



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0131153  
(43) 공개일자 2021년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/115 (2010.01) C12M 1/12 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 5/09 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/115 (2013.01)  
C12M 25/14 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0049594  
(22) 출원일자 2020년04월23일  
심사청구일자 2020년04월23일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
노영훈  
서울특별시 성동구 왕십리로 16, 101동 1702호(성수동1가, 트리마제)  
임별이  
충청남도 천안시 동남구 순천향1길 16, 101동 507호(쌍용동, 쌍용신성아파트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 11 항

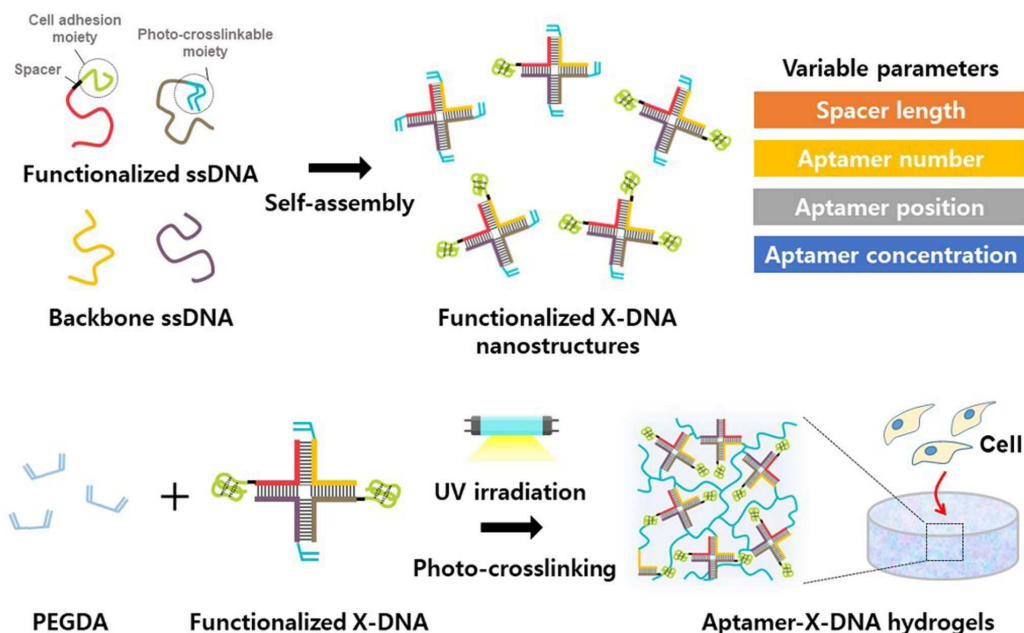
(54) 발명의 명칭 압타머가 결합된 핵산나노구조체 및 이의 3차원 세포 배양 용도

(57) 요약

본 발명은 표적 세포에 특이적으로 부착 가능한 압타머로 기능화된 핵산나노구조체 및 이의 3차원 세포 배양 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 압타머가 결합된 핵산나노구조체를 이용한 3차원 세포 배양 모델은 종래 세포 부착 기능을 갖는 펩타이드 등을 이용한 경우에 비해 압타머 서열에 따라 특정 세포를 표적으로 다양한 세포의

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



배양이 가능하며, 종래 기술에 비해 매우 적은 농도의 압타머를 사용하여 동일한 세포 배양 효율을 달성할 수 있다. 또한, 압타머는 화학적 합성이 용이하고 비용이 저렴하여 높은 경제성을 확보할 수 있으며, 광가교결합 기능을 갖는 다양한 생체적합성 소재를 하이드로젤에 도입하여 제조할 수 있는바, 소재의 범용적 적용이 가능하다. 더욱이, 핵산나노구조체와 압타머의 접목으로 나노 단위에서의 구조체 크기 및 형태 조작성이 손쉽게 가능하여 하이드로젤 내의 세포 배양을 위한 압타머의 기능성을 매우 정밀하게 조작할 수 있는바, 상기와 같은 장점으로 인해 본 발명에 따른 압타머가 결합된 핵산나노구조체는 3차원 세포 배양에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

**C12N 15/11** (2013.01)

**C12N 5/0062** (2013.01)

**C12N 5/0693** (2013.01)

**C12N 2529/10** (2013.01)

**C12N 2533/40** (2013.01)

(72) 발명자

**남건욱**

서울특별시 강남구 도산대로83길 23, 502호(청담동, 대우로얄캐운티3)

**김태형**

서울특별시 서대문구 연희로5길 14, 613호(연희동, 연희자이엘라)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

2개 이상의 단일 가닥 핵산이 분지형으로 결합된 핵산 조립체; 및

상기 핵산 조립체의 각 말단에 결합된 하나 이상의 압타머(apramer)를 포함하는, 3차원 세포 배양용 분지형(branched) 핵산나노구조체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 핵산나노구조체는 핵산 조립체의 각 말단에 결합되는 하나 이상의 광가교결합기(Photo-crosslinker)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산나노구조체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 압타머와 핵산 가닥은 1 내지 10개의 뉴클레오티드로 이루어진 핵산으로 연결된 것을 특징으로 하는, 핵산나노구조체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 분지형 핵산 조립체는 X형, Y형, T형, 덤벨형(dumbbell shape), 덴드리머 형태(dendrimer-like shape) 및 폴리포드 형태(polypod-like shape)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 형태인 것을 특징으로 하는, 핵산나노구조체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 압타머는 표적세포와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 핵산나노구조체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 핵산나노구조체 및 하이드로젤(hydrogel)을 포함하는, 3차원 세포 배양용 지지체.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol); PEG), 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(poly(N-isopropylacrylamide)), 폴리(N-알킬아크릴아마이드)(poly(N-alkylacrylamide)), 폴리(N-n-프로필

아크릴아마이드)(poly(N-n-propylacrylamide)), 폴리(N-아이소프로필메타크릴아마이드)(poly(N-isopropylmethacrylamide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)), 폴리(데스아미노-티로실-티로신 에틸 에스터 카보네이트)(poly(desamino-tyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate); poly(DTEC)), 텍스트란-폴리락티드(dextran-poly lactide), 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(elastin-like polypeptides), 폴리에스터(polyester), 폴리락티드(poly lactide), 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산)(poly(D,L-lactic acid)), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(poly(lactide-co-glycolides)), 비오틴화 폴리(에틸렌 글리콜-블록-락트산)(biotinylated poly(ethylene glycol-block-lactic acid)), 폴리(알킬시아노아크릴레이트)(poly(alkylcyanoacrylate)), 폴리(엡실론-카프로락톤)(poly(epsilon-caprolactone)), 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리(비스(p-카복시페녹시)프로판-세바스산(poly(bis(p-carboxyphenoxy)propane-sebacic acid)), 폴리오르토에스터(polyorthoester), 폴리포스포에스터(polyphosphoester), 폴리포스파젠(polyphosphazene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리(아미노산)(poly(amino acid)), 폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리프로필렌-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-polypropylene-poly(ethylene oxide)), 폴리(락트산)-g-폴리(비닐 알코올)(poly(lactic acid)-g-poly(vinyl alcohol)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(L-락트산)(poly(ethylene oxide)-poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산-코-글리콜산)-폴리(에틸렌글리콜)(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)), 폴리(L-락티드-에틸렌 글리콜)(poly(L-lactide-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(하이드록시산)(poly(ethylene glycol)-co-poly(hydroxyl Acid)), 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol)), 폴리(락트산-코-라이신)-폴리(아스파르트산)(poly(lactic acid-co-lysine)-poly(aspartic acid)), 폴리(-카프로락톤-코-트리메틸렌 카보네이트)(poly(-caprolactone-co-trimethylene carbonate)), 폴리(L-락트산-코-글리콜산-코-L-세린)(poly(L-lactic acid-co-glycolic acid-co-L-serine)), 폴리(프로필렌 푸마레이트)(poly(propylene fumarate)), 올리고(폴리(에틸렌 글리콜) 푸마레이트)(oligo(poly(ethylene glycol) fumarate)), 폴리(프로필렌 푸마레이트-코-에틸렌 글리콜)(poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)다이[에틸포스파티딜(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트](poly(ethylene glycol)di[ethylphosphatidyl(ethylene glycol)methacrylate]), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-폴리(에틸렌 글리콜)(poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene glycol)), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-젤라틴(poly(N-isopropylacrylamide)-gelatin), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드-아크릴산)(poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid)) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 지지체.

## 청구항 8

하기의 단계를 포함하는, 3차원 세포 배양 방법:

- (a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 핵산나노구조체 및 세포를 하이드로젤(hydrogel) 용액과 혼합하는 단계;
- (b) 상기 혼합 용액을 경화시키는 단계; 및
- (c) 상기 혼합 용액에 빛을 조사하여 광교결합(Photo-crosslinking)을 유도하는 단계.

## 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol); PEG), 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(poly(N-isopropylacrylamide)), 폴리(N-알킬아크릴아마이드)(poly(N-alkylacrylamide)), 폴리(N-n-프로필아크릴아마이드)(poly(N-n-propylacrylamide)), 폴리(N-아이소프로필메타크릴아마이드)(poly(N-isopropylmethacrylamide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)), 폴리(데스아미노-티로실-티로신 에틸 에스터 카보네이트)(poly(desamino-tyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate); poly(DTEC)), 텍스트란-폴리락티드(dextran-poly lactide), 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(elastin-like polypeptides), 폴리에스터(polyester), 폴리락티드(poly lactide), 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산)(poly(D,L-

lactic acid)), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(poly(lactide-co-glycolides)), 비오틴화 폴리(에틸렌 글리콜-블록-락트산)(biotinylated poly(ethylene glycol-block-lactic acid)), 폴리(알킬시아노아크릴레이트)(poly(alkylcyanoacrylate)), 폴리(엡실론-카프로락톤)(poly(epsilon-caprolactone)), 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리(비스(p-카복시페녹시)프로판-세바스산(poly(bis(p-carboxyphenoxy)propane-sebacic acid)), 폴리오르토에스터(polyorthoester), 폴리포스포에스터(polyphosphoester), 폴리포스파젠(polyphosphazene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리(아미노산)(poly(amino acid)), 폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리프로필렌-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-polypropylene-poly(ethylene oxide)), 폴리(락트산)-g-폴리(비닐 알코올)(poly(lactic acid)-g-poly(vinyl alcohol)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(L-락트산)(poly(ethylene oxide)-poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락틱-코-글리콜산)-폴리(에틸렌글리콜)(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)), 폴리(L-락티드-에틸렌 글리콜)(poly(L-lactide-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(하이드록시산)(poly(ethylene glycol)-co-poly(hydroxyl Acid)), 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol)), 폴리(락트산-코-라이신)-폴리(아스파르트산)(poly(lactic acid-co-lysine)-poly(aspartic acid)), 폴리(-카프로락톤-코-트리메틸렌 카보네이트)(poly(-caprolactone-co-trimethylene carbonate)), 폴리(L-락트산-코-글리콜산-코-L-세린)(poly(L-lactic acid-co-glycolic acid-co-L-serine)), 폴리(프로필렌 푸마레이트)(poly(propylene fumarate)), 올리고(폴리(에틸렌 글리콜) 푸마레이트)(oligo(poly(ethylene glycol) fumarate)), 폴리(프로필렌 푸마레이트-코-에틸렌 글리콜)(poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)다이[에틸포스파티딜(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트](poly(ethylene glycol)di[ethylphosphatidyl(ethylene glycol)methacrylate]), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-폴리(에틸렌 글리콜)(poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene glycol)), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-젤라틴(poly(N-isopropylacrylamide)-gelatin), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드-아크릴산)(poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid)) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양 방법.

## 청구항 10

제8항에 있어서,

상기 단계 (a)에서 혼합 용액은 광교결합 반응기 및 광개시제(photoinitiator)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양 방법.

## 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 광교결합 반응기는 비닐(vinyl), 아크릴레이트(acrylate), N-하이드록시숙신아미드(N-hydroxysuccinimide), 아민(amine), 카복실레이트(carboxylate) 및 티올(thiol)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 압타머가 결합된 핵산나노구조체 및 이의 3차원 세포 배양 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 2개 이상의 단일 가닥 핵산이 분지형으로 결합된 핵산 조립체 및 상기 핵산 조립체의 각 말단에 결합된 하나 이상의 압타머(aptamer)를 포함하는, 3차원 세포 배양용 분지형(branched) 핵산나노구조체, 상기 핵산나노구조체 및 하이드로젤을 포함하는 3차원 세포 배양용 지지체 및 이를 이용한 3차원 세포 배양 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 3차원 세포 배양(3D cell culture)은 세포간의 접촉이 사면으로 이루어지고, 세포 외 기질(extracellular matrix; ECM)과 세포간의 상호작용이 생체 내 환경과 유사하게 일어날 수 있기 때문에 2차원 세포 배양 보다 생체 내 미세 환경(microenvironment)을 모방하는데 적합하다. 즉, 2차원 세포 배양에서는 내성을 보이지 않는 약

물이 산소, 영양분, 그리고 부산물이 세포를 둘러싼 조직 내에서의 확산 기울기 차이로 3차원 세포 배양에서는 내성을 보이는 등의 차이가 있을 수 있고, 이는 신약 개발 및 약물 스크리닝(drug screening)에서의 생체적합성 차이를 유발할 수 있다. 이 때문에 3차원 세포 배양은 암 연구, 약물 개발, 재생 의학 등에 폭넓게 응용되고 있으며, 나아가 3차원 세포 배양에서 세포 성장에 필요한 세포 활성 인자를 접목한 연구가 활발히 진행되고 있다. 주로 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin)과 같은 단백질 또는 알지디(RGD)와 같은 펩타이드가 세포 접착 인자로 활용되고 있으며, 3차원 세포 배양에 핵산 압타머를 이용한 연구는 현재까지 미비한 상황이다.

