



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0107475
(43) 공개일자 2025년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0646 (2025.01)

C12N 2500/50 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0002120

(22) 출원일자 2024년01월05일

심사청구일자 2024년01월05일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

송명관

인천광역시 남구 인하로 100 (용현동, 인하대학교) 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 공과대학 생명공학과

권순조

인천광역시 남구 인하로 100 (용현동, 인하대학교) 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 공과대학 생명공학과

천지영

인천광역시 남구 인하로 100 (용현동, 인하대학교) 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 공과대학 생명공학과

(74) 대리인

특허법인정진

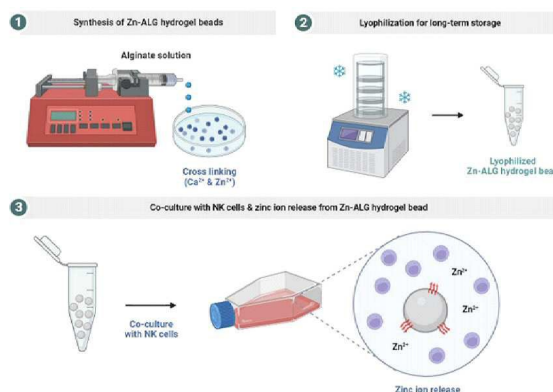
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 아연 가교 알지네이트 하이드로겔 마이크로스피어를 이용한 NK 세포 종양 사멸 활성증진 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 본 발명에 따라 합성된 갈슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 NK 세포와 공배양시 적은 농도로 포함하여도 효과적으로 NK 세포의 활성을 증진시킬 수 있고, 동결건조 후에도 물리적 특징을 유지할 수 있다. 이에 따라, 편리성이 증진된 면역 활성 증진용 조성물, 세포치료제 또는 입양면역치료법으로서 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2537/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711163688
과제번호	2020R1F1A1048494
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	기계적 및 전기적 자극을 이용한 NK세포의 암세포 살상능력 증진 연구
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192829
과제번호	00207801
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	복합장기 및 in vivo 모델 메타플랫폼 기초연구실
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는, NK 세포의 활성화증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 칼슘 및 아연을 가교제로 사용하는 것을 특징으로 하는, NK 세포의 활성화증진용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 칼슘 및 아연은 4:1의 몰 농도비로 가교액에 포함되어 가교제로 사용되는 것을 특징으로 하는, NK 세포의 활성화증진용 조성물.

청구항 4

칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는 NK 세포의 활성화증진용 조성물과 NK 세포 집단을 공배양하는 단계를 포함하는, NK 세포의 활성화 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 공배양은 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 1개/mL 내지 3개/mL으로 포함한 NK 세포의 활성화증진용 조성물을 NK 세포 집단에서 1 내지 5일간 배양하는 것을 특징으로 하는 NK 세포의 활성화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는, NK 세포의 활성화증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 임양면역치료법(Adoptive cell therapy, ACT)으로써 NK세포의 활용은 여러가지 장점이 존재한다. 1)항원제시세포(antigen presenting cell)로부터의 antigen 인지과정 없이 non-self를 효과적으로 제거할 수 있으며, 2) tumor cell의 직접적인 제거 외에 활성화된 NK세포가 분비하는 cytokine을 매개로 적응면역반응(adaptive immune response)을 강화할 수 있는 효과를 기대할 수 있고, 마지막으로 3) NK 세포의 짧은 half-life로 인하여 환자로 이식된 NK세포가 체내에서 비정상적으로 over-expansion될 가능성이 적다. 하지만 적응면역세포(adaptive immune cell)로 알려진 T cell 대비 상대적으로 세포독성(cytotoxicity)이 낮다는 한계가 존재하여

입양면역치료제로써 NK cell을 활용하기 위해선 세포독성을 충분히 끌어 올려야 할 필요성이 있다.

[0004] 아연(Zinc)은 인체에서 철 다음으로 풍부한 금속 이온이며, 인체 전체에 2-4g이 분포 되어있다고 알려져 있다. 이러한 아연은 면역시스템을 통제하는데 중요한 역할을 하며, 세포기질(cytosol) 내의 유리아연의 농도 변화는 NF κ B를 포함한 주요 신호전달 분자의 활성을 통제함으로써 면역 세포에서 신호전달을 제어한다고 알려져 있다. 실제로 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)에 아연이온 50 μ M(생리학적 복용량)을 노출시킬 경우 CD56+ cell의 퍼포린(perforin)이 상향발현 되어 세포독성이 증가한 사례도 보고되었다.

