

명세서

발명의 명칭: 세포 배양용 영양물질을 포함하는 젤라틴 마이크로입자, 이의 제조방법 및 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 세포 배양용 영양물질을 포함하는 젤라틴 마이크로입자, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 배양육은 가축의 도축없이 세포의 대량 배양을 통해 제조되는 인공육으로서 가축의 사육과 도축 과정 및 항생제 사용이 요구되는 실제 육과 달리 윤리적이고 친환경적인 공정으로 생산된다. 배양육의 제조 공정은 다음과 같은 과정을 거친다. 먼저, 가축에서 근육위성세포를 추출하고 이를 분리한 후에, 분리한 세포를 생물반응기(Bioreactor)내의 아미노산, 비타민, 당, 무기 염과 미네랄 및 다양한 성장인자를 포함하는 배양액에서 대량 증식시킨다. 제조된 세포는 특정 지지체에 옮겨지거나 세포 간의 자기조립을 통해 분화 배양액 내에서 근조직으로 분화된다.
- [3] 전세계의 많은 기업들이 배양육 사업에 도전하고 있음에도 불구하고 복잡한 생산공정과 높은 생산비용으로 인해 제품화 및 상용화가 어려운 실정이다. 가축으로부터 추출된 근육세포의 대량 증식 과정에 사용되는 배양액의 비용은 배양육 총 생산비의 70% 이상을 차지하므로 이를 절감시키기 위한 연구는 필수불가결한 요소이다. 종래에 세포 증식에 사용되는 배양은 세포 성장에 필수적인 다양한 성장인자, 사이토카인 및 단백질 등이 함유된 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함한다. 그러나, 동물 유래 성분을 사용한다는 점은 배양육 본래의 취지에 적합하지 않으므로 현재 FBS(Fetal Bovine Serum)를 대체하거나 절감시킬 수 있는 기술 개발이 요구되고 있다.
- [4] [선행기술문헌]
- [5] 미국 공개특허 제US 2012/0225483호
- [6] 대한민국 공개특허 제10-2019-0054425호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

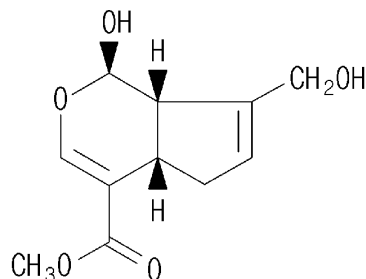
- [7] 본 발명자들은 배양육 제조를 위한 세포배양시 동물유래 혈청을 대체하거나 저감할 수 있는 영양물질 전달 플랫폼을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 가교된 젤라틴 마이크로입자를 제조하고, 제조된 젤라틴 마이크로입자의 기공에 세포배양용 영양물질을 함입시켜 이를 세포 배양액에 적용하면, 영양물질의 지속적이고 안정적인 방출을 통해 혈청 사용 보다 우수한 세포 증식 효과가 달성될 수 있음을 실험적으로 증명하여 본 출원을 완성하였다.
- [8] 따라서, 본 출원의 목적은 세포배양용 영양물질 전달을 위한 젤라틴 마이크로

- 입자를 제공하는 것에 있다.
- [9] 본 출원의 다른 목적은 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포배양용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [10] 본 출원의 다른 목적은 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 배양육의 제조 방법을 제공하는 것에 있다.
- [11] 본 출원의 다른 목적은 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공하는 것에 있다.
- [12] 본 출원의 다른 목적은 세포배양용 영양물질 전달을 위한 젤라틴 마이크로입자의 제조방법을 제공하는 것에 있다.
- [13] 본 출원의 다른 목적은 젤라틴 마이크로입자로부터 세포 배양용 영양물질의 방출을 조절하는 방법을 제공하는 것에 있다.

과제 해결 수단

- [14] 상기의 목적을 달성하기 위하여,
- [15] 본 출원의 일 측면은 가교된 젤라틴 마이크로 입자(gelatin microsphere) 및 상기 입자에 함입된 세포배양용 영양물질을 포함하는, 젤라틴 마이크로입자를 제공한다.
- [16] 본 출원의 다른 측면은 상기 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포배양용 조성물을 제공한다.
- [17] 본 출원의 다른 측면은 상기 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 배양육의 제조방법을 제공한다.
- [18] 본 출원의 다른 측면은 상기 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [19] 본 출원의 다른 측면은 상기 젤라틴 마이크로입자의 제조방법을 제공한다.
- [20] 본 출원의 다른 측면은 상기 젤라틴 마이크로입자의 가교도를 조절하여 젤라틴 마이크로입자로부터 세포 배양용 영양물질의 방출을 조절하는 방법을 제공한다.
- [21]
- [22] 이하, 본 출원을 구체적으로 설명한다.
- [23] 일 측면에 따르면, 본 출원은 젤라틴이 가교되어 형성되고, 세포배양용 영양물질이 함입된 젤라틴 마이크로입자(gelatin microsphere)를 제공한다.
- [24] 젤라틴 마이크로입자
- [25] 본 출원에서 젤라틴 마이크로입자는 에멀전화 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어 젤라틴이 용해된 용액을 오일 중에 분산시켜 제조하는 유중수형(water in oil) 에멀전화 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [26] 상기 에멀전화 방법으로 제조된 젤라틴 마이크로입자는 건조단계를 거칠 수