[0003] 핵산 압타머(aptamer)는 3차원 구조의 단일 가닥 DNA, RNA로써 표적 물질에 높은 친화력과 특이성으로 다양한 저분자 및 단백질뿐만 아니라 세포나 조직에도 특이적으로 결합할 수 있어 새로운 분자 인식 소자로써 보고되고 있다. 압타머는 젤라틴, RGD와 같은 비핵산 물질보다 세포 배양 기능성으로 다양한 이점을 갖고 있는데, 압타머의 주요 특징은 다음과 같다. (1) 압타머는 다양한 표적 세포에 특이적 결합이 가능하며, 이는 압타머 염기서열을 적절히 바꿔줌으로써 쉽게 접목이 가능해 범용성이 높다. (2) 압타머는 SELEX(Sequential Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라는 핵산 분자의 선별과 증폭 과정을 통해 탐색되는데, 이를 통해 올리고뉴클레오타이드 공급원(oligonucleotide pool)으로부터 원하는 표적에 높은 결합력(binding affinity)과 선택성(selectivity)을 보유한 압타머 확보가 용이하다(Trends in biotechnology, 28(10), 517-525.). (3) 짧은 가닥 염기 서열의 길이로, 비교적 생산비용이 저렴하고, 열안정성 및 보존성이 높으며, 화학적 합성이 간단하기 때문에 대량 생산에 용이하다. (4) 다양한 핵산공법을 통한 타 생체소재와의 복합체 형성과 기능기의 화학적 수식이 가능하다. (5) 배양된 세포의 회수 시, 단백질 분해 효소(protease) 등에 의해 세포 표면 단백질에 손상을 입히지 않고, 핵산 분해 효소(nuclease)의 처리만으로 배양 세포를 안정하게 회수할 수 있다.

[0004] 한편, 최근에는 생체 적합성이 높은 핵산을 생체소재로 활용하기 위해 염기서열 특이적 상보결합을 이용한 다양한 3차원의 분지형(branched), 이방성(anisotropic) 핵산나노구조체가 개발되고 있다. 또한 핵산나노구조체를 이루는 각 단일 가닥 DNA 말단에 성장인자, 무기나노입자, 형광 표지, 반응기 등의 기능기(functional moiety)를 화학적, 효소적 결합을 통해 핵산나노구조체 내에 결합 위치를 정교하게 조절하여 다기능성 부여가 가능하다. 특히 나노구조체를 구성하는 염기서열 및 압타머 연결 DNA 길이를 조절하면 핵산나노구조체 내에 압타머 기능기 위치조절을 통한 세포 부착능 최적화가 용이하며, 이를 통하여 세포-세포간의 접착(cell-cell adhesion)을 통한 상호작용을 증진시키거나, 세포 표면에 존재하는 접착 단백질과 핵산나노구조체에 도입된 압타머, 성장인자와 같은 기능기들과의 세포-기질 접착(cell-substratum adhesion)을 통하여 세포의 증식, 분화 등의 유도가 정교하게 가능하리라 기대할 수 있다. 그러나 구체적으로 표적 세포에 특이적으로 부착하는 압타머가 결합된 핵산나노구조체를 3차원 세포배양에 이용한 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명자들은 세포 부착능을 갖는 압타머가 결합된 핵산나노구조체를 세포 배양에 이용하기 위한 연구를 수행하였다. 구체적으로, 압타머와 광가교결합기로 구성된 다기능성 분지형 DNA 나노구조체를 고안하고, 상기 구조체를 생체적합성 하이드로젤 지지체에 도입하여 세포 접착 유도를 통한 3차원 세포 배양이 가능함을 확인하였으며 최적의 세포 배양을 위한 조건을 확립하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 이에, 본 발명은 2개 이상의 단일 가닥 핵산이 분지형으로 결합된 핵산 조립체; 및 상기 핵산 조립체의 각 말단에 결합된 하나 이상의 압타머(aptamer)를 포함하는, 3차원 세포 배양용 분지형(branched) 핵산나노구조체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 핵산나노구조체 및 하이드로젤을 포함하는, 3차원 세포 배양용 지지체를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 핵산나노구조체를 이용한 3차원 세포 배양 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 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

- [0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2개 이상의 단일 가닥 핵산이 분지형으로 결합된 핵산 조립체; 및 상기 핵산 조립체의 각 말단에 결합된 하나 이상의 압타머(aptamer)를 포함하는, 3차원 세포 배양용 분지형(branched) 핵산나노구조체를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일구현으로, 상기 핵산나노구조체는 핵산 조립체의 각 말단에 결합되는 하나 이상의 광가교결합기(Photo-crosslinker)를 더 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현으로, 상기 압타머와 핵산 가닥은 1 내지 10개의 뉴클레오티드로 이루어진 핵산으로 연결될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현으로, 상기 분지형 핵산 조립체는 X형, Y형, T형, 덤벨형(dumbbell shape), 덴드리머 형태(dendrimer-like shape) 및 폴리포드 형태(polypod-like shape)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현으로, 상기 압타머는 표적세포와 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현으로, 상기 압타머는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 핵산나노구조체 및 하이드로젤을 포함하는, 3차원 세포 배양용 지지체를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현으로, 상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol); PEG), 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(poly(N-isopropylacrylamide)), 폴리(N-알킬아크릴아마이드)(poly(N-alkylacrylamide)), 폴리(N-n-프로필아크릴아마이드)(poly(N-n-propylacrylamide)), 폴리(N-아이소프로필메타크릴아마이드)(poly(N-isopropylmethacrylamide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)), 폴리(데스아미노-티로실-티로신 에틸 에스터 카보네이트)(poly(desamino-tyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate); poly(DTEC)), 텍스트란-폴리락티드(dextran-poly lactide), 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(elastin-like polypeptides), 폴리에스터(polyester), 폴리락티드(poly lactide), 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산)(poly(D,L-lactic acid)), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(poly(lactide-co-glycolides)), 비오틴화 폴리(에틸렌 글리콜-블록-락트산)(biotinylated poly(ethylene glycol-block-lactic acid)), 폴리(알킬시아노아크릴레이트)(poly(alkylcyanoacrylate)), 폴리(엡실론-카프로락톤)(poly(epsilon-caprolactone)), 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리(비스(p-카복시페녹시)프로판-세바스산(poly(bis(p-carboxyphenoxy)propane-sebacic acid)), 폴리오르토에스터(polyorthoester), 폴리포스포에스터(polyphosphoester), 폴리포스파젠(polyphosphazene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리(아미노산)(poly(amino acid)), 폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리프로필렌-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-polypropylene-poly(ethylene oxide)), 폴리(락트산)-g-폴리(비닐 알코올)(poly(lactic acid)-g-poly(vinyl alcohol)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(L-락트산)(poly(ethylene oxide)-poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산-코-글리콜산)-폴리(에틸렌글리콜)(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)), 폴리(L-락티드-에틸렌 글리콜)(poly(L-lactide-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(하이드록시산)(poly(ethylene glycol)-co-poly(hydroxyl Acid)), 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol)), 폴리(락트산-코-라이신)-폴리(아스파르트산)(poly(lactic acid-co-lysine)-poly(aspartic acid)), 폴리(-카프로락톤-코-트리메틸렌 카보네이트)(poly(-caprolactone-co-trimethylene carbonate)), 폴리(L-락트산-코-글리콜산-코-L-세린)(poly(L-lactic acid-co-glycolic acid-co-L-serine)), 폴리(프로필렌 푸마레이트)(poly(propylene fumarate)), 올리고(폴리(에틸렌 글리콜) 푸마레이트)(oligo(poly(ethylene glycol) fumarate)), 폴리(프로필렌 푸마레이트-코-에틸렌 글리콜)(poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)다이[에틸포스파티딜(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트](poly(ethylene glycol)di[ethylphosphatidyl(ethylene glycol)methacrylate]), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-폴리(에틸렌 글리콜)(poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene glycol)), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-젤라틴(poly(N-isopropylacrylamide)-gelatin), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드-아크릴산)(poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid)) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 3차원 세포 배양 방법을 제공한다.
- [0020] (a) 상기 핵산나노구조체 및 세포를 하이드로젤(hydrogel) 용액과 혼합하는 단계;



- [0021] (b) 상기 혼합 용액을 경화시키는 단계; 및
- [0022] (c) 상기 혼합 용액에 빛을 조사하여 광가교결합(Photo-crosslinking)을 유도하는 단계.
- [0023] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계 (a)에서 혼합 용액은 광가교결합 반응기 및 광개시제(photoinitiator)를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 광가교결합 반응기는 비닐(vinyl), 아크릴레이트(acrylate), N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide), 아민(amine), 카복실레이트(carboxylate) 및 티올(thiol)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 압타머로 기능화된 핵산나노구조체를 이용한 3차원 세포 배양 모델은 종래 세포 부착 기능을 갖는 펩타이드 등을 이용한 경우에 비해 압타머 서열에 따라 특정 세포를 표적으로 다양한 세포의 배양이 가능하며, 종래 기술에 비해 매우 적은 농도의 압타머를 사용하여 동일한 세포 배양 효율을 달성할 수 있다. 또한, 압타머는 화학적 합성이 용이하고 비용이 저렴하여 높은 경제성을 확보할 수 있으며, 광가교결합 기능을 갖는 다양한 생체적합성 소재를 하이드로젤에 도입하여 제조할 수 있는바, 소재의 범용적 적용이 가능하다. 더욱이, 핵산나노구조체와 압타머의 접목으로 나노 단위에서의 구조체 크기 및 형태 조작성이 손쉽게 가능하여 하이드로젤 내의 세포 배양을 위한 압타머의 기능성을 매우 정밀하게 조작할 수 있는바, 상기와 같은 장점으로 인해 본 발명에 따른 압타머가 결합된 핵산나노구조체 및 상기 나노구조체가 도입된 하이드로젤은 3차원 세포 배양에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.
- [0026] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 압타머가 결합된 핵산나노구조체(Apt-X-DNA)의 제작 모식도 및 압타머 핵산나노구조체가 도입된 3차원 세포 배양용 하이드로젤의 제작 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 광가교결합기를 갖는 단일 가닥 DNA(ssDNA-PEGA)를 합성 및 정제한 결과로서, 도 2a는 아민기로 5' 말단이 개질된 ssDNA(ssDNA-NH<sub>2</sub>) 및 PEGA-NHS를 혼합하고 밤새 배양하여 ssDNA-PEGA 합성을 유도한 후 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행한 결과이며, 도 2b는 ssDNA-NH<sub>2</sub> 및 합성된 ssDNA-PEGA에 대하여 아가로오스 젤 전기영동을 실시한 결과이다.
- 도 3은 X-DNA 구조체에 도입되는 압타머와 광가교결합기 수가 각각 0 내지 3개 조절된 Apt-X-DNA의 모식도 및 이를 이용하여 아가로오스 젤 전기영동을 실시한 결과이다.
- 도 4는 압타머의 개수가 조절된 Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤에서의 세포 배양능 차이를 알아보기 위한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤에 대한 팽윤 및 분해 연구를 실시한 결과로서, 도 5a는 음성대조군(PEG), 압타머가 없는 X-DNA 구조체(Apt-X-(0)) 또는 압타머 2개가 결합된 X-DNA(Apt-X-(2))가 도입된 하이드로젤의 동결 건조 전(Swollen hydrogel)과 후(Lyophilized hydrogel)의 사진을 나타낸 것이고, 도 5b 및 도 5c는 Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤의 압타머 수에 따른 팽윤비(Swollen ratio (%)) 및 분해비(Degradation (%))를 비교한 결과이다.
- 도 6은 X-DNA 구조체와 압타머 간의 연결 DNA 염기서열 길이가 조절(0T, 5T, 10T)된 Apt-X-DNA 각각에 대하여 비표적 세포주인 NIH/3T3, 표적 세포주인 SKOV-3 또는 MCF-7에서의 결합능을 비교분석한 결과이다.
- 도 7은 Apt-X-DNA 농도가 다르게 도입된 하이드로젤의 물성 및 세포 배양능 차이를 분석한 결과로서, 도 7a는 상기 각 하이드로젤의 형태적 차이를 주사전자현미경으로 관찰한 결과이고, 도 7b 및 도 7c는 상기 각 하이드로젤에서의 세포 배양능 차이를 알아보기 위해 세포 생존 및 사멸 분석과 MTT 분석을 각각 실시한 결과이며, 도 7d는 각 하이드로젤에 대한 점탄성 분석 결과를 나타낸 것이다(PEG: 음성대조군, Apt-X-DNA가 각각 10, 20, 및 40μM로 도입된 하이드로젤을 각각 Apt-X-DNA 1, 2 및 4로 명명함).
- 도 8은 압타머 개수가 조절된 다양한 Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤에서의 세포 배양능 차이를 확인하기 위해



4일 동안 세포를 배양한 후 세포 생존 및 사멸 분석을 실시하고 이를 면적당 세포 수로 정량화한 결과이다(압타머가 0, 1, 2, 및 3개 도입된 X-DNA 구조체를 각각 Apt-X (0), Apt-X (1), Apt-X (2) 및 Apt-X (4)로 명명함).

도 9는 압타머가 결합되지 않은 대조군인 PEGDA, Apt-X (0) 및 Apt-X (2)가 각각 도입된 하이드로젤에서 7일 동안 세포를 배양한 후 세포 배양능을 비교분석한 결과로서, 도 9a는 세포 생존 및 사멸 분석을 실시한 결과이고, 도 9b는 MTT 분석을 실시한 결과이다.