[0005] 따라서 아연 이온을 세포 외 배양 과정에서 배양 배지에 직접 첨가하여 면역세포의 표적세포 사멸활성의 증진을 기대할 수 있으나, 아연이온자체의 세포독성 그리고 아래의 식(1)과 같이 산화아연(ZnO)의 생성으로 인한 침전물 발생 및 HCl 생성으로 인한 배양배지의 pH감소의 문제로 인해 실질적인 적용에 어려움이 있다.

[0006] 식(1): $\text{ZnCl}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) \rightarrow \text{ZnO}(\text{s}) + 2\text{HCl}(\text{aq})$

[0007] 즉, 면역세포의 표적세포 살상능력 증진을 위해 아연을 적용하기 위해선 1) 세포독성을 최소한으로 나타내며 2) ZnO의 침전물을 방지하며, 3) 세포 배양배지의 pH를 감소시키지 않는 새로운 아연 이온의 전달 방법이 필요하다.

[0008] 알지네이트(Alginate, ALG)는 갈조류 유래 음이온성 다당류로써, 2가 양이온을 통해 가교결합(cross-linked bond)을 형성함으로써 겔화가 이루어진다고 알려져 있다. 이러한 알지네이트 하이드로겔은 Na^+ 의 존재 하에 시간이 지남에 따라 가교결합을 이루고 있던 2가 양이온이 Na^+ 로 치환되며, 기존의 2가 양이온이 바깥으로 유출됨과 동시에 알지네이트 하이드로겔은 약해진 가교결합으로 인해 점차 치환되는 특징을 가진다. 이와 같은 자연 분해 특성을 이용하여 약물 전환 시스템에서는 타겟 약물을 알지네이트 하이드로겔에 캡슐화하여 지속적으로 방출시키는 전달체로써 주목하고 있다. 일반적으로 알지네이트의 가교제로써 Ca^{2+} 이 사용되나, Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 등 다른 2가 양이온 역시 ALG 사이에서 알지네이트의 가교결합을 이룰 수 있다. 즉, 기존 Ca^{2+} 와 더불어 Zn^{2+} 가교제로써 사용이 가능하다.

[0009] 이에 본 발명자들은 알지네이트 하이드로겔의 가교제로써 기존의 Ca^{2+} 과 더불어 Zn^{2+} 를 함께 사용하여 Zn-ALG hydrogel bead (Zn-ALG)를 합성하고, 합성된 Zn-ALG를 NK cell과 공배양하여 배양 과정 중에 방출되는 Zn^{2+} 을 통해 NK 세포의 표적세포 사멸 활성화를 증진시키는 것을 목표로 연구하던 중, NK세포의 활성화 효과를 확인하여 본 발명에 이르게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2288996호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는, NK 세포의 활성증진용 조성물, 이를 포함하는 배양용 조성물 및 NK 세포의 활성화 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는, NK 세포의 활성증진용 조성물

이 제공된다.

- [0016] 본 발명에서 상기 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 칼슘 및 아연을 가교제로 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 칼슘 및 아연은 4:1의 몰 농도비로 가교액에 포함되어 가교제로 사용되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는 NK 세포의 활성화증진용 조성물과 NK 세포 집단을 공배양하는 단계를 포함하는, NK 세포의 활성화 방법이 제공된다.
- [0019] 본 발명에서 상기 공배양은 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 1개/mL 내지 3개/mL 로 포함한 NK 세포의 활성화증진용 조성물을 NK 세포 집단에서 1 내지 5일간 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 NK 세포와 공배양시 적은 농도로 포함하여도 효과적으로 NK 세포의 활성을 증진시킬 수 있고, 동결건조 후에도 공배양 후 약 24시간이 지나면 본래의 물리적 특성을 유지하므로 장기보관에도 용이하다.
- [0022] 또한, NK 세포와 공배양시 자연살해세포의 자연살해능과 세포 표면의 억제/활성수용체 발현 변화 등과 같은 면역 활성 효과를 가짐으로써 이를 유효성분으로 포함하여 제조된 조성물은 다양한 분야에서 면역증강 및 항암활성의 증진을 위한 면역치료제, 세포치료제 또는 입양면역치료법으로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 실시예 1에 관한 것으로, 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔 합성방법의 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 2 및 3은 실험예 1에 관한 것으로, 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔의 동결건조 후 물리적 특성의 변화를 나타낸 도이다.
- 도 4 내지 6은 실험예 2에 관한 것으로, 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔의 물리적 특성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7 및 8은 실험예 3에 관한 것으로, 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔이 세포에 미치는 독성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 9 및 10은 실험예 4에 관한 것으로, 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔과 공배양된 NK 세포의 세포살해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 보다 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0026] 그러나, 하기 실시예는 예시적인 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니며, 달리 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고 있다.
- [0027] 또한, 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는, NK 세포의 활성화증진용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "하이드로겔"은, 유기 중합체(천연 또는 합성)가 공유, 이온 또는 수소 결합을 통해서 가교되어 물 분자를 포획하여 겔을 형성하는 3차원 개방 격자 구조를 생성할 때 형성되는 물질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 하이드로겔은 생체적합성 하이드로겔일 수 있다. 또한, 용어 "생체적합성 하이드로겔"

