(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0082237
(43) 공개일자 2023년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0169967
(22) 출원일자 2021년12월01일
심사청구일자 2021년12월01일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 106동 2002호
어거스티나 세티아와티
서울특별시 마포구 대흥로 141
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

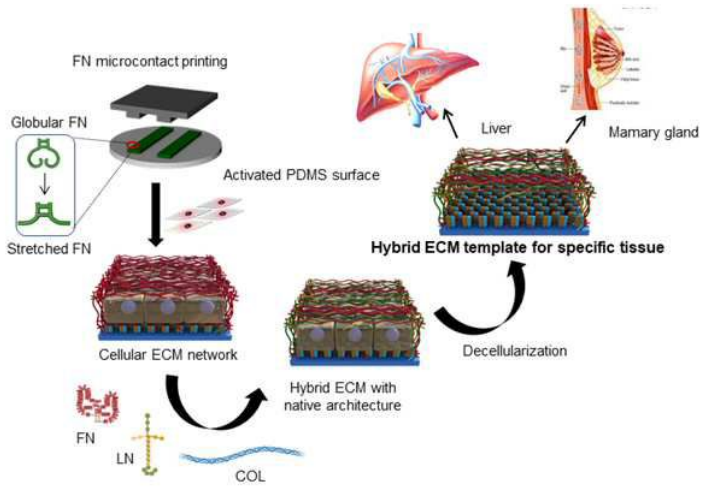
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **생체 적합성이 향상된 장기 맞춤형 세포외기질 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체 적합성이 향상된 장기 맞춤형 세포외기질 (extracellular matrix) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 세포외기질은 원하는 조직 및 장기로의 이식이 용이하도록 세포외기질의 성분을 개질한 것으로 원하는 조직에 맞춰 생체 적합성을 크게 향상시킬 수 있는 것으로, 추후 다양한 이식 및 조직 시험 연구에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/3641 (2013.01)
A61L 27/3683 (2013.01)
A61L 27/3804 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3895 (2013.01)
(72) 발명자
정성우
서울특별시 마포구 마포대로 204, 1615호
알베르투스 이반 브릴리언
서울특별시 마포구 독막로29길 38-11, 305호
김창호
서울특별시 도봉구 삼양로162가길 42-12, 226동 401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110551
과제번호 2019R1A2C2084638
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 바이오 분자 소재의 다차원 계층 구조 연구
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345331324
과제번호 2018R1A6A1A03024940
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 분자 자가 조립 기반 기능성 인공세포 구현
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711141374
과제번호 2021K1A4A8A02079222
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관협력허브구축(R&D)
연구과제명 서강-하버드-SDU BioHybrid 공동 연구센터
기 여 율 10/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345330700
과제번호 2020R1A6C101A192
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 핵심연구지원센터 조성 지원 과제(첨단 바이오계면 핵심연구지원센터)
기 여 율 5/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 202121040
과제번호 2021R1A6C103B422
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 세포 골격 생성 및 인공 세포막 상호작용에 대한 초고분해능 공초점 현미경
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.04.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

탈세포화 (decellularization)된 세포의 세포외기질 (Extracellular Matrix)을 포함하는 구조체;

상기 구조체에 부착되고 세포외막단백질을 포함하는 부착층;

을 포함하는, 생체모방 세포외기질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탈세포화된 세포의 세포외기질은 상기 세포의 세포질, 리소좀, 세포막, 리보솜, 소포체, 핵산 및 핵으로 이루어진 그룹 중 하나 이상이 제거된 것인, 생체모방 세포외기질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포외막단백질은 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin), 라미닌 (laminin), 피브로넥틴 (fibronectin), 비트로넥틴 (vitronectin), 헤파린 (heparin), 케라틴 (keratin) 및 피브린 (fibrin)으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것인, 생체모방 세포외기질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포는 섬유아세포, 줄기세포, 심근세포, 신경세포, 간세포, 근세포, 평활근세포, 조골세포, 연골세포 및 혈관내피세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것인, 생체모방 세포외기질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포는 섬유아세포인 것인, 생체모방 세포외기질.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 생체모방 세포외기질의 제조 방법:

피브로넥틴이 마이크로접촉 프린팅 (microcontact printing)된 기판 상에서 세포를 배양하는 배양 단계;

상기 세포의 세포외기질 (Extracellular Matrix)에 세포외막단백질을 포함하는 부착층을 부착시키는 부착 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방법은 상기 세포를 탈세포화 (decellularization)하는 탈세포화 단계를 더 포함하는 것인, 생체모방 세포외기질의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 탈세포화 단계는 상기 세포의 세포질, 리소좀, 세포막, 리보솜, 소포체, 핵산 및 핵으로 이루어진 그룹 중 하나 이상이 제거하는 제거 단계를 포함하는 것인, 생체모방 세포외기질의 제조 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 세포외막단백질은 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin), 라미닌 (laminin), 피브로넥틴 (fibronectin), 비트로넥틴 (vitronectin), 헤파린 (heparin), 케라틴 (keratin) 및 피브린 (fibrin)으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것인, 생체모방 세포외기질의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 적합성이 향상된 장기 맞춤형 세포외기질 (extracellular matrix) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 본 발명에 따른 세포외기질은 세포 유래의 세포외기질 또는 인공적으로 합성된 세포외기질-유사체를 개질하여 특정 장기에 생체 적합성을 향상시킨 맞춤형 세포외 기질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동물 세포나 조직의 배양은 광범위한 조직공학 및 세포치료 등의 상업적 연구에 매우 중요하다. 이식을 위한 의료 활동에 있어, 새로운 조직의 배양이나, 유전자의 해석, 또는 유용한 세포 단위 생물의 생산을 위한 생체반응기 및 새로운 약제의 영향 평가, 그리고 신속한 세포의 분리 및 대량 생산, 그리고 다양한 조건에 의한 세포의 활성도 실험을 위해서 생체 밖 (in vitro) 세포질의 배양은 매우 중요하다. 특히, 다양한 세포연구를 위해서는 해당 세포들이 가장 잘 적응할 수 있는 조직 형판 (template)이 필요하다. 각기 다른 세포는 각기 다른 종류로 구성되어 조직에서 최적화되어 성장하고, 그 조직들은 서로 다른 단백질 네트워크들로 구성되어 있다. 따라서 여러 단백질들로 구성된 복합단백질 네트워크의 개발이 우선되어야 세포의 흡착, 분화, 증식, 이동, 접착, 신호전달, 유전자 발현 등의 다양한 세포활동에 대한 연구가 가능해진다.

[0003] 생체 내 (in vivo)에서 세포외기질 단백질들은 크게 두 가지 메커니즘을 통해 네트워크를 만든다. 첫째로, 인테그린(integrin) 또는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)과 같이 세포 표면 혹은 세포 밖에 존재하는 음전하를 갖는 물질과 세포외기질 단백질이 결합하여 자가 조립 (self-assembly)을 통해 네트워크를 만드는 방식이 있다. 대표적인 예로, 파이브로넥틴 (fibronectin)과 라미닌 (laminin)이 위와 같은 방식으로 네트워크를 형성한다. 반대로, 단백질 분자들이 가교제 (crosslinking reagent)을 통해 네트워크를 만들기도 한다. 이렇게 가교 (crosslinking)를 통해 네트워크를 만드는 것은 콜라겐 (collagen)과 엘라스틴 (elastin)이 대표적이다.