도 10은 X-DNA 구조체에 도입되는 압타머의 위치 및 X-DNA 나노구조체의 도입 여부에 따른 하이드로젤에서의 세포 배양능 차이를 비교분석한 결과로서, 도 10a는 세포 생존 및 사멸 분석을 실시한 결과이고, 도 10b는 MTT 분석을 실시한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명자들은 세포 부착능을 갖는 압타머가 결합된 핵산나노구조체를 세포 배양에 이용하기 위한 연구를 진행하였다. 그 결과, 압타머와 광가교결합기로 구성된 다기능성 분지형 DNA 나노구조체를 고안하고, 상기 구조체를 생체적합성 하이드로젤 지지체에 도입하여 세포 접착 유도를 통한 3차원 세포 배양이 가능함을 확인하였으며 최적의 세포 배양을 위한 조건을 확립하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0029] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 2개 이상의 단일 가닥 핵산이 분지형으로 결합된 핵산 조립체; 및 상기 핵산 조립체의 각 말단에 결합된 하나 이상의 압타머(aptamer)를 포함하는, 3차원 세포 배양용 분지형(branched) 핵산나노구조체를 제공한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 핵산나노구조체는 바람직하게 단일 가닥 DNA가 서열 특이적으로 상호작용하여 자가 조립(self-assembly)된 DNA 구조체로서, 상기 핵산나노구조체를 구성하는 핵산 조립체는 X형, Y형, T형, 덤벨형(dumbbell shape), 텐드리머 형태(dendrimer-like shape) 및 폴리포드 형태(polypod-like shape)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일실시양태에서, 상기 핵산 조립체가 X 형태로 조립되는 경우에는 각각 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 4개의 단일 핵산 가닥으로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 압타머는 특정 단백질과 결합함으로써 표적 세포에 특이적으로 부착하는 기능을 갖는 것으로서, 바람직하게는 세포막에서 일반적으로 발현되는 뉴클레옴(nucleolin)을 표적으로 하며 구체적으로 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 핵산구조체를 이용한 3차원 세포 배양 모델에서는 표적하는 세포에 따라 당업자가 표적하는 단백질 및 이에 따른 압타머 서열을 용이하게 변경하여 사용 가능하다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 압타머는 핵산나노구조체를 구성하는 단일 가닥 DNA의 말단에 연결 DNA 염기서열을 통해 연결되는 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 연결 DNA는 1 내지 10개, 더욱 바람직하게는 3 내지 7개, 더더욱 바람직하게는 4 내지 6개, 가장 바람직하게는 5개 뉴클레옴이드로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 핵산나노구조체는 광가교결합기(Photo-crosslinker)를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “광가교결합(Photo-crosslinking)”이란 2개의 거대 분자 또는 하나의 분자 내 2개의 상이한 부분 사이에 광 유도를 통해 형성된 공유결합을 의미하는 것이다.
- [0037] 본 발명에서 있어서, 상기 압타머는 예컨대 X 형태의 핵산나노구조체를 구성하는 단일 가닥 DNA의 말단에 1 내지 3개 결합될 수 있으며, 압타머가 결합되지 않은 DNA 말단에는 광가교결합기가 결합될 수 있다. 보다 구체적으로, X 형태의 핵산나노구조체를 구성하는 4개의 단일 가닥 DNA의 5' 말단에 압타머 또는 광가교결합기가 연결될 수 있어 상기 핵산나노구조체에는 총 4개의 압타머 또는 광가교결합기가 결합될 수 있다. 예컨대, 하나의 압타머가 결합되는 경우 나머지 3군데 DNA 말단에 광가교결합기가 연결될 수 있고, 압타머가 3개 결합되는 경우 나머지 1군데 DNA 말단에 광가교결합기가 연결될 수 있다. 한편, 2개의 압타머가 결합되는 경우, 핵산나노구조체에서 한 말단과 이와 이웃하는 다른 말단에 위치하거나, 양 말단으로 가장 멀리 떨어져서 위치할 수도 있는데, 양 말단에 위치하는 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 핵산나노구조체 제조방법을 제공한다.

- [0039] (a) 압타머가 연결된 핵산 단일 가닥을 제조하는 단계;
- [0040] (b) 광가교결합기가 접합된 핵산 단일 가닥을 제조하는 단계; 및
- [0041] (c) 상기 단계 (a) 및 (b)에서 제조된 핵산 단일 가닥을 동일한 몰량으로 혼합하는 단계.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)에서 핵산 단일 가닥에 접합된 광가교결합기는 PEGA(acrylate polyethylene glycol)로, 구체적으로는 단일 가닥 DNA의 5' 말단을 아민기(NH<sub>2</sub>)로 개질시키고 PEGA의 NHS와 pH 9의 인산완충액에서 혼합하고 50℃ 조건으로 밤새 배양하여 광가교결합기인 PEGA가 접합된 단일 가닥 DNA(ssDNA-PEGA)을 제조할 수 있다. 상기 제조된 ssDNA-PEGA는 HPLC를 통해 반응이 이루어지지 않은 DNA 및 PEGA와 분리할 수 있다. 그러나 광가교결합기가 접합된 핵산 단일 가닥을 제조하는 조건 및 이의 분리방법은 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자가 적절히 조절하여 적용할 수 있다.
- [0043] 상기 단계 (c)에서, 압타머가 결합된 핵산 단일 가닥 및 광가교결합기가 접합된 핵산 단일 가닥을 혼합하는 방법은 nuclease-free water에서 각 가닥의 등 몰량을 혼합하고 열 순환 프로그램을 이용하여 이루어질 수 있으며, 핵산 단일 가닥 간의 자가 조립이 이루어지도록 하여 핵산나노구조체를 제조할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 압타머 및 광가교결합기가 결합된 핵산나노구조체를 합성하였으며, 압타머의 연결 DNA의 길이에 따른 세포 특이성 및 이의 기능성을 확인하였다. 결과적으로 연결 DNA의 길이가 0, 5, 및 10 개로 구성된 핵산나노구조체의 경우 5개 뉴클레오티드로 구성된 경우에서 압타머의 표적 세포 결합능이 가장 높게 나타났으며, 표적 단백질인 뉴클레오린을 높게 발현하는 세포에 더욱 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 핵산나노구조체 및 하이드로젤을 포함하는, 3차원 세포 배양용 지지체를 제공한다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 3차원 세포 배양용 지지체(scaffold)는 바람직하게는 상기 핵산나노구조체가 하이드로젤 내로 도입되어 광가교결합으로 연결된 하이드로젤 지지체로서, 핵산나노구조체와 함께 도입되는 표적 세포는 핵산구조체의 압타머에 부착되어 상기 지지체 내에서 증식될 수 있다.
- [0047] 상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol); PEG), 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(poly(N-isopropylacrylamide)), 폴리(N-알킬아크릴아마이드)(poly(N-alkylacrylamide)), 폴리(N-n-프로필아크릴아마이드)(poly(N-n-propylacrylamide)), 폴리(N-아이소프로필메타크릴아마이드)(poly(N-isopropylmethacrylamide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)), 폴리(테스아미노-티로실-티로신 에틸 에스터 카보네이트)(poly(desamino-tyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate); poly(DTEC)), 텍스트란-폴리락티드(dextran-poly(lactide)), 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(elastin-like polypeptides), 폴리에스터(polyester), 폴리락티드(poly(lactide)), 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산)(poly(D,L-lactic acid)), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(poly(lactide-co-glycolides)), 비오틴화 폴리(에틸렌 글리콜-블록-락트산)(biotinylated poly(ethylene glycol-block-lactic acid)), 폴리(알킬시아노아크릴레이트)(poly(alkylcyanoacrylate)), 폴리(엡실론-카프로락톤)(poly(epsilon-caprolactone)), 폴리안하이드라이드(polyanhydride), 폴리(비스(p-카복시페녹시)프로판-세바스산)(poly(bis(p-carboxyphenoxy)propane-sebacic acid)), 폴리오르토에스터(polyorthoester), 폴리포스포에스터(polyphosphoester), 폴리포스파젠(polyphosphazene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리(아미노산)(poly(amino acid)), 폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리프로필렌-폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide)-polypropylene-poly(ethylene oxide)), 폴리(락트산)-g-폴리(비닐 알코올)(poly(lactic acid)-g-poly(vinyl alcohol)), 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(L-락트산)(poly(ethylene oxide)-poly(L-lactic acid)), 폴리(D,L-락트산-코-글리콜산)-폴리(에틸렌글리콜)(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)), 폴리(L-락티드-에틸렌 글리콜)(poly(L-lactide-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(하이드록시산)(poly(ethylene glycol)-co-poly(hydroxyl Acid)), 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol)), 폴리(락트산-코-라이신)-폴리(아스파르트산)(poly(lactic acid-co-lysine)-poly(aspartic acid)), 폴리(-카프로락톤-코-트리메틸렌 카보네이트)(poly(-caprolactone-co-trimethylene carbonate)), 폴리(L-락트산-코-글리콜산-코-L-세린)(poly(L-lactic acid-co-glycolic acid-co-L-serine)), 폴리(프로필렌 푸마레이트)(poly(propylene fumarate)), 올리고(폴리(에틸렌 글리콜) 푸마레이트)(oligo(poly(ethylene glycol) fumarate)), 폴리(프로필렌 푸마레이트-코-에틸렌 글리콜)(poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol))

furmarate-co-ethylene glycol)), 폴리(에틸렌 글리콜)다이[에틸포스파티딜(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트](poly(ethylene glycol)di[ethylphosphatidyl(ethylene glycol)methacrylate]), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-폴리(에틸렌 글리콜)(poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene glycol)), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)-젤라틴(poly(N-isopropylacrylamide)-gelatin), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드-아크릴산)(poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid)) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol); PEG)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 3차원 세포 배양 방법을 제공한다.

[0049] (a) 상기 핵산나노구조체 및 세포를 하이드로젤 용액과 혼합하는 단계;

[0050] (b) 상기 혼합 용액을 경화시키는 단계; 및

[0051] (c) 상기 혼합 용액에 빛을 조사하여 광가교결합(Photo-crosslinking)을 유도하는 단계.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)는 상기에서 제조된 핵산나노구조체와 배양하고자 하는 세포를 하이드로젤 용액과 혼합하는 단계로서, 이때 하이드로젤 내에서 광가교결합을 위해 예컨대 핵산나노구조체의 DNA 가닥 말단에 접합된 광가교결합기와 반응하여 광가교결합을 형성할 수 있는 광가교결합 반응기와 광개시제를 함께 첨가할 수 있다.

[0053] 상기 광가교결합 반응기는 비닐(vinyl), 아크릴레이트(acrylate), N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide), 아민(amine), 카복실레이트(carboxylate) 및 티올(thiol)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 본 발명에서는 아크릴레이트-기능화된 폴리에틸렌글리콜(acrylate-functionalized polyethylene glycol; PEGA)과의 광가교결합을 위해 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트(polyethylene glycol diacrylate; PEGDA)를 첨가하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 상기 단계 (b)는 상기 혼합 용액을 경화시키는 단계로, 해당 기술분야에서 공지된 하이드로젤 용액을 경화시킬 수 있는 방법을 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 본 발명에서는 상기 하이드로젤 용액을 2개의 슬라이드 글라스 사이에 주입하는 방법을 이용하였으며, 이때 상기 두 슬라이드를 일정 간격으로 두어 3차원 세포 배양을 위해 하이드로젤이 입체적으로 생성될 수 있도록 하였다.

[0055] 상기 단계 (c)는, 단계 (b)에서 경화된 혼합 용액에 빛을 조사하여 광가교결합의 형성을 유도하는 단계로서, 상기 광가교결합은 가시광선, 자외선, 근적외선, 적외선 또는 마이크로파 조사에 의해 형성될 수 있으며, 또한 감마선, X-선 또는 라디오파(radio wave)를 적절히 사용할 수도 있다.

[0056] 상기 단계 (c) 이후, 배양하고자 하는 표적 세포의 특성 등에 따라 배양하는 조건 및 기간은 당업자가 적절히 조절하여 배양을 진행할 수 있다.

[0057] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 방법으로 제조된 압타머 핵산나노구조체가 도입된 하이드로젤의 팽윤비와 분해비를 조사하였다. 먼저 팽윤비를 알아보기 위해 제조된 하이드로젤을 팽윤시키고 이를 동결 건조한 결과 둥근 모양의 3차원 형태는 유지되었으며, 도입되는 압타머 수를 달리하여 각각 제조한 하이드로젤에 대하여 팽윤비를 계산 결과 2개의 압타머가 도입된 경우가 가장 높게 나타난 것을 확인하였다. 또한, PBS 완충액에서 각 핵산나노구조체가 도입된 하이드로젤의 분해성을 분석한 결과, 역시 2개의 압타머가 도입된 경우에 유의한 수준으로 분해가 일어나지 않은 것을 확인하였다(실시예 6 참조).

[0058] 본 발명의 다른 실시예에서는, 도입된 압타머 핵산나노구조체의 농도에 따른 하이드로젤의 형태를 관찰하고 세포 생존율을 분석하였다. 먼저, 상기 핵산나노구조체가 각각 10, 20 또는 40 $\mu$ M 농도로 도입된 하이드로젤 및 음성대조군 PEG 하이드로젤을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 핵산나노구조체의 농도가 높을수록 하이드로젤의 기공 크기가 작아지는 것으로 관찰되었다. 세포 배양능 역시 핵산나노구조체의 농도가 높을수록 세포 생존율이 높아지는 경향을 보였으며, 하이드로젤의 저장 탄성 계수는 감소하는 것을 확인하였다(실시예 8 참조).

[0059] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 핵산나노구조체에 결합되는 압타머 수가 세포 배양능에 미치는 영향을 분석한 결과, 압타머가 2개 결합된 조건에서 최적의 세포 배양능을 달성할 수 있음을 확인하였으며(실시예 9 참조), 나아가 3차원의 핵산구조체와 압타머가 결합될 때 두 구조 사이의 충돌로 인해 입체적 장애가 발생할 수 있는바, 압타머의 최적 결합 위치를 분석한 결과 압타머가 각각 1, 3번 단일 가닥 DNA에 결합되어 X 형태의 핵산나노구조체에서 양 말단으로 가장 멀리 위치하는 경우 세포가 균등하게 분포하고 세포 배양능이 가장 높은 것을 확인하였다.

