



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025502
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 25/16 (2013.01)
A61L 27/3633 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0102943
(22) 출원일자 2018년08월30일
심사청구일자 2018년08월30일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로 50, 생명공학과 (신촌동)
이정승
서울특별시 서대문구 연세로 50, 생명공학과 (신촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 이폼리온

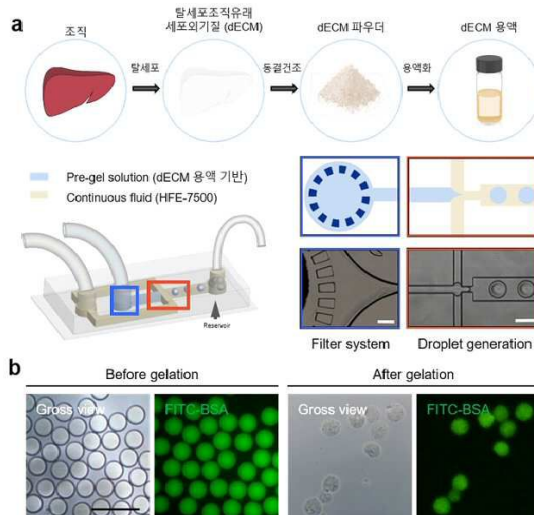
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 탈세포 조직 기반 세포 봉입 및 배양용 비드, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 탈세포 조직 유래 세포외기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 조직 특이적 세포 배양용 비드를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 11/00 (2013.01)

(72) 발명자

봉기완

서울특별시 동작구 보라매로 70, 102동 701호 (신대방동, 보라매e편한세상아파트)

노윤호

경기도 과천시 별양로 111, 503동 303호 (별양동, 주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B3005994

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진 연구(2/3)

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A5A1010148

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈세포 조직 유래 세포외기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 세포 배양용 비드(bead).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조직은 뇌, 안배(optic cup), 신장, 간, 췌장, 신경관, 위장, 대장, 전립선, 유방, 심장, 침샘(salivary gland), 자궁내막(endometrium), 젖샘(mammary gland), 갑상선, 혀, 및 폐로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 세포 배양용 비드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 탈세포 조직 유래 세포외기질은 조직 세포가 95% 이상 제거된 세포 배양용 비드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탈세포 조직 유래 세포외기질 농도는 0.1 내지 10 mg/mL인 세포 배양용 비드.

청구항 5

제1항에 있어서,

평균 직경이 60 내지 180 μm 인 세포 배양용 비드.

청구항 6

제1항에 있어서,

1Hz 기준 탄성계수(elastic modulus)가 5.0 내지 40.0 Pa인 세포 배양용 비드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 비드를 포함하는 세포 배양용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 비드를 포함하는 생체 조직 이식용 지지체.

청구항 9

제7항의 조성물에서 조직세포(tissue cell)를 배양하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈세포 조직 기반 세포 배양용 비드 및 이의 구체적인 활용 가능성에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직 및 기관의 탈세포화는 세포 배양 및 이식을 위한 기능성 지지체 또는 스캐폴드(scaffold)를 제조하기 위한

유망한 방안으로써 연구되고 있다.

- [0003] 탈세포화 과정에서, 조직으로부터 세포 성분들이 제거되지만, 세포외기질 및 일부 성장인자 단백질들은 보존된다.
- [0004] 따라서, 탈세포화 조직 내 보존된 콜라겐, 파이브로넥틴(fibronectin) 및 라미닌(laminin)을 포함하는 다양한 세포외기질 성분들은 온전한 조직 내와 유사한 삼차원적인 미세환경을 제공함으로써 배양된 세포의 생존, 증식 및 분화를 향상시킬 수 있다.
- [0005] 추가적으로, 세포 성분의 제거는 탈세포화 매트릭스를 세포 이식에 대한 최소한의 면역원성을 가진 기능성 지지체로 변화시킨다.
- [0006] 한편, 최근 부착세포(adherent cell)인 줄기세포 또는 전구세포를 이용하여 인간의 세포와 조직, 장기를 대체하거나 재생시켜서 원래의 기능을 할 수 있도록 복원시키는 의학분야인 재생의학(Regenerative medicine) 기술 개발이 활발해지고 있다.
- [0007] 세포 배양용 지지체로서 생체 적합성 마이크로 비드(micro-bead)를 이용하여 세포 부착의 표면적을 증대시켜 배양하는 방법이 개발되고 있다.
- [0008] 마이크로비드는 넓은 표면적을 바탕으로 영양분이나 대사체의 물질 교환이 용이하여 세포를 봉입하여 배양시 세포의 생존 및 기능성을 증진시킬 수 있다.
- [0009] 마이크로비드는 주사기 등을 이용한 주사가 가능하여 최소 침습법을 통한 세포 이식 및 약물 주입에 활용이 가능하다.
- [0010] 그러나, 현재까지 마이크로비드 제작에 사용되고 있는 다양한 합성고분자(폴리에틸글라이콜, 폴리아크릴레이트 등) 및 천연고분자(콜라겐, 젤라틴, 알긴산, 히알루론산 등)는 세포와 상호작용이 미흡하고 생체 재료로서 기능성에 한계점이 있다.
- [0011] 특히, 종래의 마이크로비드는 다양한 세포에 대한 조직 특이적인 미세환경을 제공하지 못하므로 마이크로비드의 효용성을 크게 저하시킨다.
- [0012] 따라서, 조직공학적 응용에 많은 가능성을 가지는 마이크로비드 시스템의 기능성을 증진시키기 위해서는 특정 장기 및 조직 재생을 위해 요구되는 조직 특이성을 효과적으로 개선할 수 있는 기술의 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 세포친화성 및 생체적합성이 우수한 삼차원 배양 플랫폼을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 측면에 따르면, 탈세포 조직 유래 세포외기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 세포 배양용 비드(bead)가 제공된다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 조직은 뇌, 안배(optic cup), 신장, 간, 췌장, 신경관, 위장, 대장, 전립선, 유방, 심장, 침샘(salivary gland), 자궁내막(endometrium), 젖샘(mammary gland), 갑상선, 혀, 및 폐로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 탈세포 조직 유래 세포외기질은 조직 세포가 95% 이상 제거될 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 탈세포 조직 유래 세포외기질 농도는 0.1 내지 10 mg/mL일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 비드의 평균 직경이 60 내지 180 μm 일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 비드의 1Hz 기준 탄성계수(elastic modulus)가 5.0 내지 40.0 Pa일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 비드를 포함하는 세포 배양용 조성물이 제공된다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 비드를 포함하는 생체 조직 이식용 지지체가 제공된다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물에서 조직세포(tissue cell)를 배양하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 기존의 콜라겐 기반 마이크로비드와 비교하여 향상된 기계적 물성을 구현할 수 있다.

