



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월16일
(11) 등록번호 10-2123550
(24) 등록일자 2020년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/095 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0695 (2013.01)
G01N 33/5017 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0128190
(22) 출원일자 2018년10월25일
심사청구일자 2018년10월25일
(65) 공개번호 10-2019-0093108
(43) 공개일자 2019년08월08일
(30) 우선권주장
1020180012338 2018년01월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014118810 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
전상용
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)
최민석
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)
(74) 대리인
팬코리아특허법인
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **암줄기세포 스페로이드 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 암줄기세포 스페로이드를 제조하기 위한 방법 또는 키트와, 상기 제조된 암줄기세포 스페로이드를 이용하여 암세포 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법에 관한 발명으로서, 간편하게 암줄기세포 스페로이드를 제조할 수 있고, 제조된 암줄기세포 스페로이드는 암세포 내성 치료용 약물을 스크리닝에 효과적으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도7a

		TCP			pV4D4		
		FBS	SR	SFM +BSA 40mg/mL	FBS	SR	SFM +BSA 40mg/mL
% of CD133 ⁺ cells	Cell line						
	U87MG	0.1	0.2	6.27	0.37	4.38	28.52
	SKOV3	0.08	0.34	1.62	1.21	28.64	37.92
	MCF7	0.28	0.82	1.25	1.84	34.78	41.36

SFM: serum free media / SR: serum replacement

(52) CPC특허분류

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

임성갑

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

이대엽

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

유승정

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

최윤정

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

명세서

청구범위

청구항 1

알부민 및 세포 배양용 배지를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물로서, 상기 알부민은 암세포의 암줄기세포 유도제이며, 상기 암세포의 암줄기세포 유도제인 알부민의 농도는 5 내지 200 mg/ml인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암줄기세포는 스펜로이드 형태인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알부민은 10 내지 200mg/ml의 농도로 배지에 포함되는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 알부민은 혈청 대체제(Serum Replacement)로서 제공되거나, 혈청 대체제에 상기 알부민이 추가로 첨가되어 제조된 제제로서 제공되거나, 또는 FBS(Fetal bovine serum)에 알부민이 추가로 첨가되어 제조된 제제로서 제공되는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알부민은 혈청 알부민(serum albumin), 난백 알부민(ovalbumin), 락트알부민(lactalbumin) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 혈청 알부민은 소혈청 알부민, 인간혈청 알부민 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암줄기세포는 암세포를 분리한 개체 특이적인 암줄기세포인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 암줄기세포는 세포 이동성, 침투성, 약물내성, 및 암 형성능으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 특성을 갖는 것인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 암줄기세포는 CD47, BMI-1, CD24, CXCR4, DLD4, GLI-1, GLI-2, PTEN, CD166, ABCG2, CD171, CD34, CD96, TIM-3, CD38, STRO-1, CD19, CD44, CD133, ALDH1A1, ALDH1A2, EpCAM, CD90, 및 LGR5로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 마커가 발현되는 것인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 암세포는 난소암, 유방암, 간암, 뇌암, 대장암, 전립선암, 자궁경부암, 폐암, 위암, 피부암, 췌장암, 구강암, 직장암, 후두암, 갑상선암, 부갑상선암, 결장암, 방광암, 복막암, 부신암, 설암, 소장암, 식도암, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 요관암, 요도암, 인두암, 질암, 편도암, 항문암, 흉막암, 흉선암 또는 비인두암으로부터 유래하는 것인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 암세포는, 인간 난소암 세포주, 인간 유방암 세포주, 인간 간암종 세포주, 인간 아교 교아종 세포주, 인간 대장암 세포주, 인간 폐암 세포주, 인간 전립선암 세포주, 인간 자궁경부암 세포주, 인간 흑색종 세포주, 및 인간 위암 세포주로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은, 알부민을 제외한 다른 성장인자를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 이용하여, 암세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암세포를 배양하는 단계는, 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관 위에서 암세포를 배양하는 것으로 수행되는 것인, 방법.

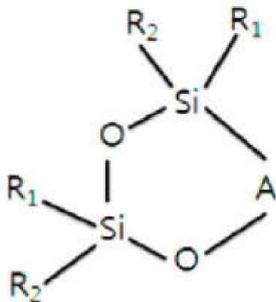
청구항 15

제14항에 있어서, 상기 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관은 물접촉각이 90° 미만인 것인, 방법.

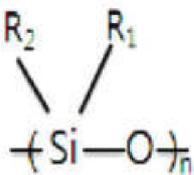
청구항 16

제14항에 있어서, 상기 사이클로실록산 중합체는 하기 화학식 1을 갖는 단량체를 포함하는 호모중합체 또는 헤테로중합체인, 방법:

[화학식 1]



상기 식에서,



A는 이고, n은 1 내지 8의 정수이며;

R1은 서로 독립적으로 수소 또는 C2-10 알케닐이고, 2 이상의 R1은 C2-10 알케닐이며;

R2는 서로 독립적으로 수소, C1-10 알킬, C2-10 알케닐, 할로, 금속원소, C5-14 헤테로사이클, C3-10 사이클로알킬 또는 C3-10 사이클로알케닐이다.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 R1 위치에 n+1개 또는 n+2개의 C2-10 알케닐을 갖는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 사이클로실록산 화합물은 2,4,6,8-테트라(C2-10)알케닐-2,4,6,8-테트라(C1-10)알킬사이

클로테트라실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 헥사(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 옥타(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 데카(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8-테트라비닐-2,4,6,8,-테트라메틸사이클로테트라실록산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 사이클로실록산 중합체는 화학식 1을 갖는 제1단량체와, 비닐기를 포함하는 제2단량체의 헥테로중합체이며,

상기 제2단량체는, 비닐기를 갖는 실록산, 메타크릴레이트계 단량체, 아크릴레이트계 단량체, 방향족 비닐계 단량체, 아크릴아마이드계 단량체, 말레익 안하이드라이드, 비닐기를 갖는 실라잔 또는 사이클로실라잔, 비닐기를 갖는 C3-10 사이클로알케인, 비닐피롤리돈, 2-(메타크릴로일록시)에틸 아세토아세테이트, 1-(3-아미노프로필)이미다졸, 비닐이미다졸, 비닐피리딘, 및 비닐기를 갖는 실란으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 제2단량체는 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4), 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산, 옥타(비닐실라제스퀴옥산), 및 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인, 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 상기 암줄기세포 스페로이드의 제조방법은 인위적인 유전자 조작을 수행하지 않는 것인, 방법.

청구항 22

사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관, 및
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는,
암줄기세포의 스페로이드 제조용 키트.

청구항 23

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 이용하여, 암세포를 배양하여 암줄기세포의 스페로이드를 제조하는 단계;

상기 암줄기세포의 스페로이드에 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질 처리군과 후보물질 미처리 대조군의 암줄기세포 생존율을 측정하는 단계; 및

상기 후보물질 처리군의 암줄기세포 생존율을, 후보물질의 미처리 대조군의 암줄기세포 생존율과 비교하는 단계를 포함하는, 암 치료용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 생존율을 비교하여, 상기 후보물질 처리군의 암줄기세포 생존율이 대조군의 생존율보다 낮은 경우, 상기 후보물질을 암 치료용 약물로 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 이용하여, 암세포를 배양하여 암줄기세포의 스페로이드를 제조하는 단계;

상기 암줄기세포의 스페로이드에, 암세포의 약물내성 완화 후보물질을, 암세포 내성 약물과 함께 처리하는 단계; 및

상기 후보물질 처리군의 암줄기세포 생존율을, 후보물질의 미처리 대조군의 암줄기세포 생존율과 비교하는 단계를 포함하는, 암세포의 약물내성 완화용 약물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암줄기세포 스페로이드 제조방법 또는 제조용 키트에 관한 것이다. 또한, 상기 제조방법 또는 키트로 제조된 암줄기세포 스페로이드를 이용한 암 세포 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암줄기세포(Cancer stem cell: CSCs 또는 tumor-initiating cells: TIC)는 자가 재생능, 내인성 약물 내성 및 분화 능력 등의 정상적인 줄기 세포와 많은 특징이 유사하다. 급성 골수성 백혈병에서 줄기 세포와 유사한 암세포가 발견된 이래, 종양의 재발과 약물 내성을 주로 담당하는 종양 응집체에서 소수의 암줄기세포가 존재한다는 증거가 증가하고 있다. 따라서 암줄기세포는 암 연구 및 약물 개발 분야에서 상당히 주목받고 있다.

[0003] 상기 암줄기세포는 일반적으로 암줄기세포 표면 마커를 기반으로 하여 환자 유래 종양 조직으로부터 분리된다. 그러나, 환자 유래 종양 조직의 공급은 제한적이고, 소량의 암줄기세포만을 분리해낼 수 있는 바, 암줄기세포를 수득하기 쉽지 않은 실정이다. 대안으로, 기존의 암 세포주에서 암줄기세포를 분리하려는 시도가 있었지만 암세포주에서 암줄기세포는 1 내지 2% 미만만이 포함되어 있으므로, 충분한 양의 암줄기세포를 확보하기 위해서는 실용적이지 못하다(Cell 144, 646-674 (2011)). 또한, 암세포의 3차원 구조는 2차원 단층 구조보다 종양 환경을 더 잘 나타낼 수 있는 바, 암세포의 스페로이드 형성을 촉진하는 방법을 개발하는데 있어 현재 상당한 관심이 보여지고 있다. 약물 스크리닝 또는 효능 검사에 이용되는 상기 스페로이드는 친수성 ULA(ultra-low-attachment) 표면, 오목한 모양의 아가로스 겔(U-bottom) 또는 hanging-drop 세포 기관의 구멍에 세포를 삼입하는 방법 등에 의해 현재 제조하고 있다. 그러나, 상기 방법으로 제조된 스페로이드의 경우에도 암줄기세포를 충분히 포함하지 않고 있다. 이러한 상황에서 인간 암세포주에서 암형성능을 갖는 암줄기세포 스페로이드를 제조하는 간편한 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 암줄기세포 스페로이드를 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관 및 알부민이 포함된 배지를 이용한 암줄기세포 스페로이드 제조방법을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 이용하여 암세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은, 세포배양 기관, 및 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트로서, 상기 세포배양 기관은 사이클로실록산 중합체를 포함하고, 상기 배지는 알부민을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트를 제공하는 것이다.

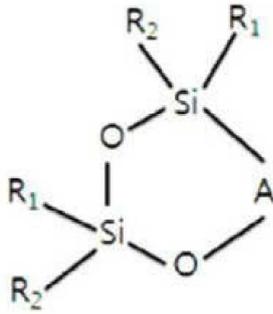
[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, (a) 상기 암줄기세포 스페로이드 제조 방법으로 암줄기세포 스페로이드를 준비하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 암줄기세포 스페로이드에 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 암세포 내성 치료 후보물질을 처리한 암줄기세포 스페로이드군 및 암세포 내성 치료 후보물질을 처

리하지 않은 대조군을 비교하는 단계를 포함하는, 암세포 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

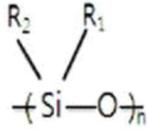
과제의 해결 수단

- [0009] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또다른 양태로서, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 이용하여 암세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또다른 양태로서, 세포배양 기관, 및 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트로서, 상기 세포배양 기관은 사이클로실록산 중합체를 포함하고, 상기 배지는 알부민을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또다른 양태로서, 암줄기세포 스페로이드를 준비하는 단계; 암줄기세포 스페로이드에 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 암세포 내성 치료 후보물질을 처리한 암줄기세포 스페로이드군 및 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하지 않은 대조군을 비교하는 단계를 포함하는, 암세포 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명자들은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기관 상에서, 알부민을 포함하는 배지에서 암세포를 배양할 경우, 암줄기세포 특성을 완벽히 갖고 있는, 생체 내 환경과 같은 3차원 암줄기세포 스페로이드를 고수율로 제조할 수 있음을 규명하여 상기 발명을 제공한다.
- [0016] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 이용하여 암세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0018] 상기 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 이용하여 암세포를 배양하는 단계는, 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 조성물을 이용하여 분리된 암세포를 배양하는 단계로, 상기 배양은 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관 위에서 이루어질 수 있다.
- [0019] 본 발명의 용어 "암세포" 또는 "분리된 암세포"는 인간에서 유래된 세포일 수 있고 또는 인간 이외의 다양한 개체에서 유래된 세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 분리된 암세포는 생체내 또는 생체외의 세포가 모두 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 분리된 암세포는 구체적으로 인간의 다양한 조직에서 유래한 세포일 수 있으며, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암, 대장암, 전립선암, 자궁경부암, 폐암, 위암, 피부암, 췌장암, 구강암, 직장암, 후두암, 갑상선암, 부갑상선암, 결장암, 방광암, 복막암, 부신암, 설암, 소장암, 식도암, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 요관암, 요도암, 인두암, 질암, 편도암, 항문암, 흉막암, 흉선암, 또는 비인두암에서 유래한 암세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 목적상 사용할 수 있는 모든 암세포를 포함하며, 암조직으로부터 생검을 통해 분리한 1차 배양세포, 또는 확립된 세포주 모두를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 상기 암세포를 확인하기 위해 암세포 마커를 이용할 수 있다. 구체적으로, 상기 마커로는 AFP(Alpha-fetoprotein), CA15-3, CA27-29, CA19-9, CA-125, Calcitonin, Calretinin, CD34, CD117, Desmin, inhibin, Myo D1, NSE(neuron-specific enolase), PLAP (placental alkaline phosphatase) 및 PSA(prostate-specific antigen)이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 용어, "사이클로실록산 화합물"는 사이클로실록산 구조를 기본 골격으로 가지면서, 이의 규소 원자 위치에 작용기(예컨대, 알킬기, 알케닐기 등)를 갖는 화합물을 포괄하기 위하여 사용된다. 본 발명의 일구현에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 하기 화학식 1 로 표시된다.

[0022] [화학식 1]



[0023]



[0024] 상기 식에서, A는 이고(n=1-8의 정수);

[0025] R1은 서로 독립적으로 수소 또는 C2-10 알케닐이고(단, R1 중 적어도 두 곳은 C2-10 알케닐임);

[0026] R2는 서로 독립적으로 수소, C1-10 알킬, C2-10 알케닐, 할로, 금속원소, C5-14 헤테로사이클, C3-10 사이클로알킬 또는 C3-10 사이클로알케닐이다.

[0028] 본 발명의 용어, "알킬"은 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 포화 탄화 수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸 또는 헥실 등을 포함한다. C1-C10 알킬은 탄소수 1 내지 10의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며, C1-C10 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0029] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C1-C10 알킬은 C1-C8 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C6 알킬이다. 본 발명의 용어, "알케닐"은 지정된 탄소수를 가지는 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 불포화탄화수소기를 나타내며, 예컨대, 비닐, 프로페닐, 알릴, 이소프로페닐, 부테닐, 이소부테닐, t-부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐을 포함한다. C2-10 알케닐은 탄소수 1 내지 10의 알케닐 유니트를 가지는 알케닐기를 의미하며, C2-10 알케닐이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0030] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명에서 C2-10 알케닐은 C2-8 알케닐, C2-6 알케닐, C2-5 알케닐, C2-4 알케닐 또는 C2-3 알케닐이다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 R1 중 적어도 세 곳은 C2-10 알케닐이다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산은 R1 위치에 n+1개 또는 n+2개의 C2-10 알케닐을 갖는다. 예를 들어, n이 2인 경우 화학식 1의 화합물은 R1 위치에 3 또는 4개의 C2-10 알케닐을 갖는 사이클로테트라실록산이 된다. 이러한 알케닐기는 중합반응에 관여한다.

