



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0103942
(43) 공개일자 2021년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0010484
(22) 출원일자 2021년01월25일
심사청구일자 2021년01월25일
(30) 우선권주장
1020200018358 2020년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호(신촌동)
윤인식
서울특별시 강남구 언주로 211, 강남세브란스병원 성형외과(도곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

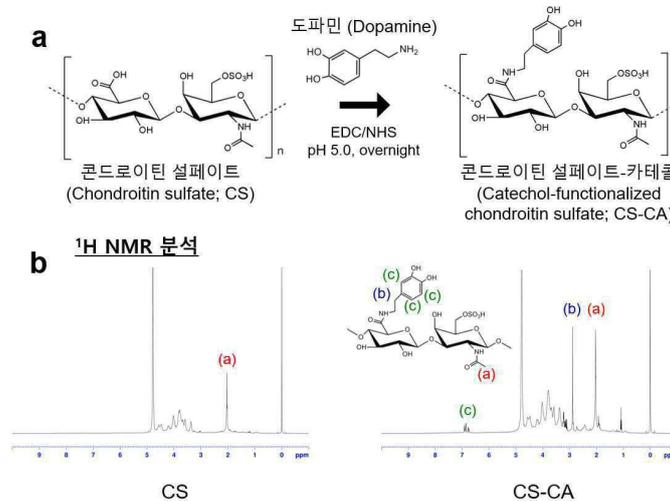
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트를 포함하는 하이드로젤, 상기 하이드로젤을 포함하는 세포 배양용 조성물, 세포 분화 촉진용 조성물, 약물 전달용 조성물, 조직 재생 촉진용 조성물 및 조직 이식용 조성물에 관한 것으로서, 상기 하이드로젤은 조직공학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61L 27/56 (2013.01)
- C08B 37/0072 (2013.01)
- C08J 3/075 (2013.01)
- A61L 2430/06 (2013.01)
- C08J 2305/08 (2013.01)

최수정

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호
(신촌동)

(72) 발명자

신지수

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호
(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105054
과제번호	2018M3A9H1021382
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간 오가노이드 생산 플랫폼
개발(3/3, 1단계)	
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083321
과제번호	2017R1A2B3005994
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진
연구(3/3)	
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

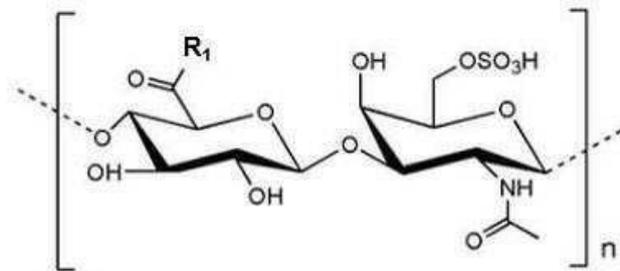
페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트를 포함하는 하이드로젤.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 하기 화학식 1의 구조를 포함하는 것인, 하이드로젤:

[화학식 1]



상기에서, R₁은 페놀 유도체이다.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 페놀 유도체는 카테콜(catechol), 4-tert-부틸카테콜(4-tert-butylcatechol; TBC), 우루시올(urushiol), 알리자린(alizarin), 도파민(dopamine), 도파민 하이드로클로라이드(dopamine hydrochloride), 3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPA), 카페익산(caffeic acid), 노르에피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 3,4-디하이드록시페닐아세트산(3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DOPAC), 이소프레날린(isoprenaline), 이소프로 테레놀(isoproterenol) 및 3,4-디하이드록시벤조산(3,4-dihydroxybenzoic acid)로 이루어진 군에서 선택된 카테콜계 화합물 유래 카테콜기; 또는

파이로갈롤(pyrogallol), 5-하이드록시도파민(5-hydroxydopamine), 탄닌산(tannic acid), 갈산(gallic acid), 에피갈로카테킨(epigallocatechin), 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate), 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드(2,3,4-trihydroxybenzaldehyde), 2,3,4-트리하이드록시벤조산(2,3,4-Trihydroxybenzoic acid), 3,4,5-트리하이드록시벤즈알데하이드(3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde), 3,4,5-트리하이드록시벤즈아마이드(3,4,5-Trihydroxybenzamide), 5-tert-부틸파이로갈롤(5-tert-Butylpyrogallol) 및 5-메틸파이로갈롤(5-Methylpyrogallol)로 이루어진 군에서 선택된 파이로갈롤계 화합물 유래 파이로갈롤기인 것인, 하이드로젤.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 수식된 페놀 유도체를 산화시켜 제조된 것인, 하이드로젤.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 산화는 산화제 또는 효소의 첨가에 의한 것인, 하이드로젤.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 산화는 산화제 또는 효소의 첨가 없이 체내 효소에 의한 것인, 하이드로젤.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 0.1 Hz 내지 10 Hz 기준 탄성계수(elastic modulus)가 0.1 내지 100 kPa 인 것인, 하이드로젤.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 조직 접착성인 것인, 하이드로젤.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 생분해성인 것인, 하이드로젤.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 하이드로젤을 포함하는 세포 배양용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 세포 배양은 3 차원 배양인 것인, 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 하이드로젤을 포함하는 세포 분화 촉진용 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 세포는 줄기세포인 것인, 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 줄기세포는 배아줄기세포, 태아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 15

제 12 항에 있어서,

상기 조성물은 연골세포로의 분화를 촉진시키는 것인, 조성물.

청구항 16

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 약물은 하이드로젤 내에 봉입 또는 담지되는 것인, 조성물.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

상기 약물은 면역세포 활성화제, 항암제, 치료용 항체, 항생제, 항박테리아제, 항바이러스제, 항염증제, 조영제, 단백질 의약품, 성장인자, 사이토카인, 펩티드 약물, 발모제, 마취제 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 19

제 16 항에 있어서,

상기 조성물은 접착성 패치 또는 필름 형태인 것인, 조성물.

청구항 20

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 하이드로젤을 포함하는 조직 재생 촉진용 조성물.

청구항 21

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 하이드로젤을 포함하는 조직 이식용 조성물.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

상기 조성물은 접착성 패치 또는 필름 형태인 것인, 조성물.

청구항 23

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

상기 조직은 간, 심장, 신장, 근육, 위, 장, 폐, 골, 연골, 혈관, 방광, 피부, 뇌, 지방, 갑상선, 침샘, 식도, 췌장, 척수, 인대, 힘줄(건), 치아 및 자궁으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 24

콘드로이틴 설페이트를 페놀 유도체로 수식하는 단계를 포함하는, 페놀 유도체로 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 방법은 수식된 페놀 유도체를 산화시키는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 손상된 연골 조직 치료를 위해 미세천공술(microfracture), 자가 연골 이식술, 연골세포 및 줄기세포 이식술 등과 같은 많은 외과적 수술 및 세포 치료술들이 행해지고 있으나, 미세천공술의 경우 섬유화된 연골 재생을

유도하여 근본적 치료가 되지 못한다는 한계점이 있고, 자가 연골 및 자가 연골세포/줄기세포 이식술의 경우 이식된 세포 및 조직이 손상 부위에 유지되지 못하고 유실되거나, 염증과 같은 병변 부위에서의 주변 환경에 의해 사멸되는 등 그 치료 효과가 미비한 실정이다.

[0004] 따라서, 이러한 외과적 수술 및 세포 치료제의 한계점을 극복하기 위해 다양한 조직공학적 방법들이 개발되어 왔지만, 아직까지 실제 임상 치료에 사용될 만큼 효과적인 시스템은 부재하였다. 특히, 콜라겐, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트 등 세포외기질을 주성분으로 하는 생체적합성 하이드로젤이 효과적인 자가 연골조직 및 세포 이식, 약물 전달을 위한 3 차원 지지체로서 개발되었지만, 실제 연골 조직과의 기계적 물성 차이, 조절이 어려운 분해 거동 및 약한 조직 접착력으로 인한 낮은 생착률 등의 단점으로 인해 장기간에 걸친 연골 재생 유도에 한계가 있었다.

[0005] 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 유도체 기반의 조직 접착성 하이드로젤 개발 및 연골 재생을 위한 치료제로서의 용도에 관한 것으로서, 체내 연골 조직에 많이 함유되어 있는 콘드로이틴 설페이트 고분자에 혼합 접착 성분에서 유래한 카테콜기 또는 명계 접착 성분에서 유래한 갈롤기를 도입하여 하이드로젤을 제작하였다. 개발된 하이드로젤은 연골 조직과 유사한 미세환경을 제공함으로써 3 차원 배양된 줄기세포의 연골 세포로의 분화를 촉진시키고 뛰어난 조직 접착성을 통해 손상된 연골 부위에 효과적으로 부착되어 연골 재생을 증진시킬 수 있다. 조직 접착성 콘드로이틴 하이드로젤은 세포 치료, 자가 연골조직 이식뿐 아니라 서방형 약물 전달에도 적용 가능하여 다양한 방식으로 연골 재생을 유도할 수 있다.