[0024] 상기 비드는 조직공학적 기능성 향상을 위한 추가적인 화학적, 물리적 수식이 필요하지 않으므로 매우 낮은 비용으로 조직 특이성을 부여할 수 있다.

[0025] 상기 비드는 생체 적용시 면역 반응이 최소화되며, 독성 물질을 함유하지 않으므로 세포친화성과 생체적합성이 매우 우수하다.

[0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 탈세포 조직 기반 비드 제작 플랫폼을 도식화한 것이다.

도 2는 탈세포 조직 기반 비드의 제작 조건을 분석한 결과이다.

도 3은 탈세포 조직 기반 분산상(pre-gel solution)의 점성을 분석한 결과이다.

도 4는 다양한 조직의 탈세포 정도를 분석하고 이를 이용한 비드 제작 결과이다.

도 5는 탈세포 조직 기반 비드의 세포 적합성을 분석한 결과이다.

도 6은 탈세포 조직 기반 비드의 물성을 분석한 결과이다.

도 7 내지 10은 탈세포 조직 기반 비드의 3차원 세포 배양 가능성을 분석한 결과이다.

도 11은 탈세포 조직 기반 비드의 세포 이식 지지체로서의 활용 가능성을 분석한 결과이다.

도 12는 탈세포 조직 기반 비드를 이용한 세포 이식 치료를 근육 손실 모델에 실제 적용한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0029] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

[0030] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0031] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명의 일 측면에 따르면, 탈세포 조직 유래 세포외기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 세포 배양용 비드(bead)가 제공된다.

[0033] 상기 “비드(bead)”는 통상적으로 마이크로비드(micro-bead)로서 지칭될 수 있으며, 세포 배양용 지지체로서 사용될 수 있다. 상기 비드는 세포 부착의 표면적을 증가시켜 줄기세포 또는 전구세포와 같은 부착성 세포가 부유배양 환경에서도 성장할 수 있도록 세포가 안착할 수 있는 환경을 제공할 수 있다.

[0034] 통상적으로, 상기 비드 또는 마이크로 비드는 세포를 안전하고 효율적으로 배양하기 위해 세포의 특성과 목적에 따라 사용되는 물질이 제한적이며, 이들은 보통 천연 또는 합성 고분자 물질로서 비중이 세포와 비슷한 물질이

사용되고 있다.

- [0035] 반면, 상기 탈세포 조직은 조직 특이적 생화학적 미세 환경을 제공할 뿐만 아니라, 세포가 제거되었기 때문에 세포이식 및 조직재생에 적용되었을 경우 면역반응이 최소화되며 비드 제작시 독성 물질이 함유되어 있지 않아 세포친화성 및 생체적합성이 우수하다.
- [0036] 상기 비드는 탈세포화하여 수득한 조직 유래 세포외기질을 포함하므로 조직공학적 기능성 증진을 위한 추가적인 화학적, 물리적 수식이 필요하지 않다.
- [0037] 따라서, 상기 비드는 매우 낮은 비용으로 조직 특이성을 부여할 수 있으며, 이에 따른 배양 세포의 증식, 분화 및 기능성을 극대화할 수 있다.
- [0038] 상기 “세포외기질(extracellular matrix)”은 포유류 및 다세포 생물(multicellular organisms)에서 발견된 조직의 탈세포화를 통해 제조된 세포 성장용 자연 지지체를 의미한다. 상기 세포외기질은 투석 또는 가교화를 통해 더 처리할 수 있다.
- [0039] 상기 세포외기질은 포유 동물에 있어서 다양한 형태로써 약 90%의 콜라겐을 포함할 수 있다. 다양한 생체 조직에서 유래한 세포외기질은 각각의 조직에 필요한 고유 역할 때문에 전체 구조체 및 조성이 상이할 수 있다.
- [0040] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0041] 예컨대, 세포외기질-유래 겔은 세포외기질을 분리하기 위해 기술적으로 알려진 다양한 방법에 의해 조직으로부터 수득한 세포외기질 성분을 포함하는 겔을 의미한다. 또는, 상기 조직-유래 세포외기질은 유용한 방법에 의해 특정 조직에서 수득한 성분을 포함하는 세포외기질을 의미할 수 있다.
- [0042] 상기 세포외기질은 콜라겐, 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸, 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인(cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.
- [0043] 상기 조직은 뇌, 안배(optic cup), 신장, 간, 췌장, 신경관, 위장, 대장, 전립선, 유방, 심장, 침샘(salivary gland), 자궁내막(endometrium), 젖샘(mammary gland), 갑상선, 혀, 및 폐로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 탈세포 조직 유래 세포외기질은 조직 세포가 95% 이상 제거될 수 있다.
- [0045] 일 실시예에서, 상기 조직을 탈세포화 용액에서 3 내지 24시간 동안 교반시킬 수 있고, 상기 탈세포화에 의해 상기 조직 세포가 95% 이상 제거될 수 있다.
- [0046] 상기 “탈세포화 용액”은 조직 세포를 제거하기 위한 다양한 세제 성분을 포함할 수 있고, 예컨대, 고장성 식염수(hypertonic saline), 과산화 아세트산(peracetic acid), 트리톤-X(Triton-X), SDS 또는 기타 세제 성분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 탈세포화된 세포외기질은 건조될 수 있으며, 동결 건조되거나 공기 건조될 수 있다.
- [0048] 상기 건조된 세포외기질은 박리(tearing), 제분(milling), 절단, 분쇄 및 전단 단계를 포함하는 방법에 의해 세분될 수 있다. 상기 세분된 세포외기질은 냉동 상태 또는 냉동 건조 상태에서, 분쇄 또는 제분과 같은 방법에 의해 분말 형상으로 가공될 수 있다.
- [0049] 상기 탈세포 조직 유래 세포외기질 농도는 0.1 내지 10 mg/mL일 수 있다. 상기 세포외기질 농도가 0.1 mg/mL 미만이면 세포 성장을 위한 적합한 환경을 제공할 수 없으며, 10 mg/mL 초과이면 비드의 점탄성 등 적절한 물성이 구현되지 않거나 경제성이 과도하게 저하될 수 있다.
- [0050] 상기 비드의 평균 직경이 60 내지 180 μm 일 수 있다. 상기 비드의 크기는 제조 과정에서 분산상 및 연속상의 압출력 제어를 통해 제어할 수 있으나, 비드의 평균 직경이 과소하면 비드에 의한 3차원 배양 구조가 적절히 구현되지 않거나 세포가 효율적으로 봉입될 수 없으며, 직경이 과대하면 비드의 형태 및 크기가 안정적으로 유지되지 않을 수 있다.
- [0051] 상기 비드의 1Hz 기준 탄성계수(elastic modulus)가 5.0 내지 40.0 Pa일 수 있고, 바람직하게는 25.0 내지 40.0 Pa일 수 있다. 상기 비드는 탄성계수가 실제 조직 환경과 유사한 수준으로 유지될 수 있으며, 종래 비드와

