

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-522995

(P2019-522995A)

(43) 公表日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(51) Int.Cl.

C 12 M	3/04	(2006.01)
C 12 M	1/22	(2006.01)
C 12 M	1/00	(2006.01)
C 12 M	3/00	(2006.01)
C 12 N	5/07	(2010.01)

F 1

C 12 M	3/04
C 12 M	1/22
C 12 M	1/00
C 12 M	3/00
C 12 N	5/07

Z

4 B 0 2 9
4 B 0 6 5
4 F 0 0 6
4 K 0 3 0

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-500397 (P2019-500397)  
 (86) (22) 出願日 平成29年7月5日 (2017.7.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月20日 (2019.2.20)  
 (86) 國際出願番号 PCT/KR2017/007195  
 (87) 國際公開番号 WO2018/008985  
 (87) 國際公開日 平成30年1月11日 (2018.1.11)  
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0084856  
 (32) 優先日 平成28年7月5日 (2016.7.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 韓国 (KR)

(71) 出願人 515036246  
 コリア アドバンスト インスティテュート オブ サイエンスアンド テクノロジー  
 KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
 大韓民国 305-701 テジョン ユソング テハロ 291,  
 291, Daehak-ro, Yusong-gu, Daejeon, 305-701 Republic of Korea  
 (74) 代理人 100107515  
 弁理士 廣田 浩一

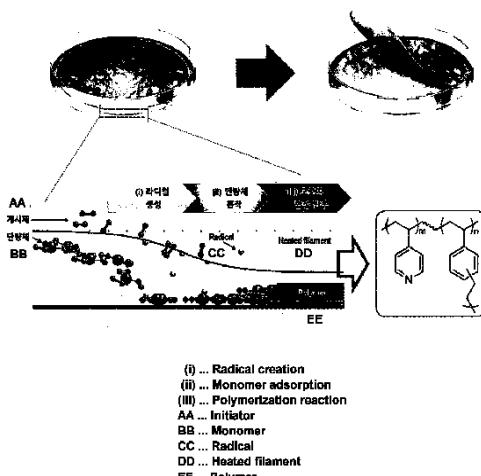
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞シート製作方法及び応用のための高分子薄膜培養プレート製作方法及び用途

## (57) 【要約】

本発明は、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようとする第1単量体と、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようとする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートとその製造方法、及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造及び転写する方法を提供する。前記のような本発明によれば、従来技術と比較してやさしくて簡単な工程により細胞シート形態の細胞集合体を生産することができる効果がある。

【選択図】図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と、前記第1単量体より表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む、培養プレート。

## 【請求項 2】

前記第1単量体の表面自由エネルギーは60mJ/m<sup>2</sup>以下であることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

## 【請求項 3】

前記第1単量体は、ジビニルベンゼン(divinylbenzene)、ビニルベンゾエート(vinyl Benzoate)、スチレン(styrene)、ベンジルメタクリレート(Benzyl Methacrylate)、シクロヘキシリメタクリレート(Cyclohexyl Methacrylate)、ブチルメタクリレート(butyl methacrylate)、イソプロピルメタクリレート(Isopropyl methacrylate)、アクリルアミド(Acryl Amide)、アリルメタクリレート(Allyl methacrylate)、2-イソシアナトエチルメタクリレート(Isocyanatoethyl Methacrylate)、エチレングリコールジメタクリレート(Ethylene glycol dimethacrylate)、ジ(エチレングリコール)メチルエステルメタクリレート(Di(ethylene glycol) methyl ester methacrylate)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(Hydroxyethyl methacrylate)、1,2,4-トリビニルシクロヘキサン(trivinylcyclohexane)、フルフリルメタクリレート(furfuryl methacrylate)、テトラヒドロフルフリルメタクリレート(Tetrahydrofurfuryl methacrylate)、ヘキシリメタクリレート(Hexyl Methacrylate)、ヒドロキシエチルメタクリレート(hydroxyethyl methacrylate)、グリシジルメタクリレート(Glycidyl methacrylate)、プロパルギルメタクリレート(Propargyl Methacrylate)、1,4-ブタンジオールジビニルエーテル(Butanediol divinyl ether)、イソボニルアクリレート(Isobornyl acrylate)、エチレングリコールジアクリレート(Ethylene glycol diacrylate)、プロパルギルアクリレート(Propargyl acrylate)、2,4,6,8-テトラメチル(tetramethyl)-2,4,6,8-テトラビニルシクロテラシロキサン(tetravinylcyclotetrasiloxane)、ヘキサビニルジシロキサン(hexavinyl disiloxane)、ヘキサビニルジシロキサン(Hexavinyl disiloxane)、1,3,5-トリビニル(trivinyl)-1,3,5-トリメチルシクロトリシロキサン(trimethyl cyclotrisiloxane)、2,4,6-トリメチル(Tri methyl)-2,4,6-トリビニルシクロトリシラザン(trivinylcyclo trisilazane)、ジメチルフェニルビニルシラン(Dimethylphenylvinylsilane)、ヘプタデカフルオロデシルメタクリレート(heptadecafluorodecyl methacrylate)、パーフルオロデシルアクリレート(perfluorodecyl acrylate)、ヘプタフルオロブチルメタクリレート(Heptafluorobutyl methacrylate)、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロピルメタクリレート(Hexafluoroisopropyl methacrylate)、2,2,3,3,4,4-ヘキサフルオロ(hexafluoro)-1,5-ペンチルジクリレート(pentyl dicrylate)、2-パーフルオロヘキシリエチルメタクリレート(perfluoro hexylethyl methacrylate)、2,2,2-トリフルオロエチルメタクリレート(Tri fluororoethyl methacrylat

10

20

30

40

50

e)、ペンタフルオロフェニルメタクリレート( Pentafluorophenyl methacrylate )、1H、1H、7H - ドデカフルオロヘプチルアクリレート( Dodecafluoroheptyl acrylate )、1H、1H、2H、2H - ヘプタデカフルオロデシルアクリレート( heptadecafluorodecyl acrylate )、ジ(エチレングリコール)ジ(ビニル)エーテル( di(ethylene glycol)di(vinyl)ether )、1,9 - デカジエン( Decadiene )、メタクリリックアンハイドライド( Methacrylic Anhydride )、1,2,4 - トリビニルシクロヘキサン( Trivinylcyclohexane )、2 - (メタクリロイルオキシル)エチルアセトアセテート( (Methacryloyloxyethyl)ethyl acetoacetate )、アリルアセトアセテート( Allyl Acetoacetate )、マレイックアンハイドライド( Maleic Anhydride )で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

#### 【請求項4】

前記第1単量体は、ジビニルベンゼン( divinylbenzene )であることを特徴とする、請求項3に記載の培養プレート。

#### 【請求項5】

前記第2単量体の表面自由エネルギーは、60mJ/m<sup>2</sup>以上であることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

#### 【請求項6】

前記第2単量体は、2 - ビニルピリジン( vinylpyridine )、4 - ビニルピリジン( vinylpyridine )、ビニルイミダゾール( vinylimidazole )、ビニルピロリドン( vinylpyrrolidone )、4 - アミノスチレン( aminostyrene )、9 - ビニルカルバゾール( vinylcabazole )、2 - (ジエチルアミノ)エチルアクリレート( (Diethylamino)ethyl acrylate )、ジエチルアミノエチルアクリレート( diethylaminoethyl acrylate )、ジメチルアミノエチルアクリレート( dimethylaminoethyl acrylate )、ジエチルアミノエチルアクリレート( diethylaminoethyl acrylate )、2 - クロロエチルアクリレート( Chlороethyl acrylate )、シアノエチルアクリレート( cyanoethyl acrylate )、3 - (ジメチルアミノ)プロピルアクリレート( (dimethylamino)propyl acrylate )、2 - (ジメチルアミノ)エチルメタクリレート( (Dimethylamino)ethyl methacrylate )、t - ブチルアミノエチルメタクリレート( butylaminoethyl methacrylate )、ジメチルアミノメチルスチレン( Dimethylaminomethyl styrene )、メタクリル酸( Methacrylic acid )、アクリルアミド( acrylamide )、メタクリルアミド( metacrylamide )、N,N - ジメチルアクリルアミド( Dimethylacrylamide )、N - イソプロピルアクリルアミド( isopropylacrylamide )、4 - ビニルベンジルクロリド( Vinylbenzyl chloride )、ビニルベンジルシアニド( Vinylbenzyl cyanide )、ビニル-N - メチルピリジニウムクロリド( vinyl-N-methylpyridinium chloride )、N - ビニルカプロラクタム( Vinylcaprolactam )、アリルアミン( Allylamine )、N - (4 - ビニルベンジル) - N - ジメチルアミン( N - (4 - Vinylbenzyl) - N - dimethylamine )、アクリロニトリル( Acrylonitrile )で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

#### 【請求項7】

前記第2単量体は、4 - ビニルピリジン( vinylpyridine )であることを特徴とする、請求項6に記載の培養プレート。

10

20

30

40

50

**【請求項 8】**

前記共重合体の表面自由エネルギーは、 $30\text{ mJ/m}^2 \sim 90\text{ mJ/m}^2$ であることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

**【請求項 9】**

前記培養プレートは、細胞シート形態の細胞集合体製造用であることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

