



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045458
(43) 공개일자 2017년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/04 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01) *A61L 27/36* (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01) *C07K 14/78* (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01) *C12N 11/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 11/04 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0144988

(22) 출원일자 2015년10월16일

심사청구일자 2015년10월16일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

정원교

부산광역시 남구 분포로 111 128동 2101호 (용호
동, LG메트로시티1차)

고석천

제주특별자치도 제주시 선덕로3길 12 (연동)

오건우

부산광역시 남구 용소로64번길 64-8 1층 103호 (
대연동, 그린빌원룸)

(74) 대리인

위병갑

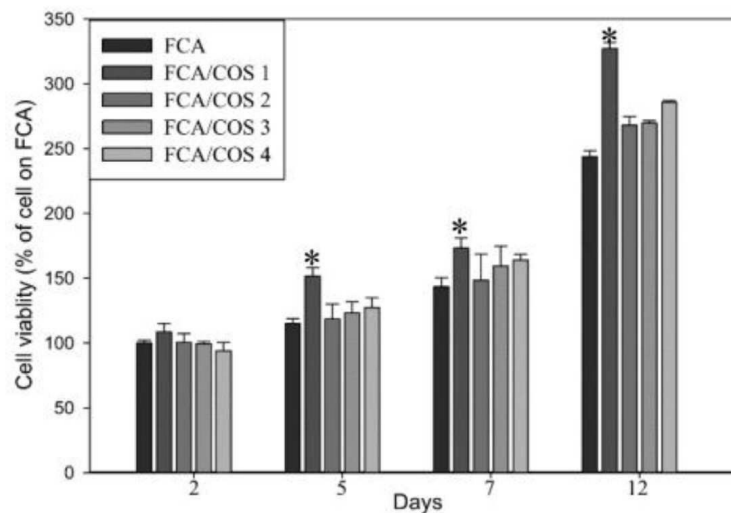
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 키토올리고당을 함유하는 피부조직재생용 세포담체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 키토올리고당을 이용한 피부조직재생용 세포담체 및 그 제조방법에 관한 것으로 본 발명 세포담체는 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)과 알지네이트(Alginate, A)와 1-3 kDa의 키토올리고당(Chitooligosaccharide, COS1)으로 구성되어 피부섬유아세포의 생체적합성이 우수하며 이를 피부조직재생용 세포담체로 활용할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61L 27/24 (2013.01)
A61L 27/3604 (2013.01)
A61L 27/60 (2013.01)
C07K 14/78 (2013.01)
C08B 37/0084 (2013.01)
C12N 11/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20120320
부처명	한국해양과학기술진흥원
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발
기 여 율	4/10
주관기관	부경대학교 산학협력단
연구기간	2014.08.24 ~ 2015.08.23이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20150220
부처명	한국해양과학기술진흥원
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양수산생명공학기술개발사업
연구과제명	해양융복합 바이오닉스 소재 상용화 기술 개발
기 여 율	6/10
주관기관	부경대학교 산학협력단
연구기간	2015.04.21 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 어류 유래 콜라겐과 알지네이트를 중량(w/w)비가 70:30가 되도록 0.02 M acetic acid에 용해시켜 콜라겐-알지네이트(FCA) 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 얻은 FCA 용액을 동결건조하여 콜라겐-알지네이트(FCA) 지지체를 제조하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 얻은 FCA 지지체를 가교제 용액에 3~5시간 침지시켜 가교시키는 단계; (d) 상기 (c)단계의 FCA 지지체가 가교제 용액에 침지된 상태에서 1~3 kDa의 키토올리고당(COS1)을 가교제 용액 전체 중량대비 0.5~5%(w/w)첨가하고 20~30시간 가교시키는 단계; (e) 상기 (d)단계에서 얻은 FCA/COS1 세포담체를 48시간 동안 증류수에 침지시켜 세척시킨 후 동결건조하는 단계로 이루어진 것을 특징으로 하는 피부조직재생용 세포담체 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 (c)단계의 가교제는 N,N'-카르보닐디이미다졸(CDI), N,N'-디시클로헥실카르보닐이미드(DCC), N-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디히드록시놀린(EEDQ), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진)-4-메틸모르폴린(DMT-MM), 2-벤조트리아졸-1,1,3,3-테트라메틸우로늄사불화붕산염(TBTU), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진(HODhbt), 벤조트리아졸-1-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄옥불화인산염(PyBOP), 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(디메틸아미노)포스포늄헥사플루오로포스페이트(BOP), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), N-하이드록시숙신이미드(NHS)로 구성된 군에서 선택되는 어느하나 이상인 것을 특징으로 하는 세포담체 제조방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항 중 어느 하나의 방법에 따라 제조된 피부조직재생용 세포담체

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키토올리고당을 함유하는 피부조직재생용 세포담체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)과 알지네이트(Alginate, A)와 1~3 kDa의 키토올리고당(Chitooligosaccharid, COS1)으로 구성되어 생체적합성이 뛰어난 피부조직재생용 세포담체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과학의 발전과 그에 따른 인간수명의 증가는 다양한 질병, 고령화 및 각종 사고로 인한 장기 손상의 등의 문제를 증가시키게 되었으며 그에따라 조직을 재생시키는 조직공학에 대한 관심은 나날이 뜨거워지고 있다.

[0003] 세포담체(Scaffold)는 조직 세포의 체외 배양과 체내 이식이 가능하도록 만들어진 물리적 지지체 및 점착 기질을 가르키며 이러한 세포담체는 인체조직 재생을 위한 세포 이식에 사용되고 있다. 피부조직재생 목적으로 사용하는 상피세포의 경우 기질간의 접촉부분이 있어야만 세포의 점착 및 이에 수반되는 이동과 증식이 가능하므로 세포담체에 배양 후에 사용하는 것이 필수적이다.

