



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월01일
(11) 등록번호 10-0871303
(24) 등록일자 2008년11월25일

(51) Int. Cl.

C12M 1/26 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12N 1/02 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2007-7007144
- (22) 출원일자 2007년03월29일
심사청구일자 2007년03월29일
번역문제출일자 2007년03월29일
- (65) 공개번호 10-2007-0060098
- (43) 공개일자 2007년06월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2005/016633
국제출원일자 2005년09월09일
- (87) 국제공개번호 WO 2006/038427
국제공개일자 2006년04월13일
- (30) 우선권주장 JP-P-2004-00286163 2004년09월30일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌 WO 03011353A1

(73) 특허권자

도쿠리쓰교세이호징 가가쿠 기주쓰 신코 기코
일본 사이타마켄 가와구치시 혼쇼 4쵸메 1반 8고
가부시키가이샤 재팬 티슈 엔지니어링
일본 아이찌켄 가마고리시 미야끼따도리 6쵸메
209반짜 1
고쿠리츠다이가쿠호진 호쿠리쿠 센단 가가쿠 기주
츠 다이가쿠인 다이가쿠
일본 이시카와켄 노미시 아사히다이 1-1

(72) 발명자

타차본야카트 완겐
일본 이시카와켄 노미시 미야타케마치 요77-1 캄
파뉴 312고
가토 마사카즈
일본 아이치켄 가마고리시 미야키타도리 6쵸메
209반치노 1가부시키가이샤 재팬 티슈 엔지니어링
나이
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 6 항

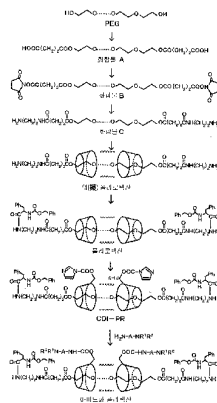
심사관 : 정재철

(54) 세포 박리제 및 세포 시트 박리 방법

(57) 요약

본 발명의 세포 시트 박리제는, 아미노화 폴리로텍산을 함유하는 것이다. 여기서, 본 발명의 세포 박리제의 골격을 이루는 폴리로텍산은, 선형 분자에 고리형 분자를 복수 관통한 상태에서 선형 분자의 양단에 고리형 분자가 빠지지 않도록 한 부피가 큰 캡을 결합시킨 구조를 가지고 있다. 또, 본 발명의 세포 박리제에 포함되는 아미노화 폴리로텍산은, 폴리로텍산에 함유되는 시클로덱스트린 골격 중 적어도 일부의 수산기가 아미노기를 가지는 치환기로 치환된 화합물이다. 이 세포 시트 박리제에 의하면, 세포에 데미지를 주지 않고, 또, 온도 조절없이 용기 표면에 접착된 배양 세포를 박리할 수 있다.

도 1



(72) 발명자

오오야 도오루

일본 이시카와켄 하쿠산시 아카라지마마치 타108-1

유이 노부히코

일본 이시카와켄 노미시 마츠가오카 4-103

특허청구의 범위

청구항 1

아미노화 폴리로텍산으로 이루어진, 용기 표면에 접착된 세포 시트를 박리하는 데에 사용되는 세포 박리제로서, 상기 아미노화 폴리로텍산은, 폴리로텍산에 포함되는 시클로텍스트린 골격 중의 일부 또는 전부의 수산기가 아미노기를 가지는 치환기로 치환된 화합물이고, 상기 아미노기를 가지는 치환기는 $-OOCNH-A-NR^1R^2$ (A 는 직쇄형 또는 분지형 탄화수소사슬, R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이하며, 수소 또는 직쇄형 또는 분지형 탄화수소기) 인 세포 박리제.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 폴리로텍산은, 선형 분자에 고리형 분자를 복수 관통한 상태에서 선형 분자의 양단에 가수 분해성 결합을 통하여 부피가 큰 치환기를 가지는 생체 친화성기가 도입된 화합물인 세포 박리제.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

A 는 탄소수 2 ~ 4 의 직쇄형 또는 분지형 탄화수소사슬인 세포 박리제.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항에 있어서,

