

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0037782

(43) 공개일자 2023년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/00 (2013.01)

C12N 5/0668 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0120741

(22) 출원일자 2021년09월10일

심사청구일자 2021년09월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

정병문

서울특별시 은평구 진관2로 57-37, 241동 601호 (진관동, 은평뉴타운우물골)

피아오, 정위

중국 지린성 엔지시 차오셴쯔저우 엔벤 공원로 977 (엔벤대)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

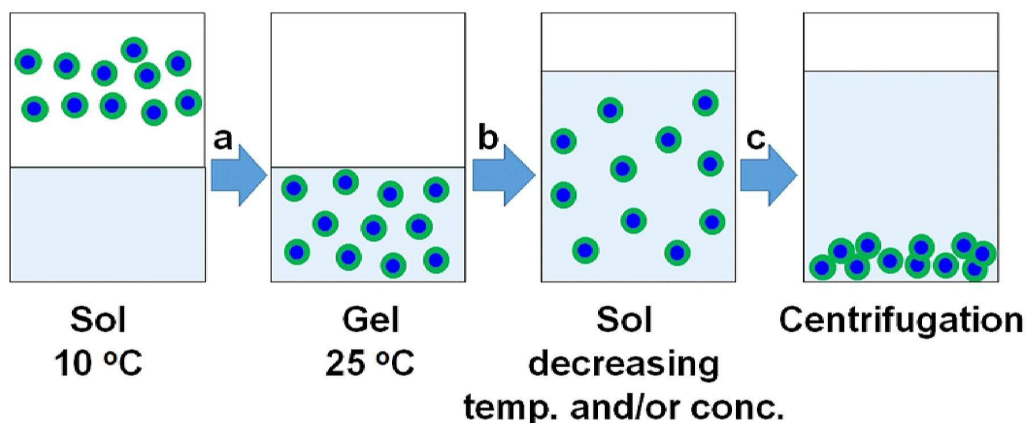
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 생체친화성 고분자를 포함하는 세포 저장용 조성물

(57) 요약

본원은, 졸-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는 세포 저장용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131425
과제번호	2020R1A2C2007101
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	생체모방형 결빙방지 분자소재
기 여 율	8/10
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711126673
과제번호	2017R1A5A1015365
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	혼성계면 화학구조 연구센터
기 여 율	2/10
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

외부 온도에 의해 졸-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는, 세포 저장용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 이상에서 상기 생체친화성 고분자가 겔화되어 세포를 저장하는 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 생체친화성 고분자는, 겔 상이 나타나는 임계 겔 농도 이상으로 함유되는 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 생체친화성 고분자의 농도는 1 중량% 내지 30 중량%인 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 생체친화성 고분자의 졸-겔 전이온도(T_{s-g})는 0℃ 내지 35℃인 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 6

제 2 항에 있어서,
상기 생체친화성 고분자가 겔화된 세포 저장용 조성물의 저장 탄성률(G')은 0.1 Pa 내지 5000 Pa인 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
상기 생체친화성 고분자는 폴리아크릴레이트계 고분자, 폴리에스터계 고분자, 폴리포스파젠계 고분자, 키토산 및 키토산 유도체, 및 폴리펩타이드 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 세포는, 연골세포, 지방세포, 간세포, 암세포, 줄기세포, 적혈구, 및 백혈구 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 세포 저장용 조성물.

청구항 9

줄-겔 전이온도(T_{s-g}) 미만의 외부 온도에서 생체친화성 고분자를 희석하는 단계;

상기 희석된 생체친화성 고분자 용액에 세포를 투여하는 단계; 및

줄-겔 전이온도(T_{s-g}) 이상의 온도에서 상기 세포가 투여된 생체친화성 고분자 용액을 겔화시키는 단계를 포함하는, 세포의 저장방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 겔화된 생체친화성 고분자 용액을 줄-겔 전이온도(T_{s-g}) 미만으로 온도를 내리거나, 임계 겔 농도 이하로 희석하거나, 또는 상기 둘 모두를 통해 상기 겔화된 생체친화성 고분자 용액을 졸화 시킴으로써 상기 세포를 회수하는 단계를 추가 포함하는, 세포의 저장방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 줄-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는 세포 저장용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 기반 치료법을 개발하는 데 있어 줄기세포 등과 같은 세포의 안정적인 저장은 세포 은행 및 세포 수송을 이룰 수 있는 만큼 중요한 문제이다. 종래의 방법은 -196°C 의 온도에서 액체 질소에 세포를 저장하는 것으로, DMSO 10% 배제가 동결 보호제로 사용된다. 따라서 종래의 방법에는 세포의 운송 및 은행 보관 모두에 콜드 체인이 필요하고, 이러한 냉동보존 시스템의 해동 및 냉동 과정에서 많은 세포가 손상되거나 손실된다. 세포의 저온 손상은 1) 냉각 및 해동 시 얼음 결정화 또는 재결정화, 2) 동결되지 않은 부분의 삼투압 발생, 3) 저온에서 세포 성분의 손상에 의해 발생한다. 특히, 종래의 냉동보존 시스템에 사용되는 DMSO는 독성이 있어 미토콘드리아를 손상시키고, 세포내 세포 신호전달을 방해하고, 줄기세포 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 DMSO의 사후 제거를 위한 매우 엄격한 절차는 in vivo 및 in vitro 적용에 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) KR 10-2004-0024170 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본원은, 종래의 세포 저장 방법의 문제를 해결하기 위해, 극저온의 환경을 필요로 하지 않는, 줄-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는 세포 저장용 조성물을 제공하고자 한다.