[0006] 특히, 카테콜기가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤 시스템에서는 가교를 위해 산화제가 사용되는 것과는 달리, 보다 산화력이 뛰어난 갈롤기가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤은 추가적 산화제 처리 없이 자연 산화를 통해 가교가 가능함으로써 안전성 측면에서 개선되었으며 그 용도가 더욱 확장될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트를 포함하는 하이드로젤을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤을 포함하는 세포 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직 재생 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직 이식용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 콘드로이틴 설페이트를 페놀 유도체로 수식하는 단계를 포함하는, 페놀 유도체로 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트를 포함하는 하이드로젤을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직 재생 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직 이식용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 콘드로이틴 설페이트를 페놀 유도체로 수식하는 단계를 포함하는, 페놀 유도체로 수식된 콘드

로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 인구 고령화와 스포츠, 등산 등 생활체육 및 여가활동의 증가로 인해 연골 손상 및 관련 질환 발병률이 세계적으로 급증하는 추세이다. 연골 관절염 등 연골 손실과 관련된 질환 시장 규모는 2017년 43억달러에서 2024년 96억 달러로 증가할 것으로 예측되고 있으며 이러한 수치 또한 현재 근본적인 치료제가 없어 환자수에 비해 시장 규모가 적게 나오고 있는 실정이다. 현재는 약물 치료나 수술 등의 방법에 의존하고 있으나 삶의 질 향상을 위해 연골 치환술을 원하는 환자가 5년간 80% 이상 증가하는 추세를 보이며 매년 30% 이상의 증가율을 보이고 있다. 이러한 연골 재생 기술의 막대한 시장성을 고려한다면 연골 재생 능력이 증진된 삼차원 생체재료 지지체 기반 치료제는 상업화에 성공하였을 때 막대한 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0025] 종래 기술의 한계를 극복하기 위해 본 발명에서는 홍합 및 멧게 접착에서 유래한 카테콜기 또는 갈릴기를 연골 조직에 풍부한 세포 외 기질인 콘드로이틴 설페이트 고분자에 도입시켜 연골 조직과 유사한 환경을 제공함과 동시에 기계적 물성 및 분해 속도 조절이 가능하게 하고 조직 접착성을 크게 향상시켜 세포, 조직, 약물의 전달 효율 및 연골 재생 효율을 증진시켰다. 연골 재생에 적합한 기계적, 생리화학적, 생체역학적 성질을 가짐과 동시에 생체적합성 및 조직 접착력까지 뛰어나서 임상적용이 가능한 수준의 연골 재생 치료용 세포, 조직, 약물 전달체로서 높은 가능성을 보여준다.
- [0026] 본 발명에서 개발된 생체모사 접착성 페놀 유도체 수식 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤 시스템은 연골 조직과 유사한 기계적, 생화학적 미세환경 제공과 우수한 조직 접착성에 기인하여 기존 세포, 조직 및 약물 치료의 한계를 극복하여 현재까지 구현되지 못한 장기간 연골 재생 효능을 유도할 수 있는 신개념 의료용 제제로 개발될 수 있을 것으로 기대된다. 현재 국내외로 근본적 연골 조직 재생 치료제가 부재한 만큼 그 시장성이 매우 클 것으로 기대되며 국내뿐 아니라 해외 기술에 의존하고 있는 기능성 생체재료, 조직재생 기술을 대체하여 막대한 수입 대체 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대한다.
- [0027] 개발된 하이드로젤 기술은 주사형 제제뿐 아니라 파티클, 비드 및 패치 등 다양한 형태의 제형으로 변형되어 적용이 가능하므로 연골 재생뿐 아니라 다양한 조직 손상에 적용될 수 있어 그 임상적 적용 범위를 크게 확장할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1a는 카테콜이 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 합성 과정을 나타낸 모식도이고, 1b는 CS-CA 하이드로젤의 ¹H-NMR 분석 결과이다.
- 도 2a는 CS-CA 하이드로젤의 제조 과정 중 반응물들 간의 분자비 조건과 그에 따른 카테콜 치환 정도를 나타낸 것이고, 2b는 젤화 전 및 후를 비교한 결과이다.
- 도 3a 및 3b는 카테콜 치환 정도와 농도에 따른 CS-CA 하이드로젤의 팽윤 양상을 분석한 결과이고, 3c는 CS-CA 하이드로젤의 분해 양상을 분석한 결과이다.
- 도 4는 카테콜 치환 정도와 농도에 따른 CS-CA 하이드로젤의 기계적 물성(a: 탄성계수; 및 b: 압축계수)을 분석한 결과이다.
- 도 5는 카테콜 치환 정도와 농도에 따른 CS-CA 하이드로젤의 조직 접착력(a: 방법; b: 접착력; 및 c: 부착일)을 측정된 결과이다 (대조군: CS-ME(methacrylated CS) 하이드로젤).
- 도 6은 카테콜 치환 정도와 농도에 따른 CS-CA 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포를 3 차원 배양한 후, 세포생존율을 측정된 결과이다 (대조군: CS-ME 하이드로젤).
- 도 7은 CS-CA 하이드로젤과 대식세포(macrophage)를 (a) 간접적 및 (b) 직접적 공배양한 후, 대식세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인 TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 양을 측정된 결과이다.
- 도 8a는 CS-CA 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포(hADSC)를 3 차원 배양하고, 연골 분화 유도 배양액 조건에서 분화시킨 후, 연골 분화 지표인 GAG(Glycosaminoglycan)의 양을 측정된 결과이고, 8b는 real-time qPCR을

통해 연골 분화 마커인 SOX9 및 collagen type II(col2A1)의 발현량을 측정된 결과이며, 8c는 면역형광염색을 통해 collagen type II의 발현량을 측정된 결과이다 (Pellet: 세포를 펠릿 형태로 배양 및 분화시키는 기존 배양 방식; CS-CA: CS-CA 하이드로젤에 줄기세포를 캡슐화시켜 3 차원 배양 및 분화시키는 방식; 및 CS-CA w/dice: CS-CA 하이드로젤에 인간 유래 탈세포 연골조직 조각(dice)을 줄기세포와 함께 캡슐화하여 실제 연골조직과 유사한 3 차원 환경에서 배양 및 분화시키는 방식).

도 9a는 토끼 귀에서 연골을 추출한 후 CS-CA 하이드로젤에 혼합하여 PCL 스캐폴드에 도포하는 방식에 의한 이식체의 제작 방법을 나타낸 것이고, 9b는 기계적 물성(탄성계수)을 분석한 결과이다.

도 10a는 제작된 이식체의 이식 전 및 이식 32 주 후에 적출된 이식체를 비교한 결과이고, 10b는 연골 분화 지표인 GAG(Glycosaminoglycan)의 양을 측정된 결과이며, 10c는 real-time qPCR을 통해 연골 분화 마커인 SOX9 및 collagen type II(col2A1)의 발현량을 측정된 결과이다 (CS-CA: PCL 스캐폴드에 CS-CA 하이드로젤만을 이식한 그룹; 및 CS-CA w/dice: PCL 스캐폴드에 자가 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-CA 하이드로젤을 이식한 그룹).

도 11은 자가 연골조직 이식 후 32주에 조직학 분석을 수행한 결과이다 (CS-CA: PCL 스캐폴드에 CS-CA 하이드로젤만을 이식한 그룹; 및 CS-CA w/dice: PCL 스캐폴드에 자가 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-CA 하이드로젤을 이식한 그룹).

도 12는 마우스 귀 연골 손상 모델에 CS-CA 하이드로젤 또는 기존 평가교된 CS-ME 하이드로젤을 이용하여 토끼 귀 연골조직을 이식한 후, 연골조직 이식 효율 및 조직 통합 효율을 평가한 결과이다 (CS-ME w/dice: 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-ME 하이드로젤을 이식한 그룹); 및 CS-CA w/dice: 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-CA 하이드로젤을 이식한 그룹).

도 13은 CS-CA 하이드로젤에 TGF- β 를 봉입한 후, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)의 처리 유무에 따른 약물 방출 양상을 확인한 결과이다.

도 14는 CS-CA 하이드로젤 패치에 TGF- β 를 봉입한 후, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)의 처리 유무에 따른 약물 방출 양상을 확인한 결과이다 (Patch (CS-CA)-TGF- β : CS-CA 하이드로젤 패치에 TGF- β 단백질을 캡슐화하여 제작된 그룹; 및 Patch (CS-CA)-TGF- β /FD: TGF- β 단백질을 CS-CA 용액에 미리 혼합한 후 패치 형태로 동결건조시키고 CS-CA 하이드로젤 패치를 가교시켜 제작된 그룹).

도 15a는 파이로갈롤이 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤(CS-PG 하이드로젤)의 합성 과정을 나타낸 모식도이고, 15b는 CS-PG 하이드로젤의 ¹H-NMR 분석 결과이다.

도 16a는 CS-PG 하이드로젤의 젤화 전 및 후를 비교한 결과이고, 16b 및 16c는 2 가지 농도(10 wt%, 15 wt%)에 따른 CS-PG 하이드로젤의 팽윤 양상을 분석한 결과이며, 16d는 CS-PG 하이드로젤의 분해 양상을 분석한 결과이다.

도 17은 2 가지 농도(10 wt%, 15 wt%)에 따른 CS-CA 하이드로젤의 (a) 주파수 (0.1~10 Hz) 에 따른 탄성계수 및 (b) 주파수 1 Hz 에서의 평균 탄성계수를 분석한 결과이다.

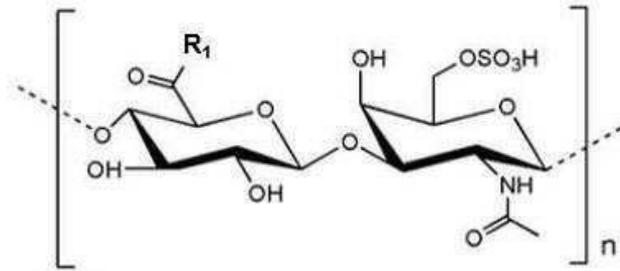
도 18은 CS-PG 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포를 3 차원 배양한 후, 세포생존율을 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트를 포함하는 하이드로젤을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로젤은 하기 화학식 1의 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 상기에서, R₁은 페놀 유도체이다.