[31] [화학식1]



[38] 일 구현예에서, 가교는 가교제에 의해 수행되고, 젤라틴 마이크로입자의 표면은 젤라틴 마이크로입자의 내부에 비해 가교제가 더 높은 수준으로 존재함

- 수 있다. 젤라틴 마이크로입자의 표면에 존재하는 가교제는 영양물질의 담지량 및 방출속도에 영향을 미칠 수 있다.
- [39] 본 출원에서 에멀전화 방법 및 가교에 의해 제조된 젤라틴 마이크로입자의 크기는 1-200 μ m, 3-170 μ m, 5-150 μ m, 5-120 μ m, 5-110 μ m, 5-100 μ m, 5-90 μ m, 5-80 μ m, 5-70 μ m, 6-70 μ m, 7-70 μ m, 8-70 μ m, 또는 10-50 μ m일 수 있다.
- [40] 세포배양용 영양물질의 함입
- [41] 본 출원에서 가교제에 의해 가교된 젤라틴 마이크로입자는 세포배양용 영양물질이 용해된 용액에 첨가하여 영양물질을 마이크로입자에 함입시킬 수 있다.
- [42] 젤라틴 마이크로입자에 함입되는 세포배양용 영양물질은 영양물질 중에서 젤라틴과 정전기적인력, 이온결합 또는 수소결합을 통해 복합체를 형성할 수 있는 물질이면 제한 없이 사용될 수 있다.
- [43] 젤라틴 마이크로입자에 함입될 수 있는 세포배양용 영양물질은 1kDa - 50 kDa, 3kDa - 47 kDa, 5kDa - 45 kDa, 7kDa - 43 kDa, 10kDa - 40 kDa, 13kDa - 37 kDa, 15kDa - 35 kDa, 17kDa - 33 kDa, 또는 20kDa - 30 kDa의 분자량을 갖는 고분자량의 물질일 수 있다.
- [44] 또한, 젤라틴 마이크로입자에 함입될 수 있는 세포 배양용 영양물질은 1kDa이하의 저분자량의 물질일 수 있다. 구체적으로 0.01 kDa - 1kDa, 0.03 kDa - 1kDa, 0.05 kDa - 1kDa, 0.07 kDa - 1kDa, 0.07 kDa - 0.95kDa , 0.10 kDa - 0.9kDa , 0.15 kDa - 0.90kDa , 0.2 kDa - 0.85kDa , 0.25 kDa - 0.8kDa , 또는 0.3 kDa - 0.75kDa의 분자량을 갖는 저분자량의 물질일 수 있다.
- [45] 젤라틴 마이크로입자에 함입될 수 있는 세포배양용 영양물질은 세포 배양에 필요한 호르몬, 성장인자, 아미노산 또는 비타민을 포함할 수 있다. 예를 들어 C-피코시아닌(C-phycoyanin); 알부민; IGF-1, BMP-2, FGF-1 및 VEGF으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [46] 상술한 본 출원의 젤라틴 마이크로입자는 세포 배양용으로 사용될 수 있다.
- [47] 일 구현예에서, 상기 세포는 동물 유래 근육 세포일 수 있다.
- [48] 다른 측면에 따르면, 본 출원은 (i) 젤라틴이 가교되어 형성되고, 세포배양용 영양물질이 함입된, 젤라틴 마이크로입자; 및 (ii) 혈청 성분을 포함하는 세포배양용 조성물을 제공한다.
- [49] 본 출원의 상기 세포배양용 조성물에서 상기 가교는 제니핀(genipin)에 의해 가교된 것일 수 있다.
- [50] 본 출원의 상기 세포배양용 조성물에서 세포배양용 영양물질은 C-피코시아닌(C-phycoyanin), 알부민; IGF-1, BMP-2, FGF-1, 및 VEGF으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산일 수 있다.
- [51] 본 출원의 상기 세포배양용 조성물에서 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 10-60%일 수 있다.