비교하여 수축 현상이 적고 크기 및 형태 안정성이 매우 우수하다.

- [0052] 상기 탄성계수가 5.0 Pa 미만이면 비드의 안정성이 저하될 수 있고, 40.0 Pa 초과이면 세포의 봉입 효율이 저하될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 비드를 포함하는 세포 배양용 조성물이 제공된다.
- [0054] 상기 “세포 배양”은 세포를 생체로부터 채취하고, 생체 밖에서 배양시키는 기술이며, 배양된 세포는 피부, 장기, 신경 등 신체의 다양한 조직으로 분화시켜 인체에 이식되거나 분화시키기 전 상태로 인체에 이식시켜 생착 및 분화를 동시에 이루어지게 하여 다양한 질병 치료에 활용될 수 있다.
- [0055] 상기 “배양”은 적합한 조건에서 세포를 유지 및 성장시키는 과정을 의미하며, 적합한 조건은 예컨대, 세포가 유지되는 온도, 영양소 가용성, 대기 CO₂ 함량 및 세포 밀도를 의미할 수 있다. 서로 다른 유형의 세포를 유지, 증식, 확대 및 분화 시키기 위한 적절한 배양 조건은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 문서화 되어 있다.
- [0056] 특히, 상기 비드는 기존의 콜라겐 기반 비드와 비교하였을 때 향상된 기계적 물성을 가지므로 장시간 구조가 안정적으로 유지될 수 있으며, 세포 배양 및 이식용 지지체로서 활용가능성이 우수하다.
- [0057] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 비드를 포함하는 생체 조직 이식용 지지체가 제공된다.
- [0058] 세포를 구비한 채로 인체 조직에 이식될 수 있는 지지체의 재료나 구조 등에 관한 연구는 조직공학 분야에서 관심이 집중되고 있다.
- [0059] 예컨대, 배양된 세포를 이용한 특정 물질의 독성반응실험은 실제 인체의 세포 구조와 유사한 3차원 구조로 배양 및 분화된 세포 군집체를 이용할 때 실제와 더욱 유사한 *in vitro* 세포 독성실험모델로 적합할 수 있다.
- [0060] 또한, 배양된 세포를 인체의 조직으로 이식하기 위해서는 인체 조직과 유사한 3차원구조로 배양된 세포집합체나 조직이 이식될 때 충분히 기능 및 역할을 수행할 수 있다.
- [0061] 최근, 질병 치료에 배양 세포의 이용 및 응용이 확대됨에 따라 세포 배양에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0062] 세포 배양에서 세포를 배양, 분화시키고, 세포와 함께 인체 조직에 이식될 수 있는 지지체의 구성소재, 구조, 모폴러지 등에 관한 연구는 매우 중요하다. 그러나 기존 지지체를 이용한 배양세포는 체내와 유사한 입체적 구조로 배양되지 않고 생존율도 낮아 *in-vitro* 실험모델이나 이식용 세포로서 부적합한 문제가 있었다.
- [0063] 반면, 상기 비드는 마이크로 크기의 균일한 삼차원 구조체로 대량생산이 가능하고, 생체 안전성 및 적합성이 우수하므로 조직공학 분야에서 세포 배양, 약물 전달, 세포 이식, 조직 재생 등의 용도로 다양하게 활용될 수 있다.
- [0064] 따라서, 상기 지지체는 조직공학 분야에서 세포 이식을 통한 질환치료 등에 담체로서 유용하게 활용될 수 있으며, 다양한 생체 부위에 직접 적용될 수 있다.
- [0065] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0066] **실험예 1 : dECM 기반 조직 특이적 비드 제작**
- [0067] 탈세포 과정을 거친 다양한 조직 유래 세포외기질 성분을 이용하여 조직 특이적 비드 제작을 위한 플랫폼을 개발하였다(도 1A).
- [0068] 동결 건조 및 용액화 과정을 통해 세포외기질 용액을 준비하고 flow-focusing 기법의 마이크로유체칩을 이용하여 비드를 제작하였다.
- [0069] 유상(Oil-phase)은 생체 적합성이 우수한 HFE-7500을 사용하였고, 수상(water-phase)은 다양한 조직 특이적 세포외기질 용액(pre-gel solution)을 사용하였다.
- [0070] 형광단백질(FITC-BSA)을 pre-gel solution에 혼합하고 비드를 제작한 결과, 젤화(gelation) 과정, 세척 과정을 거쳐 균일하고 안정적인 마이크로 크기의 비드가 제작되었다(도 1B).
- [0071] **실험예 2 : 제작 조건 및 비드 크기 확인**
- [0072] 마이크로유체칩의 분산상(pre-gel solution), 및 연속상(HFE-7500)의 압출력 (Pd, Pc)을 제어함으로써 비드의