**【請求項 10】**

前記培養プレートの素材は、ガラス、金属、金属酸化物、繊維、紙、及びプラスチックで構成された群より選択されることを特徴とする、請求項1に記載の培養プレート。

**【請求項 11】**

前記プラスチックは、ポリエチレン(*polyethylene*、PE)、ポリプロピレン(*polypropylene*、PP)、ポリスチレン(*polystyrene*、PS)、ポリエチレンテレフタレート(*polyethyleneterephthalate*、PET)、ポリアミド(*polyamides*、PA)、ポリエステル(*polyester*、PES)、ポリ塩化ビニル(*polyvinylchloride*、PV C)、ポリウレタン(*polyurethanes*、PU)、ポリカーボネート(*polycarbonate*、PC)、ポリ塩化ビニリデン(*polyvinylidene chloride*、PVDC)、ポリテトラフルオロエチル(*polytetrafluoroethylene*、PTFE)、ポリエーテルエーテルケトン(*polyetheretherketone*、PEEK)、及びポリエーテルイミド(*polyetherimide*、PEI)で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項10に記載の培養プレート。

10

20

30

**【請求項 12】**

請求項1乃至11のうち、いずれか一項の培養プレートで細胞を培養するステップを含む、細胞シート形態の細胞集合体製造方法。

**【請求項 13】**

開始剤を分解して遊離ラジカル(*free radical*)を形成するステップと、遊離ラジカルにより第1単量体と第2単量体を連鎖重合反応させて共重合体を形成するステップと、

培養プレートに共重合体が蒸着されて薄膜を形成するステップとを含む開始剤を用いた化学的気相蒸着(*initiated Chemical Vapor Deposition*、iCVD)工程を用いた培養プレート表面改質方法。

40

**【請求項 14】**

前記第1単量体の表面自由エネルギーは、 $60\text{ mJ/m}^2$ 以下であることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。

**【請求項 15】**

前記第1単量体は、ジビニルベンゼン(*divinylbenzene*)、ビニルベンゾエート(*Vinyl Benzoate*)、スチレン(*styrene*)、ベンジルメタクリレート(*Benzyl Methacrylate*)、シクロヘキシリメタクリレート(*Cyclohexyl Methacrylate*)、ブチルメタクリレート(*butyl methacrylate*)、イソプロピルメタクリレート(*Isopropyl methacrylate*)、アクリルアミド(*Acryl Amide*)、アリルメタクリレート(*Allyl methacrylate*)、2-イソシアナトエチルメタクリレート(*Isocyanatoethyl Methacrylate*)、エチレングリコールジメタクリレート(*Ethylene glycol dimethacrylate*)、ジ(エチレングリコール)メチルエステルメタクリレート(*Di(ethylene glycol) methyl ester methacrylate*)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(*Hydroxyethyl methacrylate*)、1,2,4-トリビニルシクロヘキサン(*trivinyl cyclohexane*)、フルフリルメタクリレート(*furfuryl methacryl*

50

ate)、テトラヒドロフルフリルメタクリレート(Tetrahydro furfuryl methacrylate)、ヘキシルメタクリレート(Hexyl Methacrylate)、ヒドロキシリルエチルメタクリレート(hydroxyethyl methacrylate)、グリシジルメタクリレート(Glycidyl methacrylate)、プロパルギルメタクリレート(Propargyl Methacrylate)、1,4-ブタンジオールジビニルエーテル(Butanediol divinyl ether)、イソボニルアクリレート(Isobornyl acrylate)、エチレングリコールジアクリレート(Ethylene glycol diacrylate)、プロパルギルアクリレート(Propargyl acrylate)、2,4,6,8-テトラメチル(tetramethyl)-2,4,6,8-テトラビニルシクロテラシロキサン(tetravinylcyclotetrasiloxane)、ヘキサビニルジシロキサン(hexavinyl disiloxane)、ヘキサビニルジシロキサン(Hexavinyl disiloxane)、1,3,5-トリビニル(trivinyl)-1,3,5-トリメチルシクロトリシロキサン(trimethylcyclotrisiloxane)、2,4,6-トリメチル(Trimethyl)-2,4,6-トリビニルシクロトリシラザン(trivinyl cyclotrisilazane)、ジメチルフェニルビニルシラン(Dimethyl phenylvinylsilane)、ヘプタデカフルオロデシルメタクリレート(heptadecafluorodecyl methacrylate)、パーフルオロデシルアクリレート(perfluorodecyl acrylate)、ヘプタフルオロブチルメタクリレート(Heptafluorobutyl methacrylate)、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロピルメタクリレート(Hexafluoroisopropyl methacrylate)、2,2,3,3,4,4-ヘキサフルオロ(hexafluoro)-1,5-ペンチルジクリレート(pentyldicrylate)、2-パーフルオロヘキシリルエチルメタクリレート(perfluorohexyethyl methacrylate)、2,2,2-トリフルオロエチルメタクリレート(Trifluoroethyl methacrylate)、ペンタフルオロフェニルメタクリレート(Pentafluorophenyl methacrylate)、1H,1H,7H-ドデカフルオロヘプチルアクリレート(Dodecafluoroheptyl acrylate)、1H,1H,2H,2H-ヘプタデカフルオロデシルアクリレート(heptadecafluorodecyl acrylate)、ジ(エチレングリコール)ジ(ビニル)エーテル(diethyleneglycol)di(vinyl)ether)、1,9-デカジエン(decadiene)、メタクリリックアンハイドライド(Methacrylic Anhydride)、1,2,4-トリビニルシクロヘキサン(trivinylcyclohexane)、2-(メタクリロイルオキシル)エチルアセトアセテート((Methacryloyloxyethyl)ethyl acetooacetate)、アリルアセトアセテート(Allyl Acetoacetate)、マレイックアンハイドライド(Maleic Anhydride)で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。

#### 【請求項16】

前記第1単量体は、ジビニルベンゼン(divinylbenzene)であることを特徴とする、請求項15に記載の培養プレート表面改質方法。

#### 【請求項17】

前記第2単量体の表面自由エネルギーは、60mJ/m<sup>2</sup>以上であることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。

#### 【請求項18】

前記第2単量体は、2-ビニルピリジン(vinylpyridine)、4-ビニルピリジン(vinylpyridine)、ビニルイミダゾール(vinylimidazole)、ビニルピロリドン(vinylpyrrolidone)、4-アミノスチ

10

20

30

40

50

レン( aminostyrene)、9 - ビニルカルバゾール( vinylcabazole)、2 - (ジエチルアミノ)エチルアクリレート( (Diethylamino)ethyl acrylate)、ジエチルアミノエチルアクリレート( diethylaminooethyl acrylate)、ジメチルアミノエチルアクリレート( dimethylaminooethyl acrylate)、ジエチルアミノエチルアクリレート( diethylaminooethyl acrylate)、2 - クロロエチルアクリレート( Chloroethyl acrylate)、シアノエチルアクリレート( Cyanoethyl acrylate)、3 - (ジメチルアミノ)プロピルアクリレート( (dimethylamino)propyl acrylate)、2 - (ジメチルアミノ)エチルメタクリレート( (dimethylamino)ethyl methacrylate)、t - ブチルアミノエチルメタクリレート( butyl aminoethyl methacrylate)、ジメチルアミノメチルスチレン( Dimethylaminomethyl styrene)、メタクリル酸( Methacrylic acid)、アクリルアミド( acrylamide)、メタクリルアミド( methacrylamide)、N , N - ジメチルアクリルアミド( Dimethylacrylamide)、N - イソプロピルアクリルアミド( isopropyl acrylamide)、4 - ビニルベンジルクロリド( Vinylbenzyl chloride)、ビニルベンジルシアニド( Vinylbenzyl cyanide)、ビニル - N - メチルピリジニウムクロリド( vinyl-N-methylpyridinium chloride)、N - ビニルカプロラクタム( Vinylcaprolactam)、アリルアミン( Allylamine)、N - (4 - ビニルベンジル) - N - ジメチルアミン( N - (4 - Vinylbenzyl) - N - dimethylamine)、アクリロニトリル( Acrylonitrile)で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。  
10

#### 【請求項19】

前記第2単量体は、4 - ビニルピリジン( vinylpyridine)であることを特徴とする、請求項18に記載の培養プレート表面改質方法。

#### 【請求項20】

前記共重合体の表面自由エネルギーは、30mJ / m<sup>2</sup> ~ 90mJ / m<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。  
20

#### 【請求項21】

前記培養プレートは、細胞シート形態の細胞集合体製造用であることを特徴とする、請求項13に記載の培養プレート表面改質方法。

#### 【請求項22】

( a ) 細胞シート形態の細胞集合体をホール構造体( structure with holes)の表面に1層以上付着するステップと、

( b ) 細胞集合体の適用を必要とする部位に細胞集合体が付着された面が対向するようホール構造体を配置した後、ホール構造体のみを剥離するステップとを含む、細胞集合体の転写( transfer)方法。  
30

#### 【請求項23】

前記ホール構造体は、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDF(ポリビニリデンフルオライド( Polyvinylidene fluoride))メンブレン、ポリテトラフルオロエチレン( Polytetrafluoroethylene) ( PTFE)メンブレン、ポリカーボネート( polycarbonate)メンブレン、MCE(混合セルロースエステル( mixed cellulose ester))メンブレン、ポリアマイドメンブレン、及びPES(ポリエーテルスルホン( Polyether sulfone))メンブレンからなる群より選択されたものであって、1つ以上の孔があることを特徴とする、請求項22に記載の方法。  
40