- [0060] 상기 실시예 결과들을 통해, 본 발명에 따른 3차원 세포 배양 모델에서 최적의 세포 배양능을 달성할 수 있는 최적의 조건들을 확립하였다.
- [0062] 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.
- [0064] **[실시예]**
- [0065] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**
- [0066] **1-1. 실험재료**
- [0067] 본 실험에 사용된 DNA 올리고뉴클레오타이드 및 압타머 서열(AS1411)은 Integrated DNA Technologies(Coralville, IA, USA)에서 구입하였다. 3500-Da 분자량을 갖는 PEGA 숙신이미딜 카르복시메틸 에스터(succinimidyl carboxymethyl ester)는 Jenkem Technology(Beijing, China)로부터 구입하였다. 또한 일염기 및 이염기 칼륨 인산, 트리에틸아민 및 빙초산은 Duksan Pure Chemicals(Seoul, South Korea)에서 구입하였다.
- [0069] **1-2. 단일 가닥 DNA(single strand DNA; ssDNA)의 기능화**
- [0070] **1-2-1. ssDNA에 압타머 서열의 연장**
- [0071] ssDNA에 압타머(AS1411) 서열을 연결시키기 위해, 압타머 서열을 구성하는 추가적인 길이의 ssDNA를 표준 탈염 하에 합성하고 Integrated DNA Technologies(Integrated DNA Technologies)로부터 구입하였다. 또한 압타머 서열과 ssDNA 사이에 연결 DNA 서열을 도입하였다.
- [0073] **1-2-2. ssDNA상에 광교결합성 PEGA의 접합**
- [0074] PEGA 숙신이미딜 카르복시메틸 에스터를 혼합하고, 50℃에서 0.1M 인산완충액에서 아민-개질된 ssDNA(ssDNA-NH<sub>2</sub>)와 밤새 배양하였다. 이후 상기 방법에 따라 PEGA가 접합된 ssDNA(ssDNA-PEGA)가 합성되었는지 겔 전기영동을 통해 검증하였다. 구체적으로 1× TBE 완충액 하에 80V에서 60분 동안 2% (w/v) 아가로오스 겔 전기영동을 실시하였다. ssDNA와 아크릴레이트 폴리에틸렌글리콜(acrylate polyethylene glycol; PEGA)의 접합은 종래 공지된 문헌에 근거하여 수행되었다.
- [0075] ssDNA 및 PEGA의 접합 후에, HPLC를 수행하여 반응이 이루어지지 않은 물질들을 여과하고 접합된 ssDNA-PEGA만을 수집하였다. HPLC는 진공 디게서(degasser), 4차 펌프, 자동 샘플러, 다중 파장 자외선-시각 검출기(UV-Vis) 및 자동 분획 수집기가 장착된 YL9100 HPLC 시스템(Younglin Instrument, Anyang, South Korea)에서 Hypersil GOLD™ C18 컬럼(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용했다. 순수한 PEGA-ssDNA는 종래 공지된 방법에 따라 0.1M 트리에틸암모늄 아세테이트(triethylammonium acetate; TEAA)하에 5~30% 아세토니트릴 구배를 통해 1.25mL·min<sup>-1</sup> 유속에서 14분 내에 50℃, 260nm 파장의 자외선 검출 하에 분리되었다.
- [0077] **1-3. 광교결합성 압타머-X-DNA의 조립**
- [0078] 다양한 수의 압타머가 도입된 X-DNA(Apt-X-DNA)를 제조하기 위해, 압타머 서열이 연장되거나 PEGA로 기능화된 ssDNA(PEGA-ssDNA)의 등 물량(500nM)을 총 부피 100μL의 nuclease-free water(Integrated DNA Technologies, IA, USA)에서 최대 Apt-X-DNA 합성을 위한 염 농도 및 온도 조건 하에 혼합하였다.
- [0079] 열 순환기(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여, 해당 기술분야에 공지된 방법에 따라 Apt-X-DNA를 제조하였으며, 이후 Apt-X-DNA의 합성 여부를 확인하기 위해, 500nM의 Apt-X-DNA 4μL를 6x 로딩 염료(New England Biolabs, MA, USA) 0.8μL와 혼합하고 80V에서 80분 동안 2% (w/v) 아가로오스 겔 전기영동을 실시하였다. 겔 이미지는 GelDoc® XR 시스템 및 ImageLab 소프트웨어(Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 촬영하



였다.

#### 1-4. 하이드로젤 지지체 내로 압타머-X-DNA의 도입

세포배양에 사용될 하이드로젤을 10 $\mu$ l의 부피로 슬라이드 글라스와 석영 슬라이드(quartz slide) 사이에 주입하였다. 상기 2개 슬라이드는 하이드로젤이 입체적으로 생성될 수 있도록 적절한 간격을 두었다. 이어서 하이드로젤 용액이 주입된 슬라이드에 254nm의 자외선을 7분간 조사하였고, 이때 자외선이 투과할 수 있는 석영 슬라이드를 위쪽으로 하였다.

#### 1-5. 하이드로젤의 팽윤 연구 및 분해 시험

##### 1-5-1. 하이드로젤의 팽윤 연구

팽윤 연구를 위해 동결 건조기(ALPHA 2-4 LD plus, Christ)를 사용하여 3D 하이드로젤을 밤새 동결 건조시켰으며, 이후 동결 건조된 샘플의 중량을 측정하였다( $W_d$ , 건조 중량). 이어서, 96웰 플레이트의 각 웰을 200 $\mu$ l의 PBS로 채우고 동결 건조된 샘플을 각 웰로 옮겨 팽윤되도록 하였다. 하이드로젤에 수분이 충분히 흡수된 후, 팽윤된 샘플의 표면을 티슈페이퍼로 가볍게 닦아내고 중량을 측정하였다( $W_s$ , 팽윤된 만큼의 무게). 결과적으로 하이드로젤의 팽윤비(%)는 하기 수학적식에 따라 계산하였다.

[수학적식 1]

$$\text{Swelling Ratio (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

##### 1-5-2. 하이드로젤의 분해 시험

하이드로젤을 제조한 직후에, 하이드로젤의 중량을 측정하고( $W_o$ ), 20 $\mu$ l의 PBS가 채워진 96-웰 플레이트의 각 웰로 옮긴 다음, 세포배양과 동일한 조건인 37 $^{\circ}$ C의 배양기에 두었다. 이후 7일 동안 하이드로젤의 중량을 측정하였으며( $W_t$ ), 매일 새로운 PBS로 교체하였다. 하이드로젤의 중량을 측정할 때에는, 샘플의 표면을 티슈페이퍼로 가볍게 닦아내었으며, 결과적으로 하이드로젤의 분해비(%)는 다음 수학적식에 따라 계산하였다.

[수학적식 2]

$$\text{Degradation (\%)} = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

#### 1-6. *In vitro* 세포 생존능 분석

##### 1-6-1. MTT 세포 증식 분석

하이드로젤에서 SKOV3 난소암 세포의 생존율을 조사하기 위해 MTT 분석(Roche Diagnostics, Mannheim, Baden-Wurttemberg, Germany)을 실시하였다. 보다 구체적으로, 테트라졸리움 화합물 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)의 포르마잔 생성물로의 환원을 정량함으로써 생존율을 분석하였다. 구체적으로, MTT 시약을 성장 배지와 1 : 9의 비율로 혼합하고, 하이드로젤이 포함된 96웰 플레이트에 첨가한 후, 5% CO<sub>2</sub> 및 37 $^{\circ}$ C 조건에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 남은 용액은 제거하고 각 웰에 DMSO를 처리하였다. 샘플의 흡광도는 마이크로플레이트 리더(Victor X5, Perkin Elmer, MA, USA)로 측정하였다.

##### 1-6-2. 생존 및 사멸 분석(Live and dead assay)

[0100] SKOV3 세포의 생존율 및 분포도는 생존 및 사멸 분석(ThermoFisher Scientific, MA, USA)을 통해 확인하였다. 상기 분석에서 살아있는 세포는 녹색 형광의 칼세인(calcein) AM으로 염색되고, 죽은 세포는 적색 형광의 에티디움 동종이량체-1(ethidium homodimer-1)로 염색된다. 구체적으로, 하이드로젤이 포함되어 있는 웰에 PBS와 형광 혼합물을 첨가하고 40분 동안 배양한 다음, 염색된 하이드로젤을 헬륨/네온-레이저(Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany)가 장착된 CLSM 700 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 관찰하였다.

## [0102] 실시예 2. 압타머-X-DNA 서열 디자인

[0103] 본 발명자들은 X-DNA와 세포 간의 접착을 위해 DNA 압타머 AS1411을 DNA 나노구조체(X-DNA)에 도입하였다. 상기 압타머 AS1411은 다양한 암세포의 세포막에서 일반적으로 발현되는 뉴클레옴린(nucleolin)을 표적으로 한다. 이에 더하여, 하나의 X-DNA에 도입되는 압타머의 수를 다양하게 조절하였는데, 구체적으로 압타머의 개수에 따라 압타머-X-DNA를 Apt-X (0), Apt-X (1), Apt-X (2) 및 Apt-X (3)로 명명하였다. 한편, X-DNA의 서열은 공지된 문헌을 기반으로 설계하였다. X-DNA의 ssDNA는 X1, X2, X3 및 X4로 명명하였으며, Apt-X-DNA의 합성에 사용된 ssDNA 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

DNA	서열 (5' -3' )	서열번호
X1	CGA CCG ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG	1
X2	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC GAC TCG	2
X3	CGA GTC GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG GTC TCG	3
X4	CGA GAC CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT CGG TCG	4
압타머 AS1411	GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG	5

[0106] DNA 서열에 의존적인 동적 구조의 특성을 이해하기 위해 각 서열에 압타머를 도입할 때 세포 표적화 능력 외에도 고려해야 할 다른 중요한 요소들이 있다. 구체적으로, DNA 서열의 용융 온도( $T_m$ )는 각 구조의 압타머가 표적에 결합할 수 있는 조건을 결정한다. IDT-DNA 계산 툴(© Integrated DNA Technologies, Inc)을 이용해 각 DNA 서열에 대한  $T_m$  값을 도출한 결과, 각 가닥의  $T_m$  값은 47.5℃ 내지 54.7℃ 범위로 나타났다. 따라서 압타머가 표적 분자에 결합하는 조건은 45℃ 이하의 온도로 설정하였다. 또한, 가장 높은  $T_m$  값은 54.7℃이므로 압타머-X-DNA의 합성 전에 각 서열의 2차 구조를 선형 구조로 용융시키기 위한 온도는 60℃ 이상으로 설정하였다.

[0107] 나아가 안정한 Apt-X-DNA가 합성되었는지 여부를 알아보기 위해, IDT-DNA 계산 툴을 이용하여 각 서열의 깃스 자유 에너지( $\Delta G$ ) 값을 확인하였다. 이때 합성을 위한 적절한 염 농도 및 온도 조건을 입력하여  $\Delta G$  값을 확인하였다. 결과적으로, 각 서열은 양의  $\Delta G$  값을 나타냈으며, 이는 각각의 서열이 상기 조건에서 스스로 이량체를 형성하거나 강한 2차 구조를 형성하지 않음을 의미하는 것이다. 한편, 각각의 서열이 Apt-X-DNA로 조립될 때의  $\Delta G$  값은 음의 값을 나타냈으며, 이는 고안된 구조에 따라 Apt-X-DNA가 자발적으로 조립될 것임을 의미한다. 따라서 상기 결과에 근거하여 Apt-X-DNA를 설계하였으며, 후속 실험을 진행하였다.

## [0109] 실시예 3. 광교결합기를 갖는 ssDNA의 제작

[0110] Apt-X-DNA의 4개 DNA 가닥 중, 압타머 서열이 없는 가닥은 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트(polyethylene glycol diacrylate; PEGDA)와의 광교결합을 위해 5' 말단에 아크릴레이트-기능화된 폴리에틸렌글리콜(acrylate-functionalized polyethylene glycol; PEGA)을 접합시키고자 하였다. 이를 위해, ssDNA의 5' 말단을 아민기( $NH_2$ )로 개질시키고 PEGA의 NHS(NHS 기능화된 PEGA; PEGA-NHS)와 결합하여 아마이드 결합이 형성되도록 하였다. 구체적으로, 3.5 kDa 분자량의 PEGA-NHS를 ssDNA가 포함된 용액에 첨가하고 pH 9 인산완충액과 함께 50℃에서 밤새 배양하였다. 합성 방법 및 조건은 종래 공지된 방법을 참고하였으나, 75,000 ng의 ssDNA를 합성하는 동안 합성물의 총 부피는 20 $\mu$ l로 조정하여 합성 수율을 증가시켰다.

[0111] ssDNA와 PEGA 사이의 반응 후, 반응하지 않은 ssDNA와 PEGA는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 통해 합성된 ssDNA-PEGA로부터 분리하였다. HPLC 수행 결과, 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 크로마토그램 그래프는 DNA의



흡광 파장인 260nm에서 3가지 주요 피크를 나타내었다. 구체적으로, 2.5-4.0분에서의 첫 번째 피크는 반응하지 않은 PEGA를 나타내고, 6.0-7.5분에서의 두 번째 피크는 반응하지 않은 ssDNA-NH<sub>2</sub> 피크를 나타내며 11.0-12.5분의 마지막 피크는 ssDNA-PEGA를 나타내었다. 따라서 HPLC 시스템에 장착된 자동 분획 수집기로 앞의 두 피크를 제외하고 마지막 피크만을 수집하였으며, 수집된 용액을 10 kDa 원심분리 필터(Microcon®; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 nuclease-free water로 완충액-교체하였다.

[0112] 다음으로, 겔 전기영동을 통해 ssDNA-PEGA 및 ssDNA-NH<sub>2</sub>를 비교하였다. 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이 PEGA와의 결합으로 인해 ssDNA-PEGA의 이동이 ssDNA-NH<sub>2</sub> 보다 느려 1번 레인의 밴드가 2번 레인보다 훨씬 더 높은 위치에서 확인되었다. 상기 결과를 통해 ssDNA-PEGA가 성공적으로 분리 및 정제된 것을 알 수 있었다.