- [52] 본 출원의 상기 세포배양용 조성물에서, 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 90% 에탄올 용매, 0.5 w/v% 농도의 제니핀 및 50 mg/mL 농도의 건조한 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 가교 반응액을 반응시간 2 - 60시간, 3 - 58시간, 4 - 56시간, 5 - 54시간, 5 - 52시간, 5 - 50시간, 5 - 49시간, 5 - 48시간, 또는 6 - 48시간 일 수 있으며, 보다 구체적으로는 6 - 16 시간, 4 - 8 시간, 5 - 7 시간, 10 - 14시간, 11 - 13시간, 14 - 18시간, 15 - 17시간, 22 - 26시간, 23 - 25시간, 46 - 40시간, 또는 47 - 49시간 반응시켰을 때 얻어지는 가교도일 수 있다.
- [53] 본 출원에서 세포배양용 조성물은 상기한 세포배양용 영양물질이 포함된 젤라틴 마이크로입자 외에 세포배양용 배지에 포함될 수 있는 다른 성분들을 더 포함할 수 있다. 상기 추가 성분은 예를 들어, 탄소원(e.g., 포도당), 무기염류, 아미노산, 비타민, 지질, 혈청, 혈청 유래 성분 또는 이들 중 하나 이상의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [54] 본 출원의 세포배양용 조성물은 혈청 성분이 감소된 함량으로 포함된 것일 수 있다.
- [55] 일 구현예에서, 상기 혈청 성분의 함유량은 세포 배양용 조성물의 10중량% 미만, 보다 구체적으로 9중량% 미만, 8 중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 또는 4 중량% 미만일 수 있다.
- [56] 상기 혈청 성분의 함유량의 하한은 세포 배양용 배지에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다.
- [57] 일 구현예에서 상기 혈청 성분은 소태아혈청일 수 있고, 상기 소태아혈청의 함유량은 세포 배양용 조성물의 10중량% 미만, 보다 구체적으로 9중량% 미만, 8중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 4중량% 미만일 수 있으며, 상기 소태아혈청의 함유량의 하한은 세포 배양용 조성물에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다.
- [58] 본 출원의 조성물이, 통상적인 세포 배양 배지에 포함되는 혈청 성분(예를 들어 소태아혈청)의 함량인 10중량% 보다 더 낮은 함량의 혈청 성분을 포함하더라도, 본 출원의 상술한 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 경우 세포 증식, 보다 구체적으로 근육 세포 증식에 있어서 동등하거나 더 높은 수준의 증식이 가능하다.
- [59] 본 출원의 세포배양용 조성물은 무혈청 배지를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Eagle's MEM(Minimal Essential Medium), RPMI 1640, Ham's F 12, 또는 SF 12 무혈청 배지를 포함하거나, 또는 이들 배지의 성분 중 일부를 더 포함할 수 있다.
- [60] 본 출원의 세포배양용 조성물에서 상기 세포는 배양육 제조를 위한 세포일 수 있다.
- [61] 본 출원의 세포배양용 조성물에서 상기 배양육 제조를 위한 세포는 동물유래 근육세포일 수 있으며, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙

- 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [62] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 젤라틴이 가교되어 형성되고, 세포배양용 영양물질이 함유된, 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 배양육 제조 방법을 제공한다.
- [63] 본 출원의 배양육 제조방법에서, 상기 가교는 제니핀(genipin)에 의해 가교된 것일 수 있다.
- [64] 본 출원의 배양육 제조방법에서 상기 세포배양용 영양물질은 C-피코시아닌(C-phycoyanin), 알부민; IGF-1, BMP-2, FGF-1, 및 VEGF으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산일 수 있다.
- [65] 본 출원의 배양육 제조방법에서 상기 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 10-60%일 수 있다.
- [66] 본 출원의 배양육 제조방법에서, 상기 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 90% 에탄올 용매, 0.5 w/v% 농도의 제니핀 및 50 mg/mL 농도의 건조한 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 가교 반응액을 반응시간 2 - 60시간, 3 - 58시간, 4 - 56시간, 5 - 54시간, 5 - 52시간, 5 - 50시간, 5 - 49시간, 5 - 48시간, 또는 6 - 48시간 일 수 있으며, 보다 구체적으로는 6 - 16 시간, 4 - 8 시간, 5 - 7 시간, 10 - 14시간, 11 - 13시간, 14 - 18시간, 15 - 17시간, 22 - 26시간, 23 - 25시간, 46 - 40시간, 또는 47 - 49시간 반응시켰을 때 얻어지는 가교도일 수 있다.
- [67] 본 출원의 배양육 제조방법에서, 상기 세포는 동물유래 근육 세포일 수 있고, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [68] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 젤라틴이 가교되어 형성되고, 세포배양용 영양물질이 함유된, 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [69] 본 출원의 혈청 성분을 감소시키는 방법에서, 상기 가교는 제니핀(genipin)에 의해 가교된 것일 수 있다.
- [70] 본 출원의 혈청 성분을 감소시키는 방법에서, 상기 세포배양용 영양물질은 C-피코시아닌(C-phycoyanin), 알부민; IGF-1, BMP-2, FGF-1, 및 VEGF으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산일 수 있다.
- [71] 본 출원의 혈청 성분을 감소시키는 방법에서, 상기 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 10-60%일 수 있다.
- [72] 본 출원의 혈청 성분을 감소시키는 방법에서, 상기 젤라틴 마이크로입자의 가교도는 90% 에탄올 용매, 0.5 w/v% 농도의 제니핀 및 50 mg/mL 농도의 건조한 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 가교 반응액을 반응시간 2 - 60시간, 3 - 58시간, 4 - 56시간, 5 - 54시간, 5 - 52시간, 5 - 50시간, 5 - 49시간, 5 - 48시간, 또는 6 - 48시간 일 수 있으며, 보다 구체적으로는 6 - 16 시간, 4 - 8 시간, 5 - 7 시간, 10 -

