



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월16일
(11) 등록번호 10-1969115
(24) 등록일자 2019년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C08L 33/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C23C 16/30 (2006.01)
C23C 16/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/20 (2013.01)
C08L 33/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0179100
(22) 출원일자 2016년12월26일
심사청구일자 2016년12월26일
(65) 공개번호 10-2018-0075126
(43) 공개일자 2018년07월04일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008199962 A*
KR1020160000029 A
JP2016039796 A
임성갑, 개시제를 이용한 화학 기상 증착 고분자 박막과 그 응용, 고분자과학기술, 제22권3호, pp.242-247(2011.06.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
임성갑
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)
이은정
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

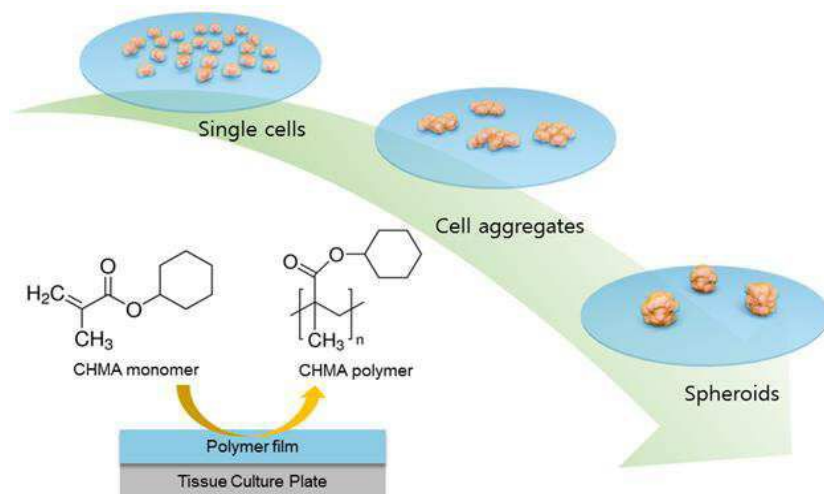
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 표면 상호작용을 통한 3차원 세포 스페로이드 제작을 위한 배양용기 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 표면 상호작용을 통한 3차원 세포 스페로이드 제작을 위한 배양용기 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 표면에 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 배양용기 및 이를 이용하여 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포 스페로이드의 제조방법, 개시제를 이용한 화학 기상 증착 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



법(iCVD)을 이용한 배양용기 표면의 개질방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 배양용기 표면에 증착된 고분자로부터 세포반응을 유도하여 3차원 세포 스페로이드를 형성하고, 배양용기 표면에 증착된 고분자 박막이 균일하고 안정성이 뛰어나며, 기존의 스페로이드 제작 방법과는 달리 비교적 간단하고 짧은 시간에 세포기능이 향상된 스페로이드를 제조할 수 있다. 또한, 다양한 배양용기에 고분자 코팅이 가능하므로 범용적인 플랫폼 기술이 되어, 세포의 기본 연구 및 질병 연구에서부터 이식 가능한 세포 치료제 개발까지 넓은 범위에 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0062 (2013.01)

C12N 5/0068 (2013.01)

C23C 16/30 (2013.01)

C23C 16/44 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

조영학

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

최고로

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

유승정

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

명세서

청구범위

청구항 1

표면에 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 이며, 두께는 5 nm 내지 1 μm 인 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 3차원 세포 스페로이드 제조용 배양용기

여기서, 상기 소수성 고분자 박막은 벤질 메타크릴레이트(Benzyl Methacrylate), 헥사비닐 디실록산(Hexavinyl Disiloxane) 및 디비닐벤젠(Divinylbenzene)으로 구성된 군에서 선택되는 단량체에 의해 형성된 동중중합체(homopolymer)인 것을 특징으로 함.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 배양용기의 소재는 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 또는 플라스틱인 것을 특징으로 하는 배양용기.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항의 배양용기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포 스페로이드의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포는 암세포, 줄기세포 또는 체세포인 것을 특징으로 하는 3차원 세포 스페로이드의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 세포는 동중세포 또는 이중세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포 스페로이드의

제조방법.