은 살아있는 세포에 독성이 없고, 생존을 유지하기 위해서 산소 및 영양소가 포획된 세포에 충분히 확산되는 것을 허용하는 겔을 형성하는 중합체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 하이드로겔 중합체는 60 내지 90%의 유체, 예컨대, 물 및 10 내지 30%의 중합체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 하이드로겔의 물 함량은 약 70 내지 80%이다. 하이드로겔은 친수성 생체중합체 또는 합성 중합체를 가교시킴으로써 제조될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 하이드로겔은 가교제를 포함할 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "가교제"는 적절한 염기 단량체와 반응하는 경우 3차원 네트워크를 형성할 수 있는 분자를 지칭한다. 1종 이상의 가교제를 포함할 수 있는 하이드로겔 중합체의 예는 하이알루로난, 키토산, 한천, 해파린, 셀레이트, 셀룰로스, 알지네이트(알지네이트 셀레이트 포함), 콜라겐, 텍스트란(텍스트란 셀레이트 포함), 펙틴, 카라기난, 폴리라이신, 젤라틴(젤라틴 타입 A 포함), 아가로스, (메트)아크릴레이트-올리고락타이드-PEO-올리고락타이드-(메트)아크릴레이트, PEO-PEO 공중합체(Pluronic), 폴리(포스파젠), 폴리(메타크릴레이트), 폴리(N-바이닐피롤리돈), PL(G)A-PEOPL(G)A 공중합체, 폴리(에틸렌 이민), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-티올, PEG-아크릴레이트, 아크릴아마이드, N,N'-비스(아크릴로일)시스타민, PEG, 폴리프로필렌 옥사이드(PPG), 폴리아크릴산, 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA), 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAAm), 폴리(락트산)(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리(바이닐설폰산)(PVSA), 폴리(L-아스파르트산), 폴리(L-글루탐산), 비스아크릴아마이드, 다이아크릴레이트, 다이알릴아민, 트라이알릴아민, 다이바이닐 설폰, 다이에틸렌글리콜 다이알릴 에터, 에틸렌글리콜 다이아크릴레이트, 폴리메틸렌글리콜 다이아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트, 트라이메틸로프로판(trimethylolpropane) 트라이메타크릴레이트, 에톡실화 트라이메틸올 트라이아크릴레이트 또는 에톡실화 펜타에리트리톨 테트라아크릴레이트 또는 이들의 조합물을 포함 하지만 이들로 제한되지 않는다. 따라서, 예를 들어, 조합물은 중합체 및 가교제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-티올/PEG-아크릴레이트, 아크릴아마이드/N,N'-비스(아크릴로일)시스타민(BACy) 또는 PEG/폴리프로필렌 옥사이드(PPG)를 포함할 수 있다.

[0031] 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 가교제는 알지네이트와의 가교결합을 위한 것으로, 상기 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 칼슘 및 아연을 가교제로 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 보다 구체적으로, 상기 칼슘 및 아연은 4:1의 몰 농도비로 가교액에 포함되어 가교제로 사용될 수 있다.

[0033] 예를 들어, 상기 칼슘 및 아연의 비율이 4:1을 벗어나는 경우, 물리적 특징을 유지하지 못하여 생분해가 일어나거나 세포 매개세포독성의 효과가 감소되거나 세포자체에 독성을 발생시켜 세포생존율이 감소되는 문제점이 발생할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명에 따른 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 상기 칼슘 및 아연이 가교제로서 우수하게 작용됨에 따라, 동결건조 후 배양배지에 사용하여도 24 내지 72시간 물리적 특징을 유지할 수 있으므로, 사용의 편리성이 증진되는 효과가 있다.

[0035] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 포함하는 NK 세포의 활성화증진용 조성물과 NK 세포 집단을 공배양하는 단계를 포함하는, NK 세포의 활성화 방법이 제공된다.

[0036] 예를 들어, 배양 배지에서 NK 세포 집단과 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 공배양하는 단계를 통하여 NK 세포의 결과적인 지속성 및/또는 세포 독성과 비교하여 NK 세포의 지속성 및/또는 세포 독성 중 하나 이상을 향상시킬 수 있다.