[0035]

본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 페놀 유도체는 카테콜(catechol), 4-tert-부틸카테콜(4-tert-butylcatechol; TBC), 우루시올(urushiol), 알리자린(alizarin), 도파민(dopamine), 도파민 하이드로클로라이드(dopamine hydrochloride), 3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPA), 카페익산(caffeic acid), 노르에피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 3,4-디하이드록시페닐아세트산(3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DOPAC), 이소프레날린(isoprenaline), 이소프로 테레놀(isoproterenol) 및 3,4-디하이드록시벤조산(3,4-dihydroxybenzoic acid)로 이루어진 군에서 선택된 카테콜계 화합물 유래 카테콜기; 또는 피로갈롤(pyrogallol), 5-하이드록시도파민(5-hydroxydopamine), 탄닌산(tannic acid), 갈산(gallic acid), 에피갈로카테킨(epigallocatechin), 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate), 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드(2,3,4-trihydroxybenzaldehyde), 2,3,4-트리하이드록시벤조산(2,3,4-Trihydroxybenzoic acid), 3,4,5-트리하이드록시벤즈알데하이드(3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde), 3,4,5-트리하이드록시벤즈아미드(3,4,5-Trihydroxybenzamide), 5-tert-부틸피로갈롤(5-tert-Butylpyrogallol) 및 5-메틸피로갈롤(5-Methylpyrogallol)로 이루어진 군에서 선택된 피로갈롤계 화합물 유래 피로갈롤기인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036]

본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로젤은 페놀 유도체로 수식된 콘드로이틴 설페이트에서, 수식된 페놀 유도체를 산화시켜 가교된 것일 수 있다. 상기 산화는 산화제 또는 효소의 첨가에 의해 수행될 수 있다. 상기 산화제는 과요오드산나트륨(sodium periodate, NaIO₄) 및 과산화수소(H₂O₂)인 것일 수 있고, 상기 효소는 과산화효소(oxidase)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037]

또한, 상기 산화는 산화제 또는 효소의 사용 없이 체내 효소에 의한 것일 수 있다. 산화능이 더욱 강한 페놀 유도체로 수식할 경우, 예를 들어, 피로갈롤로 수식할 경우, 추가적인 산화제 또는 효소의 사용 없이 체내 효소에 의한 산화로 가교될 수 있다.

[0038]

본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로젤은 0.1 Hz 내지 10 Hz 기준 탄성계수(elastic modulus)가 0.1 내지 100 kPa 인 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 50 kPa, 0.1 내지 30 kPa, 0.1 내지 20 kPa, 0.1 내지 10 kPa, 1 내지 10 kPa인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039]

본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로젤은 조직 접착성 또는 생분해성인 것일 수 있다.

[0041]

또한, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공한다.

[0042]

본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포 배양은 3 차원 배양인 것일 수 있고, 상기 세포는 줄기세포, 조혈모세포, 간세포, 섬유세포, 상피세포, 중피세포, 내피세포, 근육세포, 신경세포, 면역세포, 지방세포, 연골세포, 골세포, 혈액세포 또는 피부세포일 수 있고, 세포 종류에 관계없이 본 발명의 하이드로젤에서 성장이 가능한 모든 세포에 적용할 수 있다.

[0043]

또한, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤을 포함하는 세포 분화 촉진용 조

성물을 제공한다.

- [0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것일 수 있고, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 태아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 줄기세포에서 연골세포로의 분화를 촉진시키는 것일 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 약물은 하이드로젤 내에 봉입 또는 담지되는 것일 수 있고, 상기 약물은 면역세포 활성화제, 항암제, 치료용 항체, 항생제, 항박테리아제, 항바이러스제, 항염증제, 조영제, 단백질 의약품, 성장인자, 사이토카인, 펩티드 약물, 발모제, 마취제 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 항암제는 독소루비신, 다우노마이신, 에피루비신, 아이다루비신 등의 안트라사이클린계 (anthracycline); 파클리탁셀, 도세탁셀, 카바지탁셀, 테세탁셀 등의 타산계 (taxane); 커큐민, 캄포테신, 베르베린, 에보디아민, 마트린, 피페린, 상귀나린, 테트라드린, 탈리카르핀, 엘립티신 등의 알칼로이드계 (Alkaloid); 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 등의 빈카 알칼로이드계 (vinca alkaloids); 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴 등의 플라티넘계 (platinum); 5-플루오로우라실, 카페시타빈, 메토티렉세이트, 켄시타빈 등의 대사길항제 (antimetabolites); 이리노테칸, 토포테칸, 에토포시드, 테니포사이드, 에토포사이드, 암사크린 등의 토포아이스머라아제 저해제 (topoisomerase inhibitor); 블레오마이신, 악티노마이신, 미토마이신, 미톡산트론 등의 항종양 항생제 (antitumor antibiotics); 시클로포스파미드, 메클로레타민, 클로람부실, 멜팔란, 니트로소우레아 등의 알킬화제 (alkylating agent); 아자시티딘, 아자티오프린, 사이타라빈, 독시플루리딘, 하이드록시유리아, 메르캅토피린, 메토티렉세이트 등의 뉴클레오사이드 유사체 (nucleoside analog); 작은 간섭 리보핵산 (small interfering RNA, siRNA), 작은 헤어핀 리보핵산 (small hairpin RNA, shRNA), 마이크로 리보핵산 (microRNA, miRNA), 플라스미드 데옥시리보핵산 (plasmid DNA) 등의 유전자약물; L-아스파라지나제 등의 효소계 (enzyme); 트리톨레린 아세테이트, 메제스트롤 아세테이트, 플루타미드, 비카루타마이드, 고세레린 등의 호르몬계 (hormone); 시토크롬 씨; 및 p53 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 치료적 항체는 트라스트주맙, 리투시맙, 베바시주맙, 세특시맙, 포테조밋, 엘로티닙, 제피티닙, 이메티닙 메실레이트, 수니티닙, 팜브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 이필리무맙 및 블리나투모맙로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 항생제는 베타락탐계 (β -lactams), 아미노글리코사이드계 (aminoglycosides), 매크로라이드계 (macrolides), 테트라사이클린계 (tetracyclines), 글리코펩티드계 (glycopeptides), 린코마이신계 (lincosamides), 퀴놀론계 (quinolones), 클로람페니콜 (chloramphenicol), 설파제 (sulfa), 트리메소프림 (trimethoprim), 폴리믹신 (polymyxin), 바시트라신 (bacitracin), 무피로신 (mupirocin), 푸시딘산 (fusidic acid), 스트렙토그라민 (streptogramin) 및 옥사졸리디논 (oxazolidinone)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 상기 항박테리아제는 메트로니다졸, 세크니다졸, 오르니다졸, 티니다졸, 클린다마이신, 소듐 폴리스티렌설페이트 및 소듐 세룰로로오스설페이트로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 항바이러스제는 아시클로빌, 비다라빈, 간시클로빌, 포스카넛, 팜시클로빌, 리바비린, 아만타딘, 자마니빌 및 오세르타미빌로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 항염증제는 이부프로펜, 텍시부프로펜, 나프록센, 페노프로펜, 케토프로펜, 텍스케토프로펜, 플루르비프로펜, 옥사프로진, 록소프로펜, 인도메타신, 톨메틴, 숄리닥, 에토돌락, 케톨락, 디클로페낙, 나부메톤, 피록시캠, 멜록시캠, 테녹시캠, 드록시캠, 로르녹시캠, 이속시캠, 메페남산, 메클로페남산, 플루페남산, 톨페남산, 니플룸산, 아스피린, 디플루니살, 살살레이트, 텍사메타손 등의 NSAID로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 조영제는 PET 조영제, CT 조영제, MRI 조영제, 광학 영상 조영제 및 US 조영제로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 성장인자는 혈관내피 성장인자, 표피 성장인자, 각질세포 성장인자, 성장분화인자, 간세포 성장인자, 혈소

관유래 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 및 저산소증-유도 인자-1로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 상기 사이토카인은 인터루킨, 림포카인, 모노카인, 케모카인, 인터페론 및 아디포카인으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 상기 발모제는 피나스테라이드, 두타스테라이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 상기 마취제는 로피바카인, 부피바카인, 클로르프로카인, 리도카인, 메피바카인, 프로카인, 테트라카인, 레보부피바카인 및 아티카인으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 접착성 패치 또는 필름 형태인 것일 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤을 포함하는 조직 재생 촉진용 조성물을 제공한다.

[0061] 또한, 본 발명은 페놀 유도체가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤을 포함하는 조직 이식용 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조직은 간, 심장, 신장, 근육, 위, 장, 폐, 골, 연골, 혈관, 방광, 피부, 뇌, 지방, 갑상선, 침샘, 식도, 췌장, 척수, 인대, 힘줄(건), 치아 및 자궁으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 연골 조직인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물은 접착성 패치 또는 필름 형태인 것일 수 있고, 하이드로젤 내에 약물이 봉입 또는 담지될 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명은 콘드로이틴 설페이트를 페놀 유도체로 수식하는 단계; 및 수식된 페놀 유도체를 산화시키는 단계를 포함하는, 페놀 유도체로 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조 방법을 제공한다. 상기 산화는 산화제 또는 효소의 첨가에 의해 수행되거나, 산화제 또는 효소의 사용 없이 체내 효소에 의한 것일 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 활성 성분의 기능을 저해하지 않는 범위 내에서 추가적으로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0066] 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대, 껍틴, 히알루론산, 콜라겐, 락토즈, 벡스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여는 약학적으로 유효한 양을 투여할 수 있다. "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이, 치료의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.