R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이한 수소 또는 탄소수 1 ~ 5 의 직쇄형 또는 분지형 탄화수소기인 세포 박리제.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

용기 표면에 세포를 접착시켜 배양하여 세포 시트로 하는 배양 공정과,

상기 배양 공정 후, 제 1 항, 제 3 항, 제 6 항 또는 제 8 항 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트 박리제를 첨가한 배지로 교환하여 상기 용기 표면으로부터 상기 세포 시트를 박리시키는 박리 공정을 포함하는 세포 시트 박리 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 박리 공정 후, 상기 박리된 세포 시트를 회수하는 회수 공정을 포함하는 세포 시트 박리 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은, 세포 박리제 및 세포 시트 박리 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 용기 내에서 배양한 세포 시트는 용기 표면에 접촉되어 있기 때문에, 이 세포 시트를 회수하기 위해서는 디스파아제 (등록 상표) 와 같은 단백질 분해 효소를 사용하여 용기 표면으로부터 박리하는 조작을 실시하고 있다. 이러한 단백질 분해 효소를 사용한 박리 조작에서는, 세포에 데미지를 줄 뿐만 아니라, 배양에 따라 생성된 세포의 매트릭스도 분해해 버리는 경우가 있다. 또, 단백질 분해 효소는 동물 유래 재료인 경우가 많아, 재생 의료용의 세포 시트에 응용하는 경우, 안전성에 문제가 있다. 이 점을 감안하여, 예를 들어 일본 특허공고 공보 평6-104061호에서는, 용기 표면에 접촉된 배양 세포를 단백질 분해 효소를 사용하지 않고 박리시켜 회수하는 방법이 제안되고 있다. 즉, 표면을 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 피복한 페트리 접시를 준비하고, 이 페트리 접시 상에서 소의 대동맥의 혈관내 세포의 배양을 37℃ 에서 행한 후, 4℃ 로 냉각함으로써 페트리 접시의 표면을 소수성에서 친수성으로 변화시키고, 배양 세포를 박리시켜 회수하고 있다.

발명의 상세한 설명

<3> 발명의 개시

<4> 그러나, 상기 기술한 공보에서는, 배양 세포를 박리시키기 위해서는 온도 조절이 필요해지기 때문에, 조작이 간편하다고는 말하기 어려웠다.

<5> 본 발명은, 용기 표면에 접촉된 세포를 간편한 조작에 의해 박리 가능한 세포 박리제를 제공하는 것을 목적의 하나로 한다. 또, 이 세포 박리제를 사용하여 용기 표면에 접촉된 세포 시트를 박리하는 방법을 제공하는 것을 목적의 하나로 한다.

<6> 본 발명은, 상기 기술한 목적 중 적어도 일부를 달성하기 위하여 이하의 수단을 취하였다.

<7> 본 발명의 세포 시트 박리제는, 아미노화 폴리로택산을 함유하는 것이다. 이 세포 시트 박리제에 의하면, 세포에 데미지를 주지 않고, 또, 온도 조절없이 용기 표면에 접촉된 배양 세포를 박리할 수 있다.

<8> 본 발명의 세포 박리제의 골격을 이루는 폴리로택산은, 선형 분자에 고리형 분자를 복수 관통시킨 상태에서 선형 분자의 양단에 고리형 분자가 빠지지 않도록 한 부피가 큰 캡을 결합시킨 구조를 가지고 있다.

