

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0103977

(43) 공개일자 2021년08월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 5/071** (2010.01) **A61L 27/36** (2006.01)  
**C12M 3/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**C12N 5/0697** (2013.01)  
**A61L 27/3633** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0019937  
 (22) 출원일자 2021년02월15일  
 심사청구일자 2021년02월15일
- (30) 우선권주장  
 1020200018359 2020년02월14일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
**연세대학교 산학협력단**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
**조승우**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호  
**진윤희**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호  
**최이선**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호
- (74) 대리인  
**특허법인 피씨알**

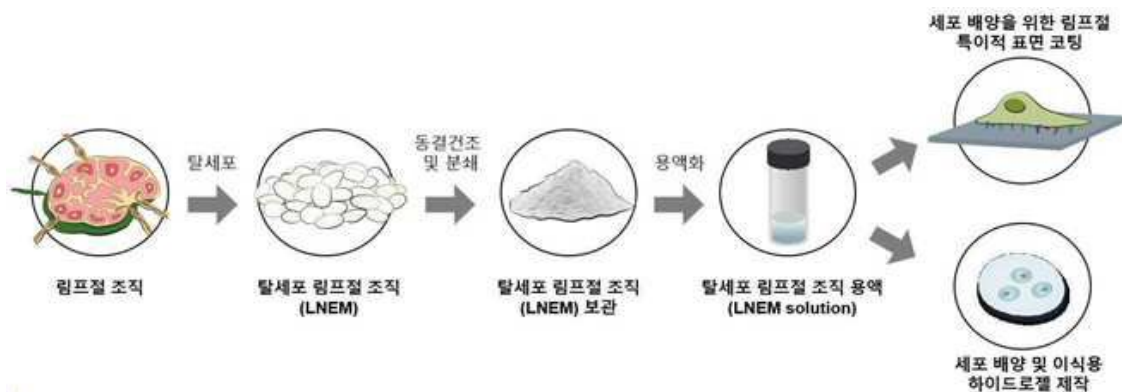
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 면역 조절성 탈세포 림프절 유래 지지체 및 이의 제조방법

## (57) 요약

본 발명은 탈세포 림프절(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)을 이용한 지지체 조성물에 관한 것이다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61L 27/3683** (2013.01)

**C12M 21/08** (2013.01)

**C12N 2502/1192** (2013.01)

**C12N 2533/90** (2013.01)

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 근육세포리프로그래밍 효율 증진

연구(3/3)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345297902
과제번호	2018R1D1A1B07042768
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	면역 미세환경 및 유도심근세포 기반 심장조직 모사 체외모델 개발(2/4)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNE)을 포함한 지지체 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL로 포함되는 것인 지지체 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 0.1 내지 10Hz 기준 탄성계수가 10 내지 100Pa인 지지체 조성물.

#### 청구항 4

(a) 분리된 림프절 조직을 탈세포화하여 탈세포된 림프절 조직을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 탈세포된 림프절 조직을 건조하여 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNE)을 제조하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 림프절 조직을 탈세포화 용액에서 교반시키는 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 교반은 3 내지 24시간 동안 이루어지는 것인 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 7

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계의 탈세포는 림프절 세포가 95 내지 99.9% 제거된 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 8

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계 이후, 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL 로 포함되도록 조절하는 단계를 더

포함하는 것인 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 9

제4항에 있어서,

상기 지지체 조성물 제조방법은 (b) 단계 이후 (c) 상기 건조된 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계를 더 포함하는 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (c) 단계의 겔화는 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL로 포함되도록 조절한 뒤 수행되는 것인 지지체 조성물 제조방법.

#### 청구항 11

제1항의 지지체 조성물을 포함하는 면역세포 배양용 조성물.

#### 청구항 12

제1항의 지지체 조성물을 포함하는 조직 재생용 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 조절성 탈세포 림프절 유래 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 항염증성 면역세포인 M2 타입 대식세포는 박테리아, 바이러스 감염에 의한 급성 염증뿐 아니라 동맥경화, 비만, 암과 같은 질환의 만성 염증 치료에 긍정적인 기능을 하기 때문에 M2 대식세포의 효과적인 배양 및 이를 기반으로 하는 면역 조절 기술에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0004] 많은 선행 연구들에서는 대부분 면역세포를 단순 2차원 배양을 하거나 3차원 조건에서 배양을 하더라도 면역세포가 분포하는 체내 조직 특이적 환경을 제대로 반영하지 못하는 지지체를 사용하기 때문에 면역세포의 M2 타입으로의 분극화(polarization) 및 면역세포 기능이 제한적이다.

[0005] 실제 체내에 존재하는 면역세포들은 신체의 다양한 부위에 존재하지만 특히 림프절의 중앙 부분에서 저장되고 성숙화된다. 면역세포들은 림프절 특이적인 세포외기질과 상호 작용을 통해 성장하고 형질과 기능이 조절된다. 하지만 현재 연구에서 활용되는 세포 배양 기법은 면역조직 특이적인 생화학적, 물리적 미세환경을 제대로 반영하지 못하는 경우가 대부분이다.

[0006] 면역세포가 체내에서 어떠한 방식으로 면역 조절에 기여를 하고 형질이 변하는지에 대한 기전 연구뿐만 아니라 면역조절을 통한 다양한 질환 치료 기술 개발을 위해서는 면역세포 배양 시 실제 면역 조절 시스템과 비슷한 미세환경을 제공해 줄 수 있는 새로운 배양 시스템의 구축이 필수적이다.

[0007] 이를 해결하기 위해 본 발명에서는 돼지 림프절을 탈세포화하여 림프절 조직 특이적 세포외기질 성분이 풍부하게 보존된 인공 배양 지지체를 제조하여 기존의 배양 지지체가 가졌던 조직 특이성 결여 문제를 해결하였다. 본

발명에서는 개발된 지지체가 면역세포의 M2 분극화 및 항염증 기능 증진에 기여한다는 것을 제시하였고 나아가 조직 손상 모델에 적용하여 생체 내 면역조절 기능까지 확인하였다.

- [0008] 본 발명에서 개발된 지지체는 돼지 림프절에서 항원성 세포 성분은 모두 제거되고 세포외기질 성분만 남긴 탈세포 조직을 기반으로 제조되기 때문에 우수한 생체적합성을 가지고 있으며 낮은 비용으로 대량 생산이 가능하여 면역조절을 위한 세포 배양 및 치료용 지지체로서 실용성 및 임상적용 가능성이 매우 높다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0143465호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 림프절 조직의 탈세포화 과정을 거쳐 세포는 완전히 제거되지만 림프절 특이적 세포외기질은 유지된 탈세포 조직을 M2 면역세포의 효과적인 배양을 위한 인공 지지체로 이용하기 위한 것으로, 면역 조절성 탈세포 림프절 유래 지지체 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

- [0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

- [0015] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

- [0016] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

- [0017] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

- [0019] 본 발명의 일 양상은 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)을 포함한 지지체 조성물을 제공한다.

- [0020] 상기 “세포외기질(extracellular matrix)”은 포유류 및 다세포 생물(multicellular organisms)에서 발견된 조직의 탈세포화를 통해 제조된 세포 성장용 자연 지지체를 의미한다. 상기 세포외기질은 투석 또는 가교화를 통해 더 처리할 수 있다.

- [0021] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.

- [0022] 상기 세포외기질은 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코스아미노글리칸

(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans), 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인(cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.

- [0023] 상기 세포외기질은 포유 동물에 있어서 다양한 형태로서 약 90%의 콜라겐을 포함할 수 있다. 다양한 생체 조직에서 유래한 세포외기질은 각각의 조직에 필요한 고유 역할 때문에 전체 구조체 및 조성이 상이할 수 있으며, 본 발명의 일 구체예로 상기 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL, 더욱 구체적으로는 0.02 내지 10mg/mL 가장 구체적으로는 0.02mg/mL 또는 10mg/mL로 포함되는 것일 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예로 상기 조성물은 0.1 내지 10Hz 기준 탄성계수가 10 내지 100Pa일 수 있고, 상기 조성물이 상기 범위의 탄성계수를 가짐으로써 안정적인 고분자 네트워크를 형성하는 것을 의미한다.
- [0025] 실제 림프절에 존재하는 세포외기질의 생화학적, 생물물리학적 특징을 조사하여 면역세포의 활성 및 기능을 증진시킬 수 있는 최적화된 배양 시스템으로 개발되어 면역세포를 이용하는 다양한 기초 연구 및 응용 연구 분야에 범용적으로 활용될 수 있고, 염증성 질환 및 조직 손상을 입은 환자들을 위한 질병 모델링 연구 및 이식 치료에 활용될 수도 있으며, 대식세포뿐만 아니라 다른 종류의 면역세포에도 영향을 줄 수 있어 면역세포치료제의 효능을 증진시킬 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 일 양상은 (a) 분리된 림프절 조직을 탈세포화하여 탈세포된 림프절 조직을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 탈세포된 림프절 조직을 건조하여 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)을 제조하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0028] 상기 탈세포화된 림프절 조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 염증 및 면역과 관련된 분야에서 활용 가능성이 높다.
- [0029] 상기 (a) 단계는 분리된 림프절 조직을 탈세포화하여 탈세포된 림프절 조직을 제조하는 단계로서, 상기 림프절 조직을 탈세포화 용액에서 교반시킬 수 있다.
- [0030] 상기 탈세포화 용액은 림프절 조직에서 세포를 제거하기 위한 다양한 성분을 포함할 수 있고, 예컨대, 고장성 식염수(hypertonic saline), 과산화 아세트산(peracetic acid), 트리톤 X-100 (Triton X-100), SDS 또는 기타 세제 성분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예로 상기 교반은 3 내지 24시간, 더욱 구체적으로는 5 내지 20시간, 가장 구체적으로는 10 내지 15시간, 일 예시로 12시간 동안 이루어지는 것일 수 있고, 이러한 교반(탈세포) 과정을 통해 림프절 세포가 95 내지 99.9%, 구체적으로는 97 내지 99%, 가장 구체적으로는 98.7% 제거된 것일 수 있다. 상기 범위 외의 시간으로 탈세포가 이루어질 경우 제조된 지지체 조성물의 품질이 저하되거나 공정 경제성이 떨어지는 문제점이 있다.
- [0032] 상기 (b) 단계는 상기 탈세포된 림프절 조직을 건조하여 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)을 제조하는 단계로서, 상기 탈세포된 림프절 조직을 건조하는 방법은 공지의 방법으로 수행될 수 있으며, 자연건조 또는 동결 건조될 수 있고, 멸균을 위해 건조 후 전자 빔 또는 감마 방사선에 의해 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출시킬 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예로 상기 (b) 단계 이후, 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL, 더욱 구체적으로는 0.02 내지 10 mg/mL 가장 구체적으로는 0.02 mg/mL로 포함되도록 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기한 림프절 유래 세포외기질의 농도 범위 외로 포함될 경우 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다. 상기 농도 범위의 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 산성 용액으로 용액화될 수 있고, 이를 특정 구조체의 표면에 코팅하여 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 일 구체예로 상기 지지체 조성물 제조방법은 (b) 단계 이후 (c) 상기 건조된 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 겔화를 통해 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 가교시켜 3차원 하이드로젤 형태의 지지체를 제작할 수 있고, 겔화된 지지체는 실험, 스크리닝 뿐만 아니라 면역과 관련된 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0036] 상기 “하이드로젤”은 졸-겔 상변이를 통해 물을 분산매로 하는 액체가 굳어 유동성을 상실하고 다공성 구조를