[0005] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제

들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본원의 제 1 측면은, 외부 온도에 의해 졸-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는, 세포 저장용 조성물을 제공한다.
- [0007] 본원의 제 2 측면은, 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 미만의 외부 온도에서 생체친화성 고분자를 희석하는 단계; 상기 희석된 생체친화성 고분자 용액에 세포를 투여하는 단계; 및 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 이상의 온도에서 상기 세포가 투여된 생체친화성 고분자 용액을 겔화시키는 단계를 포함하는, 세포의 저장방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0008] 본원의 구현예들에 의한 세포 저장용 조성물은, 0℃ 내지 35℃에서 졸-겔 전이 특성이 있는 생체친화성 고분자를 포함하는 것으로서, 세포에 유해한 영향을 미치는 첨가제 등이 사용되지 않고 겔상으로의 변화만으로 세포를 안정적으로 보관할 수 있으며, 상온 부근에서도 세포를 보관할 수 있는 특징이 있다.
- [0009] 본원의 구현예들에 의한 세포 저장용 조성물은, 겔상에서 탄성률(G')이 시판 중인 F127에 비해 현저히 작은 것으로, 세포에 외부 손상을 일으키지 않고 세포를 안정적으로 보호하고 저장할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은, 본원의 일 구현예에 있어서, 써모겔을 사용한 세포 로딩/디로딩 절차를 나타내는 개략도이다: a) T_{s-g} 이상에서의 열 유도 졸에서 겔로의 전이에 의한 세포 로딩, b) 온도를 T_{s-g} 미만으로 낮추고/하거나 생체친화 고분자를 임계 겔 농도 미만으로 희석함으로써 겔에서 졸로의 전환에 의한 세포 디로딩, c) 원심분리에 의한 세포 회수를 나타냄.
- 도 2는, 본원의 일 실시예에 있어서, 농도 및 온도에 따른 위상 다이어그램 및 온도에 따른 저장 탄성률(G') 및 손실 탄성률(G'')을 낸다: a) PEG-PA 용액의 위상 다이어그램, b) F127의 용액의 위상 다이어그램, c) PEG-PA 용액(4.0 중량%)의 온도에 따른 탄성률, 및 d) F127 용액(20.0 중량%)의 온도에 따른 탄성률을 나타내며, 졸(10℃) 및 겔(25℃) 상태의 사진이 삽입됨.
- 도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, a) PBS(음성 대조군), F127 써모겔, PEG-PA 써모겔 및 -196℃에서 냉동 보존된 DMSO 10% 시스템에서 25℃에서 1, 3, 7일 동안 보관한 후 회수된 세포 이미지(눈금 막대는 200 μ m), b) 25℃에서 1, 3 및 7일 보관 후 회수 직후의 세포 회수 정도를 나타낸 그래프(3회 측정), 및 c) 25℃에서 1, 3 및 7일 보관 후 회수된 세포를 플레이팅한 후 24시간 후에 세포 회수 정도를 나타낸 그래프(3회 측정)이다.
- 도 4는, 본원의 일 실시예에 있어서, 저장 7일 후 25℃에서 저체온 보존 PEG-PA 써모겔과 -196℃에서 동결 보존 DMSO 10% 시스템에서 회수된 줄기세포의 비교를 나타낸다 (3회 측정): a) 줄기세포 바이오마커의 발현, b) 줄기세포의 증식(0일째의 세포 밀도는 100%로 지정), c) 줄기세포의 분화.
- 도 5는, 본원의 일 실시예에 있어서, 면역형광법으로 단백질 발현을 시각화한 그림이다: (a) RUNX2(골형성), (b) COL II(연골형성) 및 (c) PPAR(지방형성), 및 d) Alizarin red, Alcian blue 및 Oil red O 염색에 의한 바이오마커 발현 (스케일 바는 200 μ m).
- 도 6은, 본원의 일 실시예에 있어서, 세포막 모방 DPPC 소포의 불안정화에서 F127과 PEG-PA 써모겔 중합체 간의 비교를 나타낸다: a) DPPC 수용액(0.05 중량%)에서 소포 형성 크기, b) 수성 DPPC/폴리머 용액 및 DPPC 써모겔(0.05 중량%)의 시차 주사 미세열량 측정 열분석도(두 번째 실행이며, DPPC/F127 및 DPPC/PEG-PA의 농도는 각각 0.05/20 및 0.05/4.0(중량%/중량%)임).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 디바이스를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.
- [0012] 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.