<9> 여기서, 선형 분자로는, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 성형(星形) 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜과 폴리프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리비닐에테르, 고분기 폴리에테르, 고분기 올리고에틸렌글리콜, 고분기 올리고프로필렌글리콜, 폴리(트리메틸렌옥사이드), 폴리(ε-카프로락톤), 폴리락트산, 폴리(ε-카프로락톤) 과 폴리락트산의 공중합체, 폴리락트산과 폴리에틸렌글리콜의 공중합체, 폴리(ε-리신), 폴리아미드, 폴리(이미노 올리고메틸렌), 아이오넨, 폴리(비닐디엔클로라이드), 폴리프로필렌, 올리고프로필렌, 폴리에틸렌, 올리고에틸렌, 폴리(알킬렌벤즈이미다졸), 폴리우레탄, 폴리(비올로겐), 폴리(N-디메틸데카메틸렌암모늄), 폴리(디메틸실록산), 폴리아닐린, 폴리카보네이트, 폴리(메틸메타크릴레이트), 폴리(N-아실에틸렌이민), 폴리에틸렌이민, 폴리(4-비닐피리딘)-도데실벤젠술포산 복합체, 플러렌-폴리에틸렌글리콜 결합체, 소수화 다당, 폴리에틸렌글리콜-다당 그래프트 공중합체, 폴리프로필렌글리콜-다당 그래프트 공중합체, 디페닐헥사트리엔으로 이루어지는 군에서 선택되는 1 종 또는 2 종 이상인 것이 바람직하다. 이 선형 분자의 평균 분자량은, 200 ~ 1000000 인 것이 바람직하고, 400 ~ 50000 인 것이 보다 바람직하고, 1000 ~ 5000 인 것이 특히 바람직하다.

<10> 또, 고리형 분자로는, α, β 또는 γ-시클로텍스트린인 것이 바람직하지만, 이것과 유사한 고리형 구조를 가지는 것이어도 되고, 그러한 고리형 구조로는 고리형 폴리에테르, 고리형 폴리에스테르, 고리형 폴리에테르아민, 고리형 폴리아민 등을 들 수 있다. 선형 분자와 고리형 분자의 조합으로는, α-시클로텍스트린과 폴리에틸

렌글리콜의 조합이 바람직하다.

<11> 또, 부피가 큰 캡은, 고리형 분자가 빠지지 않도록 한 구조를 가지고 있으면 어떠한 것이어도 되지만, 부피가 큰 치환기를 가지는 생체 친화성기인 것이 바람직하고, 선형 분자의 양 말단에 가수 분해성 결합을 통하여 도입되어 있는 것이 바람직하다. 여기서, 생체 친화성기로는, 생체에 대한 친화성이 높은 기 (생체에 대해서 안전성이 높은 기) 이면 어떠한 것이어도 되지만, 예를 들어 아미노산, 올리고펩티드, 올리고당류 또는 당 유도체인 것이 바람직하다. 아미노산으로는, 예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 아스파르트산, 글루타민산, 글리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 리신, 아르기닌, 히스티딘 등을 들 수 있다. 또, 올리고펩티드로는, 상기 기술한 아미노산의 복수가 펩티드 결합하여 형성된 것 등을 들 수 있다. 또, 올리고당류로는, 반복 단위가 1 ~ 10 정도로서, 텍스트란, 히알루론산, 키틴, 키토산, 알긴산, 콘드로이틴 황산, 전분 등의 다당류를 구성하는 단당에 의해 구성된 것이나, 고리형 올리고당인 α , β 또는 γ -시클로덱스트린 등을 들 수 있다. 또한, 당 유도체로는, 올리고당류, 다당 또는 단당을 아세틸화나 이소프로필화 등의 화학 수식한 화합물 등을 들 수 있다. 이 중, 벤젠고리를 가지는 아미노산, 예를 들어 L-페닐알라닌, L-티로신, L-트립토판 등이 바람직하다. 또, 부피가 큰 치환기로는, 선형 분자로부터 고리형 분자가 탈락되는 것을 방지할 수 있으면 어떠한 것이어도 되지만, 예를 들어 1 이상의 벤젠고리를 가지는 기 또는 1 이상의 제 3 부틸을 가지는 기가 바람직하다. 1 이상의 벤젠고리를 가지는 기로는, 예를 들어 벤질옥시카르보닐(Z)기, 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc)기, 벤질에스테르(OBz)기 등을 들 수 있고, 또, 1 이상의 제 3 부틸을 가지는 기로는, 제 3 부틸카르보닐(Boc)기, 아미노산 tert-부틸에스테르(OBu기) 등을 들 수 있지만, 이 중, 벤질옥시카르보닐기가 바람직하다. 또, 가수 분해성 결합으로는, 생체 내에서 가수 분해하는 결합인 것이 바람직하고, 생체 내에서 신속하게 비효소적으로 가수 분해하는 것을 고려하면 에스테르 결합인 것이 바람직하다.