[0068] 본 발명의 약학적 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에

멸전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 구체적으로는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타플 라스마제의 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여를 위한 제제는 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명은 페놀 유도체(카테콜기 또는 갈롤기)가 수식된 콘드로이틴 설페이트 유도체를 합성하고 하이드로젤을 제작하는 방법으로서, 줄기세포의 삼차원 배양 및 분화, 자가 연골 조직 이식, 및 약물 전달하는 방식에 관한 것이다. 본 발명에서는 합성된 콘드로이틴 설페이트 유도체의 카테콜기 수식 정도 및 고분자 농도 조건 조절을 통해 하이드로젤의 팽창 정도, 분해 속도, 기계적 물성, 접착성 등 다양한 특성을 쉽게 조절할 수 있음을 확인하였고, 이를 통해 상기 유도체를 목적과 용도에 맞게 변형 및 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0071] 본 발명에서 개발된 카테콜기 또는 파이로갈롤기가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤은 세포 독성이 거의 없으며, 면역 반응을 일으키지 않는 생체친화적 생체재료로서, 줄기세포의 3 차원 배양이 가능함을 확인하였고, 연골 조직 유사 환경 제공을 통해 연골세포로의 분화를 촉진시키는 방법을 개발하였다. 이를 이용해 연골 조직 재생을 위한 줄기세포 이식용 지지체로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0072] 나아가, 본 발명에서는 카테콜기 또는 갈롤기가 수식된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤의 뛰어난 조직 접착력을 이용해 자가 연골 조직을 생체 내로 효과적으로 이식하여 연골 재생을 유도하는 새로운 연골 조직 재건 방법을 개발하였다. 연골 조직 결손 부위에 손상없이 안정적으로 자가 연골 조직을 전달함으로써 기존 이식 방법에서는 해결하지 못한 낮은 생착능과 관련된 문제점을 극복하여 보다 효율적인 연골 재생을 유도하는 조직공학적 치료술을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

[0073] 또한, 콘드로이틴 설페이트 고분자에 수식된 홍합 및 멧게 접착 모사 페놀 유도체는 산화 과정을 통해 다양한 친핵성 작용기들과 결합할 수 있는 능력을 갖기 때문에, 이러한 작용기를 가지고 있는 다양한 약물을 전달할 수 있는 시스템으로 활용이 가능하다. 실제로 생체 내의 콘드로이틴 설페이트 분해 조건을 모사한 체외 환경에서, 본 발명에서 개발된 콘드로이틴 설페이트 하이드로젤에 탑재된 성장인자 단백질이 서방형 제어 방출 거동을 보임을 확인함으로써 연골 재생을 위한 효율적인 약물 전달 시스템으로서의 개발 가능성도 매우 높을 것으로 기대된다.

[0075] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] **실시예 1. 페놀 유도체(카테콜)가 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조**

[0078] 유도체 합성을 위해 EDC(1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, Thermo Fisher Scientific)/NHS(N-hydroxysuccinimide, Sigma) 화학반응을 적용하여, 콘드로이틴 설페이트(CS)에 도파민(dopamine)을 수식하였다 (도 1a). 합성을 완료한 유도체는 ¹H-NMR 분석을 통해 콘드로이틴 설페이트(CS)에 도파민의 카테콜 그룹이 성공적으로 수식됨을 확인하였다 (도 1b).

[0079] 카테콜이 수식된 콘드로이틴 설페이트 유도체(이하, "CS-CA 유도체")는 합성 과정에서 반응물들의 몰비를 조절함으로써 치환도(Degree of substitution; DS)를 조절하였고 (도 2a), 3 종류의 서로 다른 치환도를 갖는 CS-CA 유도체(CS-CA 3x; CS-CA 5x; 및 CS-CA 10x)를 합성하였다. 이후, PBS 및 증류수를 이용하여 CS-CA 용액을 준비하였고, CS-CA 용액에 산화제(sodium periodate, NaIO₄) 처리하여 가교 반응을 통해, 카테콜이 수식된 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(이하 "CS-CA 하이드로젤")을 제조하였다 (도 2b). CS-CA 용액 및 산화제(NaIO₄ solution, 12.5 mg/ml)는 3 : 1 (부피비)로 처리하였다.

[0081] 실시예 2. 카테콜의 치환 정도와 농도에 따른 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 물리화학적 특성 분석

[0082] 서로 다른 치환도를 갖는 3 종류의 CS-CA 유도체에 각각 2 가지의 농도 조건(CS-CA 3x: 10 wt%, 15 wt%; CS-CA 5x: 10 wt%, 15 wt%; 및 CS-CA 10x: 5 wt%, 10 wt%)에서 CS-CA 하이드로젤을 제작하여 카테콜의 치환 정도와 농도에 따른 팽윤도 및 분해 양상을 비교하는 실험을 수행하였다. CS-CA 10x는 15 wt% 조건에서 물에 잘 녹지 않고, 점성(viscosity)이 높아 실험에서 제외하였다.

[0083] 그 결과, 7 일 동안 생리학적 조건(37°C in PBS 버퍼) 하에 유지되는 동안 카테콜의 치환도가 낮아질수록 하이드로젤의 팽윤도가 높아짐을 확인하였다 (도 3a 및 3b). 또한, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소 처리를 통해 분해 양상을 비교한 결과, 카테콜의 치환도와 농도가 높아질수록 하이드로젤의 분해가 확연히 느려짐을 확인하였다 (도 3c).

[0085] 실시예 3. 카테콜의 치환 정도와 농도에 따른 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 기계적 물성 분석

[0086] 본 발명에서 유변학적 분석을 통해 주파수 0.1 - 10 Hz 사이에서 다양한 카테콜의 치환도와 농도 조건에서 CS-CA 하이드로젤의 탄성계수를 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 카테콜의 치환도와 농도가 높아질수록 탄성계수가 증가하여 하이드로젤의 기계적 강도가 향상됨을 확인하였다 (도 4a).

[0087] 또한, 본 발명에서 압입 분석(indentation)을 통해 다양한 카테콜의 치환도와 농도 조건에서 CS-CA 하이드로젤의 압축계수를 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 탄성계수와 마찬가지로, 카테콜의 치환도와 농도가 높아질수록 압축계수가 증가하여, 압력을 잘 버티는 힘을 가짐을 확인하였다 (도 4b).

[0088] 상기 결과로부터, 연골 재생에 있어서 하중을 버티는 힘이 매우 중요한데, 카테콜의 치환도와 농도가 높은 CS-CA 하이드로젤은 연골 재생 용도로 적합할 수 있음을 확인하였다.

[0090] 실시예 4. 카테콜의 치환 정도와 농도에 따른 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 조직 접착력 측정

[0091] 유변학 분석 장비를 이용하여 Tack test 모드로 하이드로젤의 접착력을 측정하는 실험을 수행하였다. 간단히, 돼지 연골 조직(porcine cartilage)을 이용하여, 다양한 카테콜의 치환도 및 농도 조건에서 형성된 CS-CA 하이드로젤 또는 기존 광가교 방식으로 제조된 CS-ME(methacrylated CS) 하이드로젤의 접착력을 측정하여 비교하였다 (도 5a).

[0092] 그 결과, 기존의 CS-ME 하이드로젤은 접착력을 거의 보이지 않는 반면, CS-CA 하이드로젤은 모든 조건에서 우수한 조직 접착력을 보였고, 특히, 카테콜의 치환도 및 농도가 증가된 CS-CA 하이드로젤에서 조직 접착력이 현저히 증가하였음을 확인하였다 (도 5b). 또한, 조직에 부착된 하이드로젤을 조직에서 떼어내는데 필요한 일의 양(부착일) 역시 카테콜의 치환도와 농도가 증가된 CS-CA 하이드로젤에서 현저히 증가하였음을 확인하였다 (도 5c).

[0093] 상기 결과로부터, 카테콜의 치환도 및 농도를 조절함으로써, CS-CA 하이드로젤의 물리화학적 성질, 기계적 성질 및 접착능까지 모두 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0095] 실시예 5. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)을 이용한 3차원 줄기세포 배양 시 세포독성 분석

[0096] 다양한 카테콜의 치환도 및 농도 조건의 CS-CA 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포(hADSC)를 3차원 배양한 후, 세포생존율을 분석하는 실험을 수행하였다. 간단히, 각 CS-CA 하이드로젤 또는 CS-ME 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포를 분주하고 7일 동안 배양한 후, Live/dead 염색을 통해 세포생존율을 분석하였다.

[0097] 그 결과, 다양한 카테콜의 치환도 및 농도 조건의 CS-CA 하이드로젤 내에서 배양된 인간 지방유래줄기세포는 높은 생존율을 보임으로써, 세포독성이 거의 나타나지 않음을 확인하였다 (도 6a 및 6b). 반면, 기존 CS-ME 하이드로젤 내에 배양된 인간 지방유래줄기세포는 배양기간이 증가함에 따라 세포생존율이 감소하는 경향을 보였고,

농도가 증가함에 따라 세포독성이 확연하게 나타났다 (도 6a 및 6b).

[0098] 상기 결과로부터, CS-CA 하이드로젤은 세포독성이 나타나지 않음으로써 우수한 생체적합성을 가짐을 확인하였다.

[0100] **실시예 6. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 면역반응 분석**

[0101] 하이드로젤과 대식세포(macrophage)의 직접적/간접적 공배양을 통해 대식세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인 TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 양을 측정하여 면역반응 유발 정도를 확인하는 실험을 수행하였다. 간접적 공배양을 위해 Transwell model을 이용하였으며, 하이드로젤에서 방출되는 분해 산물 및 가교에 사용된 물질 등에 의한 면역반응을 확인하였다. 또한, 직접적 공배양을 위해 세포 배양 플레이트 웰에 하이드로젤을 미리 코팅한 후, 그 위에 대식세포를 분주하여 세포가 직접적으로 하이드로젤에 부착되어 배양되도록 하고 세포와 하이드로젤의 직접적 상호작용에 의한 면역반응을 관찰하였다.

[0102] 그 결과, 공배양 방식에 상관없이, CS-CA 하이드로젤과의 공배양에서는 어떤 처리도 하지 않은 그룹과 거의 유사한 수준으로 대식세포가 분비하는 TNF- α 의 함량이 높지 않음을 확인하였으며, CS-ME 하이드로젤과 공배양시에는 TNF- α 분비량이 크게 증가함을 확인하였다 (도 7a 및 7b).

[0103] 상기 결과로부터, CS-CA 하이드로젤은 기존 광가교 CS 하이드로젤과 비교하여 면역반응 유발 가능성이 매우 낮음을 확인하였다.