[0004] 이러한 피부조직재생용 세포담체는 직접 체내로 삽입되기 때문에 현재 생체분해가 가능한 돼지나 소 등의 육상 동물로부터 유래되는 콜라겐 등의 물질을 사용하고 있지만, 광우병이나 구제역 같은 안전성 문제로 인하여 육상 동물 유래 콜라겐의 사용을 기피하고 있으며, 보다 안전한 해양생물로부터 유래된 천연물질들에 대한 관심이 높아지고 있다.

- [0005] 해양은 넓이가 지구 표면적의 70% 이상을 차지하고 있으며 지구 전체 동물의 80%에 달하는 수십만 종이 서식하는 생물 원료의 보고라고 알려져 있다. 최근 해양에서 얻어지는 해양 천연물은 다양한 미네랄과 생리활성 물질을 다량함유하고 있을 뿐만 아니라 다른 동물 천연물에 비해 생체적합성이 뛰어나 입증되면서 선진국에서는 해양생물을 생리활성 신물질 및 조직공학의 새로운 재료로써 주목하고 새로운 천연물의 탐색과 함께 새로운 부가가치의 창출을 위하여 해양천연물을 생명공학 및 생물유기화학적 기법에 접목하여 생물소재 개발에 힘쓰고 있다.
- [0006] 특히 해양천연물 중 키틴(Chitin) 및 키토산(Chitosan)은 갑각류 껍질, 곤충 표피 및 일부 미생물의 세포벽에 존재하는 천연 양이온성 다당류이다. 키토산은 키틴의 알칼리성 탈아세틸화에 의해 생산된 것으로, $\beta(1\rightarrow4)$ -결합 N-아세틸-D-글루코사민 유닛으로 구성되어 있으며 다양한 생물학적 활성을 갖는다. 키토올리고당(Chitooligosaccharide)은 키토산 유도체로 가수분해된다. 키토산과 달리, 키토올리고당은 D-글루코사민 유닛에서 더 짧은 사슬 길이 및 유리 아미노기를 갖는다. 이러한 이유로, 키토올리고당은 천연 수용액에서 가용성이므로 생체외 및 생체내 시스템에 쉽게 적용시킬 수 있으며 이들의 분자량(kDa) 범위에 따라 항-종양, 항-진균, 항균, 항-바이러스 및 ROS 소거능을 갖는 것으로 알려져 있으나 아직 분자량(kDa) 범위에 따라 키토올리고당을 피부조직재생용 세포담체에 이용한 방법에 대하여는 공지된 바 없다.
- [0007] 본 발명의 선행기술로 아텔로콜라겐을 이용한 체도세포 이식용 담체의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 인공 췌장이 국내 등록특허 제 10-1327630호에 공지되어 있으나 이는 양이온화 시킨 돼지 유래 아텔로콜라겐과 알지네이트를 구성성분으로 사용하여 체도세포의 생존율과 인슐린 분비량을 높인 체도세포 이식용 담체에 관한 것이다. 또 유전자 치료제 전달을 위한 키토산 나노입자 및 그 제조방법이 국내 공개특허 제 10-2009-0097582호에 공지되어 있으나 이는 키토산을 알지네이트에 가교시켜 생체적합성과 안정성을 개선시킨 유전자 전달담체에 관한 것이다. 또 단일공정에 의한 이중층 스캐폴드의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 얻어진 이중층 스캐폴드를 이용한 조직 재생방법이 국내 등록특허 제 10-1333381호에 공지되어 있으나 이는 젤라틴과 폴리비닐알코올 등의 생체적합성 재료를 EDC로 가교시켜 스캐폴드를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0008] 따라서 상기 특허 문헌 어디에도 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC) 및 알지네이트(Alginate, A) 지지체 분자량(kD)이 서로 다른 키토올리고당(Chitooligosaccharid, COS)을 가교시켜 섬유아세포의 생체적합성을 개선시킨 피부조직재생용 세포담체에 대해서는 공지된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 어류 유래 콜라겐 및 알지네이트 지지체(FCA)에 분자량이 서로 다른 저분자 키토올리고당(COS)을 가교결합시켜 생체적합성이 뛰어난 세포담체와 그 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 상기목적은 (a) 어류 유래 콜라겐(FC)과 알지네이트(A)를 중량(w/w)비가 70:30가 되도록 0.02 M acetic acid에 용해시켜 콜라겐-알지네이트(FCA) 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 얻은 FCA 용액을 동결건조하여 콜라겐-알지네이트(FCA) 지지체를 제조하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 얻은 FCA 지지체를 가교제 용액에 3~5시간 침지시켜 가교시키는 단계; (d) 상기 (c)단계의 FCA 지지체가 가교제 용액에 침지된 상태에서 1~3 kDa의 키토올리고당(COS1)을 가교제 용액 전체 중량대비 0.5~5%(w/w)첨가하여 FCA 지지체와 COS1를 20~30시간 가교시키는 단계; (e) 상기 (d)단계에서 얻은 FCA/COS1 세포담체를 48시간 동안 증류수에 침지시켜 세척시킨 후 동결건조하여 본 발명 피부조직재생용 세포담체(FCA/COS1)를 제조하는 단계로 이루어지고, 상기 본 발명 피부조직재생용 세포담체(FCA/COS1)의 물리화학적 특성을 비교평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명 세포담체는 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)과 알지네이트(Alginate, A)와 1~3 kDa의 저분자 키토올리고당(Chitooligosaccharid, COS1)으로 구성되어 피부섬유아세포의 생체적합성이 우수하며 이를 피부조직재

