 차원 배양은 혈청-결핍 (serum deprivation) 절차에 따라 무-혈청-2-단계 프로토콜을 이용하여 간세포 유도 배지로 수행되었다. 0 일째에서, 하이드로젤에서 캡슐화된 TMSC는 혈청 결핍을 위해 20 ng/mL 표피 성장 인자 (epidermal growth factor, EGF) (Peprotech, USA), 10 ng/mL 염기 섬유아세포 증식 인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (Peprotech, USA)를 함유하는 IMDM 배지를 이용하여 2 일 동안 3 차원 배양되었다. 첫 번째 단계에서, 상기 세포들은 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, HGF, 20 ng/ml) (Peprotech,

USA), bFGF (10 ng/ml), 및 니코틴아미드 (0.2 g/L, Sigma-Aldrich, USA)가 현탁된 IMDM의 간세포 분화 배지를 이용하여 7 일 동안 3 차원 배양되었다. 두 번째 단계에서, 상기 캡슐화된 세포들은 온코스타틴 M (oncostatin M, 20 ng/ml), 덱사메타손(dexamethasone) (1 μ M, Sigma-Aldrich, USA), 및 1X 인슐린-트랜스페린-셀레니움-G 보충액 (ITS+ premix) (Gibco, USA)이 현탁된 IMDM의 성숙 배지를 이용하여 3 차원 배양되었다. 페니실린/스트렙토마이신 (1%)은 각 단계에서 오염을 방지하기 위해 사용되었다. 상기 세포들은 5% CO₂ 분위기 하에서 37°C에서 3 차원 배양되었다. 전체 배지들은 신선한 배지들로 매일 교체되었다.

[0104] **세포 증식**

[0105] LB-0%, LB-5%, LB-20% 및 Matrigel™ (M) 시스템의 세포 생존도는 제조사의 지침에 따라 셀 카운팅 키트-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (Dojindo, Japan)를 이용하여 측정되었다. 상기 CCK-8 용액은 생세포에서 탈수소효소에 의해 환원되어 오렌지색 포르마잔 (formazan)을 생성하는 수용성 테트라졸륨염 (tetrazolium salt)을 포함한다. 3 차원 배양의 0, 2, 9, 16, 및 23 일에서 수집된 세포-캡슐화 시스템은 CCK-8 용액에서 1 시간 동안 인큐베이션 되었다. 인큐베이션 이후에, 상기 상청액의 흡광도가 마이크로플레이트 리더기 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정되었다. 광학 밀도는 0 일에서의 데이터에 비례한 표준화에 의해 상대적인 세포 생존율 (%)로 전환되었다. 각 샘플에 대해 n은 3이다.

[0106] 또한, LB-0%, LB-5%, LB-20%, 및 Matrigel™ (M)에서의 세포 이미지는 라이브/데드 키트 (Life Technologies, USA)를 이용하여 획득되었다. 3 차원 배양의 0, 2, 9, 16, 및 23 일에서 수집된 세포-캡슐화 시스템은 에티디움 호모다이어-1 (ethidium homodimer-1, 4 μ M) 및 칼세인 아세톡시 메틸 에스테르 (calcein acetoxy methyl ester, 2 μ M)을 함유하는 인산염 완충 식염수에서 15 분 동안 인큐베이션 되었다. 표지된 세포들은 형광 현미경 (IX71, Olympus, USA) 하에서 보여졌다. 죽은 세포들은 상기 죽은 세포의 핵산과 결합하는 에티디움 호모다이어-1에 의해 적색으로 염색되는 반면, 살아있는 세포들은 칼세인 아세톡시 메틸 에스테르에 대한 유비퀴터스 세포내 에스테라제 활성의 존재에 의해 녹색으로 염색되었다.

[0108] **RNA 추출 및 qRT-PCR**

[0109] 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 TRIZOL® (Invitrogen, USA)을 이용하여 세포-캡슐화된 하이드로겔로부터 추출되었다. RNA의 농도는 나노드롭 분광기 (ND 1000, Thermo scientific, USA)를 이용하여 측정되었으며, 대응하는 cDNA는 ReverTra Ace® qPCR RT 키트 (Toyobo, Japan)를 이용하여 합성되었다. mRNA 발현은 IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA)을 이용하여 실시간 PCR 장비 (CFX96™, Bio-Rad, USA)에 의해 분석되었다. 간세포 바이오 마커에 대한 mRNA 발현은 글리세르알데히드-3-인산-탈수소효소 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, GAPDH) (하우스키핑 유전자)로 표준화되었다. 실시간 RT-PCR 조건은 활성화 (activation)를 위해 95°C에서 3 분, 및 변성 (denaturation)을 위해 95°C에서 10 초, 결합 (annealing)을 위해 58°C에서 15 초, 및 신장 (extension)을 위해 72°C에서 20 초의 40 사이클이었다. 마지막 사이클 후에, 용해 곡선 분석 단계 (0.5 /s 속도에서 65°C에서 95°C)가 상기 조건들이 정확했는지 결정하기 위해 수행되었다. 표적 유전자들의 상대적인 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 로서 계산되었으며, 여기서 표적 유전자 발현은 $\Delta\Delta C_t = (\text{Gene A} - \text{GAPDH})_t - (\text{Gene A} - \text{GAPDH})_{t_0}$ 로 표준화되었다. t_0 는 실험이 시작된 날을 나타낸다. 각 샘플에 대하여 n은 3이다.

[0111] **면역형광 연구**

[0112] 간세포 조건 하에서 3 차원 배양의 23 일 이후, 상기 하이드로겔에 캡슐화된 TMSC는 10% 중성 완충 포르말린 (neutral buffered formalin, NBF)으로 고정되었다. 상기 샘플들은 광학 커팅 온도 화합물 (optimal cutting temperature compound, Tissue-Tek OCT compound, Sakura, Japan)에 매립되고 사이토크롬 (CM1520, Leica, Germany)을 이용하여 절단되었다. 상기 샘플들은 미리-냉각된 아세톤으로 10 분 동안 -20°C에서 처리되었으며, PBS (0.05%, Tween 20)로 세척되었다. 그 후, 상기 샘플들은 비-특이적 단백질 결합을 방지하기 위해 10% 소혈청 알부민으로 처리되었고 제조사의 프로토콜에 따라 4°C에서 24 시간 동안 항-HNF4 α (Abcam, USA), 항-ALB (Abcam, USA), 및 항-ASGR (R&D systems, USA) 1 차 항체 (primary antibodies)의 존재 하에 인큐베이션 되었다. 그 후 상기 샘플들은 PBS로 세척되었으며, 시각화를 위해 1 시간 동안 염소 항-마우스 항체 DyLight® 550 2 차 항체 (Abcam, USA)로 처리되었다. 상기 세포 핵은 DAPI 염색 (Abcam, USA)에 의해 확인되었다. 표지된 세포들은 형광 현미경 (IX71, Olympus, Japan) 하에서 조사되었으며, 이미지들은 ImageJ software(NIH)로 정량되었다(스케일 바=15 μ m). 면역형광 강도는 LB-0% 시스템에 대해 표준화되었고, 상기

mRNA 테이터는 GAPDH 및 0 일에 대하여 표준화되었다. 별표 (*)는 상기 시스템의 유의성 ($p < 0.05$)을 나타낸다. 상기 바의 별표 (*)는 LB-0% 3 차원 배양 시스템과 비교한 테이터를 나타내며, 각 샘플에서 n은 3이다.