[0037] 이에 따라, 아연이온자체가 유발하는 세포독성 및 산화아연(ZnO)의 생성으로 인한 침전물 발생 및 HCl 생성으로 인한 배양배지의 pH감소의 문제를 예방하면서 아연이온을 안전하게 전달하여 면역세포의 활성화를 증진시킬 수 있다.

[0038] 본 발명에서 상기 공배양은 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 1개/ml 내지 3개/ml로 포함한 NK 세포의 활성화증진용 조성물을 NK 세포 집단에서 1 내지 5일간 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 예를 들어, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 배지 1mL당 3개를 초과한 개수로 포함하여 공배양할 경우 세포에 독성을 유발시킬 수 있다.

[0040] 또한, 배양 배지에서 NK 세포 집단과 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 1 내지 5일의 범위를 벗어난 기간으로 공배양할 경우, 세포매개세포독성의 효과가 배양기간대비 증가하지 않거나 오히려 감소하여 실익이 없는 문제점이 발생할 수 있다.

[0041] 따라서, 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔을 적은 개수로 짧은기간 공배양 하여도 목적하는 면역세포의 활성

화 증진효과가 나타날 수 있음으로, 세포치료제 또는 입양면역치료법으로서 효과적으로 활용될 수 있다.

[0042] 예를 들어, 본 발명에 따른 NK 세포의 활성증진용 조성물을 유효성분으로 포함한 세포치료제로 제조될 수 있고, 통상적으로 사용되는 면역세포치료제로 활용될 수 있으며, 본 발명이 목적하는 효과를 유지하는 측면에서 이에 제한은 없다.

[0043]

[0044] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0046] 실시예

[0047] 실시예 1: 칼슘 및 아연 알지네이트 하이드로겔

[0048] 칼슘 및 아연을 알지네이트와 가교결합하여 하이드로겔을 제조하였으며 이에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0049] 구체적으로, 4%(w/v)알지네이트 용액을 제조하기 위하여 알지네이트(W201502, Sigma-Aldrich)를 37℃ ddH₂O에서 약 6h동안 stirring하여 잘 용해시켜주었다. 다음으로, 용액 내부의 잔해물을 제거하기 위하여 5μm syringe filter(WHA67841350, Cytiva)를 통해 filtration하였다. 알지네이트 하이드로겔(ALG hydrogel)합성을 위해 syringe pump (70-4504, Harvard Apparatus)를 이용하여 20mL/h의 일정한 속도로 알지네이트 용액을 crosslinking solution에 drop하였다.

[0050] 아연-알지네이트 하이드로겔(Zn-ALG hydrogel bead)은 100mM의 염화 칼슘 (calcium chloride)과 25mM의 염화 아연(zinc chloride)(Z0152, Sigma-Aldrich) solution에서 crosslinking으로 수행하였다. 합성된 ALG hydrogel는 충분한 crosslinking을 위하여 24h동안 crosslinking solution에 immerse하였다. 이후 ddH₂O를 이용하여 5차례 wash하였으며, 보관 및 사용의 편의성을 위하여 동결건조(FDU-1200, EYELA)를 수행하였다.

[0051] 또한, 기존에 알려진 방식으로 합성된 칼슘가교 알지네이트 하이드로겔을 비교예 1로 구성하였다.

[0053] 실험예 1. 칼슘 및 아연가교 알지네이트 하이드로겔의 물리적 특성 평가 1

[0054] 아연을 가교제로 알지네이트를 합성하였을 때, 하이드로겔의 모양 유지 및 하이드로겔 내부에 아연이 잘 가교역할을 하고 있는지 평가하여 도 2 및 3에 결과로 나타내었다.

[0055] 구체적으로 실시예 1에 따라 합성된 칼슘 및 아연가교 알지네이트 하이드로겔을 동결건조한 후 동물세포배양배지에 담구었을 때 겔 형태의 변화를 확인하였다.

[0056] 도 2를 참조하면, 동결건조된 하이드로겔을 동물세포배양배지에 담갔을 때, 24h 이 지나면 원래의 동그란 모양으로 돌아오는 것을 확인할 수 있으며, 도3을 참조하면, 72h까지 형태를 잘 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 실험예 2. 합성된 칼슘 및 아연가교 알지네이트 하이드로겔의 물리적 특성 평가 2

[0059] 실시예 1에 따른 칼슘 및 아연가교 알지네이트 물리 화학적 특성을 평가하고자 Swelling ratio 비교, ICP-OES analysis, FT-IR spectrum analysis를 수행하였으며 비교예 1과 비교하여 도 4 내지 6에 결과로 나타내었다.