#### 【請求項24】

前記( b )のホール構造体の剥離時、細胞集合体が付着された面の反対面に磷酸緩衝溶

液、または細胞培養培地を点滴することを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2016年7月5日付で大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10-2016-0084856号に対して優先権を主張し、前記特許出願の開示事項は本明細書に参照として挿入される。

【0002】

本発明は培養プレートに関し、より詳しくは、表面自由エネルギー調節が可能な高分子薄膜コーティングを含む培養プレートとその製造方法及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造する方法に関する。 10

【背景技術】

【0003】

再生医学で組織工学的治療は生分解性高分子を基盤に細胞を培養して組織を再建し、損傷されるか、または機能不全に陥った臓器に移植して正常に機能するようとする治療法に発展している。しかしながら、生分解性高分子支持体が移植された時、免疫反応及び生分解性高分子の分解による炎症反応などの問題点を避けることはできない（非特許文献1）。他の方法には、細胞を生分解性高分子溶液に混ぜて人体に注入する方法があるが、この過程中、細胞のECM（Extra Cellular Matrix：細胞外マトリックス）が破られて、ターゲット組織に移植した時、細胞再生効率が格段に低下するようになる（非特許文献2）。 20

【0004】

支持体無しで細胞を移植するために細胞シートが開発されており（非特許文献3）、現在最も多く使われる方法は日本のTeruo Okanoにより開発された技術であって、ポリスチレン（polystyrene）培養皿の表面に電子ビーム照射により温度感応型高分子ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAm）を20nm以下の厚さで共有結合させるものである（非特許文献4～5、特許文献4）。温度感応型培養皿は表面の下限臨界温度（lower critical solution temperature、LCST）以上では細胞が付着して細胞シートを形成し、下限臨界温度以下では高分子が膨潤して細胞をシート形態に回収することができる（非特許文献6）。しかしながら、この方式は細胞の温度を20℃以下に下げなければならず、表面の化学的機能基を変えることに多くの制約があり、製作方法が難しいだけでなく、多くの時間がかかる等の限界点により汎用性及び商用化が困難な問題がある（非特許文献7）。 30

【0005】

温度感応型培養皿以外に、電気刺激、超音波刺激、pH感応型を用いた研究が進められたが、電気刺激及び超音波効果を発生させるためには主に金属物質（Au、Ag、またはCNT）を使用しなければならないので、細胞培養用基板を製作するに当たって、コーティング方法に難しさが発生し、また高価の装備が必要であるので使用の限界点が発生する（非特許文献8～13）。 40

【0006】

また、細胞シートを製作したとしても、これを実際に臨床的に適用するためにはシートを積層する過程が反復的に必要であり、これを効率よく適用しようとする部位に転写可能でなければならない。しかしながら、今まで知られている方法は相变らず積層と転写（transfer）時、再現性が不足し、過程が複雑で、消耗時間が長いという短所がある。特に、既存の大部分の細胞シート転写方法は多数枚の細胞シートを一度に転写するよりは、単層の細胞シートを個別的に転写して積層する方法を選択した。したがって、よりやさしくて速く細胞シートを積層すると共に、他の基板及び疾病モデルなどに転写することができる新たな細胞シートの転写方法開発に対する必要性が提起されている実状である。 50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】大韓民国登録特許10-1583159

【特許文献2】大韓民国出願特許10-2016-0056040

【特許文献3】大韓民国登録特許10-2006-0091301

【特許文献4】米国特許出願公開第2008/0131476号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Ronneberger B et al., J Biomed Mater Res, 1996, 30 (1), 31-40 10

【非特許文献2】Canavan H et al., J Biomed Mater Res A, 2005 Oct 1; 75 (1): 1-13

【非特許文献3】Yang J et al., Biomaterials, 2005 Nov; 26 (33): 6415-22

【非特許文献4】Tang J et al., Polymers, 2012, 4, 1478-1498

【非特許文献5】Yang J et al., Biomaterials, 2007; 28 (34): 5033-5043

【非特許文献6】Haraguchi, Y. et al., Nat. Protoc., 2012, 7, 850-858 20

【非特許文献7】Akiziyama, Y. et al., Langmuir, 2004, 20, 5506-5511

【非特許文献8】Guillaume-Gentil O et al., Adv. Mater., 2008, 20, 560-565

【非特許文献9】Guillaume-Gentil O et al., Biomaterials, 2011, 32, 4376-4384

【非特許文献10】Hong Y, et al., Biomaterials, 2013, 34 (1), 11-18

【非特許文献11】L. Junge et al., Ultrasound in Med. & Biol., 2003, 29, 1769-1776 30

【非特許文献12】Sada T et al., ACS Nano, 2011, 5, 4414-4421

【非特許文献13】Kolesnikova T et al., ACS Nano, 2012, 6, 9585-9595

【0009】

本明細書の全体に亘って多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容はその全体として本明細書に参照として挿入されて、本発明が属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは前記の問題点を解決するために、例の努力した結果、細胞と培養表面の接着力に影響を与える表面自由エネルギー (surface free energy) を調節することによって、多様な形態に細胞シートの形成及び分離が可能であるだけでなく、細胞外マトリックス (extracellular matrix) が含まれた状態で回収されるので、細胞シートの積層が可能であるということを確認した。また、開始剤を用いた化学気相蒸着法 (initiated chemical vapor deposition: iCVD) による培養プレートのコーティングは気相蒸着工程であるので、基板の制約がなく、比較的短い時間に多様な機能性高分子をコーティングすることがで

きるので、汎用性及び商用化において大きな長所を有しているだけでなく、共重合体コーティングを通じて表面自由エネルギーを調節して細胞シートを形成することができることを確認し、本発明を完成するに至った。

**【0011】**

したがって、本発明の目的は、培養プレートを提供することにある。

**【0012】**

本発明の他の目的は、細胞シート形態の細胞集合体製造方法を提供することにある。

**【0013】**

本発明の更に他の目的は、開始剤を用いた化学気相蒸着法を用いて培養プレート表面改質方法を提供することにある。

10

**【0014】**

本発明の目的は以上から言及した目的に制限されず、言及されていない本発明の他の目的及び長所は以下の説明により理解されることができ、本発明の実施形態により、より明らかに知るようになる。また、本発明の目的及び長所は請求範囲に示した手段及び組合せにより実現できることが容易に分かる。

**【課題を解決するための手段】**

**【0015】**

本発明の一態様によれば、本発明は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートを提供する。

20

**【0016】**

本明細書で使われた表現、“表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体”は表面自由エネルギーが $60\text{ mJ/m}^2$ 以下である単量体を意味する。“表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体”は表面自由エネルギーが $60\text{ mJ/m}^2$ 以上である単量体を意味する。また、“第1単量体と第2単量体が形成した共重合体”は、前記第1単量体と第2単量体を用いて形成された表面自由エネルギーが $30\text{ mJ/m}^2 \sim 90\text{ mJ/m}^2$ である共重合体を意味する。

**【0017】**

本発明によれば、培養プレートの表面自由エネルギーが第1単量体または第2単量体により形成された同種重合体(homopolymer)を通じて $30\text{ mJ/m}^2 \sim 90\text{ mJ/m}^2$ で具現される場合を意味することもある。

30

**【0018】**

本明細書で使われた表現、“表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレート”は、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートの一部分である場合(例えば、前記共重合体で表面がコーティングされた培養プレート)を意味するだけでなく、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体自体を培養プレートに使用できることを意味するために使われる。

40

**【0019】**

本明細書で、第1単量体は細胞付着の弱い低い表面自由エネルギーを有する単量体である。例えば、芳香族ビニル系単量体(例えば、ジビニルベンゼン(divinylbenzene)、ビニルベンゾエート(vinyl Benzoate)、スチレン(styrene)など)、メタアクリレート系単量体(例えば、ベンジルメタクリレート(benzyl Methacrylate)、シクロヘキシリメタクリレート(cyclohexyl Methacrylate)、ブチルメタクリレート(butyl methacrylate)、イソプロピルメタクリレート(isopropyl methacrylate)、エチレングリコールジメタクリレート(ethylene glycol dimethacrylate)、ヒドロキシエチルメタクリレート(hydroxy

50

ethyl methacrylate)、フッ素系列单量体(フルフリルメタクリレート(furfuryl methacrylate)、パーフルオロデシルアクリレート(perfluorodecyl acrylate))、ビニル基を有するシラザンまたはシクロシラザン(例えば、2,4,6,8-テトラメチル(tetramethyl)-2,4,6,8-テトラビニルシクロヘキサン(tetravinylcyclohexane)、1,3,5-トリビニル(trivinyl)-1,3,5-トリメチルシクロトリシロキサン(trimethylcyclotrisiloxane)、ヘキサビニルジシロキサン(hexavinylidisisiloxane)など)、エポキシ作用基を有する单量体(グリシジルメタクリレート(Glycidyl methacrylate)など)、架橋剤に使われる单量体(エチレングリコールジメタクリレート(Ethylene glycol dimethacrylate)、エチレングリコールジアクリレート(Ethylene glycol diacrylate)、ジ(エチレングリコール)ジビニルエーテル(Di(ethylene glycol) divinyl ether)など)で構成された群より選択される单量体でありうる。10