제작 가능 범위를 산출하고(도 2A), 압출력 변화에 따라 약 60 내지 180 μm 크기의 비드를 제작하였다(도 2B).

[0073] 제작된 비드는 매우 균일하고 대량생산이 가능하며 젤화, 및 세척 이후에도 안정적으로 형태가 유지되어 다양한 크기의 조직 특이적 비드 제작이 가능하였다(도 2C 및 2D).

[0074] **실험예 3 : dECM 기반 pre-gel solution의 점성 분석**

[0075] 탈세포 간조직(DLM) 기반 pre-gel solution의 점성(viscosity)을 측정한 결과 DLM 농도에 따라 5 내지 30 mPa*s의 점성(1000 1/s기준)을 나타내었다(도 3).

[0076] 이는 유상으로 사용되는 물질의 점성보다 매우 높은 값으로 더욱 큰 압출력 변화에도 비드 제작이 가능하며, 결과적으로 다양한 크기의 비드 제작을 가능하게 한다.

[0077] **실험예 4 : 다양한 조직 유래 dECM 제작**

[0078] 다양한 조직을 이용하여 탈세포 dECM을 제작하고 이를 이용하여 조직 특이적 비드를 제작하였다.

[0079] 간, 심장, 신장, 근육, 위, 장, 폐 등의 조직을 탈세포화 하여 모든 조직으로부터 면역반응을 유발할 수 있는 세포는 거의 제거된 반면, 대표적인 세포외기질 성분인 GAG(glycosaminoglycan)는 손실되지 않고 유지되었다(도 4A, 4B, 및 4C).

[0080] 각 탈세포 조직을 이용하여 비드를 제작하였고 모두 균일한 크기로 안정적인 제작이 가능하였다(도 4D).

[0081] **실험예 5 : 세포적합성 평가**

[0082] 간조직 특이적 비드(liver bead)를 이용하여 유도간세포(induced hepatocyte-like cell)를 배양하고 조직 특이적 재료의 세포 적합성을 확인하였다.

[0083] 대조군으로는 기존 비드 제작에 널리 사용되는 Collagen type I 기반 비드(Col I bead)를 사용하였다.

[0084] 세포를 봉입(encapsulation)하고 비드 내 세포 함량을 비교한 결과 Col I / 간조직 특이적 비드 모두 유사한 양의 DNA를 포함하였으며, 세포의 봉입 효율에 큰 차이가 없었다(도 5A).

[0085] Live/dead staining 결과 간조직 특이적 비드의 경우 Col I 비드보다 유도간세포의 생존율이 현저히 높은 수준으로 유지되었다(도 5B 및 5C).

[0086] 간조직 특이적 비드 내에서 간세포 스페로이드의 형성 효율이 높고(도 5D), 비드의 크기 및 형태가 효과적으로 유지되었다(도 5E).

[0087] **실험예 6 : 비드의 물성 평가**

[0088] 제작된 비드의 물성측정을 위해 bulk 하이드로젤 형태로 물성을 측정하였다.

[0089] 측정결과 Collagen I(Col I) 기반의 비드 및 탈세포 간조직(DLM) 비드는 모두 탄성계수(elastic modulus)가 점성계수(viscous modulus) 보다 높은 값을 나타내었으며, 안정적인 하이드로젤 형태로 유지되었다(도 6A).

[0090] 제작된 탈세포 간조직(DLM) 비드는 5 mg/mL ECM 농도 기준 32.6 ± 1.7 Pa의 탄성계수(1 Hz 기준)를 나타내었으며, 종래 널리 사용되는 Collagen I(Col I) 기반의 비드(2 mg/mL 기준; 11.8 ± 0.6 Pa, 5 mg/mL 기준; 17.1 ± 2.2 Pa)보다 현저히 높은 수준이었다(도 6B).

[0091] 상기 결과는 물성이 향상된 탈세포 간조직(DLM) 비드에서 수축 현상이 적게 일어나고 크기 및 형태가 잘 유지되므로 세포를 오랜 기간 안정적으로 배양 할 수 있음을 시사한다.

[0092] **실험예 7 : 3차원 세포 배양 기능성 평가**

[0093] 간조직 특이적 비드(liver bead)를 이용하여 유도간세포(induced hepatocyte-like cell)를 배양하고 조직 특이적 재료의 기능성을 확인함.

[0094] 배양 3일 후, Liver bead 내에 봉입된 유도간세포에서 간세포 특이적 마커인 ALB, AFP, G6PC3 등이 발현이 대조군(Col I bead 그룹) 보다 높은 수준으로 유지되었다(도 7A 및 7B).