[0060] 구체적으로, Swelling ratio는 polymer의 수분 흡수로 인한 중량의 변화를 측정하는 것으로, 이를 통하여 polymer의 자연분해속도를 측정할 수 있고, ICP-OES analysis는 ICP-OES 장비를 이용하여 측정하는 것으로 시료의 금속이온을 정밀하게 측정가능하고, FT-IR spectrum analysis은 시료의 흡수 스펙트럼 피크를 측정하는 것으로 스펙트럼에서 여러 피크의 위치 및 높이를 상대적으로 비교함으로써 분석물질의 화학적 결합상태를 이해할 수 있는 평가법이다.

[0061] 도 4를 참조하면, 비교예 1(하늘색)의 경우 72h까지 swelling ratio 가 증가하는 것을 볼 수 있으나, 실시예 1(남색)의 경우 24h 에 최대치를 보이며 이후 점차 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 가교제로 더 포함된 아연이 사용되면서 하이드로겔 자체의 빨라진 자연분해속도로 인해 나타난 현상으로 볼 수 있다.

[0062] 도 5를 참조하면, 실제로 실시예 1이 31660ppm(약 3.16 w/w %)의 아연을 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0063] 도 6을 참조하면, Zn-O 결합이 관찰된다고 알려진 $600\text{--}550\text{cm}^{-1}$ 에서 비교예 1(빨간색)에서 볼 수 없는 peak가 실시예 1(파란색)에서는 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 가교제로 더 포함된 아연이 알지네이트의 가교제로써 역할을 수행하고 있다고 해석할 수 있다.

[0064] 종합적으로, 실시예 1에 따른 하이드로겔 합성방법은 성공적으로 아연을 알지네이트안에서 가교제로 포함시켰음을 확인할 수 있다.

[0066] 실시예 2. 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔 및 NK세포의 공배양

[0067] 실시예 1에 따라 합성된 칼슘 및 아연 가교 알지네이트 하이드로겔을 NK 세포와 공배양을 진행하였다. 구체적으로 1.5 및 10개/mL의 농도로 1 내지 3일간 배양하였으며, 비교예 1을 공배양 진행한 것을 비교예 2로 구성하였다.

[0069] 실험예 3. NK 세포의 생존율비교

[0070] Zn^{2+} 는 인체 전체에 극미량 분포된 금속이온으로써 Ca^{2+} 과 더불어 second messenger ion 역할을 수행하지만, 고농도 아연의 처리는 세포독성을 띤다고 알려져 있다. 따라서 실시예 2가 세포활성에 부정적인 영향은 없는지 평가하기 위하여 NK 세포 활성의 변화를 측정하여 도 7 및 8에 결과로 나타내었다.

[0071] 도 7을 참조하면, 비교예 2의 경우 모든 농도(1.5 및 10 개/mL) 및 배양 기간(D+1, D+2 및 D+3)에서 세포 생존율의 감소 정도가 평균 5% 내외로 미미한 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 도 8을 참조하면, 실시예 2의 경우, 1개/mL에서는 세포 생존율의 감소정도가 배양 3일차까지 20% 미만으로 감소하였으며, 배양기간에 의존적으로 세포독성이 나타나지 않지만, 5 및 10 개/mL에서는 배양 1 일차부터 20% 이상의 큰 세포독성을 나타냈으며 3 일차에는 각각 63% 및 38%로 배양기간에 의존적으로 그 정도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 실험예 4. NK 세포의 표적세포살상능력 증진 확인

[0075] NK세포의 NK세포매개 세포독성(NK cell-mediated cytotoxicity)이 증진되는지 평가하기 위하여, 실시예 2 및 비교예 2에 따라 공배양 된 NK cell의 암세포살상능력을 LDH assay를 통해 정량하여 도 9 및 10에 결과로 나타내었다.

[0076] 도 9를 참조하면, 비교예 2의 경우 모든 농도(1.5, 및 10 개/mL)의 1일차 배양에서는 큰 차이가 나타나지 않았으나, 2일차에서는 각각 9%, 18% 및 11%로 NK세포매개 세포독성이 감소하는 것을 확인할 수 있었고 3일차에서는 다시 회복된 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 도 10을 참조하면, 실시예 2의 경우 1 개/mL 농도에서 배양기간에 따라 각각 18%, 15% 및 23%로 증가하는 것이 확인할 수 있었으며, 3일차에서는 통계적으로 유의미하였다. 반면, 5 및 10 개/mL농도의 경우 1일차에서는 약 11% 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 이는 통계적으로 유의미하지 않았으며, 2일차 및 3일차에서는 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