- [0013] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0014] 본 명세서에서 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.
- [0015] 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~ 하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0016] 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.
- [0017] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본원의 제 1 측면은, 외부 온도에 의해 졸-겔 전이 특성을 갖는 생체친화성 고분자를 포함하는, 세포 저장용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본원의 일 구현예에 있어서, 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 이상에서 상기 생체친화성 고분자가 겔화되어 세포를 저장하는 것일 수 있다.
- [0022] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생체친화성 고분자는, 겔 상이 나타나는 임계 겔 농도 이상으로 함유되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 생체친화성 고분자는 외부 온도에 의해 졸-겔 전이 특성이 발현되기 위해 겔 상이 나타나는 임계 겔 농도 이상으로 함유될 수 있다. 상기 겔 상이 나타나는 임계 겔 농도는 하한 임계농도일 수 있다.
- [0023] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생체친화성 고분자의 농도는 1 중량% 내지 30 중량%인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 생체친화성 고분자의 농도는 1 중량% 내지 30 중량%, 1 중량% 내지 20 중량%, 1 중량% 내지 10 중량%, 1 중량% 내지 8 중량%, 1 중량% 내지 6 중량%, 3 중량% 내지 30 중량%, 3 중량% 내지 20 중량%, 3 중량% 내지 10 중량%, 3 중량% 내지 8 중량%, 3 중량% 내지 6 중량%, 5 중량% 내지 30 중량%, 5 중량% 내지 20 중량%, 5 중량% 내지 10 중량%, 5 중량% 내지 8 중량%, 또는 5 중량% 내지 6 중량%인 것일 수 있다. 상기 생체친화성 고분자의 농도는 겔 상이 나타나는 임계 겔 농도 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로는 하한 임계농도 내지 상한 임계농도 이하인 것일 수 있다. 또한, 상기 생체친화성 고분자를 포함하는 세포 저장용 조성물의 용매는 물을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생체친화성 고분자의 졸-겔 전이온도(T_{s-g})는 0℃ 내지 35℃ 인 것일 수 있다. 상기 생체친화성 고분자의 졸-겔 전이온도(T_{s-g})는 상기 생체친화성 고분자의 종류 및/또는 농도에 따라 달라질 수 있는 것으로, 세포를 보관하고자 하는 외부 온도에 따라 상기 생체친화성 고분자의 종류 및/또는 농도를 적절히 조절하여, 목적하는 상기 생체친화성 고분자의 졸-겔 전이온도(T_{s-g})를 구현할 수 있다.
- [0025] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생체친화성 고분자가 겔화된 세포 저장용 조성물의 저장 탄성률(G')은 0.1 Pa 내지 5000 Pa인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 생체친화성 고분자가 겔화된 세포 저장용 조성물의 저장 탄성률(G')은 0.1 Pa 내지 5000 Pa, 0.1 Pa 내지 4000 Pa, 0.1 Pa 내지 3000 Pa, 0.1 Pa 내지 2000 Pa, 0.1 Pa 내지 1000 Pa, 0.1 Pa 내지 500 Pa, 0.1 Pa 내지 300 Pa, 0.1 Pa 내지 100 Pa, 0.1 Pa 내지 50 Pa, 1 Pa 내지 5000 Pa, 1 Pa 내지 4000 Pa, 1 Pa 내지 3000 Pa, 1 Pa 내지 2000 Pa, 1 Pa 내지 1000 Pa, 1 Pa 내지 500 Pa, 1 Pa 내지 300 Pa, 1 Pa 내지 100 Pa, 1 Pa 내지 50 Pa, 10 Pa 내지 5000 Pa, 10 Pa 내지 4000 Pa, 10 Pa 내지 3000 Pa, 10 Pa 내지 2000 Pa, 10 Pa 내지 1000 Pa, 10 Pa 내지 500 Pa, 10 Pa 내지 300 Pa, 10 Pa 내지 100 Pa, 또는 10 Pa 내지 50 Pa일 수 있다.
- [0026] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 생체친화성 고분자는 폴리아크릴레이트계 고분자, 폴리에스터계 고분자, 폴리포스파젠계 고분자, 키토산 및 키토산 유도체, 및 폴리펩타이드 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수

있다.

- [0027] 구체적으로, 상기 폴리아크릴레이트계 고분자는 PNIPAAm(Poly(N-isopropyl acryl amide))를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 폴리에스터계 고분자는 PLGA계 폴리에스터로서 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(poly(lactide-co-glycolide))를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 키토산 유도체는 PA-PEG 블록공중합체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포는, 연골세포, 지방세포, 간세포, 암세포, 줄기세포, 적혈구, 및 백혈구 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 본원의 제 2 측면은, 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 미만의 외부 온도에서 생체친화성 고분자를 희석하는 단계; 상기 희석된 생체친화성 고분자 용액에 세포를 투여하는 단계; 및 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 이상의 온도에서 상기 세포가 투여된 생체친화성 고분자 용액을 겔화시키는 단계를 포함하는, 세포의 저장방법을 제공한다.
- [0031] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 겔화된 생체친화성 고분자 용액을 졸-겔 전이온도(T_{s-g}) 미만으로 온도를 내리거나, 임계 겔 농도 이하로 희석하거나, 또는 상기 둘 모두를 통해 상기 겔화된 생체친화성 고분자 용액을 졸화 시킴으로써 상기 세포를 회수하는 단계를 추가 포함하는 것일 수 있다. 도 1을 참고하여 설명하면, 상기 생체친화성 고분자는 외부 온도에 의해 졸-겔 전이 특성을 갖는 것으로, 겔 상에서 상기 세포를 저장할 수 있으며, 졸 상에서 상기 세포를 회수할 수 있다. 본 세포 저장 시스템은 반복된 졸-겔 전이에도 세포를 안정적으로 보관 및 저장할 수 있는 재사용 가능한 특징이 있다. 또한, 세포에 영향을 미치는 첨가제가 없으므로 세포에 유해한 영향을 미치지 않고, 반복사용에도 내구성이 유지되는 특징이 있다.
- [0033] 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.
- [0034] **[실시예]**
- [0035] **1. 실시예 : 세포 저장용 조성물의 준비**
- [0036] 본 실시예의 주재료인 PEG-PA 블록 공중합체는 모노아미노-PEG에서 L-알라닌의 N-카르복시 무수물의 개환 중합에 의해 합성되었다. $^1\text{H-NMR}$ 로 측정한 PEG-PA의 분자량은 1000 내지 1000이었고, GPC로 측정한 분자량 분포는 1.2였다. 대조군의 열겔화 시스템으로 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(프로필렌글리콜)-폴리(에틸렌글리콜)(PEG-PPG-PEG) 삼중 블록 공중합체인 F127의 수용액이 사용되었다. 수성 PEG-PA 및 F127 용액은 온도가 증가함에 따라 졸에서 겔로의 전이를 겪는다. PEG-PA의 졸-투-겔 전이는 PEG의 탈수와 β -시트의 부분적 증가, PEG-PA 미셀의 응집을 수반하며 F127은 유니머-투-마이셀 전이(unimer-to-micelle transition)에 의해 졸-투-겔 전이를 일으키고, 마이셀 분획(micelle fraction)이 0.53보다 크면 마이셀 패키징에 의해 겔이 형성된다. PEG-PA와 F127의 위상 다이어그램을 비교했다 (각각 도 2의 a 및 b). 수성 PEG-PA 용액은 3.0 내지 6.0 중량% 농도 범위에서 졸에서 겔로의 전이를 나타냈다. 전이온도는 3.0 중량%에서 23℃에서 6.0 중량%에서 7℃로 감소했다. 반면에, F127 용액은 15.0 내지 30.0 중량%의 농도 범위에서 졸에서 겔로의 전이를 나타냈다. F127 용액에서, 졸에서 겔로의 전이온도(낮은 전이온도)는 15.0 중량%에서 28℃에서 30.0 중량%에서 10℃로 감소한 반면, 겔에서 졸로의 전이온도(상부 전이 온도)는 15.0 중량%에서 40℃에서 30.0 중량%에서 87℃로 증가했다.
- [0037] 온도 및 폴리머 농도는 세포 생존 및 운송 조건에 영향을 미치기 때문에 세포 보관에서 중요한 매개변수이다. 지나치게 높거나 낮은 온도는 세포의 보관 및 운송에 추가 비용이 필요하다. 수성 PEG-PA 및 F127 용액은 임계 겔 농도 미만의 농도(하한 임계농도) 또는 앞서 표시한 졸-겔 전이를 보이는 농도(상한 임계농도)보다 더 높은 농도에서는 졸-겔 전이를 겪지 않는다. 따라서 본 실시예에서의 세포 저장용 조성물의 제조와 연구를 위해 PEG-PA의 경우 4.0 중량%, F127의 경우 20.0 중량%의 농도를 선택했다. 이러한 농도는 10℃에서 졸 상태의 줄기세포 현탁액을 제공하고 25℃에서 보관할 때의 줄기세포가 포함된 겔을 제공한다 (이하, 상기 겔을 씨모겔이라고도 한다).
- [0038] 수성 PEG-PA 및 F127 용액인 세포 저장용 조성물의 10℃ 및 25℃에서 졸 및 겔 상태는 각각 도 2의 c 및 d에서의 사진과 같다. PEG-PA 및 F127의 수성 폴리머 용액의 모듈러스는 선택된 농도에서 온도의 함수로 비교되었다 (도 2의 c 및 d). PEG-PA 용액(4.0 중량%)의 저장 탄성률(G')은 10℃(졸 상태) 이하의 온도에서 0.3 Pa 미만인