[0004] 현재까지 생체 밖에서 단백질 네트워크를 구현하는 방법으로는, 크게 물리적인 힘을 이용하는 방식과 음전하를 사용하는 방식이 있다. 먼저, 물리적인 힘을 이용하는 방식은 단백질분자들을 전단력 (shear force)을 이용해 물리적으로 잡아당겨 섬유 (fiber)를 만든다. 이러한 방식은 섬유의 모양이나 배열을 쉽고 간단히 조절할 수 있어 많은 연구들이 진행되어왔다. 하지만, 이러한 방식은 위에서 언급한 세포외기질 단백질들의 섬유형성 메커니즘과 일치하지 않는 비자연계적인 방법이다. 다른 한편으로, 음전하를 이용하는 방식은 주로 음전하를 갖는 고분자들을 사용하여 단백질 섬유를 만든다. 예를 들어, 폴리스타이렌술포네이트나 폴리에틸아크릴레이트와 같은 음전하를 띄는 작용기를 갖는 고분자를 표면에 처리하여 단백질들의 결합과 자가조립을 유도한다. 이 방식은 생체내의 메커니즘을 그대로 모사한 방법이긴 하지만, 현재까지 무작위적이고 비방향성의 섬유들만 형성이 가능하여 네트워크의 모양이나 배열의 조절이 불가능하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 세포의 세포외기질 (extracellular matrix)에 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴 등의 세포외막단백질을 부착시키고 세포를 탈세포화 시켜 (decellularization) 맞춤형 세포외기질을 제작하였으며, 본 발명에 따른 세포외기질은 생체 적합성이 기존에 비해 크게 향상된 것을 확인하였다.

[0006] 이에, 본 발명의 목적은 생체 적합성이 향상된 생체모방 세포외기질을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 생체모방 세포외기질의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 생체모방 세포외기질의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 생체 적합성이 향상된 장기 맞춤형 세포외기질 (extracellular matrix) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 세포외기질은 피브로넥틴, 콜라겐 및 라미닌 등의 세포외막단백질과 효과적인 세포외기질 네트워크를 형성하며, 이로 인해 높은 생체 적합성을 나타낸다.

[0010] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0012] 본 발명의 일 양태는, 탈세포화 (decellularization)된 세포의 세포외기질 (Extracellular Matrix)을 포함하는 구조체; 구조체에 부착되고 세포외막단백질을 포함하는 부착층;을 포함하는, 생체모방 세포외기질이다.

[0013] 본 명세서 상의 용어 "탈세포화"는 특정 세포로부터 세포외기질을 제외한 다른 세포의 구성요소를 제거하는 것을 의미한다. 예를 들어, 탈세포화는 세포의 세포질, 리소좀, 세포막, 리보솜, 소포체, 핵산 및 핵으로 이루어진 그룹 중 하나 이상을 제거하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명에 있어서 탈세포화 방법은 세포외기질을 제거하기 위한 적합한 방법이면 통상의 기술자에게 공지된 방법 또는 이의 적절한 변형에 의해 이루어질 수 있다. 구체적으로, 탈세포화는 물리적인 방법, 화학적인 방법 또는 이들 방법을 혼합한 방법으로 이루어질 수 있다.

[0015] 예를 들어, 세포외기질과 세포외막단백질을 포함하는 세포외기질을 동결융해 (freeze-thaw) 및 NH_4OH 용액을 이용하여 탈세포화할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에서는, -80 ℃의 극저온에 담가 얼린 이후에 상온에서 해동하는 것을 6번을 반복한 이후, 20분동안 NH_4OH 용액에 담가두고, 그 이후 3차 증류수로 세척하여 세포의 탈세포화를 수행하였다.

[0017] 본 명세서 상의 용어 "세포외기질"은 세포와 조직 사이의 공간을 채워줌으로써 세포를 보호하고 지지해주는 역할을 하는, 세포에 의해 생성되는 물질로, 프로테오글리칸, 섬유성 단백질, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌 등의 세포 부착성 단백질 등 세포에 의해 합성되거나, 세포외에서 분비되거나 축적된 다양한 종류의 생체 분자로 구성될 수 있다.

[0018] 본 명세서 상의 용어 "세포외막단백질"은 생물학적인 막의 일부분이거나 생물학적인 막과 상호작용하는 단백질을 의미한다. 본 발명에 있어서 세포외막단백질은 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin), 라미닌 (laminin), 피브로넥틴 (fibronectin), 비트로넥틴 (vitronectin), 헤파린 (heparin), 케라틴 (keratin) 및 피브린 (fibrin)으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 세포외막단백질은 콜라겐, 라미닌 및 피브로넥틴으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서, 세포외막단백질은 피브로넥틴일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서 구조체는 세포를 탈세포화하여 세포유래의 세포외기질을 포함할 수 있고, 이로 인해 기존의 세포에서의 세포외기질의 구조를 그대로 갖거나, 또는 일부 변형된 구조를 가질 수 있다. 구조체는 탈세포화 방법에 따라 세포유래의 세포외기질 외에 일부 세포 성분을 포함할 수 있으며, 세포 유래의 세포외기질을 포함하기 때문에 외부의 세포외막단백질과 상호작용하여 네트워크를 형성하는 것이 용이할 수 있다.

[0022] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 세포외기질에 외부에서 합성한 피브로넥틴, 콜라겐 및 라미닌을 부착시킨 후 탈세포화를 진행하여 맞춤형 세포외 기질을 제작하였고, 이 경우 세포외기질의 단백질과 상호작용하면서 견고한 단백질 네트워크를 형성한 것을 확인하였다.

[0023] 본 발명에 있어서 세포는 세포외기질을 이식할 조직 또는 기관을 고려하여 적절히 선택할 수 있다. 구체적으로, 탈세포화의 대상이 되는 세포의 종류에 따라 세포외기질의 성분비 및 구조가 상이해질 수 있으며, 이를 통해 다양한 구조의 생체모방 세포외기질을 형성할 수 있고 사용자는 특정조직에 적합한 세포를 선택하여 세포외기질을 수득할 수 있다. 본 발명에 있어서 세포는 섬유아세포, 줄기세포, 심근세포, 신경세포, 간세포, 근세포, 평활근세포, 조골세포, 연골세포 및 혈관내피세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것일 수 있고, 예를 들어, 섬유아세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에 따른 맞춤형 세포외기질이 구조체 또는 부착층 상에는 특정 장기 세포로의 배양을 위한 임의의 세포가 배양될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 맞춤형 세포외기질은 특정 장기 세포를 배양하는데 이용될 수 있다. 구체적으로, 맞춤형 세포외기질 상에 특정 장기에 맞는 세포를 배양할 수 있고, 이에 따라, 특정 마이크로 구조에 따른 장기 조직을 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 탈세포화가 완료된 맞춤형 세포외기질을 이용하여 H4IIE 쥐 간종 세포를 배양하였으며, 7일 이후에도 배양된 세포의 생존율이 우수함을 확인하였다 (도 15 내지 16참조)

[0025] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 생체모방 세포외기질의 제조 방법이다:

[0026] 세포외막단백질이 마이크로접촉 프린팅 (microcontact printing)된 기판 상에서 세포를 배양하는 배양 단계;

[0027] 세포의 세포외기질 (Extracellular Matrix)에 세포외막단백질을 포함하는 부착층을 부착시키는 부착 단계.

[0028] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 마이크로접촉 프린팅 (microcontact printing)된 기판을 제작하는 제작 단계

를 더 포함할 수 있다.

[0029] 본 명세서 상의 용어 "마이크로접촉 프린팅"은 등각 (等角) 접촉을 통해 기판의 표면 상에 잉크의 자기-조립 단일층 (Self-assembly Monolayer; SAM)의 패턴을 형성하기 위한 마스터 PDMS (master polydimethylsiloxane) 스탬프 상의 패턴을 부조하는 리소그래피 (lithography)의 한 형태이다. 과정을 간단히 설명하면, (ⅰ) 고형 패턴 표면 상에 포토레지스트(photoresist)를 적용하여 광마스크(photomask) 및 자외선에 의해 패터닝된 마스터를 제조하고; (ii) 중합제 및 경화제를 혼합한 용액을 상기 마스터에 붓고 이를 경화시켜 스탬프를 제조하여; (iii) 스탬프에 잉킹(inking)하고; (iv) 상기 스탬프를 기질에 적용하면 선택된 영역에 잉크가 전달되어 자가-조립 단일층을 형성할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서 스탬프에 잉킹되는 마이크로접촉 프린팅 잉크는 피브로넥틴, 콜라겐 및 라미닌으로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서 배양 단계는 세포외막단백질이 마이크로접촉 프린팅된 기판에서 세포를 배양하는 것일 수 있고, 배지상에 프린팅된 세포외막단백질은 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin), 라미닌 (laminin), 피브로넥틴 (fibronectin), 비트로넥틴 (vitronectin), 헤파린 (heparin), 케라틴 (keratin) 및 피브린 (fibrin)으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 예를 들어, 피브로넥틴 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에서, 기판은 유리, 플라스틱 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다. 플라스틱은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄 등일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 단계는 세포외막 단백질이 20 μm 내지 100 μm 간격으로 프린팅된 기판상에서 수행되는 것일 수 있다. 세포외막 단백질 프린팅은 배양된 세포 종류에 따른 크기에 따라서 간격 조절될 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에서, 세포는 섬유아세포, 줄기세포, 심근세포, 신경세포, 간세포, 근세포, 평활근세포, 조골세포, 연골세포 및 혈관내피세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것일 수 있고, 예를 들어, 섬유아세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 단계는 기판을 고분자 필름 또는 생체적합성 고분자로 코팅하는 코팅 단계를 더 포함할 수 있다.