14시간, 11 - 13시간, 14 - 18시간, 15 - 17시간, 22 - 26시간, 23 - 25시간, 46 - 40시간, 또는 47 - 49시간 반응시켰을 때 얻어지는 가교도일 수 있다.

[73] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 다음의 단계를 포함하는 세포배양용 젤라틴 마이크로입자의 제조방법을 제공한다: (a) 젤라틴 마이크로입자를 에멀전화 방법으로 제조하는 단계; (b) 제조된 젤라틴 마이크로입자를 가교제 존재하에 반응시켜 가교시키는 단계; 및 (d) 가교된 젤라틴 마이크로입자에 세포배양용 영양물질을 함유시키는 단계.

[74] 본 출원의 세포배양용 젤라틴 마이크로입자의 제조방법에서 상기 가교제는 제니핀(genipin)일 수 있다.

[75] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 (a) 젤라틴 마이크로입자를 에멀전화 방법으로 제조하는 단계; (b) 제조된 젤라틴 마이크로입자를 가교제 존재하에 반응시켜 가교시키는 단계; 및 (c) 가교된 젤라틴 마이크로입자에 세포배양용 영양물질을 함유시키는 단계;를 포함하며, 상기 (b) 단계에서 가교도를 조절하여 젤라틴 마이크로입자로부터 세포 배양용 영양 물질의 방출을 조절하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 영양물질의 방출 조절 방법을 제공한다.

[76] 상술한 본 출원의 다른 측면들인 세포 배양용 조성물, 배양용 제조 방법, 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법, 젤라틴 마이크로입자의 제조방법, 및 세포 배양용 영양물질의 방출 조절 방법 등에서, 젤라틴 마이크로입자에 관한 내용은 본 출원의 일 측면인 젤라틴 마이크로입자에서 설명된 바와 동일하므로, 중복하여 설명되지 않는다.

발명의 효과

[77] 본 출원의 젤라틴 마이크로입자에 의하면 세포 배양시 필요한 영양물질을 안정적으로 전달할 수 있다.

[78] 본 출원의 젤라틴 마이크로입자에 의하면 동물유래 혈청을 대체할 수 있는 영양물질을 사용할 수 있으므로 혈청 사용으로 인한 윤리성, 고비용 및 질병 유발의 문제점을 해결할 수 있다.

[79] 본 출원의 젤라틴 마이크로입자의 가교도를 용이하게 조절할 수 있어, 영양물질의 함유량, 방출량 및 방출속도의 제어가 가능하다.

[80] 본 출원은 생물로부터 유래하고, 식용 가능하며, 안전성이 확보된 젤라틴과 가교제를 사용하므로 인공 배양용 제조에 적합하다.

[81] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[82] 도 1은 가교정도에 따른 젤라틴 마이크로입자(GMS, Gelatin Microsphere)의 형태 및 크기를 보여주는 광학 현미경 이미지이다.

[83] 도 2a는 젤라틴 입자가 제니핀(Genipin)에 의해 가교되는 메커니즘을 보여주고,

도 2b는 제니핀에 의한 가교에 따라, 헤테로시클릭아민(Heterocyclic amine)의 형성과 방향족 아마이드(Aromatic amide)의 형성으로 인한 Raman 분광 스펙트럼의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 2c는 가교시간에 따른 GMS의 형태 변화를 관찰한 주사전자현미경(SEM) 이미지이다.