이루는 물질로서, 3차원 망목 구조와 미결정 구조를 갖는 친수성 고분자가 물을 함유하여 팽창함으로써 형성될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구체예로 상기 (c) 단계의 겔화는 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 0.01 내지 20 mg/mL, 더욱 구체적으로 0.02 내지 10mg/mL, 가장 구체적으로는 10mg/mL 로 포함되도록 조절한 뒤 수행되는 것일 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.

[0038] 한편, 상기 (c) 단계의 겔화는 산성 용액에서 펩신 또는 트립신과 같은 단백질을 분해 효소로 용액화될 수 있고, 중화를 위해 예컨대 등장성 완충액(isotonic buffer) 또는 NaOH 등의 염기와 혼합하여 pH 7.2 내지 7.8로 조절될 수 있으며, 25 내지 38℃의 온도에서 이루어지는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명은 상기 지지체 조성물을 포함하는 면역세포 배양용 조성물을 제공한다. 상기 지지체 조성물은 종래 지지체 조성물과 비교하여 우수한 생체적합성을 가지고 있어, 지지체 조성물을 포함하는 면역세포 배양용 조성물로 활용될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 지지체 조성물을 포함하는 조직 재생용 조성물을 제공한다. 상기 지지체 조성물은 골격근 손상 위치에 주입하였을 때, 주입된 부위에서 전체 면역세포 개수 대비 M2 타입 세포의 비율이 매우 높고, M2 대식세포 개수와 비율이 향상된 것을 확인하였다 (실험예 3-2). 이러한 결과에 기초하여 본 발명의 지지체 조성물은 조직재생에 도움이 되는 면역반응을 유도하여 조직 손상 치료에 기여할 수 있는 조직 재생용 조성물로서 활용될 수 있다.

### 발명의 효과

[0044] 본 발명에서 개발한 탈세포화된 림프절 조직 유래 지지체는 실제 림프절에 존재하는 세포외기질의 생화학적, 생물물리학적 특징을 모사하여 면역조직 특이적인 미세 환경을 제공하기 때문에 기존의 배양 지지체들이 가지고 있던 한계를 극복하고 면역세포의 활성화 및 기능을 증진시킬 수 있는 최적화된 배양 시스템으로 개발되어 면역세포를 이용하는 다양한 기초 연구 및 응용 연구 분야에 범용적으로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

[0045] 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 다양한 염증성 질환 및 조직 손상을 입은 환자들을 위한 질병 모델링 연구 및 이식 치료 플랫폼 구축 등 다양한 전임상, 임상 연구에 광범위하게 활용되어 산업, 경제적 측면에서 고부가가치 창출 및 관련 의료 산업의 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

[0046] 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 대식세포뿐만 아니라 다른 종류의 면역세포에도 마찬가지로 적용되어 그 적용 범위를 크게 확장할 수 있다. 특히 최근 각광받고 있는 CAR-T와 같은 면역세포치료제의 효능을 증진시킬 수 있는 배양 및 이식용 지지체로 적용될 수 있어 그에 따른 경제적 가치 역시 매우 클 것으로 기대한다.

### 도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 면역세포 배양을 위한 탈세포 림프절 유래 지지체 (Lymph Node Extracellular Matrix, LNEM) 제작 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 면역세포 배양을 위한 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (Lymph Node Extracellular Matrix, LNEM) 제작 및 탈세포 여부를 DNA 함량 분석 결과로 나타낸 것이다.

도 3은 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (Lymph Node Extracellular Matrix, LNEM)의 세포외기질 성분을 분석한 것이다.

도 4 내지 7은 제조한 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)의 단백질을 분석한 것이다.

도 8은 제조한 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)의 특성을 분석한 SEM 사진이다.

도 9는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)의 물성을 비교 분석한 것이다.



도 10은 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)의 생체적합성을 분석한 것이다.

도 11a 내지 11c는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)에서 배양을 한 골수유래 대식세포 부착 양상 변화를 확인한 것이다.

도 12a 내지 12d는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)에서의 M2 대식세포 특이적 형질을 확인한 것이다.

도 13a 내지 13d는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체에서의 M1 대식세포 특이적 형질을 확인한 것이다.

도 14는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체에서 M0 대식세포의 M2 대식세포로의 분화를 확인한 것이다.

도 15a 및 15b는 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)에서 배양된 골수유래 대식세포의 기능을 분석한 것이다.

도 16a 내지 16d는 골수유래 대식세포와 간 오가노이드를 공배양 하여 실제 체내 환경과 유사한 간독성 모델 형성을 확인한 것이다.

도 17a 내지 17d는 골격근 손상모델에서의 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNEM)의 면역조절 기능을 확인한 것이다.

도 18a 및 18b는 골격근 손상모델에 탈세포 림프절 조직 유래 지지체를 이식한 후 수행된 조직학 분석 (10주차) 및 운동 행동학적 분석 평가 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 본 발명은 림프절 조직의 탈세포화 과정을 거쳐 세포는 완전히 제거되지만 림프절 특이적 세포외기질은 유지된 탈세포 조직을 M2 면역세포의 효과적인 배양을 위한 인공 지지체로 이용하는 기술에 관한 것이다. 본 발명의 인공 지지체는 탈세포된 림프절 조직 유래 세포외기질 성분으로 구성되어 있기 때문에 실제 림프절과 유사한 면역조절을 위한 미세환경을 제공해줄 수 있다.

[0050] 제조된 탈세포 림프절 유래 인공 지지체는 2차원과 3차원 배양이 모두 가능하며 각각의 환경에서 단일 세포외기질 성분(콜라겐)으로 구성된 지지체와 비교하여 M2 면역세포의 증식, 크기, 특이적 형질, 그리고 항염증 기능을 모두 증진시킬 수 있음을 확인하였다. 이를 통해 림프절 특이적 세포외기질 단백질들이 풍부하게 함유된 탈세포 림프절 유래 지지체가 기존의 단일 세포외기질 성분(콜라겐) 기반 지지체 보다 더 효과적인 면역세포 배양을 가능하게 한다는 것을 검증하였다.

[0051] 다른 종류의 조직(심장)을 탈세포하여 제조한 인공 지지체와 비교해 보았을 때 림프절 조직 유래 지지체가 M2 면역세포 배양에 있어 더 우수한 효능을 지녔음을 확인하였으며 이를 통해 본 발명에서 개발된 탈세포 림프절 유래 지지체의 면역 조절 특이성 및 기능의 우수성이 검증된다.

[0052] 탈세포 림프절 조직 기반 지지체에서 배양한 M2 면역세포와 간 오가노이드를 공배양 하였을 때 오가노이드를 단일 배양했을 때 보다 약물에 의한 간독성이 줄어 드는 것을 확인하였다. 따라서 면역 미세환경에서 기능이 증진된 면역세포와의 공배양을 통해 실제 생체와 유사한 간 독성 평가 모델을 구축할 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0053] 나아가, 제조된 탈세포 림프절 조직 유래 인공 지지체를 골격근 손상모델에 이식하였을 때 손상 부위에서 M2 면역세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 체외에서의 면역세포 배양뿐 아니라 생체 내 면역조절을 통한 조직 손상 및 질환 치료를 위해 적용될 수 있는 기능성 치료제로서도 가능성을 보인다.

[0055] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1: 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 제조

[0058] 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물을 다음과 같이 제조하였다 (도 1 참고).

[0059] 실시예 1-1. 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)의 제조

[0060] 돼지 림프절 조직을 잘게 자른 후, 12시간 동안 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액 처리를 통해 조직의



세포만을 제거하여 탈세포 림프절 조직을 제조하였다.

[0061] 상기 탈세포 림프절 조직을 동결건조, 분쇄하여 탈세포 림프절 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix; LNEM)을 제조하였다.

[0062] **실시예 1-2. 지지체 조성물의 제조**

[0063] 상기 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 사용 목적에 따라 다음의 방법으로 처리하여 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 제조하였다.

[0064] 구체적으로, 세포 배양을 위한 림프절 특이적 표면 코팅에 사용하기 위하여, 0.02mg/mL 농도의 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 0.02M 아세트산에 희석시켜 지지체 조성물을 제조하였다.

[0065] 또한, 세포 배양 또는 이식용 하이드로젤의 제조를 위하여, 10mg/mL 농도의 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 중성 pH, 37° C 온도 조건에서 가교반응을 유도하여 하이드로젤을 제조하였다.

