

명세서

발명의 명칭: 배양육 제조용 세포 지지체 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 배양육 제조용 세포 지지체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 배양육의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 고기는 동물의 종류와 관계없이 수분과 단백질, 지질, 철분, 아연, 비타민 B12와 같은 영양소의 중요한 공급원이다. 대두를 제외한 제한된 식물성 공급원이 존재하는 상황에서 우리의 선조들은 필요한 아미노산을 보충하기 위해 고기를 중요한 식품원으로 활용해왔다. 영양적인 중요성을 넘어서 고기는 문화적으로도 다양한 문화와 요리의 발전에 중요한 역할을 해왔다. 고기는 약 65~80%의 수분과 16~22%의 단백질, 1.5~13%의 지방으로 이루어져 있으며 근육 속에 지방이 분포된 정도(근내지방도, 마블링)는 고기의 육질과 맛을 결정하는 중요한 요소이다.
- [3] 이러한 고기의 영양상의 장점에도 불구하고, 최근 탄소 중립 및 동물 복지와 같은 세계적 트렌드로 인해 온실가스 배출이 높은 가축 사육과정에 대한 문제가 제기되고 있다. 가축 산업은 유엔 식량농업기구(FAO)에 따르면 세계 농지의 상당부분을 사용할 뿐 아니라, 전 세계 온실가스 배출량(GHG)의 약 14.5%를 차지하고 있다. 또한 이 가축 사육과정에서 배출되는 오염수 등은 물과 토양 오염에도 상당한 영향을 미친다.
- [4] 이러한 문제의 해결책으로 최근 동물로부터 추출한 줄기세포를 실험실에서 배양하여 만든 인공 고기에 대한 관심이 높아지고 있다. 양식 고기 또는 '그린 미트'로 불리는 배양육(인공 고기)은 동물 복지 개선에 도움이 될 뿐 아니라, 고기 생산에 따른 온실가스 배출량을 크게 줄일 수 있다. 일부 추정에 따르면 가축 사육을 위한 대규모 산림 파괴 등이 감소하면서 온실가스 배출을 최대 96%까지 줄일 수 있다.
- [5] 실제 고기에 가까운 배양육을 생산하기 위해서는 그와 유사한 조직감을 구현할 수 있어야 하지만, 복잡한 마블링 구조를 모사하고 크기가 큰 고기를 경제적이고 대규모 생산할 수 있는 기술이 아직까진 부족하다. 가장 큰 이유로는 현재 배양육에 사용되고 있는 세포 지지체로 사용되는 물질들의 가격이 비싸고 근육, 지방, 혈관 등 고기의 다양한 부분을 실제와 같이 모사할 수 있는 기술이 없기 때문이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 일 과제는 배양육을 제조하기 위한 세포지지체를 제공하고자 한다. 구체적으로, 자가치유(self-healing) 과정으로 가역적인 물리화학적인 결합을 형성할 수 있는 고분자를 도입하여 지방세포와 근육세포를 각각 배양하고 이들을

자가치유 과정으로 서로 접합하여 실제육과 같이 마블링을 형성할 수 있도록 하는 세포지지체를 제공하고자 한다. 또한, 자가치유 과정으로 접합이 가능함에 따라, 배양육의 지방 부분과 근육 부분의 크기 및 함량을 자유롭게 조절할 수 있으며, 실제 고기에 가까운 마블링이 형성 가능한 배양육 제조용 세포 지지체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 배양육의 제조방법을 제공하고자 한다.

[7] 또한, 본 발명은 세포 배양이 가능하면서도 자가치유 기능을 가능하게 하기 위해 특정한 화학적 또는 물리적 특성을 도입한 자가치유 고분자를 제공하는 것이다. 일 예로, 절단과 재형성이 가능한 화학 결합을 사용하여 물질이 생체 조직에서 치료 과정과 유사하게 자가치유할 수 있다. 이는 생물적인 성질에 가까운 특징을 가지고 있으며 생체 조직의 재생 능력과 상당한 유사점을 보인다. 따라서 이러한 자가치유 고분자를 배양육 구조체 형성을 위한 세포 지지체로 사용하여 실제 고기와 유사한 구조체를 가지는 배양육을 제조하고자 한다.

[8] 또한 본 발명의 일 과제는 생체적합성 자가치유 하이드로겔을 제공하는 것이다. 일 예로, 세포의 부착유도 또는 겔의 분해가 가능한, 조직재생 유도형 지지체로 사용가능한 생체적합성 자가치유 하이드로겔을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 일 실시예는 자가치유 하이드로겔을 포함하는 배양육 제조용 세포 지지체로, 상기 자가치유 하이드로겔은 서로 동일하거나 또는 서로 상이한 적어도 2개 이상의 자가치유 하이드로겔의 단면이 자가치유 과정으로 가역적인 물리 화학적인 결합을 형성하여 서로 접합(assembly)이 가능한 것인 배양육 제조용 세포 지지체에 관한 것이다.

[10] 일 실시예로, 상기 배양육 제조용 세포 지지체는 근육세포가 배양되는 제1 자가치유 하이드로겔과 지방세포가 배양되는 제2 자가치유 하이드로겔을 포함하는 것일 수 있다.

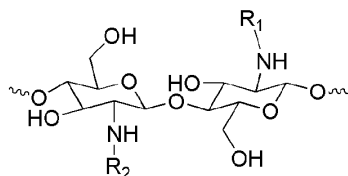
[11] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 세포가 배양 가능한 온도 및 pH 범위에서 선택되는 어느 하나 이상의 분위기에서 자가치유 과정으로 가역적인 물리 화학적 결합을 형성하는 것일 수 있다.

[12] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 것일 수 있다.

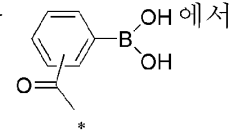
[13] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[14] [화학식 1]

[15]

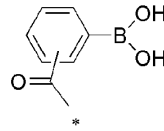


- [16] 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는



선택되고,

- [17] 상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는



- [18] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10 내지 50 %인 것일 수 있다.

- [19] [식 1]

- [20] 치환율 = (보론산 화합물이 치환된 아민몰수/키토산의 전체 아민 몰수) $\times$ 100

- [21] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔의 겔분율(Gel fraction)은 50 내지 90%인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [22] 일 실시예로, 상기 세포지지체는 강도 보강제를 더 포함하는 것일 수 있다.

- [23] 일 실시예로, 상기 세포지지체는 근원세포(Myoblast), 지방세포(Adipocyte), 섬유아세포(fibroblast), 근세포(Myocyte), 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성세포(Satellite cell), 혈관내피세포 (endothelial cells) 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 세포를 배양가능한 것일 수 있다.

- [24] 일 실시예로, 상기 근육세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제1성분은 영률(Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 지방세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제2성분은 영률(Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [25] 본 발명의 다른 양태는 상기 일 실시예에 따른 배양육 제조용 세포 지지체를 이용하여 배양된 배양육을 제공한다.

- [26] 일 실시예로, 상기 배양육은 실제육과 유사한 마블링을 형성한 것일 수 있다.

- [27] 본 발명의 다른 양태는 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체를 혼합한 후, pH를 조절하여 교차결합을 유도하는 단계;를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 이용한 세포 지지체의 제조방법을 제공한다.

- [28] 일 실시예로, 상기 혼합 후, 동결 후 해동하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

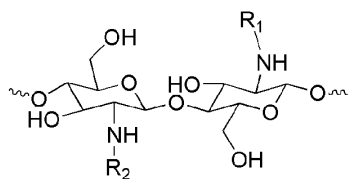
- [29] 일 실시예로, 상기 혼합 시, 강도 보강제를 더 첨가하는 것일 수 있다.

- [30] 본 발명의 다른 양태는 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 혼합비율을 서로 달리한 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 각각 준비하는 단계;

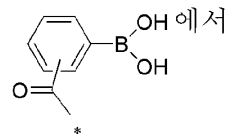
- [31] 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시키는 단계;
- [32] 를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 포함하는 세포 지지체를 이용한 배양육의 제조방법을 제공한다.
- [33] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 준비하는 단계에서, 강도 보강재를 더 추가하는 것일 수 있다.
- [34] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 준비하는 단계에서, 동결 후 해동하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [35] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔은 영률(Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 제2 자가치유 하이드로겔은 영률(Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시킨 후, 이들을 적층 또는 서로 접하도록 배치함에 따라, 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되는 것일 수 있다.
- [37] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔이 적층 또는 서로 접하도록 배치되어 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되도록 한 상태에서, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화하는 것일 수 있다.
- [38] 본 발명의 또 다른 양태는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 보론산 화합물이 결합된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 생체적합성 자가치유 중합체를 제공한다.

[39] [화학식 1]

[40]

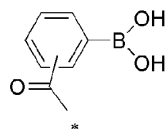


[41] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는



선택되고,

[42] 상기 R₁ 및 R₂ 중 적어도 하나는



- [43] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 pH 6.5 내지 12에서 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있다.
- [44] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10 내지 50 %인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] [식 1]
- [46] 치환율 = (보론산 화합물이 치환된 아민몰수/키토산의 전체 아민 몰수) × 100
- [47] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 강도 보강재를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [48] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 영률(Young's Modulus)이 50 내지 400 kPa 범위인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [49] 본 발명의 일 실시예에 따른 생체적합성 자가치유 하이드로겔은 생체적합성을 가지며, 세포 배양이 가능하며, 세포배양이 가능한 조건에서 자가치유가 가능하다. 이에 따라, 지방과 근육이 각각 선호하는 지지체를 제공할 수 있으며, 또한 세포 배양 가능한 조건에서 지방이 배양된 부분과 근육이 배양된 부분이 서로 자가치유 과정으로 접합되도록 함에 따라, 실제 고기와 같이 마블링이 형성될 수 있는 배양육을 제조할 수 있다. 또한, 지방이 배양된 부분끼리, 또는 근육이 배양된 부분끼리 서로 자가치유 과정으로 접합되도록 함으로써, 크기를 증가시킬 수 있다.
- [50] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 생체적합성 자가치유 하이드로겔 및 이를 이용한 배양육 제조용 세포 지지체는 접착제 등과 같은 별도의 화학적인 방법 또는 추가의 에너지를 가하지 않고도 잘린 단면을 이어 붙일 수 있다. 따라서, 상기 자가치유 하이드로겔은 세포 배양 시 물질의 확산만으로 근육 또는 지방 세포를 생장시킨 후, 원하는 크기나 위치에 이어 붙여서 큰 사이즈의 배양육을 제조하거나, 근육 내 지방의 함량 및 마블링을 자유자재로 조절 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [51] 도 1은 제조예 1에 따른 키토산과 3-카르복시벤젠보론산이 결합된 키토산 ChsB(OH)₂의 적외선 스펙트럼 그래프이다.
- [52] 도 2는 제조예 1에 따른 표준 실험과 비교 실험에서 보론산과 결합된 키토산 ChsB(OH)₂의 자외선-가시 분광도를 나타낸 그래프이다.
- [53] 도 3은 제조예 1에 따른 3-카르복시벤젠보론산의 다른 농도에 대한 285 nm에서의 흡광도의 강도를 표시하여 치환 정도를 검증하는 그래프이다.
- [54] 도 4는 실시예에 따른 N1 하이드로겔의 자가치유 및 다중 모듈 반응성을 나타낸 사진이다. a: 색칠된 조각과 색칠되지 않은 조각 세 개가 하나로 융합되어 떨어지지 않고 들어 올릴 수 있는 큰 조각으로 형성된다. 사용된 염료는 Brilliant Blue FCF와 Amaranth Red 2이다. b: 절단 및 성형만으로 하나의 큰 하이드로겔 조각을 하트, 별, 꽃 모양의 세 개의 작은 조각으로 재형성한다. c: pH 변화에 대한

하이드로젤의 액화 및 젤화. d, e: 다른 농도의 포도당 용액에 대한 하이드로젤의 반응을 나타낸다. DMEM는 Dulbecco's modified Eagle's medium의 약자이다.