[0095] 뿐만 아니라 간세포 특이적 기능성을 보여주는 urea 합성, albumin 합성, CYP3A4 효소 활성화 대조군(Col I bead 그룹)에 비해 간조직 특이적 비드 내 봉입된 유도간세포에서 효과적으로 증진되었다(도 7C 내지 7E).

[0096] 도 8을 참조하면, 간조직 특이적 비드(liver bead)와 동일한 ECM 농도의 Col I bead를 이용하여 유도간세포

(induced hepatocyte-like cell)를 배양한 결과, 배양된 세포의 기능성 향상은 ECM 농도가 아닌 조직 특이성과 연관되었다.

[0097] 배양 1, 3일 후, 간조직 특이적 비드 내에 봉입된 유도간세포에서 간세포 특이적 기능성 중 하나인 urea 합성능이 대조군(2 mg/mL, 5 mg/mL Col I bead 그룹) 보다 현저히 증진되었다(도 8).

[0098] 또한, 심장, 근육 조직 특이적 비드를 이용하여 유도심장/근육세포(induced cardiac/muscle cell)의 배양 가능성을 확인하였다(도 9A 및 9D).

[0099] Live/dead staining 결과 각각의 비드에 봉입된 세포 생존율은 높은 수준으로 유지되었으며(도 9B 및 9E), 각각의 비드에 봉입된 세포의 특이적 마커발현(심장세포: ACT, cTNT, 근육세포: α -actin, MyoD)이 효과적으로 유지되었다(도 9C 및 9F).

[0100] 도 10을 참조하면, 조직 특이적 비드(liver, kidney, lung bead)를 이용한 조직 특이적 세포 배양(HepG2, HEK293, IMR90) 가능성을 추가적으로 확인하기 위해 각 조직으로부터 유래한 세포주를 해당 조직 유래의 비드를 이용하여 배양하였다.

[0101] Live/dead staining 결과 각각의 조직특이적 비드에 봉입된 해당 조직 세포의 생존율이 높은 수준으로 유지되었다.

[0102] 실험예 8 : 세포 이식 활용 가능성 평가

[0103] 간조직 특이적 비드(liver bead)의 유도간세포(induced hepatocyte-like cell) 이식을 위한 지지체로서의 활용 가능성을 확인하였다.

[0104] 도 11을 참조하면, 간조직 특이적 비드에 봉입된 세포를 kidney capsule에 이식하였을 때, 세포만 이식한 경우보다 이식된 부위에서 생착능이 높은 수준으로 증진되었다.

[0105] 간조직 특이적 비드에 의한 생착능 증진은 조직 특이적 세포의 이식 후 기능성을 증진시키고 오랜 기간 유지시키는 데 필수적이다.

[0106] 도 12를 참조하면, 근육 특이적 비드(muscle bead)를 hindlimb 근육 75%가 제거된 근육 손상모델의 세포 치료에 사용하였다.

[0107] 유도근육세포(iMuscle cell)를 근육 특이적 비드에 봉입하고 손상 조직에 주사하여 이식하였다(도 12A).

[0108] 행동분석을 통해 Muscle bead를 이용한 유도근육세포 이식술이 근육의 기능성과 관련된 보폭 길이(stride length)를 크게 증가시켰으며, 스탠스(stance) 간격을 크게 감소(기능성 회복의 지표)시켰다(도 12B).

[0109] 특히, 근육 특이적 비드를 활용하였을 때 단일 ECM 성분 기반의 Col I bead 보다 기능성 회복이 매우 증진되었으며, 이를 통해 조직 특이적인 재료 사용에 의한 근육 재생 및 기능성 회복이 촉진되었다(도 12B).

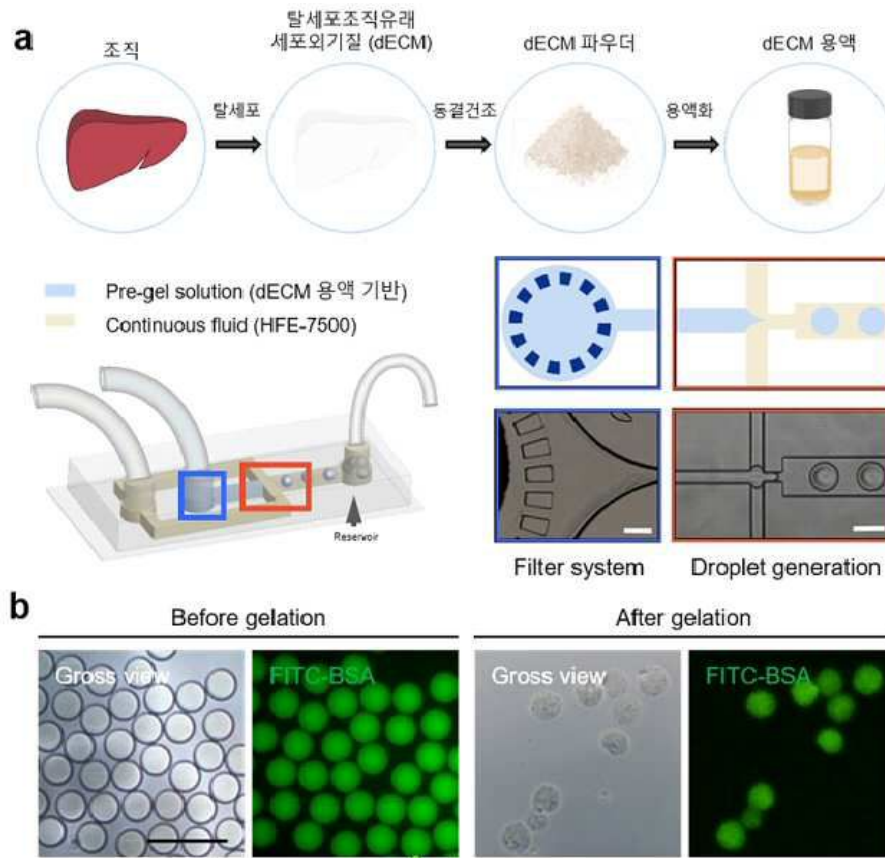
[0110] 이식 치료 4주 후 조직학 분석 결과, 근육 특이적 비드를 이용하였을 때 이식된 유도근육세포에 의한 근육 조직의 재생이 가장 높은 수준으로 촉진되었다(도 12C).