청구항 12

(a-1) 개시제를 분해하여 유리 라디칼(free radical)을 형성하는 단계;

(a-2) 형성된 유리 라디칼에 의해 벤질 메타크릴레이트(Benzyl Methacrylate), 헥사비닐 디실록산(Hexavinyl Disiloxane) 및 디비닐벤젠(Divinylbenzene)으로 구성된 군에서 선택되는 단량체의 연쇄중합반응으로 동종중합체를 형성하는 단계; 및

(a-3) 배양용기 표면에 동종중합체를 증착시켜 고분자 박막을 형성하는 단계;

를 포함하고, 상기 형성된 고분자 박막은 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 이며, 두께는 5 nm 내지 1 μm 인 것을 특징으로 하는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 3차원 세포 스페로이드 제조용 배양용기의 제조방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표면 상호작용을 통한 3차원 세포 스페로이드 제작을 위한 배양용기 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 표면에 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 배양용기 및 이를 이용하여 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포 스페로이드의 제조방법, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 배양용기 표면의 개질방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세포배양은 2차원적으로 이루어져 있으나, 생체 내 세포 및 조직은 3차원 구조를 통해 상호 작용하기 때문에 2차원 세포배양으로는 세포-기질, 세포-세포의 생체환경을 모사하는데 한계점이 있다(EKA et al., Stem cells, 24, 2006, 426-331; Cukierman et al., Science, 294, 2001, 1708-1712; Nelson et al., Annu Rev Cell Dev Biol, 22, 2006, 287-309). 따라서, 3차원 세포배양 연구가 활발히 진행되고 있고, 3차원 배양세포는 일반적인 단일 세포(single cell) 형태의 세포보다 체내에 이식 후 세포 생존율이 높고, 약물스크리닝 또한 임상효율을 높일 수 있는 결과를 줄 수 있다.

[0004] 세포는 접촉하는 표면에 따라 그 성장을 달리한다고 알려져 있으며, 세포와 표면의 화학적, 물리적인 상호작용을 통하여 실제 생체모델에 가까운 세포의 성질을 바꿀 수 있다고 알려져 있다. 특히, 암세포 또는 줄기세포는 다양한 생물학적, 화학적, 물리적인 자극 등에 따라 모양이나 바이오마커의 변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Lee et al., Nat Mater, 15(8), 2016, 856-862; Friedl et al., Nature Materials 15, 2016, 827-828; Mehta et al., J. Controlled Release, 2012, 192-204).

[0005] 3차원적인 생체모방형 모델을 구현하기 위한 지지대(scaffold)로서 하이드로젤(hydrogel)을 많이 사용해왔다. 하지만, 하이드로젤 자체는 세포부착력이 좋지 않아 다른 복잡한 과정이 부가적으로 필요하고, 생체 이식과정에서 생분해성, 안정성 등의 문제점이 동반된다. 또한, 지지체의 단점을 보완하기 위해 지지체를 사용하지 않고 3차원 세포를 형성하기 위한 다양한 방법이 연구되어 오고 있다. 배양용기(tissue culture plate)에 다양한 하이드로젤(agar, agarose, poly-HEMA 등)을 코팅하여 세포집합체를 형성시키는 방법이다(Yuhas et al., Cancer Res, 37, 1977, 3639-3643; Dangles-Marie et al., P Cancer Res, 67, 2007, 398-407; Dangles et al.,

