

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0007070

(43) 공개일자 2021년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/70 (2006.01) A61K 31/573 (2021.01)

A61K 38/18 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)

A61K 47/36 (2017.01) C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/7023 (2013.01)

A61K 31/573 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2019-0082681

(22) 출원일자 2019년07월09일

심사청구일자 2019년07월09일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 347호

최동훈

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 세브란스 심장혈관병원 원장실

신지수

서울특별시 서대문구 연세로 50 제2공학관 B533호 (신촌동, 연세대학교)

(74) 대리인

특허법인이름리온

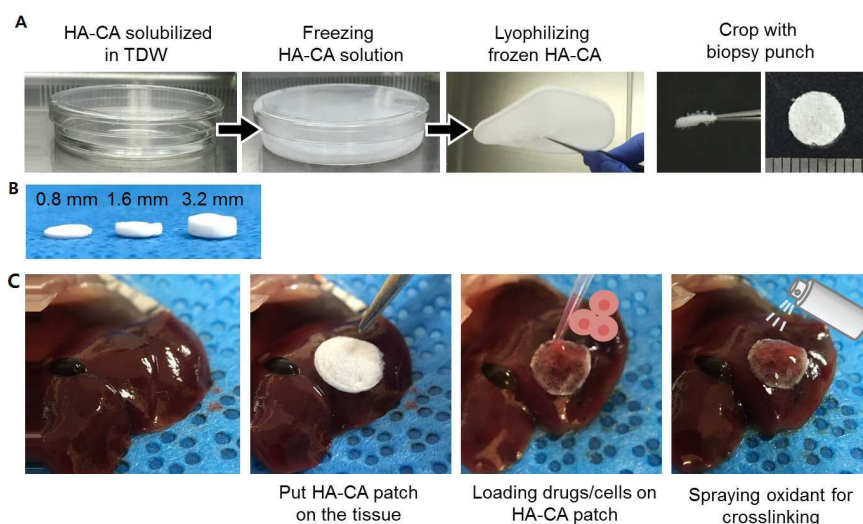
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 생체모사 조직 접착성 하이드로젤 패치 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 생체적합성 및 조직 접착력이 우수한 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치 및 이를 이용한 세포 이식, 조직 재생, 약물 전달 용도에 관한 것이다. 상기 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치는 용액 기반의 하이드로젤 제형과 비교하여 현저히 우수한 기계적 물성 및 조직 접착력을 가지므로 체내에서 장기간 세포 및 약물을 담지하여 목적부위로 안전하고 효율적으로 전달할 수 있다. 또한, 원하는 형태의 물드를 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치로 단일 또는 여러겹으로 감싸 다층 하이드로젤 패치를 제작할 수 있고, 여기에 줄기세포를 접착시킴으로써 생체내 조직과 유사한 구조체를 형성할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1808 (2013.01)
A61K 38/1866 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 9/7007 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2533/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B3005994
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진

연구(2/3)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018M3A9H1021382
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간 오가노이드 생산 플랫폼

개발(1/3,1단계)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

카테콜로 수식된 생체적합성 고분자로 이루어진 하이드로젤 패치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 히알루론산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 알지네이트, 키토산, 키틴, 콜라겐, 젤라틴, 콘드로이틴황산 및 펙틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 하이드로젤 패치.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 히알루론산인 것인, 하이드로젤 패치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤 패치는 0.05 내지 10.0 mm의 두께를 갖는 것인, 하이드로젤 패치.

청구항 5

제1항의 하이드로젤 패치; 및

상기 하이드로젤 패치에 담지된 약물을 포함하는, 약물 전달체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 약물은 혈관내피 성장인자, 표피 성장인자, 각질세포 성장인자, 성장분화인자, 간세포 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 형질전환 성장인자, 안지오프이에틴, 에리스로포이에틴, 골형성단백질, 인슐린성 성장인자, 섬유아세포성장인자, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자, 뇌유래신경영양인자, 신경아교세포-유래 신경영양인자, 신경성장인자, 기저세포-유래 인자-1, 물질 P, 저산소증-유도 인자-1, 디코프-연관 단백질-1, 인터루킨, 켈르카리주맵, 니볼루맵, 아테졸리주맵, 이필리루맵, 블리나투모맵, 트라스투주맵, 세톡시맵 및 베바시주맵으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약물 전달체.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 약물은 아세트메타신, 아크리바스틴, 알도스테론, 안타졸린, 아스테미졸, 아자타딘, 아젤라스틴, 베클로메타손, 베타메타손, 브로페낙, 부클리진, 카르프로펜, 세티리진, 클로로피릴린, 클로로페니라민, 클레마스틴, 크로몰린, 시클리진, 시프로헵타딘, 텍사메타손, 디아졸린, 디클로페낙, 디펜히드라민, 에바스틴, 에메다스틴, 에피나스틴, 에토돌락, 펜부펜, 페노프로펜, 펙소페나딘, 플루드로코르티손, 플루르비프로펜, 플루로메탈론, 히드록시진, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토롤락 트로메타딘, 케토티펜, 레보카바스틴, 레보세테리진, 로독사미드, 로라타딘, 로테프레드놀, 록소프로펜, 메트리손, 메피바카인, 메퀴타진, 메트딜라진, 메타피릴렌, 나부메톤, 나파졸린, 나프록센, 네도크로밀, 노라스테미졸, 노레바스틴, 올로파타딘, 페니다민, 페닐에프린, 옥사타미드, 옥시메타졸린, 페미롤라스트, 페니라민, 피쿠마스트, 프레드니실론, 프로메타진, 리멕살론, 레피리나스트, 몬테루카스트, 솔린닥, 수프로펜, 자퍼루카스트, 테트

라히도졸린, 테르페나딘, 티아프로펜산, 토메탐, 트라닐라스트, 트리암시놀론, 트리메프라진, 트리프롤리딘, 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민, 메만틴, 리도카인, 케타민, 메토틱렉세이트, 사이클로스포린, 시스플라틴, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 독소루비신, 미토마이신-C, 다우노마이신, 에피루비신, 타목시펜, 소라페닙, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 텍시부프로펜, 피록시캄, 약제학적으로 허용되는 이들의 염 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약물 전달체.

청구항 8

- (a) 제1항의 하이드로젤 패치에 약물 또는 세포를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 (a)의 하이드로젤 패치에 산화제를 접촉시키는 단계를 포함하는, 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (a)의 약물은 혈관내피 성장인자, 표피 성장인자, 각질세포 성장인자, 성장분화인자, 간세포 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 형질전환 성장인자, 안지오프이에틴, 에리트로포이에틴, 골형성단백질, 인슐린성 성장인자, 섬유아세포성장인자, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자, 뇌유래신경영양인자, 신경아교세포-유래 신경영양인자, 신경성장인자, 기저세포-유래 인자-1, 물질 P, 저산소증-유도 인자-1, 디코프-연관 단백질-1, 인터루킨, 펩티도글리칸, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 이필리무맙, 블리나투모맙, 트라스투주맙, 세톡시맙 및 베바시주맙으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (a)의 약물은 아세트메타신, 아크리바스틴, 알도스테론, 안타졸린, 아스테미졸, 아자타딘, 아젤라스틴, 베클로메타손, 베타메타손, 브로페낙, 부클리진, 카르프로펜, 세티리진, 클로로피릴린, 클로로페니라민, 클레마스틴, 크로몰린, 시클리진, 시프로헵타딘, 텍사메타손, 디아졸린, 디클로페낙, 디펜히드라민, 에바스틴, 에메다스틴, 에피나스틴, 에토돌락, 펜부젠, 페노프로펜, 펙소페나딘, 플루드로코르티손, 플루르비프로펜, 플루로메탈론, 히드록시진, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토롤락 트로메타민, 케토틱펜, 레보카바스틴, 레보세테리진, 로독사미드, 로라타딘, 로테프레드놀, 록소프로펜, 메드리손, 메피바카인, 메퀴타진, 메트딜라진, 메타피릴렌, 나부메톤, 나파졸린, 나프록센, 네도크로밀, 노라스테미졸, 노레바스틴, 올로파타딘, 페니다민, 페닐에프린, 옥사타미드, 옥시메타졸린, 페미롤라스트, 페니라민, 피쿠마스트, 프레드니실론, 프로메타진, 리멕살론, 레피리나스트, 몬테루카스트, 숀린다, 수프로펜, 자퍼루카스트, 테트라히도졸린, 테르페나딘, 티아프로펜산, 토메탐, 트라닐라스트, 트리암시놀론, 트리메프라진, 트리프롤리딘, 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민, 메만틴, 리도카인, 케타민, 메토틱렉세이트, 사이클로스포린, 시스플라틴, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 독소루비신, 미토마이신-C, 다우노마이신, 에피루비신, 타목시펜, 소라페닙, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 텍시부프로펜, 피록시캄, 약제학적으로 허용되는 이들의 염 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 (a)의 세포는 줄기세포, 인간혈관내피세포, 골세포, 연골세포, 심근세포, 근육세포, 표피세포, 섬유아세포, 신경세포, 간세포, 장세포, 위세포, 피부세포, 지방세포, 혈액세포, 면역세포, 세포 스펜드 및 오가노이드로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법.

청구항 12

- (a) 일정 형태의 몰드를 제1항의 하이드로젤 패치로 감싸는 단계;

(b) 상기 하이드로젤 패치에 줄기세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체 조직을 모사한 구조체 형성 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 (b)의 줄기세포는 성체줄기세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 지방조직 유래 줄기세포, 중간엽 줄기세포 또는 태반 유래 줄기세포인 것인, 생체 조직을 모사한 구조체 형성 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 (b)는 하이드로젤 패치에 세포를 도포한 후 산화제를 접촉시키는 단계인 것인, 생체 조직을 모사한 구조체 형성 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체적합성 및 조직 접착력이 우수한 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치 및 이를 이용한 약물 전달, 세포 이식 및 조직 재생 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 질병이나 사고에 의하여 손상된 조직 및 장기를 효과적으로 회복시키기 위해서는 생체 내외에 약물 및 세포를 효율적으로 전달할 수 있어야 한다. 이에 따라 약물 및 세포를 전달하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔지만 실제 임상에 사용되어 만족할만한 수준의 치료 효과를 보이는 시스템은 아직까지 개발이 부족하다.

[0004] 세포 전달의 경우 기존에는 주로 직접 주사 방법이 사용되었으나, 이 방법은 주사할 때의 압력에 의해 세포가 파괴되고, 조직 손상 및 출혈의 위험성이 존재한다. 이 한계를 극복하기 위해 고분자 패치 기반 세포 전달 기술들이 개발되었으나 여전히 패치를 조직 표면 위에 부착시키기 위해서 봉합사(suture) 혹은 접착제(glue) 등을 추가적으로 사용해야 한다. 또한, 봉합에 의해 조직의 직접적 손상이 일어날 수 있고, 접착제 이용시에는 세포를 탑재한 패치와 조직 사이에 완전한 밀착이 이루어지지 못하여 손상 조직으로 세포 전달 효율이 크게 떨어지는 단점이 존재한다. 추가적인 치료로 인해 시술 시간 또한 길어질 수 있어 이로 인해 치료 효과가 감소되는 경우가 빈번히 발생한다.

[0005] 약물 전달의 경우 경구 투여와 같은 기존의 단순 투여 방식은 약물의 빠른 분해 및 확산으로 인해 약물의 체내 체류 시간이 짧은 문제점이 존재하며, 효과적인 치료를 위해서는 많은 양의 약물을 주입하거나 약물 주입 빈도가 높아질 수 밖에 없었다.