#### 【0020】

本明細書で、第2单量体は細胞付着の強い高い表面自由エネルギーを有する单量体である。例えば、ビニル系アミン(2-ビニルピリジン(vinylpyridine)、4-ビニルピリジン(vinylpyridine)、1-ビニルイミダゾール(vinylimidazole)、1-ビニルピロリドン(vinylpyrrolidone)、2-ビニルピリジン(vinylpyridine)、4-アミノスチレン(aminostyrene)、9-ビニルカルバゾール(vinylcabazole)など)、メタアクリレート系アミン(2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート((Dimethylamino)ethyl methacrylate)、ジエチルアミノエチルアクリレート(diethylaminoethyl acrylate)、ジメチルアミノエチルアクリレート(dimethylaminoethyl acrylate)、ジエチルアミノエチルアクリレート(diethylaminoethyl acrylate)など)、酸性の作用基を有する单量体(マレイックアンハイドライド(Maleic anhydride)、メタアクリル酸(Methacrylic acid)など)、アクリルアミド(acrylamide)、メタクリルアミド(methacrylamide)、塩素系列作用基を有する单量体(4-ビニルベンジルクロライド(Vinylbenzyl chloride)、2-クロロエチルアクリレート(chloroethyl acrylate)など)、シアノ系列单量体(シアノエチルアクリレート(cyanoethyl acrylate)、ビニルベンジルシアニド(vinylbenzyl cyanide)など)、ビニル-N-メチルピリジニウムクロリド(vinyl-N-methylpyridinium chloride)で構成された群より選択される单量体でありうる。20

#### 【0021】

本発明において、第1单量体と第2单量体が形成する共重合体形成時、混合割合の制限はない。第1单量体と第2单量体の混合割合は1%~99%まで調節可能である。30

#### 【0022】

したがって、本発明の一具現例によれば、第1单量体は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする单量体であり、第2单量体は表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする单量体である。40

#### 【0023】

1つの特定例によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1单量体はジビニルベンゼン(divinylbenzene(以下、「DVB」と命名する))であり、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2单量体は4-ビニルピリジン(4-vinylpyridine(以下、「4VP」と命名する))であり、前記第1单量体と第2单量体が形成した共重合体はジビニルベンゼン-4-ビニルピリジ50

ン共重合体 (Poly (divinylbenzene - co - 4 - vinylpyridine)) (以下、「PD4V」と命名する) である。

#### 【0024】

本発明の他の具現例によれば、前記表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体上で細胞を培養することによって、細胞シート形態の細胞集合体を製造することができる(図1)。

#### 【0025】

本発明の他の態様によれば、本発明は本発明の培養プレートで細胞を培養するステップを含む細胞シート形態の細胞集合体製造方法を提供する。

10

#### 【0026】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は開始剤を分解して遊離ラジカル (free radical) を形成するステップと、遊離ラジカルにより第1単量体と第2単量体を重合反応させて共重合体を形成するステップと、培養プレートに共重合体が蒸着されて薄膜を形成するステップとを含む化学気相蒸着法を用いた培養プレート表面改質方法を提供する。

#### 【0027】

本明細書で、化学気相蒸着法は開始剤を用いた化学気相蒸着法 (initiated chemical vapor deposition: iCVD) を用いることができ、開始剤はTBPO (tert-butyl peroxide) を使用することができる。一方、開始剤は熱または電気により分解されて遊離ラジカルを生成し、前記遊離ラジカルにより第1単量体と第2単量体を活性化させることによって、前記単量体を連鎖重合反応させて共重合体を形成するようになり、前記共重合体が蒸着されて薄膜を形成することによって、培養プレートの表面を改質することができる。また、培養プレートの高分子薄膜の厚さは特別に制限されないが、例えば、5nm～500μmでありうる。支持体層の厚さがあまり薄いか厚ければ、薄膜形成の効率性と細胞培養のための薄膜表面の安定性に影響を及ぼすことがある。

20

#### 【0028】

一方、iCVDは高分子薄膜が蒸着される基板表面の温度が10～45の間に低く維持される低温及び低真空工程であるので、プラスチック材質の多様な培養プレート (35pi、100piディッシュ、6、12、24、96ウェルプレート) に損傷無しで多様な高分子コーティングが可能である。既存に使われるディップコーティング、スピンドローティングなどの液状工程は、溶媒による基板損傷問題、不均衡コーティングなどの問題を有しているので、iCVDを通じて培養プレートに製作すれば、既存のコーティング方法で不可能であったコーティング問題を解決することができる。

30

#### 【0029】

本発明によれば、前記培養プレートは細胞を培養することができる任意の空間を提供することで充分であるので、その形態は制限がない。例えば、培養プレートはディッシュ(培養皿)、シャーレやプレート(例えば、6ウェル、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、9600ウェルなどのマイクロタイタープレート、マイクロプレート、ディップウェルプレートなど)、フラスコ、チャンバースライド、チューブ、セルファクトリー、ローラーボトル、スピナーフラスコ、中空纖維 (hollow fibers)、マイクロキャリア、ビーズなどの形状を有することができる。また、支持性を有する物質であれば、前記培養プレートに制限無しで使用することができ、例えば、プラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンなど)、金属、シリコン、及びガラスなどの材質を培養プレートに使用することができる。本発明の一実施形態に従う培養プレートの構造は図1に図示されている。

40

#### 【0030】

本発明の一具現例によれば、第1単量体は表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする単量体であり、第2単量体は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにす

50

る単量体である。

【0031】

1つの特定例によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体はDVBであり、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体は4VPであり、前記第1単量体と第2単量体が形成した共重合体はPD4Vである。

【0032】

他の1つの特定例によれば、図2に開示されたように、iCVDにより共重合体蒸着時、第1単量体であるDVBと第2単量体である4VPの注入割合によって細胞シート(cell sheet)形態または細胞スフェロイド(cell spheroid)形態の細胞集合体に培養することができ、DVB注入割合が高いほどスフェロイド形態の細胞集合体に培養することに適合した培養プレート表面改質が可能であり、DVB対4VPの注入割合が増加するほどシート形態の細胞集合体に培養することに適合した培養プレート表面改質が可能である。一方、単量体の注入割合を調節すれば、接触角と表面エネルギーが異なる培養プレート表面を製作することができ、各共重合体コーティング表面のエネルギーによって細胞と培養プレート表面との接着力が変わって、各々異なる形態に細胞が育つようになり、温度変化無しで培養プレート表面から細胞シート形態の細胞集合体を分離することができる。

【0033】

本発明の培養プレート上で多様な細胞を培養して細胞シートを形成することができる。培養される細胞は本発明で特別に限定されず、例えば、心臓、筋肉、肝、骨、骨髄、胸腺、腎臓、脾臓、肺、脳、精巣、卵巣、ラングルハンス島(islet)、内臓、耳、皮膚、胆嚢組織、前立腺、膀胱、胚芽(embryo)、免疫系、及び造血系などから分離または活性化できる細胞を使用することができる。好ましくは、各種の幹細胞、角膜上皮細胞、神経細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、纖維芽細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、腎臓細胞、肝細胞、脂肪細胞、角質細胞、筋肉細胞、心臓筋肉細胞、または食道上皮細胞を含む。

【0034】

本発明の他の態様によれば、本発明はホール構造体を用いた細胞シート形態の細胞集合体の積層及び転写(transferring)方法を提供する。

【0035】

前記細胞集合体の積層及び転写方法は、次のステップを含むことができる：

(a) 細胞シート形態の細胞集合体をホール構造体(structure with holes)の表面に1層以上付着するステップ；及び

(b) 細胞集合体の適用を必要とする部位に細胞集合体が付着された面が対向するようにホール構造体を配置した後、ホール構造体のみを剥離するステップ。

【0036】

本発明の一具現例によれば、前記ホール構造体は細胞シート形態の細胞集合体を、適用を必要とする場所または部位に容易に適用できるように細胞集合体を載置することができるメンブレン形態の構造物をいう。前記ホール構造体は、例えばニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、ポリビニリデンフルオライド(Polyvinylidene fluoride)(PVDF)メンブレン、ポリテトラフルオロエチレン(Polytetrafluoroethylene)(PTFE)メンブレン、ポリカーボネート(poly carbonate)メンブレン、MCE(mixed cellulose ester)メンブレン、ポリアマイドメンブレン、及びPES(Polyether sulfone)メンブレンからなる群より選択されたものであって、1つ以上の孔があることなどがありうるが、これに限定されるものではなく、当業界で使われができる多様な種類のメンブレンを制限無しで使用できることを特徴とする方法。

【0037】

本発明の一具現例によれば、前記ホール構造体は1つ以上の孔があるものが好ましく、孔の個数と形態には制限がないし、孔のサイズは細胞シート形態の細胞集合体をメンブレンの孔の上に上げて置いても下に通過されなければ制限がない。

**【0038】**

本発明の他の一具現例によれば、前記ホール構造体を細胞集合体から剥離する時、細胞集合体が付着された面の反対面に磷酸緩衝溶液、または細胞培養培地を点滴するステップを追加的に含むことができる。

**【0039】**

前述した細胞集合体の転写方法で使われたホール構造体の構造的特徴は構造体上に孔が形成されているということで、前記孔は細胞シートとメンブレンとの間の過度な付着力を防止すると共に、効果的な転写が可能であるようにする。

**【0040】**

第一に、孔が生じるようになれば、メンブレンとシートとの間の接触面積が相対的に減って、絶対的な付着力が少なくなり、転写が容易になる。

10

**【0041】**

第2に、転写時、孔を通じて磷酸緩衝溶液や細胞培養液を少量流せば、細胞シートとメンブレンが互いによりよく離れることができる。

20

**【発明の効果】****【0042】**

前記のような本発明によれば、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートとその製造方法、及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造する方法を提供することによって、従来技術と比較して易しく簡単な工程により細胞シート形態の細胞集合体を生産及び分離回収することができる効果がある。