[0114] **알부민 분비 및 우레아 생산의 확인**

[0115] 상기 배양 배지에서 알부민 및 우레아는 원심 분리에 의해 수집되었으며 -80°C 에서 보관되었다. 알부민의 농도는 효소-결합 면역 흡수 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (R&D systems, USA)에 의해 측정되었다. 우레아의 생산량은 제조사의 지침에 따라 비색 분석 키트 (colorimetric assay kit) (BioVision, USA)를 이용하여 결정되었다. 각 샘플에서 n은 3이다.

[0117] **ICG 흡수량 연구**

[0118] ICG (TCI, Japan)는 DMSO에 용해되었으며 1 mg/mL 까지 배양 배지에서 희석되었다. 상기 세포들은 1 시간 동안 37°C 에서 인큐베이션 되었으며 PBS로 3 회 세척되었다. 이미지들은 현미경 (IX71, Olympus, Japan)을 이용하여 취득되었다.

[0120] **통계 분석**

[0121] 테이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)으로서 표시된다. 평균 값의 차이는 터키 테스트 (Tukey test)와 단 방향 ANOVA를 이용하여 분석되었다. p 값이 0.05 미만일 때 차이가 유의한 것으로 간주되었다(* 로 표시).

[0123] **결과**

[0124] 썬머젤은 고분자의 수용액으로, 온도가 높아짐에 따라 졸-젤 전이를 보인다. 세포 합입에서 어떠한 유기 용매나 화학물이 필요치 않은 세포친화성 과정과 간편성 때문에 주사 가능한 3 차원 세포 매트릭스으로써 제안된다. 본원에서 생리활성 폴리펩티드 기반 고분자는 L-알라닌의 N-카복실 무수물을 아미노 올리고프로필렌 글리콜이 말단 캐핑 된 폴리에틸렌 글리콜 (PLX)에 고리 개환 반응 시킨 후, LB를 결합 하였다. 자세한 합성과정은 도 1을 통해 설명할 수 있다. 도 1은, LB-PLX-PA-ac의 락토바이오산-결합된 생리활성 복합체 (bioactive polymer)의 합성을 나타낸 도면이다.

[0125] 첫 번째로, PLX의 아미노 관능기를 t-부틸 옥시카보닐 무수물 (Boc_2O)을 사용하여 부분적으로 프로텍션 한다. α, ω -di-Boc-PLX를 소량과 α -Boc- ω -아미노-PLX를 최대한 생성하기 위해 Boc_2O 의 과량 (PLX에 대하여 1.2 당량)을 PLX 용액에 서서히 첨가하였다. 이 생성물은 혼합물로 얻어지지만, L-알라닌의 N-카복실 무수물은 α, ω -di-Boc-PLX가 아닌, α -Boc- ω -아미노-PLX에만 반응한다. 이어서 Boc-PLX-PA의 아미노 말단기를 아세틸 클로라이드를 이용하여 캡핑하여, Boc-PLX-PA-ac를 만든다. 반응하지 않은 α, ω -di-Boc-PLX는 Boc-PLX-PA-ac가 디에틸 에테르에 재침전되는 동안 용액으로 분리된다. Boc-PLX-PA-ac의 Boc기는 트리플루오로아세트산으로 제거하여 아미노 말단기를 가진 PLX-PA-ac를 만든다. PLX-PA-ac의 자유 아미노기와 LB는 4-(4,5-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모포리늄 클로라이드 [4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMTMM]을 이용하여 커플링 하여 LB-결합된 생리활성 썬머젤 고분자인 LB-PLX-PA-ac를 합성하였다.

[0126] PLX, Boc-PLX-PA-ac, PLX-PA-ac와 LB-PLX-PA-ac의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 반응의 진행마다 확인하였다 [도 2의 (a)]. Boc-PLX-PA-ac의 알라닌의 메틸 (CH_3 -)과 메틴 ($-\text{CH}-$)기는 1.4 내지 1.8 ppm 및 4.5 내지 4.9 ppm에서 각각 나타난다. 말단 캐핑 된 아세틸 그룹 또한 2.4 ppm에서 나타난다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.6 ppm의 t-부틸기의 1중선의 사라짐은 Boc기가 디프로텍션 된 PLX-PA-ac를 나타낸다. 4.1-5.0 ppm에서 당의 수소 피크가 나타난 것은 LB가 PLX-PA-ac와 결합된 것을 가리킨다. 특히, 4.8 ppm에서 갈락토스 링의 메틴 피크는 PLX-PA-ac와 LB의 1 대 1 결합된, 최종 합성물인 LB-PLX-PA-ac의 성공적인 합성을 뜻한다. 게다가 PLX, Boc-PLX-PA-ac, PLX-PA-ac, 와 LB-PLX-PA-ac의 겔 침투 크로마토그램에서 머무름 시간이 12.5, 12.3, 12.3, 및 11.6 분으로 변화하여 반응의 진행을 뒷받침해준다 (도 3). LB-PLX-PA-ac의 폴리펩티드의 2 차 구조를 XPEAKS 소프트웨어를 이용하여 아미드 I 밴드로 분석하였다. LB-PLX-PA-ac의 α -헬릭스/랜덤 코일/b-시트 비율은 50/18/32이며 [도 2의 (b)], PLX-PA-ac (51/15/34)와 비슷하였다 (도 4). PLX-PA-ac와 LB-PLX-PA-ac는 모두 양친매성 분자로, 친수성의 PLX 나, LB-PLX 블록과 소수성의 PA-ac 블록을 포함한다. 따라서, 물에서 마이셀 (micelle)을 이루며 자가응집한다.

[0127] PLX-PA-ac와 LB-PLX-PA-ac의 투사전자주사현미경 이미지는 30-60 nm의 사이즈를 가진 구형의 마이셀 구조를 보여준다 [도 2의 (c)].

[0128] 도 5는, LB-0%, LB-5%, 및 LB-20%의 썬머젤의 4°C 및 37°C 에서의 저장 탄성율 (storage modulus)(a) 및 SEM 이

미지(b)를 나타낸 것이다. 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리알라닌 이중 공중합체와 비슷하게 LB-PLX-PA-ac 수용액 (6.0 wt%)는 온도가 증가함에 따라 졸-겔 전이를 보였다. 3 차원 줄기세포 배양을 위해서, PLX-PA-PA-ac를 기준 비로 하여, 0.0, 5.0, 과 20.0 wt% 의 LB-PLX-PA-ac가 포함된 PLX-PA-ac 썬머젤을 사용하였고, 이것을 LB-0%, LB-5%, LB-20%라 명명하였다. 전체 고분자 농도는 6.0 wt%로, 37℃에서 700-800 Pa의 탄성율을 고려하여 결정하였고 이는 간세포의 탄성율과 비슷하다. 0.0, 5.0, 그리고 20.0 wt% 의 LB-PLX-PA-ac를 PLX-PA-ac에 융합하였음에도, PLX-PA-ac의 졸-겔 전이나 탄성율이 큰 차이를 보이지 않았다. 대조군으로 비교된 Matrigel™은 쥐의 암 세포에서 채취한 세포외기질로, 온도가 증가하면서 졸-겔 전이를 보인다. 공급받은 Matrigel™의 탄성율은 37℃에서 150 Pa를 보이며, 이는 간세포와 본원의 시스템보다 낮은 수치이다. 37℃에서 겔의 마이크로 구조는 액체 질소 (-196℃)에 겔을 급냉한 후, 동결 건조하여 관찰하였다. LB-0%, LB-5% 와 LB-20%, 그리고 Matrigel™에서 높은 공극 구조를 관찰하였다. 겔의 공극 구조는 3 차원 세포 배양 시, 대사산물과 영양분을 위한 질량 수송 채널을 제공하기 때문에 중요하다.