- [84] 도 3은 12시간과 24시간 동안 가교된 GMS 샘플의 분해 속도를 측정한 결과이다.
- [85] 도 4a은 6시간, 16시간, 24시간, 48시간 가교를 진행한 GMS 샘플내 C-PC의 총축적 방출량을 분석한 그래프(오른쪽 그래프)과, C-PC의 방출 거동을 분석한 그래프(왼쪽 그래프)이다.
- [86] 도 4b는 12시간 가교된 GMS (12h_GMS)내 IGF-1의 방출 거동을 분석한 그래프이다.
- [87] 도 4c는 Bare, 6시간, 16시간, 24시간, 48시간 가교를 진행한 GMS 샘플내 함유된 IGF-1의 방출량을 분석한 그래프이다.
- [88] 도 5는 영양물질 함유된 젤라틴 마이크로입자를 세포배양에 적용하여 세포증식 효과를 평가하는 실험 모식도이다.
- [89] 도 6는 C-PC 함유 GMS에 의한 C2C12 세포의 증식 평가 결과이다.
- [90] 도 7은 IGF-1 함유 GMS에 의한 C2C12 세포의 증식 평가 결과이다.
- [91] 도 8은 히알루론산(HA) 또는 FITC가 함유된 GMS로부터 방출되는 HA 및 FITC의 방출 거동을 분석한 결과 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [92] 이하, 본 출원을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 출원의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [93] 실시예
- [94] 실시예 1: 젤라틴 마이크로입자(GMS) 및 영양물질 함유 복합체의 제조
- [95] 젤라틴 마이크로입자는 Water/Oil 에멀전 방법으로 제조하였다. 먼저, 45°C로 예열된 11.1 중량% 젤라틴(Gelatin, Sigma-Aldrich) 용액을 올리브 오일 (Sigma-aldrich)에 한방울씩 떨어뜨리는 방식으로 가하고, 500 rpm에서 10분 동안 교반하였다. 지속적으로 교반한 후, 4°C로 천천히 냉각하여 겔화시키고, 30분 후에, 냉각된 아세톤 100ml을 첨가하여 혼합 및 교반하였다. 1시간 후, 냉각된 아세톤 100ml을 추가로 혼합하여 1000rpm에서 5분 동안 교반하였다. 생성된 마이크로입자를 여과하여 수집하고, 아세톤으로 세척하여 잔류 오일을 제거한 후 자연 건조시켰다. 90% 에탄올(Sigma-Aldrich)을 용매로 하여 0.5w/v% 농도의 제니핀(genipin, Sigma-Aldrich) 가교용액을 제조하고, 건조한 마이크로입자(50 mg/mL)를 넣어 가교하였다. 가교 시간을 6시간, 12시간, 16시간, 24시간, 또는 48시간으로 다르게 설정하여 가교 정도를 조절하였다. 가교된 젤라틴 마이크로입자(GMS)를 에탄올로 세 차례 세척한 후, 80°C 오븐에서 3시간 동안

건조하였다. 건조한 GMS를 10 mg/mL 농도로 IGF-1 용액(0.5 µg/mL) 또는 C-PC(C-phycoerythrin) 용액(2 mg/mL)에 넣어 12시간 동안 반응시켜 영양물질의 흡입을 수행하였다.

[96]

[97] 실시예 2: 젤라틴 마이크로입자의 영양물질 전달 효능 평가 실험

[98] 영양물질이 흡입된 젤라틴 마이크로입자를 세포 배양 환경에 적용하여 영양물질 전달 효능을 평가하였다. C2C12 근아세포(myoblast)(Passage 6)를 24웰-플레이트의 각 웰에 3.5×10^3 세포씩 접종하였다. 세포 배양에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® Life Technologies)에 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제(Gibco® Life Technologies)와 10% 또는 5% FBS (WELGENE)가 포함된 배양액을 사용하였다. C-PC가 흡입된 GMS에 대한 세포 증식 향상 실험에서, 대조군 1은 10% FBS가 포함된 배양액을, 대조군 2는 5% FBS가 포함된 배양액을 사용하였고, 실험군 1은 C-PC가 흡입된 6시간 가교 GMS (GMS_6)가 포함된 배양액을, 실험군 2는 C-PC가 흡입된 16시간 가교 GMS (GMS_16)가 포함된 배양액을, 실험군 3은 C-PC가 흡입된 24시간 가교 GMS (GMS_24)가 포함된 배양액을, 실험군 4는 C-PC가 흡입된 48시간 가교 GMS (GMS_48)가 포함된 배양액을 사용하였다. IGF-1이 흡입된 GMS에 대한 세포 증식 향상 실험도 C-PC 흡입된 GMS의 실험방식과 동일한 방식으로 대조군과 실험군을 설정하여 수행하였다.

[99]

[100] 실시예 3: 젤라틴 마이크로입자의 특성 분석 방법

[101] GMS의 특성 분석은 다음과 같이 수행하였다. SEM을 이용하여 GMS의 거칠기 및 다공성의 미세한 형태를 관찰하였다. 광학 현미경(OM)을 사용하여 가교에 따른 GMS의 색, 형태 및 팽창비(swelling ratio)를 관찰하였다. Photoluminescence spectroscopy (PL) 및 Micro reader를 사용하여 GMS에서 방출되는 C-PC를 탐지하여 시간에 따른 방출량을 정량하고 방출 거동을 분석하였다. ELISA를 사용하여 GMS에서 방출되는 성장인자(IGF-1)를 정량화하였다.