20

**【図面の簡単な説明】****【0043】**

【図1】本発明の一実施形態に従う培養プレートの構造である。

30

【図2】本発明の単量体注入割合に従う細胞集合体形態に対する模式図である。

【図3】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子(pDVB)、第2単量体高分子(p4VP)、共重合体であるpD4Vがコーティングされた表面の化学的構造をFT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy)で分析した結果である。

30

【図4】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子(pDVB)、第2単量体高分子(p4VP)、共重合体であるpD4Vがコーティングされた表面の接触角(contact angle)と表面自由エネルギー(surface free energy)を測定した結果である。

【図5】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子(pDVB)、第2単量体高分子(p4VP)、共重合体(pD4V)がコーティングされた表面で培養された細胞(NIH3T3)の顕微鏡イメージ結果である。

40

【図6】本発明の培養プレートで培養された細胞シート形態がバッファ(buffer)により自発的に離れて出るイメージである。

【図7】本発明の一実施形態で製造されたpD4Vがコーティングされた表面で成体幹細胞シート(hMSC cell sheet)が形成され、自発的に分離回収される過程を示す光学的及び蛍光顕微鏡イメージである。

40

【図8】本発明の細胞シートをホール構造体上に積層させ、基板や疾病モデルなど、細胞シートの適用を必要とする個所に適用する過程を示した模式図である。

50

【図9】本発明の培養プレートで形成された細胞シートを分離回収して2つの細胞シートを積層して置いたイメージである。

**【発明を実施するための形態】****【0044】**

本発明の前述した目的、特徴、及び長所は添付した図面を参照して後述されている詳細な説明を通じてより明確になり、それによって、本発明が属する技術分野で通常の知識を

50

有する者が本発明の技術的思想を容易に実施することができる。また、本発明を説明するに当たって、本発明と関連した公知技術に対する具体的な説明が本発明の要旨を不必要に曖昧にすることがあると判断される場合に、その詳細な説明を省略する。以下、添付した図面を共に参照して、本発明に従う好ましい実施形態を詳細に説明する。

#### 【実施例】

##### 【0045】

###### 実施形態1. 培養プレートの製造

pD4V蒸着時、化学気相蒸着反応器(iCVD、Daeki Hi-Tech Co., Ltd.)を使用して、DVB(ジビニルベンゼン)単量体(Sigma-Aldrich)、4VP(4-ビニルピリジン)単量体(Sigma-Aldrich)と開始剤(tert-ブチルペルオキシド、TBPO、Sigma-Aldrich)を60:240:60の割合でiCVD反応器内に流しながら、反応器内のフィラメントの温度は140°C、反応器内の基板温度は23°C、反応器内チャンバーの圧力は300mTorrに維持しながら1時間30分蒸着を遂行して、400nm厚さのDVB-4VP共重合体(npD4V)が蒸着された培養プレートを得た。  
10

##### 【0046】

###### 実施形態2. 細胞シート培養プレート表面分析

重合体薄膜を蒸着した後、フーリエ変換赤外線分光学(FT-IR、ALPHA FT-IR吸光モード、Bruker Optics)を用いて重合体の分子骨格及び分率を測定した。その結果、図3に示したように、1596cm<sup>-1</sup>と1415cm<sup>-1</sup>(左側2つの点線)ピークを通じて4VP分子の存在を、710cm<sup>-1</sup>と903cm<sup>-1</sup>(右側2つの点線)ピークを通じてDVB分子の存在及び重合体合成を確認した。  
20

##### 【0047】

重合体薄膜を蒸着した後、接触角測定装置(Contact Angle Analyzer(Phoenix 150、SEO, Inc.))を用いて5μlの蒸溜水とダイアイオドメタン(Diodomethane、DIM)に対して基板の表面接触角を測定した。その結果、図4に示したように、単量体の混合割合によって形成された重合体により表面が改質されて接触角が変わることを確認することができた。これに基づいてVan Oss-Chaudhury-Good(OCG)数式を用いて基板の表面自由エネルギーを計算した。その結果、重合体の分率によって表面自由エネルギー値が変わることを確認した。  
30

##### 【0048】

###### 実施形態3. 共重合体分率に従う細胞形態観察

DVB-4VP共重合体(npD4V)がコーティングされている細胞培養皿にNIH3T3細胞を培養した後、細胞シート形成有無を確認した。細胞が十分に育った時、4%ホルムアルデヒドで固定し、DAPIとファロイジン(phalloidin)を用いて核とアクチンを染色して蛍光顕微鏡で観察した。図5に示したように、全ての培養プレートで細胞が毒性無しでよく育つことが確認されており、DVB培養表面では細胞スフェロイド(spheroids)が形成され、4VP培養表面では細胞が付着されて育つことが観察された。一方、共重合体培養表面(pD4V1、pD4V2)では細胞が付着されて育ったが、DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)を用いて洗浄した後に、自ずから細胞シート形態に離れて出ることが観察された。  
40

##### 【0049】

###### 実施形態4. 細胞シート形成及び分離

前記実施形態1により製造されたpD4Vが蒸着された35piディッシュでNIH3T3とhMSCを培養後、細胞シート形成を確認した。細胞培養はNIH3T3細胞をDMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)/10%FBS/1%抗生素(ペニシリンストレプトマイシン、Gibco)で、hMSC細胞はMEM(Minimum Essential Medium)/17%FBS  
50

S / 1 % 抗生剤（ペニシリンストレプトマイシン、Gibco）培地を使用し、3日～5日培養したら細胞シートが形成された。この際、培養液を除去し、DPBS（Dulbecco's Phosphate buffered saline）で洗浄すれば、形成された細胞シートが培養プレート表面から自発的に分離されて出ることを確認することができた（図6及び図7）。

#### 【0050】

実施形態5. 培養プレートで形成された細胞シートを分離回収後、細胞シートの積層方法

細胞シートを製造するためには、pD4V重合体がコーティングされている細胞培養プレートに細胞を培養して細胞間の接合が十分に起こることができるまで培養した後、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 溶液を用いて培養した細胞をシート形態に分離すればよい。培養皿上で剥離した1枚の細胞シートを吸引して新たな細胞培養皿に移した後、37℃飽和水蒸気のインキュベーターに適当な時間（例えば、15分間～30分間）放置した。その間に細胞シートは培養皿上に接着した。次に、剥離した直後の2番目の細胞シートを培養液と共にピペットで吸引して、培養皿上に固定された最初の細胞シートの上に滴下した。滴下した2枚のシートに、また新たな培養液をゆっくり滴下することによって、2番目のシートを最初のシートに重なった状態で接合することができた。同一な手法を繰り返して細胞シートを順に積層化することができた。

#### 【0051】

実施形態6. 細胞シートを積層後、転写時、ホール構造体を用いる方法

本発明により製作された前記細胞シートを積層し、これを他の細胞培養皿または細胞シートの適用を必要とする客体に一層容易に転写（transfer）するために、次のような方法を使用した。

#### 【0052】

まず、図8に示したように、培養皿上で剥離した1枚の細胞シートをホール構造体（例えば、1つ以上の孔があるニトロセルロースメンブレン）の表面に滴下して付着させた。次に、剥離した他の細胞シートを前記ニトロセルロースメンブレンに先に付着された細胞シートの表面に追加的に滴下して付着させることによって、2枚の細胞シートを積層した。同一な方法を繰り返すと、所望の数の細胞シートをメンブレンに積層することができる。

#### 【0053】

前記積層した2枚の細胞シートをメンブレンと共に新たな細胞培養皿に移した後、37℃飽和水蒸気のインキュベーターに適当な時間（例えば、5分間～30分間）インキュベーションした。その結果、積層された細胞シートは培養皿上に接着され、ホール構造体メンブレンから落ちる。このように、細胞シートをホール構造体に積層して所望の個所に転写（transfer）することが可能である。

#### 【0054】

以上で説明した本発明は、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者において、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内でさまざまな置換、変形、及び変更が可能であるので、前述した実施形態及び添付した図面により限定されるものではない。