- [55] 도 5 내지 7은 실시예에 따른 ChsB(OH)₂/PVA 하이드로젤에서의 세포 생존율과 증식을 나타낸 것이다. 도 5는 세포 계수 키트 8 (CKK-8)를 사용하여 두 세포주에서 하이드로젤 성분의 세포 독성 (생체 적합성) 검사. 저밀도 폴리에틸렌 (0.2 g mL⁻¹)과 아연 다이에틸다이티오카르바메이트를 각각 부정적인 대조군과 양적 대조군으로 사용했다. 도 6은 3T3-L1 세포주의 성장을 다른 하이드로젤 기관에서 1주 동안 CKK-8의 주황색 포마잔 형성으로부터의 흡광을 통해 모니터링한 결과이다. 도 7은 C2C12 세포주의 성장을 다른 하이드로젤 기관에서 1주 동안 CKK-8의 주황색 포마잔 형성으로부터의 흡광을 통해 모니터링한 결과이다.
- [56] 도 8은 실시예에 따른 F0.5에서 배양된 3T3-L1 및 N1 ChsB(OH)₂/PVA 하이드로젤 스캐폴드 상의 C2C12의 생존율을 양적 대조군인 Matrigel과 비교하였으며, 광학현미경을 사용하여 LIVE/DEAD 염색으로 시각화하였다. ①로 표시된 녹색 (calcein AM)은 생존 세포, ②로 표시된 파란색(Hoechst 33342)은 세포핵을 나타낸다.
- [57] 도 9는 실시예에 따른 F0.5 하이드로젤과 Matrigel 상에서 3T3-L1의 지방형 조직과 N1 하이드로젤과 Matrigel 상에서 C2C12의 근육형 조직으로의 분화를 관찰한 것이다. 세포는 분화 9일째에 형광현미경을 사용하여 관찰되었다. ①로 표시된 빨강색(Nile Red)은 지방 방울, ②로 표시된 파란색 (Hoechst 33342)은 세포핵, ③으로 표시된 초록색(Alexa Fluor 488)은 미오신과 F-액틴을 나타낸다.
- [58] 도 10은 실시예에 따른 자가치유성 하이드로젤을 이용하여 인공고기를 제조한 사진이다. a: 28일 동안 분화된 개별 N1 근육 형태 배양물과 F0.5 지방 형태 배양물, 튀긴 후의 모습. b: 근육 형태 조직과 지방 형태 조직을 번갈아가며 적층하여 두 개의 이중층을 형성한 인공고기 모델. 크기: x 1 cm, y 0.5 cm, z 0.35 cm. 근육 조직은 카민으로 염색하여 지방 조직과 구별된다.
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [59] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 구체에 또는 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다.
- [60] 또한 달리 정의되지 않는 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 구체예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [61] 또한 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.

- [62] 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [63] 또한 본 개시에서 특별한 정의가 없는 한, 어떤 층 또는 부재가 다른 층 또는 부재와 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 층 또는 부재가 다른 층 또는 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 층 또는 두 부재 사이에 또 다른 층 또는 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [64] 또한 본 개시에서 사용되는 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위하여 사용된다.
- [65] 또한 본 개시에서 용어 '자가치유(self-healing)'는 별도의 접착제 등 외부적인 요인에 의해서가 아니라 특정 온도 또는 pH조건에서 고분자가 스스로 가역적인 물리화학적 결합을 형성하여 접착되는 것을 의미한다.
- [66] 또한 본 개시에서 용어 '하이드로젤(hydrogel)'은 수화젤이라고도 하며, 고분자가 수소결합, 반데르발스힘, 소수성 상호작용 등의 물리적 결합 또는 공유결합 등의 화학적 결합에 의해 3차원의 가교를 형성하고 있는 망상구조를 가지고, 수상 환경에서 용해되지 않고 상당한 양의 물을 함유할 수 있는 물질을 말한다.
- [67] 이하는 본 발명의 각 구성에 대하여 보다 구체적으로 설명한다.
- [68] [세포 지지체]
- [69] 본 발명의 일 실시예는 자가치유 하이드로젤을 포함하는 배양육 제조용 세포 지지체로, 상기 자가치유 하이드로젤은 서로 동일하거나 또는 서로 상이한 적어도 2개 이상의 자가치유 하이드로젤의 단면이 자가치유 과정으로 가역적인 물리화학적 결합을 형성하여 서로 접합(assembly)이 가능한 것인 배양육 제조용 세포 지지체를 제공한다.
- [70] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로젤은 세포가 배양 가능한 온도 및 pH 범위에서 자가치유 가능한 자가치유 하이드로젤인 것일 수 있다. 또한 상기 자가치유 하이드로젤은 별도의 접착제 없이도 자가치유 하이드로젤 자체의 가역적인 물리화학적 결합에 의해 접합이 가능할 수 있다. 또한, 상기 자가치유 하이드로젤은 근육 조직과 지방 조직의 배양이 가능하며, 근육조직이 배양된 세포 지지체와 지방 조직이 배양된 세포 지지체를 접착제의 도움 없이 자가치유 과정으로 서로 접합되도록 할 수 있다.
- [71] 일 실시예로 상기 배양육 제조용 세포 지지체는 근육세포가 배양되는 제1 자가치유 하이드로젤과 지방세포가 배양되는 제2 자가치유 하이드로젤을 포함하는 것일 수 있다.
- [72] 일 실시예로, 상기 자가치유 과정으로 가역적인 물리화학적 결합을 형성하는 작용기는 수소결합, 이온결합, 보로닉 에스터(boronic acid ester) 결합, 디설파이

드 결합, 호스트-게스트 결합, 이민(imine)결합, 아실하이드라존(acylhydrazone) 결합 등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [73] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 세포가 배양 가능한 온도인 20°C 내지 40°C, 또는 25 내지 28 °C에서 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있으며, 자가치유 가능한 가역적인 물리화학적 결합을 형성하는 것일 수 있다.
- [74] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 세포가 배양 가능한 pH 6.5 내지 12, 또는 6.5 내지 8인 범위에서 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있으며, 자가치유 가능한 가역적인 물리화학적 결합을 형성하는 것일 수 있다.
- [75] 상기 온도 및 pH 범위는 세포배양이 가능한 범위이며, 상기 범위에서 세포 지지체로 사용하기에 적합할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [76] 일 실시예에 따른 세포 지지체는 세포가 배양 가능한 온도 및 pH 범위에서 자가치유 과정으로 서로 결합이 가능하므로, 별도의 접착제 등이 필요 없이 스스로 자가치유 과정에 의해 서로 접합(assembly)이 될 수 있다. 또한, 근육 조직이 배양되는 세포 지지체와 지방 조직이 배양되는 세포 지지체 중, 서로 동일하거나 또는 서로 상이한 적어도 2개 이상의 세포지지체의 단면을 적층하거나 또는 서로 접하도록 위치시켜 자가치유 과정으로 서로 접합이 가능하도록 할 수 있다.
- [77] 이에 따라 근육 조직이 배양되는 세포 지지체와 지방 조직이 배양되는 세포 지지체의 크기 및 함량을 원하는 만큼 자유롭게 조절이 가능할 수 있다. 또한, 근육 조직이 배양되는 세포 지지체끼리 적어도 2개 이상을 서로 접합하여 크기를 증가시키는 것도 가능하다. 또한, 지방 조직이 배양되는 세포 지지체끼리 적어도 2개 이상을 서로 접합하여 크기를 증가시키는 것도 가능하다.
- [78] 일 실시예로, 상기 세포지지체는 상기 세포지지체는 근원세포(Myoblast), 지방세포(Adipocyte), 섬유아세포(fibroblast), 근세포(Myocyte), 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성세포(Satellite cell), 혈관내피세포(endothelial cells) 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 세포를 배양 가능한 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 배양용 제조용 세포 지지체는 근육세포가 배양되는 제1 자가치유 하이드로겔과 지방세포가 배양되는 제2 자가치유 하이드로겔을 포함하는 것일 수 있다.
- [80] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 제1 자가치유 하이드로겔과 제2 자가치유 하이드로겔 중의 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양한 후, 이들을 서로 이어 붙여서 실제육과 같은 마블링을 형성할 수 있다.
- [81] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 근육세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제1성분과 지방세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제2성분을 불규칙한 패턴으로 이어 붙여서 실제육과 같은 마블링을 형성하는 것일

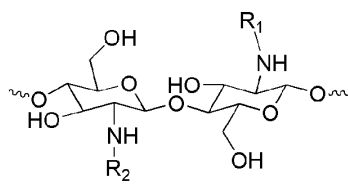
수 있다. 상기 자가치유 하이드로겔은 세포가 배양되는 온도범위에서 자가치유 하이드로겔 제1성분과 자가치유 하이드로겔 제2성분이 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있으며, 이에 따라 실제육과 같은 마블링을 형성할 수 있다.

[82] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 것일 수 있다.