[0031] 본 발명의 용어, "할로"는 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다. 본 발명의 용어, "금속 원소"는 알칼리금속원소(Li, Na, K, Rb, Cs, Fr), 알칼리토금속원소(Ca, Sr, Ba, Ra), 알루미늄족원소(Al, Ga, In, Tl), 주석족원소(Sn, Pb), 화폐금속원소(Cu, Ag, Au), 아연족원소(Zn, Cd, Hg), 희토류원소(Sc, Y, 57-71), 티탄족원소(Ti, Zr, Hf), 바나듐족원소(V, Nb, Ta), 크롬족원소(Cr, Mo, W), 망간족원소(Mn, Tc, Re), 철족원소(Fe, Co, Ni), 백금족원소(Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt) 및 악티나이드원소(89-103) 등과 같은 금속성 홑원소물질을 만드는 원소를 의미한다.

[0032] 본 발명의 용어, "헤테로사이클"은 일부 또는 완전하게 포화된 모노사이클형 또는 바이사이클형의 5원 내지 14원의 헤테로사이클 고리를 의미한다. N, O 및 S는 헤테로원자의 예이다. 피롤, 푸란, 티오펜, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 이속사졸, 티아졸, 이소티아졸, 테트라졸, 1,2,3,5-옥사티아디아졸-2-옥사이드, 트리아졸론, 옥사디아졸론, 이속사졸론, 옥사디아졸리딘디온, 3-하이드록시피로-2,4-디온, 5-옥소-1,2,4-티아디아졸, 피리딘, 피라진, 피리미딘, 인돌, 이소인돌, 인다졸, 프탈라진, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 퀴녹살린, 퀴나졸린, 신놀린 및 카르볼린은 C5-14 헤테로 사이클의 예이다.

[0033] 본 발명의 용어, "사이클로알킬"은 사이클릭 탄화수소 라디칼을 의미하며, 이는 사이클로프로필, 사이클로부틸 및 사이클로펜틸을 포함한다. C3-10 사이클로알킬은 링 구조를 형성하는 탄소수가 3-10인 사이클로알킬을 의미하며, C3-10 사이클로알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

- [0034] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C1-C10 사이클로알킬은 C1-C8 사이클로알킬, C1-C7 사이클로알킬 또는 C1-C6 사이클로알킬이다.
- [0035] 본 발명의 용어, "사이클로알케닐"은 최소 하나의 이중 결합을 갖는 사이클릭 탄화수소기를 의미하며, 예컨대 사이클로펜텐, 사이클로헥센 및 사이클로헥사디엔을 포함한다. C3-10 사이클로알케닐은 링 구조를 형성하는 탄소수가 3-10인 사이클로알케닐을 의미하며, C3-10 사이클로알케닐이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0036] 본 발명의 일구현예에 따르면, C2-10 사이클로알케닐은 C2-8 사이클로알케닐, C2-6 사이클로알케닐, C2-5 사이클로알케닐, C2-4 사이클로알케닐 또는 C2-3 사이클로알케닐이다.
- [0037] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 R2는 서로 독립적으로 수소, C1-10 알킬 또는 C2-10 알케닐이다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 R2 중 적어도 두 곳 또는 적어도 세 곳은 C1-10 알킬 또는 C2-10 알케닐일 수 있다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 사이클로실록산은 R2 위치에 n+1개 또는 n+2개의 C1-10 알킬 또는 C2-10 알케닐을 가질 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 n은 1-7의 정수, 1-6의 정수, 1-5의 정수, 1-4의 정수 또는 1-3의 정수이다.
- [0039] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 2,4,6,8-테트라(C2-10)알케닐-2,4,6,8-테트라(C1-10)알킬사이클로테트라실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C1-10)알킬-1,3,5-트리(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C1-10)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C1-10)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 헥사(C2-10)알케닐사이클로트리실록산, 옥타(C2-10)알케닐사이클로테트라실록산, 데카(C2-10)알케닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8-테트라비닐-2,4,6,8-테트라메틸사이클로테트라실록산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0040] 하나의 특정예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4), 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산, 옥타(비닐실라제스퀴옥산), 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산, 2,4,6,8-테트라(C2-4)알케닐-2,4,6,8-테트라(C1-6)알킬사이클로테트라실록산(일예로, 2,4,6,8-테트라비닐-2,4,6,8-테트라메틸사이클로테트라실록산), 1,3,5-트리(C1-6)알킬-1,3,5-트리(C2-4)알케닐사이클로트리실록산(일예로, 1,3,5-트리이소프로필-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C1-6)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-4)알케닐사이클로테트라실록산(일예로, 1,3,5,7-테트라이소프로필-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-펜타(C1-6)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-4)알케닐사이클로펜타실록산(일예로, 1,3,5,7,9-펜타이소프로필-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 1,3,5-트리(C1-6)알킬-1,3,5-트리(C2-4)알케닐사이클로트리실록산(일예로, 1,3,5-트리-sec-뷰틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C1-6)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-4)알케닐사이클로테트라실록산(일예로, 1,3,5,7-테트라-sec-뷰틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-펜타(C1-6)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-4)알케닐사이클로펜타실록산(일예로, 1,3,5,7,9-펜타-sec-뷰틸-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 1,3,5-트리(C1-6)알킬-1,3,5-트리(C2-4)알케닐사이클로트리실록산(일예로, 1,3,5-트리에틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C1-6)알킬-1,3,5,7-테트라(C2-4)알케닐사이클로테트라실록산(일예로, 1,3,5,7-테트라에틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-펜타(C1-6)알킬-1,3,5,7,9-펜타(C2-4)알케닐사이클로펜타실록산(일예로, 1,3,5,7,9-펜타에틸-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 헥사(C2-4)알케닐사이클로트리실록산(일예로, 헥사비닐사이클로트리실록산), 옥타(C2-4)알케닐사이클로테트라실록산(일예로, 옥타비닐사이클로테트라실록산), 데카(C2-4)알케닐사이클로펜타실록산(일예로, 데카비닐사이클로펜타실록산) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0041] 본 발명의 용어 "사이클로실록산 화합물을 포함하는 세포배 양기관"은 사이클로실록산이 형성한 중합체가 세포배 양 기관의 일부분인 경우(예를 들어, 상기 중합체로 표면이 코팅된 세포배 양 기관)를 의미하는 것뿐만 아니라, 사이클로실록산이 형성한 고상의 중합체 자체를 세포배 양 기관으로 사용할 수 있음을 의미할 수

있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0042] 상기 세포배양 기관은 세포를 배양할 수 있는 임의의 공간을 제공하는 것으로 충분하기 때문에 이의 형태는 제한이 없다. 예를 들어, 상기 세포배양 기관은 디쉬(배양 접시), 샬레나 플레이트(예컨대, 6웰, 24웰, 48웰, 96웰, 384웰, 9600웰 등의 마이크로타이터 플레이트, 마이크로 플레이트, 딥웰 플레이트 등), 플라스크, 챔버 슬라이드, 튜브, 셀 팩토리, 롤러 보틀, 스피너 플라스크, 중공 섬유(hollow fibers), 마이크로 캐리어, 비즈 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 지지성을 갖는 물질이라면 상기 세포배양 기관으로 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 플라스틱(예컨대, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등), 금속, 실리콘 및 유리 등을 세포배양 기관으로 사용할 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체는 (1) 동종의 사이클로 실록산 화합물이 중합하여 형성한 동종 중합체(homopolymer), (2) 이종의 사이클로 실록산 화합물이 중합하여 형성한 공중합체(copolymer), 및 (3) 동종 또는 이종의 사이클로실록산 화합물과 다른 단량체 화합물이 중합하여 형성한 공중합체 모두를 포괄하는 의미로 사용된다. 본 명세서에서 상기 공중합체는 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교호 공중합체 또는 그래프트 공중합체일 수 있으나, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 따라서, 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체는 동종의 사이클로실록산 화합물이 중합하여 형성한 동종 중합체이다.
- [0045] 본 발명의 다른 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체는 상기 사이클로실록산 화합물인 제1단량체와, 이와 중합할 수 있는 제2단량체가 형성한 공중합체이다.
- [0046] 하나의 특정예에 따르면, 상기 제2단량체는 제1단량체와 상이한 사이클로실록산 화합물이다(이종의 사이클로실록산 화합물이 형성한 공중합체).
- [0047] 다른 하나의 특정예에 따르면, 상기 제 2 단량체는 제 1 단량체와의 중합을 위한 탄소이중결합을 갖는 화합물이다. 이때, 제 1 단량체 역시 제 2 단량체와의 중합을 위한 탄소이중결합을 가질 수 있다. 이러한 제 2 단량체 화합물은, 예를 들어, 비닐기를 갖는 실록산(예컨대, 헥사비닐디실록산, 테트라메틸디실록산 등), 메타크릴레이트계 단량체, 아크릴레이트계 단량체, 방향족 비닐계 단량체(예컨대, 디 비닐벤젠, 비닐벤조에이트, 스티렌 등), 아크릴아마이드계 단량체(예컨대, N-아이 소프로필아크릴아마이드, N,N-디메틸아크릴아마이드 등), 말레익 안하이드라이드, 비닐기를 갖는 실라잔 또는 사이클로실라잔(예컨대, 2,4,6-트리메틸-2,4,6-트리비닐사이클로실라잔 등), 비닐기를 갖는 C3-10 사이클로알케인(예컨대, 1,2,4-트리비닐 사이클로헥세인 등), 비닐피롤리돈, 2-(메타크릴로일록시)에틸 아세토아세테이트, 1-(3-아미노프로필)이미다졸, 비닐이미다졸, 비닐피리딘, 비닐기를 갖는 실란(예컨대, 알릴트리클로로실란, 아크릴록시메틸트리메톡시실란 등) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0048] 다른 하나의 특정예에 따르면, 상기 제2단량체는 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4), 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산, 옥타(비닐실라세스퀴옥산), 및 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0049] 상기 메타크릴레이트계 단량체에는, 예를 들어, 메타크릴레이트, 메타크릴산, 글라이시딜 메타크릴레이트, 퍼플루오로 메타크릴레이트, 벤질메타크릴레이트, 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 퍼퓨릴메타크릴레이트, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-헵타데카플루오로데실메타크릴레이트, 헥실 메타크릴레이트, 메타아크릴릭 안하이드라이드, 펜타플루오로페닐메타크릴레이트, 프로파질메타크릴레이트, 테트라하이드로퍼퓨릴메타크릴레이트, 뷰틸메타크릴레이트, 메타크릴로일클로라이드 및 디(에틸렌글리콜)메틸에스테르메타크릴레이트 등이 있다.
- [0050] 상기 아크릴레이트계 단량체에는, 예를 들어, 아크릴레이트, 2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트, 에틸렌글라이 콜디아크릴레이트, 1H,1H,7H-도데카플루오로 헵틸아크릴레이트, 1H,1H,7H-도데카플루오로헵틸아크릴레이트, 아이소보닐아크릴레이트, 1H,1H,2H,2H-퍼플루오로데실아크릴레이트, 테트라하이드로퍼퓨릴아크릴레이트, 폴레(에틸렌글리콜)디아크릴레이트, 1H,1H,7H-도데카플루오로헵틸아크릴레이트 및 프로파질아크릴레이트 등이 있다.
- [0051] 본 발명의 공중합체는 본 명세서에서 언급한 단량체 외에 다른 단량체를 공 단량체로 추가 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 공중합체에는 사이클로실록산 화합물이 적어도 50% 이상 함유된다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 공중합체에는 사이클로실록산 화합물이 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90%

이상 함유된다. 이러한 함유량은 유량(flow rate; 단위: sccm)을 기준으로 하며, 90%는 9:1의 유량 비율(사이클로실록산 화합물: 다른 단량체)로 각 단량체를 유동시켜(흘려준) 형성된 공중합체에 포함된 사이클로실록산 화합물의 함유량을 의미하고, 80%는 8:1의 유량 비율로, 70%는 7:1의 유량 비율로, 60%는 6:1의 유량 비율로 유동시켜 형성된 공중합체에 포함된 사이클로실록산 화합물의 함유량을 의미한다.

[0053] 또한, 상기 중합체를 포함하는 세포배양 기관은 다양한 두께의 중합체를 포함하는 세포배양 기관일 수 있다. 상기 중합체의 두께는 예를 들어, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 nm 이상, 또는 약 10,000, 5,000, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 nm 이하, 또는 약 10 내지 300 nm, 10 내지 500 nm, 10 내지 1000 nm, 50 내지 300 nm, 50 내지 500 nm, 50-1000 nm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 이용하여 암세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암세포로부터 암줄기세포를 제조하는 방법에서, 상기 암줄기세포는 스페로이드 형태인 것일 수 있다. 상기 방법은 별도의 유전자 조작이나, 줄기세포 증식용으로 알려진 또는 성체세포로부터 줄기세포를 역분화시키는 것으로 알려진 다른 화합물을 포함시키지 않는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 세포 배양용 배지는 알부민을 제외한 다른 성장인자를 포함하지 않는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 용어, "스페로이드"란 1000개 이상의 단일 세포들이 모여 3차원의 구 형태를 이루는 세포 집합체를 의미하는 것으로서, 인체 내 세포들을 둘러싸고 있는 3차원 조직의 구조적, 물리적 성질을 좀 더 정확하게 모방할 수 있어 치료와 연구영역에서 유용하게 쓰이는 것으로, 본 발명의 목적상 상기 스페로이드는 암줄기세포 스페로이드를 특징으로 한다.

[0056] 또한, 본 발명의 용어, "암줄기세포(Cancer stem cell 또는 Tumor initiating cell)"는, 종양을 생성할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미하는 것으로서, 상기 암줄기세포는 정상적인 줄기세포와 유사한 특징을 갖는다. 암줄기세포는 다양한 세포형에서 줄기세포의 특성인 자기재생과 분화능력을 통해 종양을 발생시키는 바, 암형성능을 갖는다. 상기 암형성능에 의해 종양에서 다른 집단과 구별되는 새로운 종양을 발생시킴으로써 재발과 전이의 원인이 된다. 또한, 암줄기세포의 또 다른 특성으로 약물 내성을 갖고 있어, 항암제 사용 등의 화학요법에 대해 저항성을 갖고 있어, 일반 암세포만 제거되고, 암줄기세포는 죽지 않고 남게 되어, 다시 암이 재발할 수 있다. 따라서, 암을 완치하기 위해서는 암줄기세포에 대한 연구가 중요하다.

[0057] 또한, 상기 암줄기세포를 확인하기 위해 암줄기세포 마커를 이용할 수 있다. 상기 암줄기세포 마커는 CD47, BMI-1, CD24, CXCR4, DLD4, GLI-1, GLI-2, PTEN, CD166, ABCG2, CD171, CD34, CD96, TIM-3, CD38, STRO-1 및 CD19 일 수 있고, 구체적으로, CD44, CD133, ALDH1A1, ALDH1A2, EpCAM, CD90 및 LGR5 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 암줄기세포 스페로이드 제조방법 및 제조용 키트는 암줄기세포 스페로이드를 제조하는데 있어서, 인위적인 유전자 조작이 필요하지 않은 바, 보다 간편하고 신속하게 암줄기세포를 제조할 수 있다는 이점이 있다.