[0036] 본 명세서 상의 용어 "생체적합성 고분자"는 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성 (tissue compatibility) 및 항응혈성 (blood compatibility)을 가지며, 세포에 대한 친화력을 가지는 고분자를 의미한다.

[0037] 본 발명에 있어서 생체적합성 고분자는 당업계에 이미 공지되어 있거나 이를 변형한 것이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤 [poly(caprolactone)], 폴리글리콜산 [poly(glycolic acid)], 폴리락트산 [poly(lactic acid)], 폴리 락타이드 글라이코라이드 공중합체 [poly(lactide-co-glycolide)], 폴리에틸린글리콜 [poly(ethylene glycol)], 폴리오르소에스테르 [poly(ortho ester)], 폴리카복시페녹시프로판 세바신산 {poly[(caboxyphenoxy)propanesebacic acid]}, 폴리알킬 시아노아크릴레이트 [poly(alkyl cyanoacrylate)], 데사미노티로실 옥틸 에스테르 (desaminotyrosyl octyl ester), 폴리포스포에스테르 (polyphosphoesters), 폴리에스터 아마이드 (polyester amides), 폴리우레탄 (polyurethanes), 키토산 (chitosan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 생체적합성 고분자일 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 부착 단계는 배양된 세포의 세포외 기질에 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin), 라미닌 (laminin), 피브로넥틴 (fibronectin), 비트로넥틴 (vitronectin), 헤파린 (heparin), 케라틴 (keratin) 및 피브린 (fibrin)으로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상 포함하는 배양액을 접촉시키는 접촉 단계를 더 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 세포를 탈세포화 (decellularization)하는 탈세포화 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 배양된 세포의 세포외기질을 제외한 다른 요소는 탈세포화 단계에 의해 제거될 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서 탈세포화 단계는 배양된 세포를 동결-융해시키고 NH_4OH 용액과 접촉시킴에 따라 수행될 수 있

다. 구체적으로, 탈세포화는 마이크로접촉 프린팅된 기판 상에서 배양된 세포를 -80 ℃의 극저온에 담가 얼린 이후에 상온에서 해동하는 것을 6번을 반복한 이후, 20분동안 NH_4OH 용액에 담가두고, 그 이후 3차 증류수로 세척하여 수행될 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서 탈세포화 단계는 상기 세포의 세포질, 리소좀, 세포막, 리보솜, 소포체, 핵산 및 핵으로 이루어진 그룹 중 하나 이상이 제거하는 제거 단계를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 생체 적합성이 향상된 장기 맞춤형 세포외기질 (extracellular matrix) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 세포외기질은 원하는 조직 및 장기로의 이식이 용이하도록 세포외기질의 성분을 개질한 것으로 원하는 조직에 맞춰 생체 적합성을 크게 향상시킬 수 있는 것으로, 추후 다양한 이식 및 조직 시험 연구에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 장기 맞춤형 세포외기질을 제작하는 과정을 나타내는 도면이다.

도 2는 세포유래 세포외막 단백질과 외부 세포 외막 단백질 사이의 피브로넥틴 네트워크 형성 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 세포유래 세포외막 단백질과 외부 세포 외막 단백질 사이의 피브로넥틴 네트워크 형성 결과를 나타낸 사진이다.

도 4는 미세접촉 프린팅 시 세포외막 단백질에 따른 피브로넥틴 네트워크 형성 강도를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 5는 미세접촉 프린팅 시 세포외막 단백질에 따른 피브로넥틴 네트워크 형성 강도를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 0, 1, 2, 4 및 6 M의 구아니딘 염산염 농도에서 FRET 효율 (FRET Efficeiency)를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 세포 또는 무세포 환경에서 피브로넥틴의 FRET 효율을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 피브로넥틴 패턴에 섬유아세포 (fibroblast cell)를 배양하고 면역세포염색 (Immunocytostaining)을 통하여 피브로넥틴을 염색한 후 (녹색), 형광 표지된 외부 피브로넥틴 (red)을 투입하여 외부 투입 피브로넥틴 사이의 결합을 확인한 도면이다.

도 9는 피브로넥틴 패턴에 섬유아세포 (fibroblast cell)를 배양하고 면역세포염색 (Immunocytostaining)을 통하여 피브로넥틴을 염색한 후 (녹색), 형광 표지된 외부 피브로넥틴 (red)을 투입하여 외부 투입 피브로넥틴 사이의 결합부분을 확대하여 나타낸 도면이다.

도 10은 피브로넥틴 패턴에 섬유아세포 (fibroblast cell)를 배양하고 면역세포염색 (Immunocytostaining)을 통하여 피브로넥틴을 염색한 후 (녹색), 형광 표지된 외부 피브로넥틴 (red)을 투입하여 z-축 상으로 축적된 피브로넥틴의 형광세기를 나타낸 도면이다.

도 11은 외부 피브로넥틴을 추가한 배양액과 외부 피브로넥틴이 없는 배양액 (control)에서 배양했을때의 생성되는 세포외막 단백질 피브로넥틴, 콜라겐 및 라미닌의 정도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12 내지 13은 피브로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌 패턴에 외부 피브로넥틴을 추가하였을 때 피브로넥틴의 증가를 확인한 형광사진이다.

도 14는 탈세포화 후 FN 패턴 형성을 관찰한 사진이다.

도 15는 탈세포화 후 H4IIE 쥐 간종 세포를 배양하여 재세포화한 결과를 나타낸 사진이다.

도 16은 탈세포화 후 H4IIE 쥐 간종 세포를 배양하여 재세포화했을 때 세포의 생사여부 판별법 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1: 마이크로접촉 프린팅 (micro-Contact Printing; μCP)**

[0048] 패턴화된 실리콘 웨이퍼는 소프트 리소그래피 공정 (soft lithography process)에 의해 생성되었다. Thin stamp 기술을 이용하여 Sylgard 184 베이스와 경화제를 10:1 비율로 혼합하여 PDMS 스탬프를 생성하고 50 μm의 라인 패턴화된 웨이퍼에 부었다. 탈기 후 스탬프를 65 ℃에서 4시간 둔 후, 실리콘 마스터에서 20 x 20mm 크기로 잘라냈다. μCP 기판의 경우 10:1 엘라스토머의 PDMS를 세척된 커버슬립에 스핀 코팅했다. PDMS 코팅된 커버슬립은 추가로 경화되었다. 스탬핑 공정 전에 PDMS의 표면은 50° C의 증류수에 10% APTES를 2시간 동안 담그고 탈이온수로 3회 세척함에 따라 화학적으로 활성화되었다. 이후, 탈이온수 중 2.5% G.A. 용액으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 탈이온수로 3회 세척한 다음 오븐에서 건조했다.