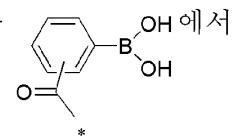
[83] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[84] [화학식 1]

[85]

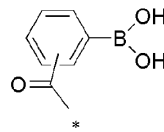


[86] 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는



선택되고,

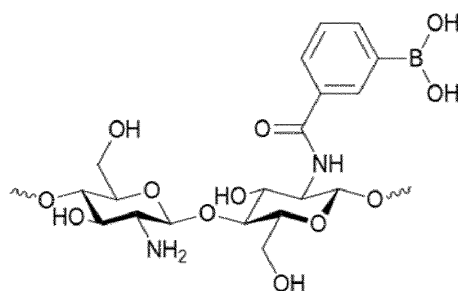
[87] 상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는



[88] 일 실시예로, 상기 화학식 1로 표시되는 단위(A)는 하기 화학식 2로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[89] [화학식 2]

[90]

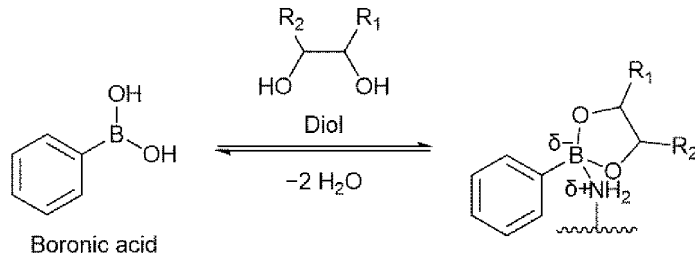


[91] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하인 것일 수 있으며, 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들면, 10 내지 50 %, 15 내지 45 %, 20 내지 30 %인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 치환율 범위를 만족

하는 범위에서 치환되지 않은 키토산의 아민이 보론산 화합물의 보론산 에스터 결합을 유지할 수 있도록 안정화될 수 있다. 이에 따라 자가치유가 가능한 것일 수 있다.

- [92] [식 1]
- [93] $\text{치환율} = (\text{보론산 화합물이 치환된 아민몰수} / \text{키토산의 전체 아민 몰수}) \times 100$
- [94] 상기 식 1에서 키토산의 전체 아민 몰수는 키토산이 탈아세틸화 되는 경우 아세틸화되지 않고 존재하는 아민의 몰수를 의미한다. 키토산의 전체 아민 몰수는 글루코사민의 함량으로부터 계산될 수 있다.
- [95] 일 실시예로 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)가 0.1 내지 0.9 : 1 중량비, 0.15 ~ 0.9 : 1, 0.3 ~ 0.9 : 1, 0.6 ~ 0.9 : 1 중량비로 포함될 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 일 실시예에서, 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 에스터 결합 및 수소 결합을 통한 이중 네트워크가 형성된 것일 수 있다.
- [97] 즉, 상기 단위(A)와 단위(B)의 반응에 의한 보론산 에스터 결합 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 수산기 그룹 간의 수소 결합을 통한 이중 네트워크가 형성된 것일 수 있다. 이와 같이 이중 네트워크가 형성되는 경우, 유연하고 동적인 공유결합인 보론산-다이올 에스터 결합으로 인해 자가치유가 가능할 수 있다. 또한, 하이드록시기를 포함하는 중합체의 수산기 그룹 간의 수소 결합을 통해 기계적인 강도가 더욱 향상될 수 있다.
- [98] 상기 화학식 1에서, 키토산 및 보론산 화합물의 결합은 키토산의 아미노기가 보론산 화합물의 보론과 루이스 산-염기 상호작용을 통해 안정화될 수 있으며, 이를 통해 종래 염기성 조건(예를 들면 pH 8.5 이상)에서만 안정화되던 보론산-다이올 에스터 결합이, 상기 키토산과 배위결합 함으로써, 중성 pH(6~8 사이에서도)에서 매우 안정한 보론산-다이올 에스터 결합을 형성하는 것일 수 있다.
- [99] 상기 키토산 및 보론산 화합물의 결합의 경우에는 폴리비닐알콜 등의 폴리올 중합체 화합물의 디올기와 결합되어 보론산-다이올 에스터 결합을 형성하여 안정화할 수 있다. 이러한 보론산-다이올 에스터 결합은 상기 키토산의 아민기가 없다면 안정화하지 못하고 결국 해리될 수 밖에 없지만, 본 발명은 키토산에 의해서 매우 안정한 보론산-다이올 에스터 결합을 형성할 수 있다.
- [100] 하기는 키토산의 아민 그룹의 질소원자에 의해 보론산-다이올 에스터 복합체를 안정화하는 것을 모식도로 표현한 것이다. 여기서 다이올(diol)은 하이드록시기를 갖는 물질을 의미하며, 본 발명에서는 폴리비닐알콜로 예시되는 하이드록시기를 갖는 중합체를 의미할 수 있다.

[101]



[102] 상기 키토산과 보론산 화합물을 결합하기 위해서는 교차연결제를 사용할 수 있으며, 예를 들면 제로-길이 교차연결제(Zero-length crosslinkers)를 사용할 수 있다. 교차연결제의 예를 들면, *N,N'*-carbonyldiimidazole(CDI), *N,N'*-Dicyclohexylmethanediimine(DCC), *N*-Hydroxysuccinimide(NHS), *N*-hydroxysulfosuccinimide(sulfo-NHS), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 등을 이용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[103] 상기 키토산은 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면, 직경이 1 내지 500 nm, 5 내지 300 nm, 또는 10 내지 100 nm이고, 길이가 1 μ m 내지 10 mm, 1 μ m 내지 5 mm, 5 μ m ~ 5 mm인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 키토산은 분자량이 100 kDa 이상, 150 kDa 이상, 160 kDa 이상, 170 kDa 이상, 180 kDa 이상, 190 kDa 이상, 200 kDa 이상, 250 kDa 이상, 300 kDa 이상, 310 kDa 이상, 500 kDa 이하, 450 kDa 이하, 400 kDa 이하, 390 kDa 이하, 380 kDa 이하, 370 kDa 이하, 360 kDa 이하, 350 kDa 이하인 것일 수 있으며, 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들면, 100 내지 500 kDa, 150 내지 400 kDa, 190 내지 310 kDa인 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[104] 또한, 상기 키토산은 탈아세틸화된 것일 수 있으며, 탈아세틸화도가 70% 이상, 80% 이상, 90% 이하인 것일 수 있으며, 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들면, 70 내지 90%, 80 내지 90%인 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[105] 상기 보론산 화합물은 상기 보론산-다이올 에스터 결합이 형성되도록 하기 위하여 카르복실산기를 갖는 것이 바람직할 수 있으며, 예를 들면, 카르복실산기를 가지는 치환체를 가지는 보론산을 사용할 수 있으며, 구체적인 화합물을 예를 들면 2-카르복시벤젠보론산, 3-카르복시벤젠보론산, 4-카르복시벤젠보론산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[106] 상기 하이드록시기를 포함하는 중합체는 하이드록시기를 포함하면서 생체 적합성을 갖는 중합체를 사용하는 것이 바람직하며, 예를 들면, 폴리비닐알코올을 사용할 수 있다. 폴리비닐알코올은 제한되지 않지만, 중량평균분자량이 10,000 g/mol 이상, 100,000 g/mol 이하, 상기 수치들 사이의 임의의 값인 것일 수 있다. 예를 들면, 10,000 내지 100,000 g/mol, 30,000 내지 100,000 g/mol, 50,000 내지 100,000 g/

mol, 70,000 내지 100,000 g/mol, 80,000 내지 100,000 g/mol, 89,000 내지 98,000 g/mol인 것을 사용할 수 있다.

- [107] 일 실시예로, 상기 세포지지체는 필요에 따라 강도 보강제를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 강도 보강제는 세포지지체의 강도 향상을 위하여 사용되는 것으로 예를 들면, 셀룰로오스 나노 크리스탈, 셀룰로오스 나노섬유, 키토산 나노위스커, 나노키티ن 등을 사용할 수 있다. 또한 상기 강도보강제로는 기타 통상적으로 세포 지지체에 사용 가능한 강도 보강제라면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 상기 강도 보강제의 함량은 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면 상기 세포지지체 전체 중량에 대하여 1 중량% 이하, 0.9 중량% 이하, 0.5 중량% 이하, 0.3 중량% 이하, 0.2 중량% 이하, 0.1 중량% 이하의 함량으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 0.01 내지 1 중량%, 0.05 내지 1 중량%, 0.1 내지 0.5 중량%를 사용할 수 있으며, 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 근육세포 또는 지방세포가 배양 및 분화되기에 적합한 강도를 갖도록 강도를 조절하기 위한 함량으로 사용될 수 있는 한에서는 상기의 수치 범위에만 한정하는 것은 아닐 수 있다.
- [108] 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, 상기 근육세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제1성분은 영률 (Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 지방세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제2성분은 영률 (Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa인 것일 수 있다. 상기 범위에서 각각 근육세포 및 지방세포가 배양 및 분화되기에 적합한 강도를 제공할 수 있으므로 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 영률은 후술되는 방법에 따라 측정된 것을 의미한다.
- [109] 일 실시예로, 상기 자가치유 하이드로겔의 겔분율(Gel fraction)은 제한되는 것은 아니지만, 50% 이상, 51% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 63% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 73% 이상, 75% 이상, 77% 이상, 80% 이상, 83% 이상, 84 % 이상, 90% 이하, 또는 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들면, 50 내지 90%인 것일 수 있다. 상기 겔분율은 후술되는 방법으로 측정된 것을 의미한다.
- [110] 일 실시예로, 상기 세포 지지체는 스캐폴드, 마이크로비드, 하이드로겔 또는 섬유 형태 등인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] [세포 지지체의 제조방법]
- [112] 본 발명의 또 다른 양태는 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체를 혼합한 후, pH를 조절하여 교차결합을 유도하는 단계;를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 이용한 세포 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [113] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체를 혼합할 때, 혼합비율을 조절함으로써 세포지지체의 영률을 원하는 범위로 조절할 수 있다. 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 : 하이드록시기를 포함하는 중합체의 함량은 0.1 내지 0.9 : 1

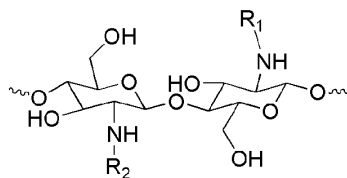
중량비인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면 0.15 ~ 0.9: 1, 0.3 ~ 0.9: 1, 0.6 ~ 0.9: 1 중량비인 것일 수 있다.