[0006] 기존의 약물 및 세포 전달 방법의 문제를 해결하기 위해 하이드로젤을 이용한 전달 방법에 관한 연구가 진행되었으나 대부분이 하이드로젤 용액에 약물 또는 세포를 탑재하고 가교시켜 겔 형성을 유도하는 방식에 관한 연구였다. 그러나 상기 방식은 하이드로젤을 생체에 주입하는 형태로 적용되기 때문에 하이드로젤을 다루는 사용자의 숙련도에 따라 약물 및 세포 전달의 효과가 달라질 가능성이 많고 사용자의 편의성이 크게 떨어지는 문제가 있다. 또한, 주사를 통하여 생체 내로 주입되기 때문에 조직 손상 및 출혈의 위험성이 여전히 존재하고, 기존의 하이드로젤은 물성 및 접착력이 생체 내에서 장기간 유지되기에는 부족한 경우가 많았다.

[0007] 조직 손상 가능성, 사용자 불편, 세포 및 약물 전달의 비효율성과 같은 종래 기술의 한계를 극복하기 위하여 본 발명자들은 카테콜로 수식된 히알루론산 유도체를 동결건조시켜 약물 및 세포 전달 효율과 사용자 편의성이 현저히 우수한 하이드로젤 패치를 제작하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 생체적합성, 접착력, 기계적 물성 및 사용편의성이 우수한 하이드로젤 패치 및 이를 이용한 세포 이식, 조직 재생 및 약물 전달 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자로 이루어진 하이드로젤 패치를 제공한다.
- [0012] 본 명세서에 사용된 용어, "카테콜(catechol)"은 히드록시기(-OH) 두 개가 인접 위치한 1,2-디하이드록시벤젠(dihydroxybenzene)으로 산화반응에 의해서 여러가지 작용기(functional group)와 공유 가교(cross-linking)를 형성한다.
- [0013] 본 명세서에 사용된 용어, "하이드로젤 패치(hydrogel patch)"는 생체적합성 고분자로 이루어진 일정 두께를 갖는 얇은 막 형태의 구조물을 말하며, 원하는 형태로 잘라서 사용할 수 있는 장점이 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 히알루론산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 알지네이트, 키토산, 키틴, 콜라겐, 젤라틴, 콘드로이틴황산 및 펙틴으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 히알루론산이다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자로 이루어진 하이드로젤 패치(이하, 하이드로젤 패치로 기재함)는 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자로 이루어진 용액 기반 하이드로젤(이하, 벌크 하이드로젤로 기재함)과 비교하여 나노섬유 기반의 다공성 구조를 가지고, 팽윤성이 뛰어나므로 생체내 환경에서도 패치 내에 세포 또는 약물을 효과적으로 담지할 수 있다. 또한, 상기 하이드로젤 패치는 벌크 하이드로젤보다 기계적 물성 및 조직 접착력이 우수하여 생체내 환경에서 패치 구조를 오랫동안 유지할 수 있고, 생체내 조직에 장기간 부착할 수 있으며, 줄기세포, 오가노이드 등의 세포를 효과적으로 이식하여 세포 생착율을 높일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치는 0.05 내지 10.0 mm의 두께를 가질 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 5.0 mm의 두께를 가질 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 하이드로젤 패치는 하기 단계로 제조될 수 있다:
- [0018] (a) 평평한 표면에 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자 용액을 고르게 붓는 단계; 및
- [0019] (b) 상기 용액을 영하 0.5℃ 내지 영하 100℃에서 5시간 내지 48시간 동안 동결건조시키는 단계.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (a)는 8 mm 원통 몰드에 HA-CA 용액을 40, 80 또는 160 μ l씩 붓는 방식으로 이루어질 수 있으며, 상기 HA-CA 용액은 0.1 내지 5% 농도, 바람직하게는 0.5 내지 3% 농도로 사용될 수 있다. 상기 HA-CA 용액의 용량은 각각 0.8, 1.6 또는 3.2 mm 두께의 고분자 하이드로젤 패치를 만들기 위한 것으로 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치는 두께를 손쉽게 조절할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (b)는 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자 용액을 영하 0.5℃ 내지 영하 100℃에서 5시간 내지 48시간 동안 동결건조시키거나, 바람직하게는 영하 50℃ 내지 영하 100℃에서 12시간 내지 36시간 동안 동결건조시키는 방법으로 이루어질 수 있다. 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자 용액을 동결건조시키면 용액의 부피가 축소하면서 일정한 두께를 갖는 얇은 막 형태의 하이드로젤 패치가 만들어진다.
- [0023] 본 발명의 다른 양상은 상기 하이드로젤 패치 및 하이드로젤 패치에 담지된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 약물은 성장인자와 같은 단백질일 수 있으며, 예를 들어 혈관내피 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장인자 (epidermal growth factor, EGF), 각질세포 성장인자 (keratinocyte growth factor, KGF), 성장분화인자 (growth and differentiation factor), 간세포 성장인자 (hepatocyte growth factor, HGF), 혈소판유래 성장인자 (platelet-derived growth factor, PDGF), 형질전환 성장인자 (transforming growth factor, TGF), 안지오포이에틴 (angiopoietin), 에리스로포이에틴 (erythropoietin), 골형성단백질 (bone morphogenic protein, BMP), 인슐린성 성장인자 (insulin-like growth factor), 섬유아세포성장인자 (acidic and basic fibroblast growth factor), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인

자 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), 뇌유래신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor), 신경아교세포-유래 신경영양인자 (glial cell-derived neurotrophic factor), 신경성장 인자 (nerve growth factor), 기저세포-유래 인자-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1), 물질 P (substance P, SP), 저산소증-유도 인자-1 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1), 디코프-연관 단백질-1 (Dickkopf-related protein-1, DKK-1), 인터루킨 (interleukin), 펌브롤리주맙 (Pembrolizumab; 제품명 키트루 다(Keytruda)), 니볼루맙(nivolumab; 제품명 옵디보(Opdivo)), 아테졸리주맙(atezolizumab; 제품명 티센트릭 (Tecentriq)), 이필리무맙(Ipilimumab; 제품명 여보이(Yervoy)), 블리나투모맙(blinatumomab; 제품명 블린사이 토(Blinicyto)), 트라스투주맙 (trastuzumab; 제품명 허셉틴(Herceptin)), 세툽시맙 (cetuximab; 제품명 엘비투 스(Erbix)) 및 베바시주맙(bevacizumab; 제품명 아바스틴(Avastin))으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0025] 또한, 상기 약물은 아세메타신 (acemethacin), 아크리바스틴 (acrivastine), 알도스테론 (aldosterone), 안타 졸린 (antazoline), 아스테미졸 (astemizole), 아자타딘 (azatadine), 아젤라스틴 (azelastine), 베클로메타손 (beclomethasone), 베타메타손 (betamethasone), 브로페낙 (bromfenac), 부클리진 (buclicine), 카르프로펜 (carprofen), 세티리진 (cetirizine), 클로로피릴린, 클로르페니라민 (chlorpheniramine), 클레마스틴 (clemastine), 크로몰린 (cromolyn), 시클리진 (cyclizine), 시프로헵타딘 (cyproheptadine), 덱사메타손 (dexamethasone), 디아졸린 (diazolinum), 디클로페낙 (diclofenac), 디펜히드라민 (diphenhydramine), 에바스 틴 (ebastine), 에메다스틴 (emedastine), 에피나스틴 (epinastine), 에토돌락 (etodolac), 펜부펜 (fenbufen), 페노프로펜 (fenoprofen), 펙소페나딘 (fexofenadine), 플루드로코르티손 (fludrocortisone), 플 루르비프로펜 (flurbiprofen), 플루로메탈론 (fluorometholone), 히드록시진 (hydroxyzine), 이부프로펜 (ibuprofen), 인도메타신 (indomethacin), 케토프로펜 (ketoprofen), 케톨락 트로메타민 (ketorolac tromethamine), 케토티펜 (ketotifen), 레보카바스틴 (levocabastine), 레보세티리진 (levocetirizine), 로독 사미드 (lodoxamide), 로라타딘 (loratadine), 로테프레드놀 (loteprednol), 록소프로펜 (loxoprofen), 메드리 손 (medrysone), 메피바카인 (mepivacaine), 메퀴타진 (mequitazine), 메트딜라진 (methdilazine), 메타피릴렌 (metapyrilene), 나부메톤 (nabumetone), 나파졸린 (naphazoline), 나프록센 (naproxen), 네도크로밀 (nedocromil), 노라스테미졸 (norastemizole), 노레바스틴 (norebastine), 올로파타딘 (olopatadine), 페니다 민 (fenidamin), 페닐에프린 (phenylephrine), 옥사토마이드(oxatamide), 옥시메타졸린 (oxymetazoline), 페미 롤라스트 (pemirolast), 페니라민 (peniramin), 피쿠마스트 (picumast), 프레드니솔론 (prednisolone), 프로메 타진 (promethazine), 리멕솔론 (rimexolone), 레피리나스트 (leprinast), 몬테루카스트 (montelukast), 술린 락 (sulindac), 수프로펜 (suprofen), 자피루카스트 (zafirlukast), 테트라하이드로졸린 (tetrahydrozoline), 테르페나딘 (terfenadine), 티아프로펜산 (tiapropenic acid), 토메탐, 트라닐라스트 (tranilast), 트리암시놀 론 (triamcinolone), 트리메프라진 (trimeprazine), 트리프로리딘 (triprolidine), 도네페질 (donepezil), 리 바스티그민 (rivastigmine), 갈란타민 (galantamine), 메만틴 (memantine), 리도카인 (lidocaine), 케타민 (ketamine), 메토티렉세이트 (methotrexate), 사이클로스포린 (cyclosporine), 시스플라틴 (cisplatinum), 카 페시타빈 (capecitabine), 옥살리플라틴 (Oxaliplatin), 독소루비신 (doxorubicin; 제품명 아드리아마이신 (Adriamycin)), 미토마이신-C (mitomycin-C), 다우노마이신 (daunomycin), 에피루비신 (epirubicin), 타목시펜 (tamoxifen), 소라페닙 (sorafenib), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 파클리탁셀 (paclitaxel), 텍시부프 로펜 (dexibuprofen), 피록시캄 (poroxicam), 약제학적으로 허용되는 이들의 염 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 약물일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 하이드로젤 패치와 약물을 전달하고자 하는 목적부위에 부 착(가교)시키는데 필요한 물질, 예를 들어 산화제를 추가로 포함할 수 있으며, 산화제로는 과요오드산 나트륨이 사용될 수 있다. 하이드로젤 패치에 산화제를 도포하거나 또는 분사하면 카테콜기가 산화되어 가교반응이 일어 난다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 하이드로젤 패치에 약물을 담지하는 방법은 카테콜로 수식된 생체적합성 고분자 용액과 약물을 혼합시켜 하이드로젤 패치를 제조하거나 하이드로젤 패치에 약물을 도포한 후 산화제를 추가하여 하이드로젤 패치에 약물을 가교시키는 방법을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명자들은 카테콜로 수식된 히알루론산(HA-CA) 수용액과 VEGF를 혼합하고, 이를 동결건조시켜 HA-CA 하이드 로젤 패치를 제작한 후 약물 방출 양상 및 상처 치료 효과를 확인하였다. 그 결과, 약물이 포함된 상태로 제작 된 HA-CA 하이드로젤 패치와 패치 제작 후 약물을 가교시킨 HA-CA 하이드로젤 패치 사이에 약물 효과에 차이가 없는 것을 확인하였다. 또한, HA-CA 벌크 하이드로젤과 비교하여 HA-CA 하이드로젤 패치의 상처 치료 효과가 우수한 것을 확인하였다.