[0049] 마이크로접촉 프린팅 (microcontact printing) 잉크는 0.1M HCl에서 콜라겐을 제외한 PBS 용액에서 실온에서 1시간 동안 NHS Alexa 488 또는 647을 사용하여 피브로넥틴 (FN), 콜라겐 I (COL I) 및 라미닌 (LN)의 형광 표지화에 의해 제조하였다. 과도한 형광 염료는 PD SpintrapTM G-25로 제거되었다. 표지된 단백질은 사용할 때까지 4° C에서 보관되었다. PDMS 스탬프는 실온에서 1시간 동안 PBS에 50 μg/mL 농도로 표지된 FN, COL I 및 LN과 함께 침지되었고, PDMS 스탬프에서 용액을 제거하고 N_2에서 건조했다. 스탬프에서 기판으로의 단백질 전달은 활성화된 기판의 표면에 스탬프를 부드럽게 누름에 따라 이루어졌다. 그런 다음 마이크로접촉 프린팅된 PMDS를 35mm의 세포 접시로 옮기고 PBS 중 2% BSA 용액으로 실온에서 1시간 동안 또는 4° C에서 밤새 차단했다. BSA 용액을 제거한 후, 접시를 PBS로 세척하고, 멸균하고, 사용할 때까지 PBS 용액에서 4° C에서 보관하였다.

[0051] **실시예 2: 세포유래 세포외막 단백질과 외부 세포 외막 단백질 사이의 피브로넥틴 네트워크 형성 확인**

[0052] 세포 배양 플레이트 (Tissue culture plate; TCP)를 세포 디쉬 (cell dish)에 위치시키고 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민 100x (Gibco)을 포함하는 Dubelcco's Minimum Essential Media (DMEM, Gibco) 세포 배양액에 담가두고 유지한 후, 섬유아세포 (Fibroblast cell)을 시딩 (seeding) 하여 초기 배양하였다. 그 이후 3시간 이후 배양액을 갈아주었으며 외부에서 투입한 세포외막 단백질 (FN, COL)이 잘 부착 생성되는지 형광세기 측정 및 공초점 형광 현미경을 통해서 확인하였고 이를 도 2 내지 도 3에 나타내었다.

[0053] 실험 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이, 배양액만 교체하여 세포를 배양한 대조군 (control)에 비해 외부 피브로넥틴을 투여했을 때 세포외막단백질이 잘 부착됨을 확인할 수 있었다. 특히, 도 2에서 확인할 수 있듯이 피브로넥틴은 배양액만을 가지고 배양시킨 세포에서는 (옅은 파랑 바 그래프) 형광 세기가 2.15 ± 0.84 x 10^6에서 3.99 ± 0.51 x 10^6으로 크게 증가하였으며, 콜라겐의 경우에도 (회색 바 그래프) 2.19 ± 0.33 x 10^5에서 2.60 ± 0.35 x 10^5으로 조금 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 3: 미세접촉 프린팅 시 세포외막 단백질에 따른 피브로넥틴 네트워크 형성 강도 확인**

[0056] 실시예 1에서 제조한 피브로넥틴 (FN) 미세 패턴에 정렬된 섬유아세포에 세포외기질의 구성 요소를 증착하여 맞춤형 세포외기질을 설계했다. 피브로넥틴(FN)은 (3-아미노프로필)트리에톡시 실란 (3-aminopropyl)triethoxy silane)과 글루타르알데히드 (glutaraldehyde)를 사용하여 화학적으로 표면 활성화된 PDMS 표면에 미세 패턴화하였고, 그 결과를 도 4 내지 5 및 표 1에 나타내었다.

[0057] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 콜라겐과 라미닌으로 패턴된 경우에도 외부 피브로넥틴이 잘 부착하였음을 확인하였다. 특히, 피브로넥틴 패턴 베이스일 때 외부 피브로넥틴이 더 잘 부착 크게 증가한 결과를 확인하였다.

표 1

[0058]

	FN		Col I		LN	
	Con	FN Added	Con	FN Added	Con	FN Added

Fluorescence Intensity (AU X 10^6)	9.06	13.6	11.8	15.0	11.5	14.2

[0059] **실시예 4: 세포유무에 따른 피브로넥틴 네트워크 형성**

[0060] 피브로넥틴 패턴위에 세포 배양 (fibroblast)을 한 상태와 섬유아세포를 배양하지 않은 상태에서의 외부에서 추가해준 세포외막단백질인 피브로넥틴에 대해서 피브로넥틴 네트워크 형성도 차이를 확인하였다.

[0061] 피브로넥틴 네트워크 형성을 확인하기 위해 도 6의 그래프에서처럼 확장된(extended) FN 형성 정도를 확인할 수 있는 FRET 효율 그래프와 비교하여 세포 또는 무세포 환경에서 피브로넥틴을 NHS 에스테르-488 (NHS ester-488) 및 C5 말레이미드-546 (C5 maleimeide-546)로 이중 표지하고 FRET 효율을 측정하였다. FRET 효율이 낮을수록 피브로넥틴의 확장이 더 큰 것을 의미한다. 피브로넥틴의 확장 정도 적정을 위한 FRET 효율 그래프를 만들기 위하여, 0, 1, 2, 4 및 6 M에서 구아니딘 염산염을 사용하여 피브로넥틴을 구조적으로 개방시킨 상태의 FRET 효율을 측정하였고 그 결과는 차례대로 0.81 ± 0.11; 0.37 ± 0.05; 0.23 ± 0.03; 0.145 ± 0.04 and 1.38 ± 0.02 FRET 효율이 측정되었고 도 6의 검정 그래프를 만들었다.

[0062] 측정결과, 도 7 및 표 2에서 확인할 수 있듯이 무세포 집단에서의 피브로넥틴의 FRET 효율은 0.54 ± 0.08, 세포 집단은 0.17 ± 0.05 ($p<0.001$)였다. 결과를 도 6의 확장된(extended) FN 형성 정도와 비교해 보면 무세포 집단에서의 피브로넥틴형성은 Folded FN 형성으로 서로간의 네트워크 형성이 어려운 상태로 형성되며 무세포 집단에서의 피브로넥틴형성은 FRET 효율 0.17로 매우 확장된(extended) FN 형태로 피브로넥틴 네트워크 형성이 서로 잘 엮어 성장할 수 있는 상태임을 확인하였다.

표 2

[0064]

	Cell-fee	Cell
FRET Efficiency	0.54	0.17

[0065] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 세포외기질 패턴에 세포를 배양한 상태에서 외부 피브로넥틴을 넣어준 경우가 세포의 배양 없이 세포외기질 패턴에 외부 FN을 넣은 상태의 FRET 효율 (0.54)보다 FRET 효율이 작아진 결과 (0.17)를 보여주고 있으며 이것은 세포가 있는 환경에서 피브로넥틴이 확장된 피브로넥틴의 형태 (extended FN 형태), 즉 긴 섬유의 형태로 잘 부착하여 생성 및 자란다는 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 5: 마이크로패턴 상의 세포 피브로넥틴과 외부 피브로넥틴 사이의 결합 원리 규명**

[0068] 실시예 1에서 제작한 피브로넥틴 패턴 베이스에 섬유아세포 (fibroblast cell)를 배양하고 면역세포염색 (Immunocytostaining)을 통하여 피브로넥틴을 염색한 후 (녹색), 형광 표지된 외부 피브로넥틴 (red)을 투입하여 외부 투입 피브로넥틴의 부착 및 피브로넥틴 네트워크 추가 결합 상태를 확인하였고, 이를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0069] 도 8에서 확인할 수 있듯이 기존의 피브로넥틴을 따라서 길게 성장 부착되며 또한 기존 피브로넥틴 (녹색)위에 외부 투입 피브로넥틴이 부착되어 성장한 것을 확인하였다. 또한, 도 8의 확대도인 도 9에서 확인할 수 있듯이 외부투입 피브로넥틴 (red)이 기존의 피브로넥틴 (녹색)을 따라서 길게 성장 및 부착되어 있는 것을 확인하였다. 또한 도 10에서 확인할 수 있듯이 Z축 형광세기 단면도 통해 외부투입 피브로넥틴 (red)이 더 위쪽에 위치한 것을 확인하였다.