었고, 25℃(겔 상태)에서 40 Pa로 증가했다. F127 용액(20.0 중량%)은 20℃(졸 상태) 이하의 온도에서 0.1 Pa 미만의 저장 탄성률(G')로 유사한 전이를 보였고, 25℃(겔 상태)에서 4,300 Pa로 증가했다. 25℃의 온도는 PEG-PA와 F127(대조군)의 수용액에 대한 겔 상태를 얻기 위해 선택되었습니다. 한편, 저장 탄성률(G')과 손실 탄성률(G'')은 온도의 함수로서 1.0 rad/s의 주파수로 제어된 응력(4.0 dyne/cm²) 하에서 측정되었다.

2. 세포 저장용 조성물의 세포 저장 및 회복 시험 분석

2-1. 저장 및 회복 시험 방법

크라이오 바이알(Thermo Scientific™ Nunc™, USA)에서 PBS(phosphate buffered saline)에 폴리머를 용해시켜 제조한 크라이오-용액(cryo-solution, 1 mL)에 1×10^6 cells/mL의 밀도로 편도선 유래 간엽 줄기세포를 현탁시켰다. 최종 중합체 농도는 PEG-PA 및 F127에 대해 각각 4.0 중량% 및 20.0 중량%였다. 바이알을 밀봉하고 인큐베이터(37℃)에 30분 동안 두어 겔을 형성하고 다른 인큐베이터(25℃)로 옮겨 줄기세포를 1, 3, 7일 동안 저체온 보관하였다. 음성 대조군으로는 폴리머가 없는 PBS를 사용하였다. 양성 대조군으로서 줄기세포가 PBS 중 10% DMSO 용액을 사용하는 기존의 세포 보관 시스템에 의해 -196℃에서 동결 보존되었다. 상기 시스템은 -196℃까지 느린 냉각 프로토콜에 의해 냉각되었다. 먼저, 상기 용액들을 제어된 냉동 용기(Thermo Scientific™ Mr. Frosty™, 미국)에서 1℃/min의 냉각 속도로 주위 온도에서 -80℃까지 냉각했다. 24시간 후, -196℃의 액체 질소에 옮겨 1, 3, 7일 동안 동결 보존하였다. 그런 다음 바이알들을 37℃의 수조로 옮겨 시스템을 1 내지 2분 동안 해동했다.

상기 바이알들(PBS, PEG-PA, F127, DMSO 10%)을 PBS(4℃)로 10배 희석하고 4℃에서 원심분리(1500 rpm, 5분)한 후 상층액을 제거하였다. 줄기세포를 PBS(4℃)에 재현탁하여 세척한 후 다시 원심분리하였다. Live/Dead 키트를 사용하여 25℃(PBS, PEG-PA 써모겔 및 F127 써모겔) 또는 -196℃(DMSO 10%)에서 1, 3, 7일 동안 보존한 후 줄기세포의 이미지를 조사했다. 살아있는 세포와 죽은 세포를 모두 포함하는 세포 응집체를 10% 소태아 혈청(Corning, USA), 1.0% 페니실린/스트렙토마이신(Corning, USA) 및 1.0% 항유사분열제 항진균제(antimitotic antimycotic) (Corning, USA)이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM)(1mL)(Corning, USA)의 성장 배지에 재현탁했다. 그 다음, 세포 현탁액을 취하고 에티듐 동종이량체-1(ethidium homodimer-1)(2.0 μM) 및 calcein AM(2.0 μM) 용액(80 μL)을 첨가한 후 37℃에서 30분간 배양하였다. Olympus IX71 형광 현미경과 Olympus DP2-BSW 소프트웨어를 사용하여 이미지를 얻었다.