생용 세포담체로 활용할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에 따라 제조된 세포담체의 분자결합을 도식화한 그림이다.
- 도 2는 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 표면을 주사전자현미경으로 촬영한 사진이다.
- 도 3은 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 평균 기공크기를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 평균 공극률을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 평균 인장강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 표면을 FTIR을 이용해 표면분석한 그래프이다.
- 도 7은 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 생체분해능을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담에서 배양된 NHDF-neo cell의 MTT assay 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담에서 배양된 NHDF-neo cell의 세포 생존율을 형광분석을 통해 확인한 사진이다.
- 도 10은 본 발명에 따라 제조된 제조예 1 및 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담에서 배양된 NHDF-neo cell의 세포 부착능을 주사전자현미경을 통해 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명 피부조직재생용 세포담체는 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)과 알지네이트(Alginate, A)와 1~3 kDa 키토올리고당(Chitooligosaccharid, COS1)으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명에 따르면 어류 유래 콜라겐 및 알지네이트 지지체에 분자량(kDa)이 서로다른 키토올리고당을 가교시켜 실시예 1 및 비교예 2 내지 비교예 4 세포담체를 제작하였으며 상세하게는 키토올리고당의 분자량이 1~3 kDa일 때 FCA-COS1(실시예1), 3~5 kDa일 때 FCA-COS2(비교예2), 5~10 kDa일 때 FCA-COS3(비교예3), 10 kDa 이상일 때 FCA-COS4(비교예4)로 정하여 이하 표기한다.
- [0015] 본 발명 피부조직재생용 세포담체(FCA-COS1)는
- [0016] (a) 어류 유래 콜라겐(FC)과 알지네이트(A)를 중량(w/w)비가 70:30가 되도록 용매에 용해시켜 콜라겐-알지네이트(FCA) 용액을 제조하는 단계;
- [0017] (b) 상기 (a)단계에서 얻은 FCA 용액을 동결건조하여 콜라겐-알지네이트(FCA) 지지체를 제조하는 단계;
- [0018] (c) 상기 (b)단계에서 얻은 FCA 지지체를 가교제 용액에 3~5시간 침지시켜 가교시키는 단계;
- [0019] (d) 상기 (c)단계의 FCA 지지체가 가교제 용액에 침지된 상태에서 1~3 kDa의 키토올리고당(COS1)을 가교제 용액 전체 중량대비 0.5~5%(w/w)첨가하여 FCA 지지체와 COS를 20~30시간 가교시키는 단계;
- [0020] (e) 상기 (d)단계에서 얻은 FCA/COS1 세포담체를 48시간 동안 증류수에 침지시켜 세척시킨 후 동결건조하는 단계를 통하여 제조된다.
- [0021] 본 발명에 따르면 상기 (a)단계에서 용매는 증류수, 0.02 M acetic acid 중 어느 하나 이상을 사용하고 혼합방법

은 homogenizer 및 magnetic stirrer를 이용하여 혼합하여 어류 유래 콜라겐과 알지네이트가 용매에 완전히 용해될 수 있도록 하는 것이 가장 바람직하나, 본 발명의 목적을 벗어나지 않는 한 용매에 혼합방법은 이로 제한되는 것은 아니다.

[0022] 또한 상기 (a)단계에서 제조한 FCA 용액을 (b)단계에서 바로 사용가능하나 가장 바람직하기로는 상기 FCA 용액의 버블을 제거하기 위해 3000rpm에서 10~15분간 원심분리 한 후 (b)단계에서 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 상기 (c)단계의 가교제는 도 1(a),(b)과 같이 FCA 지지체의 카르복실기(COOH)를 활성 에스테르화(Semi-stable NHS-ester)시키는 축합제를 해당 용매에 녹여 가교제 용액으로 사용하는 것을 특징으로 하고 상기 가교제로는 N,N'-카르보닐디이미다졸(CDI), N,N'-디시클로헥실카르보닐이미드(DCC), N-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디히드로록시놀린(EEDQ), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진)-4-메틸모르폴륨(DMT-MM), 2-벤조트리아졸-1,1,3,3-테트라메틸우로늄사불화붕산염(TBTU), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진(HODhbt), 벤조트리아졸-1-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄옥살화인산염(PyBOP), 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(디메틸아미노)포스포늄헥사플루오로포스페이트(BOP) 또는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC) 또는 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 등을 단독 또는 적절하게 조합하여 사용가능하나, 본 발명에 따르면 EDC 또는 NHS를 단독 또는 적절하게 조합하여 MES buffer에서 용해시킨 가교제 용액을 사용하는것이 가장 바람직하다.

[0024] 상기 (d)단계의 키토올리고당(COS1)은 도 1(c)와 같이 상기 (c)단계에서 FCA 지지체에 생성된 Semi-stable NHS-ester과 가교되어 FCA-COS1 지지체를 형성한다.

[0025] 또한 상기 (d)단계의 키토올리고당의 첨가량은 가교제 용액 대비 0.5~5%(w/w)이며 가장 바람직하기로는 1%(w/w)이다.

[0026] 본 발명 피부조직재생용 세포담체는 섬유아세포, 피부세포, 혈관 형성 내피세포 및 줄기세포 중 선택된 1종 이상을 배양하여 피부조직재생 목적으로 피부에 삽입할수 있고 또한 인공피부 제조목적으로 체외에서 상기 세포들을 증식시켜 인공피부를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0027] 상기 피부조직재생용이란 노화된 피부, 화상, 창상, 궤양 또는 좌상 피부에 피부조직의 재생을 증진시킬 목적이거나 피부 미용용 또는 성형용 목적을 일컫는다.

[0028] 또한 본 발명 피부조직재생용 세포담체는 다양한 생리활성물질이 부가될 수 있다. 생리활성물질은 특별한 제한은 없으며, 상기 세포담체에서 세포의 부착 및 증식에 부정적인 영향을 미치지 않는 것이면 가능하다. 구체적인 예로는 항생제, 항바이러스제, 항균제, 핵산, 펩타이드 및 단백질 중 선택된 1종 이상을 부가한 세포담체를 제공한다. 항생제, 항바이러스제, 항균제 등은 구조체 또는 재생피부조직의 감염을 막기 위한 것이고, 단백질로는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질, 수용체, 세포표면항원 및 수용체 길항물질로 이루어진 그룹 중 선택된 것임을 특징으로 한다.

[0029] 본 명세서에 달리 정의하지 않는 한 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 달리 언급되지 않는 한 "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 다른 형태 예를 들어 "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"는 제한적이지 않다.