[0071] **실험예 6: 세포외막단백질에 따른 피브로넥틴 네트워크 강도 측정**

[0072] 실시예 1에서 제조한 피브로넥틴 패턴 베이스에 섬유아세포를 배양한 후, 외부 피브로넥틴을 추가한 배양액과 외부 피브로넥틴이 없는 배양액 (control)에서 배양했을때의 생성되는 세포외막 단백질 피브로넥틴, 콜라겐 및 라미닌의 정도 변화를 확인하였고, 이를 도 11 내지 도 13에 나타내었다. 도 11 내지 13에서 확인할 수 있듯이,

외부 피브로넥틴을 투입한 경우에서 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌 모두 증가된 것을 확인하였다. 특히, 세포외막 단백질 중 피브로넥틴의 증가가 가장 큰 것을 확인하였다.

표 3

[0073]

	FN		Col I		LN	
	Con	FN Added	Con	FN Added	Con	FN Added
Fluorescence Intensity (AU X 10^3)	331	719	92	122	36	37

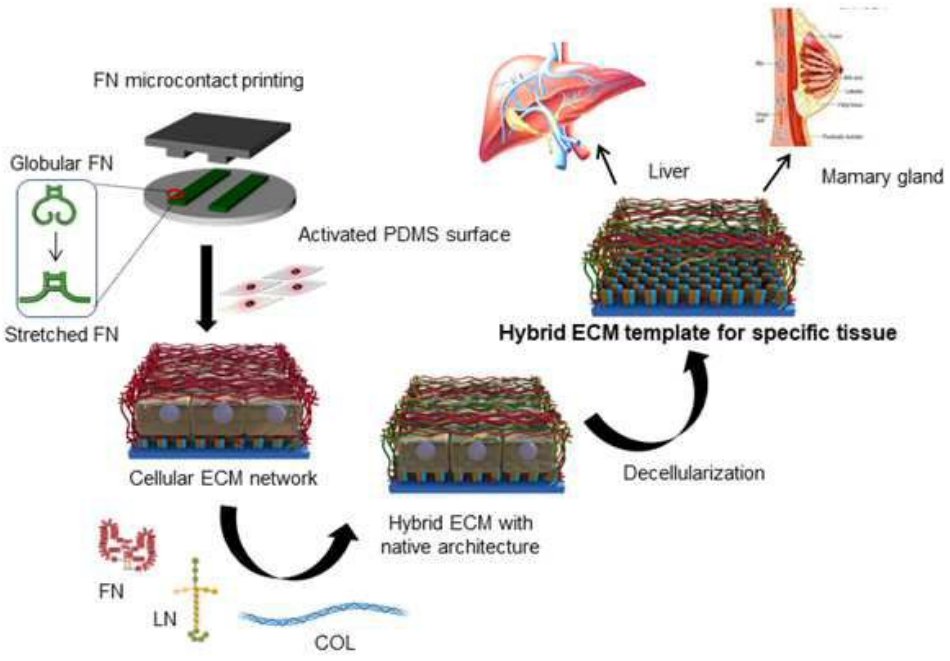
[0075] **실시예 7: 탈세포화 후 FN 패턴 형성 관찰**

[0076] 탈세포화는 실시예 6에서 배양된 세포를 -80 ℃에서 동결-해동에 이어 20분 동안 25mM NH_4OH에 의해 복합체로부터 제거하여 맞춤형 세포외기질 템플릿을 제작하였으며, 이 결과를 도 14에 나타내었다. 템플릿을 PBS로 세척한 다음 2% BSA를 사용하여 1시간 또는 밤새 반응시켜 패턴 주변에는 반응성이 없도록 차단했다. 이후, 피브로넥틴이 풍부한 템플릿을 10% fetal bovine serum, 10% calf serum 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 non-essential amino acids and Earle's BSS 배지에서 H4IIE 쥐 간종 세포를 사용하여 재세포화하였다. 3시간과 6시간 후에 부착된 세포의 수를 관찰하였다. 사멸된 세포 및 살아있는 세포 평가는 0일, 1일, 3일 및 7일에 이중 염색 방법을 사용하여 확인하였으며, 이를 도 15 내지 16에 나타내었다.

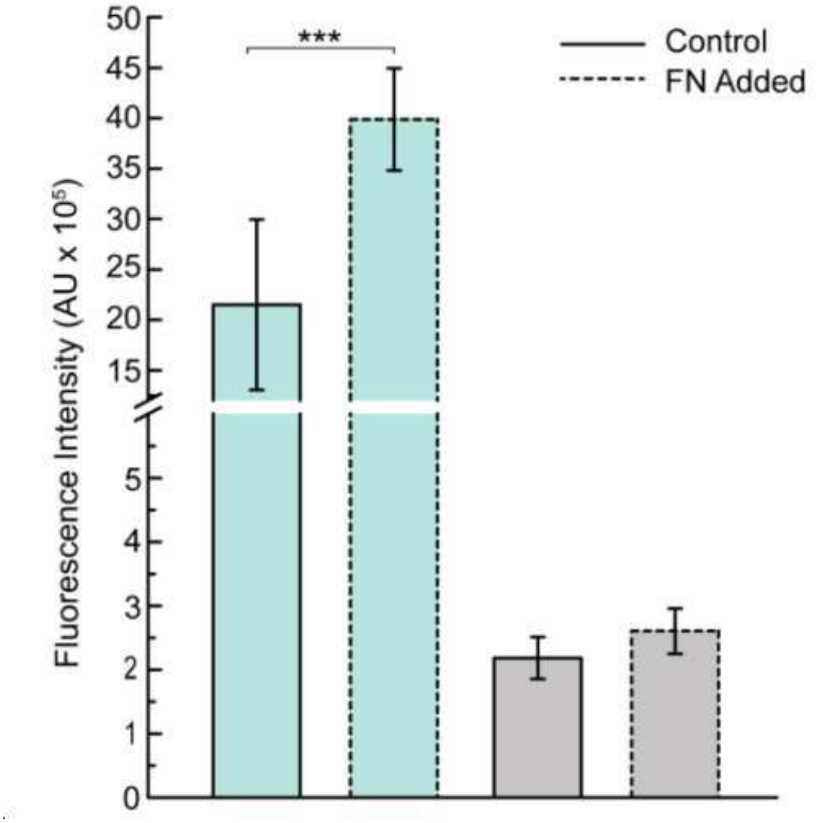
[0077] 실험결과 도 15 및 도 16에서 확인할 수 있듯이, H4IIE 쥐 간종 세포를 배양하여 잘 자라는 결과 1d (1day 이후), 3d(3 days 이후) 7d (7 days 이후)를 확인하였다. 도 16에서 확인할 수 있듯이, 세포 생사여부 판별법을 통하여 세포가 잘자란 상태를 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 맞춤형 세포외기질 템플릿이 생체 적합성이 우수한 다른 장기 세포의 좋은 조직배양 틀이 될 수 있음을 확인하였다.