24웰 배양 플레이트를 사용하여 세포 도말 직전 및 24시간 후에 세포 회수를 분석하여 각각 세포 회수-1 및 세포 회수-2 데이터를 제공했다. 세포 회수-1은 트립판 블루 염색을 사용하여 분석되었다. 세포 회수-2를 얻기 위해 모든 살아있는 세포와 죽은 세포를 DMEM의 성장 배지(1mL)에 재현탁했다. 그것들을 동일한 수의 살아있는 세포(5×10^4 개의 살아있는 세포/웰)가 있는 24-웰 배양 플레이트에 첨가했다. 플레이팅 후 24시간째에 CCK-8 키트(CCK-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 450 nm에서의 광학 밀도를 측정하였다. 세포 회수율은 450 nm에서의 광학 밀도를 기반으로 계산되었으며, 여기서 각 시스템의 값은 DMSO 10% 시스템(양성 대조군)의 값과 비교되었다.

2-2. 회수 시험 확인

상기 줄기세포 내장 하이드로겔 시스템(써모겔)인 세포 저장용 조성물은 바이알에서 세포 현탁 수성 PEG-PA 및 F127 용액의 열 유도 졸-겔 전이에 의해 제조되었으며, 폴리머 없이 PBS에 현탁된 줄기세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 그들은 25℃에서 보관되었다. 양성 대조군으로 -196℃에서 PBS에 DMSO 10%를 사용하여 줄기세포를 보관하였다. 줄기세포는 1, 3 또는 7일 동안 보관되었다. 도 3의 a는 보관 7일 후 각 시스템에서 방금 회수한 줄기세포의 이미지를 나타낸다. 살아있는 세포는 살아있는 세포의 세포 내 에스테라제 활성에 의해 녹색으로 구별된다. 비형광 칼세인 AM은 살아있는 세포에서 에스테라제 활성에 의해 녹색 형광 칼세인으로 전환되는 반면, 세포-불투과성 에티듐 동종이량체-1(ethidium homodimer-1)은 죽은 세포를 통과하여 적색으로 염색된다.

25℃에서 24시간(1D) 보관 후, F127 써모겔에서는 세포의 절반만이 살아있는 것으로 회수된 반면, PEG-PA 써모겔에서 80% 이상의 세포가 회수되었다. F127 써모겔에서 세포 회수율은 3일(3D)에 15% 미만이었으며, 대부분의 세포는 25℃에서 F127 써모겔에 보관한 후 7일 후에 죽었다. 대조적으로, PEG-PA 써모겔에서는 세포의 73% 및 64%는 25℃에서 각각 3일 및 7일 보관 후 회수되었으며, 이는 DMSO 10% 시스템(양성 대조군)(도 3의 b)을 사용하여 -196℃에서 기존 세포 보관과 유사한 회수율이다. 살아있는 세포와 죽은 세포를 모두 포함하는 줄기세포

응집체는 차가운 PBS(4℃)를 첨가한 후 원심분리하여 F127 및 PEG-PA 써모겔의 겔-투-졸 전이에 의해 수집되었다. 줄기세포 응집체를 DMEM의 성장 배지에 재현탁시키고 2D 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음 플레이트팅 후 도 3의 c에서 세포 회수-2로 코드된, 24시간의 세포 회수를 DMSO 10% 시스템(양성 대조군은 100%로 지정)과 비교했다. F127 써모겔로부터의 세포 회수는 DMSO 10% 시스템의 36% 및 2% 미만을 나타내는 반면, 25℃에서 보관된 PEG-PA 써모겔 및 -196℃에서 보관된 DMSO 10% 시스템으로부터의 세포 회수는 비슷하게 나타났다.

[0050] 2-3. 회수된 줄기세포 유전자의 바이오마커 발현, 세포 증식 및 다중계통 포텐셜 확인

[0051] 저체온 보존 PEG-PA 써모겔(25℃)과 기존의 냉동 보존 DMSO 10% 시스템(-196℃)에서 회수한 줄기세포를 줄기세포 바이오마커 발현, 세포 증식 및 골형성(osteogenic), 연골형성(chondrogenic) 및 지방형성(adipogenic) 분화로 줄기세포의 다중계통 포텐셜(multilineage potential)에 대해 비교했다. 이 비교는 -196℃에서 기존의 DMSO 10% 저장 시스템과 비교하여 25℃에서 PEG-PA 써모겔에 저체온으로 저장된 줄기세포의 품질을 보여준다.

[0052] NANOG, OCT4 및 SOX2(줄기세포의 전사 인자)의 줄기 바이오마커는 PEG-PA 및 DMSO 10%의 두 시스템에서 회수된 줄기세포에 대한 mRNA 발현 수준에서 유사하게 나타났다 (도 4의 a).

[0053] 또한 상기 세포들은 5일의 세포 증식 동안 섬유아세포와 유사한 형태를 발달시켰다. 상대 세포 밀도로 표현되는 세포 증식은 DMEM의 성장 배지를 이용한 2차원 배양에서의 배양 기간 동안 24시간(1D), 3일(3D), 5일(5D)에 걸쳐 200% → 250-280% → 480-550% 증가했다. 이는 PEG-PA 써모겔 및 DMSO 10% 시스템에서 회수된 줄기세포가 건강하고 증식 속도가 유사함을 나타낸다 (도 4의 b).