<12> 본 발명의 세포 박리제에 함유되는 아미노화 폴리로텍산은, 폴리로텍산에 함유되는 시클로덱스트린 골격 중 적어도 일부의 수산기가 아미노기를 가지는 치환기에 의해 치환된 화합물이면 된다. 여기서, 시클로덱스트린 골격 중의 수산기는, 시클로덱스트린 골격을 이루는 글루코오스의 수산기인 것이 바람직하고, 그 글루코오스의 6 위치의 수산기인 것이 보다 바람직하다. 또, 아미노기를 가지는 치환기는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, $-OOCNH-A-NR^1R^2$ (A 는 분기를 가지고 있어도 되는 탄화수소사슬, R^1 및 R^2 는 동일해도 되고 상이해도 되며, 수소 또는 분기를 가지고 있어도 되는 탄화수소기) 인 것이 바람직하다. 여기서, A 는 탄소수 2 ~ 4 의 분기를 가지고 있어도 되는 탄화수소사슬인 것이 바람직하고, 예를 들어 $-(CH_2)_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_3-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_4-$ 등을 들 수 있다. R^1 및 R^2 는 수소 또는 탄소수 1 ~ 5 의 분기를 가지고 있어도 되는 탄화수소기인 것이 바람직하고, 후자의 탄화수소기로는 예를 들어 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, sec-부틸기, tert-부틸기 등을 들 수 있다. 또한, $-OOCNH-$ 의 부위는 결합하기 위한 역할을 하는 부위라고 생각되기 때문에, 이 구조에 한정되는 것이 아니고, 예를 들어, $-OCO-$, $-OOC-$, $-OCH_2-$, $-OC(OH)CH_2-$, $-OC(=S)NH-$ 등이어도 된다.

<13> 본 발명의 세포 박리제는, 용기 표면에 접착된 세포 (접착 의존성 세포) 를 박리하는 데에 사용된다. 여기서, 접착 의존성 세포로는, 예를 들어, 연골 세포, 골아 세포, 섬유아 세포, 표피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 간 세포, 췌 세포, 근세포 또는 이들의 전구 세포나 간접적 줄기 세포, 담성 줄기 세포 (ES세포) 등을 들 수 있다.

<14> 본 발명의 세포 박리제는, 용기 표면에 접착된 세포 시트, 특히 표피 세포의 세포 시트를 박리하는 데에 바람직하게 사용된다. 세포 시트를 박리하는 방법은, 용기 표면에 세포를 접촉시켜 배양하여 세포 시트로 하는 배양 공정과, 이 배양 공정 후에 본 발명의 세포 시트 박리제를 첨가한 배지에 교환하여 용기 표면으로부터 세포 시트를 박리시키는 박리 공정을 포함하는 것으로 해도 된다. 여기서 말하는 배지란, 박리 공정 중에 세포 시트를 구성하는 세포를 사멸시키지 않는 액체인 되고, DMEM 등의 기초 배지나, 기초 배지에 증식 인자를 첨가한 증식용 배지만만이 아니라, 생리 식염수나 인산 완충액 등의 액체여도 된다. 또, 박리 공정 후에 박리된 세포 시트를 회수하는 회수 공정을 포함하는 것으로 해도 된다. 여기서, 박리 공정에서는, 세포를 배양하면서 용기 표면으로부터 서서히 세포 시트를 박리시켜도 된다. 또, 회수 공정에서는, 박리된 세포 시트를 현가용 지지막에 부착시켜 끌어올림으로써 회수해도 된다. 여기서, 현가용 지지막이란, 소정 상태에 달한 세포를 거의 그대로 현가할 수 있는 것이면 어떤 것이어도 되고, 예를 들어, 멸균 거즈, 멸균 일본 종이, 멸균 여과지, 멸균 부직포 외에, PVDF 막 (폴리불화비닐리덴막) 이나 PTFE막 (폴리테트라플루오로에틸렌막) 등의 친

수성막이나, 실리콘 고무 등의 유연성이 있는 고분자 재료나 폴리글리콜산, 폴리락트산 등의 생분해성 폴리머나 한천 배지나 콜라겐 겔, 젤라틴 겔 등의 하이드로 겔 등을 시트상으로 한 것 등을 들 수 있다.