[0030] 이하, 본 발명의 구체적인 내용을 실시예 및 제조예를 들어 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 발명이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 사용한 공시재료는 다음과 같다. 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)은 남해의 넙치(Paralichthys olivaceus)의 피부에서 Singh의 방법(Singh et al., Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus). Food Chemistry, 124(1), 97-105.)으로 추출하였다. 알지네이트와(Alginate, A)와 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)와 N-하이드록시숙신이미드(NHS)와 2-morpholinoethanesulfonic acid(MES)는 시그마알드리치(Sigma-Aldrich Co.)에서 구매하였고 1-3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa, < 10 kDa의 키토올리고당(COS)은 키토라이프(Kitto Life Co.)에서 구매하였다.

- [0032] **실시예1. 본 발명 1~3 kDa 키토올리고당을 이용한 피부조직재생용 세포담체 제조(FCA-COS1)**
- [0033] 본 발명 피부조직 재생용 세포담체는 콜라겐-알지네이트(FCA)지지체에 1~3 kDa 키토올리고당(COS1)을 가교시켜 하기의 제조방법으로 같이 제조하였다.
- [0034] 1단계 : 콜라겐-알지네이트(FCA) 지지체
- [0035] (a) 어류 유래 콜라겐을 0.8%(w/v)농도로 0.02 M acetic acid에 넣고 4℃에서 용해하고 2 M NaOH로 중화시켜 0.8%(w/v) 콜라겐 용액을 제조하였다.
- [0036] (b) 이와 별도로 알지네이트를 3%(w/v)농도로 증류수에 넣고 60℃에서 용해하여 3%(w/v) 알지네이트 용액을 제조하였다.
- [0037] (c) 상기 (a)단계와 (b)단계에서 제조한 0.8%(w/v) 콜라겐 용액과 3%(w/v) 알지네이트 용액을 어류 유래 콜라겐 (FC)과 알지네이트(A)의 중량(w/w)비가 70:30가 되도록 혼합하고 homogenizer로 5분간, magnetic stirrer로 24 시간 교반하여 콜라겐-알지네이트(FCA) 용액을 제조하였다.
- [0038] (d) 그 다음 상기 FCA 용액의 버블을 제거하기 위해 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 이를 세포배양플레이트에 분주하고 동결건조시켜 FCA 지지체를 제조하였다.
- [0039] (e) 상기에서 제조한 FCA 지지체를 먼저 50 mM MES 버퍼에서 30분간 완충시킨 후 그 다음 EDC/NHS 용액(50 mM MES, 33 mM EDC, 6 mM NHS)에 4시간 침지시켜 가교반응시켰다.
- [0040] 2단계 : 콜라겐-알지네이트-키토올리고당 세포담체(FCA/COS1)
- [0041] (f) 상기 1-(e)단계의 FCA 지지체가 침지된 EDC/NHS 용액에 1~3 kDa의 키토올리고당(COS)을 1%(w/v) 농도로 첨가하고 20시간 가교시켜 FCA/COS1 지지체 제조하였다.
- [0042] (g) 상기에서 제조한 FCA/COS1 지지체를 증류수에 48시간 침지시켜 불순물을 세척한 후 동결건조하여 본 발명 FCA/COS1 세포담체를 제조하였다.
- [0043] **비교예1. 알지네이트-콜라겐 피부조직재생용 세포담체 제조(FCA)**
- [0044] 상기 실시예 1의 1단계에서 제조한 콜라겐-알지네이트(FCA) 지지체를 증류수에 48시간 침지시켜 불순물을 세척한 후 동결건조하여 세포담체를 제조하였다.
- [0045] **비교예2. 3~5 kDa 키토올리고당을 이용한 피부조직재생용 세포담체 제조(FCA-COS2)**
- [0046] 상기 실시예 1의 2-(f)단계에서 1~3 kDa의 키토올리고당 대신 3~5 kDa의 키토올리고당을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 세포담체를 제조하였다.
- [0047] **비교예3. 5~10 kDa 키토올리고당을 이용한 피부조직재생용 세포담체 제조(FCA-COS3)**
- [0048] 상기 실시예 1의 2-(f)단계에서 1~3 kDa의 키토올리고당 대신 5~10 kDa의 키토올리고당을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 세포담체를 제조하였다.
- [0049] **비교예4. 10 kDa 이상 키토올리고당을 이용한 피부조직재생용 세포담체 제조(FCA-COS3)**
- [0050] 상기 실시예 1의 2-(f)단계에서 1~3 kDa의 키토올리고당 대신 10 kDa 이상의 키토올리고당을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 세포담체를 제조하였다.

[0051] 실험예1. 본 발명 세포담체의 형태 및 물리화학적 분석

[0052] 본 발명 세포담체의 형태 및 물리화학적 분석을 위해 SEM 관찰, 공극률측정, 인장강도측정, FTIR 분석을 실시하였다.

[0053] 형태분석

[0054] 상기 실시예1 따라 제조된 본 발명 세포담체와 비교예 1 내지 비교예 4의 세포담체의 각 표면을 주사전자현미경(SEM, Hithachi S-2700, 5.0kV)을 이용하여 저배율(X 200)과 고배율(X 500)로 촬영하고 Image analysis software(ImageJ Wayne, Rsband)로 상기 세포담체들의 기공 크기(pore size)를 측정하였다.

[0055] 도 2와 같이, 주사현미경으로 촬영한 세포담체 형태사진을 육안으로 비교하였을때 키토올리고당이 가교된 실시예 1 및 비교예 2~4의 FCA-COS 세포담체가 비교예 1 FCA 세포담체에 비해 기공의 크기가 작게 형성되었고 형태의 변화는 관찰되지 않았다.

[0056] 또한 도 3과 같이, Image analysis software으로 측정한 각 세포담체들의 기공 크기는 실시예 1 및 비교예 2~4의 FCA-COS 세포담체가 $168 \pm 22 \mu\text{m} \sim 196 \pm 31 \mu\text{m}$, 비교예 1의 FCA 세포담체가 $258 \pm 47 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 본 발명에 따른 FCA-COS 세포담체의 기공크기 $168 \pm 22 \mu\text{m} \sim 196 \pm 31 \mu\text{m}$ 는 피부조직재생용 세포담체의 가장 이상적인 기공크기인 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 에 해당한다(Wang, X et al., The roles of knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. Acta biomaterialia, 9(8), 7822-7832, 2013).