[102]

[103] 실시예 4: 가교정도에 따른 젤라틴 마이크로입자의 형태, 크기 및 분해속도 분석

[104] 제조된 GMS의 크기는 10-50 µm로 관찰되었으며, 가교 시간이 증가할수록 GMS의 블루 컬러(blue color)가 진해지며 GMS간의 응집이 관찰되었다(도 1). 라만 스펙트럼을 데이터를 통해 가교가 진행됨에 따라 히테로시클릭 아민(heterocyclic amine)과 방향족 아마이드(aromatic amide)의 형성에 의해 1550cm^{-1} 부근에서 새로운 피크가 형성되고, 1680cm^{-1} 부근의 amide² 피크의 shift가 발생하는 것을 확인하여 가교가 성공적으로 진행되었음을 검증하였다(도 2a 및 도 2b). 또한, 가교 시간에 따른 GMS의 형태의 변화를 관찰하였다(도 2c).

[105] 세포 배양 환경내에서 12일 동안 GMS의 무게 감소율을 측정하여 각 GMS의

분해 속도를 평가하였다. 12시간 동안 가교된 **GMS** (**12h_GMS**)는 48시간 이내에 무게가 크게 감소하였으며, 최종 12일 동안 90% 이상이 분해되었다. 배양육 제조를 위한 세포의 대량 증식에 7일이 필요하고, 세포의 분화에 5일이 소요되어 총 12일의 세포 배양 기간이 필요함을 고려할 때, **12h_GMS**의 분해 정도는 배양육 제조에 적합하였다. 24시간 동안 가교된 **GMS**(**24h_GMS**)는 96시간 이내에 무게가 크게 감소하였으며, 최종 12일 동안 대략 50%가 분해되었다. 세포 증식 및 분화 기간의 총 12일 동안 **GMS**는 절반 정도 분해되며, 이는 12일 이후에도 **GMS**에 영양물질이 남아 있을 것임을 나타낸다(도 3).

[106] 상기 실험결과에 의해 가교 정도에 따라 **GMS**의 분해 속도를 조절할 수 있음을 증명하였고, 이에 따라 함입된 영양물질의 방출량 및 방출속도도 조절할 수 있음을 증명하였다. **GMS**의 분해 속도는 영양물질의 방출과 밀접하게 연관되므로, 가교도가 증가할수록 분해 속도는 감소하고, 영양물질의 방출이 더 느리고 지속적으로 발생할 것으로 예상된다.

[107]

[108] 실시예 5: 가교정도에 따른 젤라틴 마이크로입자(**GMS**)내 영양물질의 함입 및 방출 분석

[109] 1) 가교정도에 따른 **GMS**내 **C-PC**의 담지 효율 분석

[110] **GMS**의 가교정도에 따른 **C-PC**의 담지량을 분석하였다. 하기 [표 1]에 나타난 실험 결과에 의하면, **C-PC** 담지량(**loading amount**) 및 효율은 **6h > Bare > 24h ≥ 16h > 48h**의 순서이었다. 가교 정도 증가에 따라 **GMS**의 밀도(**density**)가 증가하여 팽창비(**swelling ratio**)가 감소하고, 이로 인해 **C-PC** 담지 공간이 감소하였다. 담지(**loading**) 효율 측정 결과에서, **Bare**와 **6h** 샘플은 30% 이상, 나머지는 17-20%인 것으로 보아, **6h-16h** 사이에 **GMS** 내부 구조의 가교가 급격히 발생한 것을 알 수 있었다. **6h**과 **16h**은 오직 10시간 차이임에도 불구하고 담지 효율의 차이가 16%이었으나, **16h**와 **48h** 샘플은 32시간 차이임에도 불구하고 담지 효율의 차이가 3.3%로 큰 차이가 없었다. 이것은 제니핀(**genipin**) 분자가 **GMS** 외곽층에 축적되어 바깥 부분에 **C-PC**가 결합한 결과로 추정된다. **Bare**보다 **6h** **GMS**에서 담지 효율이 높았다. 가교 정도가 낮은 경우 **GMS**의 점탄성이 증가하여 **C-PC**의 담지가 용이해지며, **C-PC**가 담지되는 과정에서 **GMS**의 분해를 최소화하였다.

[111] [표1]

	Bare_GMS	6h_GMS	16h_GMS	24h_GMS	48h_GMS
Remaining volume(mL)	0.34	0.34	0.42	0.41	0.42
Remaining conc(mg/mL)	1.577±0.083	1.462±0.002	1.608±0.035	1.624±0.009	1.663±0.022
Remaining amount(μg)	736.04±28.28	697.18±0.87	875.25±14.84	865.87±3.80	811.62±9.59
Loading amount (μg)	363.96	402.82	224.75	234.13	188.38
Loading efficiency(%)	33.09±2.57	36.62±0.08	20.43±1.35	21.28±0.35	17.13±0.87

[112] 2) **GMS**내 **C-PC**의 방출 거동 분석

[113] 가교를 6시간, 16시간, 24시간, 48시간 동안 진행한 **GMS** 샘플을 4mg씩 준비하고 영양물질로서 **C-PC**를 함입시킨 후, 7일 동안의 방출 거동을 분석하였다. 가교에 의해 **GMS**의 내부는 더 조밀한 미세구조를 가지며 이는 30kDa의 **C-PC** 함입 및 방출량에 영향을 미칠 것으로 예상되었다. **GMS**로부터 **C-PC** 방출의 제1단계는 농도 구배에 따른 초기 확산(diffusion)에 의해, 많은 양의 물질이 빠르게 방출되는 단계이다. 방출의 제2단계는 **GMS**의 분해에 의해 함입되어있던 물질이 조금씩 지속적으로 방출되는 단계이다.