실시예

<16> [실시에 1]

<17> 폴리로텍산 (도 1 참조) 을 이하의 순서에 의해 합성하였다.

<18> [1-1] 에스테르 결합을 통하여 양 말단에 아미노기를 가지는 PEG 의 합성

<19> 분자량 3300 의 폴리에틸렌글리콜 (PEG) (33g, 10mmol) 과 무수 숙신산 (20g, 200mmol) 을 톨루엔 (220ml) 에 용해시키고, 이 용액을 150℃ 에서 5 시간 환류시켰다. 반응 종료 후, 과잉의 디에틸에테르에 주입하고, 여과 분별·감압 건조시켜 미정제 생성물을 얻었다. 이것을 디클로로메탄에 용해시키고, 불용물을 원심 분리 에 의해 제거하고, 과잉의 디에틸에테르에 주입하여, 여과 분별·감압 건조 후에 양 말단에 카르복실기를 가지는 PEG (화합물 A) 를 백색 분말로서 얻었다. 이 화합물 A (20g, 5.7mmol) 와 N-히드록시숙신이미드 (HOSu) (17.1g, 148.2mmol) 를 1,4-디옥산과 디클로로메탄의 혼합 용액 (350ml, 체적비 1 : 1) 에 용해시켜, 빙냉 후 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) (23.5g, 114mmol) 를 첨가하였다. 빙냉한 채로 1 시간 교반하고, 그 후 실온에서 밤새 교반하였다. 부생성물의 디시클로헥실우레아를 여과 분별하고, 여과액은 농축하고 나서 과잉의 디에틸에테르에 주입하였다. 여과 분별·감압 건조 후에 카르복실기가 활성화된 PEG (화합물 B) 를 백색 분말로서 얻었다. 이어서, 에틸렌디아민 (0.4ml, 6mmol) 을 용해시킨 디클로로메탄 (75 ml) 에, 화합물 B (10g, 2.7mmol) 를 용해시킨 디클로로메탄 (75ml) 을 적하하고, 적하 종료 후부터 실온에서 1 시간 교반하였다. 반응 종료 후, 용액을 과잉의 디에틸에테르에 주입하고, 여과 분별·감압 건조 후에 양 말단에 아미노기를 가지는 PEG (화합물 C) 를 백색 분말로서 얻었다.

<20> [1-2] 의(擬)폴리로텍산의 조제

<21> α-시클로덱스트린 (α-CD) (48g, 49.2mmol) 의 포화 수용액 (311ml) 에 화합물 C (4g, 1.12mmol) 의 수용액 (20ml) 을 실온에서 적하하였다. 1 시간 동안 초음파를 조사하면서 교반하고, 그 후 실온에서 24 시간 교반 하였다. 원심 분리에 의해 백색의 침전물을 회수하고, 50℃ 에서 감압 건조시켜, 백색 분말의 의폴리로텍산 을 얻었다. 또한, 폴리로텍산이란, 다수의 고리형 분자 (예를 들어, 시클로덱스트린) 에 선형 분자 (예를 들어, PEG) 가 관통하고, 그 선형 분자의 양 말단을 부피가 큰 치환기로 캡한 것을 말하고, 의폴리로텍산이란, 폴리로텍산의 양 말단을 아직 부피가 큰 치환기로 캡하고 있지 않은 것을 말한다.