- [0030] 본 발명의 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법을 제공한다:
- [0031] (a) 상기 하이드로젤 패치에 약물 또는 세포를 접촉시키는 단계; 및
- [0032] (b) 상기 (a)의 하이드로젤 패치에 산화제를 접촉시키는 단계.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 목적부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법은 i) 목적부위에 하이드로젤 패치를 부착시킨 후 (a) 및 (b) 단계를 수행하거나, ii) 하이드로젤 패치에 약물 또는 세포를 접촉시키고, 목적 부위에 하이드로젤 패치를 부착시킨 후 산화제를 접촉시키거나, 또는 iii) 상기 (a) 및 (b) 단계를 거친 후 약물 또는 세포가 담지된 하이드로젤 패치를 목적부위에 부착시키는 방식으로 이루어질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (a)의 약물은 약물 전달체에 사용된 것과 동일한 약물을 사용할 수 있고, 상기 (a)의 세포는 줄기세포, 인간혈관내피세포, 골세포, 연골세포, 심근세포, 근육세포, 표피세포, 섬유아세포, 신경세포, 간세포, 장세포, 위세포, 피부세포, 지방세포, 혈액세포, 면역세포, 세포 스페로이드 및 오가노이드로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0035] 본 명세서에 사용된 용어, "세포 스페로이드(cell spheroid)"는 다수의 단일세포들이 모여 형성된 구 형태의 3차원 세포집합체를 의미한다.
- [0036] 본 명세서에 사용된 용어, "오가노이드(organoid)"는 줄기세포로부터 자가 재생 및 자가 조직화를 통해 형성된 3차원 세포집합체(장기 유사체)를 의미하며, 줄기세포에는 성체줄기세포(adult stem cell, ASC), 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 지방조직 유래 줄기세포(adipose derived stem cell, ADSC), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC) 또는 태반 유래 줄기세포(placental derived stem cell, PDSC) 등이 사용될 수 있다. 줄기세포를 인체내 환경을 모방하여 3차원으로 배양하므로 인체의 생리활성 기능을 유사하게 재현할 수 있고, 환자의 조직으로부터 장기유사체를 구축함으로써 환자의 유전정보를 기반으로 한 질병 모델링, 약물 스크리닝 등을 가능하게 한다.
- [0037] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (b)의 산화제를 접촉시키는 단계는 약물 또는 세포가 도포된 하이드로젤 패치에 산화제 용액을 도포하거나 분사하는 방식으로 이루어질 수 있다.
- [0038] 본 발명자들은 상기 방법으로 허혈성 심근경색 모델 랫트에 중간엽 줄기세포를 이식한 결과 중간엽 줄기세포의 이식 및 생착 효율이 증가하고, 심장 기능이 개선되며, 손상된 심근조직이 재생되는 것을 확인하였다. 또한, 마우스의 등 부위 창상에 상기 방법으로 VEGF를 도입한 결과 창상 회복 및 피부 조직 재생이 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 방법으로 목적부위에 효과적으로 약물 및 세포를 도입할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체, 또는 목적 부위에 약물 또는 세포를 전달하는 방법은 알츠하이머, 뇌졸중 (stroke), 파킨슨병, 뇌전증 (epilepsy), 뇌출혈, 뇌경색, 뇌종양, 뇌수막염, 척수손상, 피부창상, 습진, 아토피, 대상포진, 무좀(피부사상균증), 지루성피부염, 욕창, 건선, 봉소염, 모낭염, 수족구병, 한포진, 사마귀, 티눈, 위장 손상, 위 궤양, 십이지장 궤양, 궤양대장염, 크론병, 골 결손, 골다공증, 연골 파열, 연골 연화증, 근육 손상, 인대/건 손상, 근막염, 골수염증, 관절염, 그레이브스병 (Grave's disease), 루푸스, 백내장, 녹내장, 황반변성, 망막 손상, 간 경변증, 알코올성 간질환(지방간), 간경화, 신부전, 규폐증(silicosis), 낭종성 폐질환, 폐쇄성 폐질환, 만성 폐질환, 폐렴, 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 편도결석, 기관기확장증, 기관협착, 성대/후두 결절, 치주염, 구내염, 구순포진, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 이상지질혈증, 말초혈관병, 하지허혈, 동맥경화, 심근섬유증, 심근경색, 심근병증, 심부전, 협심증, 담도염, 췌장염, 위염, 역류성 식도염, 식도협착증, 식도게실 (esophagus diverticula), 식도근증, 특발성 식도확장증, 플러머-빈슨증후군 (Plummer-Vinson syndrome), 식도정맥류, 간염, 중이염, 기관지염, 갑상선염, 결막염, 혈관염, 편도선염, 척추염, 신우신염, 방광염, 염좌, 늑막염, 갑상선암, 난소암, 자궁경부암, 폐암, 위암, 간암, 유방암, 다발성골수종, 소화기암, 췌장암, 담석증, 담낭암, 담도암, 대장암, 전립선암, 림프종, 골연부조직암, 두경부암, 혈액암, 식도암, 골육종, 후두암, 당뇨병, 당뇨병 족부궤양, 당뇨병 망막변증, 당뇨병콩팥병증, 당뇨병신경병증 또는 비만의 치료 및 개선에 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 양상은

- [0043] (a) 일정 형태의 몰드를 하이드로젤 패치로 감싸는 단계;
- [0044] (b) 상기 하이드로젤 패치에 줄기세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체 조직을 모사한 구조체 형성 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 생체 조직을 모사한 구조체 형성 방법은 (a) 및 (b)의 단계를 1회 내지 복수회 반복하는 방법일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (b)의 줄기세포는 성체줄기세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 지방조직 유래 줄기세포, 중간엽 줄기세포 또는 태반 유래 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (b)는 하이드로젤 패치에 줄기세포를 도포한 후 산화제를 접촉하는 방법으로 이루어질 수 있으며, 구체적으로 하이드로젤 패치에 산화제 용액을 떨어뜨리거나 분사하는 방식으로 이루어질 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 생체 조직은 혈관, 피부 또는 간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명의 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치는 용액 기반의 벌크 하이드로젤과 비교하여 현저히 우수한 기계적 물성, 접착력을 가지므로 체내에서 장시간 동안 세포 및 약물을 담지할 수 있고, 조직의 손상 없이 상기 세포 및 약물을 안전하고 효율적으로 체내로 전달할 수 있다. 또한, 상기 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치는 일정한 두께의 얇은 막 형태이므로 벌크 하이드로젤과 비교하여 다루기가 용이하고, 원하는 모양으로 자를 수 있으므로 사용하기 편리하다. 추가로 원하는 형태의 몰드를 카테콜 수식 생체적합성 고분자 하이드로젤 패치로 단일 또는 여러겹으로 감싸 다층 하이드로젤 패치를 제작할 수 있고, 여기에 줄기세포를 접촉시킴으로써 생체내 조직과 유사한 구조체를 형성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 카테콜로 수식된 히알루론산(HA-CA) 하이드로젤 패치의 제작 과정(A), 두께가 다른 HA-CA 하이드로젤 패치(B) 및 상기 하이드로젤 패치의 사용 방법(C)을 개략적으로 보여준다.
- 도 2는 HA-CA 벌크 하이드로젤(A)과 HA-CA 하이드로젤 패치(B)의 세포독성 및 3차원 배양 여부를 확인한 결과이다.
- 도 3은 HA-CA 하이드로젤 패치(Patch)와 HA-CA 벌크 하이드로젤(Gel)의 팽윤도(A 및 B), 수분 함유량(C) 및 히알루론산 분해 효소에 의한 분해 속도(D)를 확인한 결과이다.
- 도 4는 주사 전자 현미경으로 HA-CA 벌크 하이드로젤(Gel)과 HA-CA 하이드로젤 패치(Patch)의 내부 구조를 확인한 결과이다.
- 도 5는 HA-CA 하이드로젤 패치(Patch)와 HA-CA 벌크 하이드로젤(Gel)의 기계적 강도(A 및 B), HA-CA 하이드로젤 패치의 두께에 따른 탄성계수(C)를 확인한 결과이다.
- 도 6은 HA-CA 하이드로젤 패치(Patch)와 HA-CA 벌크 하이드로젤(Gel)의 조직 접착력(A, B 및 C)과 조직 부착일(D)을 확인한 결과이다.
- 도 7은 HA-CA 하이드로젤 패치(Patch)와 HA-CA 벌크 하이드로젤(Gel)의 스테인리스강 접착력(A 및 B)과 부착일(C)을 확인한 결과이다.
- 도 8은 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 신장, 간 및 장에 줄기세포를 이식한 후 줄기세포의 생착 여부를 확인한 결과이다.
- 도 9는 심근 경색이 유발된 허혈 조직에 줄기세포를 HA-CA 하이드로젤 패치(MSC-patch) 또는 주사 방법(MSC-injection)으로 이식한 후 줄기세포의 생착 여부를 확인한 결과이다.
- 도 10은 허혈성 심근경색 모델 랫트에 줄기세포를 HA-CA 하이드로젤 패치(MSC-patch) 또는 주사 방법(MSC-

injection)으로 이식한 후 좌심실 이완기말 직경(A), 좌심실 수축기말 직경(B), 심박출계수(C) 및 구획단축률(D)을 확인한 결과이다.

도 11은 허혈성 심근경색 모델 랫트에 줄기세포를 HA-CA 하이드로젤 패치(MSC-patch) 또는 주사 방법(MSC-injection)으로 이식한 후 손상된 심장 조직을 TTC 염색(A 및 B), Masson's Trichrome 염색(C 및 D)으로 확인한 결과이다.

도 12는 허혈성 심근경색 모델 랫트에 줄기세포를 HA-CA 하이드로젤 패치(MSC-patch) 또는 주사 방법(MSC-injection)으로 이식한 후 손상 부위를 소동맥 특이적 마커 (smooth muscle actin, SMA) 및 모세혈관 마커(CD31)로 염색한 결과이다.

도 13은 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 형광으로 표지된 오가노이드를 간(A 및 B), 위(C) 및 소장(D)에 이식한 후 세포의 생착 여부를 확인한 결과이다.

도 14는 다층 구조의 HA-CA 하이드로젤 패치 제작 결과(A) 및 이를 이용하여 다층의 생체내 구조를 모사(B)한 후 확인한 결과이다.

도 15는 튜브 형태의 다층 HA-CA 하이드로젤 패치 제작 결과(A 및 B) 및 이를 이용하여 다층의 혈관 모사 구조체(C)를 제작한 결과이다.

도 16은 히알루론산 분해효소가 존재하는 생체내 환경을 모사한 조건에서 HA-CA 하이드로젤 패치의 약물 방출 양상을 확인한 결과이다.

도 17은 마우스 창상 모델에 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 혈관내피 성장인자(VEGF)를 도입한 후 시간 경과에 따른 창상 치료 효과를 확인한 결과이다.

도 18은 마우스 창상 모델에 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 혈관내피 성장인자(VEGF)를 도입한 후 모낭 재생(A 및 C), 콜라겐 생성(B 및 D) 및 혈관 형성 정도(E 및 F)를 확인한 결과이다.

도 19는 마우스 창상 모델에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 사용하여 약물을 도입한 후 창상 치료 효능을 확인한 결과이다.

도 20은 마우스 창상 모델에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 사용하여 약물을 도입한 후 창상 부위의 재생 정도를 헤마토실린&에오신 염색(A)과 Masson's Trichrome 염색(B)으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 제조예

[0056] 1. HA-CA 하이드로젤 패치 제작

[0057] 카테콜이 수식된 히알루론산(catechol-functionalized hyaluronic acid; 이하, HA-CA로 기재함)을 증류수에 1% 농도로 용해시키고, 8 mm 원통 몰드에 상기 1% HA-CA 용액을 각각 40, 80 또는 160 μ l씩 부은 후 -80℃에서 하룻밤 동안 동결건조시켜 0.8, 1.6, 3.2 mm 두께의 HA-CA 하이드로젤 패치를 제작하였다. 제작된 HA-CA 하이드로젤 패치는 건조된 상태이므로 보관이 용이하고, 얇은 막 형태이므로 원하는 모양으로 용이하게 자를 수 있어 사용이 간편하다.

[0058] 특정 모양으로 자른 HA-CA 하이드로젤 패치를 표적 조직의 표면 위에 올리고, 원하는 약물 또는 세포를 패치 위에 도포하였다. 이후, 과요오드산 나트륨(sodium periodate, NaIO₄; 산화제)을 HA-CA 하이드로젤 패치에 뿌려 세포 또는 약물이 패치에 캡슐화되도록 하였다.