[0105] **실시예 7. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)을 이용한 3차원 줄기세포 배양 시 줄기세포의 분화 증진 효능 분석**

[0106] CS-CA 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포(hADSC)를 3 차원 배양한 후, 21 일 동안 연골 분화 유도 배양액 조건에서 분화시켜 분화 효율을 확인하는 실험을 수행하였다. 각 실험 그룹은 다음과 같다: (1) Pellet 그룹: 세포를 펠릿(pellet) 형태로 배양 및 분화시키는 기존 배양 방식; (2) CS-CA 그룹: CS-CA 하이드로젤에 줄기세포를 캡슐화시켜 3 차원 배양 및 분화시키는 방식; 및 (3) CS-CA w/dice 그룹: CS-CA 하이드로젤에 인간 유래 탈세포 연골조직 조각(dice)을 줄기세포와 함께 캡슐화하여 실제 연골조직과 유사한 3 차원 환경에서 배양 및 분화시키는 방식.

[0107] 분화 여부는 연골 분화 지표인 글리코사미노글리칸(Glycosaminoglycan, GAG)의 생성 여부를 DMB(1,9-dimethylmethylene blue) 염색을 통해 정량하였고, 전체 DNA 양으로 표준화하였다. 그 결과, pellet 그룹에서는 GAG의 양이 매우 낮은 반면, CS-CA 하이드로젤에서는 GAG의 양이 현저히 증가함으로써 연골세포로의 분화가 현저하게 증진되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 8a). 특히, CS-CA 하이드로젤에 탈세포 연골조직 조각이 포함된 CS-CA w/dice 그룹에서는 CS-CA 하이드로젤만을 사용한 경우보다 더욱 현저하게 GAG의 양이 향상되었음을 확인하였다 (도 8a).

[0108] 또한, real-time qPCR을 통해 연골 분화 마커인 SOX9 및 collagen type II(col2A1)의 발현량을 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, CS-CA 하이드로젤 그룹 및 CS-CA w/dice 그룹에서는 기존 방식인 pellet 그룹에 비해 SOX9 및 collagen type II(col2A1)의 mRNA 발현량이 현저히 증가하였음을 확인하였다 (도 8b).

[0109] 또한, 면역형광염색을 통해 collagen type II의 발현량을 확인하는 실험을 수행하였다(세포핵: DAPI). 그 결과, CS-CA 하이드로젤 그룹에서는 기존 방식인 pellet 그룹에 비해 collagen type II의 발현량이 현저히 증가하였고, 특히, CS-CA w/dice 그룹에서는 CS-CA 하이드로젤 그룹에 비해 collagen type II의 발현량이 더욱 증가하였음을 확인하였다 (도 8c).

[0110] 상기 결과로부터, CS-CA 하이드로젤은 줄기세포의 3 차원 배양을 가능하게 하고, 줄기세포의 분화를 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0112] **실시예 8. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 조직 이식능 분석**

[0113] 동물모델에서 자가 연골 이식 및 체내에서의 연골 형성 효능을 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, 3차원 프린팅 기법으로 제작된 PCL (Polycaprolactone) 고분자로 스캐폴드(이하, "PCL 스캐폴드")를 제작하였다 (향후

귀 조직 스캐폴드를 제작하여 인공 귀 이식체 제작에 사용하기 위함). 이후, 토끼 귀에서 연골을 추출한 후 CS-CA 하이드로젤에 혼합하여 PCL 스캐폴드에 도포하는 방식으로 이식체를 제작하였다 (도 9a).

[0114] 유변학 분석 장비를 이용하여 토끼 모델에 이식한 자가 연골조직 이식체의 탄성계수를 측정하였다. 그 결과, PCL 스캐폴드의 높은 기계적 강도 덕분에 자가 연골조직이 포함된 CS-CA 하이드로젤의 탄성 계수가 14 kPa에서 1.1 mPa로 크게 향상되었으며, 이는 인간 연골 조직의 탄성 계수 (0.2~2.5 mPa)와 유사한 수치임을 확인하였다 (도 9b).

[0115] 제작된 이식체와 연골 조직없이 CS-CA 하이드로젤만을 도포한 PCL 스캐폴드를 동일한 토끼 모델의 피하에 이식하였고, 이식 후 8, 16, 24 및 32 주에 각각 이식체를 수거해 연골 형성 효능을 확인하였다. 이식 32 주 후 적출된 이식체를 육안으로 관찰한 결과, CS-CA 하이드로젤이 생분해되어 연골 조직과 유사한 형태로 PCL 스캐폴드에 조직이 채워져 있음을 확인하였다(도 10a).

[0116] 특히, 자가 연골조직 이식 후 32주에 수거된 이식체에 대한 조직학 분석을 실시하였을 때, 자가 연골조직이 포함되어 이식된 3D PCL 스캐폴드/CS-CA 하이드로젤 이식체에서 상당한 수준의 연골조직의 존재가 관찰되었다 (도 11).

[0117] 또한, 이식체 내 형성된 GAG 양을 DMB 염색을 통해 정량하고, 전체 DNA 양으로 표준화하였다. 그 결과, PCL 스캐폴드에 자가 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-CA 하이드로젤을 이식한 그룹에서는 CS-CA 하이드로젤만을 이식한 그룹에 비해 시간에 따라 GAG 생성이 현저히 증진되는 효과가 있었다 (도 10b).

[0118] 또한, 이식체 내 세포를 수거하여 RNA를 추출하고, real-time qPCR을 통해 연골세포 마커인 SOX9 및 collagen type II (col2A1)의 mRNA 발현량을 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, PCL 스캐폴드에 자가 연골조직 조각(dice)이 포함된 CS-CA 하이드로젤을 이식한 그룹에서는 CS-CA 하이드로젤만을 이식한 그룹에 비해 SOX9 및 collagen type II (col2A1)의 mRNA 발현량이 현저히 증가하였고, 시간이 지남에 따라 SOX9 및 collagen type II (col2A1)의 mRNA 발현량이 증가하는 경향으로 나타났다 (도 10c).

[0119] 또한, 마우스 귀 연골 손상 모델에 CS-CA 하이드로젤 또는 기존 평가교된 CS-ME 하이드로젤을 이용하여 토끼 귀 연골조직을 이식한 후, 조직 접착성 CS-CA 하이드로젤의 연골조직 이식 효율 및 조직 통합 효율을 평가하는 실험을 수행하였다. 마우스 귀 연골 손상 모델은 마우스 귓바퀴에 생검 펀치(biopsy punch)를 이용해 2 mm 지름의 구멍을 뚫어 제작하였다.

[0120] 그 결과, 연골 이식 3일 후, CS-ME 하이드로젤은 조직 접착성이 없어, 이식된 부위에 유지되지 못하고 완전히 손실되었다 (도 12a). 반면, CS-CA 하이드로젤은 뛰어난 조직 접착성을 가지고 있어, 결손 부위 조직에 안정적으로 완전히 부착된 채로 유지되었다 (도 12a). 특히, 조직학 결과에서와 같이, 주변 조직과의 밀접한 연결을 통해 이식된 연골 조직의 효율적인 통합을 가능하게 하였다 (도 12b).

[0121] 상기 결과로부터, 접착성 CS-CA 하이드로젤은 생체 내에서 장기간 이식된 연골조직의 유지 및 생착을 증진시키는 효과가 있어, 자가 연골을 효과적으로 이식하는데 사용될 수 있고, 연골 형성을 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0123] **실시예 9. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤(CS-CA 하이드로젤)의 약물 전달능 분석**

[0124] CS-CA 하이드로젤의 약물 방출 양상을 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, CS-CA 하이드로젤 내에 연골 형성을 유도한다고 알려진 TGF-β 단백질을 탑재하고, 37°C의 PBS 버퍼 또는 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 포함된 용액에서 TGF-β의 방출 양상을 관찰하였다. TGF-β의 방출량은 ELISA 분석을 통해 확인하였다.

[0125] 그 결과, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 처리되지 않은 경우에는 카테콜과 단백질의 다양한 친핵성 작용기들의 강한 결합으로 인하여 CS-CA 하이드로젤로부터 TGF-β의 방출이 거의 일어나지 않은 반면, 인체 내 환경을 모사한 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 처리된 경우에는 2주 동안 서서히 CS-CA 하이드로젤로부터 TGF-β가 방출됨을 확인하였다 (도 13).

[0126] 상기 결과로부터, CS-CA 하이드로젤은 TGF-β와 같은 약물이 봉입될 수 있고, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)의 활성이 증가된 조직 결손 부위에서 장기간 효과적인 약물 전달이 가능함을 확인하였다.

[0128] 실시예 10. 콘드로이틴 설페이트-카테콜 하이드로젤 패치(CS-CA 하이드로젤 패치)의 제조 및 약물 전달능 분석

[0129] CS-CA 하이드로젤에 대한 적용의 편의성을 증진시키고, 다양한 용도로 활용하기 위하여, CS-CA 하이드로젤을 패치 제형으로 제작하였다. CS-CA 하이드로젤 패치는 CS-CA 용액을 얇게 얼린 후, 동결건조시켜 제작하였다. 약물이 탑재된 패치는 CS-CA 용액을 얼리기 전에 타겟 약물을 미리 녹인 후, 함께 동결건조시켜 제작하였다. 또한, 산화제(NaIO_4) 스프레이를 이용해 CS-CA 하이드로젤 패치를 가교시켜 캡슐화된 약물의 서방형 방출이 가능하게 하였다.

[0130] CS-CA 하이드로젤 패치의 약물전달 시스템으로의 응용 가능성을 검증하기 위하여, 다음의 두 그룹에서 성장인자 단백질의 방출 양상을 비교하는 실험을 수행하였다: (1) Patch (CS-CA)-TGF- β 그룹: 기존 제작된 CS-CA 하이드로젤 패치에 TGF- β 단백질을 캡슐화하여 제작된 그룹; 및 (2) Patch (CS-CA)-TGF- β /FD 그룹: TGF- β 단백질을 CS-CA 용액에 미리 혼합한 후 패치 형태로 동결건조시키고 CS-CA 하이드로젤 패치를 가교시켜 제작된 그룹.