[0057] 공극률 및 인장강도 측정

[0058] 상기 실시예 1 및 비교예 2~4에 따라 제조된 FCA-COS 세포담체와 비교예 1의 세포담체의 공극률(porosity)은 에탄올 침투실험(Tan et al., 2009)으로 인장강도는 universal tensile machine(Top-tech 2000, Chemilab)을 사용하여 측정하였다.

[0059] 공극률실험방법은 먼저 세포담체의 무게(W_0)를 측정하고 이 세포담체를 100% 에탄올에 상온에서 15분간 침지시킨다. 15분 후 세포담체를 에탄올에서 꺼내고 표면의 에탄올을 제거한 뒤 세포담체의 무게(W_1)를 측정한다. 상기에서 측정한 W_0 와 W_1 을 하기 수학식 1에 대입하여 공극률을 계산하였다. 하기 수학식 1의 p는 에탄올의 비중(0.789mg/ml)이고 V_s 는 세포담체의 Geometrical volume이다.

수학식 1

$$\text{공극률}(\%) = \left(\frac{W_1 - W_0}{p V_s} \right) \times 100$$

[0060]

[0061] 도 4와 같이, 공극률은 실시예 1 및 비교예 2~4에 따라 제조된 FCA-COS세포담체와 비교예 1의 FCA 세포담체 모두 90% 이상의 공극률을 나타냈다.

[0062] 또한 도 5와 같이, 인장강도는 비교예 1의 세포담체가 $2.57 \pm 0.2 \text{ MPa}$, 실시예 1 및 비교예 2~4가 각각 $7.17 \pm 0.7 \text{ MPa}$, $8.79 \pm 0.2 \text{ MPa}$, $8.51 \pm 0.2 \text{ MPa}$, $11.31 \pm 1 \text{ MPa}$ 를 나타내어 FAC 지지체에 COS가 가교결합시 인장강도가 증가함을 알 수 있었다.

[0063] 전반사 측정 푸리에 변환 적외선 분광분석

[0064] 상기 실시예 1 및 비교예 2~4에 따라 제조된 세포담체의 가교형태를 이화학적으로 분석하기 위하여 전반사 측정 푸리에 변환 적외선분광분석(FTIR, ALPHA,Bruker optics, 400-4000nm)을 실시하였다.

[0065] 도 6 및 하기 표 1과 같이, 먼저 어류 피부로부터 추출된 콜라겐의 5가지 주요 peak인 amide A ($\sim 3299\text{ cm}^{-1}$), amide B ($\sim 3074\text{ cm}^{-1}$), amide I ($\sim 1647\text{ cm}^{-1}$), amide II ($\sim 1534\text{ cm}^{-1}$) 및 amide III ($\sim 1234\text{ cm}^{-1}$)의 확인을 통하여 성공적으로 어류 피부로부터 콜라겐이 추출됨을 알 수 있었다. 알지네이트의 주요 peak의 관찰은 $\sim 1599\text{ cm}^{-1}$ 과 $\sim 1408\text{ cm}^{-1}$ 에서 카르복실염그룹(carboxylate salt group)의 비대칭 및 대칭적 신축진동 peak와 $\sim 1035\text{ cm}^{-1}$ 에서 글리코시드 결합(glycosidic bond)의 C-O-C의 신축 peak를 확인하였다. 가교결합된 FCA 지지체의 적외선 분광분석을 통한 peak를 관찰한 결과, 카보디이미드 반응(carbodiimide reaction)으로 인해 형성되는 아마이드 결합(amide bond)이 콜라겐과 알지네이트의 구조적인 변화에 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. $3650\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ wavenumber에서 peak의 감소는 EDC 가교결합에 의한 FC-FC와 FC-A로부터 수소결합의 축출에 기여한다. 키토산(chitosan)과 비슷한 IR peak를 가지는 4가지 다른 분자량을 가지는 COS의 가교결합후의 peak는 amide A와 O-H 결합에 해당하는 IR peak가 감소됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 COS의 분자량의 증가에 의한 수소결합이 세포담체로부터 축출된다는 것을 의미한다.

표 1

Types of fabrication	Absorption band peaks (cm^{-1})					
	Amide A	Amide B	Amide I	Amide II	Amide III	C-O-C
FC	3299	3074	1647	1534	1234	-
SA	-	-	-	-	-	1035
FCA-NCL	3285	3072	1602	1556	1238	1032
FCA-CL	3299	3076	1648	1550	1235	1035
FCA/COS1	3295	3077	1636	1544	1238	1033
FCA/COS2	3295	3075	1636	1548	1240	1030
FCA/COS3	3294	3076	1637	1548	1240	1030
FCA/COS4	3299	3089	1636	1546	1246	1035

NCL = non cross-linked, CL = cross-linked by EDC

[0066]

[0067] 실험예2. 본 발명 세포담체의 생체적합성 평가

[0068] 본 발명 세포담체의 생체적합성을 평가하기 위해 생체분해율, MTT assay, 형광분석 및 세포부착능을 하기와 같이 확인하였다.

[0069] 생체분해율

[0070] 상기 실시예 1 및 비교예 2~4에 따라 제조된 FCA-COS 세포담체와 비교예 1의 FCA 세포담체의 생체분해율은 In vitro enzymatic degradation method(Choi et al., 1999)로 확인하였다. 실험방법은 먼저 세포담체의 무게(W_0)를 측정하고 이 세포담체를 125 unit(125 CDU)의 콜라게네이즈(type 1 collagenase from Clostridium histolyticum)가 들어있는 PBS용액에 37°C , 12일간 침지시켰다. 침지된 세포담체를 2일 간격으로 상기 PBS용액에서 꺼내고 증류수로 세척 후 동결건조시켰다. 그다음 동결건조한 세포담체의 무게(W_1)를 측정하였다. 상기에서 측정한 W_0 와 W_1 을 하기 수학적 식 2에 대입하여 생체분해율을 계산하였다.