도면

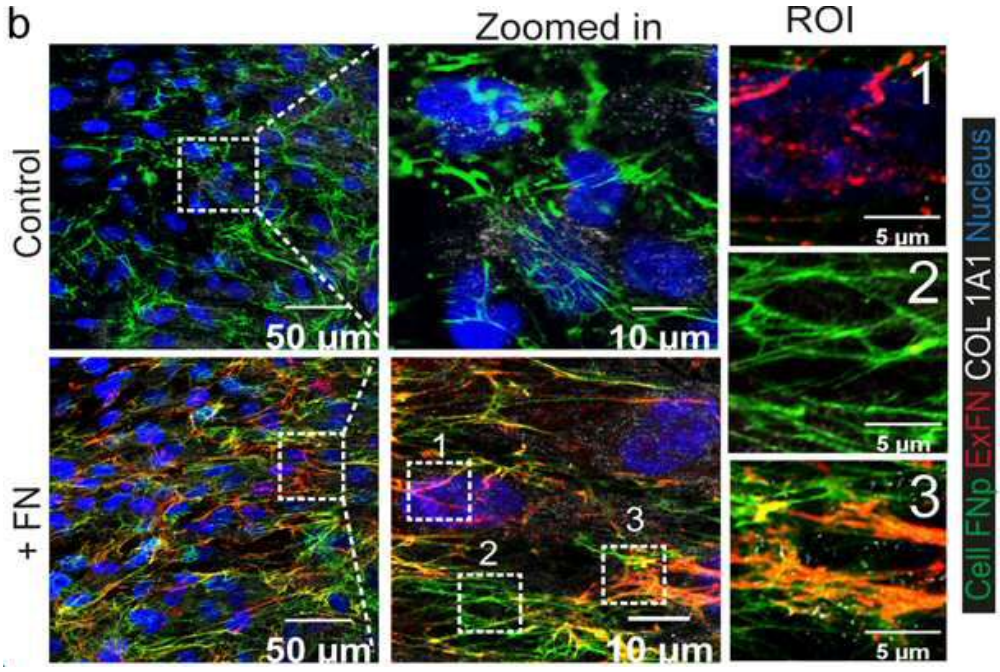
도면1



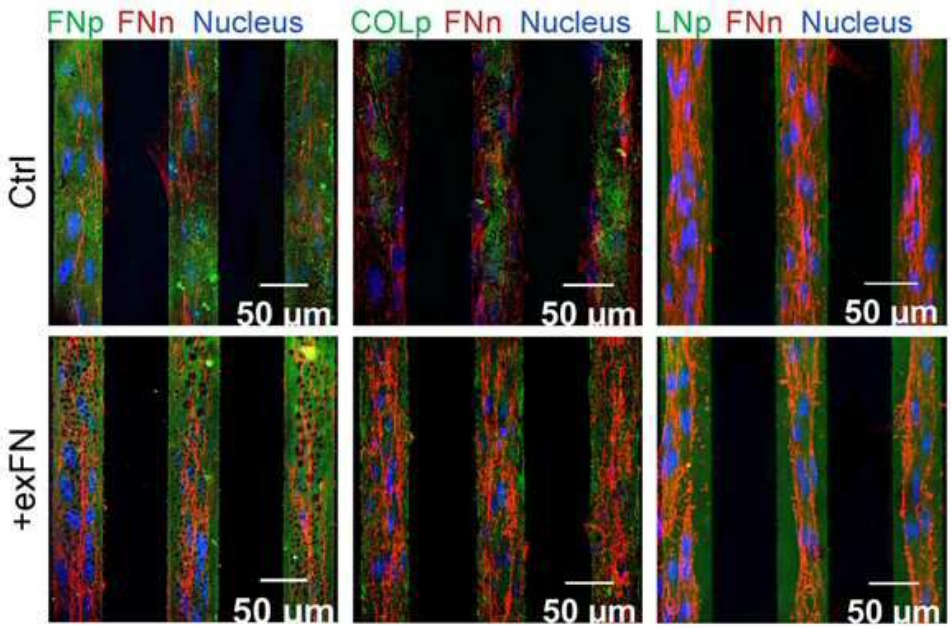
도면2


***
Control
FN Added
Fluorescence Intensity (AU x 10⁵)
50
45
40
35
30
25
20
15
5
4
3
2
1
0

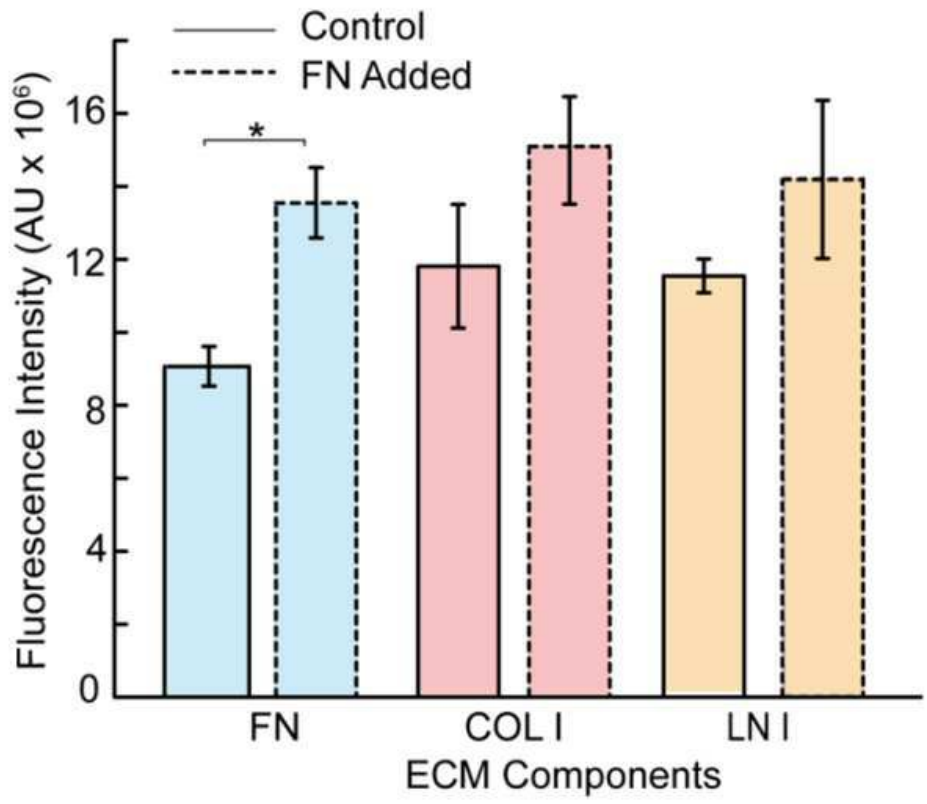
도면3


b
Zoomed in
ROI
Control
+ FN
50 μm
10 μm
50 μm
10 μm
1
2
3
5 μm
5 μm
5 μm
Cell FNp ExFN COL 1A1 Nucleus