Cancer Res, 57, 1997, 3360-3364). 최근에는 현적 배양법(hanging drop method)이 개발되어 사용되고 있고, 이는 cell suspension을 dish 뚜껑에서 배양하여 세포와 표면과의 접촉을 막아 세포 스페로이드를 형성하는 방법이다(Kelm et al., Biotechnol Bioeng, 83, 2003, 173-180). 다양한 방법으로 세포 스페로이드가 만들어지고 있으나, 실제 세포와 비교하여 세포외기질(extracellular matrix, ECM)이나 바이오마커의 발현이 낮은 성능을 보여, 약물스크리닝이나 세포이식을 위한 새로운 형태의 스페로이드 형성 방법이 요구되어오고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존에 개시된 방법에 비해 세포의 기능이 향상된 스페로이드를 제조하기 위한 배양용기를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명의 배양용기를 이용하여 비교적 간단한 방법으로 짧은 시간에 세포 기능이 향상된 스페로이드를 제조하였으며, 다양한 배양용기에 고분자 코팅이 가능하므로 범용적인 플랫폼 기술이 되어 세포의 기본 연구 및 질병 연구에서부터 이식 가능한 세포 치료제 개발까지 넓은 범위에 활용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 배양용기를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 3차원 세포 스페로이드의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 배양용기 표면의 개질방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 표면에 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 배양용기를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 배양용기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포 스페로이드의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (a-1) 개시제를 분해하여 유리 라디칼(free radical)을 형성하는 단계; (a-2) 형성된 유리 라디칼에 의해 제1단량체 및 제2단량체의 연쇄중합반응으로 공중합체를 형성하는 단계; 및 (a-3) 배양용기 표면에 공중합체를 증착시켜 고분자 박막을 형성하는 단계;를 포함하는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 배양용기 표면의 개질방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 배양용기 표면에 증착된 고분자로부터 세포반응을 유도하여 3차원 세포 스페로이드를 형성하고, 배양용기 표면에 증착된 고분자 박막이 균일하고 안정성이 뛰어나며, 기존의 스페로이드 제작 방법과는 달리 비교적 간단하고 짧은 시간에 세포기능이 향상된 스페로이드를 제조할 수 있다. 또한, 다양한 배양용기에 고분자 코팅이 가능하므로 범용적인 플랫폼 기술이 되어, 세포의 기본 연구 및 질병 연구에서부터 이식 가능한 세포 치료제 개발까지 넓은 범위에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 개시제를 이용한 화학적 기상 증착(iCVD) 공정을 통해 고분자가 증착된 배양용기에서 3차원 세포 스페로이드가 형성되는 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 플랫폼의 표면 고분자 박막의 접촉각 및 FT-IR 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 고분자가 코팅된 배양용기에서 형성된 세포 스페로이드를 관찰한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 고분자가 코팅된 배양용기에서 형성된 세포 스페로이드를 날짜별로 크기를 관찰한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 각 고분자가 코팅된 배양용기에서 형성된 암세포 스페로이드에서 발현되는 marker를 real-time RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 각 고분자가 코팅된 배양용기에서 형성된 성체줄기세포(hMSC) 스페로이드에서 발현되는 marker를 real-time RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 배양용기에서 암세포 스페로이드에서 발현되는 세포외기질인 fibronectin을 형광 염색한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체적인 예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 첨부된 도면은 이해를 돕기 위한 것으로, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 개별 구성에 관한 세부 사항은 후술하는 관련 기재의 구체적 취지에 의하여 적절히 이해될 수 있다.
- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0022] 본 발명에서는 고분자가 증착된 배양용기를 이용하여 3차원 세포 스페로이드를 제조하는 것으로, 배양용기의 표면에 코팅된 고분자로부터 세포반응을 유도하고 배양용기 표면에 증착된 고분자 박막이 균일하고 안정성이 뛰어나며, 기존의 스페로이드 제작 방법과는 달리 비교적 간단하고 짧은 시간에 세포기능이 향상된 스페로이드를 제조할 수 있다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 표면에 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 소수성 고분자 박막이 증착되어 있는 배양용기에 관한 것이다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 '배양용기'는 세포 배양 플레이트 및 세포배양 기관과 동일한 의미로 해석된다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 소수성 고분자는 배양용기에 증착되었을 때 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 고분자, 바람직하게는 접촉각이 75° 를 넘는 고분자를 의미한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 배양용기는 세포의 반응을 유도하기 위해 소수성 고분자를 포함하는 것이 바람직하고, 소수성 고분자는 제1단량체에 의해 형성된 동중중합체(homopolymer) 또는 제1단량체 및 제2단량체에 의해 형성된 공중합체(copolymer)인 것이 바람직하다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 공중합체는 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 그래프트 공중합체 또는 이층층(layer by layer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 제1단량체는 소수성 단량체로, 메타크릴레이트계 단량체, 아크릴레이트계 단량체, 방향족 비닐계 단량체, 불소계 단량체, 에폭시 작용기를 갖는 단량체로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하다.
- [0029] 메타크릴레이트계 단량체는 벤질 메타크릴레이트(Benzyl Methacrylate), 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl Methacrylate), 부틸 메타크릴레이트(Butyl Methacrylate), 이소프로필 메타크릴레이트(Isopropyl Methacrylate), 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트(Ethyleneglycol Dimethacrylate), 하이드록시에틸 메타크릴레이트(Hydroxyethyl Methacrylate), 헥실 메타크릴레이트(Hexyl Methacrylate), 프로파질 메타크릴레이트(Propargyl Methacrylate);
- [0030] 아크릴레이트계 단량체는 이소보닐 아크릴레이트(Isobornyl Acrylate), 테트라하이드로피루릴 아크릴레이트(Tetrahydrofurfuryl Acrylate);
- [0031] 방향족 비닐계 단량체는 디비닐벤젠(Divinylbenzene), 비닐 벤조산염(Vinyl Benzoate), 스티렌(Styrene), 헥사비닐 디실록산(Hexavinyl Disiloxane);
- [0032] 불소계 단량체는 퍼푸릴 메타크릴레이트(Furfuryl Methacrylate), 퍼플루오로데실 아크릴레이트(Perfluorodecyl Acrylate); 및
- [0033] 에폭시 작용기를 갖는 단량체는 글리시딜 메타아크릴레이트(Glycidyl Methacrylate)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서 제1단량체는 벤질 메타크릴레이트(Benzyl Methacrylate), 사이클로헥실 메타크릴레이트

(Cyclohexyl Methacrylate) 또는 디비닐벤젠(Divinylbenzene)인 것이 더욱 바람직하다.