[0059] 또한, 상기 방법 및 키트로 제조된 암줄기세포(CSC) 마커 유전자가 발현되고(실시에 6), 약물 배출에 의한 약물 내성 특징을 가지고 있으며, 생체 내에서 암 형성능이 있음(실시에 12)을 확인하였는 바, 본 발명의 방법 및 키트로 제조된 암줄기세포 스페로이드는 암줄기세포 특성을 가짐으로 암줄기세포를 연구하고 이의 치료제를 스크리닝하기 위해 이용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 암줄기세포 스페로이드는 3차원 입체 배양 형태로 배양되는 것일 수 있고, 약물 내성을 갖는 것을 특징으로 하고, 또는 암세포를 분리한 환자 특이적인 암줄기세포 스페로이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 용어, "알부민(Albumin)"은 글로불린과 함께 세포의 기초물질을 구성하는 것으로서, 본 발명의 세포 배양 기관내에 플레이팅된 암세포의 배양배지에 포함되며, 암세포를 암줄기세포 스페로이드로 형성시킬 수 있는 물질은 제한 없이 포함된다. 본 발명의 알부민은 혈청 알부민(serum albumin), 난백 알부민(ovalbumin), 락트알부민(lactalbumin) 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다. 그 예로 시중에서 구입할 수 있는 혈청 대체제(Serum replacement: SR) 역시 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 대부분의 세포는 증식하기 위해 혈청이 필요하며, 천연 혈청과 동등 또는 유사한 기능을 수행할 수 있는 인공 혈청 (artificial serum), 또는 혈청 대체제 (serum replacement)가 사용될 수 있다. 상기 인공 혈청 또는 혈청 대체제는, 세포 배양시 천연 혈청을 대체하여 사용될 수 있는 것으로서 통상은 알부민을 포함한다. 본 발명

의 알부민은 알부민 단독 성분으로서 첨가되거나, 혈청 대체제에 포함된 제제, 혈청 대체제에 알부민을 추가로 첨가하여 제조된 제제, 또는 FBS에 알부민을 추가로 첨가하여 제조된 제제로서 제공될 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈청 대체제에 알부민이 추가로 첨가되는 제제로 제공될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 혈청 알부민은 그 유래에 따라 소혈청 알부민, 인간혈청 알부민 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서는 소혈청 알부민을 이용하여 제조된 스페로이드가 암 줄기세포 관련 마커를 발현하는 것을 확인하였는 바(실시예 6), 알부민이 암줄기세포를 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0062] 상기 알부민 농도는 0.1mg/ml 내지 500mg/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 알부민 농도는, 약 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 1, 1.1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 41, 46, 51, 56, 61, 66, 71, 76, 81, 86, 91, 96, 100, 101, 106, 111, 116, 121, 126, 131, 136, 141, 146mg/ml 이상, 또는 약 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 199, 195, 190, 175, 170, 150, 149, 144, 139, 134, 129, 124, 119, 114, 109, 104, 99, 94, 89, 84, 79, 74, 69, 64, 59, 54, 49, 44, 39, 34, 29, 24, 19, 14, 9, 4, 1.4, 0.9, 0.4 mg/ml 이하 일 수 있고, 보다 구체적으로 약 0.1mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 150mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 80mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 70mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 60mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 20mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 40mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도, 약 0.1mg/ml 내지 약 40mg/ml의 농도, 약 0.5mg/ml 내지 약 40mg/ml의 농도, 약 1mg/ml 내지 약 40mg/ml의 농도, 약 5mg/ml 내지 약 40mg/ml의 농도, 약 10mg/ml 내지 약 40mg/ml의 농도, 또는 약 40mg/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 혈청 대체제(Serum replacement)에 포함된 알부민의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게, 상기 알부민 농도는 0.1mg/ml 내지 400mg/ml, 또는 0.1mg/ml 내지 200mg/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다. 더욱 바람직하게, 상기 알부민 농도는 0.5mg/ml 내지 400mg/ml, 0.5mg/ml 내지 200mg/ml, 또는 0.5mg/ml 내지 100mg/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명에서 용어, "배양"은 세포를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미하며, 본 발명의 배양 과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 세포에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서는 암줄기세포 스페로이드를 제조하기 위해 알부민이 포함된 배지에서 배양할 수 있고, 그 예로 혈청 대체제(serum replacement: SR)가 포함된 배지에서 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 제조방법으로 제조된 암줄기세포 스페로이드를 제공한다. 상기 "암줄기세포" 및 "스페로이드"는 전술한 바와 같다.

[0066] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 세포배양 기관, 및 알부민을 포함하는 세포 배양용 배지를 포함하는 암세포로

부터 암줄기세포를 유도하는 조성물을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트로서, 상기 세포배양 기판은 사이클로실록산 중합체를 포함하고, 상기 배지는 알부민을 포함하는, 암줄기세포 스페로이드 제조용 키트를 제공한다.

[0067] 상기 "사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기판", "알부민", "암 줄기세포" 및 "스페로이드"는 전술한 바와 같다.

[0068] 본 발명의 키트는 암줄기세포 스페로이드를 제조할 수 있다. 상기 키트는, 세포배양 기판 및 배지를 기본 구성으로 포함할 수 있고, 구체적으로 세포배양기판은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 기판일 수 있으나, 암줄기세포 스페로이드를 제조하거나 배양할 수 있는 기판이라면 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 배지는 구체적으로 알부민이 함유된 배지 또는 혈청 대체제가 함유된 배지일 수 있으나, 암줄기세포 스페로이드를 제조하거나 배양할 수 있는 배지라면 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 키트에는 암줄기세포 스페로이드 제조방법에 대한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 상기 제조방법으로 암줄기세포 스페로이드를 준비하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 암줄기세포 스페로이드에 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 암세포 내성 치료 후보물질을 처리한 암줄기세포 스페로이드군 및 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하지 않은 대조군을 비교하는 단계를 포함하는, 암세포 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 "암줄기세포" 및 "스페로이드"는 전술한 바와 같다.

[0070] 상기 (c) 단계의 암세포 내성 치료 후보물질을 처리한 암줄기세포 스페로이드군 및 암세포 내성 치료 후보물질을 처리하지 않은 대조군을 비교하는 단계는 암 줄기세포 마커의 발현수준을 측정하여 비교하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 암줄기세포 마커의 발현수준을 측정하는 단계는, 당업계에서 이용되는 통상의 발현수준 측정 방법이 제한 없이 사용될 수 있으며, 그 예로 웨스턴 블롯(western blot), ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 등이 있다.

[0071] 본 발명의 용어 "후보물질"이란 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질 또는 그 예후를 개선시킬 수 있을 것으로 기대되는 물질로서, 구체적으로, 암줄기세포를 제거하여 암세포 내성을 억제하여 암을 치료하거나 예후를 개선시킬 수 있는 물질일 수 있고, 직접 또는 간접적으로 암 또는 암줄기세포를 호전 또는 개선시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한되지 않는다. 이러한 후보물질의 예로는 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 모든 치료 가능 예상물질을 포함한다. 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 후보 물질의 투여 전후의 암줄기세포 마커의 발현 수준을 확인하는 한편, 상기 발현수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소된 경우, 해당 후보물질을 암줄기세포 또는 암세포 내성에 대한 예상 치료제로서 결정할 수 있다.

[0072] 또한, 상기 (b) 단계는 내성을 갖고 있는 약물과 함께 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0073] 본 발명의 암줄기세포 스페로이드 제조방법 및 제조용 키트는 간편하게 암줄기세포 스페로이드를 제조할 수 있고, 상기 방법 및 키트로부터 제조된 암줄기세포 스페로이드는 암세포 내성 치료용 약물을 스크리닝에 효과적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1a 내지 도 1f는 다양한 PTF 제작에 이용된 화합물의 구조를 나타내는 것이고, 도 1g 내지 도 1l은 다양한 사이클로실록산 화합물의 구조를 나타낸 것이며, 도 1m은 특정한 PTF 표면상의 암형성능 스페로이드 형성 과정을 나타내는 도면이고, 도 1n은 종래의 TCP 및 다양한 기능성 PTF상에서의 암형성능 스페로이드 형성 여부를 확인한 도면이며, 도 1o 내지 도 1t는 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기판에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 도면이다.

도 2a는 다양한 인간 암 세포주가 pV4D4 PTF 표면에서 스페로이드 형성 여부를 확인한 도면이고, 도 2b는 다양한 인간 암 세포주가 pV4D4 PTF 표면에서 어떠한 형태의 스페로이드를 형성하는지 확인한 도면이다.

도 3a는 V4D4 단량체 및 pV4D4 PTF의 FT-IR 스펙트럼을 보여주는 도면이고, 도 3b는 pV4D4 PTF의 XPS survey scan 결과를 나타낸 도면이며, 도 3c는 코팅되지 않은 Si wafer, pV4D4 코팅된 Si wafer, 코팅되지 않은 세포

배양 기관, 및 pV4D4 코팅된 세포 배양 기관의 물 접촉각을 나타낸 도면이고, 도 3d는 코팅되지 않은 TCP 및 pV4D4 코팅된 TCP의 AFM 이미지를 나타낸 도면이다.

도 4는 10, 50, 100, 200, 및 300 nm의 PTF 두께를 가지는 pV4D4가 코팅된 TCP 상에서의 스페로이드 형성을 여부를 확인한 도면이다.

도 5a는 다양한 종류의 FBS 및 SR을 함유하는 배지에서 배양된 세포의 CD133 및 CD44의 발현 수준을 나타내는 도면이고, 도 5b는 FBS와 SR의 알부민 함량을 웨스턴블랏을 통해 확인한 도면이다.

도 6a는 무혈청 배지(SFM)에 포함된 BSA의 농도에 따른 스페로이드 형성을 나타낸 이미지이고, 도 6b는 BSA의 농도에 따른 CD133의 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 7a는 TCP 또는 pV4D4에 FBS, SR 또는 40mg/ml의 BSA가 함유된 무혈청 배지(SFM)에서 배양된 세포의 CD133 발현 수준을 나타내는 도면이다.

도 7b는 pV4D4에서 BSA가 포함된 무혈청 배지(SFM)에서 배양된 3종류의 암세포의 스페로이드 형성을 나타낸 도면이다.

도 7c는 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서 제조된 스페로이드의 암줄기세포성 마커 유전자인 CD133의 발현 수준을 나타낸 그래프로, 도 7c의 x축에서 1g는 pV4D4 및 도 1g의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1h는 pV4D4 및 도 1h의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1i는 pV4D4 및 도 1i의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1j는 pV4D4 및 도 1j의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1k는 pV4D4 및 도 1k의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1l는 pV4D4 및 도 1l의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이다.

도 7d는 SKOV3를 사이클로실록산 중합체를 포함하는 기관에서 다양한 알부민 농도에 따라 배양한 뒤 CD133 발현 수준을 측정하는 것을 나타낸 도면이다.

도 7e는 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서, SFM배지에 알부민의 농도가 0, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml, 및 400mg/ml가 되도록 BSA를 첨가한 배지에서 암세포를 배양하여 형성된 스페로이드의 CD133의 발현 수준을, 알부민의 농도에 따라 나타낸 그래프이다.

도 8a는 hanging-drop, U-bottom, ULA 및 pV4D4를 이용하여 제조된 SKOV3 스페로이드의 형태를 나타낸 도면이다.

도 8b는 ULA 또는 pV4D4 표면상에서 제조된 SKOV3 스페로이드에서의 라미닌 발현 패턴을 나타내는 도면으로서 적색은 라미닌을 나타내고 청색은 핵을 나타낸다.

도 8c는 hanging-drop, U-bottom, ULA 및 pV4D4를 이용하여 제조된 SKOV3 스페로이드의 ALDH1A1 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 8d는 pV4D4 표면상에서 제조된 SKOV3-ssiCSCs(4일 및 8일)에서의 Oct3/4, Sox2 및 Nanog mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 9는 pV4D4 표면상에서 제조된 SKOV3-ssiCSCs의 상처 치유 어세이(a) 및 침투 어세이(b) 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 SKOV3-ssiCSCs 및 U87MG-ssiCSCs에 의한 스테로이드 형성 여부를 확인한 도면이다.

도 11의 pV4D4 표면 상에서 4일 및 8일 동안 배양된 SKOV3-, MCF-7-, Hep3Band SW480-ssiCSC 스페로이드에서의 CSC 관련 마커 mRNA 발현 수준(a 및 b), 유세포 분석 결과(c)를 나타내는 도면이다.

도 12의 a 및 b는 pV4D4 표면 상에서 4일 및 8일 동안 배양된 SKOV3-ssiCSC, MCF-7-ssiCSC, Hep3B-ssiCSC 및 SW480-ssiCSC 스페로이드의 측면-계체군 어세이 결과(a) 및 독소루비신에 대한 세포 생존력(b)를 나타낸 도면이고, c는 SW480-ssiCSCs를 계대 배양 1회 또는 2회한 세포에서의 독소루비신에 대한 세포 생존력을 나타낸 도면이고, d는 8일간 배양하여 제조된 SKOV3-ssiCSCs의 약물 배출 ABC 수송체 관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 나타내는 도면이다.

도 13의 a는 SKOV3-ssiCSC 스페로이드 유래 세포를 BALB/c 누드 마우스에 투여하여 종양 형성하는 과정을 나타내는 도면이고, b는 종양이 전이된 간을 나타낸 도면이고, c는 종양이 전이된 간을 H&E 염색하여 관찰한 도면이고, d는 SKOV3-ssiCSC 스페로이드 유래 세포가 주입된 BALB/c 누드 마우스의 간에 전이된 병변을 나타내는 도면이고, e는 종양이 전이된 간에 TNC를 염색하여 관찰한 도면이다.

도 14의 a는 SKOV3-ssiCSC 스페로이드의 Wnt 타겟 유전자 (n = 46)의 히트 맵을 나타내고, b는 SKOV3-ssiCSCs에서 DKK1의 발현 (1일, 4일 및 8일)과 SKOV3-ssiCSCs에서의 AXIN2 및 MMP-2 mRNA의 발현(4일 및 8일) 수준을 나타내고, c는 SKOV3-ssiCSCs (4일 및 8일)의 인산화된 β -카테닌(β -catenin) 및 전체 β -카테닌의 웨스턴블랏 결과를 나타내고, d는 SKOV3-ssiCSCs의 세포내에서의 β -카테닌의 위치를 보여주는 도면이고, e는 SKOV3-ssiCSCs에서의 TNC 발현 여부를 나타내는 도면이다.

도 15는 MCF-7-ssiCSC, Hep3B-ssiCSC, 및 SW480-ssiCSC 스페로이드에서 TNC 발현 여부(a) 및 DKK1 mRNA 발현 수준(b)를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 이하 본 발명을 참고예, 비교예 및 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 참고예, 비교예 및 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 참고예, 비교예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] **참고예 1: 이종 이식 종양 형성 분석**

[0078] Orient Bio Inc.로부터 암컷 BALB/c 누드 마우스(6주령)를 획득하여 한국과학기술원의 동물 실험실에서 무균 상태로 보관하였다. 상기 마우스는 임의의 실험 그룹에 무작위로 배정했다. 모든 수술은 이소플루란(isoflurane) 마취 하에 수행했으며, 윤리적인 절차와 과학적 관리를 위해 한국과학기술원 기관 동물관리 및 사용위원회(KAIST-IACUC)에서 모든 동물 관련 절차를 검토하고 승인했다(승인 번호: KA2014-21).