[0129] 간세포 분화를 위해 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cells, TMSCs)가 이용되었다. TMSC는, 편도 수술을 통해 버려져 왔던 인간의 구개 편도 조직에서 분리한 세포이다. 편도 조직에서 유래된 중간엽 줄기세포의 세포 수는 골수에서 채취된 것보다 10 배 내지 100 배 정도 더 많고, 골수 유래 중간엽 줄기세포 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC)보다 2 배 내지 3 배의 분화 속도를 보인다. 이러한 중간엽 줄기세포의 공급원으로써의 장점을 가진 TMSC는, 최근에 주목을 받고 있다. TMSC는 11 살 여자아이에게서 동의를 받아 (IRB 승인 코드: ETC 11-53-02) 이화여자대학교 목동 병원 (서울, 한국)에서 기증받은 것이다.

[0130] TMSC는 2 차원의 폴리스티렌 접시에서 10% 소태아 혈청이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배양액을 이용하여 5 패시지 동안 배양되었다. 그 후, 2 차원 배양 접시에서 떼어낸 TMSC (6 패시지)는 세포 현탁 고분자 수용액의 졸-겔 전이를 통해 37℃에서 함입되었으며, 이 때를 0 일이라 정하였다. 함입된 TMSCs는 표피 성장인자 (epidermal growth factor, EGF, 20 ng/mL)와 염기 섬유아세포 증식인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF, 10 ng/mL)가 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 배양액에서 2 일 동안 혈청 제거를 위해 배양하였다. 간세포 분화는 무혈청 2 단계 프로토콜을 이용한, 간세포 유도 배양액을 통해 수행하였다. 첫 번째로, 간세포 성장인자 (hepatocyte growth factor, HGF, 20 ng/mL)와 bFGF (10 ng/mL), 그리고 니코틴아미드 (0.2 g/L)가 포함된 IMDM을 이용하여 7 일 동안 3 차원 배양하였다. 두 번째로, 온코스타틴 M (oncostatin M, 20 ng/mL)과 덱사메타손 (dexamethasone, 1 μM), 1 X 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (1 X insulin-transferrin-selenium, ITS+ 프리믹스)를 첨가한 IMDM 배양액을 이용하여 14 일 동안 3 차원 배양하였다.

[0131] 0 일째에 3 차원 배양한 세포의 모양은 구형의 모형을 보여주었다. 이 구형 모양은 LB-0%, LB-5%, LB-20% 시스템에서 유지되는 반면, Matrigel™ (M)에서는 구형에서 섬유아세포 모양으로 변화하는 것이 관찰되었다 [도 6의 (a)]. 상기 이미지들은 라이브/데드 분석 키트 (live/dead assay kit)를 이용하여 획득되었으며, 스케일 바는 50 μm이다. 각각의 시스템에서 세포 수는 세포의 탈수소효소에 의해 발색단이 생성되는 양을 이용한 cell counting kit-8 (CKK-8)을 이용하여 분석되었으며, 살아있는 세포에 비례하여 발색단 흡광도를 보인다. 간세포 분화 동안에, LB-0%, LB-5%와 LB-20% 의 3 차원 배양 시스템에서 세포 수는 감소한 반면, Matrigel™ (M)에서는 23일 쯤 약 2 배정도의 증가가 관찰되었다 [도 6의 (b)].

[0132] 간세포 바이오 마커 발현은 간세포핵인자 4α (hepatocyte nuclear factor 4α, HNF4α), 알부민 (ALB), 아시알로당단백질수용체 (asialoglycoprotein receptor, ASGR)의 mRNA 레벨을 확인하였다. HNF4α 는 간 발달 과정 동안, 건강한 간 구조를 형성하는데 관여하는 간세포 분화의 핵심 바이오 마커이다. 이 바이오 마커는 포크헤드 박스 단백질 A1 (forkhead box protein A1, FOXA1), GATA 결합 단백질 4 (GATA binding protein 4, GATA4), 간세포핵인자 1β (HNF1 β), CCAAT/촉진-결합 단백질 α (CCAAT/enhancer-binding protein α, CEPBA), 간 수용체 동족체 1 (liver receptor homolog 1, LRH1)과 혈액생성 관련 호메오박스 (hematopoietically expressed homeobox, HHX)같은 몇몇 간 분화 관련 유전자의 발현을 조절한다. ALB는 성숙 간세포의 분화 바이오 마커이다. ASGR의 발현 역시 줄기세포의 간세포 분화를 나타낸다. 간세포의 표면에는 ASGR의 발현 (500,000 ASGR/간세포)이 높다고 알려져 있다. 당 기반 리간드는 ASGR에 높은 친화력을 가지고 있다고 알려져 있다. 이 mRNA들에 해당하는 프라이머 서열은 하기 표 1에 정리되어있다.

[0133] [표 1]

유전자	프라이머 서열	결합 온도(°C)
HNF4 α	F: 5'-AGC AAC GGA CAG ATG TGT GA-3' (서열번호: 1)	56.6
	R: 5'-TCA GAC CCT GAG CCA CCT-3' (서열번호: 2)	58.2
ALB	F: 5'-GTG AGG TTG CTC ATC GGT TT-3' (서열번호: 3)	55.5
	R: 5'-GAG CAA AGG CAA TCA ACA CC-3' (서열번호: 4)	54.8
ASGR	F: 5'-GTG ACC ACC ATC AGC TCA GA-3' (서열번호: 5)	56.8
	R: 5'-TCG CTG TGA AGT TGC TGA AC-3' (서열번호: 6)	55.8
GAPDH	F: 5'-CTC CTC ACA GTT GCC ATG TA-3' (서열번호: 7)	54.5
	R: 5'-GTT GAG CAC AGG GTA CTT TAT TG-3' (서열번호: 8)	53.9

[0134]

[0135] * HNF4 α , ALB, ASGR, 및 GAPDH는 각각, 간세포 핵 인자 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α), 알부민 (albumin), 아시알로당단백수용체 1 (asialoglycoprotein receptor 1), 및 글리세르알데히드-3-인산-탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)를 나타낸다. F 및 R은 각각, 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 나타냄.