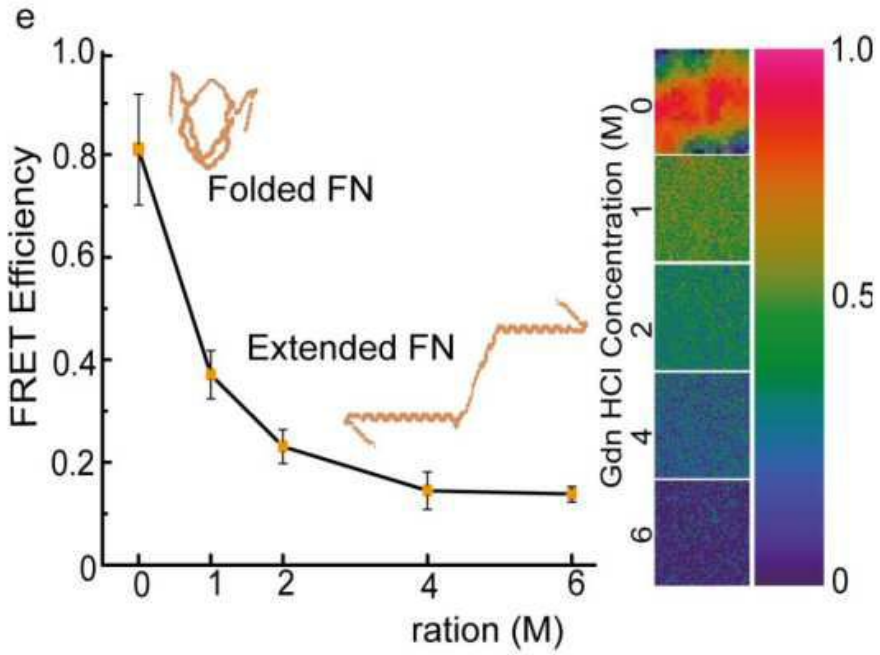
도면4


FNp FNn Nucleus
COLp FNn Nucleus
LNp FNn Nucleus
Ctrl
+exFN
50 μm

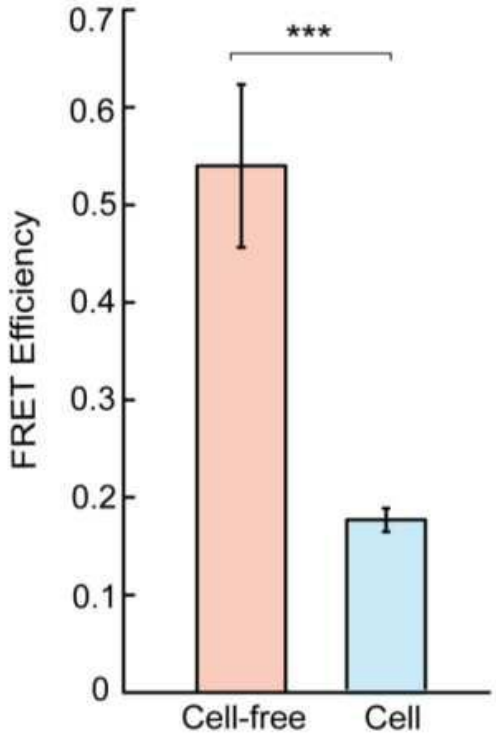
도면5


Control
FN Added
*
Fluorescence Intensity (AU x 10⁶)
0
4
8
12
16
FN
COL I
LN I
ECM Components

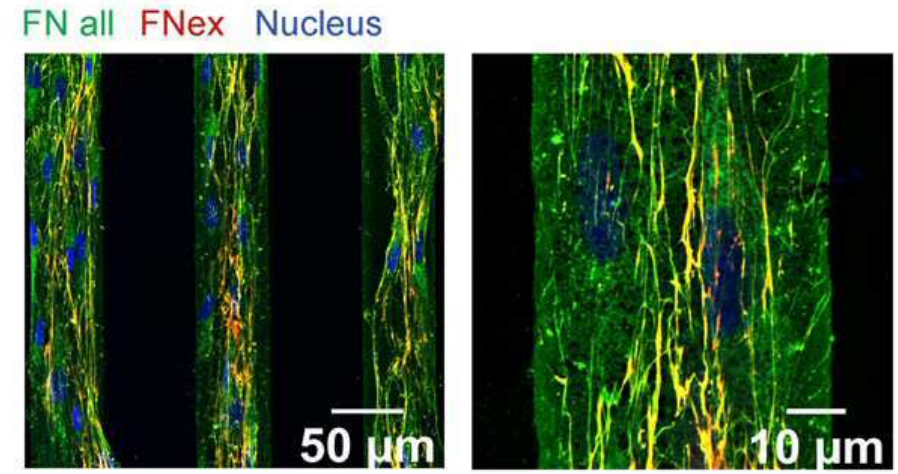
도면6


e
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
FRET Efficiency
Folded FN
Extended FN
0
1
2
4
6
ration (M)
Gdn HCl Concentration (M)
0
1
2
4
6
1.0
0.5
0

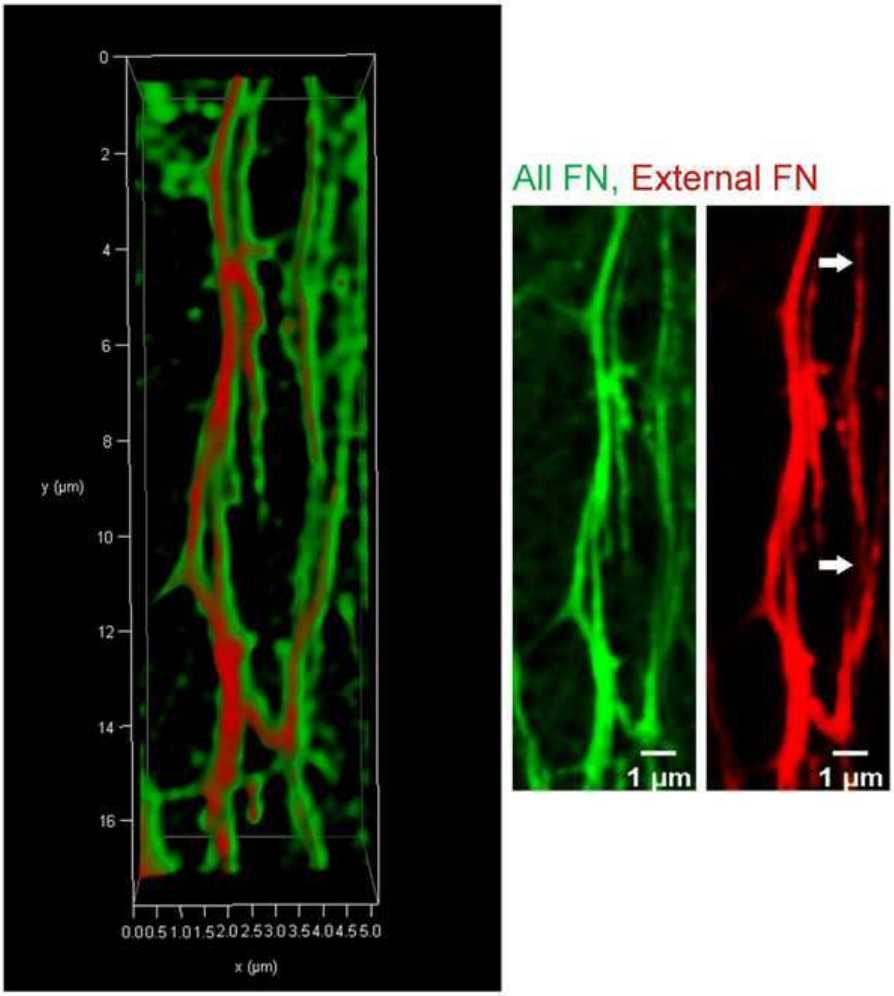
도면7


0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
FRET Efficiency
***
Cell-free
Cell

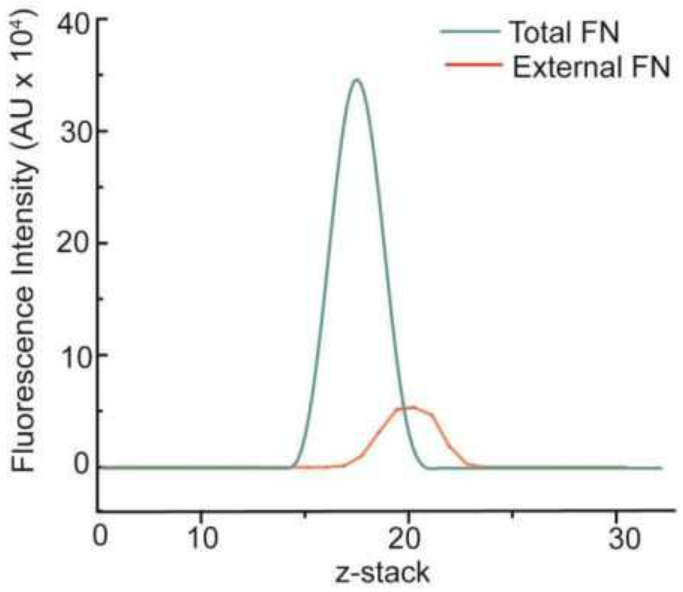
도면8


FN all FNex Nucleus
50 μm
10 μm

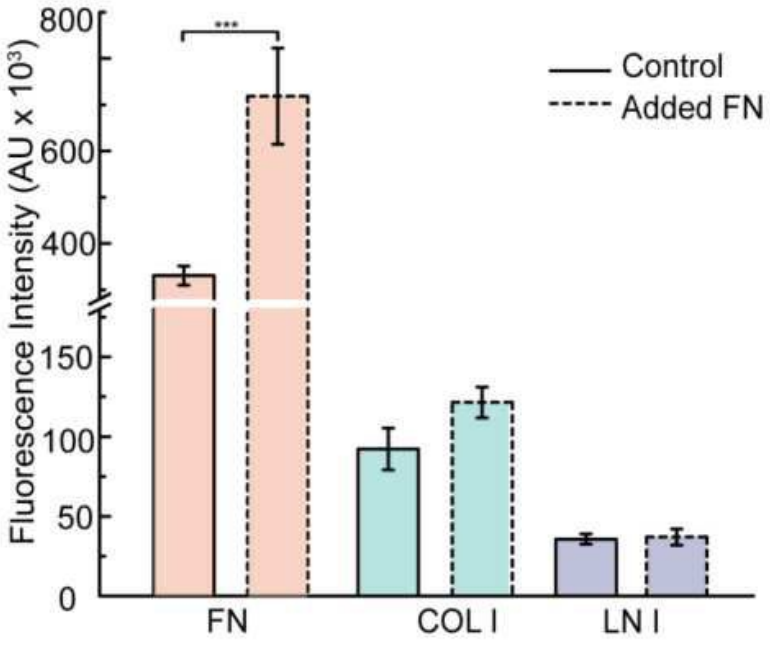
도면9


0
2
4
6
8
y (μm)
10
12
14
16
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0
x (μm)
All FN, External FN
1 μm
1 μm