[0059] 이전 실험에서, HA-CA의 농도가 1%보다 높은 경우 하이드로젤 패치가 너무 단단하여 세포 및 약물이 하이드로젤 패치 내부로 효과적으로 침투하지 못하였고, 낮은 경우에는 하이드로젤 패치의 구조가 충분히 유지되지 못해 세포 및 약물이 손실되었다. 또한, HA-CA 하이드로젤 패치가 지나치게 두꺼우면 세포 및 약물이 하이드로젤 패치 내부로 효과적으로 침투하지 못하며, 너무 얇은 경우에는 하이드로젤 패치를 다루기 어렵고, 산화제를 도포한

후 하이드로젤 패치의 구조가 오랜 시간 유지되지 못하는 단점이 있다.

[0060] 실시예 1 내지 5에서는 1.6 mm 두께의 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하였다.

[0061] 도 1에서 A는 HA-CA 하이드로젤 패치의 제작 과정을 나타내고, B는 두께가 다른 HA-CA 하이드로젤 패치를 보여 주며, C는 목적 조직에 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하는 방법을 개략적으로 보여준다.

[0063] 2. HA-CA 벌크 하이드로젤 제작

[0064] HA-CA를 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)에 용해시키고, 이 용액에 과요오드산 나트륨 용액을 첨가(HA-CA 용액:산화제 용액 = 3:1 (v/v))하여 HA-CA 벌크 하이드로젤을 제작하였다. 완성된 HA-CA 벌크 하이드로젤에서 HA-CA의 최종 농도는 2%이다. 제작한 HA-CA 벌크 하이드로젤은 구조 분석 및 세포독성 분석 등에 사용하였다. 약물 또는 세포를 포함하는 HA-CA 벌크 하이드로젤은 HA-CA 용액과 약물 또는 세포를 미리 혼합한 후 과요오드산 나트륨 용액을 첨가하여 제조하였다.

[0066] 실시예 1: HA-CA 하이드로젤 패치의 특성 분석

[0067] 1-1. 세포독성 확인

[0068] 6-웰 세포 배양 플레이트의 바닥에 상기 제조예에서 제작한 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 놓고, 인간 지방 유래 줄기세포(human adipose derived stem cell, hADSC)를 분주하여 7일 동안 배양하였다. 배양 0일, 3일 및 7일 차에 Live/Dead assay (Invitrogen; 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 세포 생존율을 확인하였다.

[0069] 그 결과, 이미 생체적합성이 검증된 HA-CA 벌크 하이드로젤은 세포 독성이 없는 것을 알 수 있었고(도 2의 A), HA-CA 하이드로젤 패치 또한 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다(도 2의 B). 또한, XZ 축 사진에 나타난 바와 같이 HA-CA 하이드로젤 패치에서 세포가 단층이 아닌 3차원으로 분포되어 있는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 HA-CA 벌크 하이드로젤의 제형을 HA-CA 하이드로젤 패치로 변형시켜도 히알루론산의 생체적합성은 그대로 유지되고, 세포의 3차원 배양도 가능함을 의미한다.

[0071] 1-2. 팽윤도(swelling) 및 분해 속도 확인

[0072] 생체내 조건과 유사한 37℃의 PBS에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 7일 동안 담그고, 12시간, 1일, 3일 및 7일 후에 팽윤도를 측정하였다. 측정 결과, HA-CA 하이드로젤 패치의 팽윤도가 HA-CA 벌크 하이드로젤보다 약 4배 정도 높았고(도 3의 A), 실제 수분 함량은 HA-CA 벌크 하이드로젤이 HA-CA 하이드로젤 패치보다 높았다(도 3의 B 및 C).

[0073] 또한, 실제 생체내 환경은 다양한 분해효소가 존재하므로 37℃의 PBS에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 담그고, 분해될 때까지 히알루론산 분해효소를 처리하였다. 일정 시간마다 HA-CA 하이드로젤 패치 및 HA-CA 벌크 하이드로젤의 무게를 측정하여 시간 경과에 따른 분해 정도를 측정하였다. 측정 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤은 히알루론산 분해효소를 처리한 후 2시간 이내에 빠르게 분해되어 6시간 후에는 완전히 분해되나, HA-CA 하이드로젤 패치는 히알루론산 분해효소 처리 24시간 이후에도 남아 있어 효소에 의한 분해 속도가 느린 것을 알 수 있었다(도 3의 D).

[0075] 1-3. 내부 구조 확인

[0076] 주사 전자 현미경을 사용하여 HA-CA 하이드로젤 패치 및 HA-CA 벌크 하이드로젤의 내부 구조를 확인하였다. 그 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤은 마이크로미터(μm) 크기의 다공성 구조를 갖는 반면, HA-CA 하이드로젤 패치는 나노섬유 기반의 다공성 구조를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 이 결과는 HA-CA 벌크 하이드로젤보다 HA-CA 하이드로젤 패치가 더 조밀한 내부 구조를 갖고, 나노섬유 구조에 의해 카테콜로 수식된 표면적이 증가하므로 조직 접착력이 우수할 수 있음을 의미한다.

[0078] **1-4. 기계적 강도 측정**

[0079] 레오미터를 사용하여 주파수 0.1 내지 10 Hz 사이에서 HA-CA 하이드로젤 패치와 HA-CA 벌크 하이드로젤의 탄성계수를 측정하였다. 측정 결과, HA-CA 하이드로젤 패치와 HA-CA 벌크 하이드로젤 모두 G' 수치가 G'' 수치보다 높은 것으로 나타나 내부 구조가 안정적인 고분자 네트워크로 구성된 것을 확인할 수 있었다(도 5의 A).

[0080] 또한, HA-CA 벌크 하이드로젤의 평균 탄성계수는 약 260 Pa인 반면, HA-CA 하이드로젤 패치의 탄성계수는 약 11 kPa로 나타나 탄성계수가 약 50배 이상 증가한 것을 알 수 있었다(도 5의 B). 상기 제조예 1에서 제작한 HA-CA 하이드로젤 패치의 탄성계수를 측정한 결과, 패치의 두께가 증가함에 따라 탄성계수가 0.8 kPa에서 5 및 14 kPa로 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었으며(도 5의 C), 탄성계수가 증가하는 것은 기계적 강도가 우수해지는 것을 의미한다.

[0081] 상기 실험 결과들은 HA-CA 벌크 하이드로젤과 비교하여 HA-CA 하이드로젤 패치의 기계적 강도가 현저히 우수하고, HA-CA 하이드로젤 패치는 두께를 조절함으로써 기계적 강도를 용이하게 조절할 수 있음을 의미한다.

[0083] **1-5. 생체조직 접착력 측정**

[0084] 돼지 심장 조직에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 올린 후 산화제를 분사하고, 돼지 심장 조직이 부착되어 있는 프로브(probe)로 누른 후 10분 동안 방치하였다. 이후, 접착력 측정기로 HA-CA 하이드로젤 패치와 HA-CA 벌크 하이드로젤의 조직 접착력을 측정하였다.

[0085] 측정 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤은 약 1.5 N의 접착력을 가지는 반면, HA-CA 하이드로젤 패치는 약 5.5 N의 접착력을 보여 조직 접착력이 3.5배 이상 향상되는 것을 알 수 있었다(도 6의 B 및 C).

[0086] 또한, 접착력-인장길이 그래프(도 6의 B)의 면적을 측정하여 돼지 심장 조직에 부착된 HA-CA 벌크 하이드로젤 또는 하이드로젤 패치를 분리하는데 필요한 일의 양(부착일)을 계산하였다. 그 결과, HA-CA 하이드로젤 패치의 조직 부착일이 HA-CA 벌크 하이드로젤보다 8배 이상 증가하는 것을 알 수 있었다(도 6의 D).

[0088] **1-6. 접착력 측정 (스테인리스강 표면)**

[0089] 스테인리스강(stainless steel) 표면에 HA-CA 하이드로젤 패치 또는 HA-CA 벌크 하이드로젤을 올리고 상기 실험예 1-5와 동일한 방법으로 접착력을 측정하였다.

[0090] 측정 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤은 약 12 N의 접착력을 가지는 반면, HA-CA 하이드로젤 패치는 약 30 N의 접착력을 보여 2.5배 이상 접착력이 향상되는 것을 알 수 있었다(도 7의 A 및 B).

[0091] 또한, 접착력-인장길이 그래프(도 7의 A)의 면적을 측정하여 스테인리스강 표면에 부착된 HA-CA 벌크 하이드로젤 또는 하이드로젤 패치를 분리하는데 부착일을 계산하였다. 그 결과, HA-CA 하이드로젤 패치의 부착일이 HA-CA 벌크 하이드로젤보다 5.5배 이상 증가하는 것을 알 수 있었다(도 7의 C).

[0093] **실시예 2: HA-CA 하이드로젤 패치의 장기 접착능 확인**

[0094] 생체내 환경은 수분이 많은 상태이므로 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치가 다양한 장기에 부착할 수 있는지 확인하였다. 마우스를 마취시킨 후 개복하여 신장, 간 및 장에 HA-CA 하이드로젤 패치를 올리고, 인간 지방줄기세포(human adipose derived stem cells, hADSC)를 떨어뜨린 후 산화제를 뿌리고 봉합하였다. 24시간 후 마우스를 희생시켜 신장, 간 및 장을 분리하고, HA-CA 하이드로젤 패치의 부착 여부를 육안으로 확인한 후 조직 절편을 만들어 헤마토실린&에오신 염색을 수행하였다. 그 결과, 24시간 후에도 수분이 많은 장기 표면에 HA-CA 하이드로젤 패치가 잘 부착되어 있는 것을 알 수 있었다. 조직 염색 결과를 통해서도 신장, 간 및 장에 HA-CA 하이드로젤 패치가 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0095] 본 결과는 HA-CA 하이드로젤 패치가 다양한 장기 및 생체내 조직에 부착할 수 있으므로 다양한 장기 및 조직에 비침습적 세포 이식이 가능함을 의미한다.

[0097] **실시예 3: HA-CA 하이드로젤 패치의 심근경색 치료 효능**

[0098] **3-1. 줄기세포 이식 및 생착 효율 확인**

[0099] 기존의 줄기세포 이식술은 주로 손상이 일어난 조직에 직접 주사를 하는 방식으로 진행되었으나 줄기세포의 전달 및 생착 효율이 낮고, 주사로 인한 출혈 및 조직 손상의 위험이 있는 단점이 있다. 이에 비해 접착성 패치를 이용한 줄기세포 이식 방법은 비침습적으로 넓은 조직 부위에 효과적으로 줄기세포 이식이 가능한 장점이 있다. 따라서, 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 줄기세포를 이식한 후 결과를 확인하였다.

[0100] 허혈성 심근경색(ischemic myocardial infarction) 모델 랫트를 마취시킨 후 가슴을 열고, 심장에 HA-CA 하이드로젤 패치를 올린 후 랫트 골수유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell; 이하 MSC로 기재함)를 2×10^5 개 떨어뜨렸다. 이후 HA-CA 하이드로젤 패치에 산화제를 스프레이하여 MSC가 HA-CA 하이드로젤 패치에 캡슐화되도록 하였다. 수술 부위를 봉합하고, MSC 이식 3일차에 심근경색이 일어난 심장 조직을 추출하여 당업계에 알려진 방법에 따라 헤마토실린&에오신 염색을 수행하였다. 염색 결과, MSC를 포함하는 HA-CA 하이드로젤 패치(MSC-patch)가 심장 조직 표면에 단단히 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었으며(도 9의 A), 이 결과는 HA-CA 하이드로젤 패치가 박동하는 심장 표면에도 안정적으로 잘 부착하고, 부착력을 유지할 수 있음을 의미한다.

[0101] 또한, 형광물질(Paul Karl Horan 26, PKH26)로 표지된 MSC를 랫트에 직접 주입하거나 상기와 동일한 방식으로 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 이식하였다. MSC 이식 2주 후에 추적한 결과, HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 심장 외벽에 이식한 MSC가 손상이 일어난 심장 조직 내로 이동한 것을 확인할 수 있었다. 직접 주사를 통한 기존 MSC 이식술(MSC-injection)보다 HA-CA 하이드로젤 패치를 이용(MSC-patch)할 때 MSC의 생착 및 이동 효율이 현저히 높았다(도 9의 B).