- [114] 또한, 필요에 따라 강도 보강재를 더 첨가함으로써 영률을 원하는 범위로 조절하는 것일 수 있다. 상기 강도 보강재는 통상적으로 세포 지지체에 적용 가능한 것이라면 제한되지 않으며, 그 함량은 예를 들면, 전체 세포지지체 중량 중 1 중량% 이하, 0.5 중량% 이하의 범위로 사용될 수 있으나, 목적으로 하는 강도를 조절하기 위한 함량으로 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [115] 또한, 필요에 따라 제조된 자가치유 하이드로겔을 동결 후 해동하는 단계를 더 포함함으로써 기계적인 강도, 예를 들면, 영률을 원하는 범위로 조절하는 것일 수 있다. 이와 같이 동결 후 해동하는 과정을 포함함으로써 폴리비닐알콜의 사슬 간 수소 결합을 유도하여 하이드로겔의 기계적인 물성을 증가시킬 수 있다.
- [116] 일 실시예로 근육세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제1성분은 영률 (Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이 되도록 조절되고, 상기 지방세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제2성분은 영률 (Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa이 되도록 조절되는 것일 수 있다. 상기 범위에서 세포의 배양이 용이하고, 실제육과 유사한 조직감을 제공할 수 있어서 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [117] [배양육 및 이의 제조방법]
- [118] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 일 실시예에 따른 세포 지지체를 이용하여 배양된 배양육을 제공한다.
- [119] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 지지체는 세포배양이 가능한 온도 및 pH범위에서 자가치유 가능함에 따라, 근육세포 및 지방세포를 배양한 각각의 세포 지지체가 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 가능하며, 실제육과 같은 마블링을 형성할 수 있다.
- [120] 또한, 영률(Young's Modulus) 등과 같이 기계적인 강도는 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 혼합비율을 조절하거나, 강도 보강재를 첨가하거나, 또는 동결 해동을 반복하는 등의 방법에 의해 조절이 용이하다. 이에 따라, 근육세포가 배양되기 유리한 강도 및 지방세포가 배양되기 유리한 강도를 갖는 세포 지지체를 각각 제조할 수 있으며, 세포배양 후 또는 세포 배양 전에 자가치유를 통해 일체화되어 마블링이 형성된 배양육을 제공할 수 있다.
- [121] 본 발명의 또 다른 양태는 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 혼합비율을 서로 달리한 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 각각 준비하는 단계;
- [122] 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시키는 단계;
- [123] 를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 포함하는 세포 지지체를 이용한배양육의 제조방법을 제공한다.

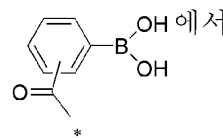
- [124] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 혼합비율을 서로 다르게 한 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 제1 자가치유 하이드로겔은 영율(Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 제2 자가치유 하이드로겔은 영율(Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa이 되도록 혼합된 것일 수 있다.
- [125] 일 실시예로, 기계적인 강도를 조절하기 위하여 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 동결 후 해동하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 또한, 필요에 따라서 강도 보강제를 더 포함할 수 있다.
- [126] 일 실시예로, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시킨 후, 이들을 적층 또는 서로 접하도록 배치함에 따라, 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되면서 근육 조직과 지방 조직의 함량을 원하는 비율로 조절 할 수 있는 배양육을 제조할 수 있다.
- [127] 또는 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔이 적층 또는 서로 접하도록 배치되어 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되도록 한 상태에서, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화하는 것일 수 있다.
- [128] 상기 일 실시예에 따른 제조방법으로 제조된 배양육은 근육 조직과 지방 조직의 함량을 원하는 비율로 조절 할 수 있으며, 이는 통상의 당업자가 조절 가능하다.
- [129] [생체적합성 자가치유 중합체]
- [130] 본 발명의 또 다른 양태는 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 생체적합성 자가치유 중합체를 제공한다.
- [131] 일 실시예로, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[132] [화학식 1]

[133]

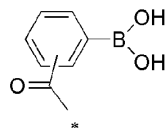


- [134] 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는



선택되고,

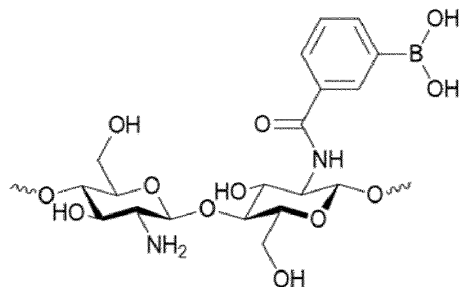
- [135] 상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는



- [136] 일 실시예로, 상기 화학식 1로 표시되는 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 화학식 2로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [137] [화학식 2]

- [138]



- [139] 일 실시예로 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하인 것일 수 있으며, 상기 수치들 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들면, 10 내지 50 %, 15 내지 45 %, 20 내지 30 %인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 치환율 범위를 만족하는 범위에서 치환되지 않은 키토산의 아민이 보론산 화합물의 보론산 에스터 결합을 유지할 수 있도록 안정화될 수 있다. 이에 따라 자가치유가 가능한 것일 수 있다.

- [140] [식 1]

- [141] 치환율 = (보론산 화합물이 치환된 아민몰수/키토산의 전체 아민 몰수) × 100

- [142] 상기 식 1에서 키토산의 전체 아민 몰수는 키토산이 탈아세틸화 되는 경우 아세틸화되지 않고 존재하는 아민의 몰수를 의미한다. 키토산의 전체 아민 몰수는 글루코사민의 함량으로부터 계산될 수 있다.

- [143] 일 실시예로 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)가 0.1 내지 0.9 : 1 중량비, 0.15 ~ 0.9 : 1, 0.3 ~ 0.9 : 1, 0.6 ~ 0.9 : 1 중량비로 포함된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [144] 상기 자가치유 중합체는 pH 6.5 내지 12에서 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한, 다양한 온도 범위에서 자가치유를 발휘할 수 있으며, 생체 적합성을 가지기 위한 관점에서 생체적합한 온도에서도 자가치유 과정에 의해 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있다. 예를 들면, 20°C 이상, 25°C 이상, 26°C 이상, 27°C 이상, 50°C 이하, 45°C 이하, 40°C 이하, 37°C 이하 또는 25 내지 37°C에서 자가치유 과정에 의해 서로 접합(assembly)이 가능한 것일 수 있다.
- [145] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 보론산 에스터 및 수소 결합을 통한 이중 네트워크가 형성된 것일 수 있다.
- [146] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 하이드로겔인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [147] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 상기 단위(A) 및 단위(B)의 비율을 조절하여, 영율(Young's Modulus)이 50 내지 400 kPa 범위로 조절가능한 것일 수 있다. 상기 영율 범위를 만족할 수 있다면 제한되지 않지만, 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)가 0.1 내지 0.9 : 1 중량비, 0.15 ~ 0.9 : 1, 0.3 ~ 0.9 : 1, 0.6 ~ 0.9 : 1 중량비로 포함된 것일 수 있다.
- [148] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 강도 보강재를 더 포함하여 기계적인 강도를 조절할 수 있다. 상기 강도 보강재의 종류 및 함량은 앞서 설명한 바와 동일하므로 더 이상의 설명을 생략한다.
- [149] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 세포의 부착유도 또는 겔의 분해가 가능한, 조직재생 유도형 지지체로도 사용되는 것일 수 있다.
- [150] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체는 생리활성 물질 전달체로 사용되는 것일 수 있으며, 상기 생리활성 물질은 예를 들면, 항생제, 항암제, 진통제, 소염제, 항바이러스제, 항균제, 단백질, 펩타이드, 핵산, 다당, 지질, 탄수화물, 스테로이드, 세포외기질 물질 및 세포 등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [151] 일 실시예로, 상기 자가치유 중합체에 화학적 또는 물리적으로 결합된 생리활성 물질 전달체의 종류와 농도, 상기 자가치유 중합체의 물리적 강도, 화학적 특성 및 분해속도 등에 따라서 생리활성 물질의 전달속도 등이 조절될 수 있다. 상기 전달체는 생리활성 이온 생리활성 물질을 담지 혹은 화학적으로 결합시켜 생체 내로 전달할 수 있는 것을 의미하며, 사용 부위 또는 주입 방법에 따라서 생체 내로 주사(injection)되거나, 예정된 부위에서 예정된 시간에 걸쳐서 일정하게, 방출되도록 할 수 있다.
- [152] 일 예로, 상기 자가치유 중합체는 생체적합용 드레싱이나, 수술부위 봉합용 접착제, 필름, 봉합사, 인공피부를 위한 지지체 등에 적용이 가능할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [153] 이하 실시예 및 비교예를 바탕으로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하기 위한 하나의 예시일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 비교예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [154] 이하 물성은 다음과 같이 측정하였다.
- [155] [분광학]
- [156] 동결건조된 ChsB(OH)₂ 수지 전구체와 수지의 감쇠 총 반사 푸리에 변환 적외선 (ATR-FTIR)스펙트럼은 Nicolet iS50 FTIR 분광계 (Thermo Scientific, 미국)와 스마트 iTR 다이아몬드/ZnSe ATR 액세서리 (페이스 각도 45°)를 사용하여 4000 ~ 650 cm⁻¹ 범위에서 2 cm⁻¹의 스캔 간격으로 128회 스캔하여 기록되었다.
- [157] ChsB(OH)₂ 샘플의 UV-Vis 스펙트럼은 UV-가시선근적외선 (NIR) 분광광도계 (Jasco V-770, 미국)를 사용하여 측정되었다. UV 테이터는 키토산에 3-카르복시 벤젠보론산이 접목되었는지를 확인하고, 보론산 모이어티(moiety) 치환 정도 (DS)를 다음과 같은 식에 따라 계산하기 위해 사용되었다.
- [158] $DS = [BA]/[GlnN] \times 100$
- [159] 여기서 [BA]는 보론산 모이어티 함량 (mmol g⁻¹)을 나타내고, [GlnN]은 샘플 내의 글루코사민 (키토산 반복 단위) 함량을 나타낸다. 이 때 평균 탈아세틸화 정도는 80% (4.718 mmol g⁻¹)로 가정하였다.
- [160] [겔분율(% , Gel Fraction)]
- [161] 제조된 자가치유 하이드로겔(중합체)의 겔분율은 제조한 자가치유 하이드로겔의 이온교환수에 담그기 전과 후에 동결건조한 무게로부터 측정하였다.
- [162] 즉, 제조된 자가치유 하이드로겔(중합체)을 무게가 일정해 질 때까지 동결건조하여 무게를 측정하여 Wi로 하였다. 그런 다음, 이를 무게가 일정해 질 때까지 이온교환수에 담갔다가 꺼낸 후, 무게가 일정해 질 때까지 동결건조하여 무게를 측정하여 We로 하였다.
- [163] 하기 식으로 겔분율을 계산하였다.
- [164] $\text{겔분율(Gel Fraction)} = (We/Wi) \times 100$
- [165] [팽윤도]
- [166] 팽윤도를 결정하기 위해, 자가치유 하이드로겔(중합체)을 계량하여 무게(Wd)를 측정하고, 상기 수지를 실온에서 과잉 이온교환수에 담겨 평형에 도달하도록 팽윤시켰다. 이후, 팽윤된 수지를 계량하여 팽윤 상태의 수지의 무게(Ws)를 측정하여 평형 팽윤도 (ESD)를 하기 식으로 측정하였다.
- [167] $ESD (\%) = (Ws - Wd) / Wd \times 100\%$
- [168] [기계적 특성]
- [169] 제조된 자가치유 하이드로겔(수지) 샘플의 압축 기계적 특성은 1 kN 로드셀이 장착된 범용 시험기 (UTM, Instron 5943, 영국)을 이용하여 실온에서 사용하여 평가되었다. 수지 샘플은 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 크기의 정육면체로 잘라져 지지판 위에 배치되었다. 압축 시험은 5 mm/min의 이송속도로 진행되었다. 테이터는

0.1초마다 수집되며, 영률 (Young's modulus)은 압축 탄성계수 (E)이며, 응력-변형 곡선의 선형 영역의 기울기로 측정되었다. 또한 스트레인(strain)이 각각 30 %, 50 % 일 때의 압축강도(Compressive modulus)를 측정하였다.