<22> [1-3] 말단 캡제의 조제

<23> α-CD 의 이탈을 방지하는 부피가 큰 치환기로서 벤질옥시카르보닐-L-페닐알라닌 (Z-L-Phe, Z 는 벤질옥시카르보닐기를 나타낸다) 을 도입하기 위해서, Z-L-Phe 의 카르복실기의 활성화를 실시하였다. 즉, Z-L-Phe (100g, 334mmol) 를 1,4-디옥산 (800ml) 에 용해시키고, 빙냉하면서 HOSu (38.42g, 334mmol) 를 첨가하였다. 1 시간 후에 DCC (75.7g, 367mmol) 를 용해시킨 1,4-디옥산 용액 (200ml) 을 천천히 첨가하여, 빙냉한 채로 1 시간 교반하고, 그 후 실온에서 밤새 교반하였다. 부생성물의 디시클로헥실우레아를 여과 분별하고, 여과 액은 농축한 후 과잉의 디에틸에테르에 주입하고, 여과 분별·감압 건조 후에 미정제 생성물을 얻었다. 실 온에서 가능한 한 포화 농도가 되도록 미정제 생성물을 디클로로메탄에 용해시킨 후, 석유 에테르를 적당량 첨가하여 냉각하고, 재결정을 실시하였다. 결정을 여과 분별·감압 건조시켜 백색 침상 결정의 Z-L-Phe 의 숙신이미드에스테르 (Z-L-Phe-OSu) 를 얻었다.

<24> [1-4] 폴리로텍산의 조제

<25> Z-L-Phe-OSu (80g, 200mmol) 를 디메틸설폭사이드 (DMSO) (60ml) 에 용해시키고, 의폴리로텍산 (45g, 2mmol) 을 첨가하였다. 이 불균일 용액을 실온에서 교반 하면서, 균일하게 되도록 조금씩 DMSO 를 첨가하여 96 시간 교반하였다. 반응 종료 후, 반응 용액을 과잉의 디에틸에테르에 주입하여, 미정제 생성물을 얻었다. 미정제 생성물을 아세톤, 디메틸포름아미드 (DMF) 의 순서로 세정하여 불순물 (미반응 Z-L-Phe-OSu, α-CD, 화합물 C 등) 을 제거하고, 여과 분별·감압 건조시켜 생분해성의 폴리로텍산을 백색 분말로서 얻었다. 합성의 확인은, ¹H-NMR 에 의해 실시하였다. 또, 이 폴리로텍산의 α-CD 관통수를 ¹H-NMR 에서의 PEG 의 프로톤과 α-CD 의 C (탄소) 의 1 위치의 프로톤과의 적분비로부터 구한 결과, 17 이었다.

<26> [실시에 2]