[0103] **3-2. 심초음파 검사를 통한 심장 기능성 평가**

[0104] 허혈성 심근경색 모델 랫트를 마취시킨 후 좌심실 관상동맥결찰을 실시하여 급성 심근경색을 유발하였다. 이후 랫트를 아래 그룹으로 나누어 해당 처치를 한 후 심근경색의 치료 효과를 비교하였다: 대조군(생리식염수 주사, Saline); 실험군 1 (HA-CA 하이드로젤 패치만 부착, Patch only); 실험군 2 (직접 주사로 MSC 이식, MSC-injection); 및 실험군 3 (HA-CA 하이드로젤 패치를 이용해 MSC 이식, MSC-patch). 실험 4주 후에 심초음파 검사(echocardiography)를 실시하여 심장 기능 개선 효과를 평가하였다.

[0105] 평가 결과, 대조군과 비교하여 실험군 3에서 좌심실 수축기말 직경 (left ventricle end-systolic dimension, LVIDs)이 유의미하게 감소한 것을 알 수 있었으며, 이는 HA-CA 하이드로젤 패치로 이식된 MSC가 심장 조직의 손상을 효과적으로 감소시켜 허혈 심장이 비대해지는 것을 방지하였음을 의미한다(도 10의 B). 심장의 수축 기능을 평가할 수 있는 지표인 심박출계수(Ejection fraction) 또한 대조군과 비교하여 실험군 3에서 향상되는 것을 알 수 있었다(도 10의 C). 좌심실 구획단축률(Fractional shortening)도 대조군과 비교하여 실험군 3에서 향상되었다(도 10의 D).

[0106] 본 실험 결과를 통해 HA-CA 하이드로젤 패치로 MSC를 이식하여 허혈성 심근경색을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0108] **3-3. 조직학 분석을 통한 허혈 조직 검사**

[0109] HA-CA 하이드로젤 패치로 이식된 MSC가 손상된 심근조직을 재생하는지 확인하기 위해 손상된 심장의 조직학적 분석을 수행하였다. TTC 염색(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)은 정상 심근조직만 붉은색으로 염색시키며, 심근경색으로 인해 조직이 괴사된 부분은 염색이 되지 않아 흰색으로 보인다.

[0110] 상기 실험예 3-2 종료 후 랫트를 마취시키고 심근 조직을 분리하여 조직 절편 슬라이드를 만든 후 당업계에 알려진 방법에 따라 TTC 염색을 수행하였다. 수행 결과, 실험군 3(MSC-patch)에서는 흰색 부분이 거의 보이지 않아 대조군(Saline)과 비교하여 괴사조직 면적(Infarct size)이 유의미하게 감소한 것을 알 수 있었다. 한편, 실험군 1(Patch only)의 경우 MSC를 이식하지 않았음에도 불구하고 실험군 2(MSC-injection)와 유사한 수준의 조직 괴사 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(도 11의 A 및 B).

[0111] 또한, 랫트로부터 심근경색이 유발된 심장을 분리한 후 조직 절편을 만들고, Masson's Trichrome 염색을 수행

하여 허혈에 의한 심장 조직의 섬유화(fibrosis) 정도를 확인하였다. 그 결과, 실험군 3의 섬유화 억제 효과가 현저히 우수하여 정상 심근조직이 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 실험군 2 또한 대조군과 비교하여 유의미한 섬유화 억제 효과를 보였다(도 11의 C 및 D).

[0112] 본 실험 결과를 통하여 HA-CA 하이드로젤 패치 자체가 조직 재생에 도움이 되는 생체내 세포의 이동 및 생착을 촉진하고, 세포가 생존할 수 있는 공간을 제공함으로써 허혈 질환에 의한 심근조직의 손상을 MSC를 직접 주사한 방법보다 현저히 우수한 수준으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하면 MSC의 이식 및 생착 효율이 현저히 우수하므로 실제 심장질환 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0114] 3-4. 혈관 재생 여부 확인

[0115] HA-CA 하이드로젤 패치로 이식된 MSC가 혈관을 재생시키는지 확인하였다. 구체적으로 상기 실시예 3-3의 심장 조직 절편 슬라이드를 소동맥 특이적 마커 (smooth muscle actin, SMA) 및 모세혈관 마커 (CD31)로 염색하였다.

[0116] 염색 결과, 대조군과 비교하여 실험군 3(MSC-patch)에서 소동맥 및 모세혈관이 현저하게 많이 재생된 것을 확인할 수 있었다(도 12의 A 및 B). 이 결과를 통해 HA-CA 하이드로젤 패치를 이용한 MSC 이식 방법이 기존의 MSC 주입 방식보다 혈관 재생에 현저하게 효과적임을 알 수 있었다.

[0118] 실시예 4: HA-CA 하이드로젤 패치의 세포 이식 및 조직 재생 효능

[0119] 4-1. 오가노이드 이식

[0120] 기존의 주사를 통한 세포 주입 방식은 세포 스페로이드(spheroid) 또는 오가노이드(organoid)와 같이 큰 세포 덩어리를 효율적으로 이식하기 어렵다. 이식시 주사 바늘을 통과할 때의 압력으로 세포 구조가 파괴되고 세포가 사멸하는 등의 문제점이 있기 때문이다. 따라서 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 세포 오가노이드 이식을 수행하였다.

[0121] 마우스를 마취시킨 후 개복하고, 간, 위 및 소장 표면에 DiI 형광으로 표지된 세포 오가노이드를 올린 후 HA-CA 하이드로젤 패치를 테이프 형태로 붙여 오가노이드를 각 장기의 표면에 고정시켰다.

[0122] 오가노이드 이식 3일 후에 위와 소장을 분리하고, 7일 후에는 간을 분리하여 오가노이드의 부착 여부를 확인하였다. 그 결과, 간에 오가노이드가 성공적으로 부착되어 기존 간 조직과 통합된 것을 알 수 있었다(도 13의 A 및 B). 또한, 위 및 소장에도 오가노이드가 성공적으로 부착된 것을 알 수 있었다(도 13의 C 및 D).

[0124] 4-2. 시트(sheet) 형태의 다층 구조 형성

[0125] 피부, 혈관과 같이 생체내 조직은 다층 구조로 이루어져 있으므로 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치로 생체내 조직과 유사한 다층 구조를 제작하였다.

[0126] 컬러 잉크를 사용하여 적색과 녹색의 HA-CA 하이드로젤 패치를 제작하고, 하나의 HA-CA 하이드로젤 패치 위에 다른 HA-CA 하이드로젤 패치를 올려 다층 패치 구조체를 형성시켰다. 이때 별도의 접착제는 사용하지 않고 HA-CA 하이드로젤 패치 자체의 접착성을 이용하였다. 실험 결과, 3층 및 5층으로 이루어진 패치 구조체를 제작할 수 있었다(도 14의 A).

[0127] 또한, 하나의 HA-CA 하이드로젤 패치에 형광물질로 표지된 hADSC를 올리고, 이 위에 다른 HA-CA 하이드로젤 패치를 올린 후 다시 형광물질로 표지된 hADSC를 올리는 방식을 반복하여 다층의 삼차원 세포 구조체를 형성시켰다. 이때 매층마다 다른 형광물질로 표지된 hADSC를 사용하였다. 그 결과, HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하여 층마다 서로 다른 세포가 존재하는 다층 시트로 구성된 조직 구조를 구현할 수 있음을 확인하였다(도 14의 B).

[0128] 원통 모양의 몰드를 적색과 녹색의 HA-CA 하이드로젤 패치로 감은 후 몰드를 제거하여 튜브 형태의 다층 HA-CA 하이드로젤 패치를 만들 수 있었고(도 15의 A), 탄성이 있어 압력을 가해 형태를 변형시켜도 원래 형태로 다시 복원되는 것을 확인할 수 있었다(도 15의 B). 튜브 형태의 다층 HA-CA 하이드로젤 패치 제작시 한 층에는 인간 혈관내피세포 (HUVEC), 다른 층에는 hADSC를 부착시킨 결과, 인체 혈관과 유사한 구조를 제작할 수 있었다.

[0130] **실시예 5: HA-CA 하이드로젤 패치를 이용한 약물 전달**

[0131] **5-1. 약물 방출 양상 확인**

[0132] 제조예 1의 방법에 따라 HA-CA 하이드로젤 패치를 제작하고, 패치에 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하, VEGF로 기재함)를 뿌린 후 산화제를 도포하여 패치에 VEGF를 캡슐화시켰다(Patch (CA)-VEGF 실험군). 비교군으로는 HA-CA 수용액과 VEGF를 혼합한 후 동결건조시켜 HA-CA 하이드로젤 패치를 제작한 후 산화제를 도포하였다(Patch (CA)-VEGF/FD 실험군). 상기 비교군은 실제 임상에서 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하는 경우 편의성이 가장 우수할 것으로 생각되는 약물 전달 형태이다. VEGF를 포함하는 상기 두 종의 HA-CA 하이드로젤 패치를 37℃의 PBS에 담그고, 히알루론산 분해효소(hyaluronidase) 처리 유무에 따른 VEGF 방출 양상을 ELISA로 분석하였다.

[0133] 분석 결과, VEGF를 함께 동결건조시킨 HA-CA 하이드로젤 패치, 별도로 VEGF를 도입한 HA-CA 하이드로젤 패치 모두 유사한 VEGF 방출 양상을 보이는 것을 알 수 있었다(도 16). 또한, 단백질의 다양한 친핵성 작용기들과 카테콜의 강한 결합으로 인해 분해효소가 없는 환경(- hyaluronidase)에서는 VEGF의 방출이 잘 일어나지 않은 반면, 생체 내 환경을 모사해 분해효소를 처리한 환경(+ hyaluronidase)에서는 효과적으로 VEGF가 방출되는 것을 확인할 수 있었다(도 16).

[0134] 따라서 본 발명의 HA-CA 하이드로젤 패치를 사용하면 창상과 같이 히알루론산 분해효소의 활성이 증가된 상처 부위에 효과적으로 약물을 전달할 수 있고, 상처 부위의 치료 효과를 높일 수 있을 것으로 예상된다.

[0136] **5-2. 마우스 창상 치료 효능 평가**

[0137] 마우스 등 부위에 펀치를 사용해 지름 8 mm의 창상을 만든 후 HA-CA 하이드로젤 패치를 올리고, 패치에 FITC-BSA 단백질을 뿌린 후 산화제를 도포하여 패치를 가교시켰다. 일정 시간이 지난 후 해당 창상 부위의 조직을 분리하여 염색한 결과 FITC-BSA 단백질이 탑재된 HA-CA 하이드로젤 패치가 창상 부위의 근육층에 단단히 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 17의 A).

[0138] 마우스 등 부위에 펀치를 사용해 지름 8 mm의 창상을 만들고 4개 그룹으로 나누어 HA-CA 하이드로젤 패치의 피부 재생 및 창상 치료 효과를 확인하였다: 1. 대조군(No treatment); 2. HA-CA 하이드로젤 패치만 적용(Patch(CA) only); 3. HA-CA 하이드로젤 패치에 VEGF 캡슐화 (Patch(CA)-VEGF); 및 4. VEGF와 HA-CA 용액을 혼합한 후 동결건조시켜 패치 제작한 후 가교 (Freeze-dried patch; Patch(CA)-VEGF/FD).

[0139] 확인 결과, 창상 부위에 VEGF를 전달한 Patch(CA)-VEGF 그룹 및 Patch(CA)-VEGF/FD 그룹에서 유의미하게 창상 크기가 빠르게 줄어드는 것을 알 수 있었으며, 상기 두 그룹은 유사한 창상 치료 효능을 보였다(도 17의 B 및 C). 이 결과를 통하여 HA-CA 하이드로젤 패치에 미리 약물을 탑재한 후 동결건조시켜도 약물의 효과에 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었으며, 이는 사용자의 편의성을 높일 수 있다.