수학식 2

$$\text{생체분해율}(\%) = \left(\frac{W1 - W0}{W0} \right) \times 100$$

[0071]

[0072]

도 7과 같이, 12시간 콜라겐네이즈와 반응한 세포담체의 생체분해율은 비교예 1이 21%, 실시예 1 및 비교예 2~4가 10.5%, 9.5%, 8.6%, 7.6%로 나타났다. 이를 통해 FCA-COS 세포담체가 FCA 세포담체보다 콜라겐네이즈 효소가 존재하는 생체 내에서 오래 지속되어 안정적으로 세포담체를 유지할수 있음을 확인하였다.

[0073]

세포배양

[0074]

본 발명 피부조직 재생용 세포담체의 세포 생존율 및 증식율을 확인하기 위해 사람 피부 섬유아세포주인 NHDF-neo cell(ATCC, PCS-201-010)을 사용하였다. NHDF-neo cell의 세포배양배지는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 을 사용하였고 배양조건은 37℃, 5% CO₂ 이었으며 NHDF-neo cell이 분주된 세포담체의 세포배양배지와 배양조건도 동일하였다.

[0075]

상기 각 세포담체에 NHDF-neo cell을 분주하기 위해서 먼저 UV를 조사하여 살균한 세포담체를 상기 배양배지에서 24시간 동안 완충시켰다. 그 다음 세포담체와 같은 면적의 플레이트에서 80~85%의 포화도(confluency)로 배양한 NHDF-neo cell을 배양배지로 부유시키고 이를 상기 세포담체 위에 분주하였고 이를 본 발명 피부재생 조직용 세포담체의 세포생존율을 알아보기 위한 하기 실험에 사용하였다.

[0076]

MTT assay

[0077]

NHDF-neo cell이 분주된 각 세포담체를 각각 2, 5, 7, 12일간 배양 후 PBS로 세척하였다. 그 다음 세포담체를 0.5 mg/ml의 MTT가 첨가된 세포배양배지에서 4시간 배양하여 환원반응을 유도시켰다. 반응 후 배지를 조심스럽게 제거하고 DMSO 용액을 첨가하여 상기 환원반응으로 형성된 MTT formazan을 용해하였다. 그 다음 4000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액만 회수하여 이를 시료로 ELISA microplate reader(Gen5 ELISA BioTek, USA)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(cell viability)은 0시간 비교예1의 FCA 세포담체의 흡광도 대비 각 실험군 세포담체 흡광도의 퍼센트(%)로 수치화 하였다.

[0078]

도 8과 같이, 배양 12시간 후 각 세포담체에서 증식된 NHDF-neo cell의 세포생존율은 실시예 1 및 비교예 2~4의 FCA-COS 세포담체가 비교예 1의 FCA 세포담체보다 높았으며 특히 본 발명 1~3 kDa COS로 제조된 실시예 1의 FCA-COS1은 다른 세포담체보다 173±7%높은 세포생존율을 나타내었다.

[0079]

형광 분석

[0080]

세포증식율을 확인하기 위해 살아있는 세포에 염색되어 형광을 띠는 물질인 FDA를 사용하였다. 상기 FDA는 살아있는 세포의 intracellular esterase activity에 의해 de-acetylation 되어 형광을 나타내는 특징을 가진다. 먼저 NHDF-neo cell이 분주된 각각의 세포담체를 각각 1일과 12일간 배양 후 PBS로 세척하였다. 그 다음 세포담체를 5 ug/ml의 FDA가 첨가된 PBS에서 15분간 형광염색시킨 후 PBS로 세척하고 형광현미경(Leica DMI3000B)으로 NHDF-neo cell을 관찰하였다.

[0081]

도 9와 같이, 배양 12일 후 NHDF-neo cell의 형광강도는 실시예 1 및 비교예 2~4의 FCA-COS 세포담체가 비교예 1의 FCA 세포담체보다 높았으며 특히 본 발명 1~3 kDa COS로 구성된 실시예 1의 FCA-COS1은 다른 세포담체에 비해 높은 형광강도를 나타냈다.

[0082] 세포부착능 관찰

[0083] 실시예 1의 FCA-COS 세포담체와 비교예 1의 FCA 세포담체에 대한 NHDF-neo cell의 세포부착능을 주사전자현미경 (SEM, Hitachi S-2700, 5.0kV)을 사용하여 확인하였다.

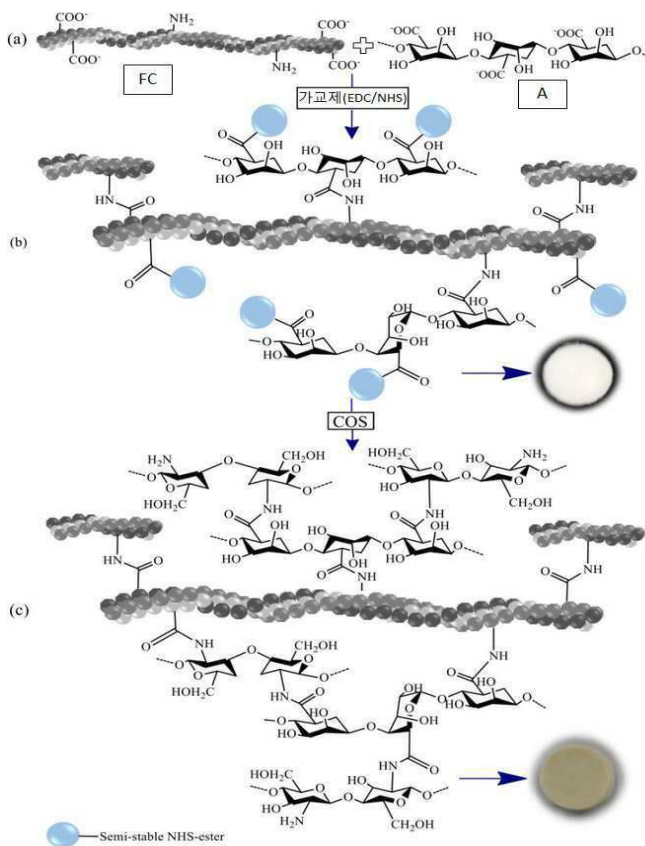
[0084] 도 10과 같이, 배양 7일후 NHDF-neo cell은 본 발명 실시예 1의 FCA-COS 세포담체의 바닥(d)과 벽(e)에서는 납작하게, 기공내(f)에서는 세포의 위족(Pseudopods)을 뻗으면서 잘 부착되어 있었으며 상대적으로 비교예1의 FCA 세포담체는 그러하지 못함을 확인하였다.