- <27> CDI 활성화 폴리로텍산을 이하의 순서에 의해 조제하였다. 즉, 실시예 1 에서 얻어진 폴리로텍산 (1g, 0.0369mmol, CD = 0.871mmol, OH = 15.6mmol) 을 DMSO (10ml) 에 질소 분위기하에서 용해시키고, N,N'-카르보닐 디이미다졸 (CDI) 2.54g (15.6mmol; 폴리로텍산 중의 수산기와 등량) 을 첨가하고, 질소 분위기하 실온에서 반응시켜, 3 시간 경과 후 에테르에 적하하여 백색 침전물을 생성시키고, 이것을 여과하고 실온에서 감압 건조시켜 백색 분말의 CDI 활성화 폴리로텍산 (CDI-PR) 을 얻었다. 이 CDI-PR 의 활성화율을 자외 흡광 분광계를 사용하여 207nm 의 흡광도로부터 산출한 결과, 91.37% 였다.
- <28> [실시예 3]
- <29> 아미노화 폴리로텍산이나 술폰화 폴리로텍산, 카르복실화 폴리로텍산을 이하와 같이하여 조제하였다.
- <30> 아미노화 폴리로텍산을 이하의 순서에 의해 조제하였다. 즉, 실시예 2 에서 얻어진 CDI-PR 1g (0.029mmol) 을 20ml 의 디메틸술폰사이드 (DMSO) 에 용해하고, 여기에 과잉량의 아미노화 시약을 첨가하여 실온에서 3 시간 교반하였다. 그 후, 반응 용액을 과잉량의 디에틸에테르에 투여하고, 얻어진 침전물을 동일한 용매로 세정한 후, 목적으로 하는 아미노화 폴리로텍산을 얻었다. 여기서, 아미노화 시약으로, 1,2-디아미노프로판을 사용한 것을 샘플 No.1 (도입된 아민수 16, α-CD 관통수 17) 로 하고, 1,3-디아미노프로판을 사용한 것을 샘플 No.2 (도입된 아민수 38, α-CD 관통수 17) 로 하고, N,N-디메틸-1,2-디아미노에탄을 사용한 것을 샘플 No.3 (도입된 아민수 158, α-CD 관통수 17) 으로 하고, N,N-디메틸-1,3-디아미노프로판을 사용한 것을 샘플 No.4 (도입된 아민수 128, α-CD 관통수 17) 로 하였다.
- <31> 카르복실화 폴리로텍산을 이하의 순서에 의해 조제하였다. 즉, 실시예 1 에 준하여, 다수의 α-CD 공동부를 관통한 PEG (분자량 4000) 의 양 말단을 Z-티록신으로 캡한 폴리로텍산을 조제하였다. 이 폴리로텍산의 무수 숙신산에 의한 에스테르화에 의해, α-CD 수산기에 카르복시에틸에스테르 (CEE) 기를 도입한 수용성의 카르복실화 폴리로텍산 (도입된 CEE 수 188, α-CD 관통수 15) 을 합성하였다. 이 카르복실화 폴리로텍산을 샘플 No.5 로 하였다.
- <32> 술폰화 폴리로텍산을 이하의 순서에 의해 조제하였다. 즉, 상기 기술한 바와 같이 합성한 카르복실화 폴리로텍산에 수용성 카르보디이미드를 축합제로서 사용하여 타우린을 도입하고, 술폰화 폴리로텍산을 얻었다 (도입된 타우린수 117, α-CD 관통수 9). 이 술폰화 폴리로텍산을 샘플 No.6 으로 하였다. 또한, 실시예 1 의 폴리로텍산을 샘플 No.7 로 하였다. 하기 표 1 에 각 샘플의 구조적 특징을 나타낸다.

표 1

샘플 No.	PEG 분자량	α-CD 관통수	치환기		
			시약	폴리로텍산에 대한 도입량	구조 (-OOCNH-A-NR ¹ R ²)
1	3,300	17	1급 아민 (1,2-디아미노프로판)	16	-OOCNH-CH(CH ₃)CH ₂ -NH ₂ 또는 -OOCNH-CH ₂ CH(CH ₃)-NH ₂
2	3,300	17	1급 아민 (1,3-디아미노프로판)	38	-OOCNH-(CH ₂) ₃ -NH ₂
3	3,300	17	3급 아민 (N,N-디메틸-1,2-디아미노에탄)	158	-OOCNH-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂
4	3,300	17	3급 아민 (N,N-디메틸-1,3-디아미노프로판)	128	-OOCNH-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂
5	4,000	28	무수 숙신산	188	-O(CH ₂) ₂ COOH
6	4,000	9	타우린	117	-O(CH ₂) ₂ CONH-(CH ₂) ₂ -SO ₃ H
7	3,300	17	-	-	-OH

<33>

<34> [실시예 4]