[0079] 또한, 인간 난소암 이종 이식 모델을 제작하기 위해, 상이한 일련의 농도(10^6 부터 10^2 세포)의 2D-배양된 대조군 SKOV3 세포 또는 이에 대응되는 스페로이드로부터 분리된 SKOV3-ssiCSC를 50% 매트릭젤(Matrigel, Corning)과 혼합한 다음, 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스에 피하 주입시켰다. 종양 형성은 최대 120일 동안 모니터링되었고, 종양 부피가 약 50 mm^3 에 도달하였을 때 종양이 형성되었다고 기록하였다. 인간 유방암 이종 이식 모델을 제작하기 위해, 상이한 일련의 농도(10^7 부터 10^2 세포)의 2D 대조군 세포 또는 MCF7-Luc 암세포로부터 유래한 ssiCSC를 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스에 피하 주입하였다. β -estradiol 17-valerate (2.5 μg ; Sigma)이 용해된 50 μl 의 세삼오일(Sigma)을 10일마다 목을 통해 BALB/c 누드 마우스에 피하 투여하였다. 인간 신경교종 이종 이식 모델을 제작하기 위해, 상이한 일련의 농도(10^6 부터 10^2 세포)의 2D 대조군 U87MG 세포, ULA-배양된 U87MG 스페로이드 또는 pV4D4-배양된 U87MG-ssiCSC 세포를 50% 매트릭젤(Matrigel)과 혼합하고, 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스에 피하 주입하였다. MCF7-Luc 및 U87MG 세포로부터의 종양 형성을 90 일까지 모니터링하고, 종양 부피가 약 50 mm^3 에 도달할 때 종양이 형성되었다고 기록하였다.

[0081] **참고예 2: 세포 생존율 분석**

[0082] 다양한 종류의 암세포로부터 제조된 ssiCSC 스페로이드(SKOV3, MCF-7, Hep3B 및 SW480)를 트립신(TrypLE Express, Gibco)을 사용하여 분리하고, 상기 분리된 세포를 D-PBS로 2회 세척하였다. 상기 ssiCSC를 96-웰 플레이트(1×10^4 개의 세포/웰)에 플레이팅하고 10% FBS를 포함하는 세포 성장 배지에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 상기 배지를 제거하고, 다양한 농도의 독소루비신을 포함하는 새로운 배지를 각 웰에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 웰을 D-PBS로 세척하고 100 μl 의 새로운 세포 성장 배지로 교체한 다음, 10 μl 의 WST-1 세포 증식 시약(Roche)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 이후, 마이크로 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 450 nm(기준 파장, 600 nm)에서의 흡광도를 측정하였다

[0084] **참고예 3: 조직학적 분석 및 면역조직화학**

[0085] 2D 대조군 또는 SKOV3-ssiCSC 암세포가 접종된 BALB/C 누드 마우스에서 얻은 간 생검 표본을 10% 포르말린으로 고정하고, 탈수 및 파라핀으로 포매하고, 5 μm 의 두께의 표본으로 절단화하여, 슬라이드에 올려놓았다. 상기 표본은 표준 광학 현미경(Eclipse 80i, 니콘)하에서 조직학적 평가를 위해 탈락스하고 헤마톡실린-에 오신

(hematoxylin % eosin: H&E)으로 염색하였다.

[0086] 간 전이는 조직을 파라핀 포매하고 절편화(5 μm) 후에 면역조직화학적 방법으로 확인하였다. 절편화된 간 조직을 항원 회복을 위해 10mM 시트레이트 나트륨 완충액(pH 6.0)으로 멸균하고, 5% 소혈청 알부민(BSA) 및 1% 염소 혈청이 포함된 PBS로 블락킹한 후에, 실온(RT)에서 1시간동안 토끼 항-인간 TNC 1차 항체와 함께 인큐베이션 하였다(20 μg/ml; cat. no. AB19011; Millipore). 인큐베이션 후, 슬라이드를 D-PBS로 세척하고, 실온에서 30분 동안 비오틴이 부착된 항-토끼 2차 항체 (1:200; Vector Laboratories)와 함께 인큐베이션한 후, 실온에서 30분 동안 HRP(horseradish peroxidase, 1:500, Vector)와 함께 인큐베이션하였다. 면역반응성 단백질은 기질 3,3'-다이아미노벤지딘(Vector Laboratories)을 사용하여 시각화한 후, 헤마톡실린을 이용하여 대비염색하였다.

[0088] **참고예 4: 웨스턴블랏 분석**

[0089] 2D 대조군 SKOV3 세포 및 SKOV3-ssiCSC 스페로이드를 얼음 상에서 30분 동안 프로티나제 억제 각테일 (ThermoFisher Scientific)을 포함하는 RIPA 용해 완충액으로 용해했다. 브래드포드 단백질 분석키트(Bio-Rad)를 사용하여 상기 용해물의 단백질을 정량하고, 동량의 단백질(50 μg)을 Bolt 4-12% Bis-Tris Plus 폴리아크릴 아미드겔(ThermoFisher Scientific)을 이용하여 전기영동으로 분리했다. 제조사의 지침에 따라, 겔을 iBlot2 transfer system(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 건조 블랏하였다.

[0090] 1차 토끼 항-포스포-β-카테닌 항체(1:1000, cat. no. 9561; Cell Signaling Technology), 마우스 항-β-카테닌 항체(1:1000, cat. no. 13-8400; Invitrogen), 및 토끼 항-GAPDH 항체(1:1000, cat. no. 25778; Santa Cruz Biotechnology)와 함께 인큐베이션하여 상기 PVDF 막을 면역블랏하였고, 이어서 표준 절차를 사용하여 HRP-결합된 항-토끼 IgG 2차 항체 (1:5000, cat. no. 31460; Invitrogen) 또는 항- 마우스 IgG(1:5000, cat. no. 31430; Invitrogen) 2차 항체와 함께 적절하게 인큐베이션하였다. 단백질은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific)와 ChemiDoc MP 시스템 (Bio-Rad)을 사용하여 시각화했다.

[0092] **참고예 5: 유세포 분석**

[0093] 유세포 분석을 하기와 같이 실시하였다. 구체적으로, 단일층으로 배양된 2D 대조군 암세포 및 이에 상응하는 ssiCSC 스페로이드(8일 동안 배양)를 트립신 처리한 후, 완충액[1% FBS(fetal bovine serum)을 포함하는 D-PBS]으로 상기 세포를 각각 분리시켰다. SKOV3, MCF-7, Hep3B, 및 SW480 암세포를 각각 APC (allophycocyanin)-접합된 항-CD133 1차 항체(1:100; eBioScience), FITC-접합된 항-CD44 1차 항체(1:200; BD Biosciences), PE(phycoerythrin)-접합된 항-CD90 1차 항체(1:100, MACS; Miltenyi Biotec), 및 FITC-접합된 항-CD133 1차 항체(1:100; Miltenyi Biotec)로 염색하고, 유세포 분석 시스템(BD Calibur and BD LSR Fortessa)을 사용하여 분석하였다.

[0094] 또한, 측면계체군 어세이(side population assays)를 위해, 2D 대조군 암 세포 및 ssiCSCs를 트립신을 사용하여 분리하고, 37°C에서 90분 동안 2% FBS 및 10mM HEPES 완충액을 포함하는 DMEM에서 Hoechst 33342(ThermoFisher Scientific) 으로 염색하였다. 이어서 세포를 2% FBS를 포함하는 HBSS로 세척하고, 유세포 분석 시스템(BD LSR Fortessa)을 이용하여 분석하였다. 유세포 분석 데이터 히스토그램 및 플롯은 FlowJo software(Tree Star Inc.)을 사용하여 분석하였다.

[0096] **참고예 6: 라이브 세포 이미징(Live cell imaging)**

[0097] ssiCSC 스페로이드는 표준 인큐베이터(가습 5% 이산화탄소, 37°C) 내에서 라이브 세포 이미징을 가능하게 하는 LumaScope 620 시스템(Etaluma)을 사용하여 이미지화 하였다. 위상차 이미지는 10x 대물 렌즈를 사용하여 24시간 동안 매 2.5분 마다 관찰하였다.

[0099] **참고예 7: RNA 추출 및 mRNA 시퀀싱**

[0100] 제조사의 프로토콜에 따라, pV4D4 코팅 플레이트에서 8일 동안 배양된 SKOV3 스페로이드 및 2D 대조군 SKOV3 세포로부터 자생 mRNA 분리 키트(NEB)를 사용하여 mRNA를 추출하였다. 상기 제조사 프로토콜에 기술된 바와 같이, DNase 처리된 mRNA를 NEXTflex Rapid Directional mRNA-Seq 키트(BIOO)를 사용하여 라이브러리를 제조하였다. 각 라이브러리를 HiSeq2500 시스템에서 single-end 방법(50-bp reads)을 사용하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱된 결과는 STAR aligner (v.2.4.0) 61을 사용하여 인간 게놈(Hg19 version)과 비교하였다.

[0101] 또한, DEG를 조사하기 위해 HOMER 소프트웨어 알고리즘과 DESeq R 패키지를 사용했다. 히트맵 및 MA 플랏을 각

각 R 통계 프로그래밍 언어 v.3.3.0(<http://www.r-project.org/>)의 pheatmap 함수와 plotMA 함수를 사용하여 시각화하였다.

[0103] **참고예 8: 면역 세포 화학을 위한 면역 염색 방법**

[0104] SKOV3 스페로이드를 ULA 플레이트 및 pV4D4 플레이트로부터 1.5-ml 튜브로 옮기고, 실온(RT)에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드 용액(Sigma)에서 인큐베이션 하여 상기 스페로이드를 고정하였다. 고정된 스페로이드를 실온에서 10분 동안 0.25%(w/v) Triton X-100(Sigma)가 포함된 D-PBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)용액에서 인큐베이션하고, D-PBS로 세척한 다음, 블로킹하기 위해 3% BSA가 포함된 D-PBS으로 인큐베이션하였다.

[0105] 상기 스페로이드에 라미닌을 염색하기 위해, 상기 고정된 스페로이드를 4°C 에서 12시간 동안 항-인간 라미닌 1차 토끼 항체(1:100, cat. no.11575; Abcam)로 인큐베이션하였다. 그 후, D-PBS로 세척한 후, 수득된 스페로이드를 실온에서 1 시간 동안 rhodamine red-X-접합 항-토끼 2차 항체(1:500, cat. no. R6394; Invitrogen)로 인큐베이션하고, 그 후 10분 동안 Hoechst 33342로 인큐베이션하였다.

[0106] 또한, TNC 염색을 위해, 12시간 동안 4°C에서 SKOV3 2D 대조군 또는 SKOV3 스페로이드를 항-인간 TNC 1차 토끼 항체(20 µg/ml, cat. no.AB19011; Millipore) 와 인큐베이션하였다. 그 후, D-PBS로 세척한 후, 상기 세포 및 스페로이드를 실온에서 1시간 동안 FITC-접합 항-토끼 2차 항체 (1:500, cat. no.sc-2012; Santa Cruz)로 인큐베이션하였다. 그 후, 10분 동안 Hoechst 33342로 인큐베이션하였다.

[0107] β-카테닌 염색을 위해, 실온에서 1시간 동안 SKOV3 2D 대조군과 SKOV3- ssiCSCs를 마우스 항-인간 β-카테닌 1차 항체(1:100, cat. no.13-8400; Invitrogen)와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, D-PBS로 세척한 후, 상기 세포를 실온에서 1시간 동안 TRITC-접합 항-마우스 2차 항체(1:1000, cat. no.ab6786; Abcam)로 인큐베이션하였고, 이어서 Hoechst 33342로 10분 동안 인큐베이션하였다. 모든 형광 이미지는 공초점 레이저-주사현미경(LSM 780, Carl Zeiss)을 사용하여 시각화하였다.

[0109] **참고예 9: 통계적 분석 및 데이터 출처**

[0110] 데이터는 평균±표준 편차(s.d.)로 표현되었다. GraphPad Prism 소프트웨어 (La Jolla)의 unpaired Student's t-test를 사용하여 통계 분석을 수행했다. Pvalue< 0.05는 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[0111] 또한, NCBI의 Gene Expression Omnibus 데이터 저장소의 GSE106848 RNA 시퀀싱 데이터가 이용되었다.

[0113] **실시예 1: 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관 또는 커버글래스의 제작**

[0114] 1-1: iCVD 공정을 통한 PTF 세포 배양 기관 또는 커버글래스 제작

[0115] 하기와 같은 방법을 통해 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 중합체 박막(polymer thin film: PTF)을 제조하였다.

[0116] 먼저, pV4D4[poly(2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane) 중합체 박막(polymer thin film: PTF)을 제조하였다. 구체적으로, 단량체의 기화를 위해, V4D4[2,4,6,8-테트라비닐-2,4,6,8-테트라메틸 사이클로테트라실록산(2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane)](99%; Gelest) 및 tert-부틸 페록사이드(tert-butyl peroxide: TBPO, 98%; Aldrich)를 각각 70 및 30으로 가열하였다. 기화된 V4D4 및 TBPO를 iCVD chamber(Daeki Hi-Tech Co. Ltd.)에 1.5 및 1 표준 cm³/min (sccm)의 유속으로 각각 도입하였다. 상기 기관 온도는 40로 유지하였고, 필라멘트 온도는 200로 유지하였으며, iCVD chamber의 압력은 180mTorr로 설정하였다. pV4D4 막의 증착 속도는 1.8nm/min으로 추정된다. pV4D4 필름의 두께는 He-Ne 레이저 (JDS Uniphase) 간섭계 시스템을 사용하여 그 위치에서 모니터링하였다.

[0118] 1-2: 다양한 사이클로실록산 중합체를 포함하는 세포배양 기관의 제작

[0119] 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 세포배양 기관을 제작하기 위해, 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4), 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산, 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산, 옥타(비닐실라세스퀴옥산), 및 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산을, 각각 pV4D4와 1:9의 비율로 공중합체 기관을 형성하였다. 상기 다양한 사이클로실록산 화합물의 화학구조는 도 1 g 내지 도 1 l에 나타내었다.

[0120] 도 1g 내지 도 1l은 다양한 사이클로실록산 화합물의 구조를 나타낸 것으로, 도 1g는 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트

리메틸사이클로트리실록산의 구조를 나타낸 것이고, 도 1h는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4)의 구조를 나타낸 것이며, 도 1i는 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산의 구조를 나타낸 것이고, 도 1j는 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산의 구조를 나타낸 것이며, 도 1k는 옥타(비닐실라세스퀴옥산)의 구조를 나타낸 것이고, 도 1l은 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산의 구조를 나타낸 것이다.

[0122] 1-3: 분석 방법

[0123] V4D4 단량체 및 pV4D4 중합체의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼(FT-IR)을 ALPHA FTIR 분광계 (Bruker Optics, USA)를 사용한 정상 흡광도 모드에서 64개의 평균 스캔 및 0.085 cm^{-1} 의 광학분해능을 사용하여 취득하였다. 각 스펙트럼은 기준선이 보정되었고 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 범위에서 기록하였다.

[0124] pV4D4 PTF 표면의 화학적 조성은 2.0×10^{-9} mbar의 기압에서 X선 광전자 분광법(XPS; K-alpha, Thermo VG Scientific Inc.)에 의해 분석하였다. XPS 스펙트럼은 운동 에너지 (KE)가 12 kV 및 1486.6 eV 인 단색 Al K α 방사선 X 선원을 사용하여 $100\text{--}1100\text{ eV}$ 범위에서 기록하였다.

[0125] $45 \times 45\ \mu\text{m}$ 영역의 표면 지형은 비접촉 모드에서 0.5 Hz의 스캔 속도로 원자력 현미경 (AFM; PSIA XE-100, Park Systems)에 의해 분석하였다.

[0126] Si 웨이퍼, pV4D4 코팅된 Si 웨이퍼, 조직 배양 기관 및 pV4D4 코팅 기관에 대한 물 접촉각은 $10\ \mu\text{l}$ 의 탈이온수를 해당 표면에 떨어뜨림으로써 접촉각 분석기(Phoenix 150; Surface Electro Optics, Inc.)를 사용하여 측정하였다.