[0137]

도 7a 내지 7c는, HNF4 α mRNA (a), ALB mRNA (b), 및 ASGR mRNA (c)의 간세포 바이오 마커 발현을 나타낸 것으로, HNF4 α mRNA는 LB-5%, LB-20%, Matrigel™ (M)에서 3 차원 배양하는 9-23 일 동안에 0 일 째와 비교하여 1.6 배에서 3.1 배 증가하였다 (도 7a). 특히, HNF4 α mRNA 발현은 3 차원 배양 16 일 째, 락토비오닐레이션 되지 않은 고분자 (LB-0%)에서 1.6 배 증가를 보인 것과 비교하여, LB-5%와 LB-20% 시스템에서 모두 3.1 배 증가함을 보였다. 16 일 째, LB-5%, LB-20% 시스템에서 모두 Matrigel™ (M)에서 보다 현저하게 높은 HNF4 α mRNA 발현이 관찰되었다. 이러한 HNF4 α mRNA의 발현은 간 전구세포 (Hepa GR cells)를 히알루론산-젤라틴 (hyaluronan-gelatin, Extracel®)에서 3 차원 배양 하였을 때, HNF4 α mRNA의 발현이 2 배에서 3 배 증가함을 보인 것과 비교할 수 있다. ALB mRNA는 LB-20% 시스템에서 LB-0%, LB-5%, 그리고 Matrigel™ (M)에서 보다 높은 발현을 보였다 (도 7b). LB-20%의 3 차원 배양 시스템에서 9-23 일 동안 ALB mRNA 발현은 4.8 배에서 6.1 배 증가한 반면, LB-0%에서는 2.4 배에서 3.8 배, Matrigel™ (M)에서는 1.7 배에서 1.8 배의 증가를 보였다. ASGR mRNA 발현은 특히 LB-5%와 LB-20% 시스템에서 LB-0% 나 Matrigel™ (M) 보다 특히 더 큰 수치를 보였다 (도 7c). ASGR mRNA 는 LB-5%와 LB-20% 시스템에서 7 배에서 9 배의 증가를 보인 반면, LB-0% 시스템과 Matrigel™ (M)에서는 각각 2.1 배에서 4.8 배, 3.8 배의 증가를 보였다.

[0138]

도 7d는 23 일에서 시간 형광 강도에서 염색된 세포의 수에 따른 형광 이미지의 반정량적 분석 (semi-quantitative analysis)을 나타낸 것이며, 도 7e 내지 도 7g는, HNF4 α (e), ALB(f), 및 ASGR (g)에 대한 23 일에서의 면역형광 이미지이다. HNF4 α , ALB 와 ASGR의 바이오 마커 발현은 면역형광염색법에 의해서 23일 째, 배양시스템의 단백질 단계에서도 증명되었다. 항-HNF4 α , 항-ALB 와 항-ASGR의 1차 항체를 시료에 처리한 후, 시각화를 위해 염소 항-마우스 항체 DyLight® 550를 처리하였다. 면역형광염색법에서 앞서 기술한 단백질들은 빨간색으로 염색되었다. HNF4 α , ALB와 ASGR의 단백질 발현은 LB-0% 시스템의 생리활성이 부족한 고분자와 Matrigel™ (M)에서 보다, 생리활성 LB-결합된 고분자가 포함된 LB-5%와 LB-20% 시스템에서 현저하게 ($p < 0.05$) 높은 수치를 보였다 (도 7d). 3 차원 배양된 세포의 면역형광염색 이미지는 LB-0% 시스템과

Matrigel™ (M)에서 보다, LB-5%와 LB-20% 시스템에서 형광이 증가된 것을 명확하게 알 수 있다 (도 7e 내지 도 7g).

[0139] TMSC로부터 분화된 간세포 특성을 확인하기 위하여 ALB 분비, 요소 생성, 그리고 인도시아닌 그린 (ICG) 흡수를 확인하여 분화된 세포의 간 생리기능을 확인하였다. ALB 분비와 요소생성은 TMSC의 간 분화를 시작하는 0 일째에 적은 수치를 보인다. 하지만, ALB 분비는 TMSC의 간 분화의 결과를 증명하는 듯이 23 일째에 증가되었다. 초기 세포 수로 정규화한, ALB 분비는 LB-5%와 LB-20% 시스템에서 $330\text{--}360\text{ (ng/10}^6\text{ cells)}$ 로, LB-0% 시스템에서 보인 $193\text{ (ng/10}^6\text{ cells)}$ 보다 현저하게 ($p<0.05$) 높은 수치를 보여준다 [도 8의 (a)]. Poly(lactic acid-co-glycolic acid) 마이크로 기공 지지체를 이용하여 21 일 동안 3 차원 배양된 BMSC의 ALB 분비는 $600\text{ (ng/10}^6\text{ cells)}$ 이라 보고되었다. 쥐의 유도 분화 줄기세포를 다공성 알지네이트 수화젤에서 3 차원 배양하였을 때, ALB 분비량은 $160\text{ (ng/10}^6\text{ cells)}$ 이라 보고되었다. 초기 세포 수로 정규화한 요소 생성은 LB-0%, LB-5% 와 LB-20%에서 각각 26, 67, 그리고 $88\text{ (}\mu\text{g/10}^6\text{ cells)}$ 의 수치를 보였으며, Matrigel™ (M)에서 $50\text{ (}\mu\text{g/10}^6\text{ cells)}$ 을 기록하였다 [도 8의 (b)]. 요소 생성은 LB-0% 시스템보다, LB-5% 와 LB-20% 시스템에서 현저하게 ($p<0.05$) 높은 수치를 보였다. 또한, LB-20% 시스템에서의 요소 생성은 Matrigel™ (M)에서 보다 현저하게 ($p<0.05$) 높은 수치를 보였다. 쥐의 배아 줄기세포를 3 차원의 다공성 알지네이트 수화젤에서 배양했을 때, 요소 생성은 $7\text{ (}\mu\text{g/10}^6\text{ cells)}$ 로 보고되었다. ICG 흡수는 간세포의 전형적인 대사 기능과 연관되어 있다. ICG는 간 기능 검사에서 임상적으로 널리 쓰이고 있다. ICG 흡수는 LB-0%, LB-5%, LB-20% 와 Matrigel™ (M)에서 23 일 동안 3 차원 배양된 세포에서 평가하였다. ICG 흡수는 녹색으로 나타난다 [도 8의 (c)]. ICG 흡수의 형광 세기는 LB-5%, LB-20% 시스템에서, LB-0%와 Matrigel™ (M)에서 보다 더 증가한 것을 보인다.