- [0035] 본 발명에 있어서, 제2단량체는 제1단량체의 젖음성을 조절할 수 있는 것으로, 아크릴/메타크릴레이트계, 비닐계, 불소계, 가교제로 쓰이는 단량체로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하다.
- [0036] 아크릴/메타크릴레이트계 단량체는 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트(Ethylene Glycol Dimethacrylate), 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(Ethylene Glycol Diacrylate), 2-클로로에틸 아크릴레이트 시아노에틸아크릴레이트(2-Chloroethyl Acrylate Cyanoethylacrylate), 퍼푸릴 메타크릴레이트(Furfuryl Methacrylate), N-이소프로필아크릴아마이드(N-Isopropylacrylamide);
- [0037] 비닐계 단량체는 1-비닐이미다졸(1-Vinylimidazole), 1-비닐피롤리돈(1-Vinylpyrrolidone), 아크릴아마이드(Acrylamide), 메타크릴아마이드(Methacrylamide), 4-비닐벤질 클로라이드(4-Vinylbenzyl Chloride), 디(에틸렌 글리콜) 디비닐에테르(Di(Ethylene Glycol) Divinylether), 비닐 벤질 시안화물(Vinyl Benzyl Cyanide), 펜타플로오로페닐 메타아크릴레이트(Pentafluorophenyl methacrylate);
- [0038] 불소계 단량체는 퍼플루오로데실 아크릴레이트(Perfluorodecyl Acrylate), 도데카플루오로헵틸 아크릴레이트(1H, 1H, 7H-Dodecafluoroheptyl acrylate);
- [0039] 가교제로 쓰이는 단량체는 다이에틸렌글리콜 다이비닐에테르(Di(ethylene glycol) divinyl ether), 에틸렌글리콜 다이메타아크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 제1단량체와 제2단량체가 형성하는 공중합체 형성 시, 공중합체의 형태에 관계없이 혼합비율의 제한은 없다. 제1단량체와 제2단량체의 혼합비율은 1% ~ 99% 까지 조절이 가능하다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 고분자를 증착시키는 방법으로는 화학적 기상 증착법(CVD), 플라즈마화학증착법(PECVD) 또는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)일 수 있다. 용매나 첨가제를 전혀 사용하지 않기 때문에 고순도의 박막을 얻을 수 있고, 이는 제조과정에서 발생할 수 있는 독성물질의 노출을 차단함으로써 외부 환경에 민감한 세포(예컨대, 신경세포)를 배양하는데 유용하다.
- [0042] 상기 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)은 개시제(initiator)를 라디칼(radical)로 분해하여 단량체의 중합을 일으키는 장치이다. 개시제로는 tert-butyl peroxide(TBPO)와 같은 과산화물(peroxide)이 주로 사용되는데, 상기 개시제로 tert-butyl peroxide(TBPO)와 같이 열에 의해 분해되어 라디칼을 형성하는 것 말고도, UV와 같은 빛에 의해서도 분해되어 라디칼을 형성하는 벤조페논(benzophenone) 등을 이용할 수도 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 배양용기의 소재는 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 또는 플라스틱인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 플라스틱은 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리아미드(polyamides, PA), 폴리에스터(polyester, PES), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리우레탄(polyurethanes, PU), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리염화비닐리덴 (polyvinylidene chloride, PVDC), 폴리테트라플루오르에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK) 및 폴리에테리미드(polyetherimide, PEI)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 배양용기는 세포를 배양하거나 스크리닝 등에 사용할 수 있는 다양한 형태의 용기를 포함한다. 예를 들어, 상기 세포배양 기판은 배양 접시, 마이크로타이터 플레이트(6웰, 24웰, 48웰, 96웰, 384웰, 9600웰 등), 마이크로칩, 챔버 슬라이드, 튜브, 셀 팩토리, 롤러 보틀, 스피너 플라스크, 중공 섬유(hollow fibers), 마이크로 캐리어, 비즈 등의 형상을 가질 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 배양용기에 코팅되는 고분자 박막의 두께는 특별히 제한되지 않으나, 5 nm 내지 500 μ m 일 수 있다. 바람직하게는 5 nm 내지 1 μ m, 더욱 바람직하게는 100 nm 내지 500 nm 사이의 고분자가 배양용기에 증착되며, 고분자 층의 두께는 박막 형성 및 배양조건에서의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 더욱 상세하게는 소수성 고분자 박막의 두께가 5 nm 이하인 경우 박막의 두께가 너무 얇아 conformal coverage가 좋지 않거나 낮은 안정성으로 보이는 문제가 있고, 1 μ m 이상인 경우 박막제조에 많은 시간이 필요하며, 높은 비용문제가 발생한다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 배양용기는 3차원 세포 스페로이드 제조용인 것이 바람직하다.