[0128] **실시예 2: 다양한 중합체 박막(PTF)을 이용한 암세포 유래 스페로이드의 형성**

[0129] 2-1: 다양한 인간 암 세포주 준비

[0130] 인간 난소암 세포주(SKOV3, OVCAR3), 인간 유방암 세포주(MCF-7, T47D, BT-474), 인간 간암종 세포주(Hep3B, HepG2), 인간 아교 교아종 세포주(U87MG, U251), 인간 대장암 세포주(SW480, HT-29, HCT116, Caco-2), 인간 폐암 세포주(A549, NCIH358, NCI-H460) 및 인간 전립선암 세포주(22RV1), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 흑색종 세포주(A375), 및 인간 위암 세포주(NCI-N87)는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 구입하였다. e-Myco 마이코플라스마 PCR 검출 키트(iNTRON Biotechnology)를 사용하여 모든 암세포는 마이코플라스마가 없음을 확인하였다.

[0132] 2-2: 스페로이드 형성 방법

[0133] 암 세포(1×10^6)를 다양한 중합체 박막 기관에 접종하고, 37°C 의 가습된 5% CO $_2$ 대기에서 10%(v/v) 혈청 대체물 (serum replacement: SR, Gibco), 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin: P/S, Gibco), 및 L-글루타민을 포함하는 RPMI-1640 배지, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지 또는 MEM(Minimal Essential Medium) 배지에서 적절하게 배양하였다.

[0134] 구체적으로, SKOV3, T47D, BT-474, SW480, HT29, 22RV1, A549, NCI-H358, NCI-N87, OVCAR3, NCI-H460, 및 HCT116 세포주는 10%(v/v) SR, 1% (v/v) P/S, 및 25mM HEPES(Gibco)를 포함하는 RPMI-1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. MCF-7, Hep3B, HeLa, U251, 및 A375 세포주는 10%(v/v) SR 및 1%(v/v) P/S(Gibco)를 포함하는 DMEM에서 배양하였다. HepG2, U87MG, 및 Caco-2 세포주는 10% (v/v) SR 및 1% (v/v) P/S (Gibco)를 포함하는 MEM에서 배양하였다. 또한, 최적의 스페로이드 성장을 위해 배지는 2-3일마다 교체하였다.

[0136] 2-3: 사이클로실록산 중합체 박막의 스페로이드 형성 특이성 확인

[0137] 세포 배양 기관에 다양한 표면 기능성을 도입하기 위해, iCVD (initiated chemical vapor deposition) 공정을 사용하여 다양한 단량체로부터 종래의 조직 배양 기관(tissue culture plates: TCP)에 중합체 박막(polymer thin films: PTFs) 라이브러리를 구축하고, 각각의 PTF의 암형성능 스페로이드의 제조 능력을 확인하였다(도 1m). 이를 위해, 인간 난소암 세포주인 SKOV3를 다양한 PTF에서 배양해보았다. 테스트한 PTFs를 구성하는 화학 구조는 도 1a 내지 도 1f에 나타났다. 도 1a는 EGDMA(ethylene glycol diacrylate) 및 이의 중합체(pEGDMA)의 구조를 나타낸 것이고, 도 1b는 VIDZ(1-vinyl imidazole) 및 이의 중합체(pVIDZ)의 구조를 나타낸 것이며, 도 1c는 IBA(isobornyl acrylate) 및 이의 중합체(pIBA)의 구조를 나타낸 것이고, 도 1d는 PFDA(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl acrylate) 및 이의 중합체(pPFDA)의 구조를 나타낸 것이고, 도 1e는 GMA(glycidyl

methacrylate) 및 이의 중합체(pGMA)의 구조를 나타낸 것이며, 도 1f는 V4D4(2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane) 및 이의 중합체(pV4D4)의 구조를 나타낸 것이다.

[0138] 그 결과, 사이클로실록산 화합물 중합체로 제조된 pV4D4[poly(2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane)] PTF상에서만 24시간 내에 매우 많은 다세포 스페로이드가 형성된 것을 확인하였다. 이와는 대조적으로, 다른 PTF상에서 자란 SKOV3는 TCP상에서 자란 세포와 유사하게 부착되어 퍼져나가는 형태를 나타냈다(도 1n). 도 1n은 종래의 TCP 및 다양한 기능성 PTF상에서의 암형성능 스페로이드 형성 여부를 확인한 도면이다.

[0140] **실시예 3: 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관의 스페로이드 형성 가능여부 확인**

[0141] 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성되는지 확인해보기 위해, 실시예 1-2에서 제작된 세포배양기관에 SKOV3 세포를 접종하여 24시간 뒤 스페로이드를 형성하였는지 확인하였다.

[0142] 구체적으로, 도 1g 내지 도 1l의 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성되는지 확인해본 결과, 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산(도 1g), 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4) (도 1h), 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산(도 1i), 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산(도 1j), 옥타(비닐실라세스퀴옥산) (도 1k), 및 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산(도 1l)을 포함하는 세포배양기관에서도 스페로이드가 형성된 것을 확인하였다(도 1o 내지 도 1t).

[0143] 도 1o 내지 도 1t는 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것으로, 도 1o는 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산이 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이며, 도 1p는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4)이 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이고, 도 1q는 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산이 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이며, 도 1r은 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산이 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이고, 도 1s는 옥타(비닐실라세스퀴옥산)가 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이며, 도 1t는 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산이 포함된 세포배양 기관에서 스페로이드가 형성된 것을 보여주는 것이다.

[0145] **실시예 4: 다양한 암세포주를 이용한 스페로이드 형성 가능여부 확인**

[0146] 사이클로실록산화합물 중합체를 포함하는 PTF가 인간 난소암 세포주 SKOV3 외의 다른 암세포주에서도 스페로이드-형성증진 능력을 갖는지 확인하였다.

[0147] 그 결과, 기원 또는 유래 상관없이 대부분의 인간 암 세포주에서 다세포 스페로이드(~50-300 μm 지름)가 24시간 이내에 형성되었고, 높은 효율 및 재현성을 보였다(도 2의 a). 각 스페로이드의 형태는 '포도송이' 모양부터 조밀한 구체까지 그 형태가 다양하였고(도 2의 b), 이러한 결과는 PTF 플랫폼의 다양성을 나타낸다.

[0149] **비교예 1: 종래 스페로이드 형성 방법**

[0150] 종래의 방법으로 스페로이드 형성하기 위해 아래와 같이 실시하였다.

[0151] 구체적으로, Hanging-drop 96-웰 플레이트(3D Biomatrix), U-bottom 96-웰 플레이트 (SBio), 및 ultra-low attachment (ULA) 6-웰 플레이트 (Corning)를 사용하였다. 세포는 hanging drop 플레이트에 1×10^4 세포/50 μl의 밀도로 접종하고, U-bottom 플레이트에 5×10^4 세포/2ml의 밀도로 접종하고, ULA 플레이트에 5×10^5 세포/2ml의 밀도로 접종하였다. 최적의 스페로이드 성장을 위해 배지는 2-3 일마다 교체하였다.

[0153] **실시예 5: 제조된 암줄기세포 스페로이드의 특성분석**

[0154] 5-1: 사이클로실록산 화합물 중합체 기관의 암세포 유래 스페로이드 형성 특성

[0155] 상기 실시예 2-3의 스페로이드 형성 과정에서, 각각의 암세포는 처음에는 pV4D4 표면에 부착되었지만, 곧바로 자발적으로 세포간 상호작용하여 다세포 스페로이드를 형성하였다. 상기 pV4D4상에서의 상기 활성화된 세포간 상호작용은, 단순한 물리적 또는 기계적 접촉-기반 결합에 의존한, 다른 스페로이드-형성 기술에서는 관찰되지 않은 현상이다.

[0156] 종래의 친수성 ULA(ultra-low-attachment) 표면과 달리, FT-IR(Fourier transform infrared) 분광법 및 XPS(X-

ray photoelectron spectroscopy)으로 특징지어지는, pV4D4 PTF 표면은(도 3a 및 b, 표 1) 물 접촉각 이 ~90° 로 상대적으로 소수성이고(도 3c), 종래의 TCPs와 유사한 조도를 갖는 매끄러운 표면을 갖는다(도 3d).

표 1

Atoms	Measured value [%]	Theoretical value [%]
C	59.08	60
O	21.49	20
Si	19.42	20
Total	100	100

[0157]

[0158]

또한, pV4D4를 He-Ne 레이저 (JDS Uniphase) 간섭계 시스템을 사용하여 10, 50, 100, 200 및 300 nm의 두께로 TCP에 증착시켜 제작된 다양한 두께의 pV4D4 PTF 를 제작하여 두께와 스페로이드 형성 능력의 상관관계를 확인 하였던 바, 50 내지 300nm 범위에서의 pV4D4 PTFs의 두께 변화는 스페로이드-형성 능력에 전혀 영향을 끼치지 않았다(도 4). 상기 결과를 종합해보면, pV4D4의 경우 기계적 신호가 아닌 pV4D4에 존재하는 특정한 표면 기능성(화학적 또는 생물학적 자극)이 스페로이드 형성을 유도함을 알 수 있다.

[0159]

이와 같은 결과들은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기관들이 암세포를 특정 성질을 갖는 3D 스페로이드로의 형성을 할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0161]

5-2: 제조된 암줄기세포 스페로이드의 형태 분석

[0162]

먼저, pV4D4 PTF에서 4 내지 8일간 배양하여 제조된 암세포 스페로이드의 특징을 상기 1-2에서 제조된 종래의 다른 스페로이드-형성 방법으로 제조된 스페로이드와 비교하였다.

[0163]

그 결과, SKOV3 암세포는 hanging-drop 방법 및 U-bottom 방법을 통해 하나의 큰 응집된 스페로이드를 형성하는 반면, ULA 및 pV4D4 표면에서는 여러개의 작은 스페로이드를 형성하였고, 상기 pV4D4에서 형성된 스페로이드는 ULA에서 형성된 스페로이드보다 더 균일하며 약간 작았다(도 8의 a). 또한 면역세포화학적 분석을 통해 ULA 표면 또는 pV4D4 표면에서 8일간 배양된 SKOV3 스페로이드를 비교한 결과, pV4D4 표면에서 배양된 스페로이드의 경우 세포외 기질(ECM)의 주요 구성성분인 라미닌(laminin)이 스페로이드 안에 존재하였지만, ULA 표면에서 배양된 스페로이드의 경우에는 라미닌이 스페로이드 주변에만 국한되어 존재하였다(도 8의 b).

[0164]

상기 결과를 토대로, 본 발명의 pV4D4에서 배양하여 제조된 스페로이드는, 종래의 방법을 사용하여 제조된 스페로이드와 같은 암세포 응집체가 아니라, 생체 내에서 종양 조직의 ECM-매개 다세포 구조를 되풀이하고 있음을 보여준다. 상기 ECM은 종양 미세환경에서 약물 내성, 자가-재생성 및 암형성능의 발달에서 중추적인 역할을 하는 것으로 보여진다.

[0166]

실시예 6: 알부민을 이용한 암줄기세포 스페로이드의 제조

[0167]

6-1: 암줄기세포 스페로이드의 제조

[0168]

암줄기세포 스페로이드를 형성하기 위해, SKOV3 세포(1x10⁶)를 pV4D4로 코팅한 기관에 접종하고, 37°C의 가습된 5% CO₂ 대기에서 10%(v/v) 혈청 대체물(serum replacement: SR, Gibco), 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin: P/S, Gibco), 및 L-글루타민을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 적절하게 배양하였다. 최적의 스페로이드 성장을 위해 배지는 2-3일마다 교체하였으며, 스페로이드를 얻었다. 혈청 대체물의 알부민 농도는 1mg/ml 이상이며, FBS(fetal bovine serum) 혈청에 포함된 알부민의 농도보다 높았다.

[0170]

6-2: CSC 관련 유전자 발현 확인을 통한 암줄기세포 스페로이드 형성 확인

[0171]

실시예 6-1에서 제조된 스페로이드가 암줄기세포의 특성을 가지는지 확인하기 위해, CSC 관련 유전자의 발현을 qRT-PCR 및 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 대조군으로서 비교에 1의 종래의 방법으로 형성된 스페로이드를 사용하였다.

[0172]

구체적으로, qRT-PCR을 수행하기 위해, 제조사의 지침에 따라 2D-배양된 대조군 암세포 및 ssiCSC 스페로이드로부터 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer)와 혼합하고 Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. qRT-PCR 실험은 Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen)와 KAPA SYBR FAST Universal qPCR 키트 (Kapa Biosystems)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 50ng의 RNA로

수행했다.

[0173] 또한, RT-PCR을 이용하여 암 줄기세포성 마커 유전자인 CD44, CD133, ALDH1A1, ALDH1A2 및 EpCAM의 발현 수준을 분석하기 위해 제조사의 지침에 따라 HyperScript One-step RT-PCR 키트 (GeneAll Biotechnology Co. Ltd.)를 사용하여 30 사이클 프로그램으로 수행했다. β-actin은 내부 대조군(internal control)으로 사용하였다.

[0174] 상기 qRT-PCR 및 RT-PCR을 수행하기 위한 프라이머의 서열은 하기 표 2에서 나타난다.

표 2

Gene (Accession number)	Primer pair	Primer sequence	서열번호
Human β-actin (NM_001101.3)	Forward primer	GTCTTCCCCTCCATCGTG	1
	Reverse primer	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC	2
Human ALDH1A1 (NM_000689.4)	Forward primer	CGCCAGACTTACCTGTCTTA	3
	Reverse primer	GTCAACATCCTCCTTATCTCCT	4
Human ALDH1A2 (NM_003888.3)	Forward primer	CAGCTTTGTGCTGTGGCAAT	5
	Reverse primer	GGAAAGCCAGCCTCCTTGAT	6
Human EpCAM (NM_002354.2)	Forward primer	AGTTGGTGCACAAACTGTGCAT	7
	Reverse primer	TCCCAAGTTTTGAGCCATTC	8
Human CD44 (XM_006718390.3)	Forward primer	TCCAACACCTCCCAGTATGA	9
	Reverse primer	GGCAGGTCTGTGACTGATGT	10
Human CD90 (NM_001311162.1)	Forward primer	AGAGACTTGGATGAGGAG	11
	Reverse primer	CTGAGAATGCTGGAGATG	12
Human CD133 (XM_006713974.3)	Forward primer	ACCAGGTAAGAACCCGGATCAA	13
	Reverse primer	CAAGAATCCGCCTCCTAGCACT	14
Human LGR5 (NM_001277227.1)	Forward primer	CCTGCTTGACTTTGAGGAAGACC	15
	Reverse primer	CCAGCCATCAAGCAGGTGTTC	16
Human Oct3/4 (NM_001285987.1)	Forward primer	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	17
	Reverse primer	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	18
Human Sox2 (NM_003106.3)	Forward primer	CATCACCCACAGCAAATGACA	19
	Reverse primer	GCTOCTACCGTACCAGTAGAAGCTT	20
Human Nanog (XM_011520852.1)	Forward primer	AATACCTCAGCCTCAGCAGATG	21
	Reverse primer	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC	22
Human ABCB1 (NM_001348946.1)	Forward primer	TGACATTTATTCAAAGTTAAAAGCA	23
	Reverse primer	TAGACACTTTATGCAAACATTTCAA	24
Human ABCB2 (NM_000593.5)	Forward primer	CGTTGTCAGTTATGCAGCGG	25
	Reverse primer	ATAGATCCCGTCAOCCACGA	26
Human ABCB5 (XM_011515367.2)	Forward primer	CACAAAAGGCCATTCAAGCT	27
	Reverse primer	GCTGAGGAATCCACCCAATCT	28
Human ABCO1 (XM_017023243.1)	Forward primer	GGAATACCAGCAACCCCGACTT	29
	Reverse primer	TTTTGGTTTTGTTGAGAGGTGTC	30
Human ABCO2 (NM_001348989.1)	Forward primer	TCATGTTAGGATTGAAGCAAAGGC	31
	Reverse primer	TGTGAGATTGACCAACAGACCTGA	32
Human DKK1 (NM_012242.2)	Forward primer	TCCCTGTGATTGCAGTAAA	33
	Reverse primer	TCCAAGAGATCCTTGCGTTC	34
Human β-catenin (NM_001330729.1)	Forward primer	ACAGCTCGTTGTACCGCTGG	35
	Reverse primer	AGCTTGGGGTCCACCACTAG	36
Human AXIN2 (XM_017025194.1)	Forward primer	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC	37
	Reverse primer	CTTCACACTGCGATGCATTT	38
Human MMP-2 (NM_001302510.1)	Forward primer	TCTCCTGACATTGACCTTGGC	39
	Reverse primer	CAAGGTGCTGGCTGAGTAGATC	40

[0175]

[0176] 그 결과, 다양한 스페로이드 형성 방법 중, 오직 pV4D4에서 배양하여 제조된 SKOV3 스페로이드에서만 CSC 마커로 알려진, ALDH1A1(aldehyde dehydrogenase 1 family member A1) 발현이 크게 증가되었음을 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction: qRT-PCR) 분석을 통해 확인하였다(도 8c). 또한, pV4D4에서 배양하여 제조된 SKOV3 스페로이드는 TCP상에서 성장한 2D-배양된 SKOV3 대조군과 비교하였을때, 전형적인 자가 재 생성 유전자인 Oct3/4, Sox2 및 Nanog의 발현이 현저히 증가되었음을 확인되었다 (도 8d). 상기

결과를 통해 상기 스페로이드 내의 암세포는 줄기세포적 특성을 가짐을 알 수 있었다.