[114] 실험결과, 방출량(release amount, μg)은 Bare > 16h ≥ 6h > 24h > 48h의 순서이었다. Bare **GMS**는 24h을 기준으로 **C-PC**의 확산 및 **GMS**의 분해가 모두 발생하여 포화되었다. 6h_**GMS**는 약간의 가교에 의해 감소된 내부 확산 공간 때문에 Bare에 비해 **C-PC** 방출 속도가 느렸으나, 48h 이후 95%가 방출되었고, 96h 에서는 거의 포화되었다. 16h-48h **GMS**의 경우 샘플간 담지량은 크게 차이가 나지 않았고, 방출 거동(release behavior) 또한 거의 유사하였으나, 방출량은 뚜렷한 차이를 보였으며 48h < 24h < 16h 순으로 높았다. 가교시간이 24시간 보다 큰 경우 부터는 **GMS**의 내부구조(inner structure)의 가교 뿐만 아니라 제니핀(genipin)이 외곽층에 축적되기 시작하여, **GMS** 표면과 **C-PC**간의 상호작용, 또는 **C-PC**와 **C-PC**간의 상호작용을 강화시킴으로써 방출 속도가 지연되었다(도 4a).

[115] 3) **GMS**내 **IGF-1**의 방출 거동 분석

[116] **IGF-1** 방출량 및 방출속도는 ELISA 정량 분석을 통해 평가하였다. 초기 24 시간 동안에는 **GMS** 내/외의 농도 구배에 의한 확산 현상에 기인하여 빠른 방출이 발생하였으며, 24시간 이후에는 **GMS**의 느린 분해에 의해 **IGF-1**이 서서히 방출되었다. 72시간 후에도 **IGF-1**의 방출은 지속되었으며, 최대 방출량은

256 ng/mL로 C2C12 세포의 증식 향상에 대한 유효농도를 충족하였다(도 4b).
가교 정도에 따른 IGF-1의 방출량(ng/mL)은 Bare < 6h < 24h < 48h $\approx$ 168h의
순서이었다(도 4c).

[117]

[118] 실시예 7: 영양물질 함입된 젤라틴 마이크로입자의 세포 증식에 미치는 효능
평가

[119] 영양물질 함입된 젤라틴 마이크로입자를 세포 배양에 적용하여 세포증식
효과를 평가하였다(도 5).

[120] 세포 배양 배지에는 일반적으로 FBS(Fetal Bovine Serum)가 10%의 농도로
첨가된다. 본 실시예에서는 영양물질의 전달로 인한 FBS 절감 효과를 평가하기
위해, 종래의 배지(FBS 10%), FBS가 절감된 배지(FBS 5%), 및 FBS 5% 배지에
가교도를 달리하여 제조한 C-PC가 함입된 GMS를 첨가한 배지를 각각 준비하여
세포 증식 평가를 행하였다. 실험 결과, 16시간 가교된 GMS (GMS_16)에서
C-PC가 방출되었을 때 가장 효과가 뚜렷하였으며, FBS 양이 절감된 배지를
사용하였음에도 불구하고 종래 배지(FBS 10%)에서 보다 1.6배만큼 세포의 수가
증가하였다. 또한, GMS_16 이외에도 GMS가 첨가된 모든 그룹에서의 세포의 수
및 밀도가 FBS 절감 배지(FBS 5%) 보다 더 높게 나타났다(도 6).

[121] C-PC 함입 GMS 샘플의 C2C12 세포에 대한 증식 평가 방법과 같은 방식으로
종래 배지(FBS 10%), FBS 절감 배지 (FBS 5%), 및 FBS 5% 배지에 가교 정도를
달리하여 제조한 IGF-1 함입 GMS를 첨가한 배지를 각각 준비하여 세포 증식
평가를 행하였다. 실험 결과, GMS를 첨가한 그룹에서의 세포 밀도, 세포 수 및
증식 속도가 FBS 5%에 비해 뚜렷하게 향상되었으며, 특히 6h_GMS와 24h_GMS,
48h_GMS 그룹은 FBS 10% 그룹보다 1.4 배 더 많은 세포 수가 측정되었다(도 7).