- [0049] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 배양용기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포 스펜로이드의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명의 배양용기 상에서 다양한 세포들의 스펜로이드를 형성할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 배양되는 세포는 체세포(신장세포, 간세포, 지방세포 등), 생식세포, 암세포, 성체줄기세포, 지방 유래 줄기세포 등이 적용될 수 있으며, 상기 세포 중 동종세포 또는 이종세포들을 사용하여 스펜로이드를 형성하는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 발명은 다른 관점에서, (a-1) 개시제를 분해하여 유리 라디칼(free radical)을 형성하는 단계; (a-2) 형성된 유리 라디칼에 의해 제1단량체 및 제2단량체의 연쇄중합반응으로 공중합체를 형성하는 단계; 및 (a-3) 배양용기 표면에 공중합체를 증착시켜 고분자 박막을 형성하는 단계;를 포함하는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 배양용기 표면의 개질방법에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 배양용기 표면의 개질방법의 제1단량체 및 제2단량체는 배양용기에 증착된 소수성 고분자에 대하여 상술한 바와 같다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 형성된 고분자 박막은 물과의 접촉각이 70° 내지 100° 인 것이 바람직하다.
- [0057] 또한, 본 발명에서는 상기 방법으로 형성된 3차원 세포 스펜로이드가 기존의 2차원 세포 스펜로이드에 비해 세포외기질과 바이오파크의 발현이 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 배양용기에서 세포 스펜로이드를 형성하고, 각 세포 특이적인 바이오파크(CD133, OCT4, Sox2, Nanog, Nestin 등)의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0062] **실시예 1: 고분자 증착**
- [0063] 1-1. 사이클로헥실 메타크릴레이트(CHMA)이 증착된 배양용기
- [0064] 도 1에 나타난 바와 같이, 화학기상증착 반응기(iCVD, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)의 단량체통에 단량체인 사이클로헥실 메타크릴레이트(cyclohexyl methacrylate, CHMA, Sigma-Aldrich)를 넣고, 60°C 로 가열하였다. TBPO(tert-butyl peroxide, Sigma-Aldrich)를 개시제로 하여, 이를 개시제통에 넣고 상온으로 유지하였다. 폴리스티렌 세포 배양 플레이트를 기판으로 하여 증착을 진행하였다. CHMA 증착 시, CHMA 단량체와 TBPO를 2:1 비율(유량 기준, 단위: sccm)로 화학기상증착 반응기 내에 흘려주면서, 반응기 내의 필라멘트의 온도를 140°C , 반응기 내의 기판 온도를 30°C , 반응기 내 챔버의 압력을 150 mbar로 유지하면서 30분 증착을 수행하여, 300 nm 두께의 pCHMA(poly-CHMA)가 증착된 세포배양 기판을 제조하였다.
- [0066] 1-2. 벤질 메타크릴레이트(BMA)이 증착된 배양용기
- [0067] 실시예 1-1에서 사이클로헥실 메타크릴레이트(CHMA) 대신에 벤질 메타크릴레이트(Benzyl Methacrylate, BMA, Sigma-Aldrich)을 단량체로 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 증착하였으며, 300 nm 두께의 pBMA(poly-BMA)가 증착된 세포배양 기판을 제조하였다.
- [0069] 1-3. 디비닐벤젠(DVB)이 증착된 배양용기
- [0070] 실시예 1-1에서 사이클로헥실 메타크릴레이트(CHMA) 대신에 디비닐벤젠(Divinylbenzene, DVB, Sigma-Aldrich)을 단량체로 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 증착하였으며, 300 nm 두께의 pDVB(poly-DVB)가 증착된 세포배양 기판을 제조하였다.
- [0072] 1-4. 헥사비닐 디실록산(HVDS)이 증착된 배양용기
- [0073] 실시예 1-1에서 사이클로헥실 메타크릴레이트(CHMA) 대신에 헥사비닐 디실록산(Hexavinyl Disiloxane, HVDS, Sigma-Aldrich)을 단량체로 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 증착하였으며, 300 nm 두께의 pHVDS(poly-HVDS)가 증착된 세포배양 기판을 제조하였다.
- [0075] **실시예 2: 배양용기에 증착된 고분자 박막의 기능기 및 접촉각 확인**
- [0076] 실시예 1에서 형성된 고분자가 증착된 세포배양 기판(배양용기)을 접촉각 측정장비(Contact Angle Analyzer

(Phoenix 150, SEO, Inc.)를 이용하여 5 μ l의 증류수와 다이아이오도메탄(Diiodomethane, DIM)에 대하여 기관의 표면 접촉각을 측정하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 다양한 단량체에 의해 형성된 중합체에 의해 표면 개질이 되어서 접촉각이 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] **실시예 3: 세포 스페로이드 형성**

[0079] 실시예 1에서 형성된 고분자가 증착된 세포배양 기관에 NIH3T3, U87MG, MCF7, hMSC 세포를 배양한 후, 세포 스페로이드 형성 여부를 확인하였다. NIH3T3, U87MG 및 MCF7은 같은 배지조건에서 배양되었으며, 사용한 배지조건은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)/FBS/antibiotics(1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신(penicillin streptomycin)을 90/10/1 조성으로 혼합하여 사용하였다. hMSC 세포배양은 α -MEM(Minimum Essential Medium Eagle)/FBS/antibiotics(1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신(penicillin streptomycin)을 90/10/1 조성으로 혼합한 배지를 사용하여 실시하였다.