#### [0114] 실시예 4. 광가교결합이 가능한 압타머-X-DNA의 조립

[0115] 광가교결합기를 갖는 ssDNA와 압타머-ssDNA를 하기 비율에 따라 혼합함으로써 다양한 수의 압타머를 갖는 X-DNA를 합성하였다. 구체적으로, Apt-X (0)은 X1, X2, X3 및 X4 가닥 모두 광가교결합기를 갖는 ssDNA로 조립하였으며, Apt-X (1)은 X1, Apt-X (2)는 X1, X2 및 Apt-X (3)은 X1, X2 및 X3을 압타머가 결합된 ssDNA로 대체하여 조립하였다. Apt-X-DNA는 총 부피 100μl의 nuclease-free water에서 각 가닥의 등 물량을 혼합하여 자가 조립되도록 하였다. Apt-X-DNA의 합성을 위한 열 순환 프로그램은 공지된 방법을 이용하였으나, 압타머 2차 구조의 충분한 용융을 위해 95°C에서의 가열 시간을 5분으로 조정하였다.

[0116] 이후 Apt-X (0, 1, 2 및 3)를 순차적으로 합성하고 겔 전기영동으로 결과를 확인하였다. 관찰 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 Apt-X-DNA의 대부분은 주 밴드를 제외하고는 기타 밴드가 관찰되지 않았으며, Apt (0)에서만 약간의 기타 밴드가 관찰되었다. 단계별로 하나의 가닥이 추가로 합성됨에 따라 이동이 감소하였으며, 마지막으로 4개의 가닥이 모두 조립된 경우의 밴드가 가장 상단에서 관찰되었다. 또한, 압타머의 수가 0에서 3으로 증가함에 따라 접합된 PEGA의 수가 감소하여 결과적으로 Apt-X (0)에서 Apt-X (3)으로 갈수록 전체 밴드가 더욱 아래쪽에서 나타난 것을 확인하였고, 이러한 결과를 통해 Apt-X (0, 1, 2 및 3)가 성공적으로 합성된 것을 알 수 있었다.

#### [0118] 실시예 5. 광가교결합을 통한 하이드로젤 지지체로의 압타머-X-DNA 도입

[0119] 상기 실시예를 통해 제조된 DNA 나노구조체 각각을 3D 하이드로젤 지지체에 도입하여 어떠한 Apt-X-DNA가 3D 세포배양 모델로서 적합한지를 비교하고자 하였다. 대조군으로는 DNA 나노구조체가 도입되지 않은 PEG로 구성된 것을 이용하였고, Apt-X (0) 하이드로젤은 압타머가 없는 X-DNA(Apt-X (0))를 도입하였으며, 각각의 하이드로젤은 10 μM 농도의 DNA 나노구조체를 도입해 제조하였다. 광가교결합을 위해, PEGDA, 광개시제(photoinitiator; PI) 및 세포를 용액에 첨가하고 PBS로 나머지 부피를 채운 다음, 용액을 충분히 혼합하여 광가교결합 전에 세포가 균일하게 분포될 수 있도록 하였다.

[0120] 이후 상기 혼합된 하이드로젤 용액 10μl을 슬라이드 글라스 및 석영 슬라이드 사이에 주입하였다. 2개의 슬라이드는 입체적 하이드로젤이 형성될 수 있도록 적절한 간격을 두었다. 이어서 용액이 주입된 슬라이드에 254nm 파장의 자외선을 5~7분 동안 조사하였다. 이를 통해 DNA 구조의 PEGDA 및 PEGDA, PEGDA 및 PEGA는 UV 조사에 의해 광가교결합을 형성하였으며, 이를 도 1의 하단 그림에서 확인할 수 있다. 이후 하이드로젤을 슬라이드로부터 조심스럽게 꺼내어 실험에 사용하였다.

[0121] 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 하나의 X-DNA에 접합된 압타머의 수가 증가함에 따라, PEGDA와의 연결 부위가 감소되어 구조 사이의 결합력이 약해진다. 따라서, 각 하이드로 젤이 세포의 물리적 특성과 같은 상이한 환경을 제공할 것이기 때문에, 각각의 하이드로 젤에서 세포 생존률은 다르게 나타날 수 있다. 이러한 세포의 생존율 차이는 하기 분석을 통해 확인하였다.

#### [0123] 실시예 6. 하이드로젤의 팽윤비 및 분해비 비교분석

[0124] 하이드로젤의 가교 밀도가 증가함에 따라 수분 함량이 감소하는데, 이는 가교 밀도가 높을수록 하이드로젤의 기공 크기가 작아지기 때문이다. 따라서, 하이드로 젤의 팽윤비는 가교 밀도에 반비례한다. 비교적 큰 기공 크기를 갖는 PEG 하이드로젤과 비교하여 X-DNA를 함유하는 Apt-X (0) 하이드로젤은 X-DNA와 PEGDA 사이의 광가교결

합 부위의 증가로 인해 기공 크기 및 팽윤 비율이 감소된다. 이에, 본 발명자들은 하이드로젤의 팽윤 연구를 위해 실시예 1-5-1의 방법에 따라 PEG, Apt-X (0, 1, 2 및 3) 하이드로젤을 동결 건조시켰다. 구체적으로 4mm x 4mm 크기의 3D 하이드로젤을 동결 건조기를 사용하여 밤새 동결 건조시킨 후 관찰하였다. 동결 전(Swollen hydrogel)과 후(Lyophilized hydrogel)의 하이드로젤을 관찰한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 동결 건조된 하이드로젤의 크기는 2 mm x 2 mm로 감소되었다. 그러나 동결 건조 전후의 모든 하이드로젤은 일반적으로 둥근 모양의 3차원 형태를 보여주었다.

[0125] 이어서, 상기 수학적 식 1을 이용해 팽윤비(%)를 계산한 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이 Apt-X (0)의 팽윤비(%) 값은 상기와 같은 이유 때문에 PEG 하이드로젤과 비교해 653.47%에서 494.07%로 감소한 것을 확인하였다. 그러나 Apt-X (0)에서 Apt-X (2)로 증가함에 따라, X-DNA의 가교점은 감소하고 팽윤비는 각각 494.07%에서 558.06% 및 661.90%로 증가한 것으로 나타났으며, 모든 샘플 중에서 Apt-X (2)가 가장 높은 값을 보였다. 한편, Apt-X (3)의 값은 581.48%로 Apt-X (1)과 유사한 값을 보였다. 이는 Apt-X (3)의 가교점이 PEGDA와 결합하기에 불충분하여 Apt-X-DNA 자체가 누락되고 하이드로젤이 완전히 형성되지 않았기 때문이다.

[0126] 다음으로, 본 발명자들은 Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤이 PBS 완충액에서 어느 정도의 분해성을 가지는지 여부를 알아보고자 하였다. 이를 위해, 각각의 하이드로젤을 PBS 완충액과 함께 96-웰 플레이트에서 37℃ 조건으로 배양하고 매일 특정 시간에 중량을 측정하였으며, 상기 실시예 1-5-2의 수학적 식 2에 따라 계산하였다. 하이드로젤의 표면을 티슈페이퍼로 닦아내고 7일까지 중량을 측정한 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이 2일째에 PEG 하이드로젤의 중량 퍼센트는 4.72%가 급격히 감소하였고, Apt-X (0) 및 Apt-X (2)는 유사한 패턴을 보이다가 Apt-X (0)는 7일째(D7)에 4.86%가 급격히 감소하였다. 1일(D1)을 기준으로, PEG 하이드로젤은 6.75% 감소하였고, Apt-X (0) 하이드로젤은 9.33% 감소하였으며, Apt-X (2) 하이드로젤은 7일째 2.56% 감소하였다. Apt-X (2)는 생리학적 조건 하에서 7일 동안 유의한 수준으로 분해가 일어나지 않은 것을 확인하였다.

#### [0128] 실시예 7. 세포 부착용 압타머의 연결 DNA 길이에 따른 세포 특이성 및 효과 평가

[0129] 본 발명자들은 본 실험에서 이용한 3개 세포주에 대하여 flow cytometry를 실시하여 각 세포의 세포막에서 발현되는 nucleolin의 발현수준을 확인한 다음, 각 세포에 형광 압타머(Apt-FAM)를 처리하였다. GeneCards® 웹 사이트를 통해 예상되는 단백질 발현 값에 따르면 nucleolin의 발현수준은 MCF-7가 SKOV-3보다 약 2배 높다. 실험 결과, MCF-7의 보정된 형광 값이 SKOV-3 보다 약 3.9배 높게 나타났다. 즉, SKOV-3보다 MCF-7 세포막에 더 많은 nucleolin이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

[0130] 나아가 세포 부착을 위한 Apt-X-DNA의 특이성 및 기능성을 확인하기 위해 하기 두 가지 변수, 즉 세포 유형 및 압타머와 X-DNA 사이의 연결 DNA 길이를 확인하고자 하였다. 먼저, 압타머-X-DNA의 특이성을 확인하기 위해 3가지 세포주를 사용하였다. 세포막에서 nucleolin을 과발현하는 SKOV-3 및 MCF-7을 선택하고 세포막에서 nucleolin을 발현하지 않는 NIH/3T3 세포를 음성대조군으로 선택하였다. 동시에, X-DNA와 압타머 구조체 간의 입체 장애로 인한 압타머의 기능 상실이 유발될 수 있으므로 압타머와 X-DNA 사이에 5T 및 10T(티민(thymin) 테일)로 구성된 연결 DNA 서열을 각각 삽입하고, 유세포 분석을 통해 연결 DNA가 없는 압타머-X-DNA (0T)와 세포 부착능을 비교하였다.

[0131] 실험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 NIH/3T3 세포의 경우 Apt-X-DNA를 처리하지 않은 경우(Non treat)에 비해 Apt-X-DNA가 처리되었을 때 형광 강도가 증가한 것으로 나타났으며, SKOV-3 및 MCF-7 세포의 경우에는 NIH/3T3 세포보다 형광 강도가 더욱 증가하여 강하게 나타난 것을 확인하였다. 또한, NIH/3T3의 경우에는 0T 및 5T에서 형광 강도가 유사하게 나타났으나, SKOV-3 및 MCF-7 세포의 형광 강도는 각각 0T 및 10T보다 5T에서 가장 높게 나타났다. 상기 2개 세포주에서 연결 DNA의 길이가 5T인 경우에 형광 강도가 가장 높게 나타난 것을 기준으로 할 때, SKOV-3 및 MCF-7 세포의 표준화된 형광 강도 값은 각각 NIH/3T3 세포의 경우 보다 약 2.1 배 및 3.0 배 더 높게 나타난 것을 확인하였다.

[0132] 즉, 상기 결과는 AS1411 압타머가 세포 표면에 nucleolin을 과발현하는 세포에 보다 특이적으로 결합할 수 있음을 의미하는 것이며, 이는 합성된 Apt-X-DNA가 세포 특이적 부착능을 가짐을 시사한다. 또한, 5개의 티민으로 구성된 연결 DNA가 압타머와 X-DNA 사이에 삽입 될 때, 두 구조 사이의 입체적 장애가 감소되고 압타머의 세포 부착 기능이 방해받지 않는 것을 알 수 있었다.

[0134] **실시예 8. Apt-X-DNA의 농도에 따른 하이드로젤의 형태 관찰 및 세포 생존율 분석**

[0135] 본 발명자들은 압타머-X-DNA 핵산나노구조체가 하이드로젤에 미치는 영향을 알아보기 위해, 다양한 농도의 Apt-X-DNA를 도입한 하이드로젤을 제조한 후 이의 물성 및 세포 배양능 평가를 진행하였다.

[0136] 이를 위해, 먼저 대조군인 PEG 하이드로젤 또는 Apt-X-DNA가 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 농도로 도입된 하이드로젤 (Apt-X-DNA 1, Apt-X-DNA 2, Apt-X-DNA 4)을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이 Apt-X-DNA의 농도가 높아질수록 하이드로젤의 기공 크기가 작아지는 것을 관찰하였다. 나아가 합성된 각 하이드로젤에서의 세포 배양능 차이를 비교하기 위해 세포를 로딩하고 37°C에서 7일 동안 세포를 배양한 후 세포 배양능을 비교분석하였다. 그 결과, 도 7b 및 도 7c에 나타난 바와 같이 하이드로젤 내에 Apt-X-DNA의 함량이 높아질수록 세포 배양능이 개선되는 것을 확인하였다. 이에 더하여, Apt-X-DNA가 도입된 하이드로젤의 특성 변화를 확인하기 위한 점탄성 분석을 실시하여 탄성 모듈러스(elastic modulus;  $G'$ )와 점성 모듈러스(viscous modulus;  $G''$ )를 확인한 결과, 도 7d에서 볼 수 있는 바와 같이 Apt-X-DNA의 농도가 높아질수록 저장 탄성 계수가 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0138] **실시예 9. X-DNA에 결합된 압타머 수가 세포 배양능에 미치는 영향 분석**

[0139] 상기 실시예 결과들을 반영하여, X-DNA에 결합된 압타머 수가 세포 배양능에 미치는 영향을 분석하기 위해 세포 생존 및 사멸 분석과 MTT 분석을 실시하였다. 보다 구체적으로, 먼저 다양한 개수의 압타머를 갖는 Apt-X (0, 1, 2 및 3) 하이드로젤 및 대조군 PEG 하이드로젤을 제조하고 37°C 배양기에서 4일 동안 세포를 배양하였다. 4 일째에 생존 및 사멸 분석을 실시한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 Apt-X (2) 하이드로젤에 현저히 많은 수의 세포가 존재하였고 Apt-X (3)의 경우 세포 수가 가장 적은 것을 확인하였다. 또한, Apt-X (1)의 경우에도 Apt-X (2)보다 세포 분포가 적게 나타났다. 따라서 X-DNA 구조체에 압타머가 2개 결합된 Apt-X (2) 조건이 최적의 세포 배양능을 달성할 수 있음을 알 수 있었다.