[0140] 창상 부위의 피부 재생 수준을 평가하기 위해 실험 12일 차에 창상 부위를 헤마토실린&에오신으로 염색하고 이미징 기반 정량 분석으로 확인하였다.

[0141] 확인 결과, 창상 부위에 VEGF를 전달한 Patch(CA)-VEGF 그룹 및 Patch(CA)-VEGF/FD 그룹에서 모낭 재생이 활발히 일어난 것을 알 수 있었다(도 18의 A 및 C). 또한, Masson's trichrome 염색을 통하여 창상 부위에 VEGF를 전달한 Patch(CA)-VEGF 그룹 및 Patch(CA)-VEGF/FD 그룹에서 콜라겐 재생 또한 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 18의 B 및 D). 혈관 형성 효과를 확인하기 위해 모세 혈관마커(CD31)로 면역 염색을 수행한 결과, 창상 부위에 VEGF를 전달한 Patch(CA)-VEGF 그룹 및 Patch(CA)-VEGF/FD 그룹에서 더 많은 혈관이 형성된 것을 알 수 있었다(도 18의 E 및 F).

[0143] **5-3. 마우스 창상 치료 효능 비교**

[0144] 마우스 등 부위에 펀치로 지름 8 mm의 창상을 만들고, HA-CA 하이드로젤 패치와 HA-CA 벌크 하이드로젤의 창상 치료 효능을 비교하였다. 구체적으로 HA-CA 용액에 VEGF를 미리 혼합한 후 동결건조시키고, 이를 다시 PBS에 용해시킨 후 HA-CA 벌크 하이드로젤 형태로 가교시켰다(Freeze-dried bulk hydrogel; Bulk(CA)-VEGF/FD). HA-

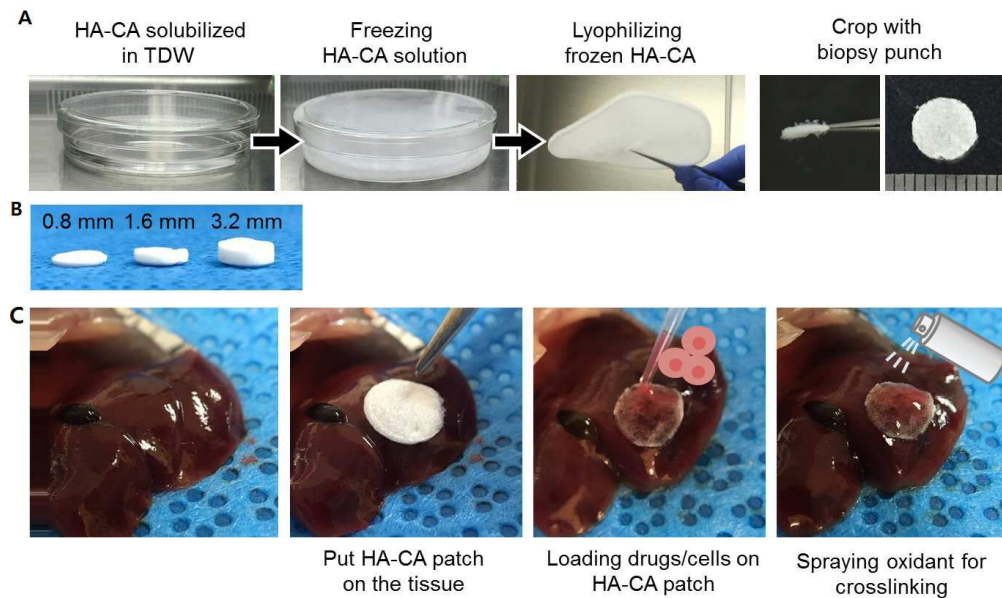
CA 하이드로젤 패치는 HA-CA 용액과 VEGF를 미리 혼합한 후 패치 형태로 동결건조시키고, 이후 산화제로 패치를 가교시켜 제작하였다 (Freeze-dried patch; Patch(CA)-VEGF/FD).

[0145] 16일 동안 창상 크기의 감소 정도를 관찰한 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤로 VEGF를 전달한 실험군(Bulk(CA)-VEGF/FD)보다 HA-CA 하이드로젤 패치로 VEGF를 전달한 실험군(Patch(CA)-VEGF/FD)에서 창상 크기가 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 19의 A 및 B).

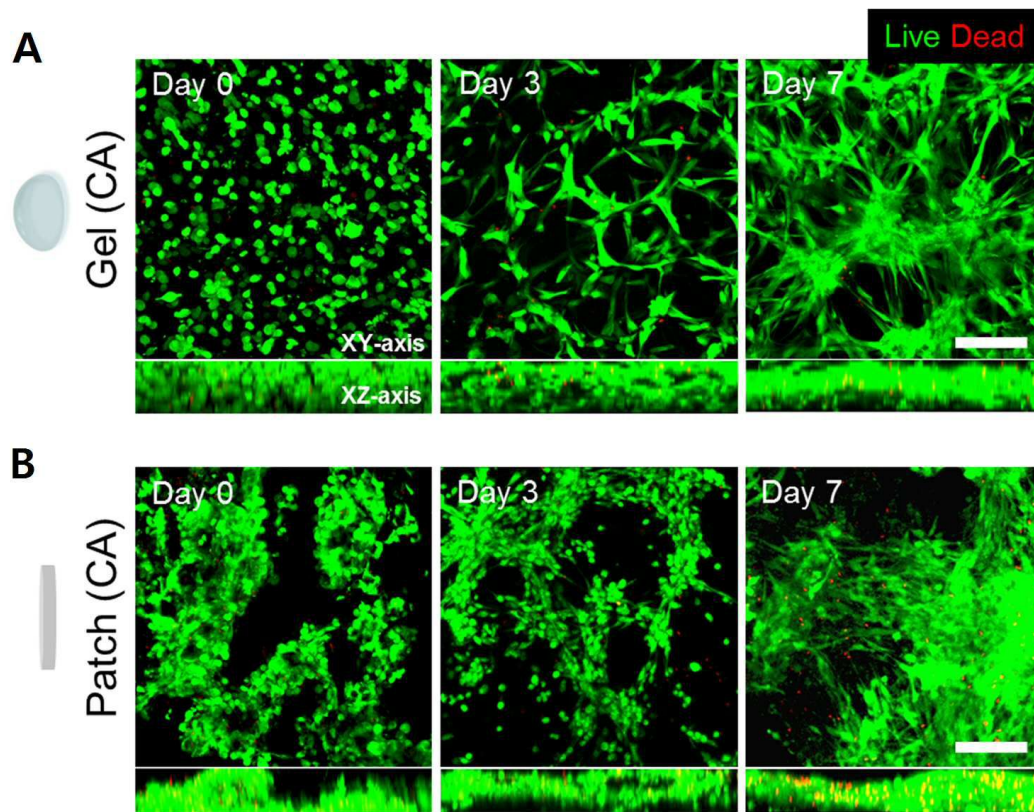
[0146] 창상 부위의 피부 재생 정도를 확인하기 위해 실험 16일차에 마우스를 희생시켜 창상 부위를 헤마토실린&에오신으로 염색하였다. 그 결과, HA-CA 벌크 하이드로젤로 VEGF를 전달한 실험군(Bulk(CA)-VEGF/FD)보다 HA-CA 하이드로젤 패치로 VEGF를 전달한 실험군(Patch(CA)-VEGF/FD)에서 세포들이 많이 생성되어 창상 부위가 현저히 많이 재생된 것을 확인할 수 있었다(도 20의 A). 또한, 창상 부위를 Masson's Trichrome으로 염색한 결과, 콜라겐 재생 또한 Patch(CA)-VEGF/FD 실험군에서 더 많이 일어난 것을 알 수 있었다(도 20의 B). 상기 실험 결과는 동일한 물질로 이루어져 있다고 하더라도 하이드로젤 패치 제형이 기존의 용액 기반 벌크 하이드로젤 제형보다 치료 효능이 더 우수함을 의미한다.