[0080] 도 3에 나타난 바와 같이, 모든 세포배양 기관에서 세포가 독성 없이 잘 자라며, 모든 배양표면에서는 24시간 후 세포 스페로이드(spheroids)가 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 세포별 날짜별로 스페로이드의 크기가 표면별로 달라지는 것을 확인하였다.

[0082] **실시예 4: 세포 스페로이드의 바이오마커 확인**

[0083] 실시예 3에서 형성된 세포 스페로이드에 대하여 각 세포별 바이오마커의 발현을 real-time RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, 암세포 특이적 마커인 CD133이 U87MG, MCF7 스페로이드에서 2D 세포에 비해 2-7배 증가되는 것을 확인하였으며(도 5), 줄기세포 마커인 Oct4 역시 hMSC에서 2D 세포에 비해 3-60배 상당히 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

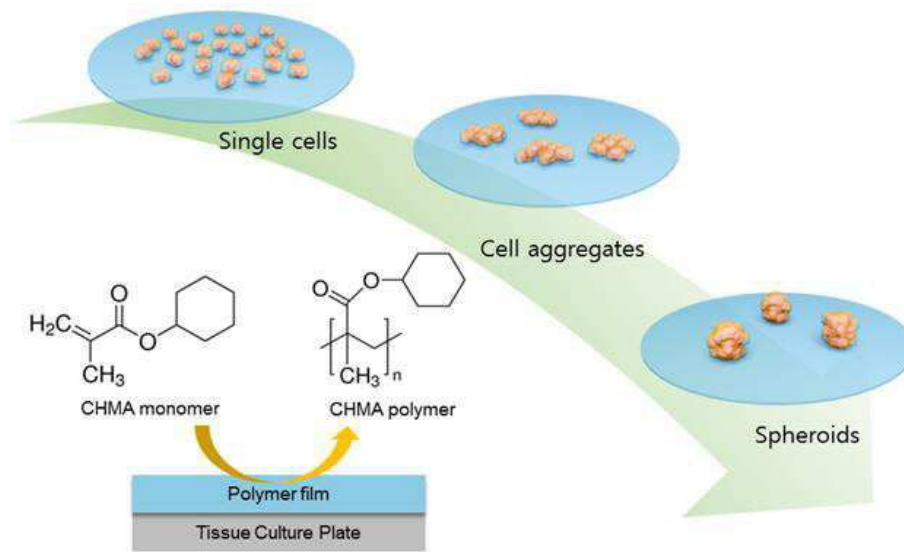
[0085] **실시예 5: 세포 스페로이드의 세포외기질 확인**

[0086] 실시예 1-1 에서 제조된 pCHMA가 증착된 세포배양 기관에 MCF-7 세포를 배양하여 수득된 세포 스페로이드(실시예 3)의 세포외기질 발현을 관찰하기 위해 면역형광염색법을 통해 염색하였다. 세포를 실온에서 10분 동안 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용하여 고정하고, 15분 동안 실온에서 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)에 세포투과 시켰다. DPBS로 세척 후, 10분 동안 1% BSA(Bovine serum albumin)을 처리하고, 1차 항체(anti-fibronectin)를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 12 시간 동안 반응하였다. 세척한 후, FITC(Fluoresceinisothiocyanate)가 부착된 2차 항체를 사용하여 반응하였다. 세척한 후, 핵 염색을 위해 DAPI를 대비 염색하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 세포 스페로이드에서 세포외기질이 잘 발현되어 있는 것을 확인하였다.