산업상 이용가능성

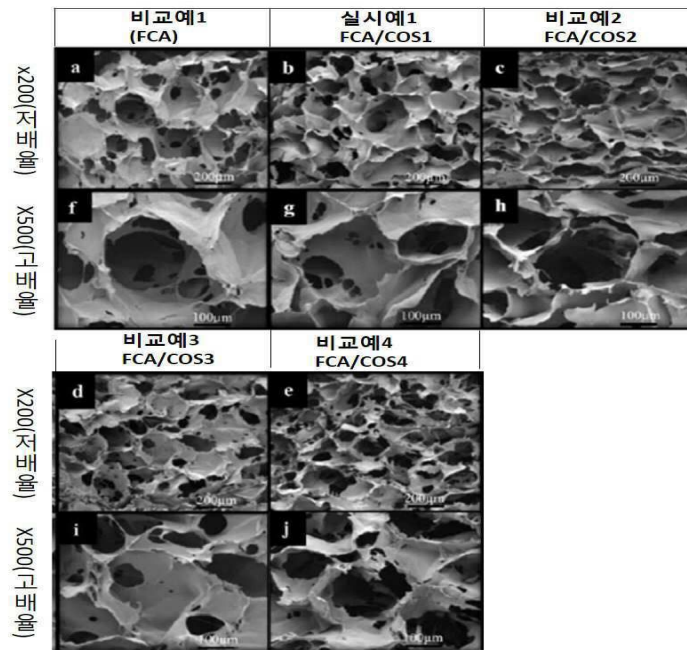
[0085] 이상 설명한 바와같이 본 발명 세포담체는 어류 유래 콜라겐(Fish collagen, FC)과 알지네이트(Alginate, A)와 1-3 kDa의 키토올리고당(Chitooligosaccharide, COS)으로 구성되어 인체피부조직재생용 세포담체로 이용시 생체 적합성이 뛰어난 효과가 있으므로 의료용 생체소재산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