[0067] **실험예 1: 탈세포 림프절 유래 세포외기질의 분석**

[0068] 실시예 1-1.의 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 아래와 같이 분석하였다.

[0069] **실험예 1-1. 탈세포 림프절 유래 세포외기질의 탈세포 수준 확인**

[0070] 실시예 1-1.에서 제조된 탈세포 림프절 유래 세포외기질의 탈세포 수준을 확인하였다.

[0071] 구체적으로, 탈세포 과정 전후의 림프절 조직을 포르말린으로 고정시킨 뒤 파라핀 절편으로 제작한다. 이후 탈수과정을 거친 뒤 헤마톡실린 용액에 20분, 에오신 용액에 5분 반응시켜 염색하였다 (도 2(b)).

[0072] 한편, 탈세포 과정 전후의 림프절 조직을 동결건조한 뒤 DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용해 동일한 무게의 조직 내 DNA양을 정량하였다 (도 2(c)).

[0073] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1-1의 탈세포 림프절 조직은 육안으로도 탈세포 수준을 확인할 수 있었고 (도 2(a)), H&E염색 결과 Hematoxylin 염색이 나타내는 핵 부분이 제거된 것으로 보아 탈세포 과정을 통해 세포가 대부분 제거된 것을 확인하였다 (도 2(b)). 또한, 탈세포 과정 후에 세포가 제거된 것을 확인하기 위해 탈세포 과정 전후의 림프절 조직 내 DNA 양을 비교한 결과 탈세포 과정 후 세포는 탈세포 전에 비해 98.7%가 제거된 것을 확인하였다 (도 2(c)).

[0075] **실험예 1-2. 탈세포 림프절 조직 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix, LNEM) 분석**

[0076] 실시예 1-1.에서 제조된 탈세포 림프절 유래 세포외기질의 세포외기질 성분의 보존 수준을 확인하였다.

[0077] GAG 함량은 콘드로이틴 설페이트 (chondroitin sulfate)와 1,9-디메틸 메틸렌 블루 (DMMB)의 염료 결합 분석법을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, DMMB를 첨가하여 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 물질로 사용된 콘드로이틴 설페이트의 표준검량선으로부터 계산하였다.

[0078] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 세포외기질 성분 중 하나인 glycosaminoglycan (GAG)의 양을 확인한 결과 탈세포 과정 후에도 GAG는 잘 보존되어 충분히 남아있는 것을 확인하였다 (도 3(a)). 그리고, 세포외기질 성분 중 큰 비중을 차지하는 fibronectin과 laminin의 염색을 통해 탈세포 림프절 조직에서 해당 세포외기질 단백질들의 존재를 확인하였다. 또한, 탈세포 과정 후에 DAPI로 염색되는 핵이 사라진 것을 관찰하여 세포 성분이 제거되었음을 다시 확인하였다 (도 3(b)).

[0080] **실험예 1-3. 탈세포 림프절 조직 유래 세포외기질(Lymph Node Extracellular Matrix, LNEM)의 단백질 분석**

[0081] 실시예 1-1.에서 제조된 탈세포 림프절 유래 세포외기질의 단백질을 분석, 비교하였다.

[0082] 각 시료를 FASP Protein Digestion Kit를 이용하여 단백질을 분해하였다. 이후에 고해상도 질량분석기를 이용하여 추출된 단백질을 동정하였으며 단백질의 종류는 MaxQuant 소프트웨어를 이용하여 밝혀냈다. 그리고 iBAQ 정량비교분석 기법을 통해 검출된 단백질의 상대적인 정량값을 얻어내었다.

- [0083] 그 결과, 도 4 내지 7에서 확인되는 바와 같이, 탈세포 림프절 유래 세포외기질에서 검출된 ECM 단백질들 중 특히 대식세포의 M2 분극화에 영향을 준다고 알려져 있는 collagen I, collagen VI, biglycan, fibrinogen, decorin, vitronectin, laminin, fibronectin 등 다량의 ECM 단백질이 포함되어 있는 것이 확인되어 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 대식세포의 형질 및 분화에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되었다 (도 4).
- [0084] 또한, Matrisome database에 따르면, COL (콜라겐 하이드로젤), HEM (탈세포 심장 조직 유래 지지체), LNEM (탈세포 림프 조직 유래 지지체) 모두 ECM 단백질로 분류되는 단백질량이 총 단백질의 절반 가량을 차지하는 것을 확인하였다 (도 5 상단 그래프들). Matrisome 단백질 중에서 COL은 collagen을 가장 많이 포함하고 있으며 HEM은 glycoprotein을 가장 많이 함유하고 있었다. 그에 반해 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 collagen과 glycoprotein 모두 고르게 함유를 하고 있는 것을 확인하였다 (도 5 하단 그래프들).
- [0085] 그리고, 각 하이드로젤 그룹의 매트릭스 단백질 중 가장 높은 수준으로 발현하는 10개의 단백질을 확인한 결과 각 그룹마다 높게 발현되는 단백질 구성이 다르다는 것이 확인하였다. 구체적으로 탈세포 림프절 유래 세포외기질에서는 collagen VI, biglycan, TGF-beta1, fibrinogen alpha chain 등 실제 림프 조직에서 많이 발현된다고 알려진 매트릭스 단백질들이 가장 많이 포함되어 있는 것을 알 수 있었다 (도 6).
- [0086] 한편, 인간 타 장기들에 비해 인간 림프절 조직(lymphoid tissue)에서 4배 이상 높게 발현되는 단백질들이 COL, HEM, 탈세포 림프절 유래 세포외기질(LNEM)에 존재하는지 분석한 결과, COL 그룹에는 3개, HEM은 26개, 탈세포 림프절 유래 세포외기질(LNEM)에서는 96개가 검출되었다. 탈세포 림프절 유래 세포외기질에서 발견된 96개의 단백질 중, COL 또는 HEM에서는 발견되지 않은 단백질은 72개였다. 72개 단백질을 gene ontology biological process (GOBP)로 분석한 결과, 그 중에서 p-value가 가장 낮은 10개를 살펴보면, 면역 반응과 관련된 단백질들이 존재한다는 것을 확인하였다 (도 7).
- [0087] 이러한 결과들을 종합할 때, 탈세포 림프절 유래 세포외기질은 기존에 사용되는 콜라겐이나 다른 장기 유래 지지체(예; 탈세포 심장 조직 유래 지지체)에 비해서 면역세포에 더욱 적합한 생체 내 림프 조직과 유사한 미세환경을 구현할 수 있을 것으로 기대되었다.
- [0089] **실험예 2: 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 분석**
- [0090] 실시예 1-2에서 제조된 지지체 조성물을 아래와 같이 분석하였다.
- [0091] **실험예 2-1. 지지체 조성물의 구조 확인**
- [0092] 실시예 1-2.에서 제조된 지지체 조성물의 구조를 확인하였다.
- [0093] 코팅 표면 같은 경우 포르말린으로 고정 후 건조시킨 뒤 Au 이온을 표면에 코팅하고 주사전자현미경을 이용하여 표면을 관찰하였다. 하이드로젤 지지체 같은 경우 포르말린으로 고정 후 에탄올을 단계별로 처리하여 탈수과정을 진행하였으며, 동결건조과정을 거쳤다. 그리고 Au 이온을 표면에 코팅하고 주사전자현미경을 이용하여 내부 구조를 관찰하였다.
- [0094] 그 결과, 도 8에서 확인되는 바와 같이 LNEM 코팅 표면에서 림프절 조직 세포외기질 성분이 섬유 다발 형태로 도포됨을 관찰하였다 (도 8의 2D). 하이드로젤 형태 (3D LNEM hydrogel) 또한 콜라겐으로 형성된 지지체 (COL)와 유사한 나노섬유 기반의 내부 구조를 가지는 것을 확인하였다 (도 8의 3D).
- [0096] **실험예 2-2. 지지체 조성물의 물성 확인**
- [0097] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물 중 하이드로젤의 물성을 비교, 확인하였다.
- [0098] 구체적으로, 0.1-10 Hz 범위의 주파수 (frequency)에서의 탄성계수 ( $G'$ , elastic modulus) 및 점성계수 ( $G''$ , viscous modulus)를 회전형 유량계로 측정하여 탈세포 림프절 세포외기질 포함 지지체 조성물의 기계적 물성을 분석하였다. 비교군으로 콜라겐 I 만으로 이루어진 하이드로젤 (3D COL)과 탈세포 심장 조직으로부터 제조된 하이드로젤 (3D HEM)을 이용하였다.
- [0099] 제조된 하이드로젤의 점탄성 계수는 유량계 (MCR 102 레오미터, Anton Paar, Ashland, VA, USA)를 이용하여 각각 0.1 내지 10 Hz의 주파수 범위에서 주파수 스위프 모드 (frequency sweep mode)내의 저장 탄성율 ( $G'$ ) 및 손실 탄성율 ( $G''$ )을 측정하여 분석하였다. 하이드로젤의 탄성은 1 Hz ( $n = 4$ )에서의 평균 저장 탄성율을 계

산하여 나타내었다.

[0100] 그 결과, 도 9에서 확인되는 바와 같이, 액체상을 나타내는 점성계수에 비해 고체상을 나타내는 탄성계수가 모든 주파수 영역에서 높게 관찰됨을 확인하여 LNEH 하이드로젤이 안정적인 고분자 네트워크로 구성되었음을 확인하였다 (도 9 (a)). 3D COL, 3D HEM, 3D LNEH 하이드로젤 각각 평균 87.3 Pa, 83.7 Pa, 93.1 Pa 수준으로 모두 비슷한 물성을 가지는 것을 확인하였다 (도 9 (b)).

[0101] 따라서 3D LNEH 하이드로젤이 면역세포에 미치는 영향은 지지체의 물성이 아닌 생화학적 특징에 의한 것임을 예측할 수 있다.

### [0103] 실험예 2-3. 지지체 조성물의 생체적합성 확인

[0104] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물의 생체적합성을 확인하였다.