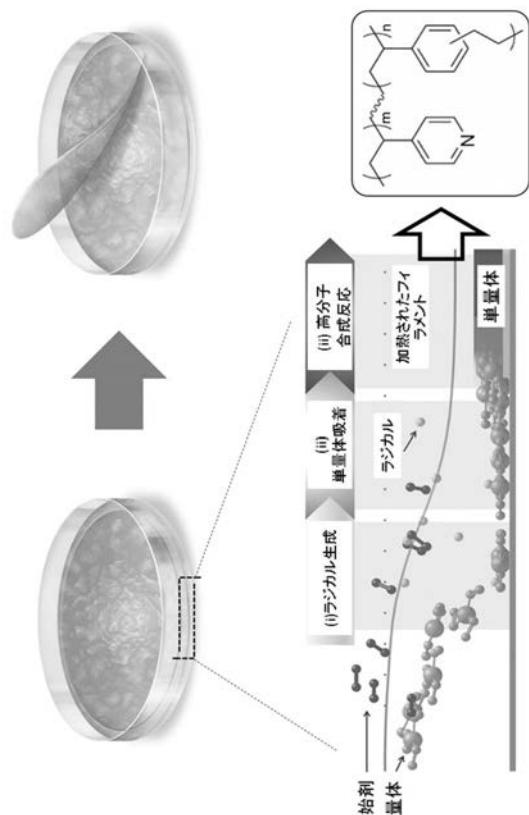
10

20

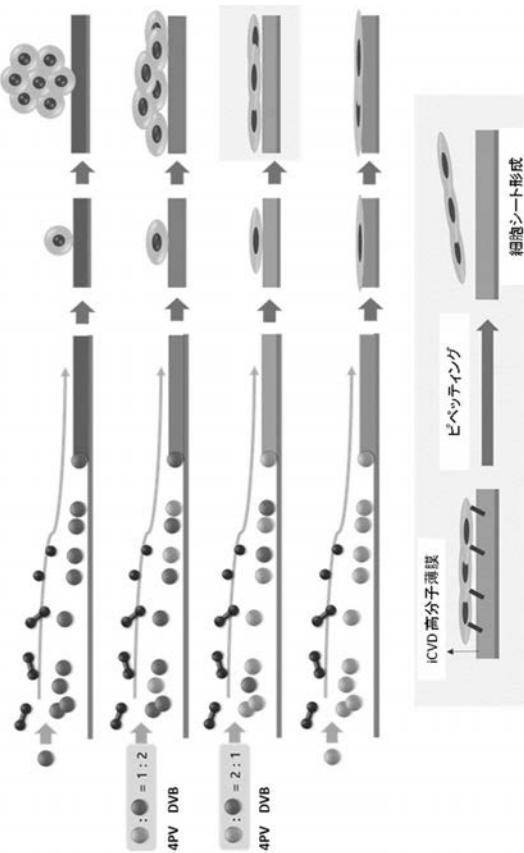
30

40

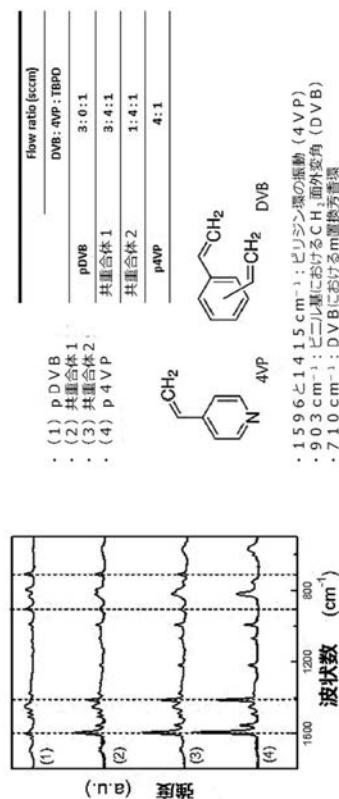
【図1】



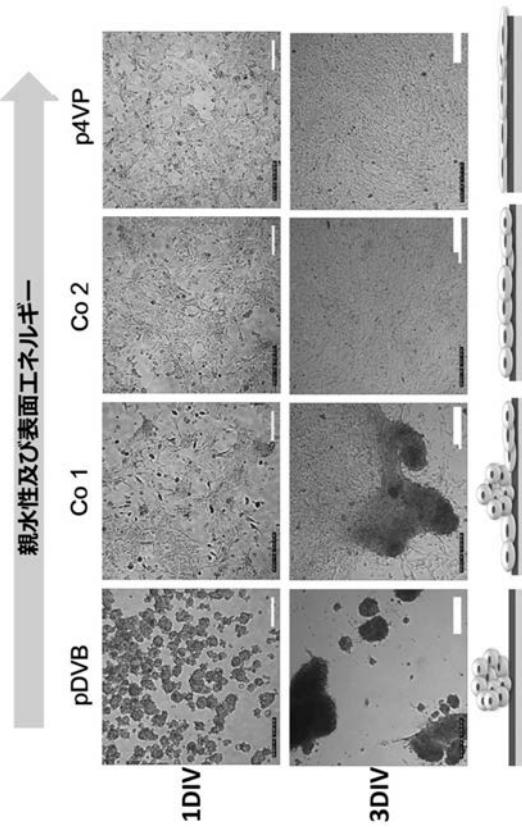
【図2】



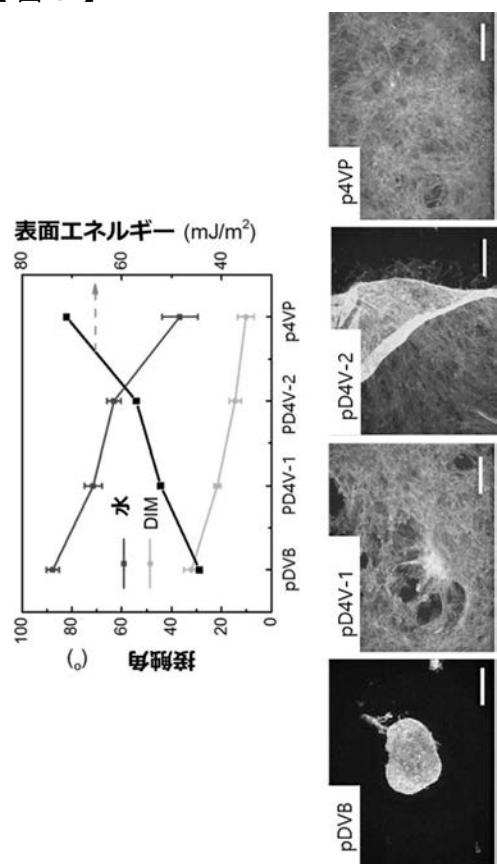
【図3】



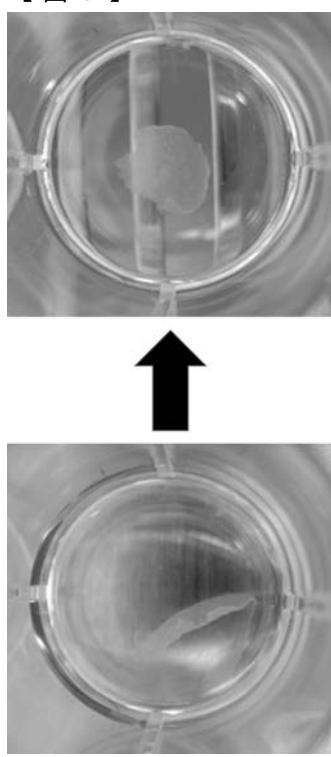
【図4】



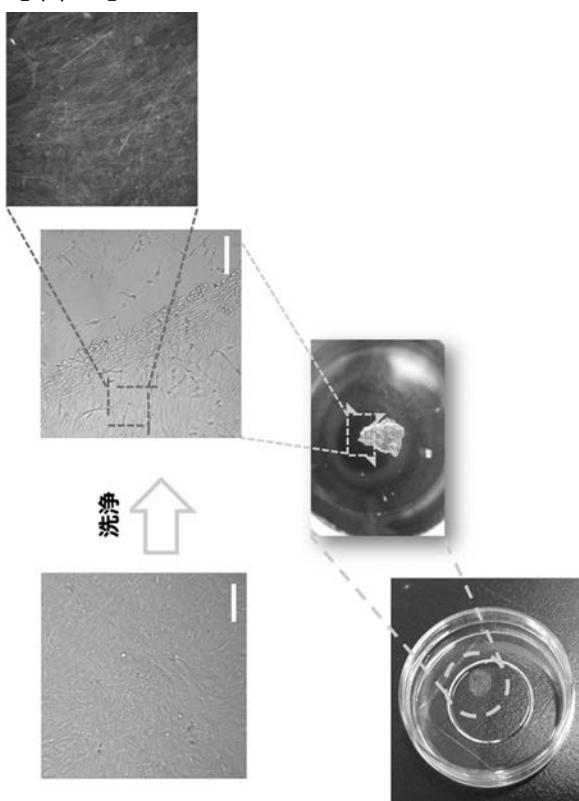
【図5】



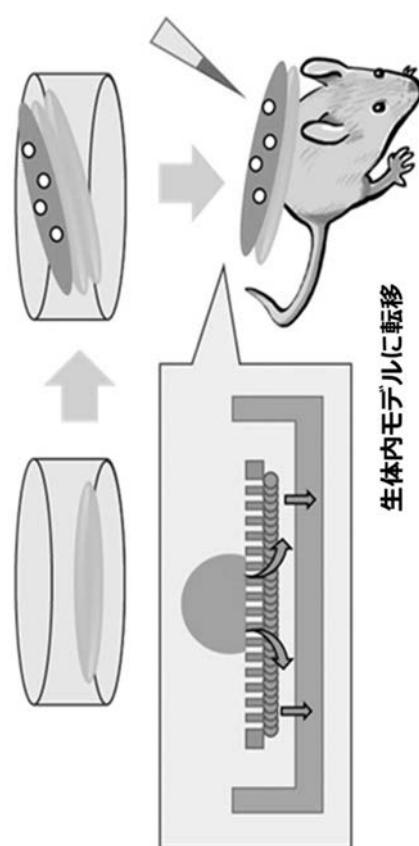
【図6】



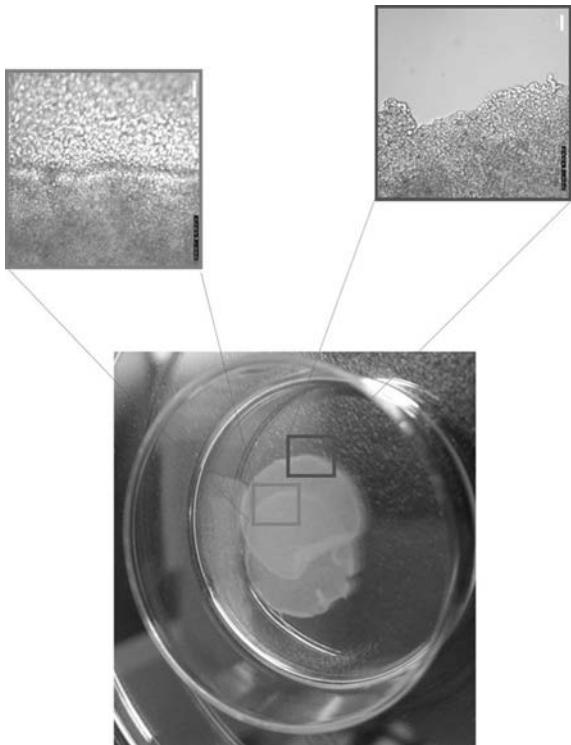
【図7】



【図8】



【図9】



## 【手続補正書】

【提出日】平成31年2月20日(2019.2.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0024】