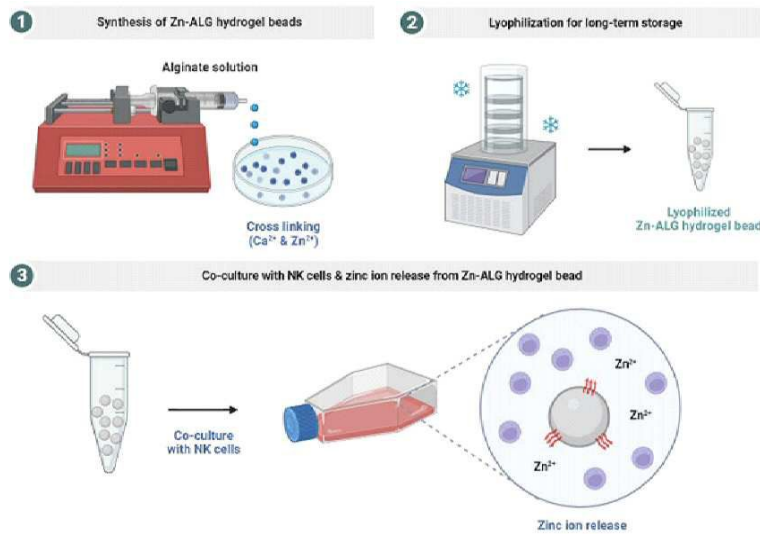
[0078] 따라서 상기 실험예 3 및 4를 참조하면, 1 개/mL 농도로 1 내지 3일간 배양할 경우 세포독성이 최소화되면서 NK 세포매개 표적세포살상능력을 증진시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0080] 종합적으로, 본 발명에 따라 합성된 칼슘 및 아연-알지네이트 하이드로겔은 동결건조 후에도 안정적인 물리적 특성을 유지할 수 있고, NK 세포의 활성증진용 조성물로 사용할 경우 NK 세포의 활성화를 유도하여 면역 활성 증진용 조성물로서 활용이 가능하다.

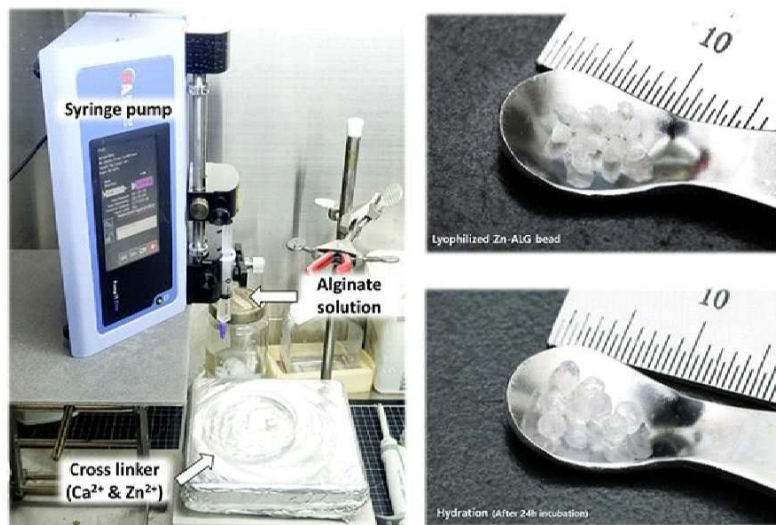
[0081] 또한, 기존의 칼슘-알지네이트 하이드로겔과 대비하여 적은 농도로도 효과적인 NK세포의 활성화 효과를 나타냄으로 보관 및 편리성이 증진된 입양면역치료법 또는 세포치료제로 활용할 수 있다.