[170] [수지의 포도당 농도 및 pH 변화에 대한 반응]

[171] 안정화된 수지는 HCl 용액 (0.1 M)을 첨가하여 산성 pH에 노출되어 보론산-다이올 에스터 결합을 해리시켰다. pH는 NaOH 용액 (0.1 M)을 사용하여 다시 7 내지 8로 상승시켜 보론산-다이올 에스터 결합 네트워크를 재형성했다. 또한, 수지의 포도당 수용액 (0.45 wt% 및 5 wt%)에 대한 반응도 조사되었다. 폴리올기를 가진 사카라이드인 포도당은 보론산-다이올 에스터 결합과 경쟁하며 포유동물 세포 배양 미디어의 필수 구성 요소이다 (0.45 wt%로 사용됨). 낮은 포도당 농도는 수지의 큰 파괴를 유발하지 않을 것으로 예상되었다.

[172] [수지 기반 스캐폴드에서 육류 배양]

[173] 1. 세포주 및 세포 처리

[174] 3T3-L1은 지방세포로 분화될 수 있는 마우스 섬유아세포 세포주이다. C2C12는 신속하게 분화되어 수축성 근사체를 형성하고 근육 단백질을 생성할 수 있는 마우스 근아세포 세포주이다. 두 세포주는 ATCC (<https://www.atcc.org/>)로부터 획득되었으며, 해당 기관의 지침에 따라 처리되었다.

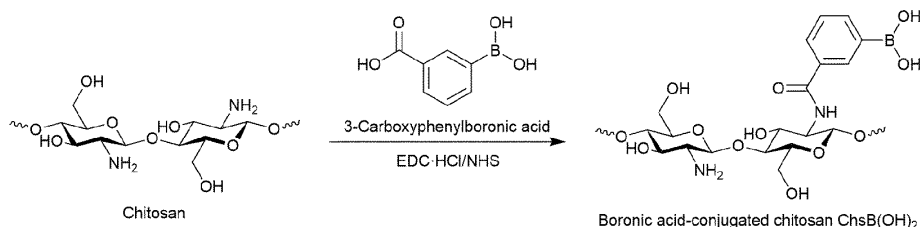
[175] 2. 세포 생존율 및 증식 (수지 스캐폴드의 생체적합성/세포독성)

[176] 수지 구성 요소인 ChsB(OH)₂와 PVA의 세포독성을 C2C12 근아세포와 3T3-L1 섬유아세포를 대상으로 ISO-10993-5 및 ISO-10993-5-12 표준을 기반으로 세포 카운팅 키트-8(CCK-8)을 사용하여 평가하였다. 동결건조된 시험 재료를 0.2 g mL⁻¹의 세포 배양 미디어에 첨가하여 37 °C에서 100 rpm의 진동 상태에서 24시간 동안 배양한 후, 추출물을 대상 세포주에 테스트하였다. 성장 미디어 및 저밀도 폴리에틸렌 (LDPE, 0.2 g mL⁻¹) 및 디에틸디티오키아르바메이트 아연 (100 μM)의 추출물은 각각 빈, 음성, 양성 대조군으로 사용되었다. 세포는 10⁴ cells mL⁻¹로 폴리스티렌 96구 웰 플레이트에 배양되었으며, 성장 미디어에서 24시간 동안 증식한 후 추출물에 24시간 동안 배양되었다. 세포는 이후에 인산완충생리식염수(PBS)로 3회 세척되고, CCK-8(Cell Counting Kit-8)의 함량이 10 v%인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 37 °C에서 1시간 동안 체내 미토콘드리아 탈수소효소가 CCK-8의 삼차아조리움 솔트를 주황색 포마잔으로 변환하도록 체내에서 체외로 이동되었다. 포마잔의 양은 흡광도 450 nm (광학밀도 OD 450)를 사용하여 미세플레이트 판독기 (Hidex Sense)로 측정되었다. 세포 생존율은 다음과 같은 식을 사용하여 빈에 대해 비교되었다.

[177] 생존율(Viability, %)=(100%×OD_{450e})/OD_{450b}

[178] 여기서 OD_{450e}는 시험 샘플의 추출물의 측정된 OD 450 값이고, OD_{450b}는 빈의 측정된 OD 450 값이다.

- [179] 또한, 수지 스캐폴드 상의 세포 증식은 CCK-8을 사용하여 1주일 동안 모니터링되었다. 세포는 성장 미디어(cell culture medium for cell proliferation)로 사전 평형화된 24구 웰 플레이트에 높이 0.5 cm의 수지 스캐폴드 위에 10^6 cells mL^{-1} 로 접종되었다. 수지 스캐폴드의 위쪽에는 500 μL 의 성장 미디어가 추가되었고, 건강한 세포의 성장과 증식을 유지하기 위해 매일 갱신되었다. OD 450 값은 위에서 설명한 방법대로 측정되었다. 그러나 측정 전에 반응한 CCK-8 용액은 수지 스캐폴드로부터의 간섭을 방지하기 위해 배양 플레이트에서 새로운 96구 웰 플레이트로 이전되었다. 그런 다음 실험을 계속하기 위해 세포 배양액에 신선한 성장 미디어가 추가되었다. 시간에 따라 증가하는 OD 450 값은 세포 증식을 나타낸다.
- [180] 세포 생존율은 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cell (Thermo Fisher Scientific L-3224)를 사용하여 시각적으로 확인되었다. 수지 스캐폴드 위에 배양된 세포 (10^6 cells mL^{-1})은 PBS로 3회 세척한 후, calcein acetoxymethyl ester (칼세인 AM, 생존 세포에 염료를 칠하는 역할; PBS 내 2 μM) 및 에티디움 호모디머-1 (EthD-1, 사멸한 세포에 염료를 칠하는 역할; PBS 내 4 μM)로 37 °C에서 어둠 속에서 30분 동안 염색되었다. 그런 다음, 세포 핵은 Hoechst 33342 (PBS 내 5 μg mL^{-1})로 37 °C에서 어둠 속에서 5분 동안 염색되고, PBS로 한 번만 세척되었다. 염색된 세포는 레이저 형광 현미경 (LSM 780, Carl Zeiss AG, 독일)을 사용하여 다음 매개변수로 관찰되었다: calcein AM, 흡수 495 nm, 방출 515 nm (녹색); EthD-1, 흡수 528 nm, 방출 617 nm (빨강); Hoechst 33342, 흡수 350 nm, 방출 461 nm (파랑).
- [181] 세포 생존율과 증식은 세포 외 기질을 모방하며 양의 대조군으로 작용하는 Corning Matrigel Matrix (제품 번호 354230, 5 mg mL^{-1})와 비교되었다.
- [182] [제조예 1] 보론산 치환된 키토산(수지전구체)의 합성
- [183]



- [184] 키토산 (5.0 g; 시그마 알드리치, medium molecular weight Chitosan 448877제품, viscosity molecular weight M_v 190-310 kDa, 글루코사민 단량체로 0.0236 몰, 80%의 탈아세틸화)을 이온교환수(500 mL)에 용해시킨다. 용액의 pH는 HCl (0.1 M)을 사용하여 4 ~ 4.5로 조절되었다. 3-카르복시벤젠보론산(1.958 g, 0.0118 몰, 글루코사민에 대해 50 mol%의 비율)을 키토산 용액에 첨가하였다. 교차연결제인 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염화물 (EDC·HCl) (2.262 g, 0.0118 몰)과 N-히드록시 숙신이미드(NHS)(1.358 g, 0.0118 몰)를 반응 혼합물에 첨가하여 실온에서 48시간 동안 반응을 진행하였다. 보론산 결합된 키토산

- [ChsB(OH)₂]은 분자량 10 KDa의 재생 섬유소 다이알라이시스 막(Spectrum Labs의 Spectra/PorTM 제품)을 사용하여 정제되고, 동결건조를 통해 보존되었다.
- [185] 그 결과, 도 1에서 도시된 바와 같이, 키토산에 3-카르복시벤젠보론산이 접목된 성공적인 결과는 FTIR 분광법을 통해 확인되었다. ChsB(OH)₂의 스펙트럼은 특징적인 페닐기 신호를 보여주며, 이에는 방향족 고리 신축 (1580 cm⁻¹)과 m-치환 방향족 고리의 세 개의 인접한 CH 이외 평면 변형 (748 및 705 cm⁻¹)이 포함된다. 또한, C=O 신축진동 (1604 cm⁻¹)을 통해 ChsB(OH)₂의 아마이드 결합 형성이 확인되었다.
- [186] 상기 결합은 또한 도 2의 UV-Vis 분광법을 통해 확인되었으며, 도 2에 도시된 바와 같이, 285 nm에서 페닐 고리 피크의 등장을 보여주었다. 또한 보론산 치환 정도는 도 3과 같이, 3-카르복시벤젠보론산에 대한 캘리브레이션 곡선을 기반으로 자외선-가시분광법 (UV-Vis 분광법)을 사용하여 결정되었다. 그 결과 치환율이 21.2 몰%로 결정되었다.
- [187] [비교예 1] 세포 배양용 알지네이트 기반 자가치유 수지 수용체의 합성
- [188] 알지네이트에 보론산을 결합시킨 AlgB(OH)₂는 다음과 같이 EDC-HCl과 NHS의 존재하에서 알지네이트에 3-아미노페닐보론산을 접목하여 준비되었다. 나트륨 알지네이트(5 g, 단량체 기준으로 0.025 몰)를 이온교환수(500 mL)에 용해시킨 후, EDC-HCl (4.8 g, 0.025 몰), NHS (2.88 g, 0.025 몰) 및 3-아미노페닐보론산 (1.95 g, 0.0125 mmol)을 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 48시간 동안 교반되었으며, 이후 1주 동안 증류수로 다이알라이시스되었으며, 최소한 7회 이상 물을 교체한 후 동결건조되었다.
- [189] AlgB(OH)₂는 PVA와는 두 구성 요소 간의 비율과 관계없이 알칼리성 pH 10에서만 안정한 수지를 형성할 수 있었다. 생리학적 pH 7 내지 7.5에서는 수지가 유동성을 띠기 시작하고 빠르게 유동성 액체로 변했다.
- [190] [실시예 1 내지 10]
- [191] <보론산 에스터 기반 자가치유 하이드로겔 수지의 합성>
- [192] 상기 제조예 1에서 제조된 동결 건조된 ChsB(OH)₂를 아세트산 수용액 (0.2 M, pH 4.76)에 3 중량%로 용해하였다(용액 A). 폴리비닐알콜(PVA) 분말 (MW 89 × 10³ 내지 98 × 10³ g/mol, >99 몰% hydrolyzed, atactic hydroxy side chains)을 10 중량%로 탈이온수에 90 °C에서 용해하였다(용액 B). 실시예 3 및 8에서는 스프레이 건조된 셀룰로오스 나노 크리스탈을 0.1중량%를 각각 실시예 2 및 실시예7에서 더 추가한 것이다.
- [193] 하이드로겔을 형성하기 위해 용액 A를 용액 B에 표 1에 기재된 바와 같이, 서로 다른 질량비로 첨가하고, 1.0 M의 NaOH 용액을 사용하여 pH를 7.5로 조절하여 교차결합을 유도하였다.
- [194] 수지에 포획된 공기 거품을 제거하고 균일한 질감을 얻기 위해 수지를 혼합기에서 혼합한 후, 4 °C에서 24시간 동안 안정화시켜 고분자 네트워크의 완전한 교