[0111] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 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.

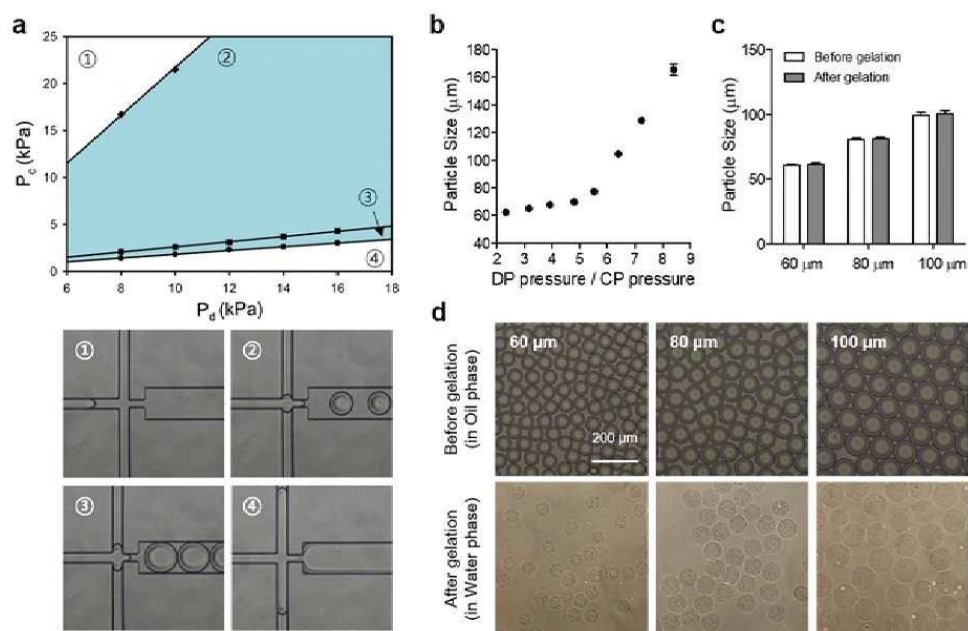
[0112] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