도면

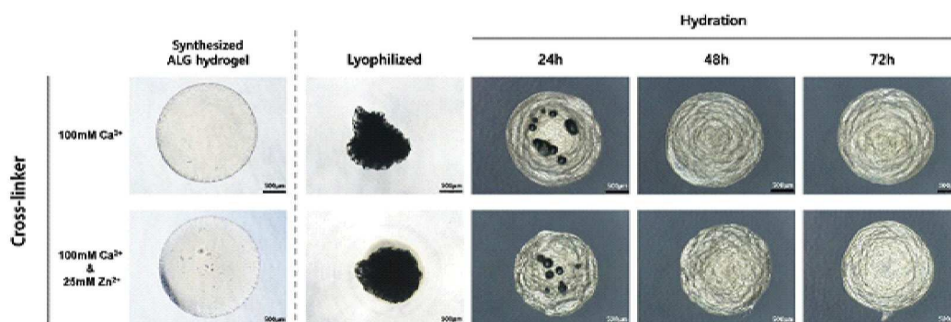
도면1



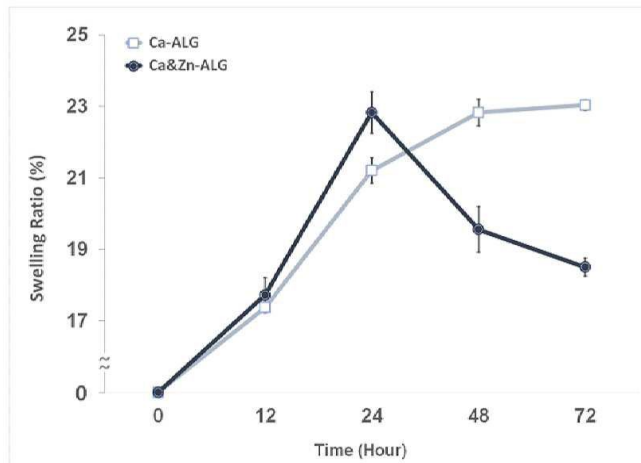
도면2



도면3



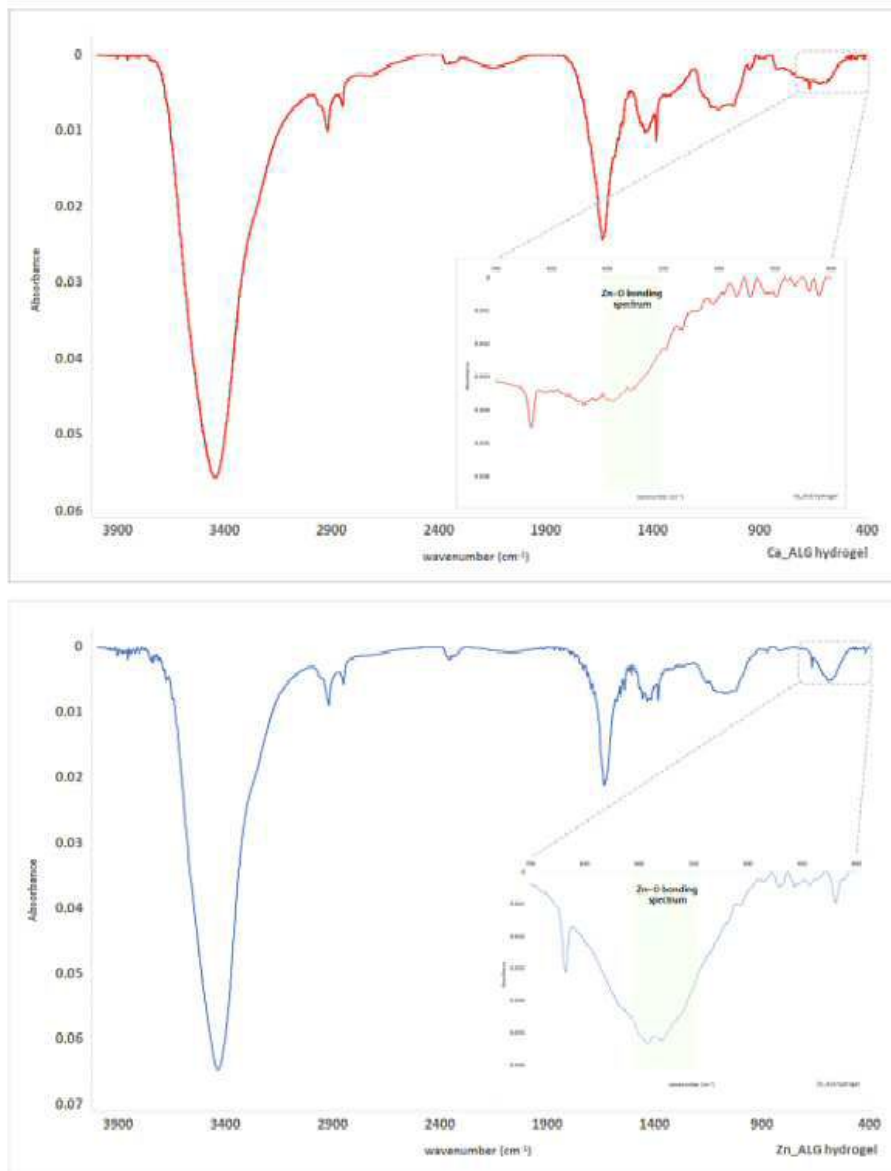
도면4



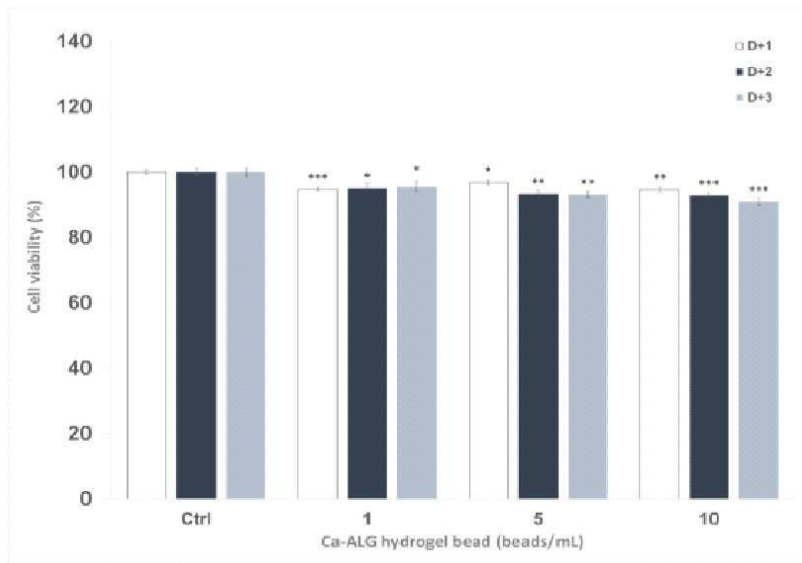
도면5