[0131] 37°C의 PBS 버퍼 또는 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 포함된 용액에서 TGF- β 의 방출 양상을 관찰하였고, TGF- β 의 방출량은 ELISA 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, CS-CA 하이드로젤 패치에 TGF- β 를 캡슐화한 Patch (CS-CA)-TGF- β 그룹 및 TGF- β 를 CS-CA 용액에 미리 혼합한 후 동결건조시켜 제작된 Patch (CS-CA)-TGF- β /FD 그룹 모두에서는 유사한 약물 방출 양상이 나타났음을 확인하였다 (도 14). 특히, CS-CA 하이드로젤 패치에서도 CS-CA 하이드로젤과 마찬가지로, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 처리되지 않은 경우 카테콜과 단백질의 다양한 친핵성 작용기들의 강한 결합으로 인하여 CS-CA 하이드로젤 패치로부터 TGF- β 의 방출이 거의 일어나지 않은 반면, 인체 내 환경을 모사한 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)가 처리된 경우에는 2주 동안 서서히 CS-CA 하이드로젤 패치로부터 TGF- β 가 방출됨을 확인하였다 (도 14).

[0132] 상기 결과로부터, CS-CA 하이드로젤 패치도 CS-CA 하이드로젤과 마찬가지로, TGF- β 와 같은 약물이 봉입될 수 있고, 콘드로이틴 설페이트 분해 효소(chondroitinase)의 활성이 증가된 조직 결손 부위에서 장기간 효과적인 약물 전달이 가능함을 확인하였다.

[0134] 실시예 11. 파이로갈롤이 수식된 콘드로이틴 설페이트 기반 하이드로젤의 제조

[0135] 유도체 합성을 위해 EDC(1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, Thermo Fisher Scientific)/NHS(N-hydroxysuccinimide, Sigma) 화학반응을 적용하여, 콘드로이틴 설페이트(CS)에 파이로갈롤(pyrogallol, PG)을 수식하였다(도 15a). CS:EDC:NHS:PG 는 1 : 1 : 1 : 1 (몰비)로 제조하였다. 합성을 완료한 유도체는 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 통해 콘드로이틴 설페이트(CS)에 파이로갈롤이 수식되었음을 확인하였다 (도 15b).

[0136] 이후, PBS 및 증류수를 이용하여 CS-PG 용액을 준비하였고, CS-PG 용액에 산화제(sodium periodate, NaIO_4)를 처리하여 가교 반응을 통해, 파이로갈롤이 수식된 콘드로이틴 설페이트-파이로갈롤 하이드로젤(이하, "CS-PG 하이드로젤")을 제조하였다 (도 16a). CS-PG 용액 및 산화제(NaIO_4 solution, 4.5 mg/ml)는 3 : 1 (부피비)로 처리하였다.

[0137] 파이로갈롤은 카테콜에 수산화기(OH)가 하나 더 달린 구조를 가지고 있어, 카테콜보다 빠른 산화를 통해 고분자를 가교시킬 수 있다. 따라서, 인체 내와 같이 산소 농도가 높은 환경에서는 산화제의 처리 없이 자연 산화가 수 분내로 이루어질 수 있으므로, 가교를 위한 산화제의 처리 없이 바로 적용이 가능한 장점이 있다. 가교를 위한 추가적인 산화제의 처리가 필요하지 않으므로, 안전성 및 생체적합성 측면에서 매우 우수한 재료인 것으로 볼 수 있다.

[0139] 실시예 12. 콘드로이틴 설페이트-파이로갈롤 하이드로젤(CS-PG 하이드로젤)의 물리화학적 특성 분석

[0140] 2 가지 농도 조건(10 wt%, 15 wt%)에서 CS-PG 하이드로젤을 제작해 팽윤도(swelling ratio) 및 분해 양상을 비교하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 6 일 동안 생리학적 조건(37°C in PBS 버퍼) 하에 유지되는 동안, 15 wt%의 CS-PG 하이드로젤은 질량 손실 없이 팽윤된 상태로 구조가 잘 유지되는 반면, 10 wt%의 CS-PG 하이드로젤은 2 일 차까지 팽윤되다가 점차 구조가 무너져 큰 질량 손실을 보임으로써, CS-PG 하이드로젤은 15 wt% 이상의 농도 조건에서 구조가 장기간 잘 유지될 수 있음을 확인하였다 (도 16b 및 16c). 또한, 콘드로이틴 설페이트 분해

효소 처리를 통해 분해 양상을 비교한 결과, CS-PG의 농도가 증가할수록 CS-PG 하이드로젤의 분해가 느려짐을 확인하였다 (도 16d).

[0142] 실시예 13. 콘드로이틴 설페이트-파이로갈롤 하이드로젤(CS-PG 하이드로젤)의 기계적 물성 분석

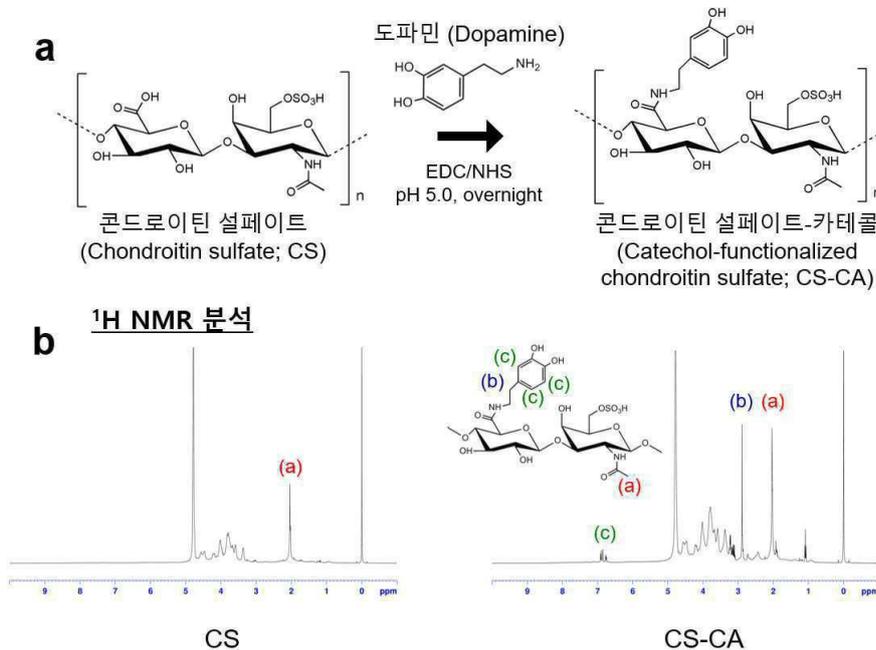
[0143] 유변학 분석 장비를 이용하여 2 가지 농도 조건(10 wt%, 15 wt%)에서 CS-PG 하이드로젤의 탄성계수를 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 2 가지 농도 모두에서 G'(storage modulus) 수치가 G''(loss modulus) 수치보다 높은 것을 확인함으로써, 하이드로젤 내에 안정적인 고분자 네트워크가 형성되었음을 확인하였다(도 17a). 또한, CS-PG의 농도가 증가할수록 탄성계수가 증가하여 하이드로젤의 기계적 강도가 향상됨을 확인하였다 (도 17b).

[0145] 실시예 14. 콘드로이틴 설페이트-파이로갈롤 하이드로젤(CS-PG 하이드로젤)을 이용한 3 차원 줄기세포 배양 시 세포독성 분석

[0146] CS-PG 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포(hADSC)를 3 차원 배양한 후, 세포생존율을 분석하는 실험을 수행하였다. 간단히, 각 CS-PG 하이드로젤 내에 인간 지방유래줄기세포를 분주하고 4 일 동안 배양한 후, Live/dead 염색을 통해 세포생존율을 분석하였다. 그 결과, CS-PG 하이드로젤 내에서 배양된 인간 지방유래줄기세포는 높은 생존율을 보임으로써, 세포독성이 나타나지 않았음을 확인하였다 (도 18). 이로써, CS-PG 하이드로젤은 세포 독성이 나타나지 않음으로써 우수한 생체적합성을 가지는 것을 확인하였다.

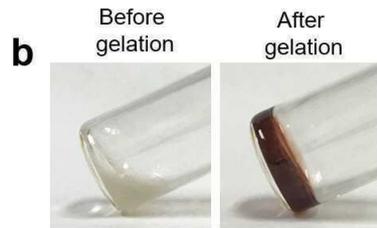
도면

도면1



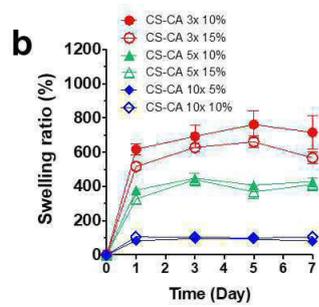
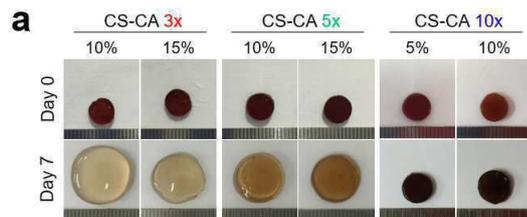
도면2

Conjugate	CS:EDC:NHS:dopamine (molar ratio)	Degree of substitution (DS; mol%)
CS-CA 3x	1 : 1 : 1 : 3	1.91
CS-CA 5x	1 : 3 : 3 : 5	14.32
CS-CA 10x	1 : 5 : 5 : 10	20.86