[0178] 6-3: 알부민의 암줄기세포 유도 기능 확인

[0179] 스페로이드의 암줄기세포(CSC: Cancer Stem Cell) 특성이 알부민에 의해 유도된 것인지 확인하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0180] 먼저, 다양한 종류의 FBS 및 혈청 대체제(serum replacement: SR)를 사용한 경우, CSC 마커 유전자의 발현 수준을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, pV4D4 PTF상에 플레이팅된 U87MG를 3종류(Welgene, Hyclone, GIBCO)의 FBS 및 SR에서 6일간 배양 후, 유세포 분석을 통해 CSC 마커인 CD133 및 CD44의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 3종류의 FBS에 비해 SR이 첨가된 경우의 CD133 및 CD44의 발현 수준이 우수함을 확인하였다(도 5의 a). 또한, native-gel을 사용하여 FBS 및 SR의 알부민 함량을 비교한 결과, SR이 FBS보다 많은 양의 알부민을 포함하고 있음을 확인하였다(도 5의 b). 상기 결과를 토대로, SR이 FBS보다 알부민 함량이 높아 스페로이드의 CSC 유도를 촉진함을 알 수 있다. 다음으로, pV4D4 PTF상에 플레이팅된 5×10^5 개의 U87MG를 FBS 및 다양한 농도의 소혈청알부민(BSA)(0.1, 5, 10, 20, 40, 및 80mg/ml)이 포함된 무혈청 배지(SFM)에서 8일간 배양한 후, 스페로이드 형성 여부를 확인하고, 유세포 분석을 통해 BSA 농도가 0.1, 5, 10, 20, 40, 및 80mg/ml인 무혈청 배지(SFM)에서 배양한 세포의 CSC 마커 유전자(CD133)의 발현 수준을 확인하였다.

[0181] 그 결과, BSA가 포함된 배지에서 스페로이드가 형성됨을 확인하였고, CSC 마커인 CD133이 발현됨을 확인하였다(도 6a 및 b). 또한 BSA의 농도가 올라갈수록 CD133의 발현 수준이 증가됨을 확인하였다. 또한, 일반적인 세포 성장 배지에 포함되는 FBS를 사용한 경우, 스페로이드는 형성되지만 CSC 마커인 CD133은 발현되지 않는 것을 확인하였다. 즉, 알부민이 특정 농도 이상 포함된 배지 하에서는 CSC마커가 발현되어 암줄기세포의 특성을 나타낸 것을 알 수 있으나, 알부민이 낮은 농도로 포함되어 있는 경우에는 CSC 마커가 발현되지 않아, 암줄기세포의 특성을 가지지 않는 것을 확인하여, 특정 농도 이상의 알부민에 의해 암줄기세포가 유도됨을 확인하였다.

[0182] 또한, TCP와 pV4D4 PTF에서 FBS, SR 또는 40mg/ml BSA가 포함된 무혈청 배지(SFM)에서 U87MG, SKOV3, 및 MCF7을 배양한 경우 CSC 마커인 CD133의 발현 수준을 유세포 분석을 통해 확인하고 도표로 표시하였다(도 7a 및 도 7b).

[0183] 상기 결과를 토대로, 알부민이 암줄기세포를 유도할 수 있고, pV4D4 PTF상에서 배양하는 경우에는 특정 농도 이상의 알부민을 무혈청 배지(SFM)에 포함하여 배양하는 것이 암줄기세포를 효율적으로 유도할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0185] 6-4: 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서 제조된 스페로이드의 암줄기세포 특성 확인

[0186] 다양한 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서 제조된 스페로이드가 암줄기세포 특성을 가지는지 확인하기 위해, 암 줄기세포성 마커 유전자인 CD133의 발현 수준을 측정하여, 그 결과를 도 7c에 나타내었다.

[0187] 구체적으로, pV4D4 및 도 1g 내지 도 1l의 6가지 사이클로실록산 화합물을, 각각 9:1 비율로 공중합체 기관을 형성하였다. 도 1g는 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산, 도 1h는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산(V4D4), 도 1i는 2,4,6,8,10-펜타메틸-2,4,6,8,10-펜타비닐사이클로펜타실록산, 도 1j는 2,4,6,8,10,12-헥사메틸-2,4,6,8,10,12-헥사비닐-사이클로헥사실록산, 도 1k는 옥타(비닐실라세스퀴옥산), 및 도 1l은 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-도데카메틸사이클로헥사실록산을 나타낸 것이다. 각 기관에 SKOV3 세포를 처리하여 24시간 뒤 스페로이드가 형성됨을 확인하였고, 8일 후 유세포 분석을 통해 CD133 발현되는 세포의 수가 증가함을 확인하였다.

[0188] 도 7c의 x축에서 1g는 pV4D4 및 도 1g의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1h는 pV4D4 및 도 1h의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1i는 pV4D4 및 도 1i의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1j는 pV4D4 및 도 1j의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1k는 pV4D4 및 도 1k의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이고, 1l는 pV4D4 및 도 1l의 사이클로실록산 화합물이 공중합된 기관에서 제조한 암줄기세포 스페로이드의 CD133 발현량을 나타낸 것이다.

[0189] 따라서, pV4D4 외 다른 사이클로실록산 화합물을 사용하였을 때에도 암줄기세포의 특성을 유도 가능함을 확인할 수 있었다.

[0191] **실시예 7: 다양한 알부민 농도에서의 암줄기세포 스펜로이드 생성**

[0192] **7-1: 다양한 알부민 농도에서의 스펜로이드 형성 확인**

[0193] SFM배지에 알부민의 농도가 0, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml, 및 10mg/ml가 되도록 BSA를 첨가하여 배지를 조성하고, 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관 및 TCP 기관에서 암세포를 배양하여, 스펜로이드가 형성되는지 확인해보았다.

[0194] 그 결과, 도 7d에서 알 수 있듯이, 사이클로실록산 화합물인 pV4D4 기관에서는 스펜로이드 형태가 나타났으나, TCP 기관에서는 스펜로이드가 형성되지 않았다.

[0196] **7-2: 스펜로이드의 암줄기세포 마커 확인**

[0197] SFM배지에 알부민의 농도가 0, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml, 400mg/ml가 되도록 BSA를 첨가하여 배지를 조성하고, 사이클로실록산 화합물을 포함하는 기관에서 암세포를 배양하여 암줄기세포 스펜로이드가 형성되는지 확인해보았다.

[0198] 그 결과, 도 7e에서 알 수 있듯이, 알부민 농도에 따라 CD133의 발현 수준이 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

[0199] 상기 결과들을 종합해보면, 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체의 한 예인, pV4D4 표면이 SKOV3 암세포를 활성화시키고 변형시키는 특정 자극을 제공하여, 암세포의 스펜로이드 형성을 유도하고, 알부민이 이의 암줄기세포 특성을 유도하여, 상당히 많은 양의 CSC-유사 세포를 포함하는 스펜로이드를 생성시킨다는 것을 알 수 있다. 따라서, 상기 CSC-유사 세포를 표면-자극-유도 암줄기세포 (surface-stimuli-induced cancer stem cells: ssiCSCs)로 명명하였다.

[0201] **실시예 8: 다양한 암세포주를 이용한 암줄기세포 스펜로이드 형성 능력 확인**

[0202] 상기 pV4D4를 이용한 스펜로이드 제조 방법의 일반화 가능성을 확인하기 위해, 다양한 암세포주에서 유래한 ssiCSC 스펜로이드를 제조하고, CSC-관련 특성을 확인하였다. 이를 위해 다양한 조직에서 유래한 4가지 인간 암세포주를 선택하였다: SKOV3, MCF-7(인간 유방암), Hep3B(인간 간암) 및 SW480(인간 대장암). 또한, 각 세포주별 특정 표면 마커를 사용하여 각 세포주에 대한 추정 CSC 특성을 확인 하였다: SKOV331 - ALDH1A1; MCF-7 - CD44(cluster of differentiation 44); Hep3B36 - CD90; 및 SW48037 - LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5). 또한, CD133은 모든 세포주에 대한 일반적인 추정 CSC 마커로 사용하였다. CSC 마커 유전자의 발현은 pV4D4 표면에서 4일 및 8일 동안 배양한 ssiCSC 스펜로이드를 qRT-PCR로 확인하였고, TCP로 배양된 해당 2D 대조군과 CSC 마커 유전자의 발현을 비교하였다.

[0203] 그 결과, 각각의 세포-유형 특이적 CSC 마커 유전자는 각 스펜로이드에서 유의하게 상향조절되었고, 공통 마커인 CD133의 발현은 모든 ssiCSC 스펜로이드에서 증가되었다(도 11의 a). 또한, 상기 마커 유전자의 발현 수준은 배양 시간에 따라 증가하였는 바, 이는 배양될수록 CSC-유사 특성이 강화됨을 보여준다. 또한, RTPCR(Reverse transcription-PCR) 분석은 2D 배양 대조군 암세포와 비교하여 모든 ssiCSC 스펜로이드에서 다양한 CSC-관련 유전자의 발현이 증가되었음을 보여주었다(도 11의 b).

[0204] 다음으로, pV4D4 표면에서 8일 동안 배양하여 제조된 스펜로이드에서 추정 CSC-마커-양성 암세포의 비율을 유세포 분석을 통해 정량화하였다. 그 결과, 2D-배양된 대조군과 비교하여 SKOV3, Hep3B 및 SW480의 ssiCSC 스펜로이드에서 세포-유형-특이적 CSC-관련 표면 마커(유전자 카운트로 표시)의 발현이 대략 10배 증가한 것으로 나타났다, MCF-7 세포의 CD44의 경우에는 10배 보다는 적게 증가하였다(도 11의 c).

[0205] 이와 같은 결과들은 pV4D4를 이용하여 제조된 ssiCSC 스펜로이드는 CSC와 유사한 특성을 갖는 것을 시사한다.

[0207] **실시예 9: 제조된 암줄기세포 스펜로이드의 상처 치유 어세이, 침투 어세이 및 스펜로이드-형성 분석**

[0208] **9-1: 분석방법**

[0209] SKOV3 세포를 pV4D4-코팅 기관에서 8일 동안 배양하였다. SKOV3-스페로이드 형성을 확인한 후, 상기 ssiCSC 스펜로이드를 트립신(TrypLE Express; Gibco)으로 분리하여 상기 분리된 세포를 D-PBS로 두 번 세척하였다.

[0210] 상처 치유(Wound healing) 어세이는 먼저 6-웰 플레이트에서 SKOV3 세포 및 SKOV3-ssiCSCs를 단일층으로 밀집되게 배양한 후, 상기 세포를 1% FBS 함유 배지에서 24시간 동안 동기화시켰다. 그 후 "상처"는 표준 200 µl 피펫 팁으로 세포 단일층을 균일하게 긁어서 만들었다. 떨어진 세포를 D-PBS로 2회 세척하여 제거한 후, 무혈청 배지를 첨가하였다. 상처 부위로의 세포의 이동은 상처가 만들어진 직후(0h), 만들어진지 12시간(12h) 및 24시

간(24h) 후에 위상차 현미경(LumaScope 620, Etaluma)을 사용하여 관찰하였다.

[0211] 침투(Invasion) 어세이는 먼저 무혈청 배지에서 24시간 동안 SKOV3 세포와 SKOV3-ssiCSCs 세포를 배양시킨 후 Transwell chamber(Corning)에서 배양하여 수행 하였다. 매트릭겔(200 µg/ml; Corning)로 코팅된 투명한 PET 막(8.0 µm 기공 크기) 의 상부 chamber에 세포(1x10⁵ 개의 세포/웰)를 플레이팅하고, 10% FBS를 포함하는 배지로 채워진 하부 chamber로 침투할 수 있도록 하였다. 세포를 24시간 동안 배양 하고 4% 포름알데히드(Sigma)로 고정시켰다. 막의 상부 chamber상의 투과하지 못한 세포를 면봉을 사용하여 제거하였다. 막의 하부 표면 상의 이동하는 세포를 Hoechst 33342(ThermoFisher Scientific)으로 염색하고, 형광 현미경 (Eclipse 80i, Nikon)을 사용하여 침투 세포의 핵을 계수 하였다. 침투는 각 막의 5개 필드 당 평균 세포수로 계산되었다.

[0212] 스페로이드 형성 어세이를 위해, SKOV3 세포와 SKOV3-ssiCSCs는 B27 (Invitrogen), 20ng/ml EGF(epidermal growth factor, Gibco), 10ng/ml LIF(leukemia inhibitory factor, Invitrogen) 및 20ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor, Invitrogen)를 포함하는 DMEM/F12 (1:1, Gibco)에서 배양하였다. 스페로이드의 형성은 위상차 현미경 (LumaScope 620; Etaluma)을 사용하여 1시간 및 24시간 후에 이미지를 통해 관찰하였다.

[0214] 9-2: 결과

[0215] 상처 치유 어세이에서 8일간 pV4D4에서 배양하여 제조된 SKOV3 스페로이드로부터 분리된 암세포가 2D-배양된 대조군 세포보다 빠르게 이동하여 틈새를 매우고(도 9의 a), 트랜스웰-기반 침투 어세이에서 상기 스페로이드로부터 분리된 암 세포가 상기 대조군 세포보다 겔 기질에 더 많이 침투할 수 있음을 확인하였는 바(~4배) (도 9의 b), 이를 통해 pV4D4에서 배양하여 제조된 스페로이드는 향상된 세포 이동성 및 침투성을 갖는 것을 알 수 있다.

[0217] **실시예 10: 제조된 암줄기세포 스페로이드의 CSC 특성 유지 확인**

[0218] 8일간 pV4D4에서 배양하여 제조된 SKOV3 암줄기세포 스페로이드로부터 단일세포로 분리된 암 세포를 종래의 TCPs에서 배양하여 "스페로이드 형성능"을 평가하였다. 상기 SKOV3-ssiCSCs 및 U87MG-ssiCSCs에 의한 스테로이드 형성 여부를 확인한 도면을 도 10에 나타냈다.