Sample	Zn ²⁺ concentration	Std. Dev.	RSD
Zn-ALG hydrogel	31660 ppm	276.52	0.87%

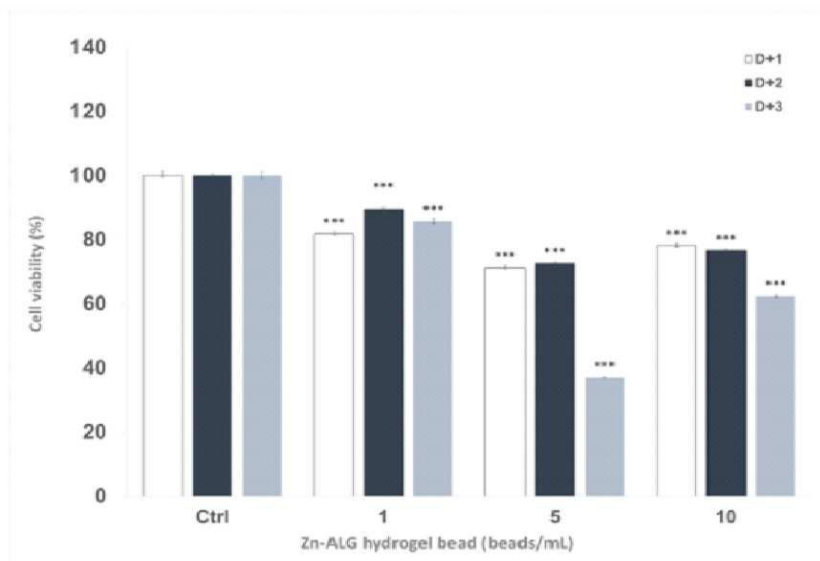
도면6



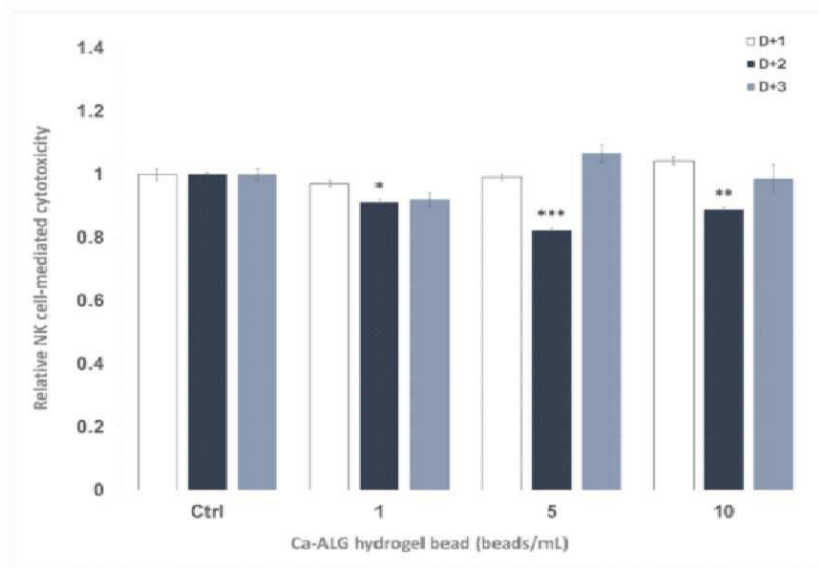
도면7



도면8



도면9



도면10