[0105] 세포 생존을 측정을 위해 세포를 Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 염색 후 정량하였다. 그리고 세포 증식을 측정하기 위해서는 담황색물질의 MTT (4,5-디메틸티아졸-2-일-2,5-데페닐테트라졸리움 프로미드)를 이용하여 정량하였다. 간단히 설명하면, 세포의 미토콘드리아에 있는 효소에 의해 테트라졸리움고리가 개열하여 암청색의 포르마잔으로 변화하는데 각 그룹의 세포에서의 변화량을 흡광도를 측정함으로써 정량하였다.

[0106] 그 결과, 도 10에서 확인되는 바와 같이, Live/Dead 염색을 실시한 결과 개발된 LNEH 2D 및 3D 배양 플랫폼은 세포 독성이 거의 없음을 확인하였다 (도 10 (a) 및 (b)). 특히, 3D LNEH 하이드로젤의 경우 기존의 3D COL 하이드로젤과 비교하여 대식세포의 생존에 더욱 유리함을 확인하였다.

[0107] 또한, MTT 분석을 통해 각 조건에서 배양된 대식세포의 증식을 분석하여 탈세포 림프절 조직 유래 3D LNEH 하이드로젤 조건에서 배양된 대식세포가 가장 높은 증식율을 보이는 것을 확인하였다 (도 10(c)).

[0108] 따라서 이러한 결과는 기존 지지체와 비교하여 LNEH 지지체의 우수한 생체적합성을 보여주며 개발된 지지체가 면역세포 배양에 적합함을 알 수 있었다.

### [0110] 실험예 2-4. 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 면역세포 부착양상 확인

[0111] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물의 면역세포 부착양상을 확인하였다.

[0112] 실시예 1-2.의 지지체 조성물 (LNEH 표면 코팅과 LNEH 하이드로젤)에서 골수유래 대식세포를 배양하면서 4일 동안 세포 부착 양상 및 세포 크기의 변화를 관찰하였다. 기존의 콜라겐 (COL)과 탈세포 심장 조직 유래 HEM 기반 코팅 표면 및 하이드로젤에서 배양한 세포를 대조군으로 비교 관찰하였다.

[0113] 도 11a 내지 11c 에서 확인되는 바와 같이, 다양한 코팅 표면과 하이드로젤에서 배양된 골수유래 대식세포를 F-actin (filamentous actin; 섬유상 액틴) 염색하여 세포 골격을 관찰하였다. 코팅 표면 중에서는 탈세포 림프절 조직 유래 LNEH 표면 코팅에서, 하이드로젤 중에서는 탈세포 림프절 조직 유래 LNEH 하이드로젤에서 세포 부착이 가장 우수하고 세포 모양도 가장 많이 변화함을 확인하였다 (도 11 (a)).

[0114] 그리고, 세포의 길이 신장 계수를 정량적으로 계산한 결과 탈세포 림프절 유래 LNEH 지지체에서 배양된 세포의 신장률이 가장 높음을 확인하였다 (도 11 (b)). 세포의 면적 또한 정량적으로 계산한 결과 탈세포 림프절 유래 LNEH 지지체에서 배양된 세포의 크기 성장률도 가장 높음을 확인하였다 (도 11(c)).

### [0116] 실험예 2-5. 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 M2 대식세포 특이적 형질에 대한 영향 확인

[0117] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물에 포함된 림프절 특이적 세포외기질 단백질들이 골수유래 대식세포의 분극화 (macrophage polarization)에 영향을 주는지 확인하였다.

[0118] 구체적으로, M2 대식세포 특이적인 마커 발현 분석을 통해 대식세포 중 M2 세포로의 분극화 수준을 조사하였다. 이를 위해 세포를 포르말린으로 고정한 후 CD206 또는 CD163 마커에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 진행하고 형광현미경으로 관찰하였다.

- [0119] 또한, M2 대식세포 마커에 대한 유전자 발현 분석을 위해 정량적 PCR 분석을 시행하였다. 배양된 대식세포의 RNA를 RNA kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 이용하여 추출한 뒤 cDNA를 제작하였다. TaqMan Fast Universal Master Mix system (Thermo Fisher Scientific)과 StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 정량적 PCR을 진행하였고 TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 각 유전자 발현을 정량하였다.
- [0120] 그 결과, 도 12a 내지 12d에서 확인된 바와 같이, 면역염색을 통해서 M2 대식세포의 특징인 항염증작용과 관련된 마커인 CD206과 CD163 단백질 발현을 비교해 보았을 때, 탈세포 림프절 유래 3D LNM 하이드로젤에서 배양된 대식세포에서 이들 마커가 가장 많이 발현되는 것을 확인하였다 (도 12 (a)).
- [0121] 그리고, 면역염색 이미지를 기반으로 M2 대식세포와 관련된 CD206 단백질의 발현을 정량했을 때 3D LNM 하이드로젤에서 가장 높은 발현량을 관찰하였다. 이를 통해 생체 내 존재하는 면역세포 미세환경을 모사하는 3D LNM 하이드로젤은 대식세포의 항염증성 형질 발현을 증진시킴을 확인하였다 (도 12 (b)).
- [0122] 면역염색을 통해서 탈세포 림프절 유래 3D LNM 하이드로젤에서 배양된 세포에서 대식세포 마커인 F4/80 단백질이 가장 많이 발현하는 것을 확인하였다 (도 12(c)). 이를 통해 3D LNM 하이드로젤 배양 지지체는 기존 콜라겐 하이드로젤 기반 배양 지지체와 비교하여 대식세포의 성숙도를 더욱 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0123] 정량적 PCR 분석을 통해 탈세포 림프절 조직 유래 3D LNM 하이드로젤에서 배양된 골수유래 대식세포에서 M2 대식세포 특이적인 마커인 Arg1, Ym1 유전자 발현이 가장 높음을 확인하였다 (도 12 (d)). 이러한 결과를 통해 3D LNM 하이드로젤이 2D 코팅 표면뿐 아니라 3D COL 하이드로젤 및 3D HEM 하이드로젤 보다 대식세포의 M2 형질 발현에 더욱 효과적임을 알 수 있다.
- [0125] **실험예 2-6. 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 M1 대식세포 특이적 형질에 대한 영향 확인**
- [0126] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물에 포함된 림프절 특이적 세포외기질 단백질들이 골수유래 대식세포의 M1 대식세포로의 분극화 (macrophage polarization)에 영향을 주는지 확인하였다.
- [0127] 구체적으로, M1 대식세포 특이적인 마커 발현 분석을 통해 대식세포 중 M1 세포로의 분극화 수준을 조사하였다. 이를 위해 세포를 포르말린으로 고정한 후 전체 대식세포 마커인 F4/80 및 M1 세포 마커 iNOS에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 진행하고 형광현미경으로 관찰하였다 (도 13a-c).
- [0128] 또한, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 이용하여 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  분비를 정량하였다. 이를 위해 배양 4일차에 대식세포의 배양액을 수거한 뒤 TNF- $\alpha$  ELISA kit (Koma Biotech, Seoul, Korea)를 이용하여 각 샘플의 TNF- $\alpha$  농도를 정량하였다 (도 13d).
- [0129] 그 결과, 도 13a 내지 13d에서 확인되는 바와 같이, F4/80-양성 전체 대식세포 중, NOS-양성 M1 대식세포 수를 정량 분석한 결과, COL, HEM, LNM 그룹 모두 비슷한 분포도를 보여 림프절 유래 지지체가 골수유래 대식세포의 M1 분극화에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다 (도 13 (a) 내지 13 (c)).
- [0130] 또한, M1 대식세포의 특징 중 하나인 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  생성은 2D 및 3D 배양 환경에서 COL, HEM, LNM 그룹 간 차이는 없었으나 대식세포가 3D 지지체에서 배양되었을 때 2D 지지체에서 배양되었을 때보다 더 낮은 TNF- $\alpha$  생성을 보여주는 것을 확인하였다 (도 13 (d)).
- [0131] 이를 통해 LNM 지지체는 염증성 표현형을 가지는 M1 타입 대식세포로의 분극화에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
- [0133] **실험예 2-7. 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물에서 M0 대식세포의 M2 대식세포로의 분화 확인**
- [0134] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물에 포함된 림프절 특이적 세포외기질 단백질들이 M0 상태의 골수유래 대식세포에서 M2 대식세포로의 분극화 (macrophage polarization)에 영향을 주는지 확인하였다.
- [0135] 각 지지체에서 M0 대식세포를 아무런 분화인자 없이 5일간 배양한 뒤 M2 대식세포의 마커인 CD163 발현을 면역염색을 통해 비교하였다. 면역염색방법은 전술한 바와 같다.