도면

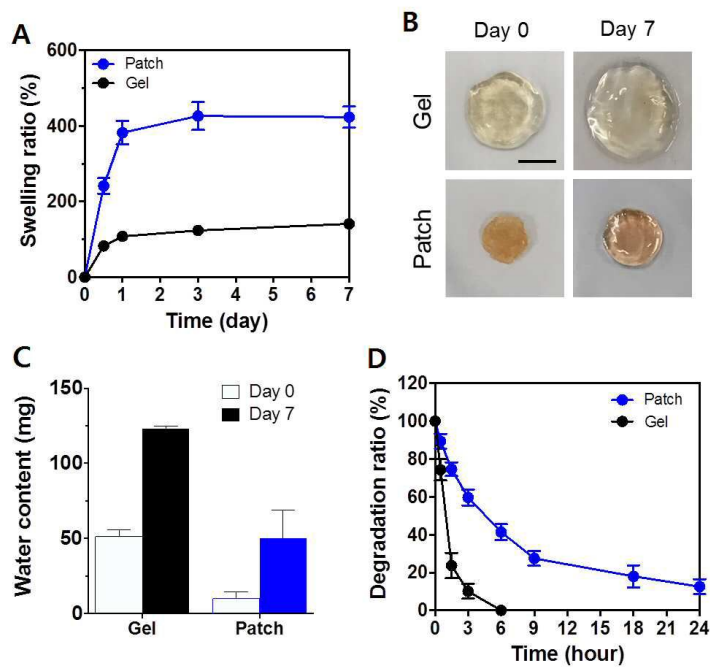
도면1



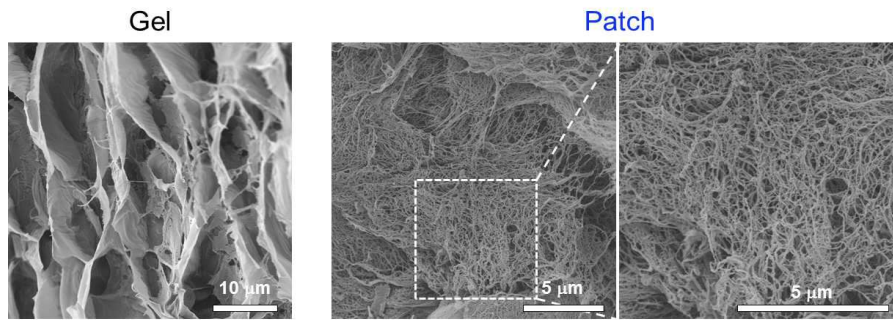
도면2



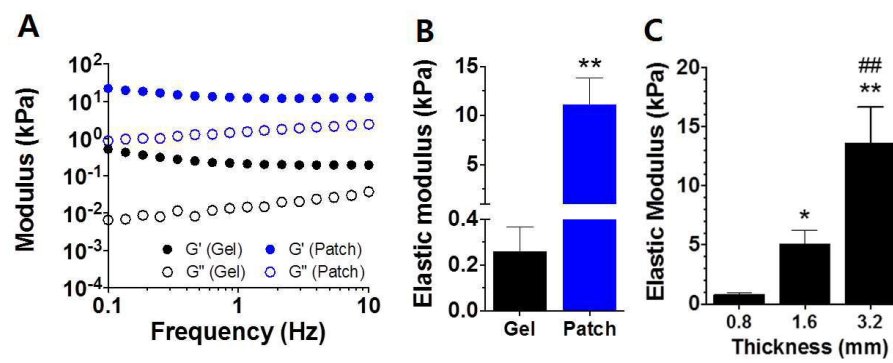
도면3



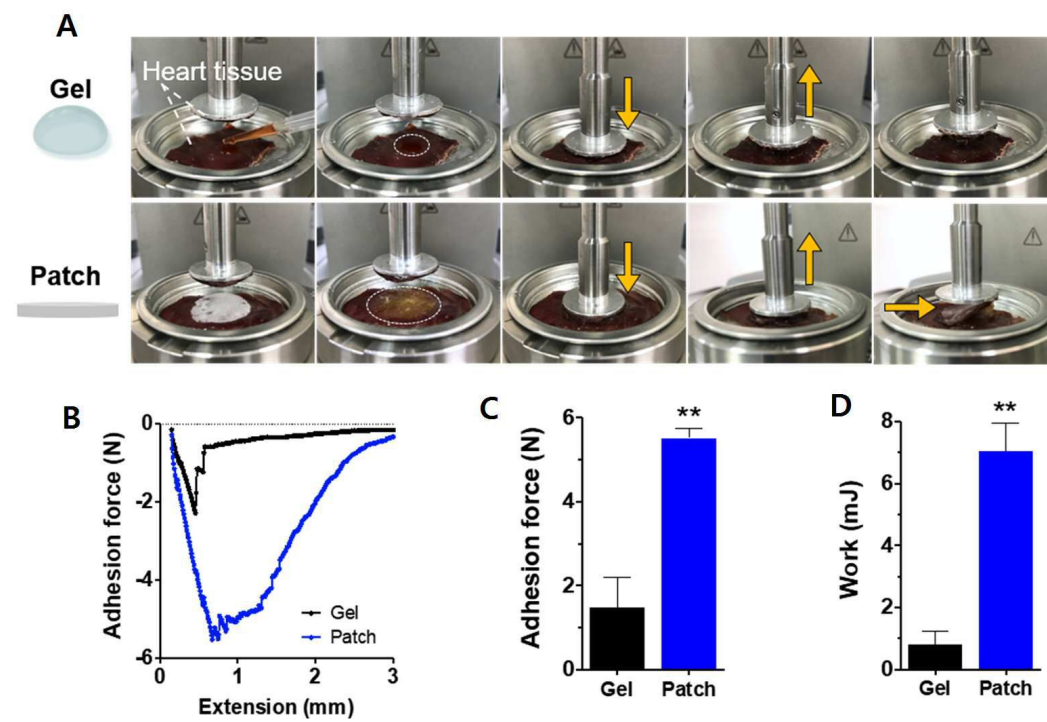
도면4



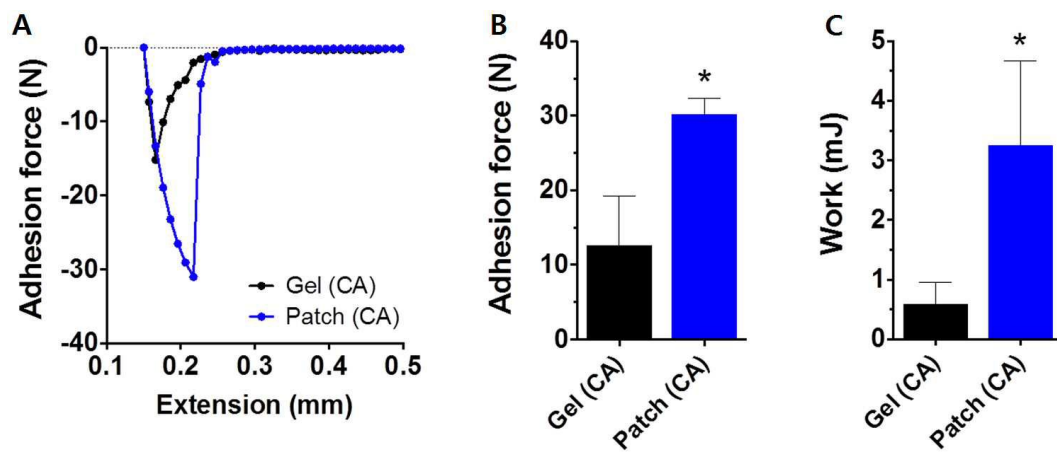
도면5



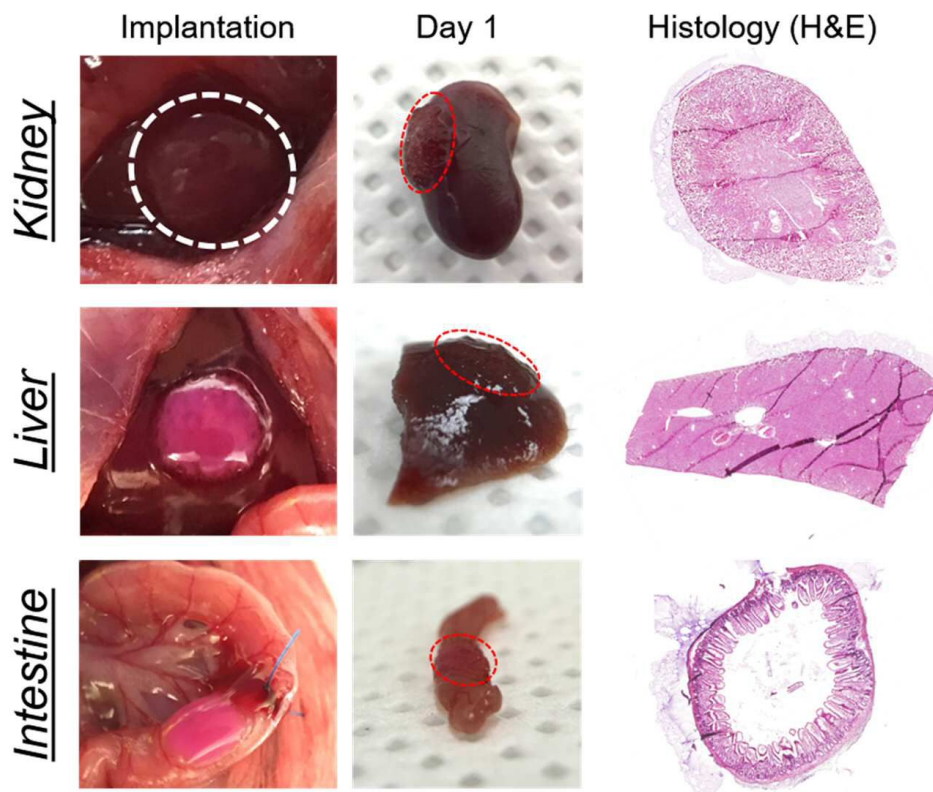
도면6



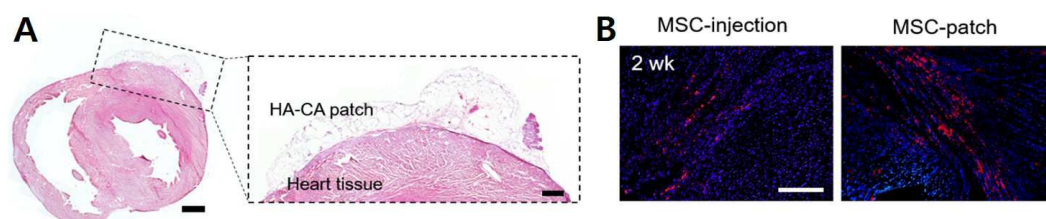
도면7



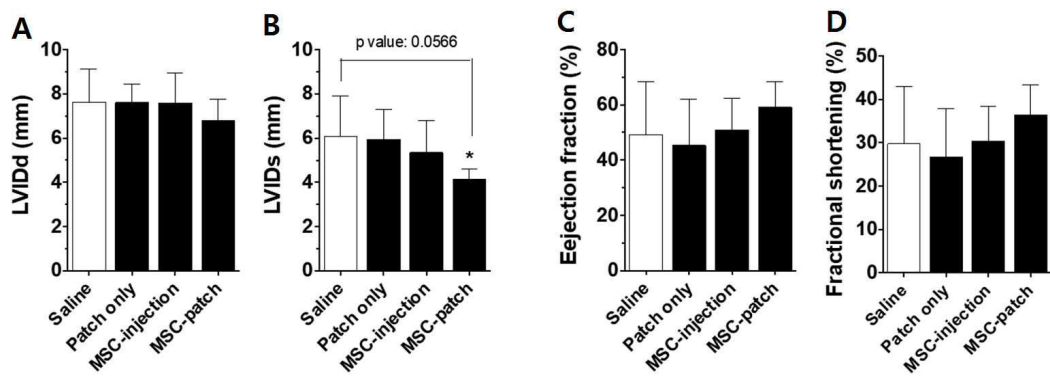
도면8



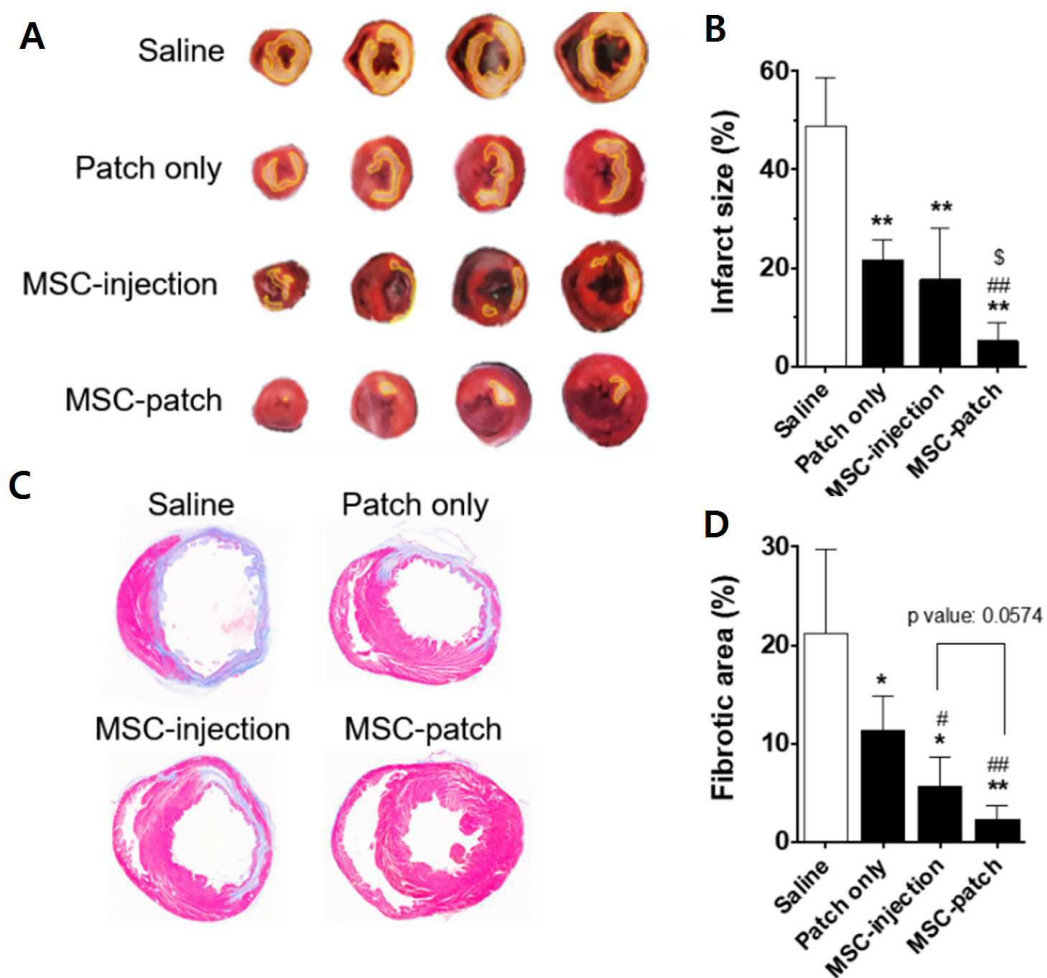
도면9



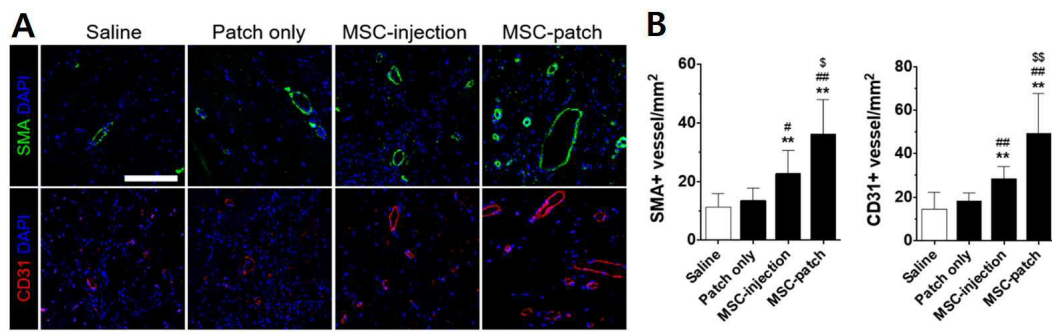