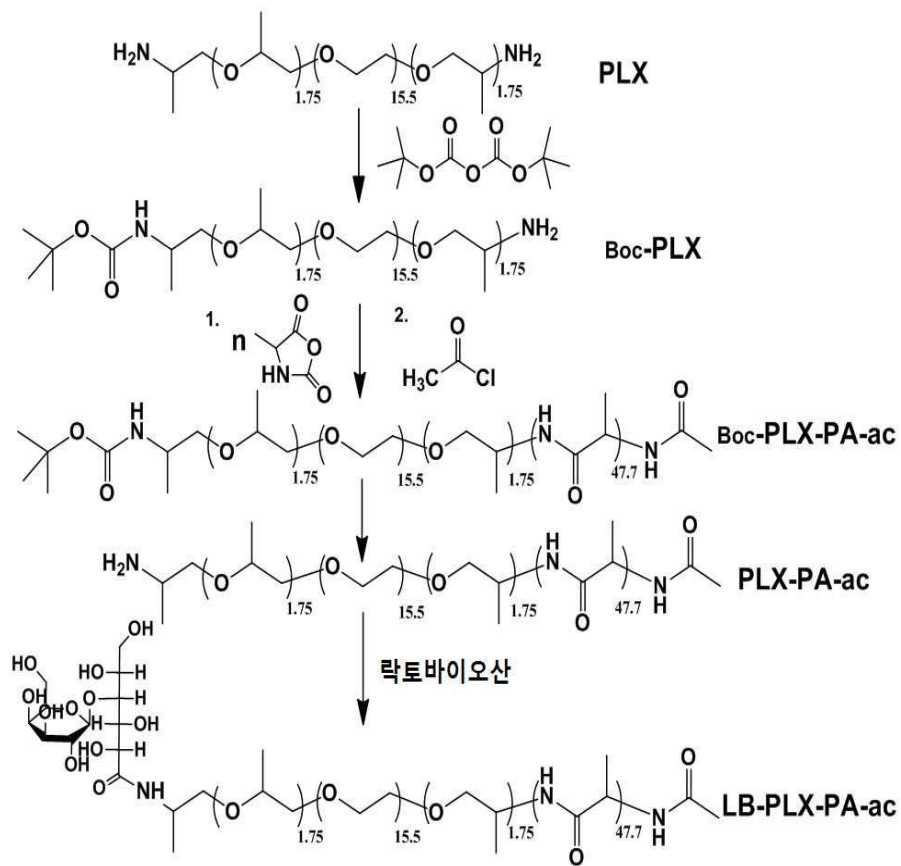
[0141] 결론적으로, mRNA 및 단백질 레벨 둘다에서의 상기 바이오 마커 발현, 및 상기 분화된 세포들의 생리적 기능 (biofunction)은 TMSC의 간세포 분화 (hepatogenic differentiation)가 5-20% 비율로 LB-PLX-PA-ac의 LB-결합된 중합체를 포함하는 써머젤링 3 차원 배양 시스템에서 유의하게 향상되었다는 것을 명확하게 설명한다. 본원은 줄기세포 분화가 표적세포-표면 수용체의 기질에 의하여 조절될 수 있음을 제안한다. 여기서, 줄기세포 분화에 대한 "유도 모델"을 제안한다. 특정 세포 타입으로의 줄기세포의 분화 동안, 상기 줄기세포로 매우 근접한 수용체 기질의 존재는 상응하는 표면 수용체를 갖는 세포 타입으로의 분화를 권장한다. 상기 설명한 바와 같이, 표면 형태 (topography), 기질의 거칠기, 기계적 특성, 및 화학적 및 생물화학적 기능적 접근과 같은 적절한 틈새 디자인을 통한 특정 세포 타입으로의 줄기세포의 분화를 조절하고자 하는 많은 노력들이 있어왔다. 본원은 지지체에 부착되었을 때, 캡슐화된 줄기세포가 표적세포로 분화하는 것을 표적세포-표면 수용체의 기질을 이용한 틈새 디자인 형태의 새로운 패러다임을 제안한다.

[0143] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

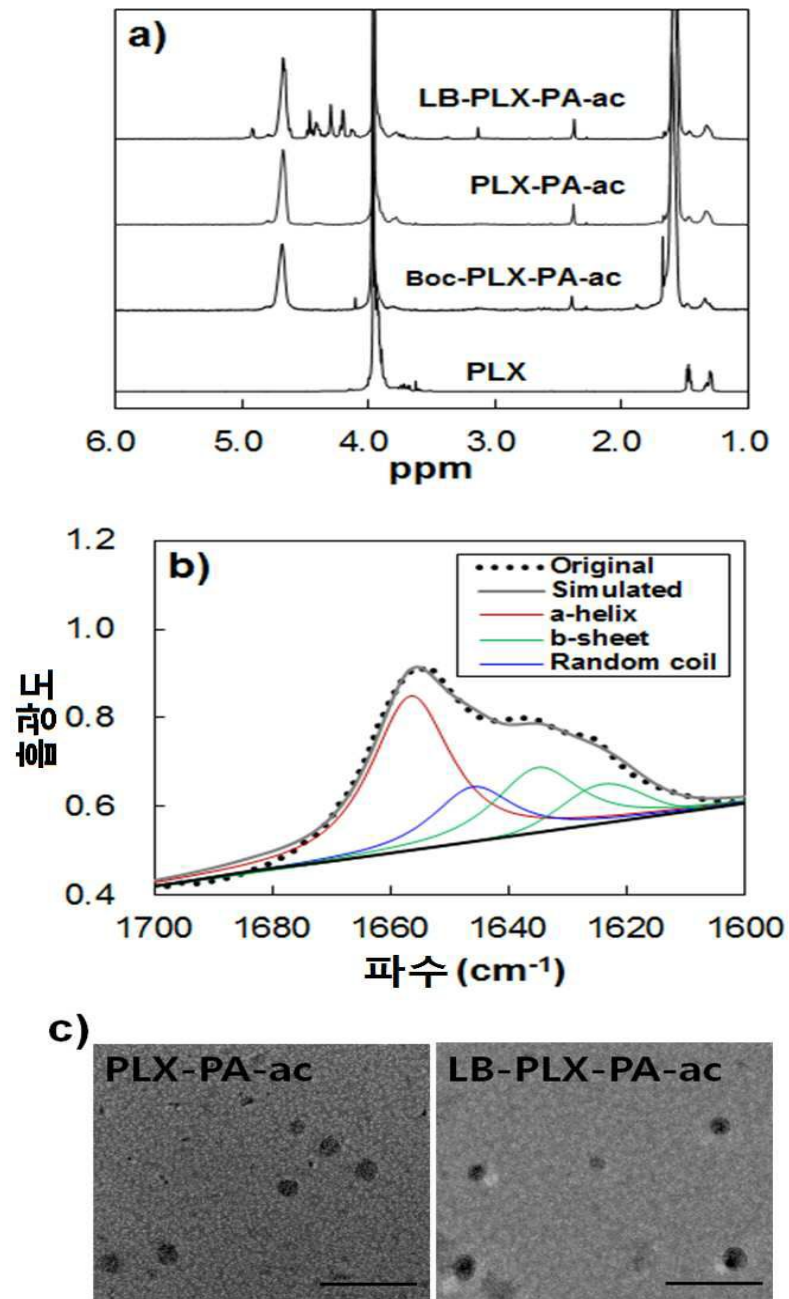
[0144] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