[122] 상기 실험결과를 통해 영양물질 함입된 GMS를 사용하면 FBS 사용량을 절감할
수 있다는 것을 확인하였다.

[123]

[124] 실시예 8: 고분자 또는 저분자 함입된 젤라틴 마이크로입자의 방출 거동 분석

[125] GMS는 팽창(swelling) 특성과 하전된 아미노산 사슬에 의해 다양한 물질의
함입이 가능하다. 실제 배양육 제조 과정에서 C-PC, IGF-1 이외의 저분자
물질이나 다양한 종류의 성장인자가 사용될 수 있다. GMS에 함입하는 물질로서
IGF-1 및 C-PC 이외에 고분자물질로서 히알루론산(HA)과 저분자 물질로서 FITC
(Fluorescein isothiocyanate)를 모델 물질로 선정하였다. HA 또는 FITC 함입된
GMS 샘플에 대해 C2C12 세포 배양용 배지에서 72시간 동안 함입된 모델
물질들에 대한 방출 거동을 분석하였다.

[126] HA는 로다민 B 염료가 컨쥬게이션된 HA와 1:9의 비율로 혼합하여
사용하였고, Photoluminescence (PL) 측정을 통해 방출 거동을 분석하였다. HA는
중성 용액 조건에서 비교적 높은 음전하 밀도를 가지므로, 양전하를 띤 GMS와
강한 정전기적 인력이 작용할 수 있다. 이로 인해, GMS/HA 상호작용 > 확산

속도(diffusion rate)을 나타내어, 확산에 영향을 받는 부분이 감소되어 GMS 분해에 따라 HA가 서서히 방출되었다. FITC는 IGF-1, C-PC 및 HA와 달리 저분자 물질 모델이며, PL 형광 분석을 통해 방출 거동을 분석하였다. FITC의 경우, GMS에 비해 분자량이 매우 작기 때문에 GMS와의 상호작용 보다는 확산력(diffusion force)에 의존하여 빠른 방출이 발생되었다(도 8).

- [127] 이상과 같은 결과를 통해 배양육 제조에 요구되는 여러 작용기 또는 분자량을 가진 영양 물질들이 식용 가능한 GMS 내에 함입되어 효율적으로 방출될 수 있음을 증명하였다.
- [128] 상기에서는 본 출원의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 젤라틴이 가교되어 형성되고, 세포배양용 영양물질이 함유된, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
젤라틴 마이크로입자의 표면은 젤라틴 마이크로입자의 내부에 비해 가교도가 더 높은 수준으로 존재하는 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 가교는 제니핀(genipin)에 의해 가교된 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 세포배양용 영양물질은 C-피코시아닌(C-phycoyanin); 알부민; IGF-1, BMP-2, FGF-1, 및 VEGF으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산인 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
젤라틴 마이크로입자의 가교도는 10-60%인 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
젤라틴 마이크로입자의 가교도는 90% 에탄올 용매, 0.5 w/v% 농도의 제니핀 및 50 mg/mL 농도의 건조한 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 가교 반응액을 반응시간 2 - 60 시간에서 반응시켜 얻어지는 가교도인 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
세포 배양용으로 사용되는 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서,
상기 세포는 동물 유래 근육세포인 것인, 젤라틴 마이크로입자.
- [청구항 9] (i) 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 젤라틴 마이크로입자; 및 (ii) 혈청 성분을 포함하는 세포 배양용 조성물.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 혈청 성분은 세포 배양용 조성물에서 10중량% 미만의 함량으로 포함되는 것인, 세포 배양용 조성물.
- [청구항 11] 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 배양육 제조 방법.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 세포는 동물유래 근육 세포인 것인, 배양육 제조 방법.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 젤라틴 마이크로입자를 포함하는 세포 배양액에서 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법.
- [청구항 14] 다음의 단계를 포함하는 세포배양용 젤라틴 마이크로입자의 제조방법:
(a) 젤라틴 마이크로입자를 에멀전화 방법으로 제조하는 단계;

- (b) 제조된 젤라틴 마이크로입자를 가교제 존재하에 반응시켜
가교시키는 단계; 및
- (c) 가교된 젤라틴 마이크로입자에 세포배양용 영양물질을 함입시키는
단계.

[청구항 15] 청구항 14에 있어서,
상기 가교제는 제니핀인 것인, 세포배양용 젤라틴 마이크로입자의
제조방법.

[청구항 16] (a) 젤라틴 마이크로입자를 에멀전화 방법으로 제조하는 단계;
(b) 제조된 젤라틴 마이크로입자를 가교제 존재하에 반응시켜
가교시키는 단계; 및
(c) 가교된 젤라틴 마이크로입자에 세포배양용 영양물질을 함입시키는
단계;를 포함하며,
상기 (b) 단계에서 가교도를 조절하여 젤라틴 마이크로입자로부터 세포
배양용 영양 물질의 방출을 조절하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양용
영양물질의 방출 조절 방법.