차결합을 유도하였다. 실시예6 내지 실시예10은 기계적 특성을 향상시키기 위해 수지를 -20 °C의 냉동기에 6시간 동안 놓고 20 °C에서 12시간 동안 해동시키는 과정을 거쳤다. 이 과정은 수지 내 PVA 사슬 간의 수소 결합을 통해 추가적인 교차결합을 유도하여 수지 내 보론산 에스터 및 수소 결합을 통한 이중 네트워크를 형성한다. 수지는 분자량 10 KDa의 재생 섬유소 막을 사용하여 이온교환수 및 Dulbecco 인산염 버퍼 살라인 (PBS 1X, pH 7.4, 세포 배양용)으로 다이얼라이시스 하여 부산물을 완전히 제거할 때까지 정화하였다.

[195] <겔분율과 팽윤정도 평가>

[196] 하기 표 1에서, 샘플명은 N은 동결/해동처리 하지 않은 것을 의미하고, F는 동결/해동과정을 추가한 것이며, C는 전체 하이드로젤 수지 중에 강도보강제로 셀룰로오스나노크리스탈을 0.1중량%를 추가한 것을 의미한다. 숫자는 PVA에 대한 ChsB(OH)₂의 중량비를 의미한다.

[197] 실시예 1 내지 10에서 제조된 하이드로젤 수지의 물성을 평가하였다.

[198] [표1]

	Sample	ChsB(OH) ₂ /PVA mass ratio	Gel fraction (%)	Equilibrium degree of swelling (%)
실시예 1	F0.5	0.15	75.6 ± 2.59	145 ± 2.52
실시예 2	F1	0.3	83.1 ± 3.30	153 ± 7.57
실시예 3	F1C	0.3	84.4 ± 1.20	152 ± 1.73
실시예 4	F2	0.6	64.6 ± 4.65	188 ± 6.66
실시예 5	F3	0.9	57.7 ± 3.18	196 ± 3.61
실시예 6	N0.5	0.15	66.9 ± 2.23	201 ± 5.13
실시예 7	N1	0.3	73.9 ± 2.73	182 ± 4.16
실시예 8	N1C	0.3	77.1 ± 1.81	185 ± 6.03
실시예 9	N2	0.6	63.8 ± 3.94	231 ± 6.03
실시예 10	N3	0.9	51.8 ± 2.65	237 ± 5.86

[199] 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, ChsB(OH)₂ 용액과 PVA 용액은 생리학적 pH 범위 7.0-7.5에서 다양한 부피 비율로 혼합되어 보론산-다이올 결합을 통해 자가치유 하이드로젤을 형성하는 것을 확인하였다. 이러한 결합은 키토산 질소 원자에 의해 안정화된다(N 시리즈). 동결-해동 처리는 PVA 사슬 간 수소 결합을 유도하여 하이드로젤을 기계적으로 강화한다(F 시리즈). <기계적 물성 평가>

[200] 또한 표 2에서 알 수 있듯이, PVA 사슬 사이의 수소 결합 네트워크의 형성은 높은 겔 분율과 낮은 팽윤도로 나타났다.

[201] [표2]

	Sample	Compressive modulus (MPa)	at 30% strain Stress (MPa)	at 50% strain Stress (MPa)
실시예 1	F0.5	0.16	0.10	0.39
실시예 2	F1	0.42	0.22	0.92
실시예 3	F1C	0.61	0.34	1.60
실시예 4	F2	0.10	0.07	0.23
실시예 5	F3	-	-	-
실시예 6	N0.5	0.08	0.05	0.26
실시예 7	N1	0.21	0.13	0.47
실시예 8	N1C	0.25	0.15	0.17
실시예 9	N2	0.07	0.04	0.37
실시예 10	N3	-	-	-

[202] 상기 표 2에서 실시예 5의 F3 및 실시예 10의 N3는 기계적 특성을 측정할 수 있을 만큼 충분히 강하지 않아서 측정할 수 없었다. 또한 상기 표로부터 알 수 있듯이, 하이드로젤의 압축 강도 특성은 ChsB(OH)₂와 PVA의 질량 비율을 조절함으로써 변화시킬 수 있었다. 이 능력은 특정 종류의 조직과 일치하는 탄성계를 가진 골격을 생성하여 조직의 성장과 분화를 촉진하는 데 이점이 있다. 압축 탄성계는 ChsB(OH)₂와 PVA를 적절한 질량 비율인 0.3으로 혼합했을 때 가장 높은 값을 나타내었다.

[203] <자가치유 및 다중모듈 반응성 평가>

[204] 다음으로 자가치유 및 다중 모듈 반응성을 평가하였다.

[205] 보론산-다이올 결합의 동적 특성은 ChsB(OH)₂/PVA 하이드로젤의 효율적인 자가치유를 허용하며, 비호환 인터페이스의 효율적인 융합을 이끌어낸다. 도 4에서 보듯이, 독립적으로 준비된 염료가 칠해진 별도로 제작된 3가지의 시편 (Brilliant Blue FCF 염색/무염색/Amaranth Red 2 염색)으로 제조한 실시예 7의 N1 하이드로젤을 서로 면접촉한 후, 5분 경과한 결과, 세 가지 별도 조각은 매끄럽게 연결되어 조각이 분리되지 않고 들어 올릴 수 있는 하이드로젤로 변화했다(도 4의 a참조).

[206] 이러한 봉합-치유 기능은 하이드로젤의 용이한 형태 변경을 가능하게 했다. 예를 들어, 곰 인형 머리 형태로 된 N1 하이드로젤 한 조각을 자르고 이를 완전히 망가뜨린 다음 하트, 별, 및 꽃 모양의 틀에 담아 두고 일정 시간이 지나면 그 틀에 맞는 형태의 하트, 별, 및 꽃 모양으로 재형성되는 것을 알 수 있다. 이때 추가 접착제가 필요하지 않았으며, 자가치유 중합체의 재사용이 가능함을 확인할 수 있었다(도 4의 b).

- [207] N1 하이드로젤은 또한 pH 변화와 포도당에 반응하였다. pH를 알칼리성에서 산성으로 낮추면 $\text{ChsB}(\text{OH})_2$ 와 PVA 사슬 사이의 pH 의존적인 보론산-다이올 결합의 이탈로 인해 하이드로젤이 붕괴되었다. pH를 7.5로 다시 높이면 젤이 재형성되고 안정성을 회복한다(도 4의 c).
- [208] 또한 N1 하이드로젤이 5 wt% 포도당 용액과 접촉하면 강력한 단당류와 보론산의 결합결합으로 인해 젤이 흐르기 시작하여 곧 자유로운 유동성을 가지게 되었다. 그러나 포도당 농도가 훨씬 낮은 DMEM 배지 (0.45 wt%)에 있을 때 하이드로젤은 손상되지 않았으며, 이는 조직 적재용 골격으로서의 기능에 필수적인 특성을 부여할 수 있다 (도 4의 d, e).
- [209] <조직배양용 스캐폴드로서의 평가>
- [210] 다음으로 자가치유 하이드로젤을 조직 배양용 스캐폴드로서의 재료로 이용 가능성을 평가하였다. 상기 실시예 1 내지 10에서 제조된 하이드로젤을 이용하여 세포주의 배양을 실시하였다.
- [211] 세포주의 배양 평가는 세포 계수(cell counting) 키트-8(CCK-8)을 사용하여 다른 세포주가 있는 하이드로젤에서 한 세포주의 성장과 증식을 조사하였다. 이 실험을 위해 각 개별 세포주에 대해 매트릭젤 (Matrigel, 양성 대조군)과 비슷한 증식 속도를 보이는 하이드로젤을 선택했다. 다음과 같은 하이드로젤과 해당 압축 강도가 사용되었다: C2C12 세포주에는 N1(207kPa) 및 N1C(250kPa), 3T3-L1 세포주에는 N0.5(80.2kPa), F0.5(161kPa) 및 F2(104kPa)가 사용되었다.
- [212] 먼저 24웰 플레이트(24-well plate)에 10^6 세포 mL^{-1} 의 성장 배지로 사전 평형화된(pre-equilibrated) 하이드로젤(높이~0.3cm) 위에 세포를 시드(seed)했다. 그 후, 세포가 쉽게 부착될 수 있도록 성장 배지(500 μL)를 시드된 하이드로젤 상단에 추가한 다음 37 °C에서 5 % CO_2 로 3시간 동안 배양했다. 배지를 흡인한 후(After aspirating the media), C2C12 시드 하이드로젤을 주격으로 웰에서 조심스럽게 분리하고 뒤집은 다음 하이드로젤의 자가 치유 능력을 사용하여 다른 웰 플레이트의 3T3-L1 시드 하이드로젤에 부착했다. 6가지 자가 치유 하이드로젤 조합을 평가했다. 배양은 성장 배지(500 μL)를 엮고 37 °C에서 5v% CO_2 에서 배양했으며, 최적의 세포 성장과 증식을 유지하기 위해 매일 배지를 교체했다. C2C12 세포주에 비해 3T3-L1 세포주의 성장 속도가 느린 점을 고려하여 3T3-L1 섬유아세포의 성장에 최적화된 소 송아지 혈청(BCS 10 v%)을 성장 배지에 보충했다. 공동 배양에서 두 세포주의 성장과 증식은 개별 세포 배양에 대해 설명한 대로 CCK-8을 사용하여 평가했다. 자가 치유 능력이 없는 매트릭젤(5 mg mL^{-1})을 음성 대조군으로 사용했다.
- [213] 1. 세포 생존율과 증식
- [214] $\text{ChsB}(\text{OH})_2$ 와 PVA로 구성된 모든 하이드로젤 성분은 3T3-L1 및 C2C12 세포주에서 관찰 가능한 독성이 없었다. 모든 처리 조건의 세포 생존율은 ISO 10993-5 표준을 준수하며 음성 대조군과 비교 가능한 수준이었다(도 5).