- [0136] 그 결과, 도 14에서 확인되는 바와 같이, 면역염색을 통해서 M2 대식세포의 특징인 항염증작용과 관련된 마커인 CD163 단백질을 발현을 비교해 보았을 때, F4/80-양성 대식 세포 중 CD163을 발현하는 M2 세포 비율이 탈세포 림프절 유래 3D LNM 하이드로젤에서 가장 높은 것을 확인하였다.
- [0137] 이러한 결과를 통해 3D LNM 하이드로젤 지지체를 이용하면 아무런 분화 인자 처리 없이도 M0 대식세포의 M2 대식세포로 분극화가 가능한 것을 확인하였다.
- [0139] **실험예 2-8. 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물에서 배양된 대식세포의 기능 분석**
- [0140] 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물에서 배양된 골수유래 대식세포의 기능 증진 정도를 분석하였다.
- [0141] 구체적으로, 본 실험은 FITC 형광을 부착한 덱스트란 (dextran)이 대식세포의 식작용 (phagocytosis)을 통해 얼마나 많이 세포 내로 유입되는지를 분석하기 위해 진행하였다. 이를 통해 대식세포의 중요한 기능 중 하나인 식작용 기능을 확인할 수 있고, 식작용이 활발히 일어났을수록 세포 내 초록색 형광 세기가 강해진다.
- [0142] 구체적으로, Fluorescein isothiocyanate (FITC)가 접합된 40 kDa 분자량의 덱스트란 (dextran)을 0.1 mg/mL 농도로 대식세포에게 처리한 뒤 45분 동안 37°C에서 배양하였다. 이후 형광현미경을 통하여 대식세포의 식작용을 확인하였다 (도 15a).
- [0143] 또한, ELISA를 이용하여 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 정량하였다. 이를 위해 배양 4일 및 8일차에 대식세포의 배양액을 수거한 뒤 IL-10 ELISA kit (Koma Biotech, Seoul, Korea)를 이용하여 각 샘플의 IL-10 농도를 정량하였다 (도 15b).
- [0144] 그 결과, 도 15a 및 15b에서 확인되는 바와 같이, 형광 이미징 분석을 통해 탈세포 림프절 조직 유래 3D LNM 하이드로젤에서 배양된 골수유래 대식세포에서 식작용이 가장 활발히 일어난 것을 확인하였고 이를 정량화 했을 때에도 마찬가지로 3D LNM 하이드로젤 조건에서 배양된 대식세포의 식작용에 의한 FITC-덱스트란이 가장 많이 세포 내로 유입됨을 확인하였다 (도 15 (a)).
- [0145] 또한, M2 대식세포가 분비하는 항염증성 사이토카인 중 하나인 인터루킨-10 (Interleukin-10, IL-10)의 분비량을 비교하는 실험에서 탈세포 림프절 조직 유래 3D LNM 하이드로젤에서 배양된 대식세포에서 가장 높은 수준의 IL-10 분비량이 관찰되었다 (도 15 (b)).
- [0146] 이러한 결과를 통해 3D LNM 하이드로젤이 골수 유래 대식세포의 식작용 기능 및 M2 분극화를 크게 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0148] **실험예 3: 탈세포 림프절 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 활용 가능성 확인**
- [0149] **실험예 3-1. 골수유래 대식세포와 간 오가노이드를 공배양 하여 실제 체내 환경과 유사한 간독성 모델의 제작**
- [0150] 신체 내에서는 면역세포가 다양한 조직 내에 존재하기 때문에 생체 내 조건과 보다 유사한 간 독성 모델 구축을 위해서는 간세포와 면역세포와의 공배양이 필요하다.
- [0151] 이에, 실시예 1-2. 에서 제조된 지지체 조성물에서 배양된 골수유래 대식세포와 간 오가노이드를 공배양하여 실제 체내 간 조직과 유사한 환경을 제조하였다. 간세포는 아세트아미노펜 (Acetaminophen, APAP)에 의해 손상되지만 탈세포 림프절 유래 지지체에서 배양된 M2 대식세포와 공배양했을 때 M2 대식세포의 항염증 작용 및 식작용 기능이 개선될 경우, APAP에 의한 간세포의 손상 및 염증반응이 감소되는 것으로 확인이 가능하다.
- [0152] 구체적으로, 간 오가노이드에 5 mM APAP (Sigma Aldrich)를 48시간 동안 처리한 뒤 GSH와 ROS를 각각 mBCL과 DHE (Sigma-Aldrich) 시약을 이용해 측정하였다. 세포에 5  $\mu$ M의 mBCL과 10  $\mu$ M의 DHE 처리하고 20분 동안 37°C에서 배양한 후 형광현미경을 통하여 관찰하였다.
- [0153] 그 결과, 도 16 a 내지 16d에서 확인되는 바와 같이, 형광 이미징 분석을 통해 APAP 약물이 처리된 간 오가노이드에서 Monochlorobimane (mBCL)로 확인할 수 있는 글루타티온 (Glutathione; GSH)양이 감소하고, Dihydroethidium (DHE)로 확인할 수 있는 활성산소의 양은 증가하는 것을 확인하였다 (도 16 (a)). 간 오가노이드와 골수유래 대식세포의 공배양 조건에서는 간 오가노이드를 단일 배양한 경우와 비교하여 APAP 약물 처리에 의해 mBCL이 감소하고 DHE가 증가하는 정도가 줄어들었다 (도 16 (b)).

- [0154] 형광 이미지 기반으로 DHE 형광 세기를 정량화한 결과, 대식세포와 간 오가노이드의 공배양 조건에서는 APAP 처리에 의한 DHE 형광 세기 변화에 있어 간 오가노이드만 배양했을 때만큼 DHE 형광이 증가하지 않는 것을 확인하였다 (도 16 (c)).
- [0155] 형광 이미지 기반으로 mBCL 형광 세기를 정량화 한 결과, 대식세포와 간 오가노이드의 공배양 조건에서는 mBCL 형광 세기가 APAP 약물을 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹이 거의 비슷한 것을 확인하였다. 간 오가노이드만 배양한 경우 보다는 APAP 처리에 의한 mBCL 형광의 감소 정도가 크게 줄어들었다 (도 16 (d)).
- [0156] 이러한 결과를 통해서 LNM 지지체에서 식작용 기능 및 M2 분극화 현상이 증진된 대식세포를 간세포와 공배양함으로써 실제 생체 내 간 조직에서의 독성 반응을 보다 정밀하게 구현할 수 있음을 확인하였다.
- [0158] **실험예 3-2. 골격근손상모델에서의 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNM)의 면역조절 기능 확인**
- [0159] 마우스 대퇴사두근 부위에 약 70%의 골격근 손상을 유발한 뒤 탈세포 림프절 조직 유래 3D LNM 하이드로젤 지지체를 주입했을 때 손상 부위에서 조직 재생에 도움이 되는 초기 면역 반응이 빠르게 일어나는 것을 확인하고자 동물실험을 진행하였다.
- [0160] 구체적으로, 이식 후 3일차와 10일차에 수득한 마우스의 대퇴사두근을 고정시킨 뒤 파라핀 절편으로 제작한다. 이후 탈수과정을 거친 뒤 헤마톡실린 용액에 20분, 에오신 용액에 5분 반응시켜 염색을 진행하였다 (도 17a). 면역조직염색을 위해서 가온된 Retrieval Solution에 조직 절편을 담가 조직의 항원을 노출시킨다. CD206에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 진행하고 형광 이미지 기반으로 CD206 양성 세포를 정량하였다.
- [0161] 도 17 a 내지 17d에서 확인되는 바와 같이, 헤마톡실린 & 에오신 (H&E) 염색을 통하여 근육 손상 부위에서 많은 면역세포들이 모여든 것을 확인하였다 (도 17(a)). 면역염색을 통해서 M2 대식세포의 특징인 항염증 작용과 관련된 CD206 단백질 발현을 분석하였을 때, 탈세포 림프절 LNM 하이드로젤을 주입한 부위에서 전체 면역세포 개수 대비 M2 타입 세포의 비율이 매우 높음을 확인하였다 (도 17 (b)). 전체 대식세포 중 M2 대식세포가 차지하는 비율을 정량하였을 때 탈세포 림프절 LNM 하이드로젤을 주입한 부위에서 수치가 가장 높은 것으로 확인된다 (도 17 (c)).
- [0162] 전체 대식세포의 개수 변화를 정량적으로 분석한 결과, 탈세포 림프절 LNM 하이드로젤을 주입한 경우 손상 부위에서의 M2 대식세포 개수와 비율이 대조군 (치료하지 않은 그룹 및 콜라겐 주입 그룹)에 비해 높은 것을 확인하였다. 이를 통해 탈세포 림프절 LNM 하이드로젤 지지체는 생체내 면역조절을 통해 손상 부위의 과도한 면역 반응을 억제해주고 손상 부위로 항염증성 형질을 지닌 M2 대식세포의 이동 및 분극화를 촉진시키는 것을 알 수 있다 (도 17 (d)).
- [0163] 따라서 LNM 하이드로젤은 조직재생에 도움이 되는 면역반응을 유도하여 조직 손상 치료에 기여할 수 있다.
- [0165] **실험예 3-3. 골격근손상 (volumetric muscle loss; VML) 모델에 탈세포 림프절 조직 유래 지지체 (LNM)를 이식한 후 수행된 조직학 분석 (10주차) 및 운동행동학적 분석 평가**
- [0166] 외상성 근육 손상 치료용 소재로서의 적용 가능성을 평가하기 위해 마우스 골격근손상 (volumetric muscle loss; VML) 모델의 quadriceps femoris (QF) 근육 부위에 COL 및 LNM 지지체를 이식하고 10주 후에 조직학 분석을 수행하였다.
- [0167] 그 결과 도 18a 및 18b에서 확인되는 바와 같이, H&E 염색을 통해 분석한 결과, NT(no treatment; 치료를 받지 못한 그룹)과 COL 그룹에서는 새로 생성된 근육조직이 관찰되지 않은 반면, LNM 그룹에서는 근육조직이 새로 재생된 것으로 판단되었다. Masson's trichrome (MT) 염색을 통해서도 섬유화 침윤(fibrotic infiltration) 정도가 NT와 COL 그룹에 비해 LNM 그룹에서 감소함을 확인하였다 (도 18 (a)).
- [0169] 또한, 이식된 LNM의 기능성을 걸음걸이 분석(gait analysis)을 통해 최대 10주 동안 보행능력 및 균형능력을 평가하였다.
- [0170] 구체적으로, 뒷다리의 자세(stance), 보폭(stride) 및 흔들거림(sway)을 분석하고 수술 전의 수치와 비교하였다.