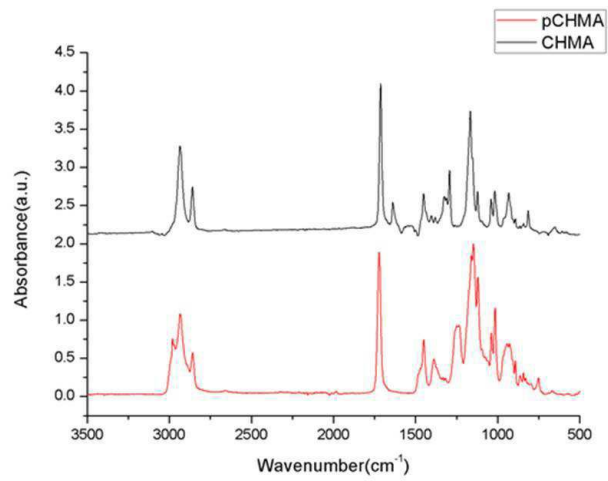
[0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

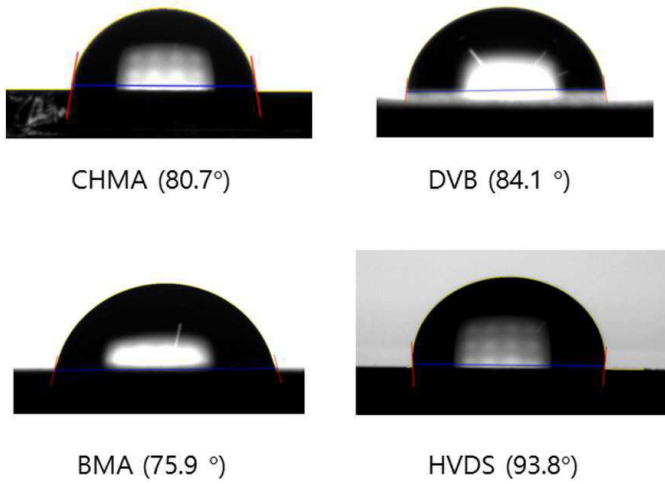
도면1



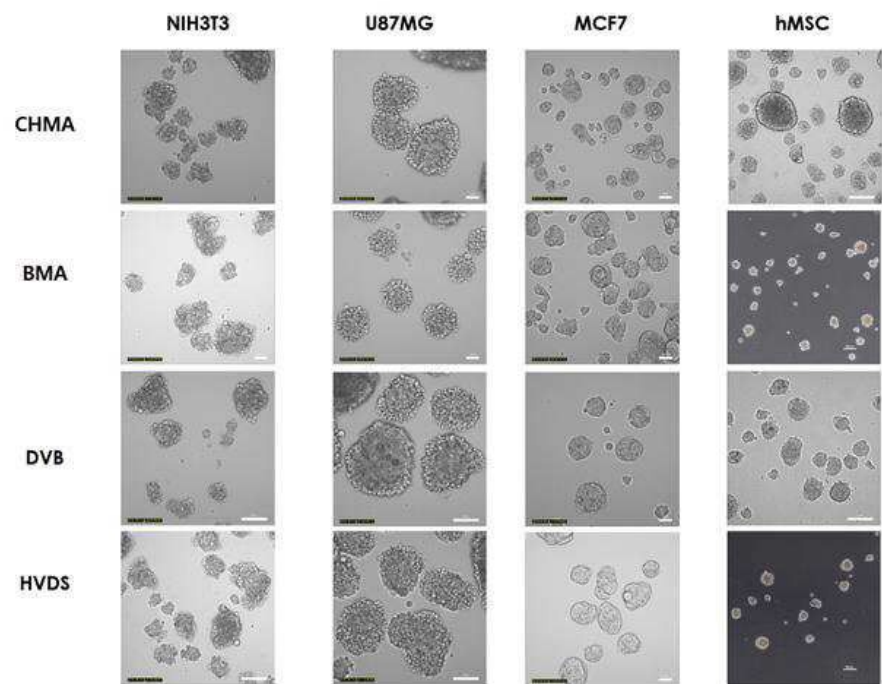