[0141] **실시예 10. X-DNA에 결합된 압타머 위치가 세포 생존에 미치는 영향 분석**

[0142] 이전 연구에서, 분지형태의 DNA(branched-DNA)는 평면이 아닌 3차원 구조를 가짐이 밝혀졌다. 따라서 3차원의 X-DNA와 압타머가 결합될 때, 두 구조 사이의 충돌로 인해 입체적 장애가 발생할 수 있으며, 이는 X-DNA에 결합된 압타머의 수에 따라 다르게 발생할 수 있다. 이에, 본 발명자들은 X-DNA에 결합된 압타머의 영향을 알아보기 위해 생존 및 사멸 분석과 MTT 분석을 통해 세포 배양능 차이를 비교분석하였다.

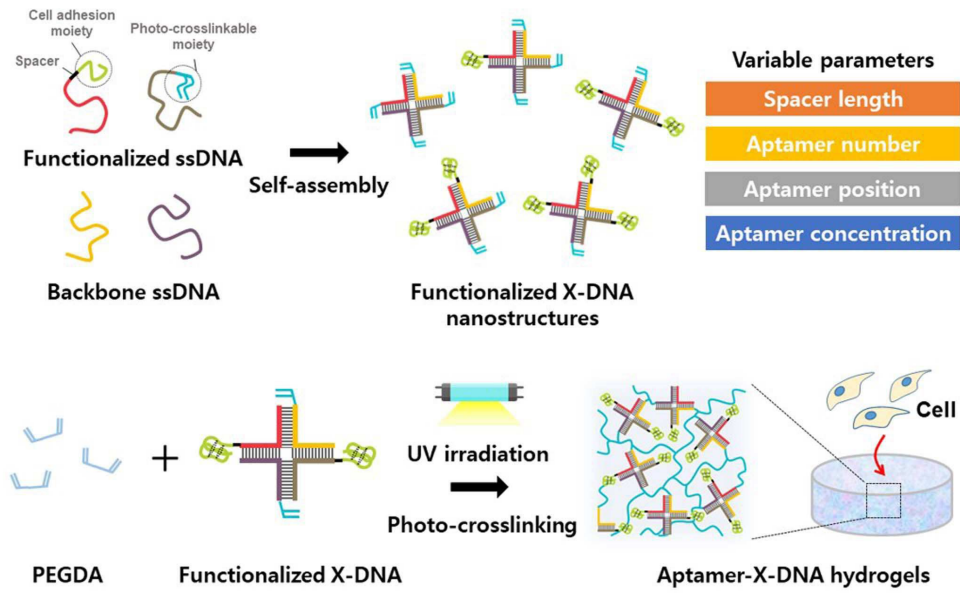
[0143] 먼저, 대조군 PEG 하이드로젤(PEGDA), 압타머가 결합되지 않은 X-DNA 나노구조체(Apt-X (0)) 및 압타머 2개가 X1X2에 위치한 X-DNA(Apt-X (2)) 하이드로젤에 세포를 로딩하고 7일 동안 배양한 후 세포 배양능 차이를 분석하였다. 생존 및 사멸분석과 MTT 분석을 실시한 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이 대조군 PEG 하이드로젤 경우에 비하여 Apt-X (0)의 경우 세포생존율이 증가하였으며, Apt-X (2)의 경우에는 세포 생존율이 더욱 증가한 것으로 나타났다.

[0144] 상기 결과에 근거하여, 압타머 포지셔닝에 적합한 Apt-X (2)를 이용해 압타머의 위치에 따른 세포 배양능 차이를 비교분석하였다. 압타머가 X1X2에 위치한 경우에는 Apt (2)-1,2로, X1X3에 위치한 경우는 Apt (2)-1,3으로 명명하였으며, 실험을 위해 각 세포가 로딩된 하이드로젤을 7일 동안 배양하였다. 그 결과, 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이 Apt (2)-1,3의 세포 생존율은 Apt (2)-1,2의 경우 보다 약 14% 더 높게 나타났다. Apt (2)-1,3은 Apt (2)-1,2보다 세포가 균등하게 분포되는데, 이는 압타머가 X-DNA의 양쪽에서 나란히 결합될 때, X-DNA 및 PEGDA와 구조적 충돌을 일으키지 않고 세포에 잘 결합하거나, 또는 세포가 Apt (2)-1,3에서 압타머를 만날 수 있는 기회를 더 많이 가지기 때문인 것으로 판단되었다. 또한, 가교점이 측면에 근접하지 않고 X2 및 X4와 함께 존재할 때 하이드로젤이 세포 배양에 더 적합하다고 추론될 수 있다.

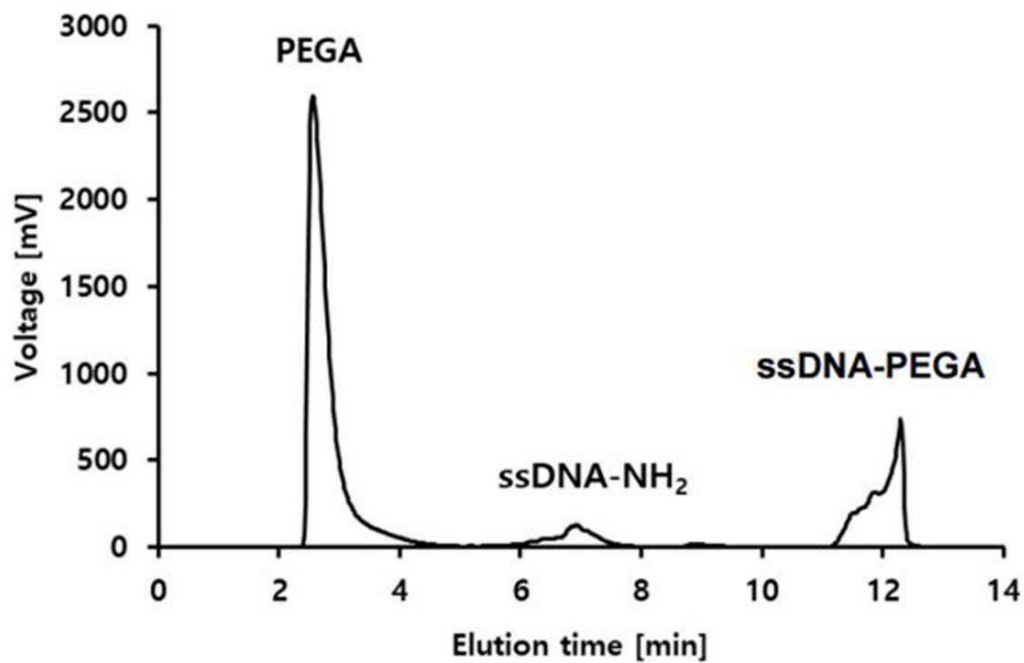
[0146] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