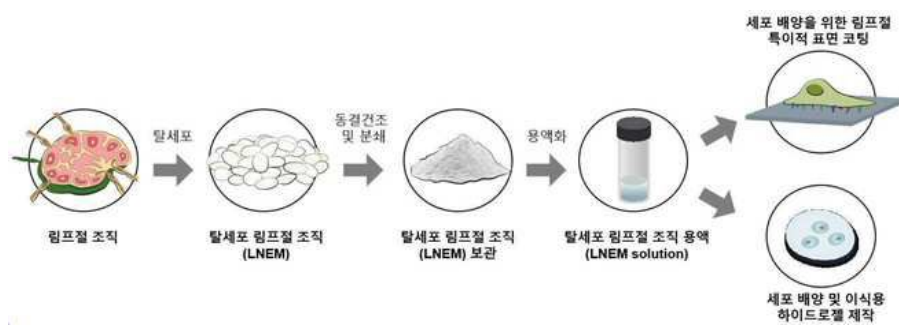
[0171] 정상(Normal) 그룹의 경우 10주 동안 자세길이는 증가, 보폭은 유지가 되었으며, 흔들거림 길이는 감소하였다. COL을 이식한 그룹은 이식 전의 길이와 비교하여 자세는 유의하게 변하지 않았고, 흔들거림의 길이가 증가하는 것을 막지 못하였다. 반면, LMEM을 이식한 그룹은 수술 전의 길이와 비교하여 자세 및 보폭의 길이가 향상되었다. 10주차에는 정상(Normal) 그룹과 비교하였을 때 비슷한 자세와 보폭 및 흔들거림의 증가도를 보였다 (도 18(b)).

[0172] 따라서, LMEM을 이식한 그룹이 VML 모델의 근육 병리 지연 및 근육 손상 완화에 효과적일 수 있음을 알 수 있다 (자세 길이 증가, 흔들거림의 길이 유지).

[0174] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

## 도면

### 도면1

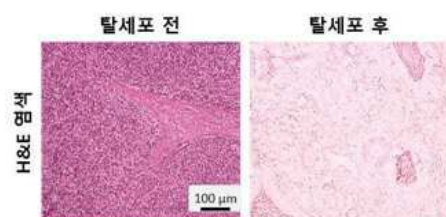


### 도면2

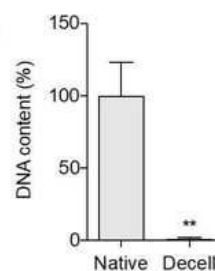
(a)



(b)

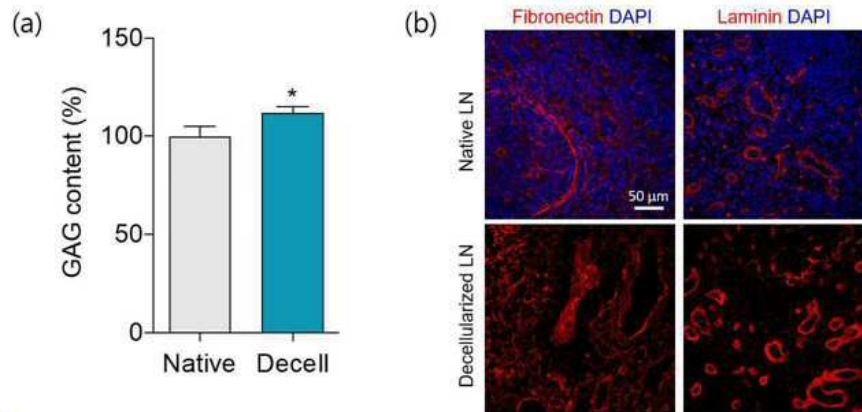


(c)