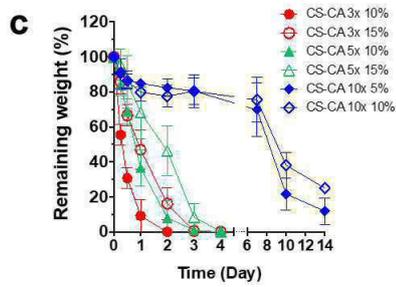


도면3

평윤 양상 분석

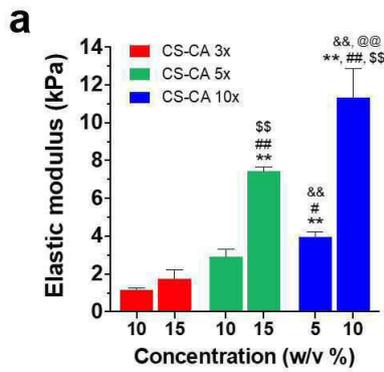


분해 양상 분석

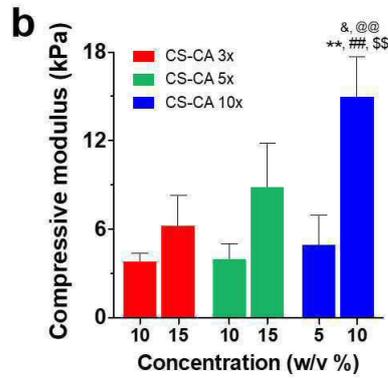


도면4

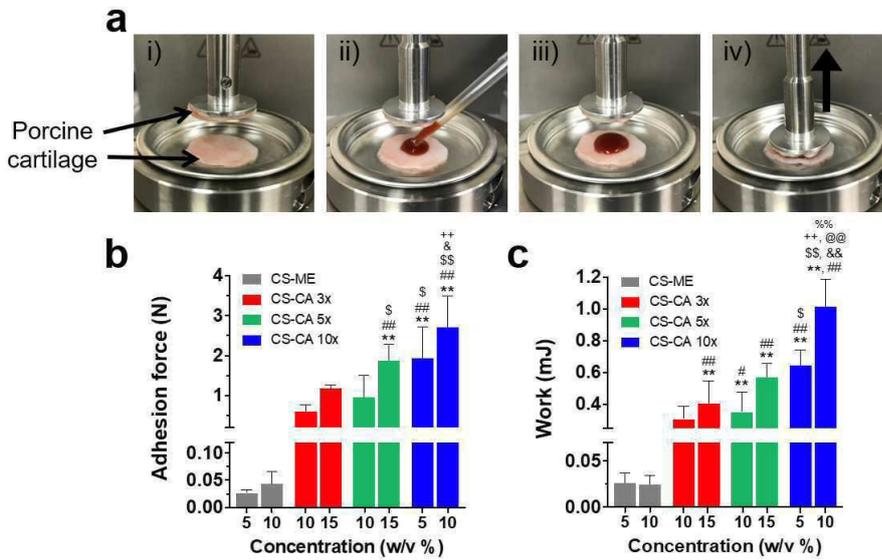
탄성계수 측정 (유변학 분석)