[0054] 상기 줄기세포들의 골형성, 연골형성 및 지방형성 분화에 대한 다중계통 포텐셜은 각각 mRNA 및 단백질 수준에서 런트 관련 전사 인자 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2), 유형 II 콜라겐(type II collagen, COL II) 및 퍼옥시좀 증식자 활성화 수용체-감마(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR)의 전형적인 바이오마커를 조사하여 연구되었다. mRNA 발현 수준은 저체온 보존 PEG-PA 써모겔(25℃) 및 동결 보존 DMSO 10% 시스템(-196℃)에 보관한 후 7일 후에 회수된 세포에서 유사하게 나타났다. 0일과 비교하여 RUNX2, COL II 및 PPAR의 mRNA 발현은 특정 유도 배지에서 14일 배양 후 각각 6.5 내지 6.8배, 6.8 내지 7.7배 및 2.1 내지 2.9배 증가했다 (도 4의 c). RUNX2, COL II 및 PPAR의 단백질 발현은 각각 세포의 핵, 세포질 및 핵에서 단백질의 적색 염색으로 인해 명확하게 관찰되었다 (도 5의 a 내지 c). PEG-PA 써모겔 및 DMSO 10% 시스템에서 회수된 세포는 mRNA 및 단백질 수준에서 바이오마커의 발현 측면에서 유사했다. 또한, 각각 칼슘을 적색으로, 글리코사미노글리칸을 청색으로, 지질을 갈색으로 염색하는 Alizarin red, Alcian blue 및 Oil red O 염색 분석을 수행하여 골형성, 연골형성 및 지방형성 분화를 확인하였다. PEG-PA 써모겔 및 DMSO 10% 시스템에서 회수된 세포는 위의 바이오마커의 발현이 유사했다 (도 5의 d).

[0056] 2-4. 회수된 줄기세포 유전자의 세포막(membrane) 안정성 확인

[0057] 주변 온도에서 저체온 줄기세포 저장 시스템으로서 PEG-PA 써모겔의 우수한 특성은 써모겔의 세포 적합성 미세 환경과 관련될 수 있다. 먼저, PEG-PA 써모겔의 저농도(4.0 중량%)는 졸에서 겔로의 전이를 나타내는 고농도의 F127(20 중량%)과 비교될 수 있다. PEG-PA에서 겔상이 나타나는 임계 겔 농도는 3.0 중량%이며, 이는 15.0 중량%의 F127보다 훨씬 낮다. 농도가 낮을수록 수분 함량이 높아져 세포와 대사 산물이 있는 경우 공간을 자유롭게 차지할 수 있다. 둘째, 보관 조건에서 겔 모듈러스의 차이가 세포 회복에 영향을 미칠 수 있다. PEG-PA 및 F127 써모겔의 모듈러스는 25℃에서 각각 40 Pa 및 4,300 Pa였다. F127의 높은 모듈러스는 세포를 손상시킬 수 있다. 셋째, 온도는 세포의 저체온 보존에서 세포 생존력을 결정하는 중요한 요소이다. 본 실험에서는 F127과 PEG-PA의 수용액이 졸에서 겔로 전환될 수 있도록 25℃를 선택했다. 최적의 온도는 폴리머 시스템에 따라 다를 수 있다. 네 번째, 폴리머에 의한 세포막의 불안정화이다. 이 점을 증명하기 위해 세포막의 주요 지질인 DPPC의 평균 크기가 100 nm인 소포(vesicle)를 준비했다 (도 6의 a). DPPC는 42℃에서 상전이를 겪는다. 소포의 불안정화는 미세사차 주사열량계에 의해 조사되었다 (도 6의 b). 15 내지 25℃에 집중된 큰 피크는 F127의 유니머-투-마 이셀(unimer-to-micelle) 전이와 관련이 있다. DPPC의 경우 42℃에서 피크의 변화는 세포막의 불안정화와 관련이 있다. DPPC/F127 시스템에서 전이점은 41.5℃로 감소한 반면, DPPC/PEG-PA 시스템에서는 전이점이 42℃로 유지되었다. 이를 통해 F127 써모겔에 의해서는 세포막의 불안정화 가능성을 확인할 수 있으며, PEG-PA 써모겔은 세포막의 안정성을 유지할 수 있음을 확인할 수 있다.

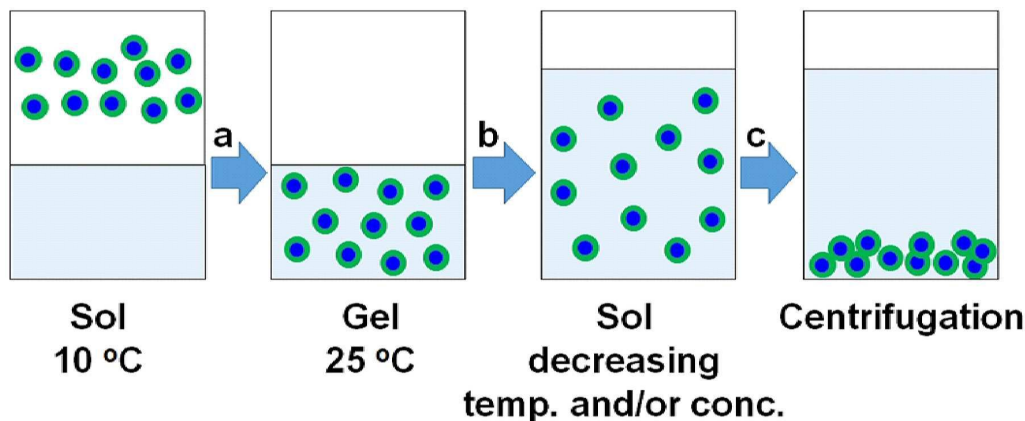
[0059] 종합하면, PEG-PA 써모겔을 사용하여 25℃에서 저체온 세포 보관은 -196℃에서 DMSO 10%를 사용하는 기존의 저온 보관 시스템과 유사할 뿐만 아니라 줄기세포의 줄기(stemness), 증식 및 분화 가능성의 보존 측면에서 우수함이 나타났다. 반면, 대조 시스템으로 사용된 F127 써모겔은 25℃에서 저체온 세포 보관 시스템으로서 세포 회복이 좋지 않은 것으로 나타났으며, 이는 F127의 높은 임계 겔 농도와 막 불안정화 활성화 때문인 것으로 확인되었다. 줄기세포가 로딩된 PEG-PA 써모겔은 주변 온도에서 보관하는 동안 부형제나 영양소가 없는 바이알에 PBS를 사용하여 준비되었으며, 특히, 감열성(thermosensitive) 졸-겔/겔-졸 전이에 의한 줄기세포의 로딩 및 디로딩의 간단한 절차는 PEG-PA 써모겔을 세포 은행 및 운송을 위한 유망한 키트로 활용될 수 있음을 보여준다.