도면10



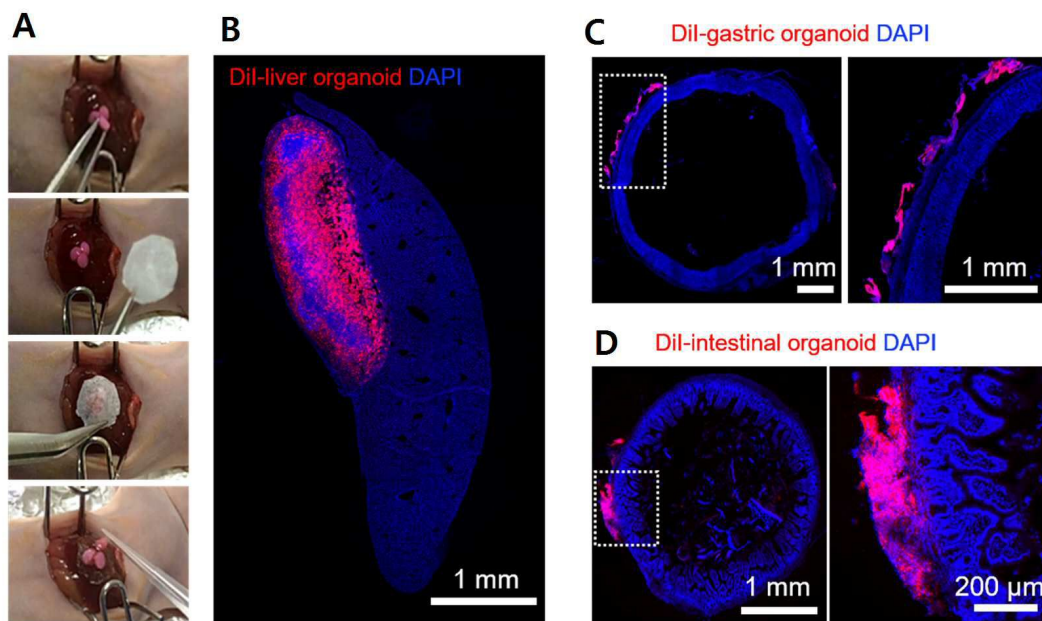
도면11



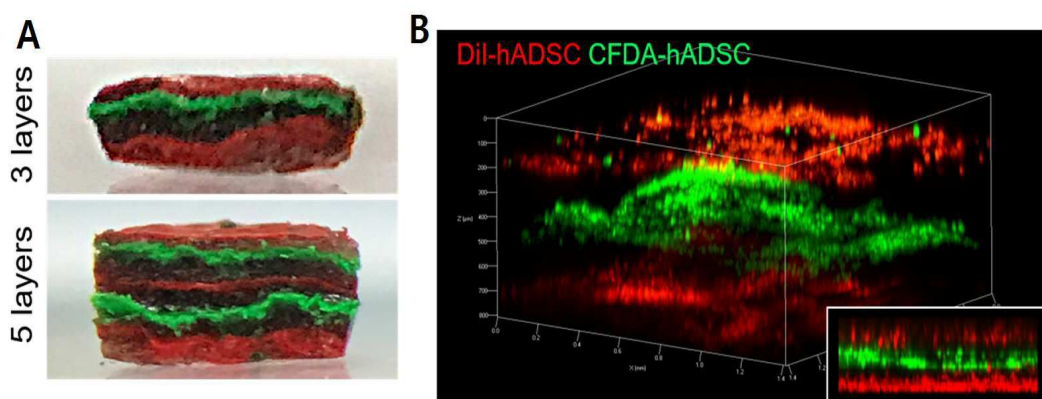
도면12



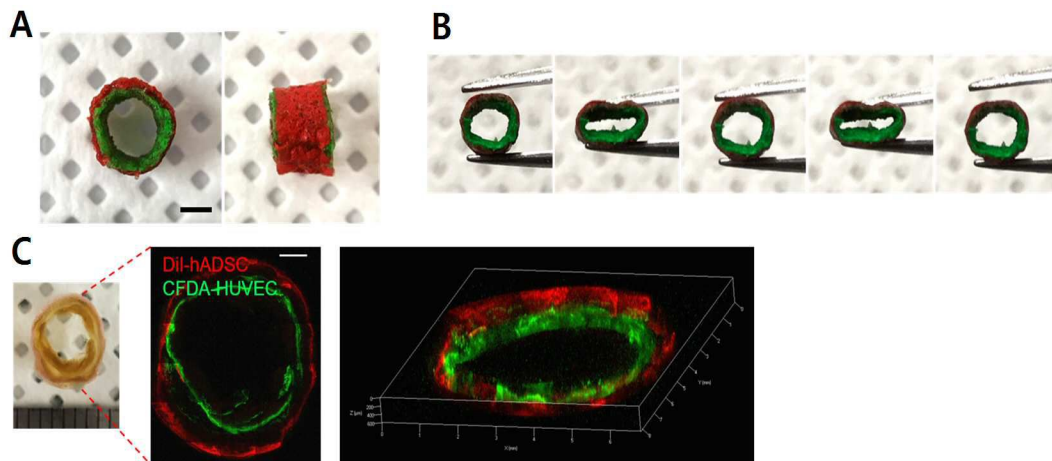
도면13



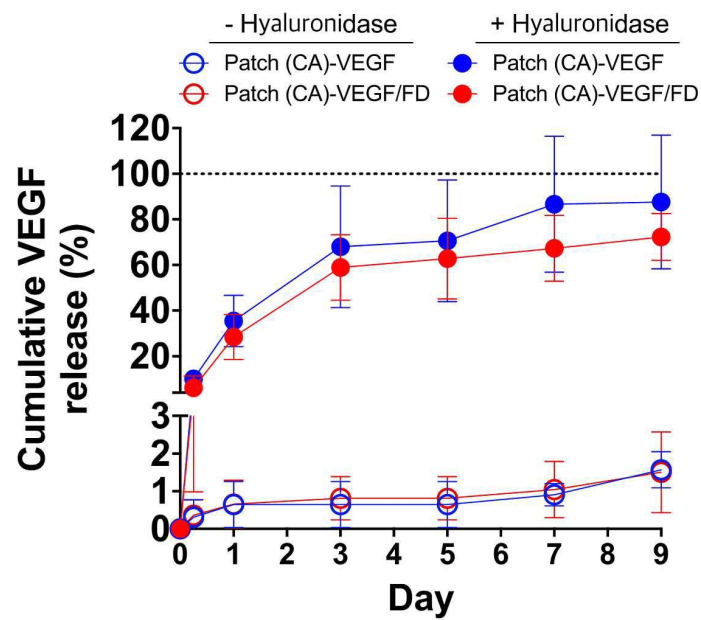
도면14



도면15



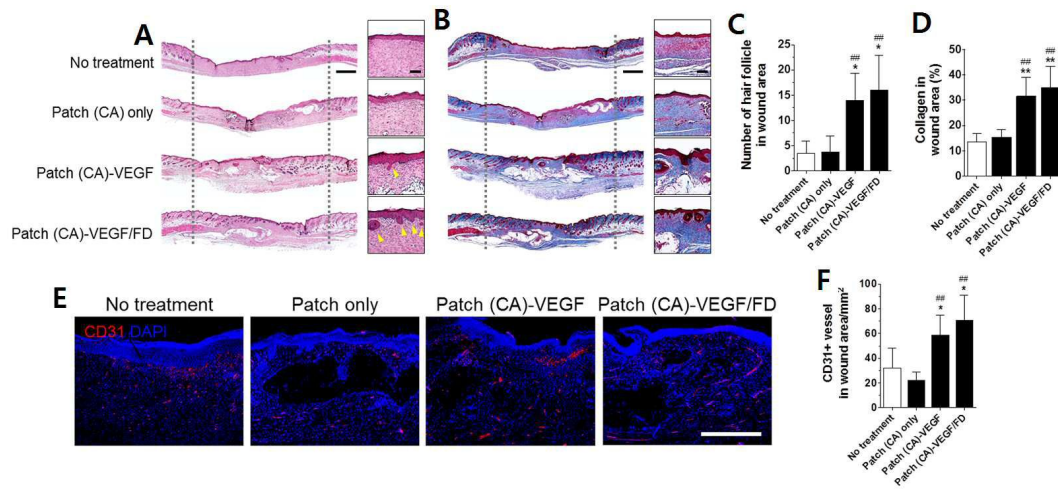
도면16



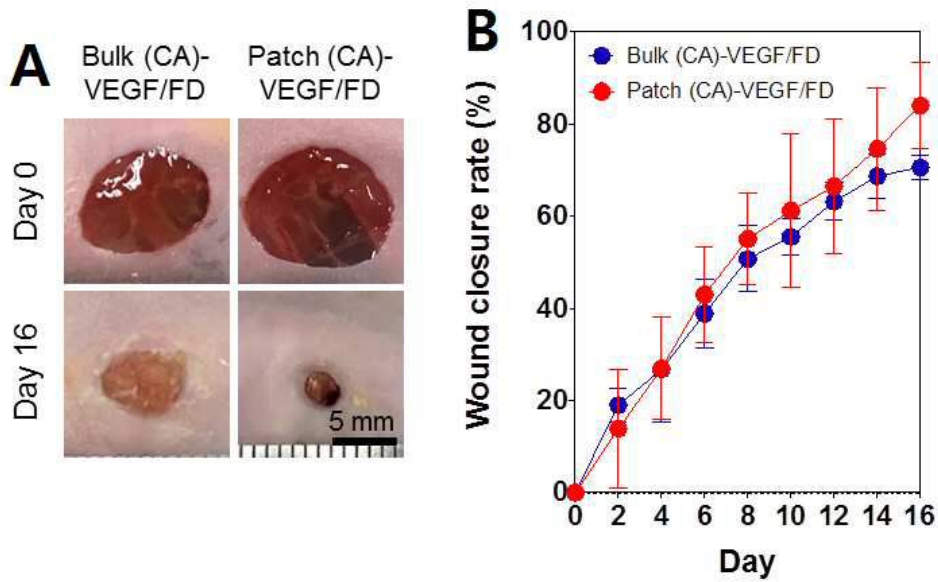
도면17



도면18



도면19

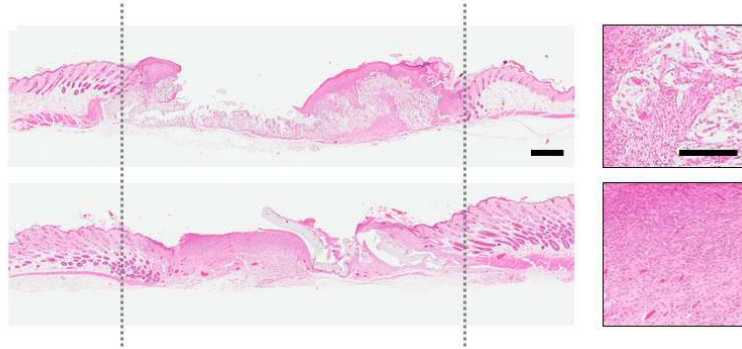


도면20

A

Bulk (CA)-VEGF/FD

Patch (CA)-VEGF/FD



B

Bulk (CA)-VEGF/FD

Patch (CA)-VEGF/FD