- [215] 또한 하이드로젤 강성이 세포 증식에 미치는 영향을 조사했다. 부드러운 하이드로젤 (F0.5, N0.5, 및 F2)은 세포 분화 전의 3T3-L1 섬유아세포주의 증식을 촉진했다(도 6), 반면 C2C12 근육세포주는 더 단단한 하이드로젤 (N1 및 N1C)에서 더 잘 성장했다(도 7). 이러한 하이드로젤에서 양 세포주의 성장은 Matrigel (양성 대조군)과 유사한 수준이었다.
- [216] LIVE/DEAD 염색 결과, F0.5 하이드로젤 위에서 배양된 3T3-L1의 생존율과 N1 하이드로젤 위에서 배양된 C2C12의 생존율은 양성 대조군인 Matrigel과 거의 동일한 수준이었다(도 8). 즉, 사멸되는 세포는 거의 없음을 알 수 있다. 상기 표 7에서 ①로 표시된 녹색(calcein AM)은 생존 세포, ②로 표시된 파란색(Hoechst 33342)은 세포핵을 나타낸다.
- [217] 2. C2C12 and 3T3-L1 cell lines 분화 배지 제작 및 분화
- [218] 다음으로 세포의 분화를 살펴보았다.
- [219] 3T3-L1 세포를 Adipocyte로 분화시키기 위해 다음과 같은 조성의 분화 배지를 제조하였다. 90% DMEM, 10% FBS, 1 μ M Dexamethasone, 0.5 mM methyl isobutyl xanthine (IBMX), 1 μ g/ml Insulin. 충분히 생장이 일어난 3T3-L1 세포로부터 성장 배지를 제거한 후, 분화 배지를 처리해주었다. 관찰하고자 하는 날에 따라 최소 7일부터 14일, 21일까지 분화 배지를 처리하였으며, 2-3일에 한 번 분화 배지를 새로 갈아주었다.
- [220] 마찬가지로 C2C12 세포를 Myoblast로 분화시키기 위해 다음과 같은 조성의 분화 배지를 제조하였다. 98% DMEM, 2% Donor equine serum (DES), 1 μ M Insulin. 충분히 생장이 일어난 C2C12 cell로부터 성장 배지를 제거한 후, 분화 배지를 처리해주었다. 관찰하고자 하는 날에 따라 최소 7일부터 14일, 21일까지 분화 배지를 처리하였으며, 2-3일에 한 번 분화 배지를 새로 갈아주었다.
- [221] 3T3-L1 세포는 F0.5 하이드로젤과 Matrigel 상에서 Nile Red로 염색된 지질 방울이 축적되는 지방 세포와 유사한 조직으로 분화되었다. 마찬가지로, C2C12 세포는 N1 하이드로젤과 Matrigel 상에서 섬유아세포와 유사한 줄기 모양에서 근육 세포 모양으로 모양을 변화시켰다(도 9). 즉, F0.5 하이드로젤과 Matrigel 상에서 3T3-L1의 지방형 조직과 N1 하이드로젤과 Matrigel 상에서 C2C12의 근육형 조직으로의 분화. 세포는 분화 9일째에 형광현미경을 사용하여 관찰되었다. ①로 표시된 빨강색(Nile Red)은 지방 방울, ②로 표시된 파란색(Hoechst 33342)은 세포핵, ③으로 표시된 초록색(Alexa Fluor 488)은 미오신과 F-액틴을 나타낸다.
- [222] 3. 배양육의 제조
- [223] 지방(3T3-L1) 및 근육(C2C12) 조직의 배양물은 인공 고기 프로토타입을 생산하기 위해 6-well 배양 접시에서 배양되었다. 하이드로젤 세포 스캐폴드는 두께가 0.3 cm를 넘지 않으며 well에 맞게 크기를 조절한 후, $\text{ChsB}(\text{OH})_2$ (3 wt%, pH 4-5)와 PVA (10 wt%) 용액을 적절한 비율로 혼합하고 pH를 7.4-7.5로 조정하여 준비되었다. 하이드로젤에 냉동/해동 처리를 적용할 수 있다. 세포 시딩 24시간 전에 각 세포 유형에 맞는 성장 배양액을 스캐폴드에 함침시켜 평형상태를 만들었다.

- [224] 각 웰에 있는 하이드로젤 스캐폴드(N1은 C2C12에, F0.5는 3T3-L1에)에 세포 (10^6 세포/mL 현탁액 1mL)를 시딩했다. 세포들은 분화를 위해 충분한 세포 간 신호를 보장하기 위해 100% 융합될 때까지 배양되었다.
- [225] 융합된 3T3-L1 세포는 지방세포 분화 배양액을 사용하여 3일간 지방세포 분화를 유도한 후, 매일 신선하게 교체되는 지방세포 유지 배양액으로 유지되었다. 융합된 C2C12 세포는 근육세포 분화를 유도하고 매일 배양액을 교체하여 유지되었다. 성장, 분화 및 유지 배양액의 구성은 위의 '2. C2C12 and 3T3-L1 cell lines 분화 배지 제작 및 분화'에 설명되어 있다.
- [226] 분화 후 28일째, 성숙한 지방 및 근육 조직 배양물은 스캐폴드 자가 치유를 통해 고기 프로토 타입을 조립하는 데 사용되었다. 배양액을 제거한 후, 지방과 근육 층을 나란히 배치하여 샌드위치 구조(도 10), 가장자리를 맞대어 베이컨/삼겹살 구조, 또는 복잡한 마블링 소고기를 모방하는 맞춤형 구조로 접합(assembly)시켰다. 조립은 외부 접착제나 자극 없이 실온에서 2 내지 5분 내에 이루어졌다. 조립된 고기는 냉장 보관하거나 원하는 대로 요리할 수 있음을 확인하였다.
- [227] 분화된 N1 근육 형태 배양 및 F0.5 지방 형태 배양은 28일 후에 실제 날 고기의 근육과 지방과 같은 외관을 나타냈다(도 10 a). 식품에 처리된 고기에 붉은 색상을 부여하는 일반적인 식품 염색제인 카민을 사용하여 근육 조직과 지방 조직을 구분했다. 두 배양물은 해바라기 오일에서 150°C 로 튀겨지고, 결과적으로 조리된 인공 고기는 소고기 육포 또는 베이컨과 유사한 질감을 가졌다. 마지막으로, 세포가 함유된 하이드로젤 시트를 최대 $0.75\ \mu\text{m}$ 두께로 교대로 적층하여 지방과 근육의 구조 내에서 맞춤형 패턴을 만들 수 있는 두꺼운 고기 조각(두께 $0.35\ \text{cm}$)을 만들 수 있었다(도 10 b). 이는 3D 프린팅과 같은 고급 기술의 도움 없이도 대면적의 인공 고기를 만들 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 보여준다.
- [228] <식용 가능성 및 안정성 확인 결과>
- [229] 1. 하이드로젤 중량 평가
- [230] 조직 배양물의 조성 분석을 위해 완전히 평행 상태에 달한 N1 및 F0.5 하이드로젤의 무게를 세포 시딩 전에 측정하였다. 분화 후 28일째, 해당 배양물(N1에 C2C12 세포를 포함하고 있는 것과 F0.5에 3T3-L1 세포를 포함하고 있는 것)의 배양액을 제거한 후, 증류수로 세척하고, 표면에 묻은 물기를 제거한 다음 무게(W_s)를 측정하였다. 이후, 배양물은 동결 건조하여 건조 내용물을 얻은 다음, 건조된 하이드로젤의 중량(W_d)을 측정하였다. 건조된 조직 내용물은 배양기간 동안 하이드로젤의 분해가 없다고 가정하여 건조된 하이드로젤 및 물의 무게를 배양물의 총 무게에서 빼어 얻었다. 평형 부풀림 정도(equilibrium swelling degree (ESD))는 다음의 식으로 계산되었다.
- [231]
$$\text{ESD}(\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100\%$$
- [232] 2. 하이드로젤의 조성 분석
- [233] 배양물의 건조된 내용물에 대한 원소 분석은 수소(H), 탄소(C), 질소(N) 및 황(S)을 Unicube 원소 분석기(Elementar, 독일)를 사용하고, 산소(O)는 Flash 2000 원

소 분석기(Thermo Fisher Scientific, 미국)를 사용하여 실시되었다. 붕소 함량 분석은 동결건조된 샘플(~0.1 g)을 액체 질소에서 분쇄한 후, 증류수(100 mL)에 처음 소니케이션(40% 진폭, 5초 작동/2초 정지 주기, 실온, 3분)하여 분산시켰다. 그런 다음, 이 분산물은 iCAP 6500 Duo 유도 결합 플라즈마-원자 방출 분광계(IOP-AES) 분광계를 사용하여 분석되었다.

[234] 이하는 실험 결과를 나타낸다.

[235] 지방세포/세포지지체인 3T3-L1/F0.5 배양체 및 근육세포/세포지지체인 C2C12/N1 배양체를 분화한 후 그 조성을 측정하였다.

[236] 분화가 완료된 3T3-L1/F0.5 배양체의 무게조성을 확인한 결과, 19.5 %의 수분, 9.68 %의 건조 하이드로 겔(dried hydrogel), 70.84 %의 건조 조직(dried tissue)으로 구성됨을 확인하였다. 또한, 분화가 완료된 C2C12/N1 배양체의 무게조성을 확인한 결과, 73.29 %의 수분, 4.82 %의 건조 하이드로 겔(dried hydrogel), 21.89 %의 건조 조직(dried tissue)으로 구성됨을 확인하였다.

[237] 중성지방을 저장하는 지방 조직은 근육보다 적은 물을 포함하며, 반면 근육 조직은 전해질 이동 및 수축에 중요한 수분 함량을 보유하는 것을 확인하였다. 28 일차 분화 후, C2C12/N1 및 3T3-L1/F0.5 배양물의 건조 하이드로 겔 내용물은 각각 4.82 wt% 및 9.65 wt%로 계산되었다. 이는 세포 증식, 분화 과정에서 세포 및 조직의 함량이 늘어나면서 점차 하이드로 겔이 차지하는 부피가 감소함을 보여주었다.