[0219] 도 10에서 알 수 있듯이, 자발적으로 스페로이드가 형성됨을 보여주는 바, 이는 상기 스페로이드가 CSC-유사 특성을 유지하고 있음을 보여준다.

[0221] **실시예 11: ssiCSC의 약물 내성 확인**

[0222] CSC의 다른 중요한 특징 중 하나는 약물을 밖으로 밀어내는 능력으로 인해 화학요법에 대해 내재적 또는 획득성 약물 내성을 갖는 것이다. 이와 관련하여, Hoechst-dye에 기반한 측면-개체군(side-population) 어세이를 통해 pV4D4 표면에서 8일 동안 배양하여 제조된 스페로이드로부터 분리된 각각의 암세포의 약물-배출 능력을 확인하였다. 그 결과, 2D-배양된 대조군과 비교하여 4가지 암세포주로부터 제조된 ssiCSC에서 약물 배출-양성 세포의 분획이 유의하게 증가됨을 확인하였다. 구체적으로, 약물 배출-양성 분획은 SKOV3 세포의 경우 0% 내지 13.8%, MCF-7 세포의 경우 0.59% 내지 9.6 %, Hep3B 세포의 경우 0.58% 내지 9.2%, Hep3B 세포의 경우 0.1% 내지 10% 증가하였다(도 12의 a).

[0223] 또한, 항암제로 알려져 있는 독소루비신(DOX)에 대한 ssiCSC의 약물 내성을 확인하였다. 구체적으로, pV4D4 표면에서 8일 동안 배양하여 제조된 ssiCSC 스페로이드를 단일 세포로 분리하고, 상기 세포를 종래의 TCP 표면에 2D 단일층으로 배양한 후, 다양한 농도의 DOX를 24시간 동안 처리하였다. WST-1 분석법을 사용하여 세포 생존력을 측정된 결과, 2D 대조군에 비해 ssiCSC는 50 µM의 Dox에 대해서도 높은 내성을 가졌다(도 12b). 또한, SKOV3- 및 SW480-ssiCSC는 Dox에 대해 완전히 내성을 가졌고, SW480-ssiCSC의 경우에는 DOX가 처리되지 않은 대조군의 암세포보다 더 높은 세포 생존력을 나타냈다. 상기 SW480-ssiCSC의 경우에는 TCP 표면에서 2번 계대배양한 경우에도 약물 내성을 유지하였는 바, 이를 통해 본래의 암세포가 CSC-유사 세포로 형질전환되었음을 알 수 있다(도 12의 c).

[0224] 상기 약물-배출 능력은 ATP-결합 카세트(ATP-binding cassette: ABC) 단백질 패밀리에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 따라서, qRT-PCR을 이용하여, SKOV3-ssiCSC에서 주요 다중 약물 내성(multi-durg resistance: MDR) 유전자인 ABCB1, ABCB2, ABCB5, ABCC1 및 ABCG2 패닐의 발현을 분석했다. 상기 5개의 모든 MDR-관련 유전자는 2D-배양된 대조군과 비교하여, ssiCSC에서 높게 상향조절된 것을 확인하였다. 특히 ABCB1 및 ABCB5 유전자의 경우 상향조절된 정도가 두드러졌다(도 12의 d). ssiCSC에서 MDR 유전자가 유의미하게 상향조절된 상기 결과는, 측면- 개체군 어세이 결과(도 12의 a) 및 DOX 내성 테스트(도 12의 b) 결과와 상관관계를 보였다.

[0225] 상기 4가지 유형 세포의 ssiCSC 스페로이드의 분자적 또는 기능적 분석을 종합한 결과, pV4D4 표면에 존재하는 특정 자극에 노출되면 암세포는 CSC-관련 유전자를 강하게 발현하고 강력한 약물 내성을 갖는 CSC-유사 세포로 형질전환되는 것을 확인하였다.

[0227] 실시예 12: ssiCSC 스페로이드의 생체 내 암형성능 확인

[0228] ssiCSC의 생체내 암형성능을 확인하였다. 구체적으로, SKOV3-유래 ssiCSC 스페로이드를 단일 세포로 분리하고, 상이한 일련의 농도(10^2 부터 10^6 개의 세포)의 상기 세포를 마트리겔과 혼합하여 BALB/c 누드마우스에 피하 주입시켰다(도 13a). 상기 스페로이드에서 분리된 세포에 의한 이종이식 종양 형성을 120일간 모니터링 하였고, 2D TCP-배양된 SKOV3 대조군과 비교하였다(표 3).

표 3

Tumor formation and metastasis of SKOV3 in BALB/c nude mice. ^a				
Cell number ^b	Tumor formation		Liver metastasis	
	2D control	ssiCSC	2D control	ssiCSC
100	0/5	0/5	0/5	4/5
1,000	0/5	1/5	0/5	4/5
10,000	0/5	4/5	0/5	4/5
100,000	0/5	3/5	0/5	5/5
1,000,000	2/4	-	0/4	-

^a Tumor formation and metastasis were monitored up to 120 days.
^b All cells were dissociated into single cells and counted with a hemocytometer before subcutaneous injection.

[0229]

[0230] 그 결과, 2D 대조군은 10^5 개의 세포 이하의 용량으로는 종양을 형성하지 못했고(0/5 마우스), 10^6 개의 세포 용량으로 50% 빈도(2/4 마우스)로 종양을 형성할 수 있음을 확인하였다(표 3). 이와는 대조적으로, ssiCSC-유래 세포는 매우 적은 용량으로도 대조군보다 높은 빈도로 종양을 형성할 수 있었다. 구체적으로, 종양 형성 빈도는 10^5 개의 세포 용량의 경우 60%(3/5 마우스), 10^4 개의 세포 용량의 경우 80%(4/5 마우스) 및 10^3 개의 세포 용량의 경우 20%(1/5 마우스) 였다(표 3). 일반적으로 중증결합 면역결핍(severe combined immunodeficiency: SCID) 마우스를 사용하지 않고 무흉선 누드 마우스에서 인간 난소암 세포(SKOV3)의 이종 이식 종양을 얻는 것이 얼마나 어려운지를 고려하면, 상기 결과를 통해 생체 내에서 SKOV3-ssiCSC의 암형성능이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0231] 또한, ssiCSC이 접종된 마우스의 간에서 현저히 비정상적인 외견인 전이성 소결절이 발견된 반면, 2D SKOV3 대조군을 접종한 마우스의 간은 정상으로 보였다 (도 13b). 조직학적 분석을 통해, ssiCSC이 접종된 비정상적 간에서는 정상 부위 및 종양 부위 사이가 명확하게 구분되면서 조직 전체에 수많은 전이 병변이 나타났음을 확인한 반면, 2D 대조군 암세포가 접종된 마우스의 간에서는 전이된 증거가 전혀 보이지 않았다(도 13c). 특히, SKOV3-ssiCSC에서 유래된 세포를 10^2 개의 세포 용량으로 접종한 마우스는 높은 빈도의 간 전이성을 보였는바 (4/5 마우스)(도 13d, 표 3), 이를 토대로 SKOV3-ssiCSCs는 매우 향상된 전이 능력 및 암형성능을 가짐을 확인할 수 있다. 암 특이적 ECM의 주요 구성요소이자 전이성 환경의 필수 구성요소인 테나신-C(tenascin-C: TNC)의 발현에 대한 간 전이의 면역조직화학 검사는 정상 조직 접촉된 종양 경계 부위 주위에 TNC가 유의하게 존재하고 있음을 확인하였다 (도 13e). 이를 통해, 간의 종양 소결절은 피하 주입된 SKOV3-ssiCSCs의 전이에 의한 것임을 알 수 있다.

[0232] 다음으로, 다양한 암세포주에서 유래된 ssiCSCs의 암형성능을 확인하였다. 그 결과, 루시페라제가 도입된 MCF-7(MCF7-Luc) 세포 및 U87MG 인간 교아종 세포에서 유래된 ssiCSCs는 2D 배양된 대조군 세포에 비해 암형성능이 유의하게 증가하였다(표 4 및 5).

표 4

Tumor formation of MCF-7-Luc in BALB/c nude mice. ^a		
Cell number	2D control	ssiCSC
100	-	0/5
1,000	-	2/5
10,000	-	2/5
100,000	0/5	4/5
1,000,000	0/5	-
10,000,000	1/5	-

^aTumor formation was monitored up to 90 days.

[0233]

표 5

Tumor formation of U87MG in BALB/c nude mice. ^a			
Cell number	2D control	ULA	ssiCSC
100	-	0/5	1/5
1,000	-	0/5	2/5
10,000	1/4	0/5	3/5
100,000	2/4	-	-
1,000,000	4/4	-	-

^aTumor formation was monitored up to 90 days.

[0234]

[0235] 구체적으로, 2D-배양된 MCF7-Luc 세포는 마우스 당 10^6 개의 세포 용량으로 접종하더라도 종양이 형성되지 않았으나, MCF7-Luc-ssiCSC는 마우스 당 10^5 개의 세포 용량으로 접종한 경우 높은 빈도(4/5 마우스)로 종양을 형성했다(표 4). 이와 유사하게 U87MG-ssiCSCs가 마우스 당 10^4 개의 세포 용량으로 접종한 경우 60%의 빈도(3/5 마우스)로 종양이 형성된 반면, ULA 표면에서 배양된 U87MG 스페로이드가 접종된 경우에 형성된 종양은 없었으며, 이것은 ULA- 및 pV4D4- 에서 배양된 스페로이드의 암 형성능 차이가 뚜렷함을 나타낸다.

[0236] 상기 결과를 종합해보면, pV4D4-기반 PTF는 암형성능 스페로이드를 제조할 수 있는 플랫폼으로 사용될 수 있고, 무흉선 누드 마우스에서 제조하기 어려운 다양한 인간 이종이식 종양 모델 제조에 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0238] 실시예 13: ssiCSC 스페로이드의 암형성능과 Wnt/ β -카테닌 신호전달의 관련 성 확인

[0239] ssiCSCs의 줄기세포-유사 특징과 관련된 세포 및 분자적 메커니즘을 확인하기 위해, Notch, Hedgehog 및 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin)과 같은 CSC의 암형성능 및 줄기세포성과 관련된 몇 가지 중요한 신호 전달 경로를 확인하였다.

[0240] 먼저, SKOV3-ssiCSCs에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로가 활성화되고 Wnt 표적 유전자(n=46)의 발현이 증가되는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, SKOV3-ssiCSC에서 46개의 Wnt/ β -카테닌 표적 유전자 중 30개의 유전자 발현이 1.5 배 이상 증가하며, Wnt 신호전달 경로의 핵심 억제자인, Dickkopf 관련 단백질 1(Dickkopf-related protein 1: DKK1)의 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 14a). 또한, 1일, 4일 및 8일간 배양된

SKOV3-ssiCSC 스페로이드에서의 qRT-PCR 분석 결과, DKK1 mRNA의 발현이 극적으로 감소됨을 확인하였으며(도 14b), 이는 스페로이드 형성 초기 단계에서부터 Wnt/ β -카테닌 신호전달이 활성화됨을 나타낸다. 또한, 상기 qRT-PCR 결과는 DKK1 발현의 감소가 Wnt/ β -카테닌 신호전달의 하류 표적 유전자인 AXIN2(axis inhibition protein 2)와 MMP2 (matrix metalloproteinase-2)의 발현의 증가와 직접적으로 관련이 있음을 보여주었다(도 14b). 또한, qRT-PCR 결과로는 ssiCSC 스페로이드에서 β -카테닌 mRNA의 수준이 변화된 결과가 나타나지 않았으나, 웨스턴블랏 분석 결과에서는 인산화된 β -카테닌 단백질의 유의하게 감소되었음을 보여준다(도 14c). 또한, 면역염색 결과, 2D-배양된 SKOV3 세포의 핵 내에 β -카테닌이 거의 존재하지 않지만, ssiCSCs에서는 핵으로 β -카테닌이 이동한 것을 보여준다(도 14d).

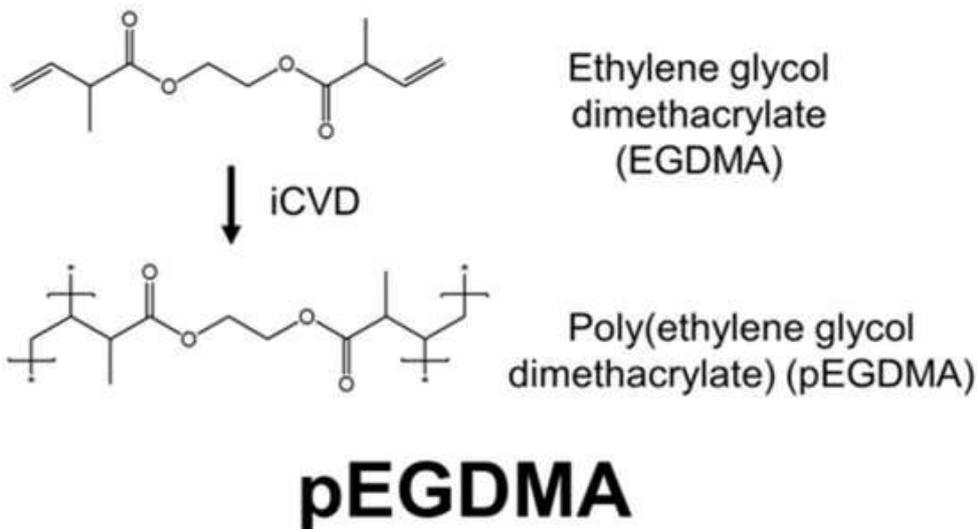
[0241] 다음으로, ssiCSC 스페로이드에서 DKK1의 현저한 감소를 일으킨 상류의 신호를 확인하였다. 그 결과, SKOV3-ssiCSC에서 간 전이와 관련된 TNC가(도 13e) DKK1을 하향 조절함으로써 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로를 활성화시킨다는 것을 확인하였다. 따라서, TNC와 DKK1 사이의 연관성을 확인하기 위해, 8일간 배양된 SKOV3-ssiCSC 스페로이드를 TNC로 면역염색하였다. 그 결과, TNC는 스페로이드 전체에 풍부하게 존재하였는 바, 상기 TNC가 표적 DKK1을 하향조절하고, 이로 인해 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로를 활성화시키는 것을 확인하였다(도 14e).

[0242] 또한, MCF-7, Hep3B 및 SW480 스페로이드로부터 얻은 ssiCSC는 DKK1 유전자 발현의 현저한 감소와 함께 TNC(도 15a)의 상당한 발현을 보였고(도 15b), 이는 다른 암세포에서 ssiCSC를 제조하는 과정에서 동일한 Wnt/ β -카테닌 신호전달이 관련되었다는 것을 보여준다.

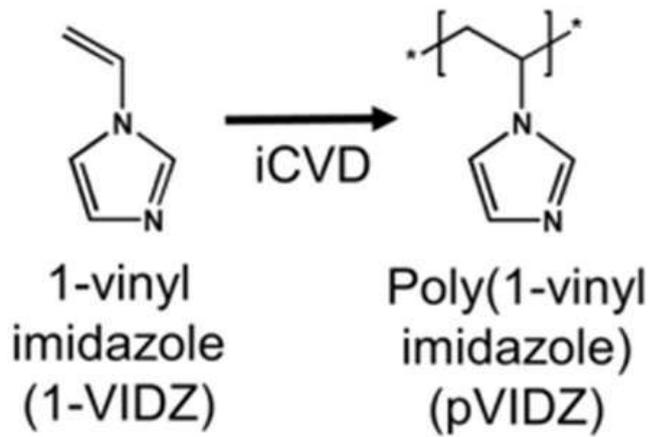
[0243] 상기 결과를 종합해보면, TNC-DKK1에 의해 매개된 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로의 활성화가 pV4D4 표면으로 인해 암세포가 암형성능 CSC-유사 표현형으로의 전환될 수 있음을 보여준다.