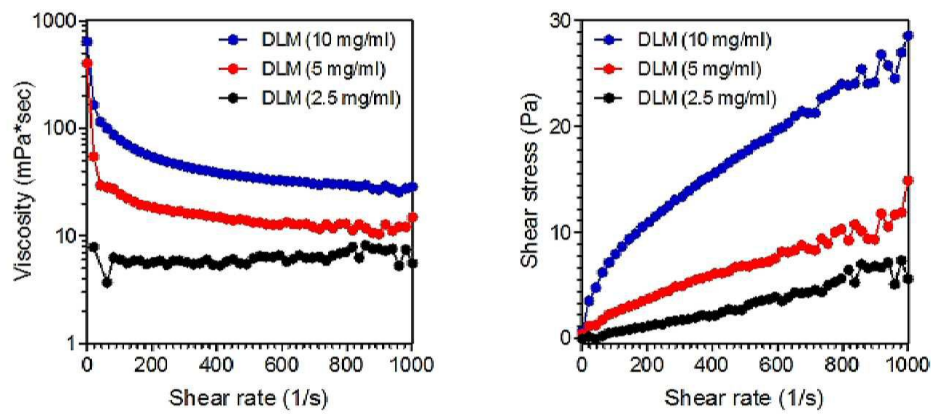
도면1



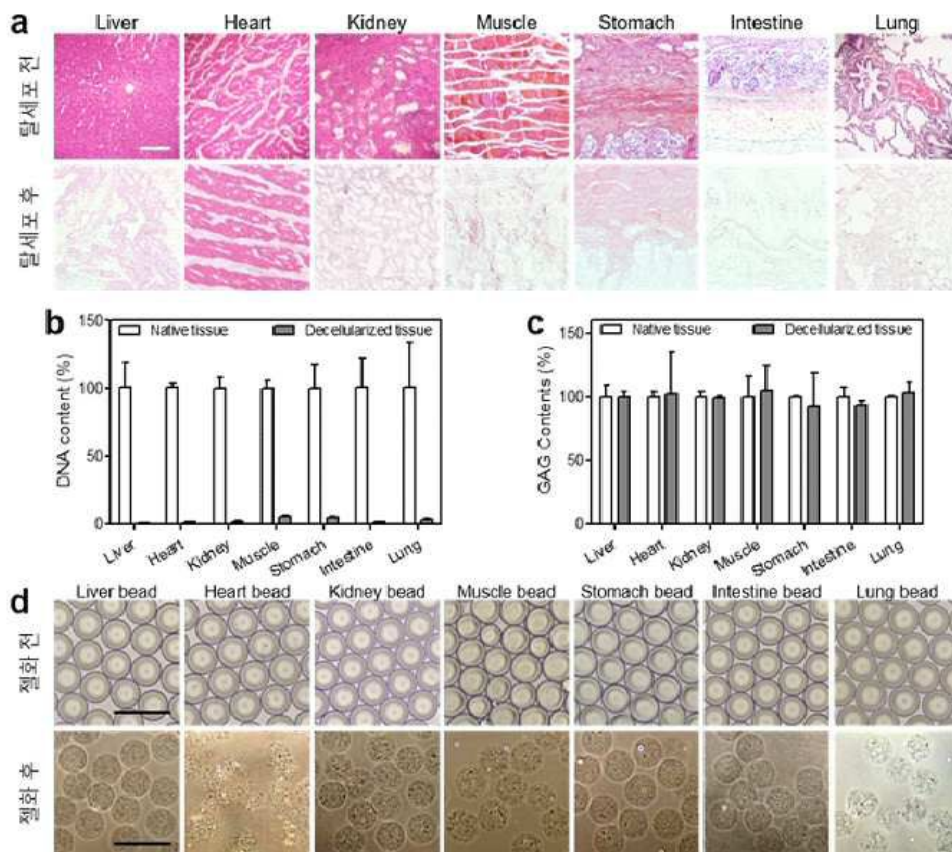
도면2



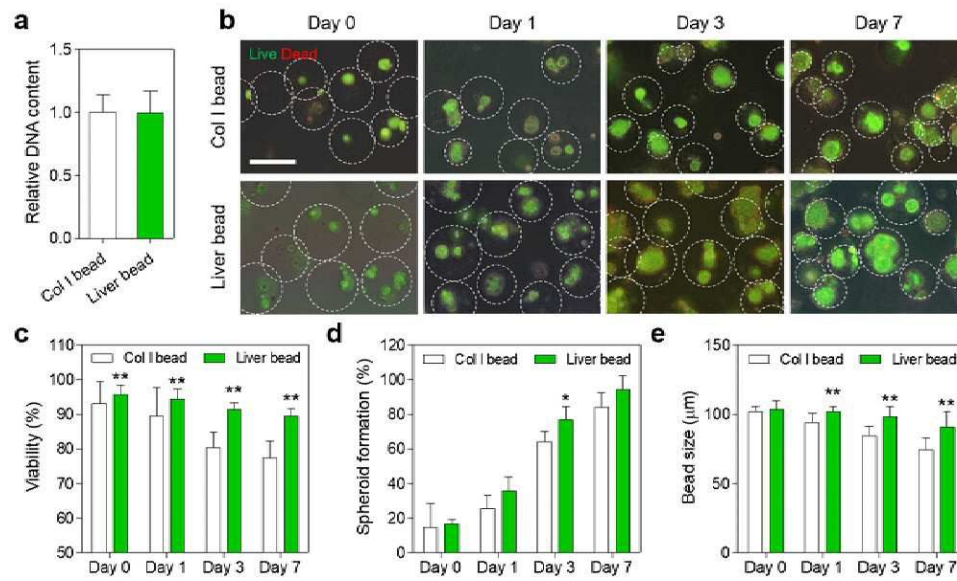
도면3



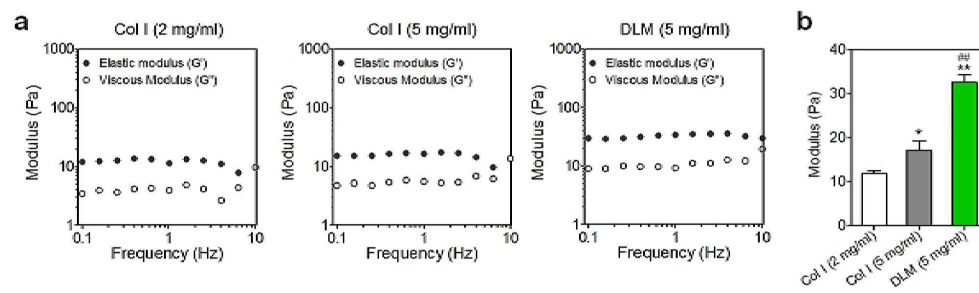
도면4



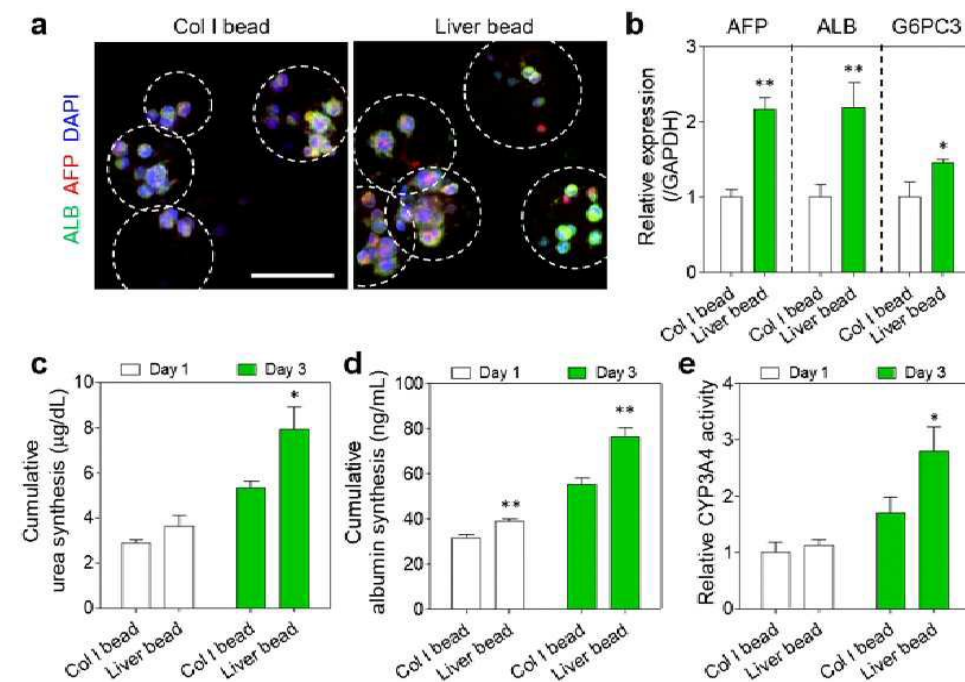