[238] 또한 스캐폴드 및 조직을 포함한 최종 배양물의 원소 조성을 측정한 결과, 초기 하이드로 겔과 비교하여 세포 성장과 분화 후에 크게 변경된 것을 확인하였다. 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

[239] 하기 표 3은 하이드로 겔 전구체, 하이드로 겔 및 조직 배양물(세포 포함 하이드로 겔)의 건조 샘플의 원소 구성을 나타낸다. 단위는 중량%이다.

[240] [표3]

Dried sample	Formula/Composition	Hydrogen (H)		Carbon (C)		Nitrogen (N)		Oxygen (O)		Sulfur (S)	
		이론 값	실험 값	이론 값	실험 값	이론 값	실험 값	이론 값	실험 값	이론 값	실험 값
Chitosan	$(C_6H_{11}O_4N)_0.8(C_8H_{13}O_5N)_{0.2}^{b)}$	6.78	6.52	45.33	45.27	8.26	8.44	39.63	39.53	0	N D
PVA	C_2H_4O	9.15	8.59	54.53	54.27	0	ND	36.32	36.31	0	N D

ChsB(OH) ₂	(C ₁₃ H ₁₆ O ₇ N ₁ B) _{0.1696} (C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _{0.6304} (C ₈ H ₁₃ O ₅ N) _{0.2} ^{c)}	6.34	6.48	46.82	46.95	7.2	6.85	38.7	37.85	0	N D
N1 hydrogel	ChsB(OH) ₂ /PVA weight ratio 0.3/0.7	7.31	7.13	49.48	48.5	4.71	5.02	37.88	37.67	0	N D
F0.5 hydrogel	ChsB(OH) ₂ /PVA weight ratio 0.15/0.85	7.92	7.85	51.15	51.82	3.15	3.12	37.36	38.03	0	N D
C2C12/N1 culture ^{d)}		-	10.00	-	19.60	-	3.44	-	66.00	-	0.25
3T3-L1/F0.5 culture ^{d)}		-	7.16	-	61.74	-	0.87	-	29.69	-	N D

[241] 상기 표 3에서 ^{b)}탈아세틸화 정도 80 몰% 기준, ^{a)}자외선-가시광도법에 의한 평균 붕산-N 치환 정도 21.2 몰% 기준, ^{d)}세포 분화 28일 이후 샘플이다. 3T3-L1/F0.5 배양은 지방세포가 장쇄 중성지방(long-chain-hydrocarbon triglycerides)을 축적함에 따라 탄소 함량이 증가하였으며, C2C12/N1 배양은 근육단백질에서 유래한 질소 및 산소 함량이 높았다. 계산 결과, 분화된 C2C12 및 3T3-L1의 원소 조성이 데이터베이스의 근육 및 지방세포와 밀접하게 일치하는 것으로 나타났다(표 4 참조). 이는 동적 결합이 가능한 자가치유 하이드로겔이 근육 및 지방의 정상적인 발달을 촉진할 수 있다는 것을 시사하였다. 붕소 함유량을 통한 고기 프로토타입의 안전 평가 결과, 28일간의 습식 배양물에는 <0.07 wt% 붕소가 함유되어 있었다(보론산 0.4 wt% 동등량에 해당). 이는 식품 첨가제로서의 보론산 최대 사용량 요구 사항을 충족하며, 이는 고기 제품의 잠재적인 안전한 소비를 예상하였다.

[242] 하기 표 4는 분화 후 28일 쯤 건조된 근육 및 지방 조직의 계산된 원소 조성을 나타낸다. 조성은 중량%이다.

[243] [표4]

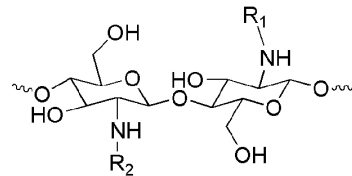
Tissue	Hydrogen (H)	Carbon (C)	Nitrogen (N)	Oxygen (O)	Phosphorus (P)	Sulfur (S)
--------	--------------	------------	--------------	------------	----------------	------------

	Db ^{a)}	Calc ^{b)}	Db	Calc	Db	Calc	Db	Calc	Db	Calc	Db	Calc
Muscle (C2C12)	10.15	10.63	13.13	13.24	3.25	3.1	72.4	72.24	0.2	0	0.33	0.3
Adipose (3T3-L1)	7.14	7.06	62.38	63.09	0.6	0.56	29.34	28.55	0.06	0	0.06	0

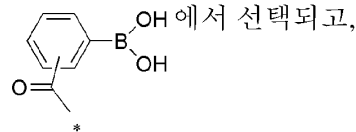
- [244] 상기 표 4에서, ^{a)}Db, 다양한 조직 유형의 원소 조성을 위해 IT'IS 재단 데이터베이스(<https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/elements/>)에서 element% 데이터를 획득하였으며, 이로부터 중량%를 계산하여 기재하였다. ^{b)} Calc, 건조 함량에서 조직의 중량 비율을 사용하여 계산한 값이다. 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.
- [245] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

청구범위

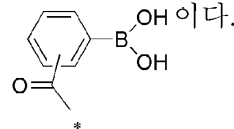
- [청구항 1] 자가치유 하이드로겔을 포함하는 배양육 제조용 세포 지지체로, 상기 자가치유 하이드로겔은 서로 동일하거나 또는 서로 상이한 적어도 2개 이상의 자가치유 하이드로겔의 단면이 자가치유 과정으로 가역적인 물리화학적 결합을 형성하여 서로 접합(assembly)이 가능한 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 배양육 제조용 세포 지지체는 근육세포가 배양되는 제1 자가치유 하이드로겔과 지방세포가 배양되는 제2 자가치유 하이드로겔을 포함하는 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 자가치유 하이드로겔은 세포가 배양 가능한 온도 및 pH 범위에서 선택되는 어느 하나 이상의 분위기에서 자가치유 과정으로 가역적인 물리화학적 결합을 형성하는 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 자가치유 하이드로겔은 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [화학식 1]



상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는



상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는



- [청구항 6] 제 5항에 있어서,

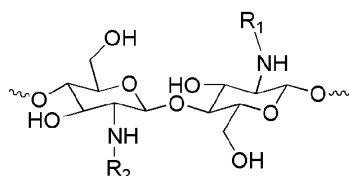
상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10 내지 50 %인 것인 배양육 제조용 세포 지지체.

[식 1]

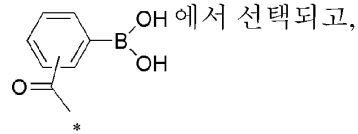
치환율 = (보론산 화합물이 치환된 아민몰수/키토산의 전체 아민 몰수) × 100

- [청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 자가치유 하이드로겔의 겔분율(Gel fraction)은 50 내지 90%인 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 세포지지체는 강도 보강제를 더 포함하는 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 세포지지체는 근원세포(Myoblast), 지방세포(Adipocyte), 섬유아세포(fibroblast), 근세포(Myocyte), 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성 세포(Satellite cell), 혈관내피세포 (endothelial cells) 또는 배아 줄기세포 (embryonic stem cell)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 세포를 배양가능한 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 10] 제 2항에 있어서,
상기 근육세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제1성분은 영률 (Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 지방세포가 배양(증식)되는 자가치유 하이드로겔 제2성분은 영률(Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa인 것인 배양육 제조용 세포 지지체.
- [청구항 11] 제 1항 내지 제 10항에서 선택되는 어느 한 항의 세포 지지체를 이용하여 배양된 배양육.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서,
상기 배양육은 실제육과 유사한 마블링을 형성한 것인 배양육.
- [청구항 13] 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체를 혼합한 후, pH를 조절하여 교차결합을 유도하는 단계;를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 이용한 세포 지지체의 제조방법.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 혼합 후, 동결 후 해동하는 단계를 더 포함하는 세포 지지체의 제조 방법.
- [청구항 15] 제 13항에 있어서,
상기 혼합 시, 강도 보강제를 더 첨가하는 것인 세포 지지체의 제조방법.

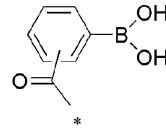
- [청구항 16] 보론산 화합물이 치환된 키토산 수지 전구체 및 하이드록시기를 포함하는 중합체의 혼합비율을 서로 달리한 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 각각 준비하는 단계;
상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시키는 단계;
를 포함하는 자가치유 하이드로겔을 포함하는 세포 지지체를 이용한 배양육의 제조방법.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서,
상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 준비하는 단계에서, 강도 보강재를 더 추가하는 것인 배양육의 제조방법.
- [청구항 18] 제 16항에 있어서,
상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔을 준비하는 단계에서, 동결 후 해동하는 단계를 더 포함하는 배양육의 제조방법.
- [청구항 19] 제 16항에 있어서,
상기 제1 자가치유 하이드로겔은 영률(Young's Modulus)이 200 내지 400 kPa이고, 상기 제2 자가치유 하이드로겔은 영률(Young's Modulus)이 50 내지 180 kPa인 것인 배양육의 제조방법.
- [청구항 20] 제 16항에 있어서,
상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화시킨 후, 이들을 적층 또는 서로 접하도록 배치함에 따라, 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되는 것인 배양육의 제조방법.
- [청구항 21] 제 16항에 있어서,
상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔이 적층 또는 서로 접하도록 배치되어 자가치유 과정으로 서로 접합(assembly)이 되도록 한 상태에서, 상기 제1 자가치유 하이드로겔 및 제2 자가치유 하이드로겔 중 어느 하나에 근육세포를 배양하고, 다른 하나에 지방세포를 배양 및 분화하는 것인 배양육의 제조방법.
- [청구항 22] 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 보론산 화합물이 결합된 키토산으로부터 유도된 단위(A)와, 하이드록시기를 포함하는 중합체로부터 유도된 단위(B)를 포함하는 생체적합성 자가치유 중합체.
- [화학식 1]



상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는



상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는



- [청구항 23] 제 22항에 있어서,
상기 자가치유 중합체는 pH 6.5 내지 12에서 서로 접합(assembly)이 가능한 것인 자가치유 중합체.
- [청구항 24] 제 22항에 있어서,
상기 보론산 화합물이 치환된 키토산으로부터 유도된 단위(A)는 하기 식 1에 따른 보론산 화합물의 치환율이 10 내지 50 %인 것인 자가치유 중합체.
- [식 1]
치환율 = (보론산 화합물이 치환된 아민몰수/키토산의 전체 아민 몰수) × 100
- [청구항 25] 제 22항에 있어서,
상기 자가치유 중합체는 강도 보강제를 더 포함하는 것인 중합체.
- [청구항 26] 제 22항에 있어서,
상기 자가치유 중합체는 영률(Young's Modulus)이 50 내지 400 kPa 범위인 자가치유 중합체.