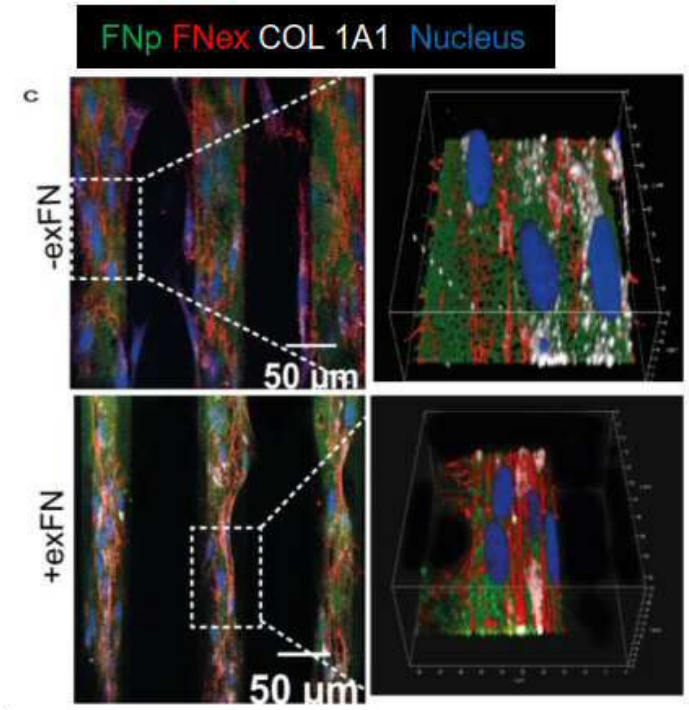
도면10


Total FN
External FN
Fluorescence Intensity (AU x 10⁴)
40
30
20
10
0
0
10
20
30
z-stack

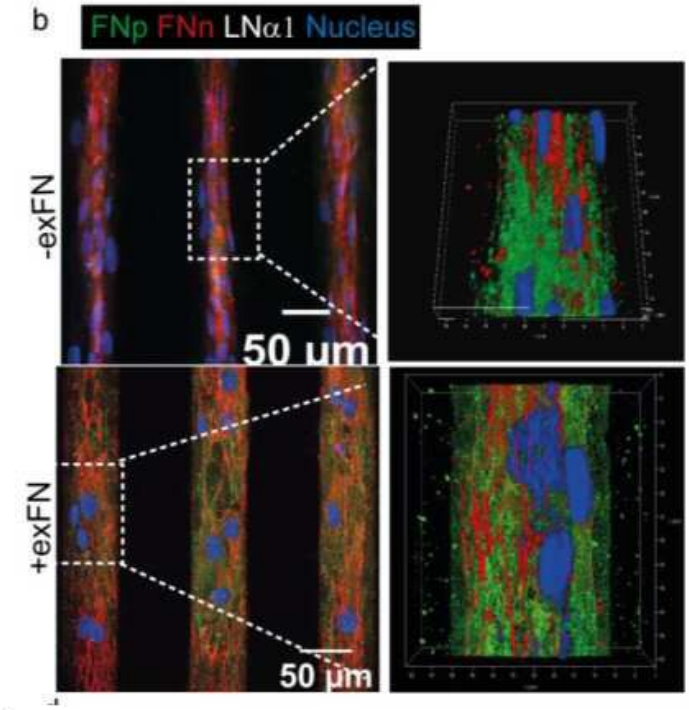
도면11


***
Control
Added FN
Fluorescence Intensity (AU x 10³)
800
600
400
150
100
50
0
FN
COL I
LN I

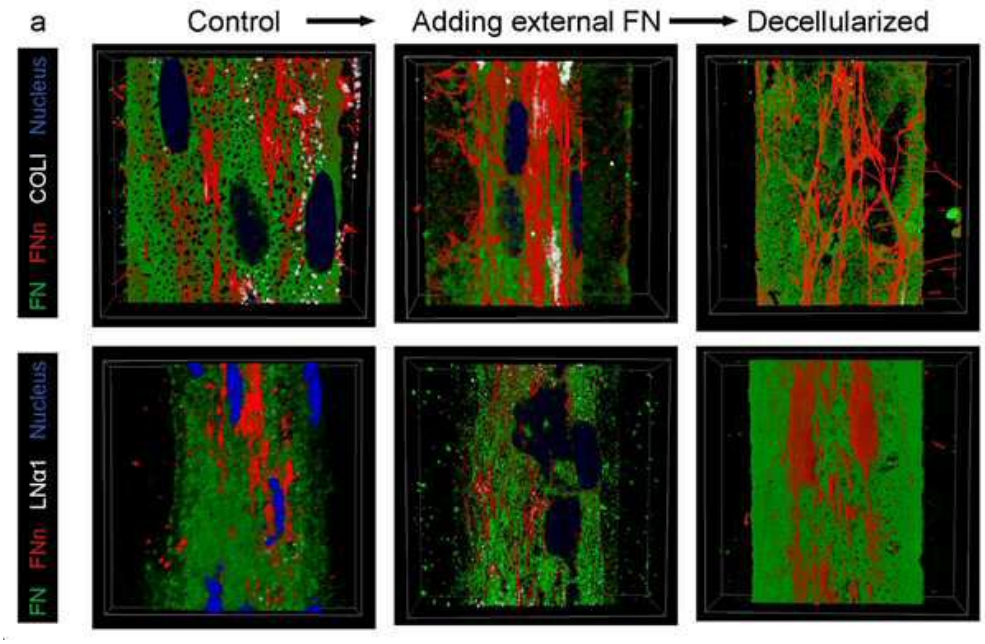
도면12


FNp FNex COL 1A1 Nucleus
c
-exFN
50 μm
+exFN
50 μm

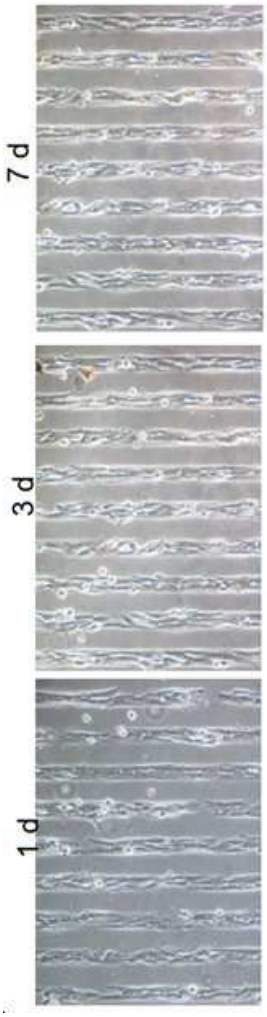
도면13


b
FNp FNn LNα1 Nucleus
-exFN
50 μm
+exFN
50 μm

도면14


a
Control
Adding external FN
Decellularized
FN FNn COLI Nucleus
FN FNn LNa1 Nucleus

도면15


7 d
3 d
1 d

도면16