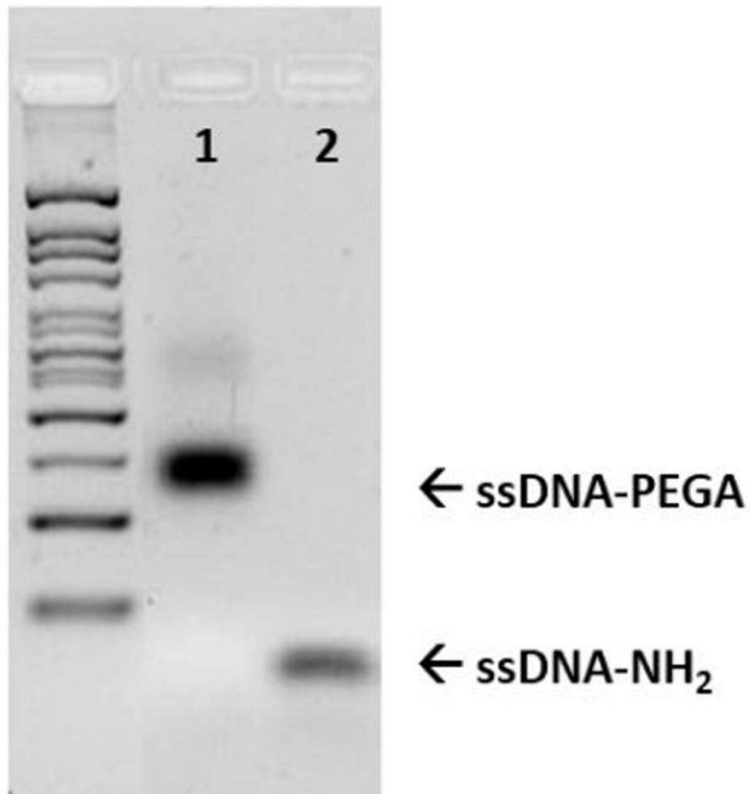
도면1



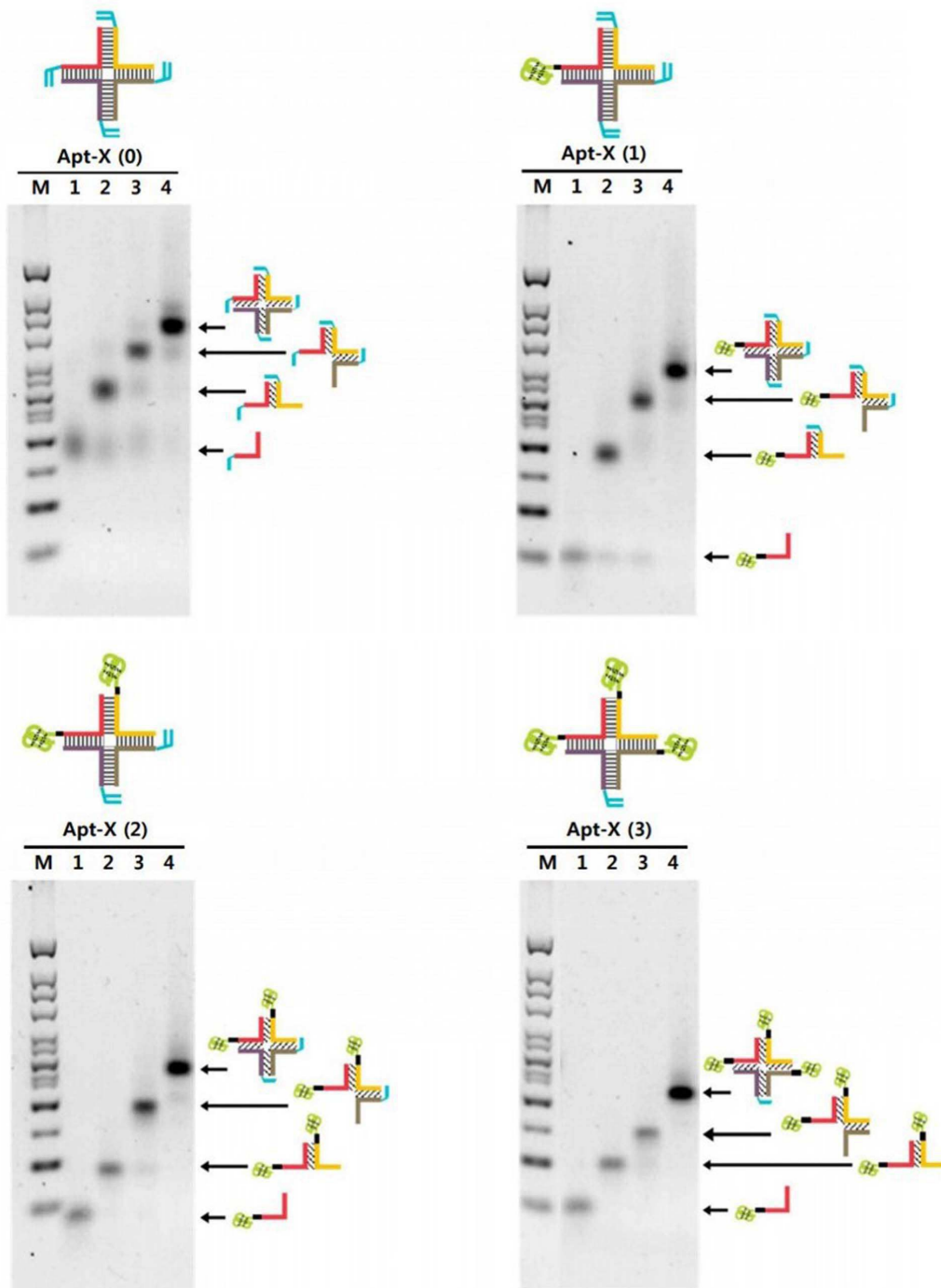
도면2a



도면2b

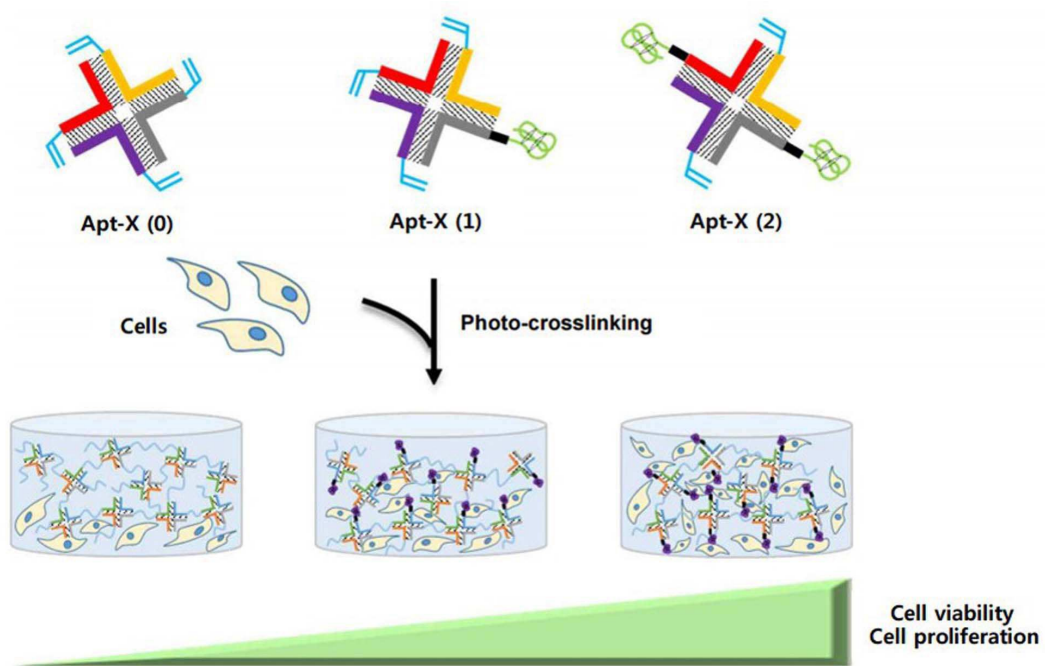


도면3

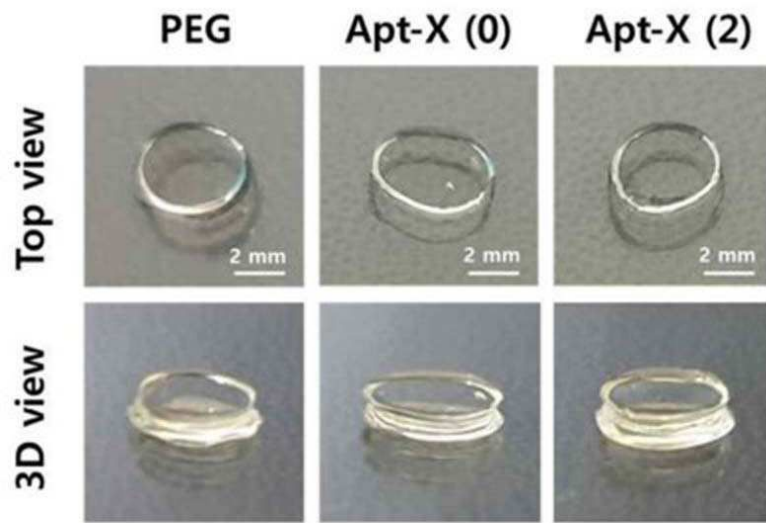




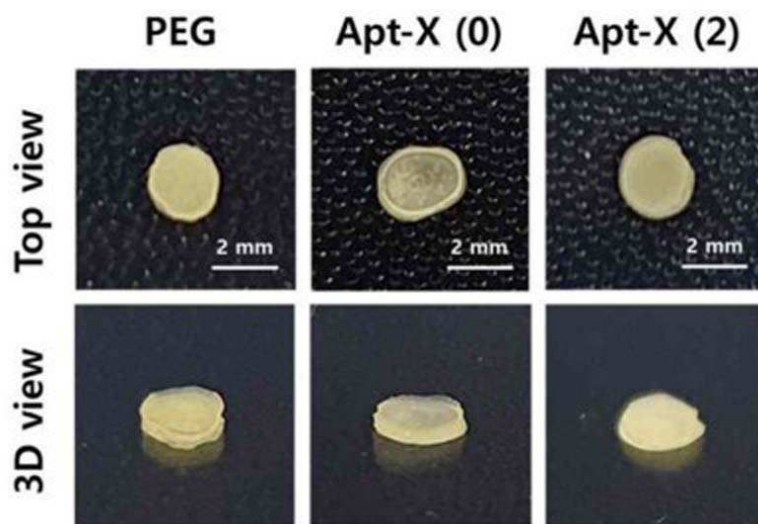
도면4



도면5a

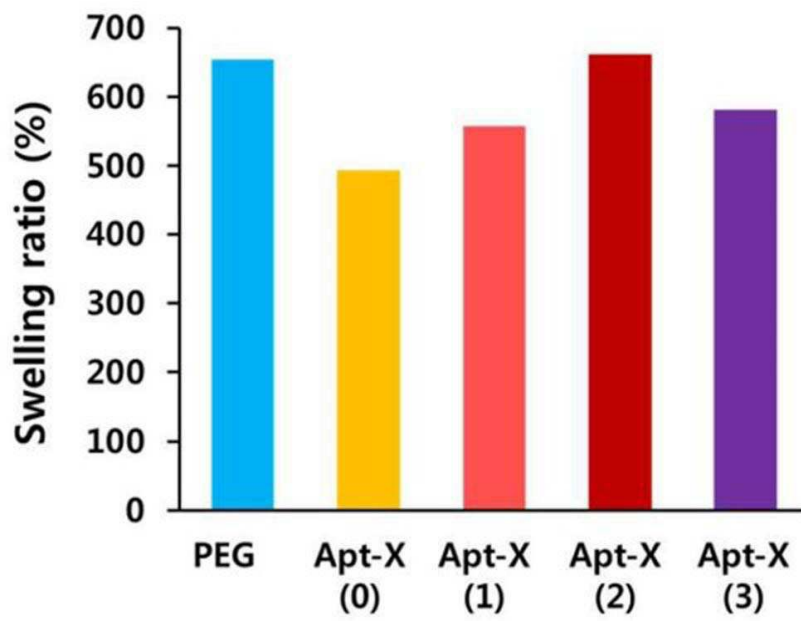


Swollen hydrogel

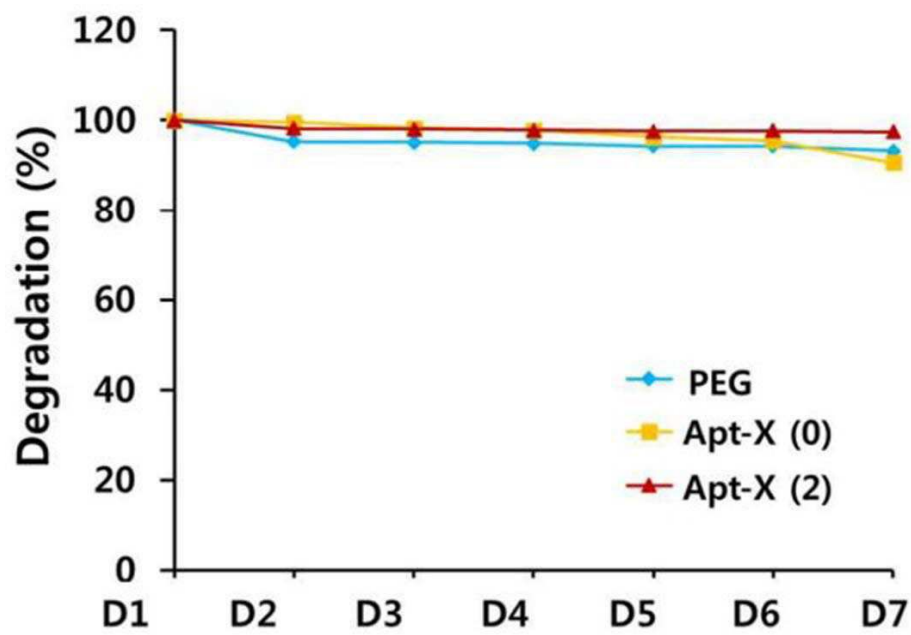


Lyophilized hydrogel

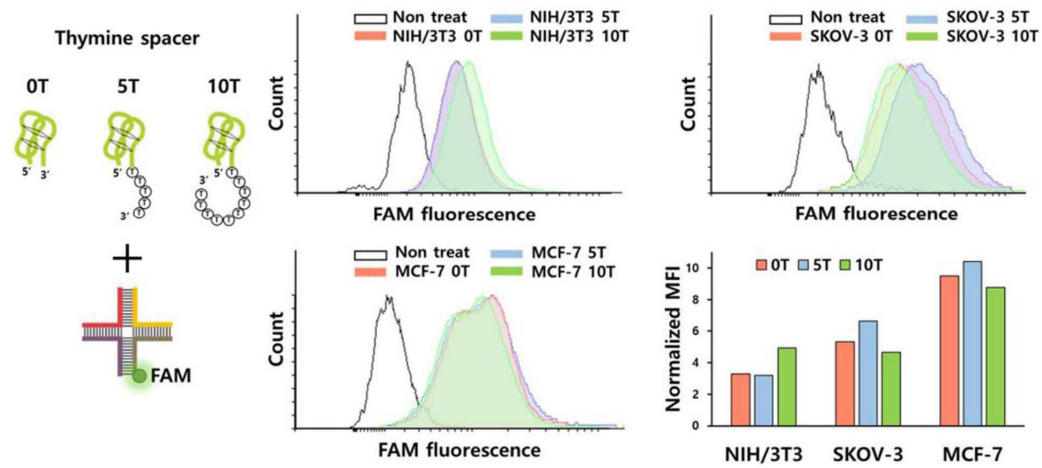
도면5b



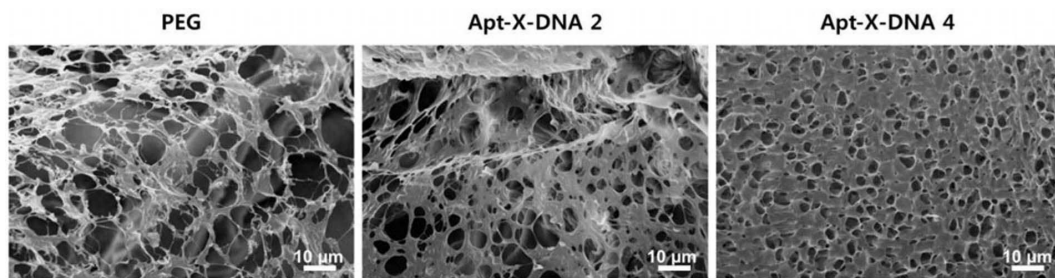
도면5c



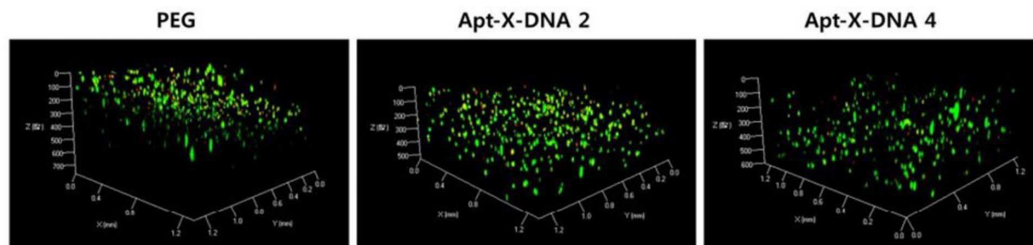
도면6



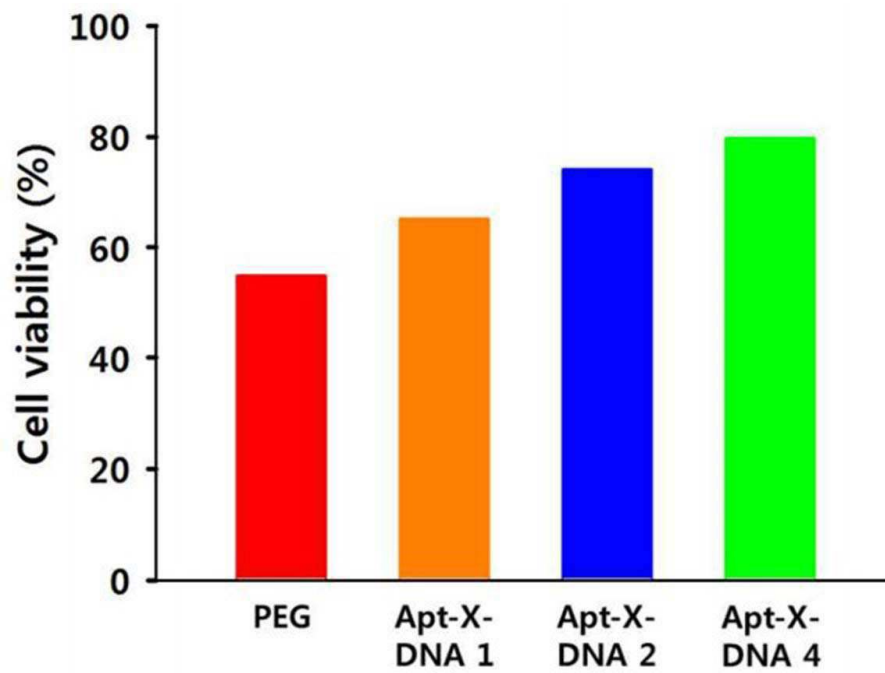
도면7a



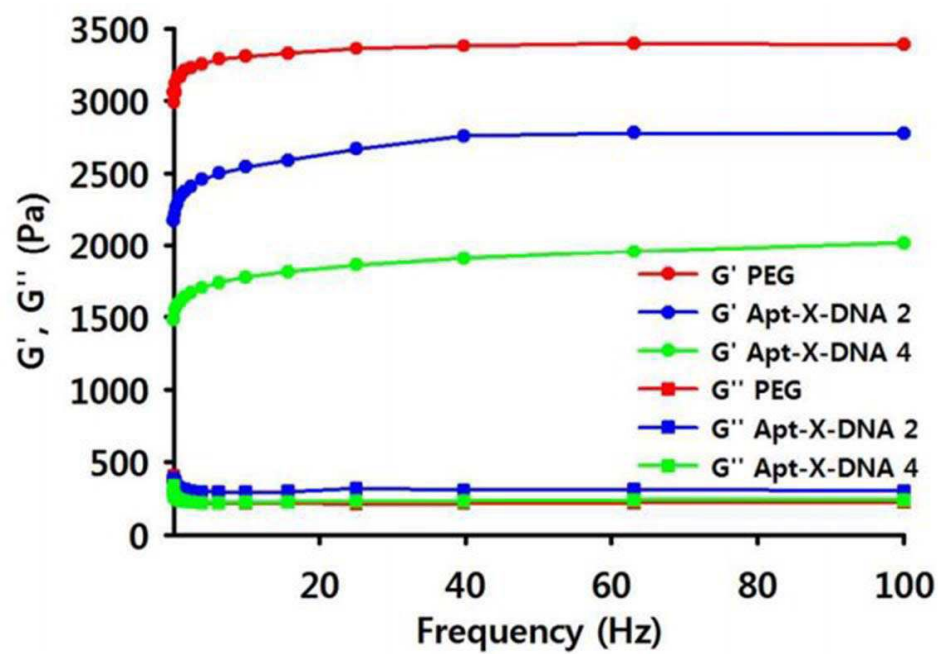
도면7b



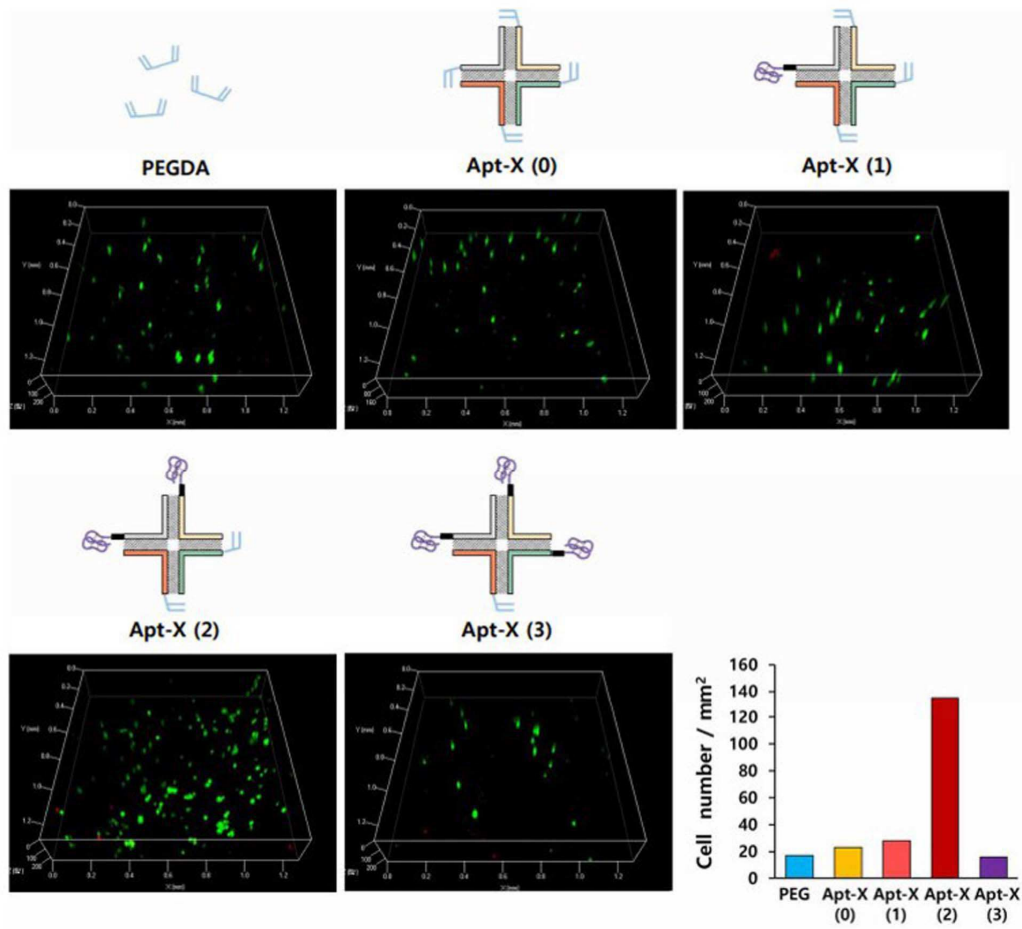
도면7c



도면7d

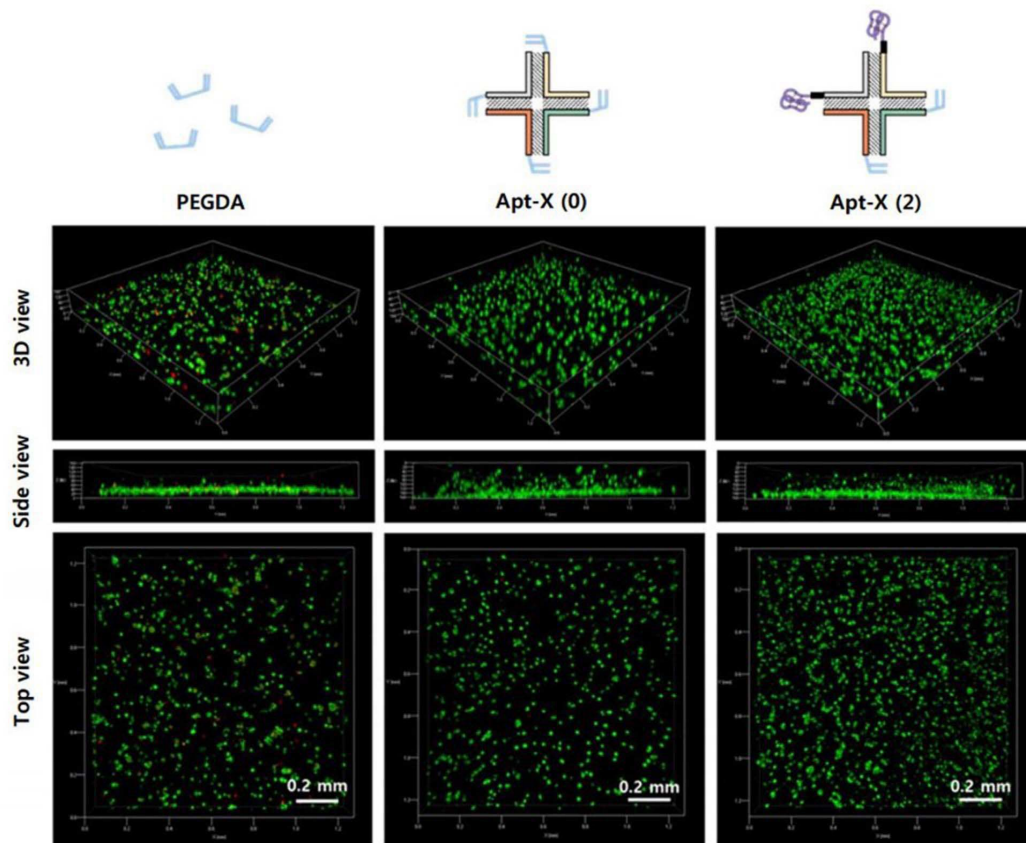


도면8

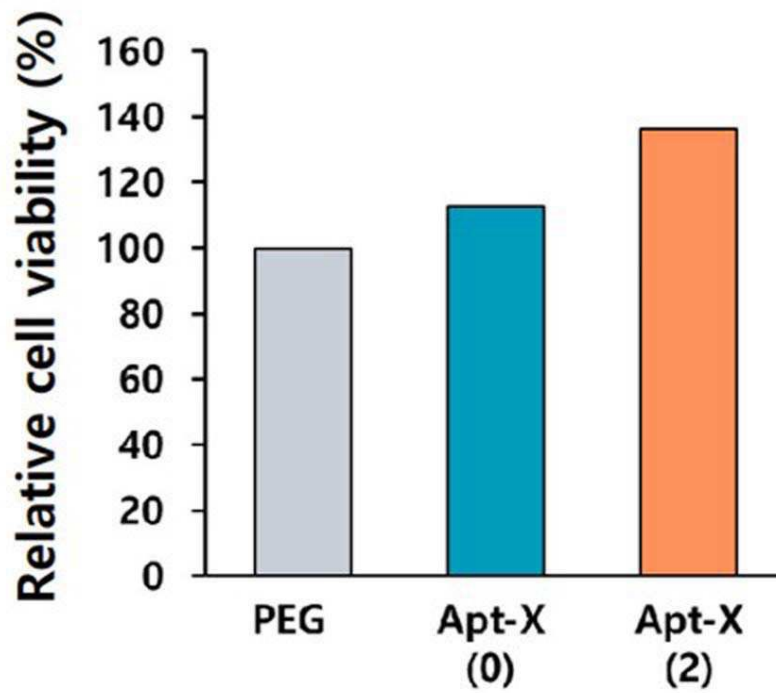




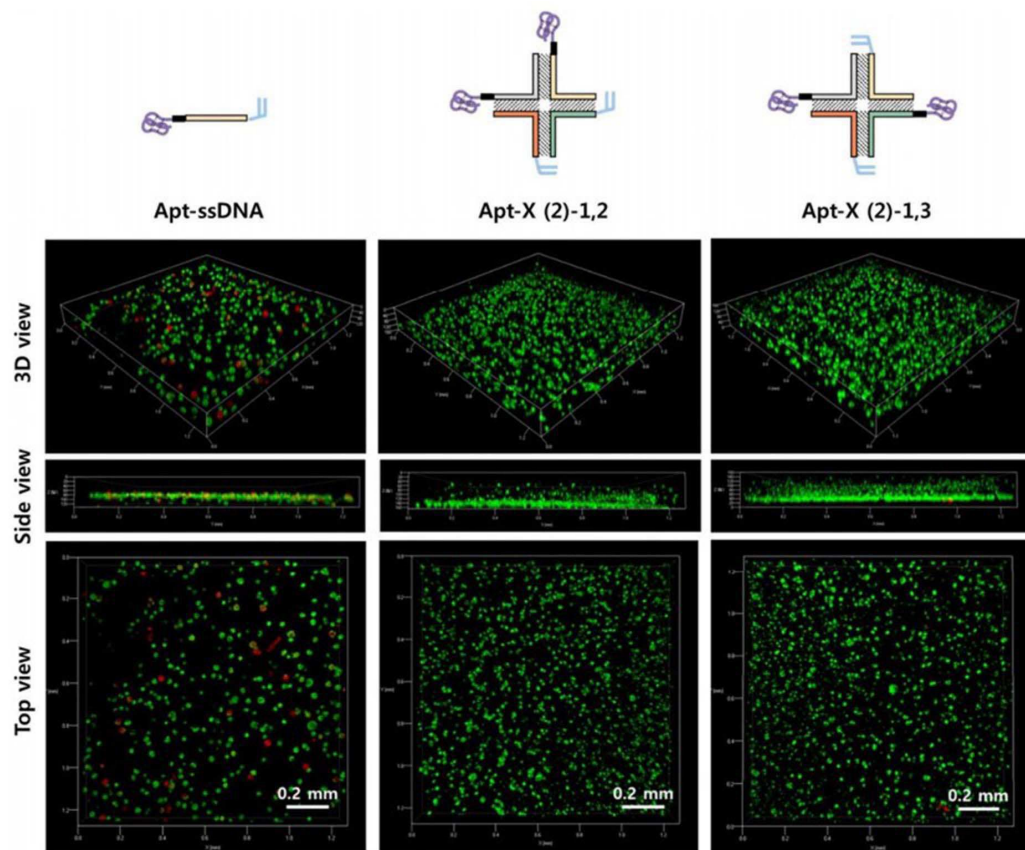
도면9a