本発明の他の具現例によれば、前記表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体上で細胞を培養することによって、細胞シート形態の細胞集合体を製造することができる(図1)。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0030】

本発明の一具現例によれば、第1単量体は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようとする単量体であり、第2単量体は表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようとする単量体である。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

**【補正の内容】****【0042】**

前記のような本発明によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートとその製造方法、及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造する方法を提供することによって、従来技術と比較して易しく簡単な工程により細胞シート形態の細胞集合体を生産及び分離回収することができる効果がある。

**【手続補正4】**

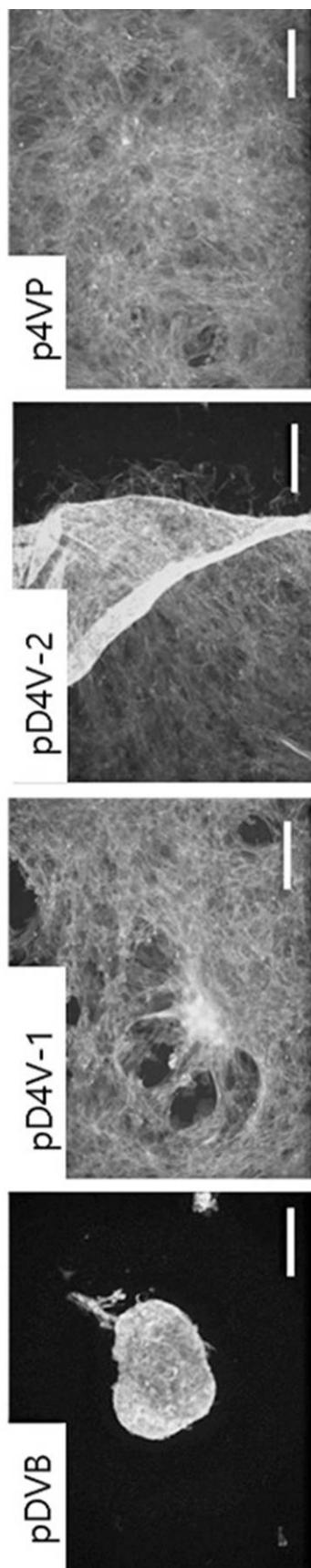
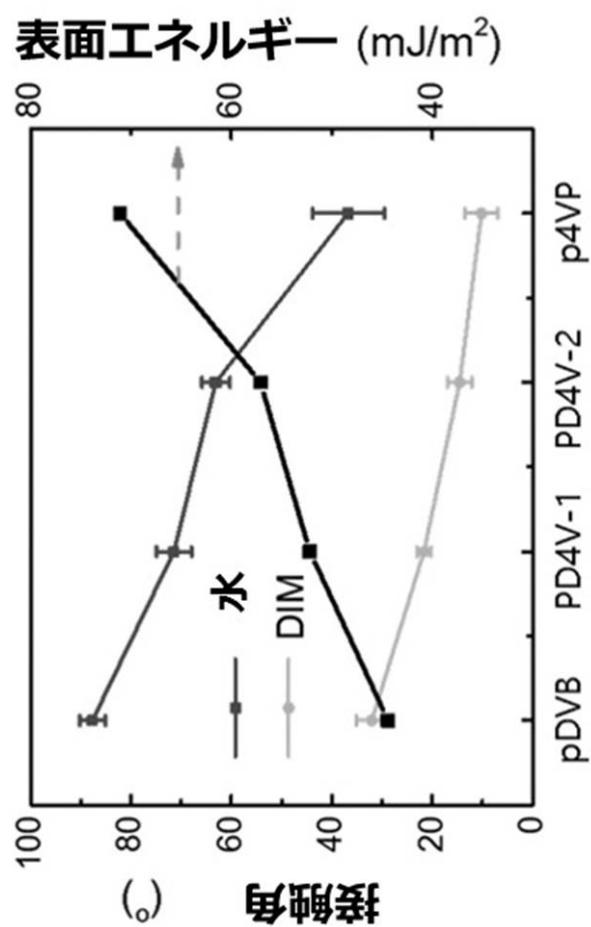
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図4】



【手続補正5】

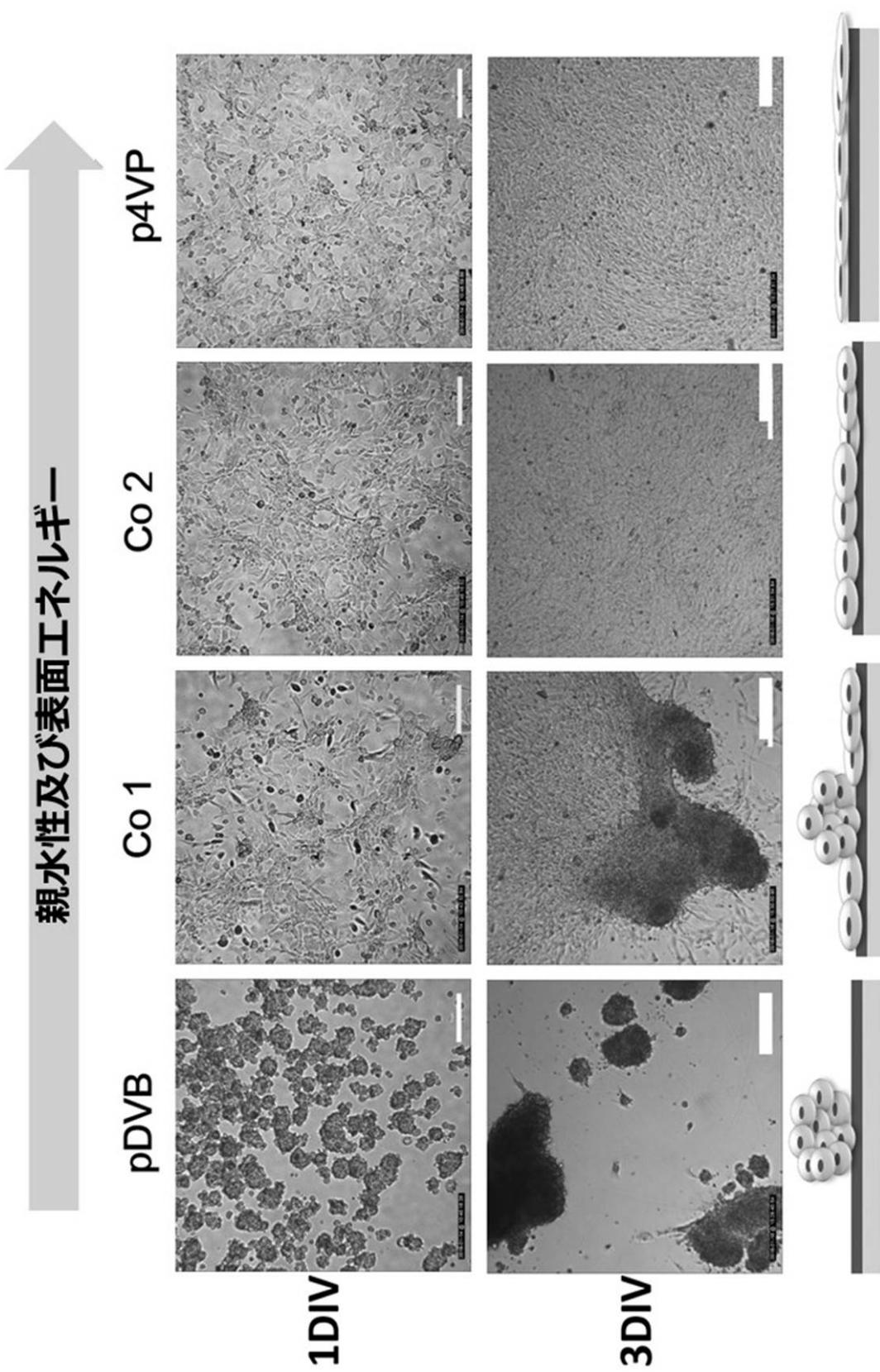
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図5】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2017/007195
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 5/00(2006.01)i, C08F 212/36(2006.01)i, C08F 226/06(2006.01)i, C23C 16/452(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N 5/00; A61F 2/02; C12N 5/06; C12N 5/077; C12N 5/074; C12M 1/18; C08J 7/18; C08F 212/36; C08F 226/06; C23C 16/452</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: surface free energy, culture plate, copolymer, sheet typed cell-aggregate</i>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0142564 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 22 December 2015 See figure 10; paragraphs [0021]-[0022], [0027], [0114] and [0117].	1-8,10-11,13-20
Y		21
A		9,12,22-24
X	KR 10-2015-0033697 A (POLYMERS CRC LIMITED) 01 April 2015 See claims 1 and 19-20; paragraphs [0003], [0011], [0046]-[0047] and [0142].	1-3,5-6,8-12
Y		21
A		4,7,13-20,22-24
X	US 2015-0032223 A1 (MIYAGAWA, Shigern et al.) 29 January 2015 See claims 1 and 11.	22-24
A	KR 10-2011-0005682 A (GERON CORPORATION et al.) 18 January 2011 See claims 1 and 8.	1-24
A	WO 2007-125288 A1 (UNIVERSITY OF DURHAM) 08 November 2007 See the entire document.	1-24
<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>13 DECEMBER 2017 (13.12.2017)</b>	Date of mailing of the international search report <b>13 DECEMBER 2017 (13.12.2017)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer  Telephone No.	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/KR2017/007195