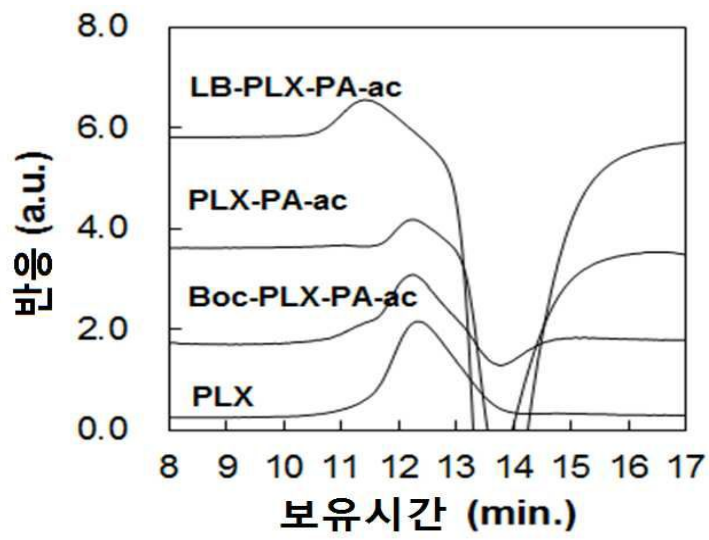
도면1



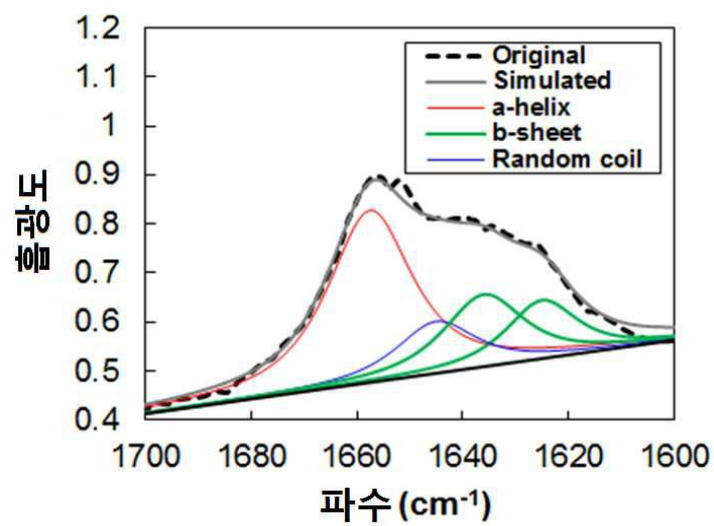
도면2



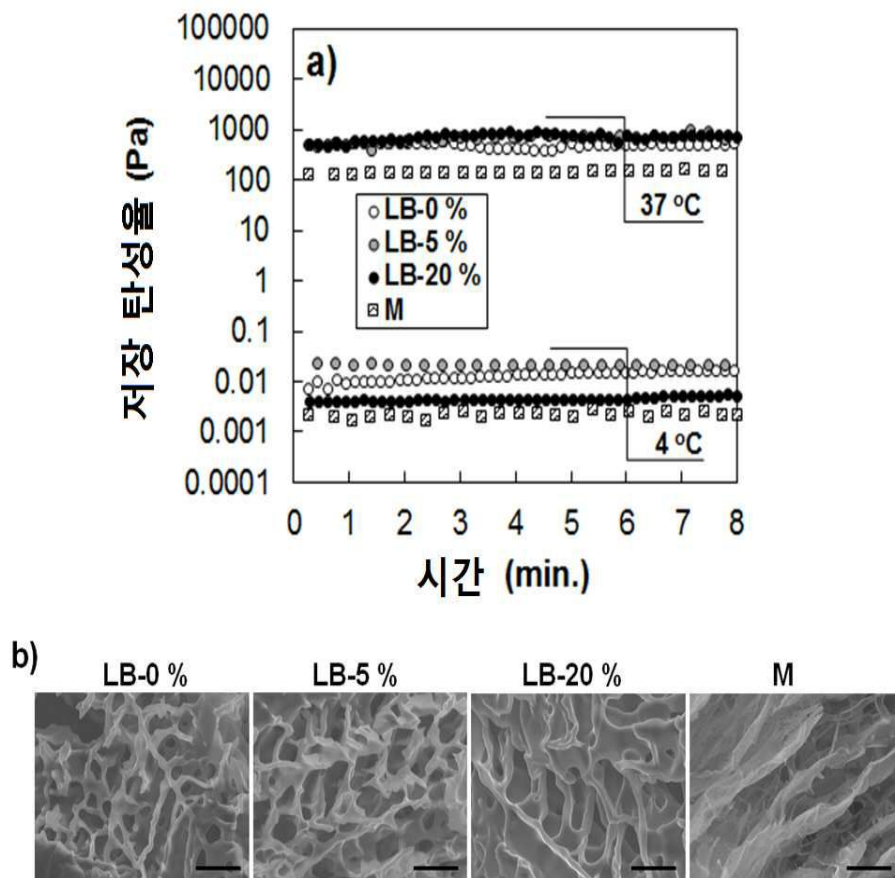
도면3



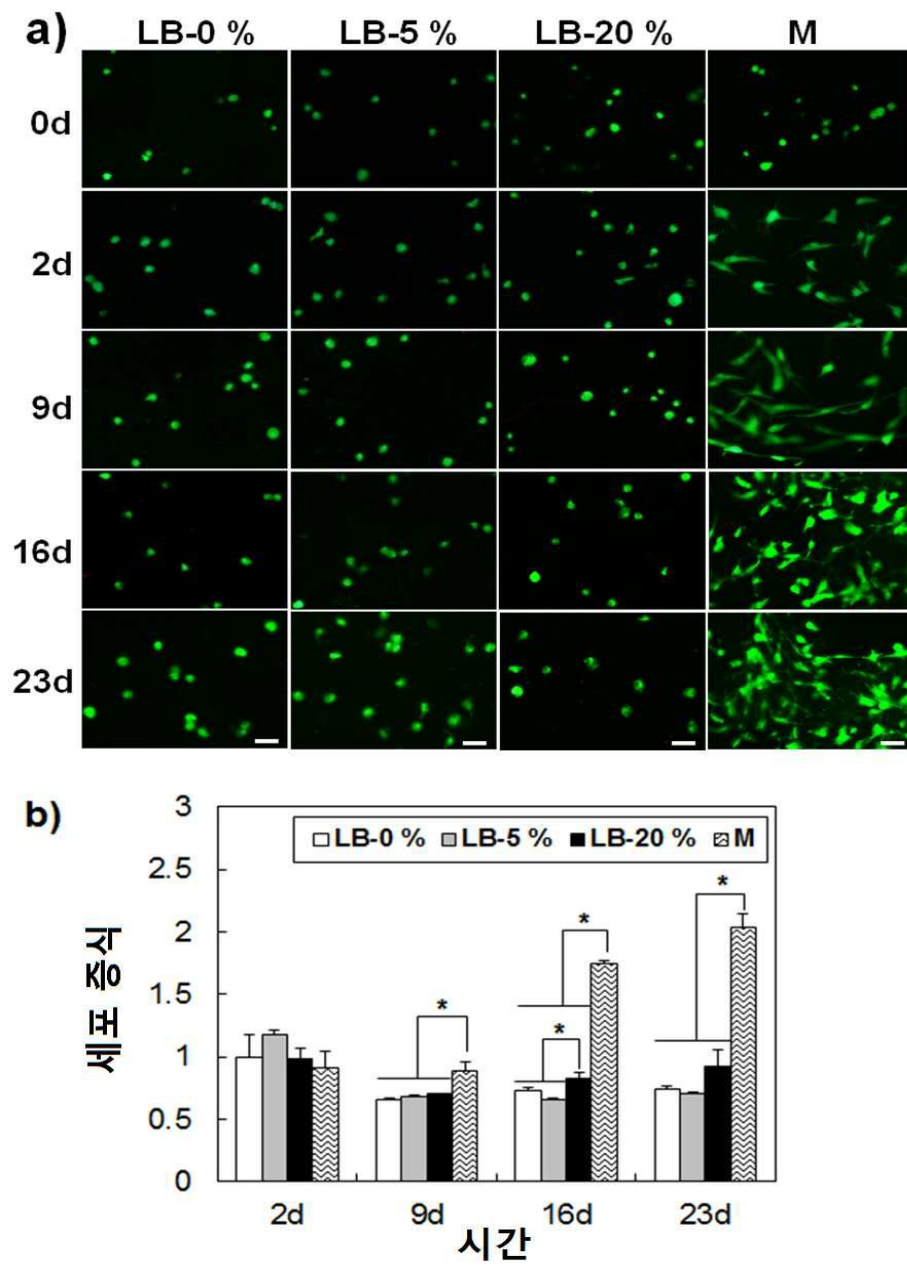
도면4



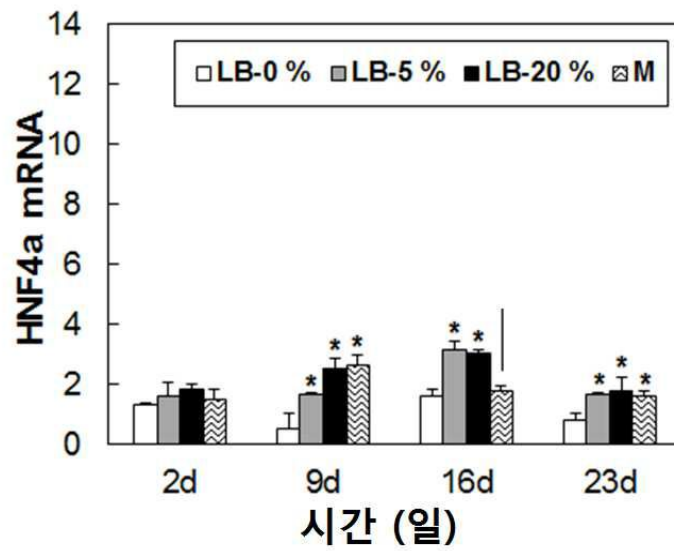
도면5



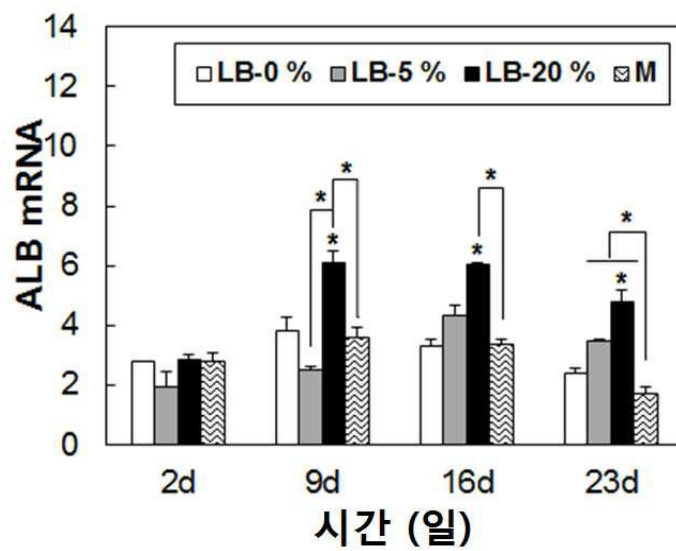
도면6



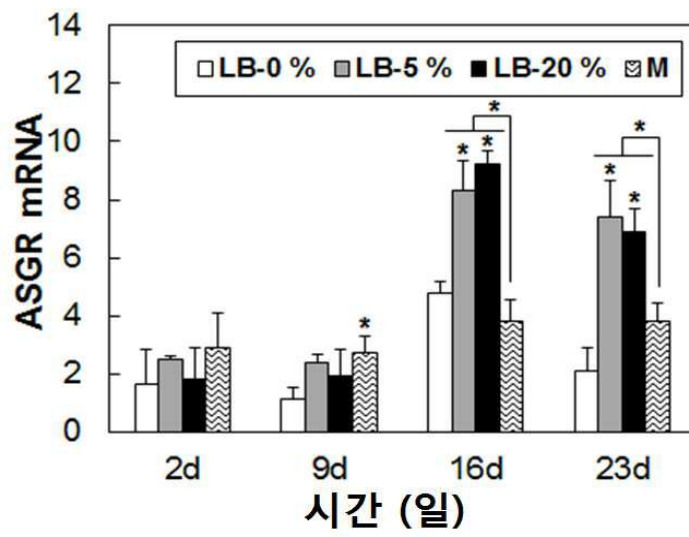
도면7a



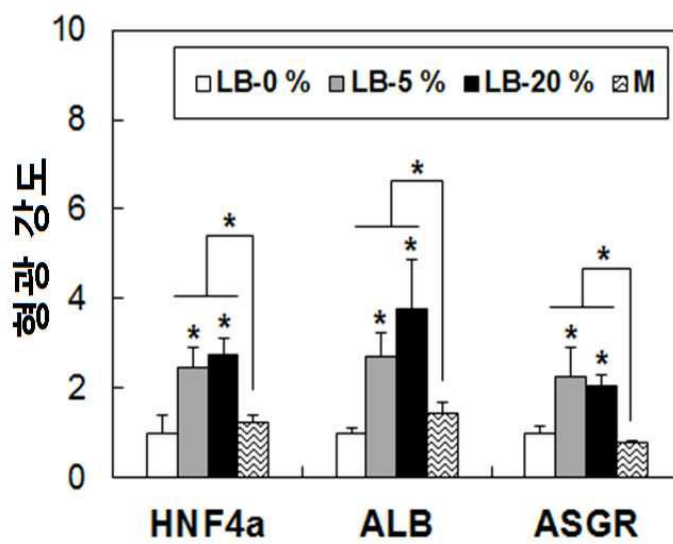
도면7b



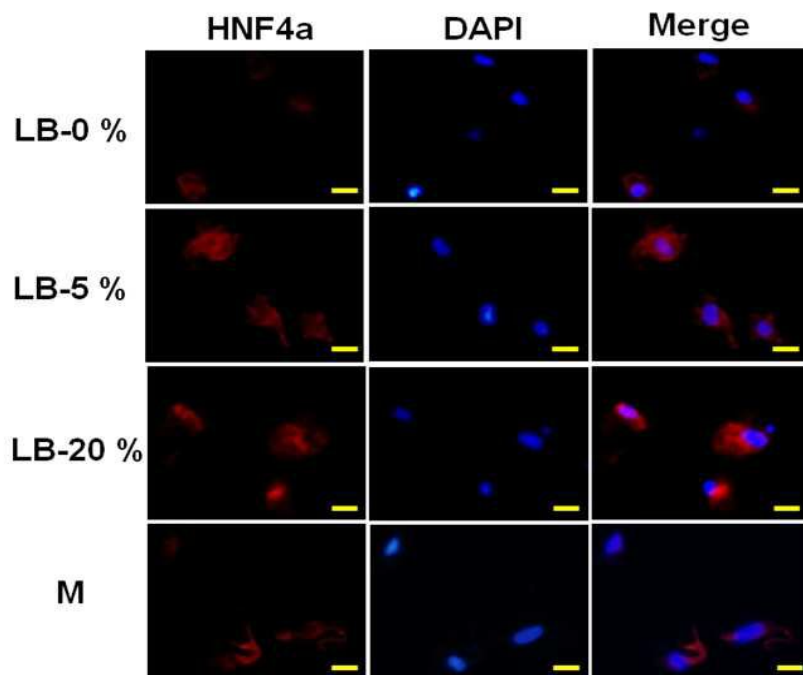
도면7c



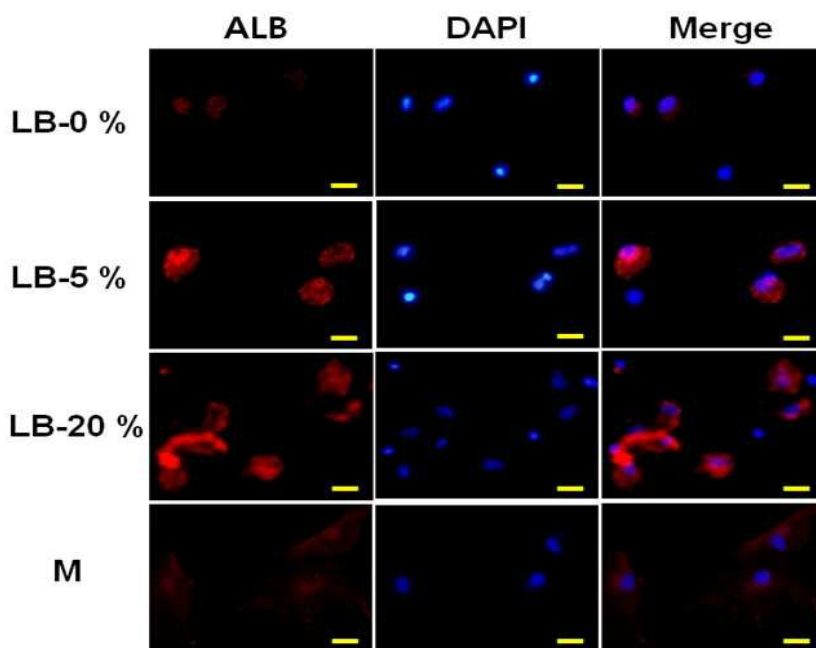
도면7d