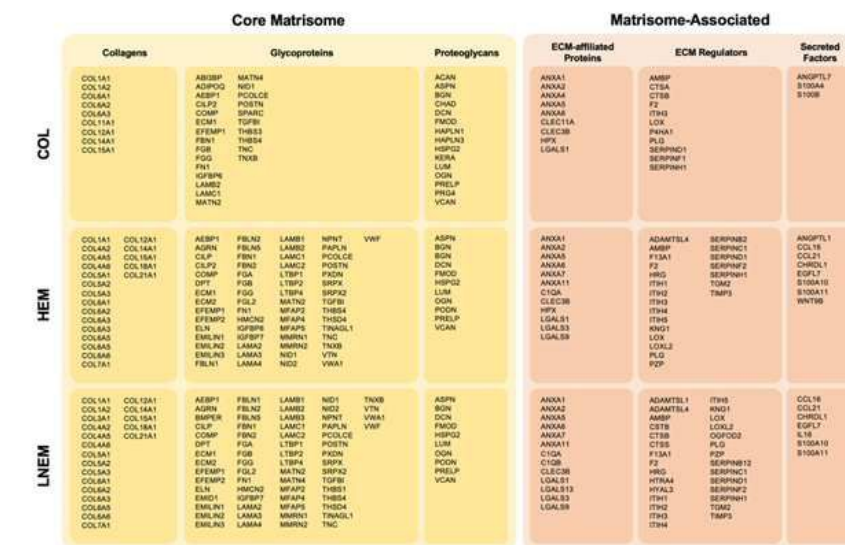




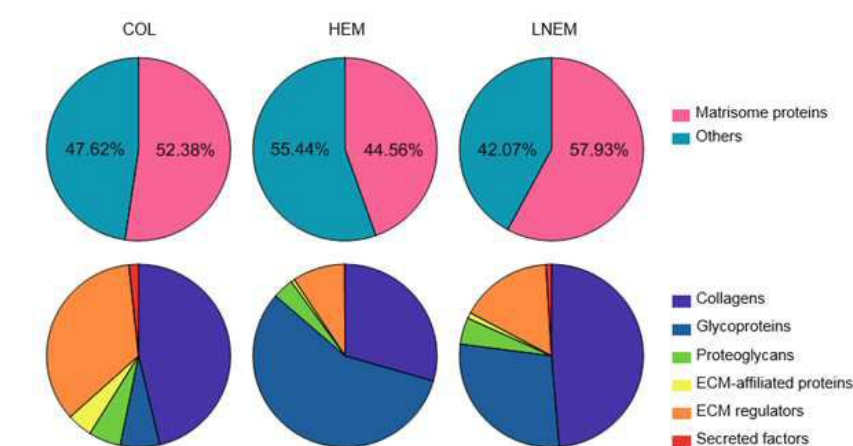
도면3



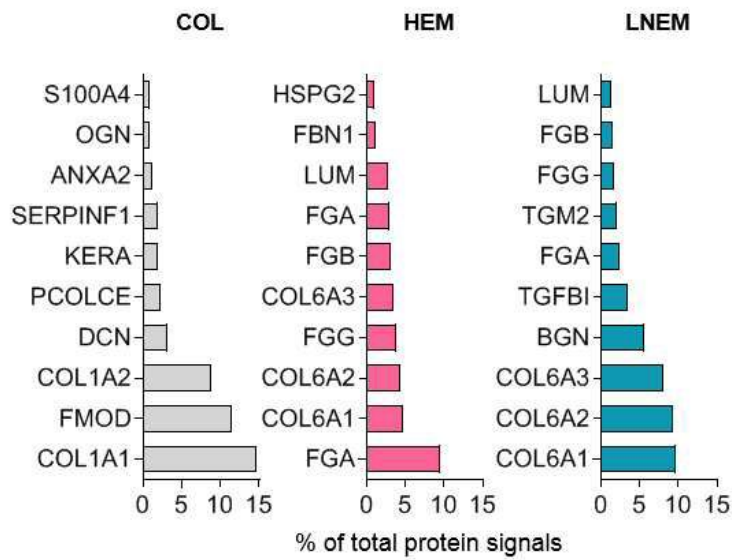
도면4



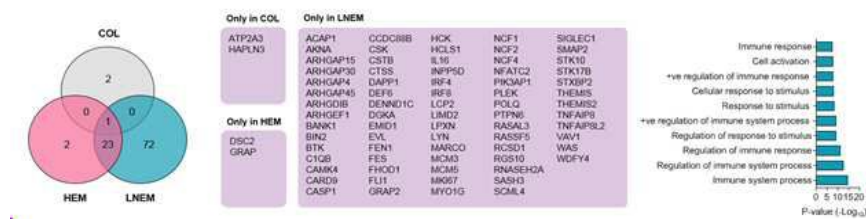
도면5



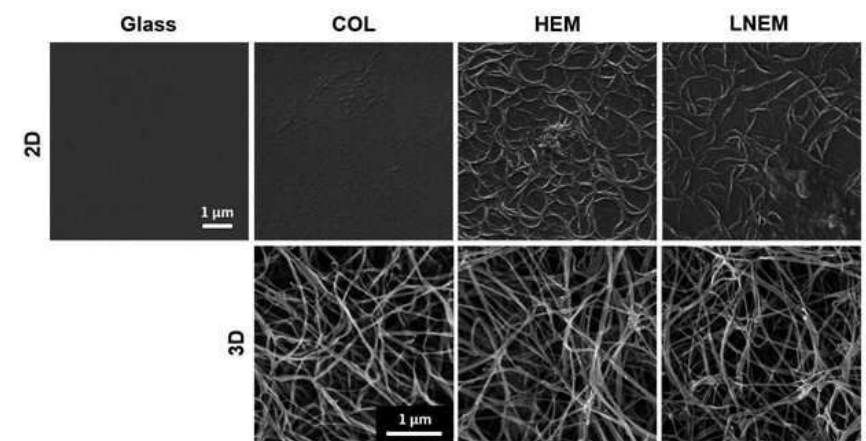
도면6



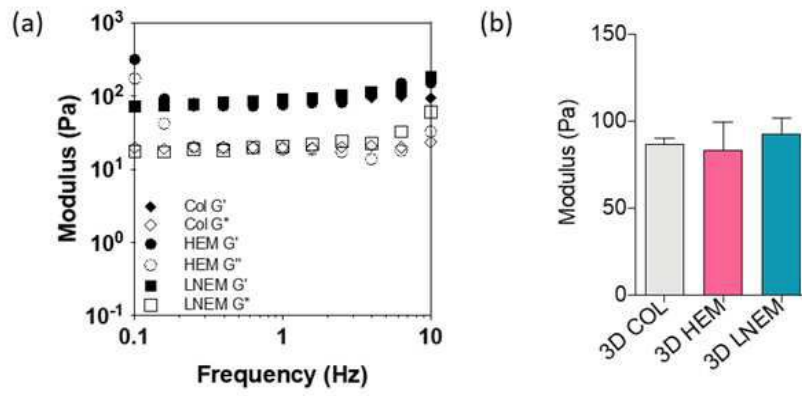
도면7



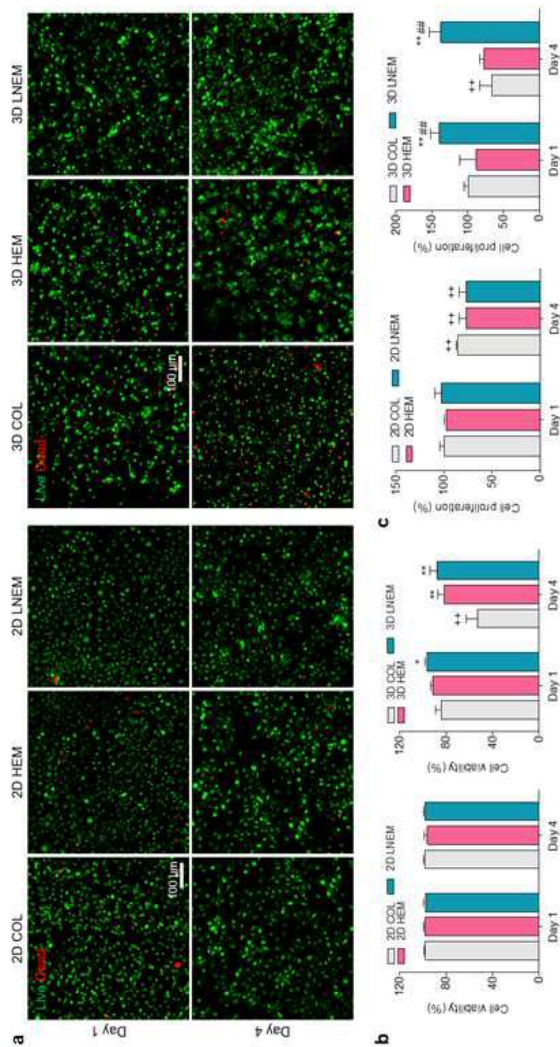
도면8



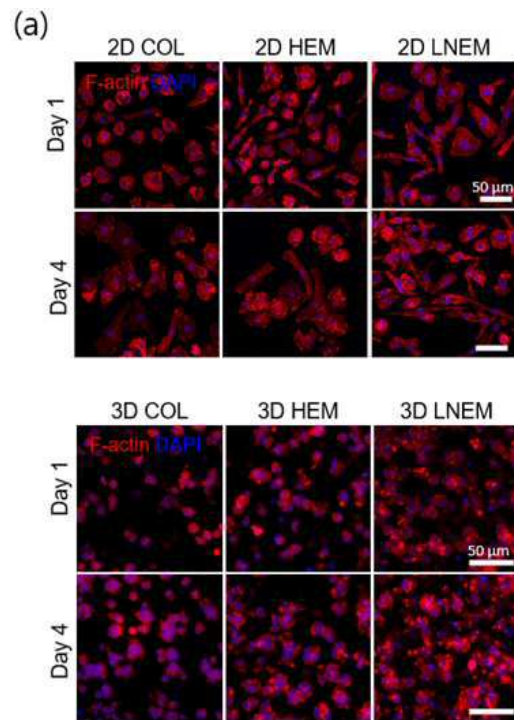
도면9



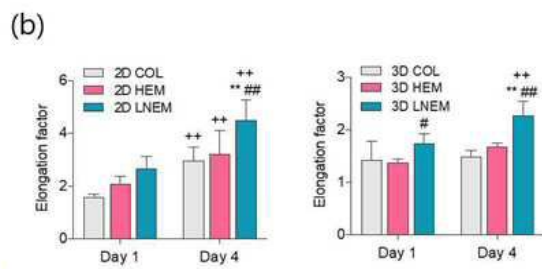
도면10



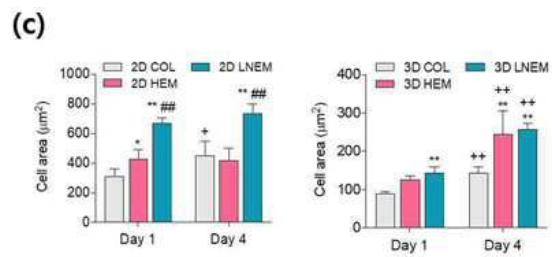
도면11a



도면11b



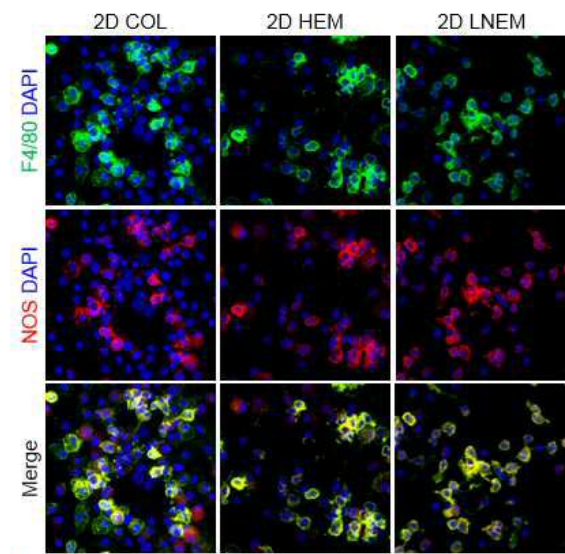
도면11c



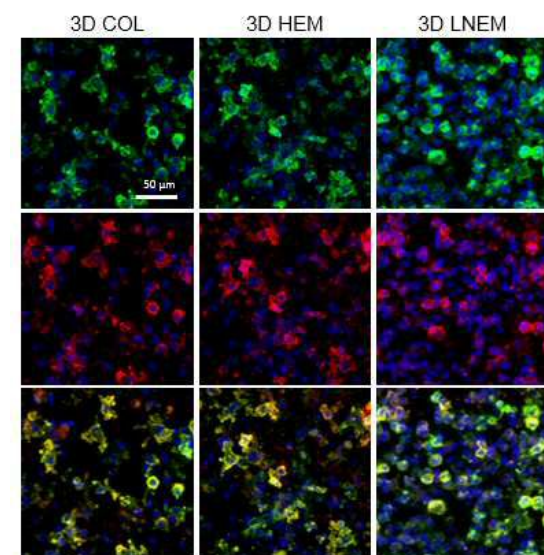




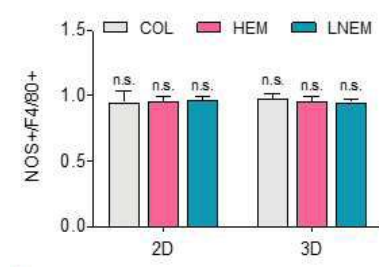
도면13a



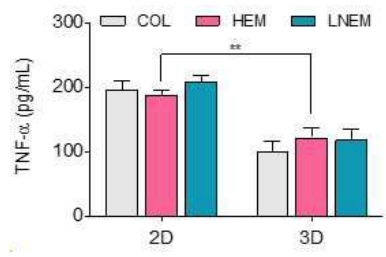