[0061] 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 수도 있다.

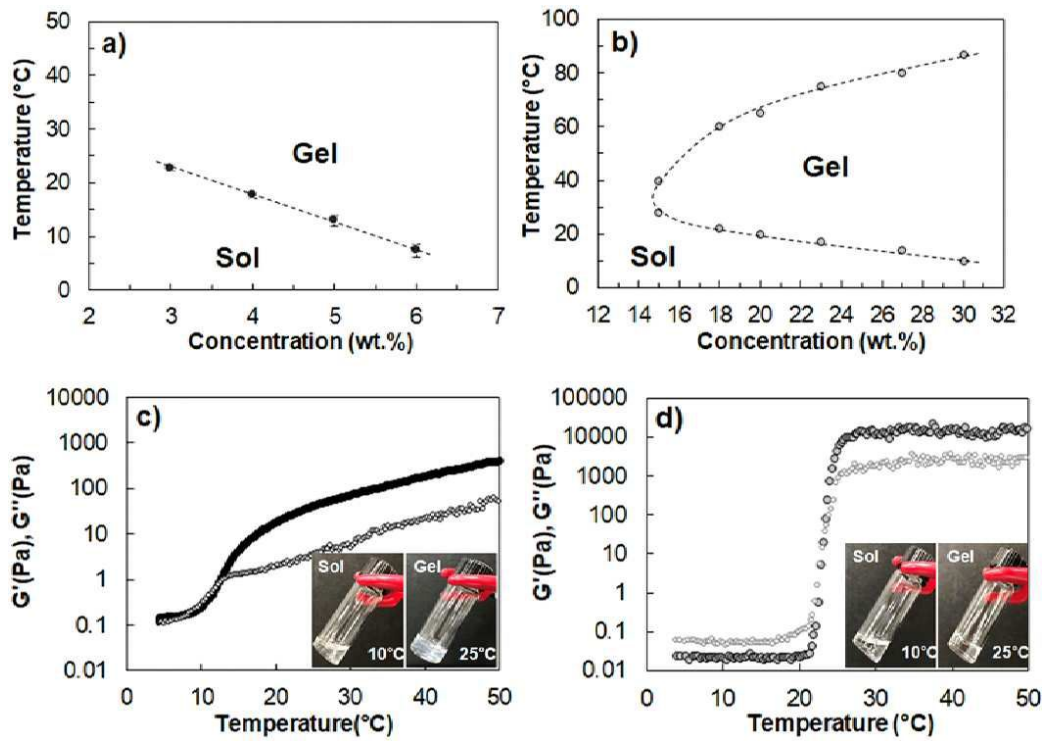
[0062] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