도면5



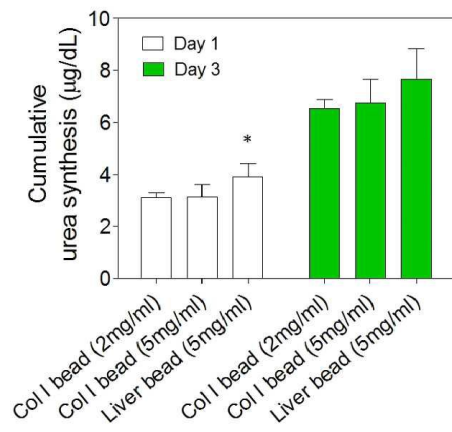
도면6



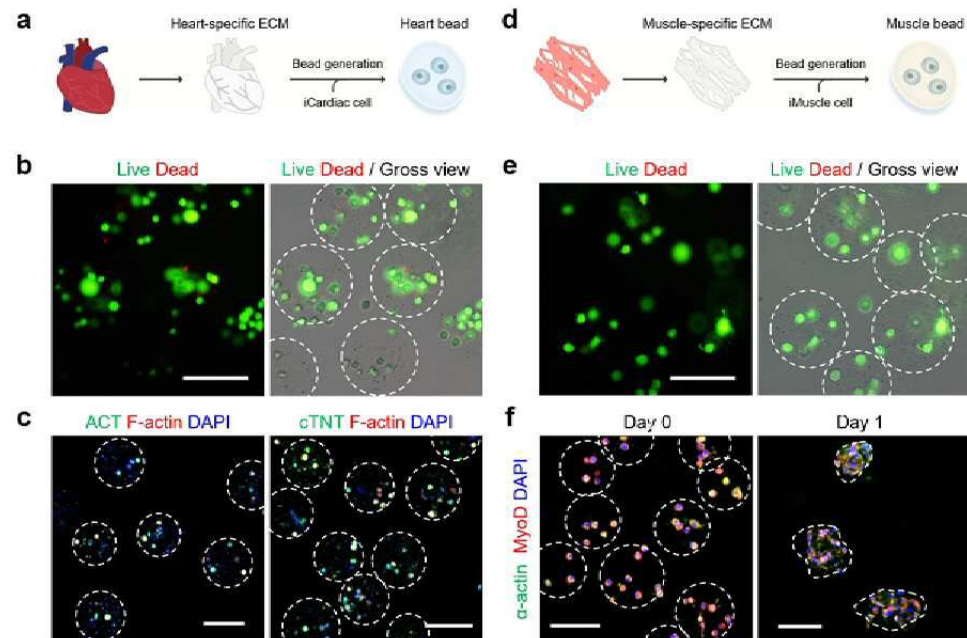
도면7



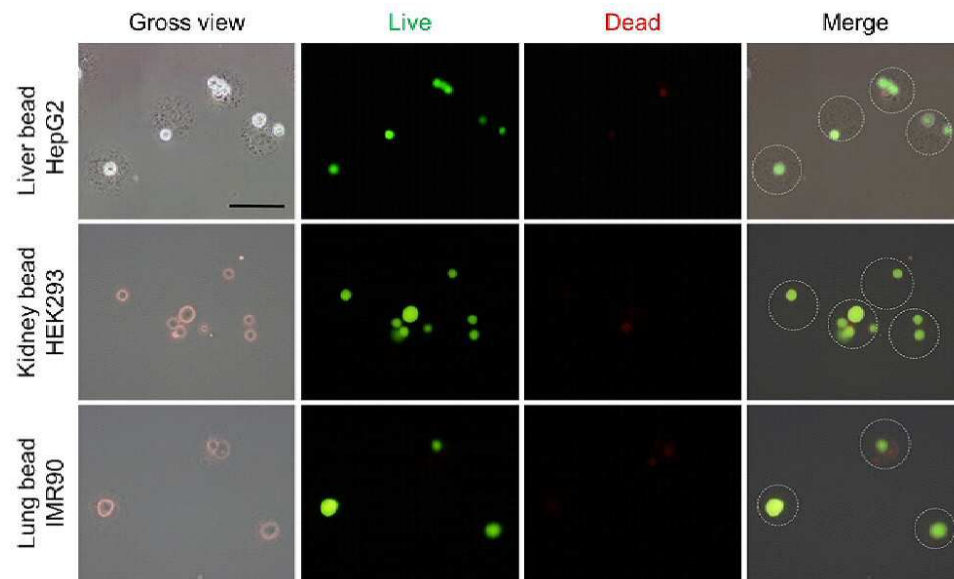
도면8



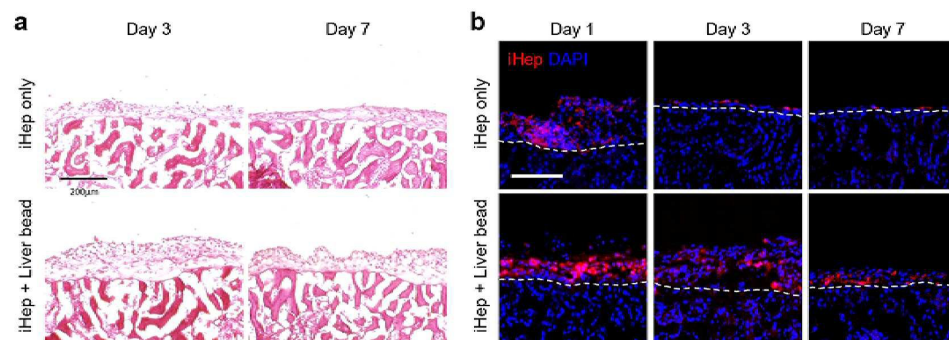
도면9



도면10



도면11



도면12