도면13b



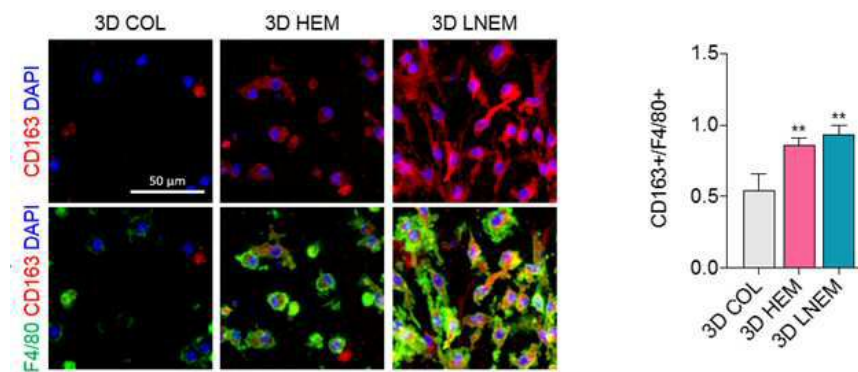
도면13c



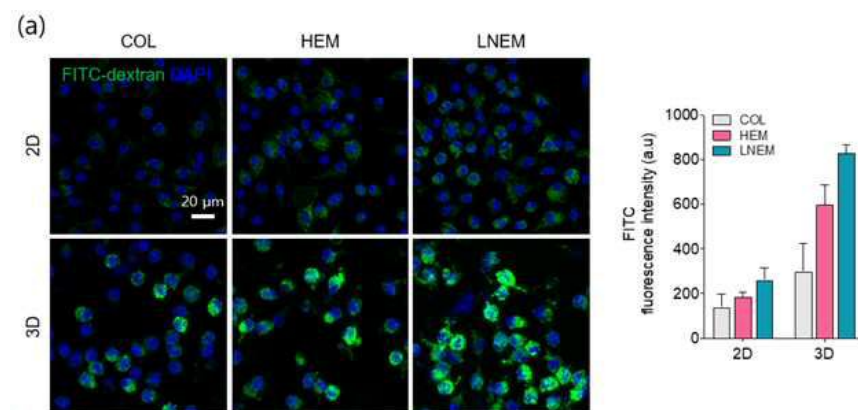
도면13d



도면14



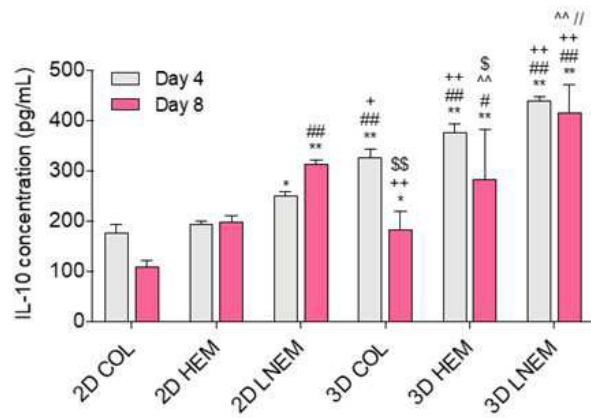
도면15a





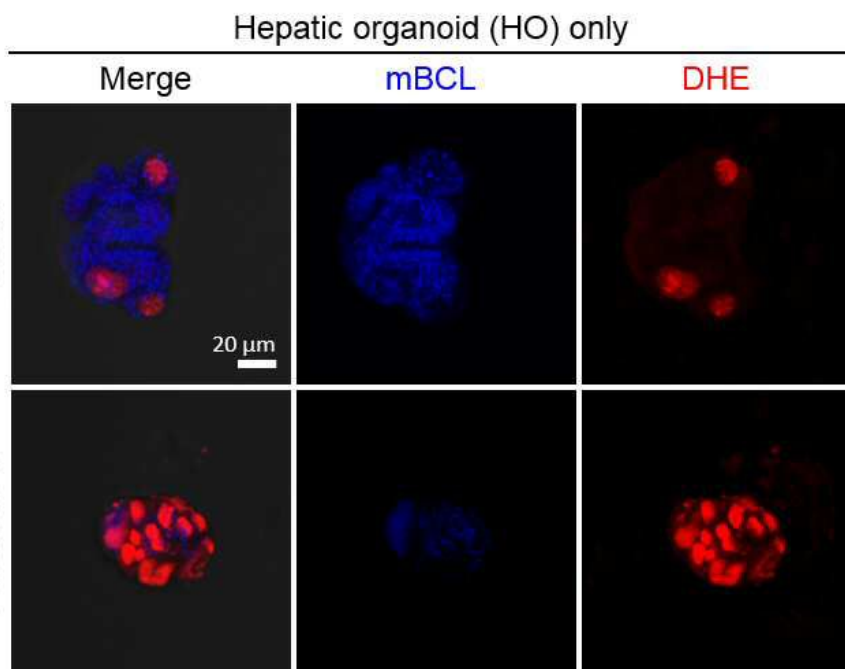
도면15b

(b)

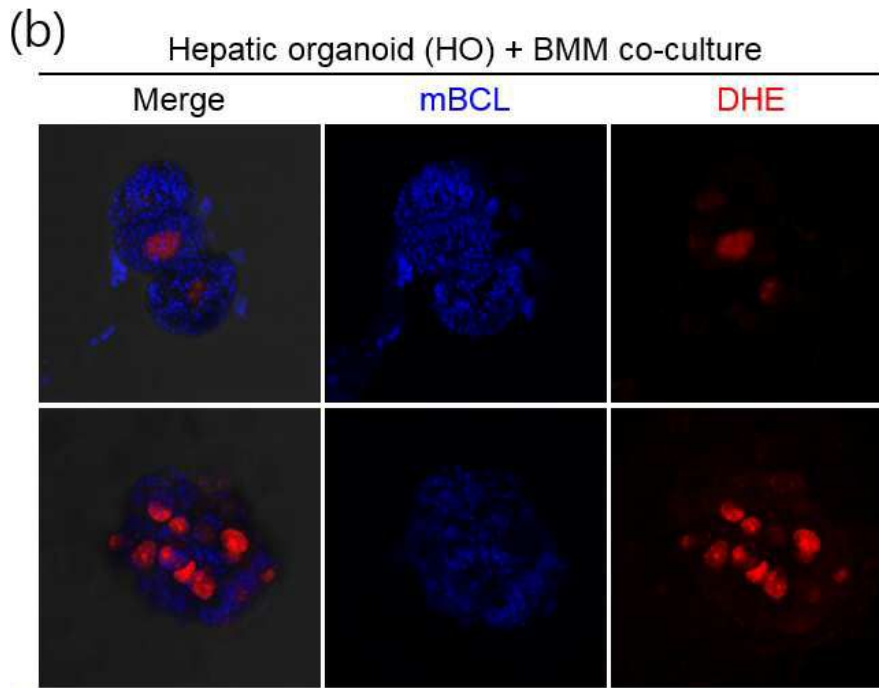


도면16a

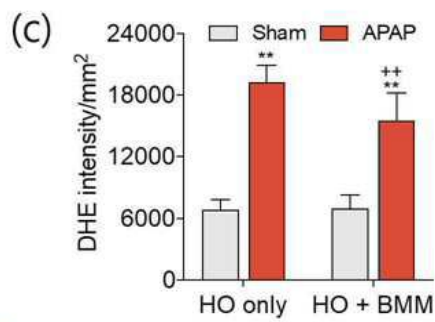
(a)



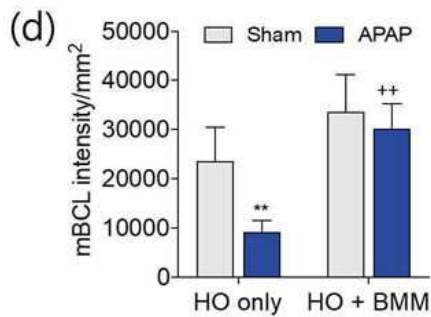
도면16b



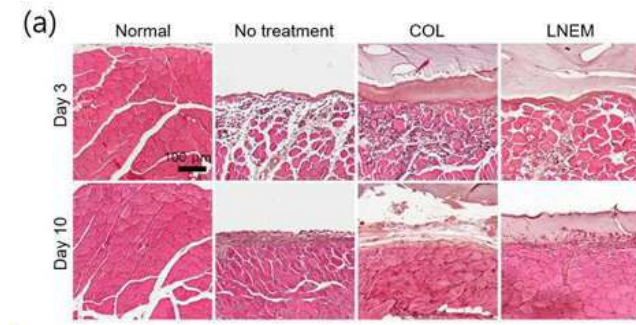
도면16c



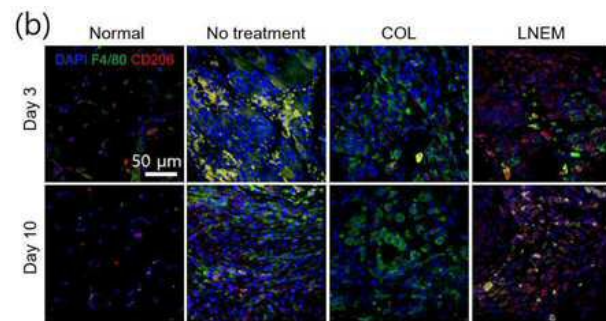
도면16d



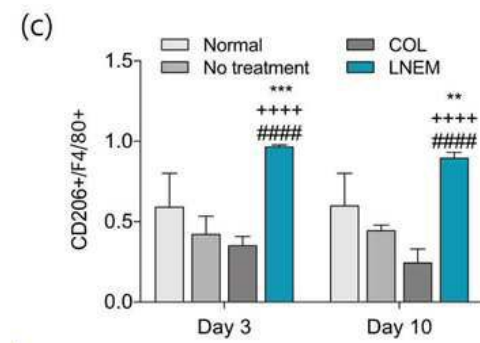
도면17a



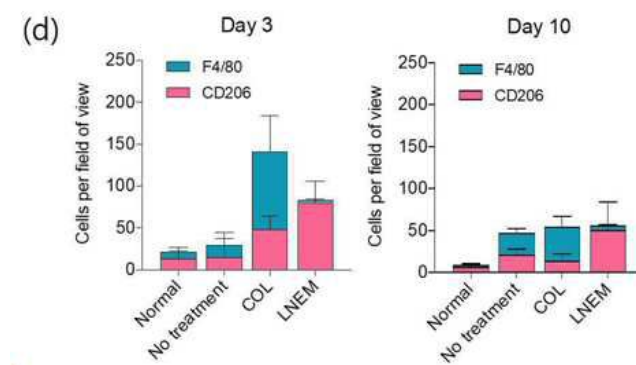
도면17b



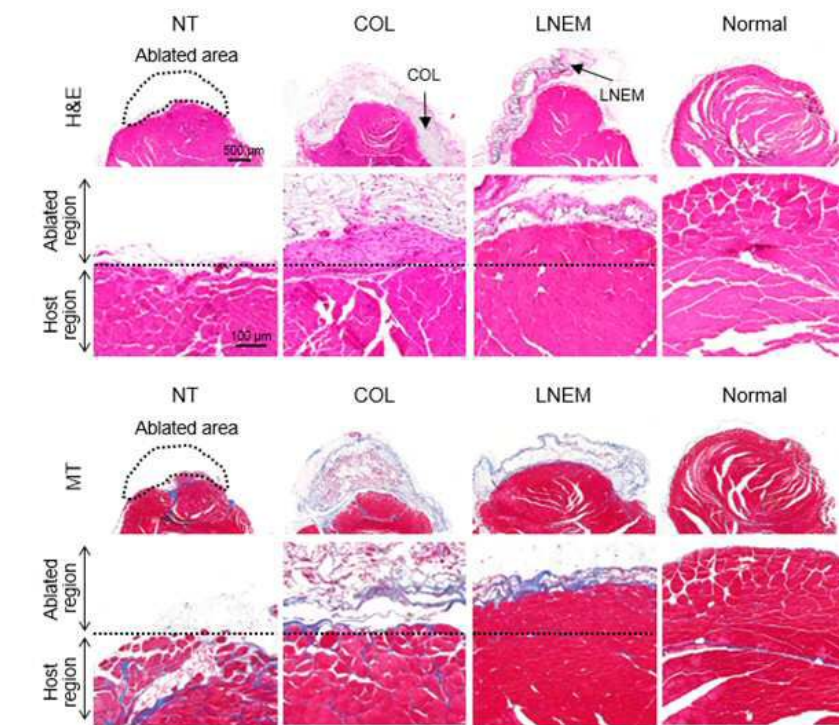
도면17c



도면17d



도면18a



도면18b