- <35> 각 샘플의 폴리로텍산에 대하여, 세포 박리 시험을 이하의 순서에 의해 실시하였다. 즉, 각 샘플의 폴리로텍산을 정확하게 칭량한 후, 70% 에탄올을 첨가하여, 200m/ml 의 용액 또는 현탁액을 조제하였다. 그 후, 70% 에탄올에 의해 0.02 ~ 20mg/ml 의 희석 계열을 조제하고, 96 웰 플레이트에 100 μ l 씩 첨가하고, 클린 벤치 내에서 하룻밤 송풍 상태에서 건조시켰다. 세포 증식용 배지 100 μ l 를 첨가하고, 1 시간 교반하여 폴리로텍산을 재용해한 후, NIH3T3 세포 현탁액 (고밀도 조건 : 3×10^5 cells/ml, 중밀도 조건 : 9×10^4 cells/ml, 저밀도 조건 : 3×10^4 cells/ml) 를 100 μ l 씩 첨가하였다. 최종 폴리로텍산 농도는 0.01, 0.1, 1, 10mg/ml, NIH3T3 세포 밀도는 $1.3, 10 \times 10^4$ cells/cm² 이다. 그 후, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 이라는 조건하에서 8 일까지 배양하고, 현미경하 소견을 관찰하였다.
- <36> 그 결과, 카르복실화 폴리로텍산 (샘플 No.5), 술폰화 폴리로텍산 (샘플 No.6) 및 α -CD 수산기가 무치환의 폴리로텍산 (샘플 No.7) 을 포함하는 배지에 있어서는, 파종 밀도에 관계없이, 농도가 1mg/ml 이하에서는 플레이트면에 접촉되어 증식될 뿐 박리는 보이지 않고, 농도가 10mg/ml 에서는 세포가 접촉되지 않고 증식되지 않았다.
- <37> 이에 대하여, 1 급 아민을 도입한 아미노화 폴리로텍산 (샘플 No.1, 2) 에 있어서는, 농도가 0.1 ~ 1mg/ml 이고 파종 밀도가 중·고밀도 조건인 경우, 배양 3 일째까지 세포가 시트상으로 증식되어 박리되고, 나아가서는 수축하여 1 개의 스페로이드가 형성되었다. 이로써, 아미노화 폴리로텍산이 세포에 약하게 결합하여 플레이트면에 대한 세포의 접착을 부분적으로 저해하고, 시트 형성 후에는 세포 시트의 수축력이 플레이트면과 세포와의 접착력을 웃돌아, 시트상으로 박리되었다고 추측된다. 이 때문에, 스페로이드가 형성되기 전의 시트상의 단계에서 세포 시트 지지체를 사용하여 세포 시트를 회수하는 것이 가능하다. 또, 동일 아미노화 폴리로텍산에 있어서, 농도가 10mg/ml 이고 파종 밀도가 중·고밀도 조건인 경우, 배양 1 일째에서 세포 콜로니가 응집되어 다수의 소(小)스페로이드가 형성되었다. 이로써, 시트상으로 박리되어 1 개의 스페로이드가 형성되는 경우에 비하여, 아미노화 폴리로텍산과 세포의 결합량이 많고, 작은 콜로니 형성의 단계에서 세포 콜로니의 시트 수축력이 플레이트면과 세포의 접착력을 웃돌았다고 추측된다.
- <38> 한편, 3 급 아민을 도입한 아미노화 폴리로텍산 (샘플 No.3, 4) 에 있어서는, 농도가 10mg/ml 로 고밀도 조건인 경우, 배양 2, 3 일째까지 세포 콜로니가 응집되어 다수의 소스페로이드가 형성되고, 동일 농도이고 중·저밀도 조건인 경우, 플레이트면에 접촉되어 세포가 증식될 뿐이었다. 이로써, 3 급 아민을 도입한 아미노화 폴리로텍산은, 1 급 아민을 도입한 아미노화 폴리로텍산에 비하여 세포와의 접착성이 약하다고 추측된다.
- <39> 이상의 세포 박리 시험은, 배양 공정과 박리 공정을 동시에 진행시킨 것이지만, 배양 공정에 있어서 컨플루언트가 되기 직전에 아미노화 폴리로텍산을 첨가하면, 세포가 증식되어 시트상이 되면서 시트 수축력에 의해 용기 표면으로부터 박리되기 때문에, 예를 들어, 친수 처리한 PVDF 막 (폴리불화비닐리덴막) 을 상방으로부터 떨어뜨리고, 이 PVDF 막에 세포 시트를 접촉시킨 후에 막째 끌어올림으로써, 세포 시트를 박리·회수할 수 있다.
- <40> 또한, 본 발명은, 2004년 9월 30일에 출원된 일본 특허 출원 2004-286163호를 우선권 주장의 기초로 하고 있고, 그 내용의 전부가 편입된다.

산업상 이용 가능성

- <41> 본 발명은, 재생 의료 분야에 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- <15> 도 1 은, 아미노화 폴리로텍산의 합성 순서를 나타내는 설명도이다.

도면

도면1