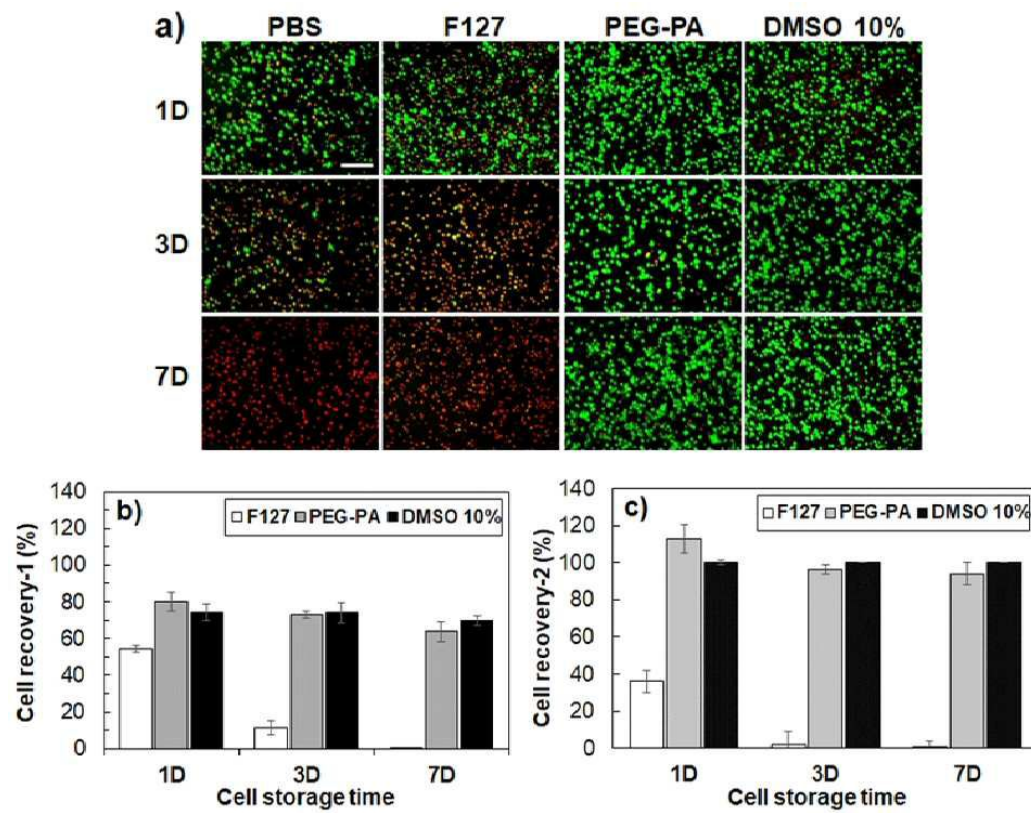
도면1



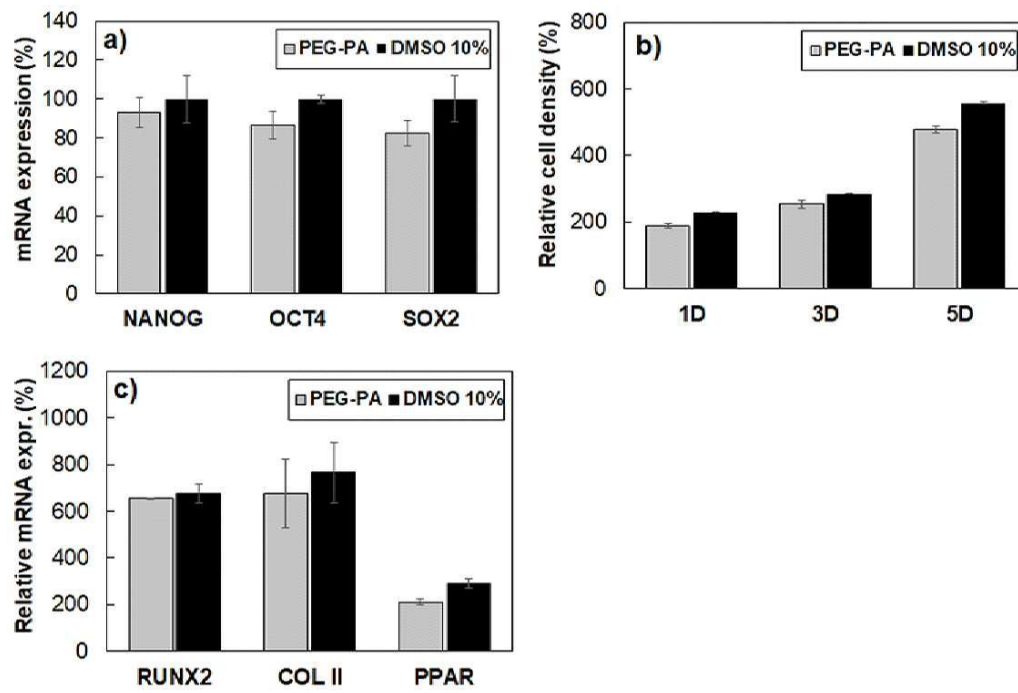
도면2



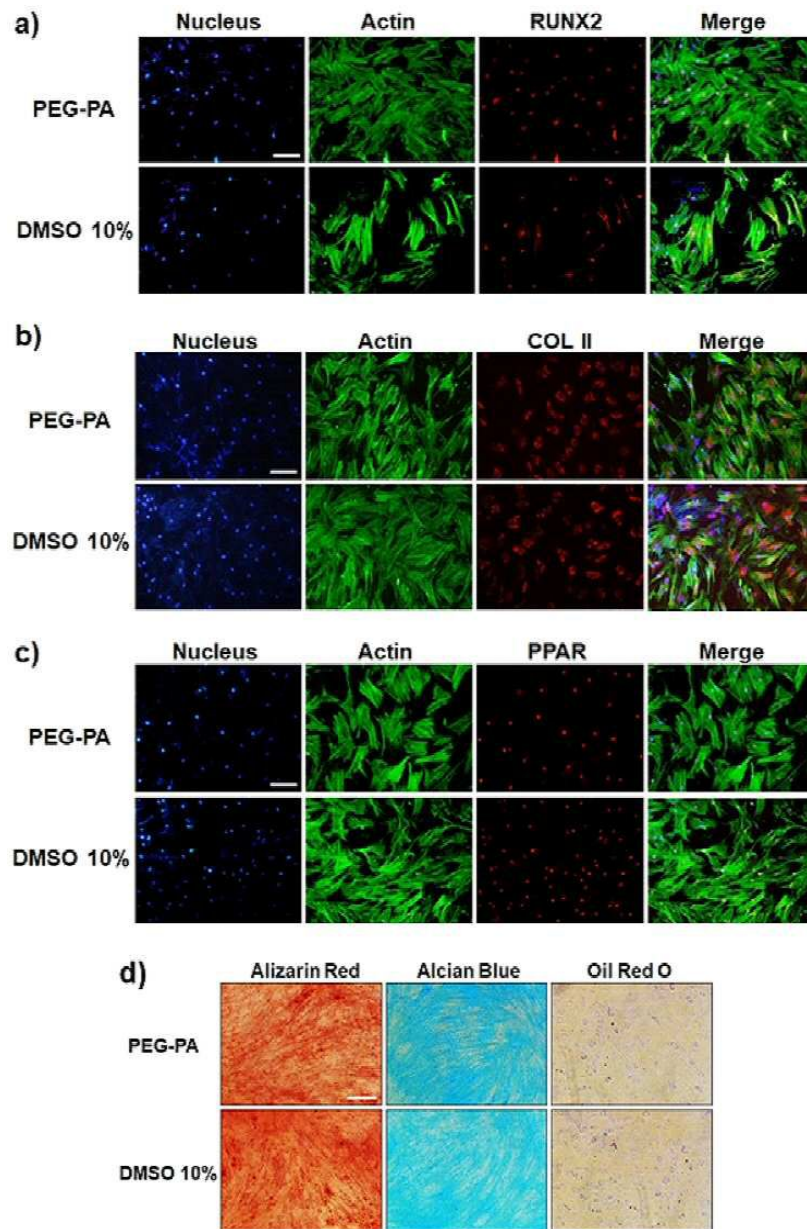
도면3



도면4



도면5



도면6