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 21 pertain to a culture plate, a method for preparing a cell aggregate having a cell sheet form, and a method for reforming a culture plate surface,  
Claims 22 to 24 pertain to a method for transferring a cell aggregate having a cell sheet form.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/KR2017/007195**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0142564 A	22/12/2015	JP 2017-517267 A US 2017-0130195 A1 WO 2015-190644 A1	29/06/2017 11/05/2017 17/12/2015
KR 10-2015-0033697 A	01/04/2015	AU 2013-284282 A1 CA 2877757 A1 CN 104603189 A EP 2867285 A1 EP 2867285 A4 JP 2015-527428 A US 2015-0191693 A1 WO 2014-000052 A1	22/01/2015 03/01/2014 06/05/2015 06/05/2015 03/03/2016 17/09/2015 09/07/2015 03/01/2014
US 2015-0032223 A1	29/01/2015	EP 2692852 A1 EP 2692852 A4 JP 2014-075979 A JP 5816452 B2 JP 5943907 B2 WO 2012-133900 A1	05/02/2014 01/10/2014 01/05/2014 18/11/2015 05/07/2016 04/10/2012
KR 10-2011-0005682 A	18/01/2011	AU 2009-209157 A1 AU 2009-209157 B2 CA 2712891 A1 CN 101939418 A CN 105400735 A EP 2247718 A1 JP 2011-510658 A JP 2014-236741 A JP 2016-171808 A JP 5933647 B2 KR 10-2016-0117630 A US 2009-0191633 A1 US 2012-0276626 A1 US 2014-0134725 A1 US 2016-0137983 A1 US 8241907 B2 US 8563312 B2 US 9243229 B2 US 9745550 B2 WO 2009-097411 A1	06/08/2009 11/06/2015 06/08/2009 05/01/2011 16/03/2016 10/11/2010 07/04/2011 18/12/2014 29/09/2016 15/06/2016 10/10/2016 30/07/2009 01/11/2012 15/05/2014 19/05/2016 14/08/2012 22/10/2013 26/01/2016 29/08/2017 06/08/2009
WO 2007-125288 A1	08/11/2007	AU 2007-245453 A1 AU 2007-245453 B2 CA 2650488 A1 CN 101484574 A EP 2018418 A1 EP 2018418 B1 JP 2009-535025 A JP 2014-097068 A	08/11/2007 28/11/2013 08/11/2007 15/07/2009 28/01/2009 10/12/2014 01/10/2009 29/05/2014

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/007195**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		MX 2008013885 A US 2010-0048411 A1	11/02/2009 25/02/2010

국 제 조 사 보 고 서	국제출원번호 PCT/KR2017/007195	
<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>C12N 5/00(2006.01)i, C08F 212/36(2006.01)i, C08F 226/06(2006.01)i, C23C 16/452(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/00; A61F 2/02; C12N 5/06; C12N 5/077; C12N 5/074; C12M 1/18; C08J 7/18; C08F 212/36; C08F 226/06; C23C 16/452		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌판에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌판에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전자 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 표면자유에너지, 배양 플레이트, 공중합체, 시트형 세포집합체		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	KR 10-2015-0142564 A (한국과학기술원) 2015.12.22 도면 10; 단락 [0021]-[0022], [0027], [0114] 및 [0117] 참조.	1-8, 10-11, 13-20 21 9, 12, 22-24
X Y A	KR 10-2015-0033697 A (풀리머스 씨알씨 리미티드) 2015.04.01 청구항 1 및 19-20; 단락 [0003], [0011], [0046]-[0047] 및 [0142] 참조.	1-3, 5-6, 8-12 21 4, 7, 13-20, 22-24
X	US 2015-0032223 A1 (MIYAGAWA, SHIGERU 등) 2015.01.29 청구항 1 및 11 참조.	22-24
A	KR 10-2011-0005682 A (제론 코포레이션 등) 2011.01.18 청구항 1 및 8 참조.	1-24
A	WO 2007-125288 A1 (UNIVERSITY OF DURHAM) 2007.11.08 전체 문헌 참조.	1-24
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
<p>* 인용된 문헌의 특별 카테고리:</p> <p>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌</p> <p>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌</p> <p>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌</p>		
국제조사의 실제 완료일 2017년 12월 13일 (13.12.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 12월 13일 (13.12.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405	

국제조사보고서	국제출원번호 PCT/KR2017/007195
<b>제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)</b>	
<p>PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> 청구항: 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,</li> <li>2. <input type="checkbox"/> 청구항: 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,</li> <li>3. <input type="checkbox"/> 청구항: 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.</li> </ol>	
<b>제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)</b>	
<p>본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.</p> <p>청구항 1-21은 배양플레이트, 배양플레이트에서 배양된 세포 시트 형태의 세포 집합체 제조방법 및 배양플레이트 표면 개질방법에 관한 것이고,</p> <p>청구항 22-24는 세포시트 형태의 세포 집합체의 전사 방법에 관한 것입니다.</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.</li> <li>2. <input checked="" type="checkbox"/> 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.</li> </ol>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>4. <input type="checkbox"/> 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.</li> </ol>	
<b>이의신청에 관한 기재</b>	<input type="checkbox"/> 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다. <input type="checkbox"/> 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다. <input type="checkbox"/> 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 <b>PCT/KR2017/007195</b>	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0142564 A	2015/12/22	JP 2017-517267 A US 2017-0130195 A1 WO 2015-190644 A1	2017/06/29 2017/05/11 2015/12/17
KR 10-2015-0033697 A	2015/04/01	AU 2013-284282 A1 CA 2877757 A1 CN 104603189 A EP 2867285 A1 EP 2867285 A4 JP 2015-527428 A US 2015-0191693 A1 WO 2014-000052 A1	2015/01/22 2014/01/03 2015/05/06 2015/05/06 2016/03/03 2015/09/17 2015/07/09 2014/01/03
US 2015-0032223 A1	2015/01/29	EP 2692852 A1 EP 2692852 A4 JP 2014-075979 A JP 5816452 B2 JP 5943907 B2 WO 2012-133900 A1	2014/02/05 2014/10/01 2014/05/01 2015/11/18 2016/07/05 2012/10/04
KR 10-2011-0005682 A	2011/01/18	AU 2009-209157 A1 AU 2009-209157 B2 CA 2712891 A1 CN 101939418 A CN 105400735 A EP 2247718 A1 JP 2011-510658 A JP 2014-236741 A JP 2016-171808 A JP 5933647 B2 KR 10-2016-0117630 A US 2009-0191633 A1 US 2012-0276626 A1 US 2014-0134725 A1 US 2016-0137983 A1 US 8241907 B2 US 8563312 B2 US 9243229 B2 US 9745550 B2 WO 2009-097411 A1	2009/08/06 2015/06/11 2009/08/06 2011/01/05 2016/03/16 2010/11/10 2011/04/07 2014/12/18 2016/09/29 2016/06/15 2016/10/10 2009/07/30 2012/11/01 2014/05/15 2016/05/19 2012/08/14 2013/10/22 2016/01/26 2017/08/29 2009/08/06
WO 2007-125288 A1	2007/11/08	AU 2007-245453 A1 AU 2007-245453 B2 CA 2650488 A1 CN 101484574 A EP 2018418 A1 EP 2018418 B1 JP 2009-535025 A JP 2014-097068 A	2007/11/08 2013/11/28 2007/11/08 2009/07/15 2009/01/28 2014/12/10 2009/10/01 2014/05/29

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/007195**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

MX 2008013885 A 2009/02/11  
US 2010-0048411 A1 2010/02/25

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 8 J 7/04 (2006.01)	C 0 8 J 7/04	C E R Z
C 2 3 C 16/44 (2006.01)	C 0 8 J 7/04	C E Z
	C 2 3 C 16/44	A

(81) 指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(74) 代理人 100107733

弁理士 流 良広

(74) 代理人 100115347

弁理士 松田 奈緒子

(72) 発明者 スンガブ・イム

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72) 発明者 ウンジョン・リ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72) 発明者 ジウン・ペク

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72) 発明者 ヨンハク・チョ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72) 発明者 スンチョン・ユ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72) 発明者 コロ・チエ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

F ターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08 DG08 GA01 GB05 GB09

4B065 AA91X AC12 AC17 BC01 BC41 BC50 BD14 BD50 CA44 CA46

4F006 AB42 AB43 AB64 BA01 CA09 DA01

4K030 AA09 BA61 CA07 CA12 FA17 JA01 JA09 JA10 JA11