도면2



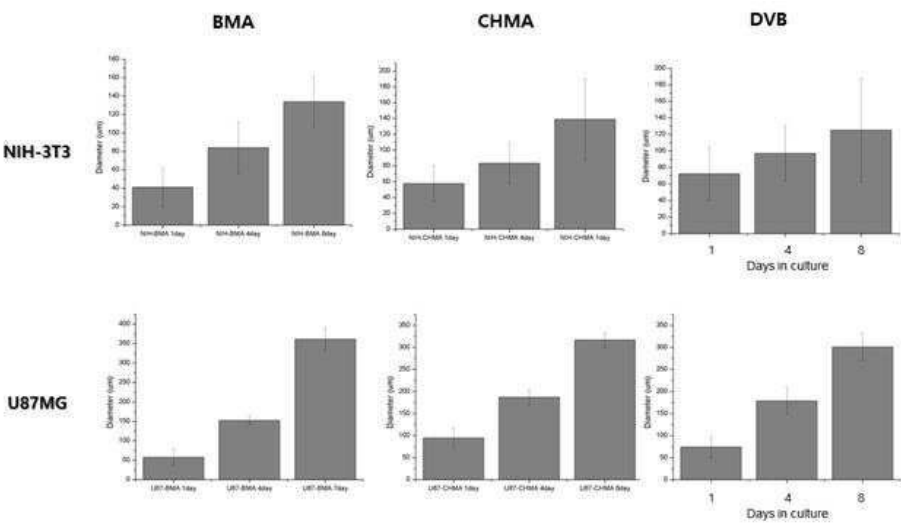
b) Contact angle



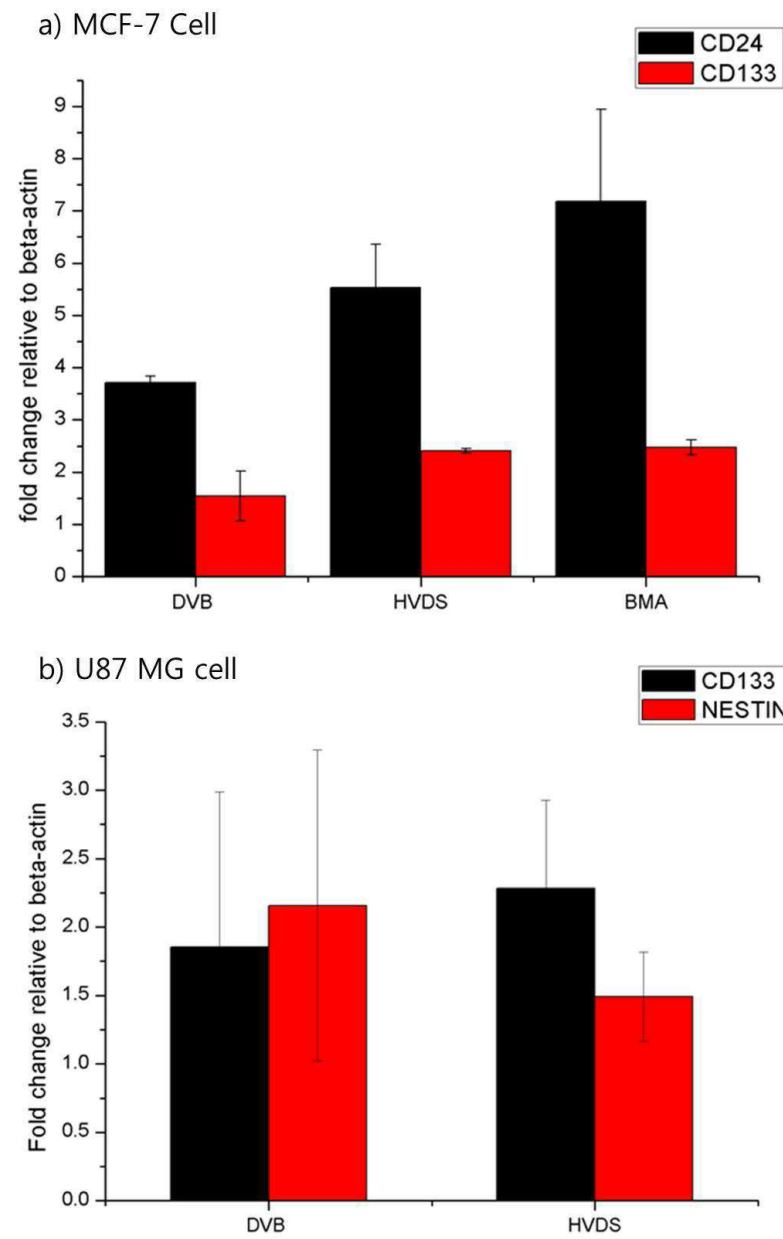
도면3



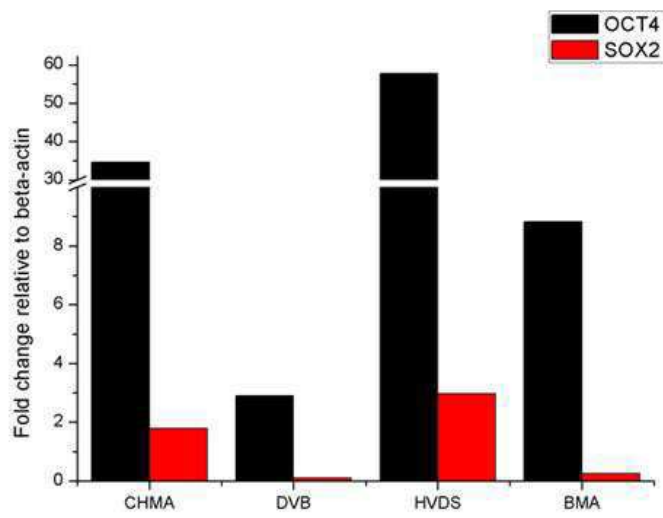
도면4



도면5



도면6



도면7