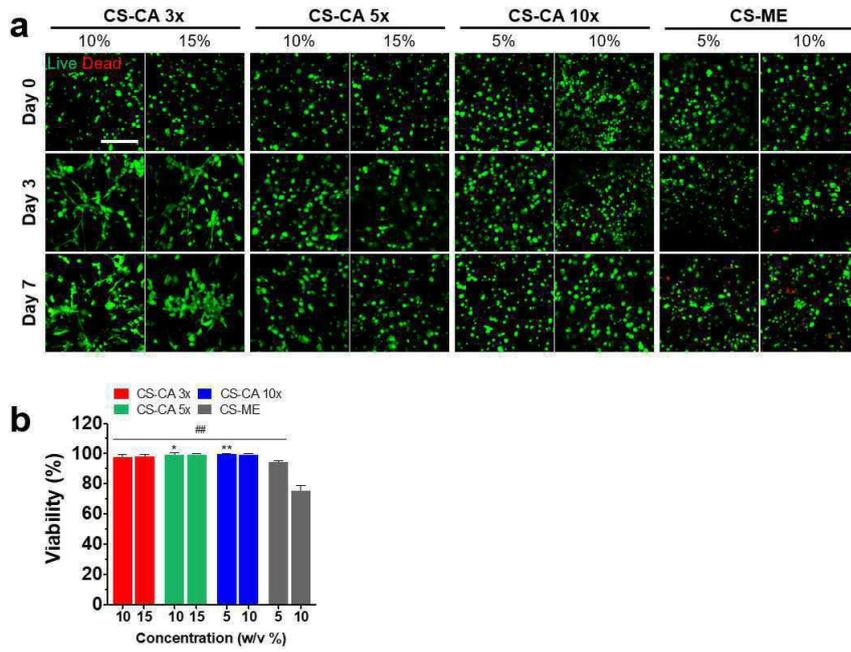
압축계수 측정



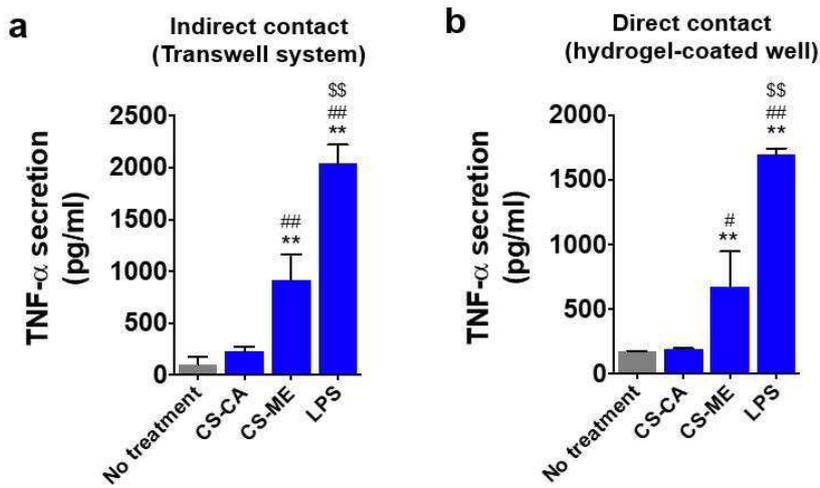
도면5



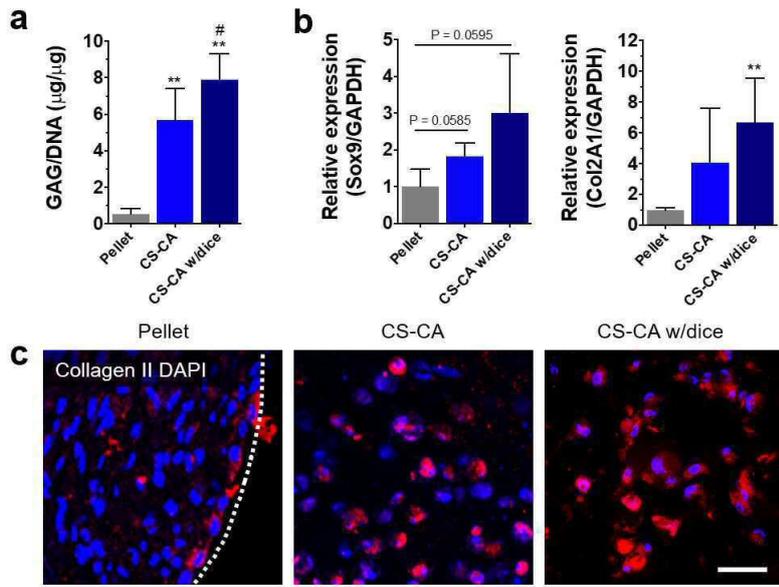
도면6



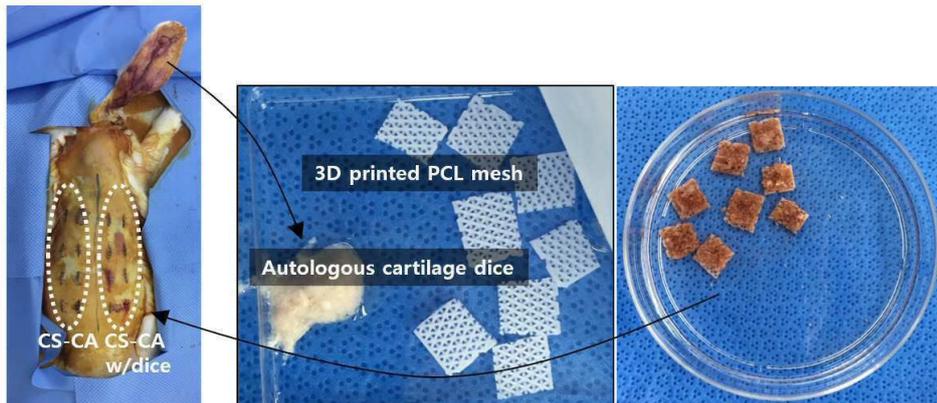
도면7



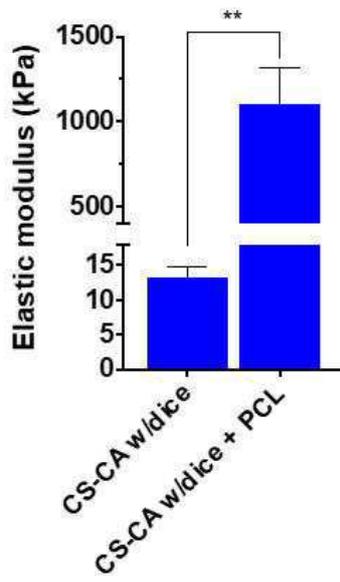
도면8



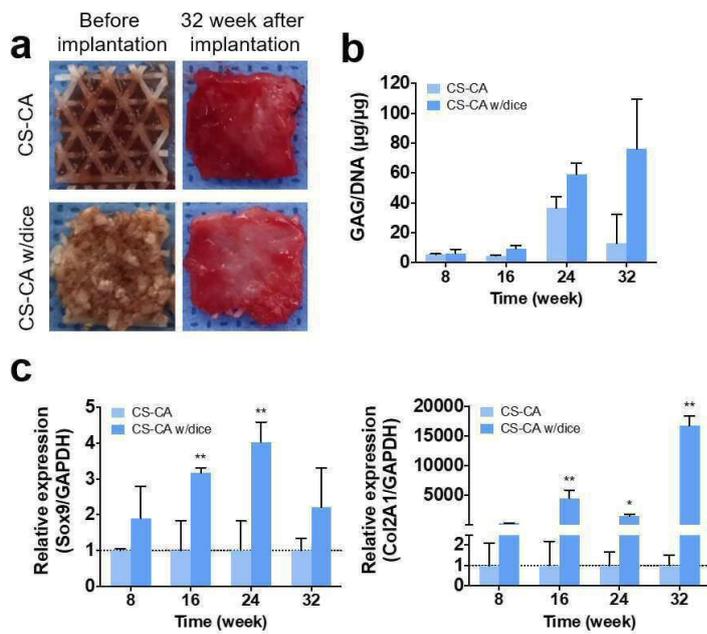
도면9a



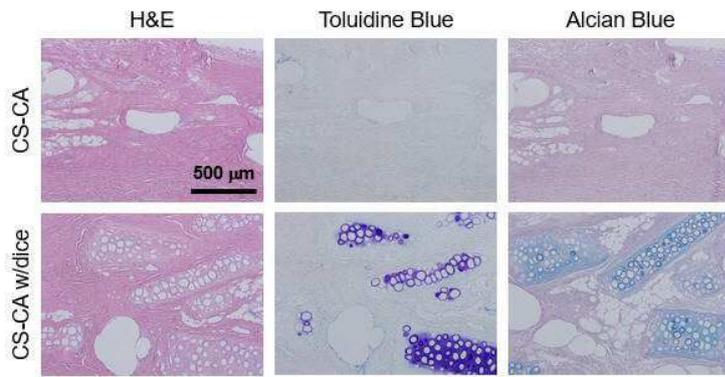
도면9b



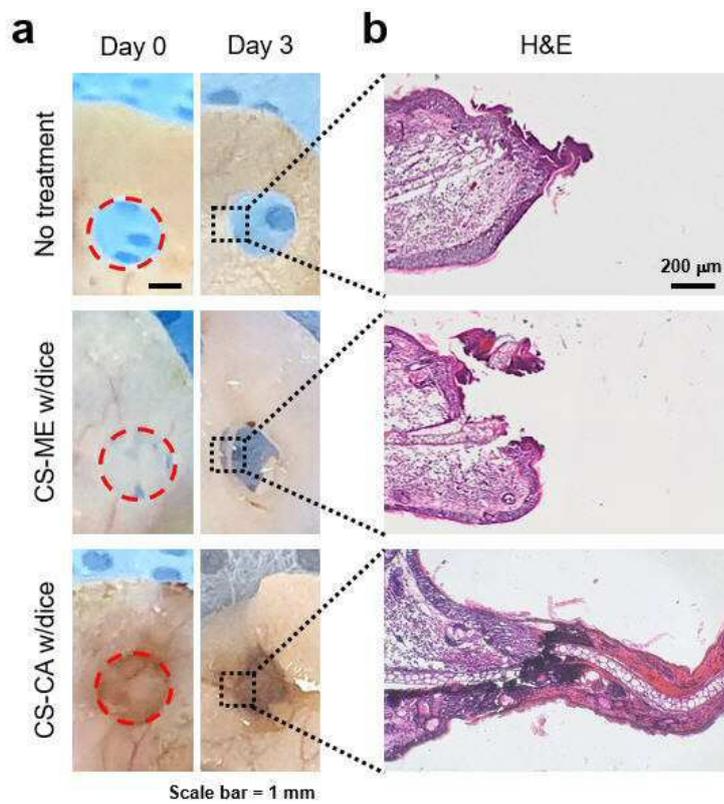
도면10



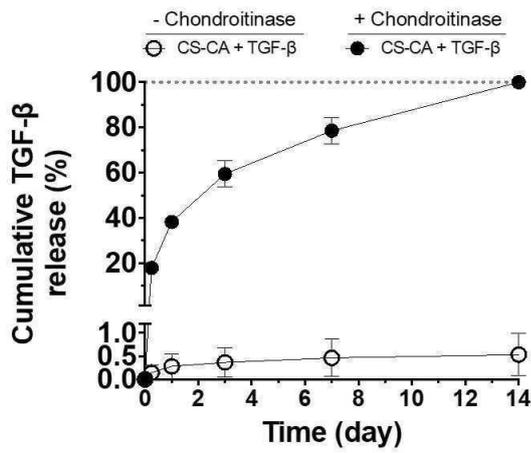
도면11



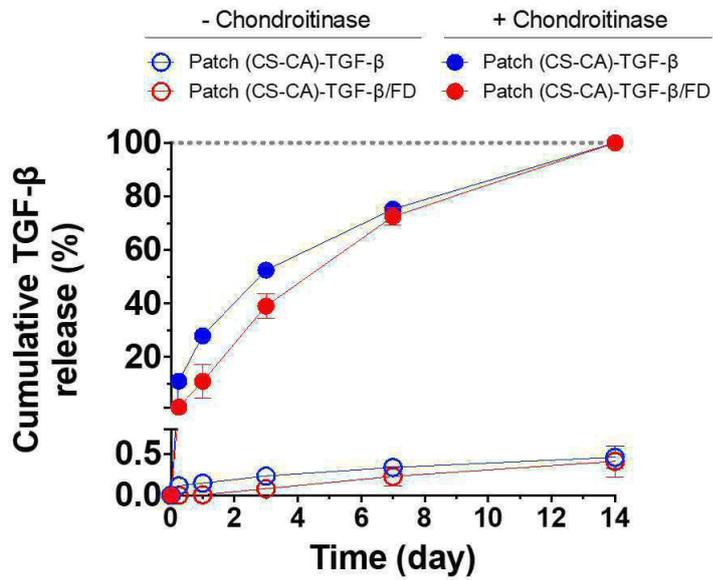
도면12



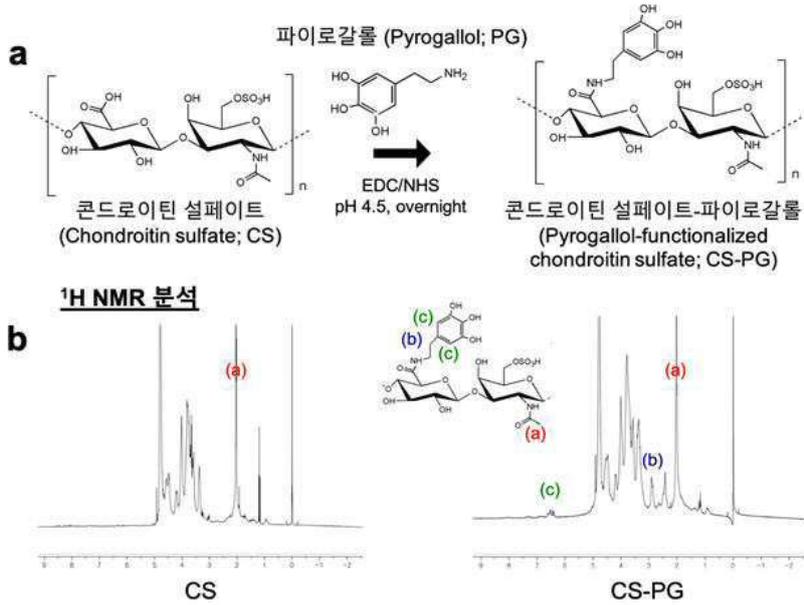
도면13



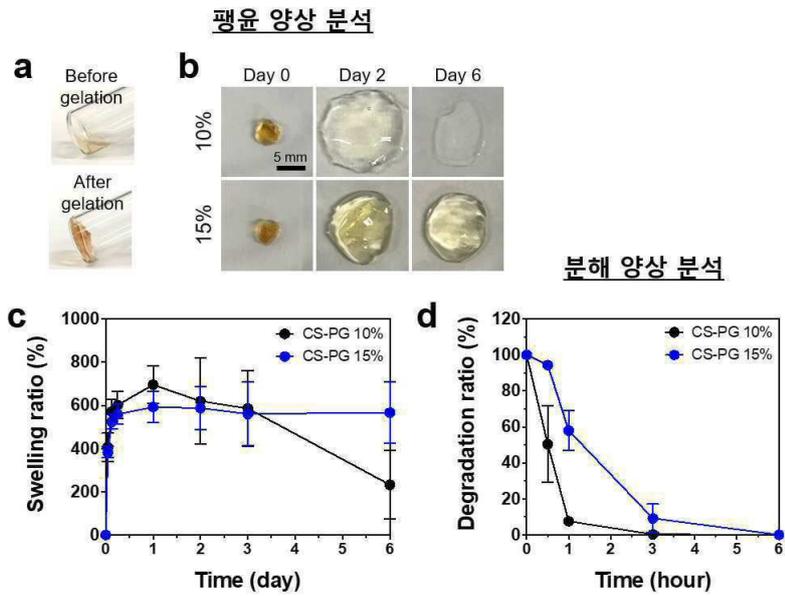
도면14



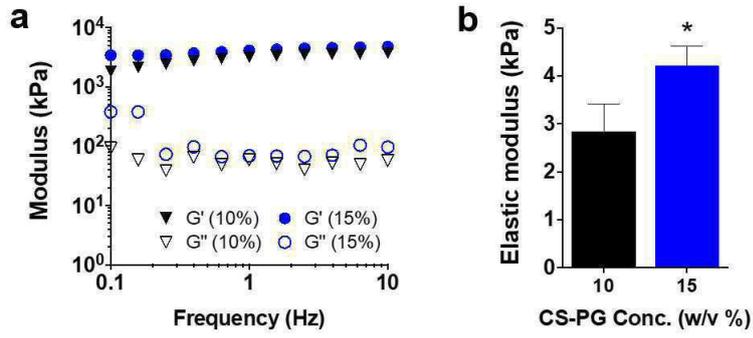
도면15



도면16



도면17



도면18