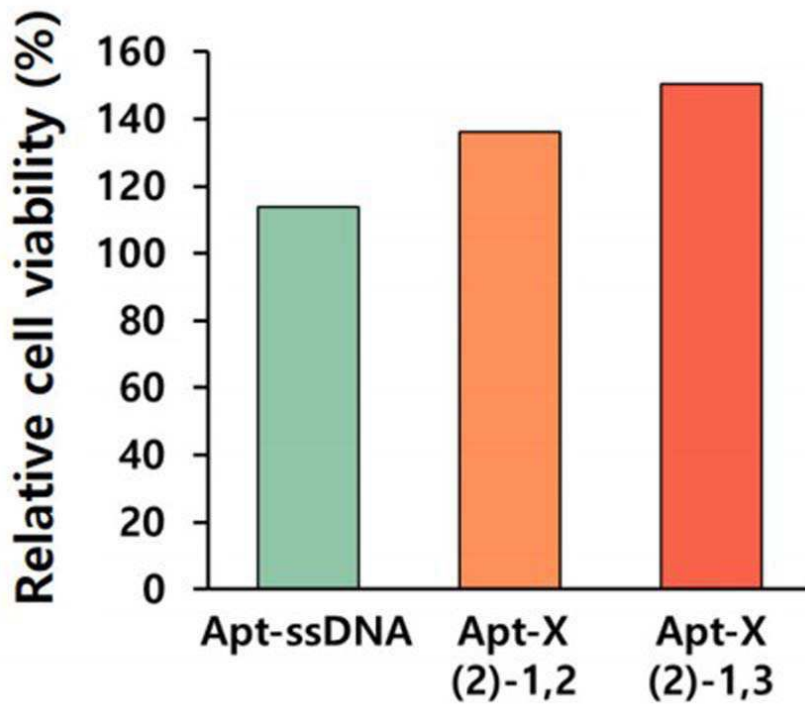
도면9b



도면10a



도면10b



# 서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Nucleic acid nanostructures with aptamers, and 3D cell culture  
use thereof

<130> PD20-014

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apt-X-DNA\_X1

<400> 1

cgaccgatga atagcgggtca gatccgtacc tactcg 36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apt-X-DNA\_X2

<400> 2

cgagtaggta cggatctgcg tattgcgaac gactcg 36

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apt-X-DNA\_X3

<400> 3

cgagtcgttc gcaatacggc tgtacgtatg gtctcg 36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apt-X-DNA\_X4

<400> 4

cgagaccata cgtacagcac cgctattcat cggtcg 36

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apt-X-DNA\_aptamer AS1411

<400> 5

ggtggtggtg gttgtggtgg tgggtg

26