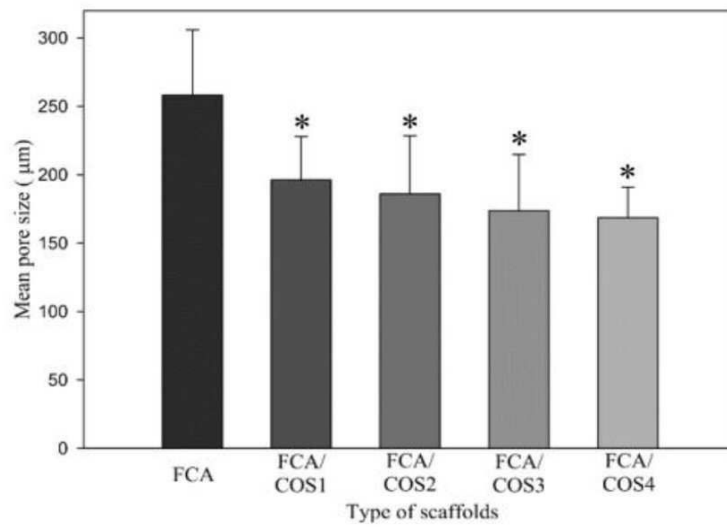
도면1



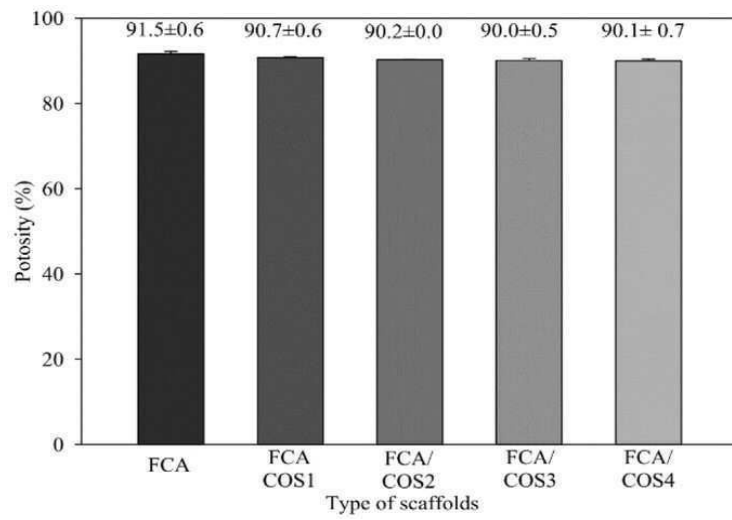
도면2



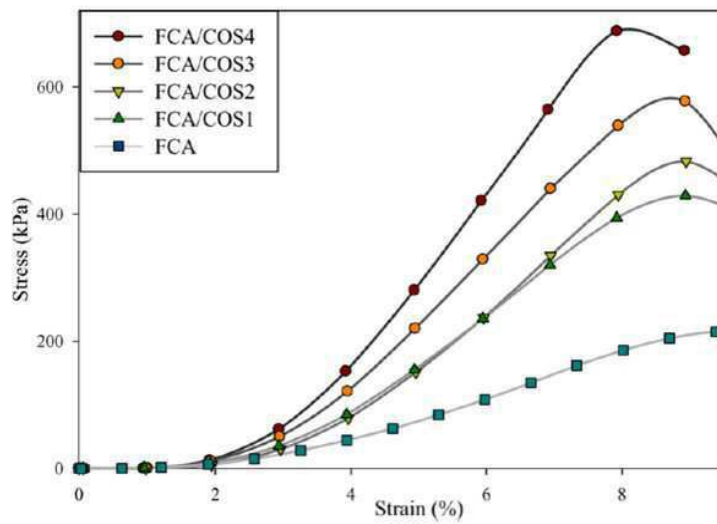
도면3



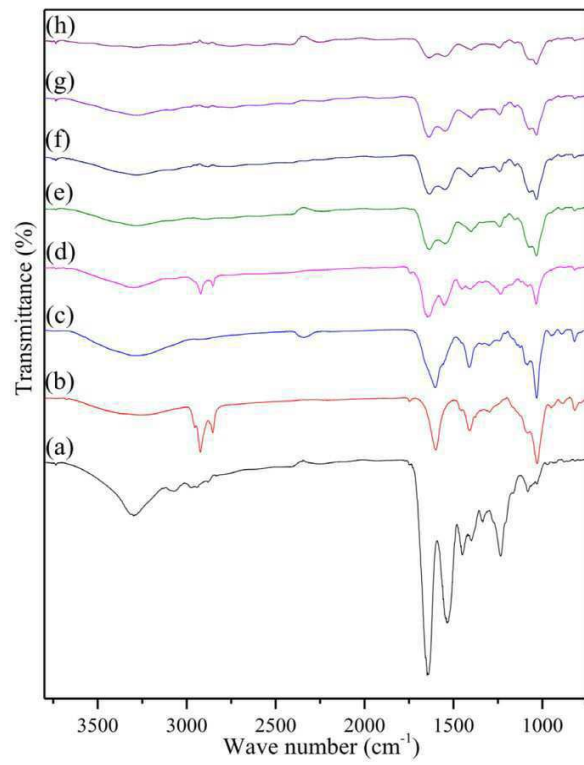
도면4



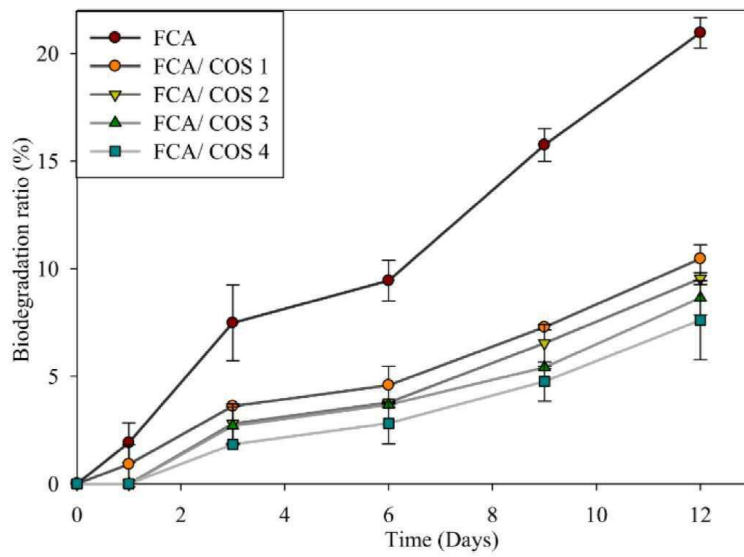
도면5



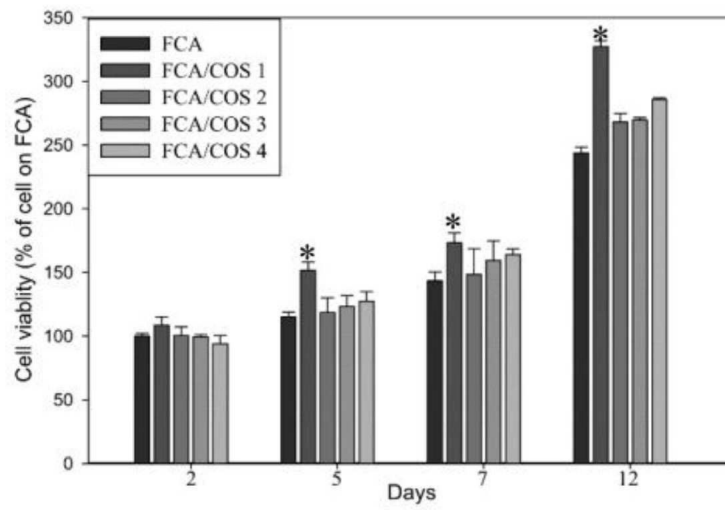
도면6



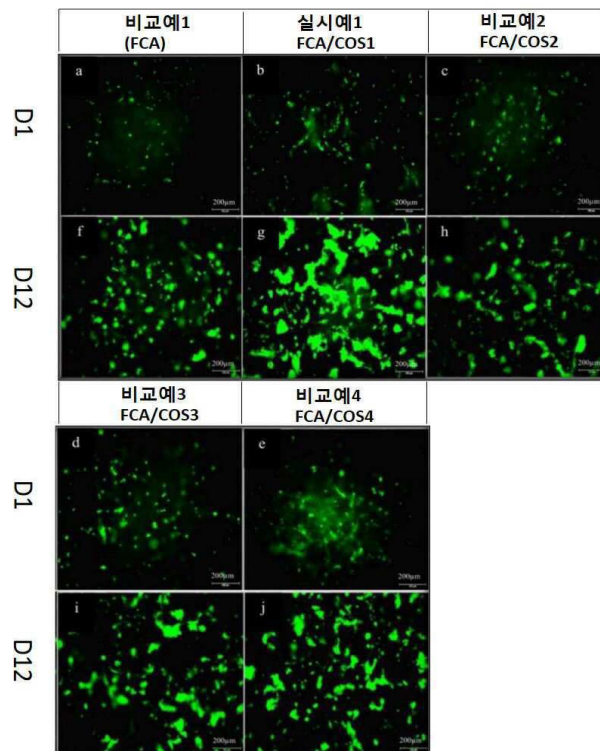
도면7



도면8



도면9



도면10