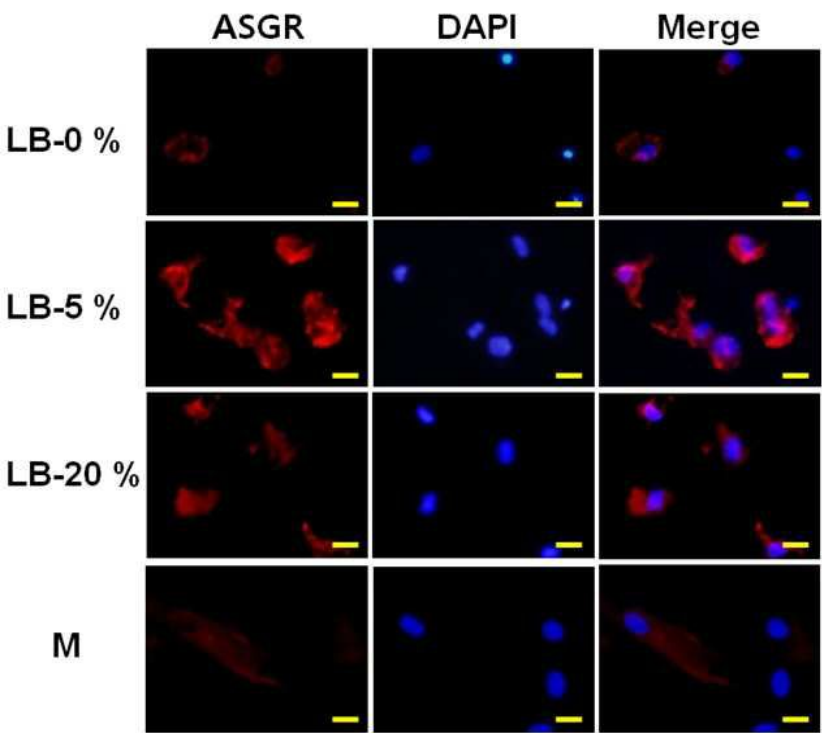
도면7e



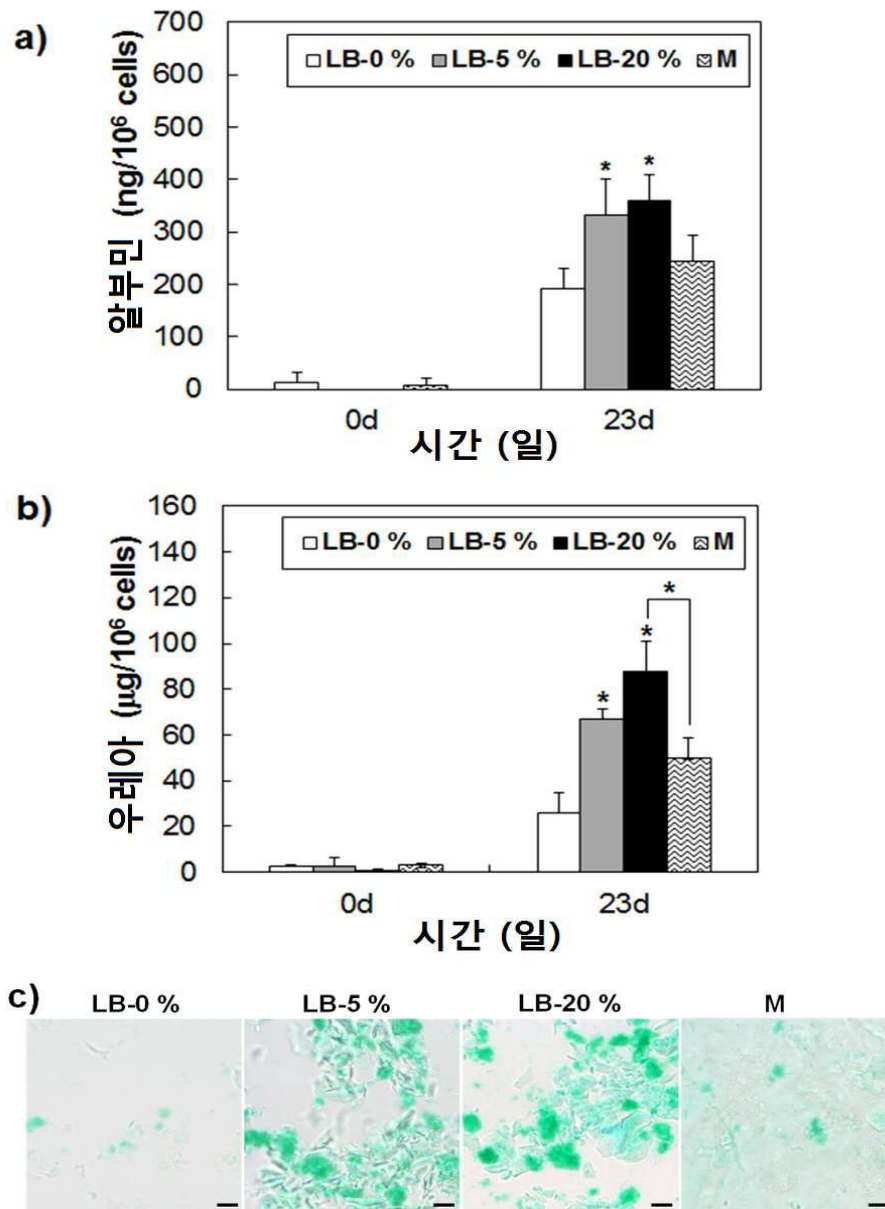
도면7f



도면7g



도면8



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> BIOACTIVE TEMPERATURE-RESPONSIVE POLYMER AND ITS USES AS
3-DIMENSIONAL CULTURE AND TISSUE ENGINEERING
- <130> DP20160027KR
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

agcaacggac agatgtgtga

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

tcagaccctg agccacct

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 3

gtgaggttgc tcacggttt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 4

gagcaaaggc aatcaacacc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 5

gtgaccacca tcagctcaga

20

<210> 6

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer	
<400>	6	
	tcgctgtgaa gttgctgaac	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer	
<400>	7	
	ctcctcacag ttgcatgta	20
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer	
<400>	8	
	gttgagcaca gggacttta ttg	23