도면

도면1a

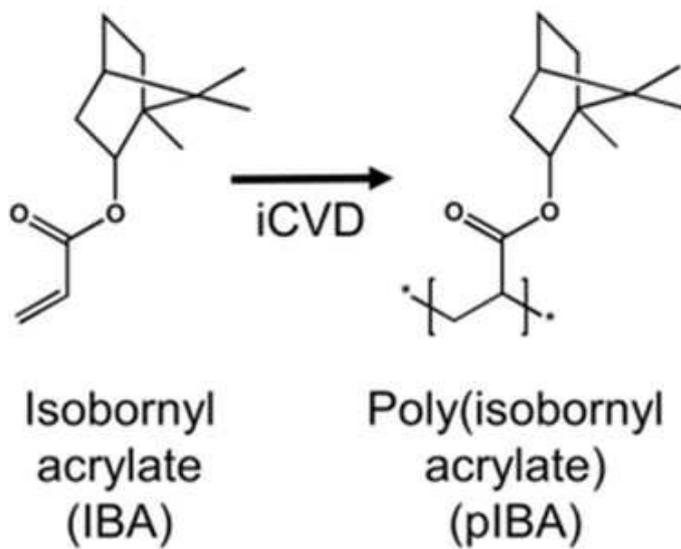


도면1b



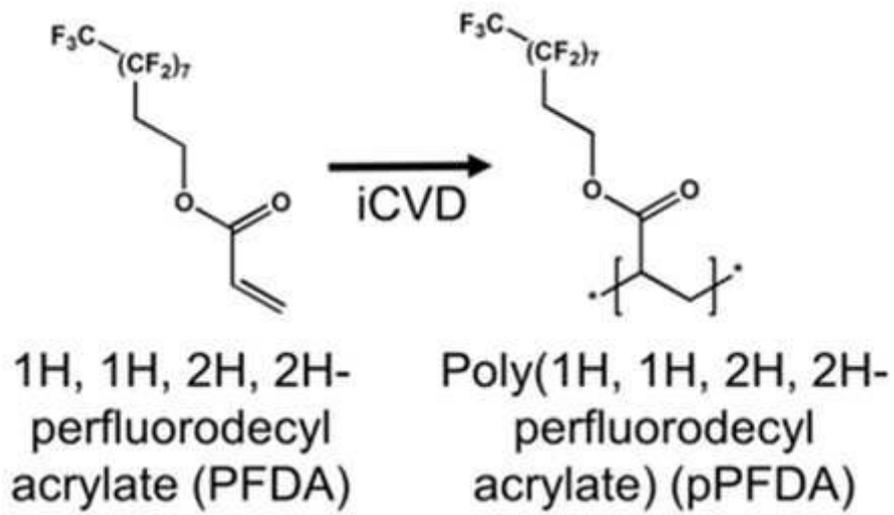
pVIDZ

도면1c



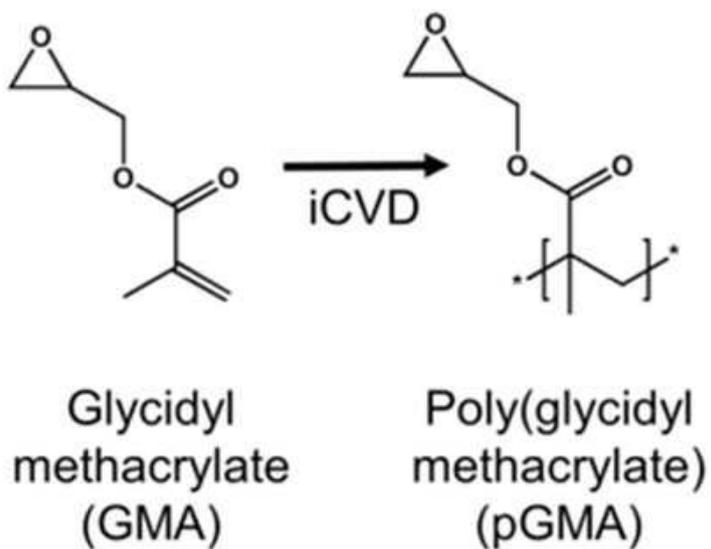
pIBA

도면1d



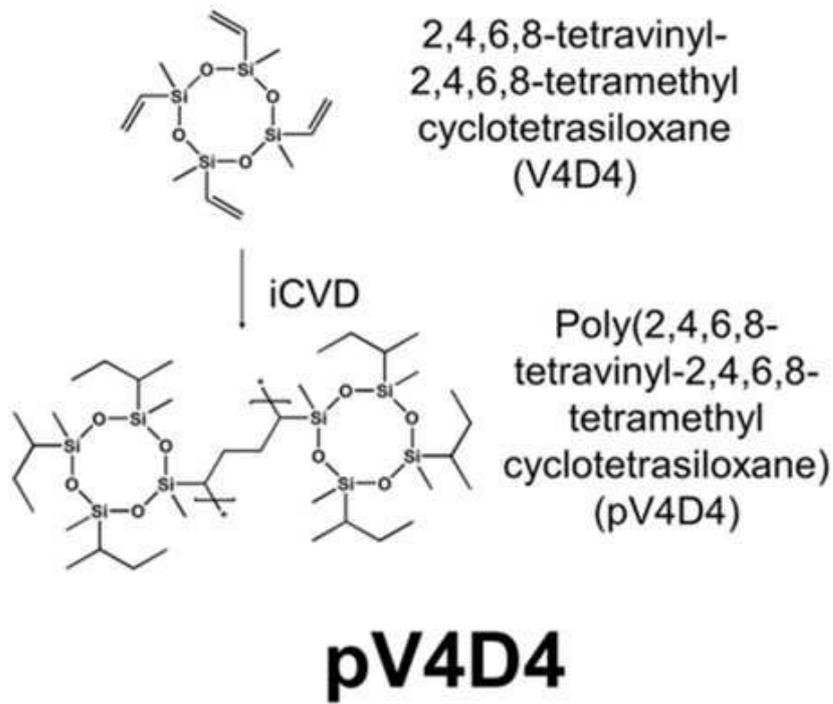
pPFDA

도면1e

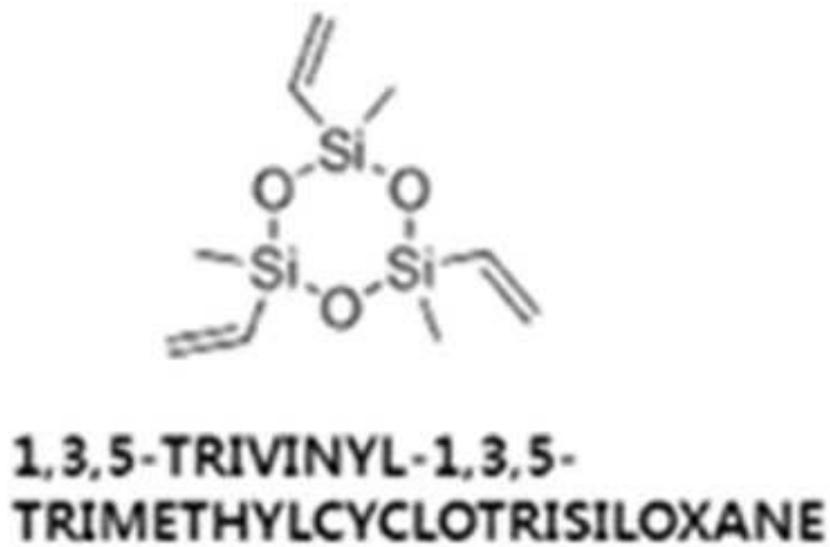


pGMA

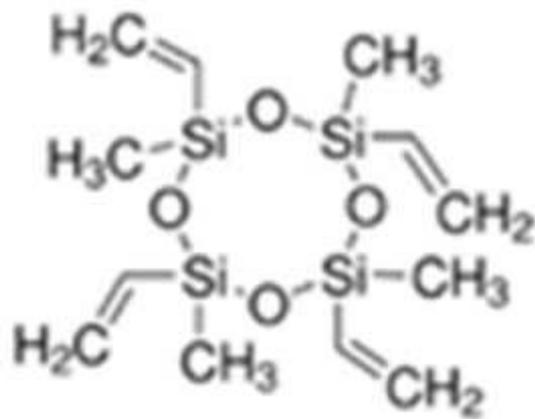
도면1f



도면1g

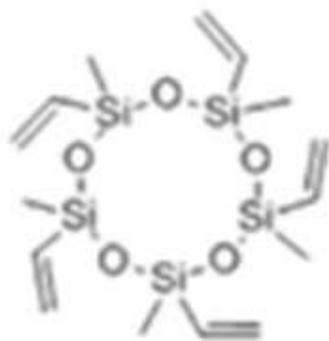


도면1h



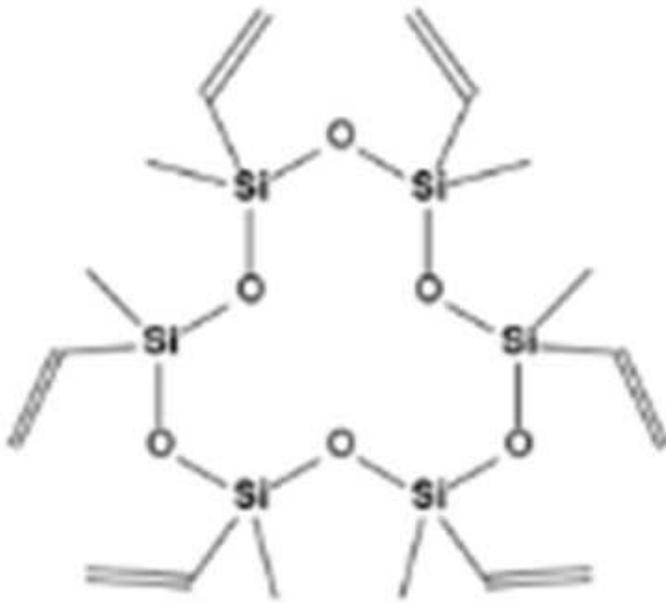
2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetrasiloxane

도면1i



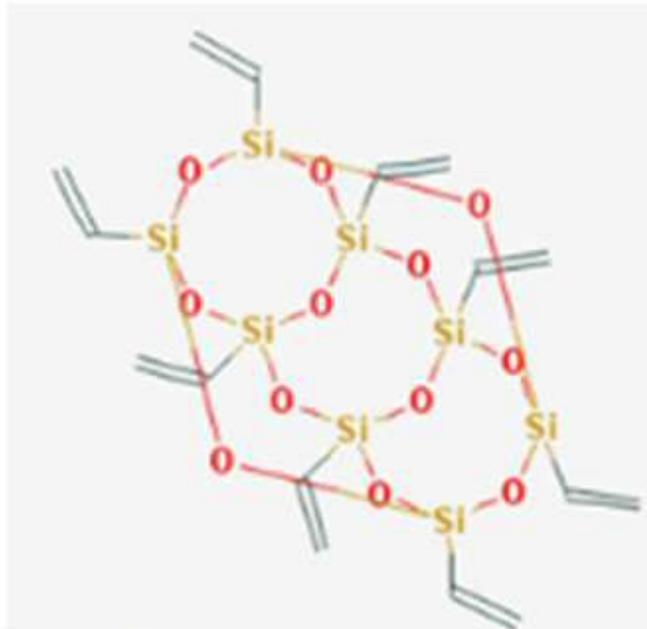
2,4,6,8,10-pentamethyl-2,4,6,8,10-pentavinylcyclopentasiloxane

도면1j



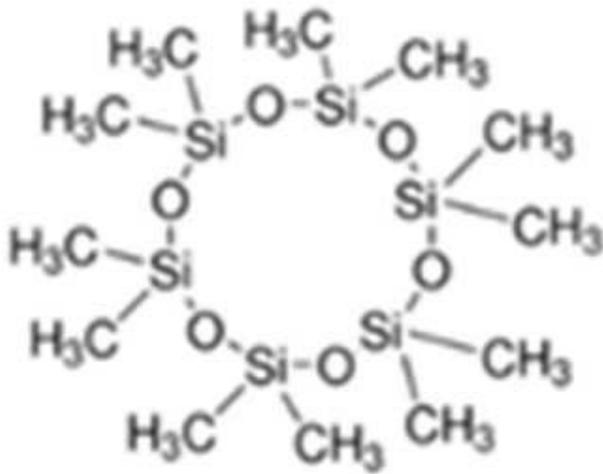
2,4,6,8,10,12-hexamethyl-2,4,6,8,10,12-hexavinyl-cyclohexasiloxane

도면1k



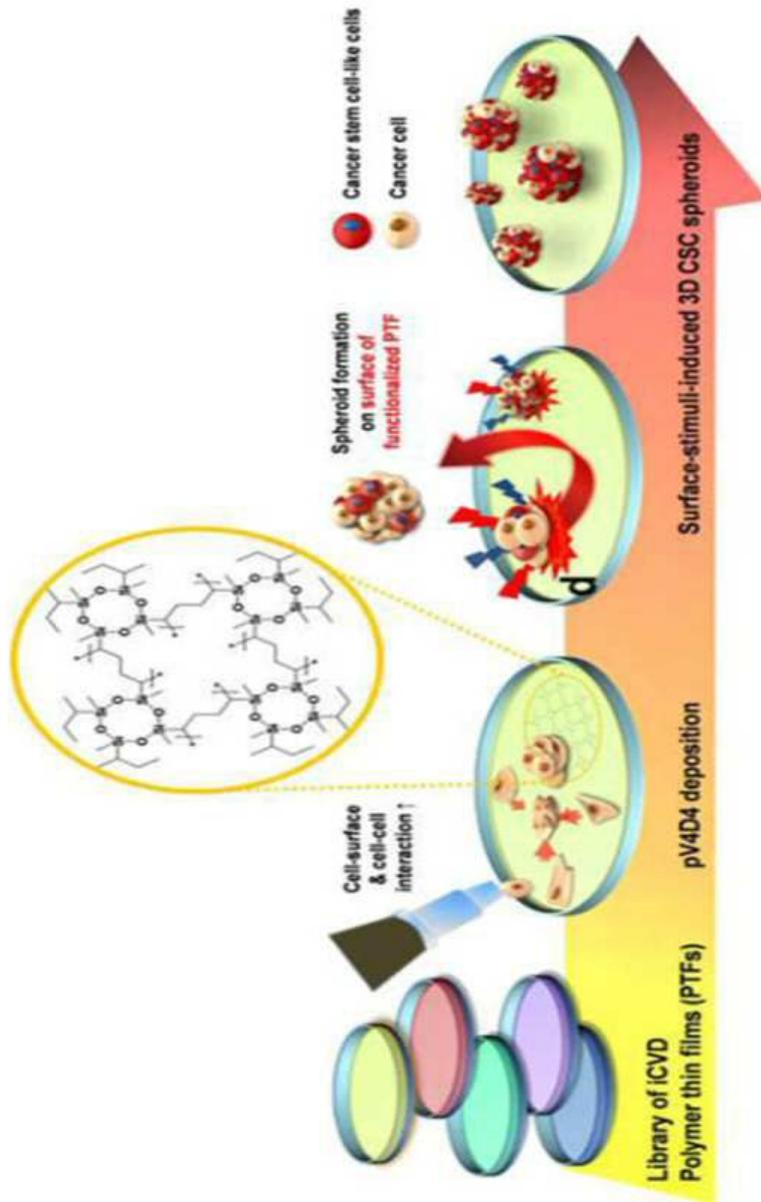
Octa(vinylsilasesquioxane)

도면11

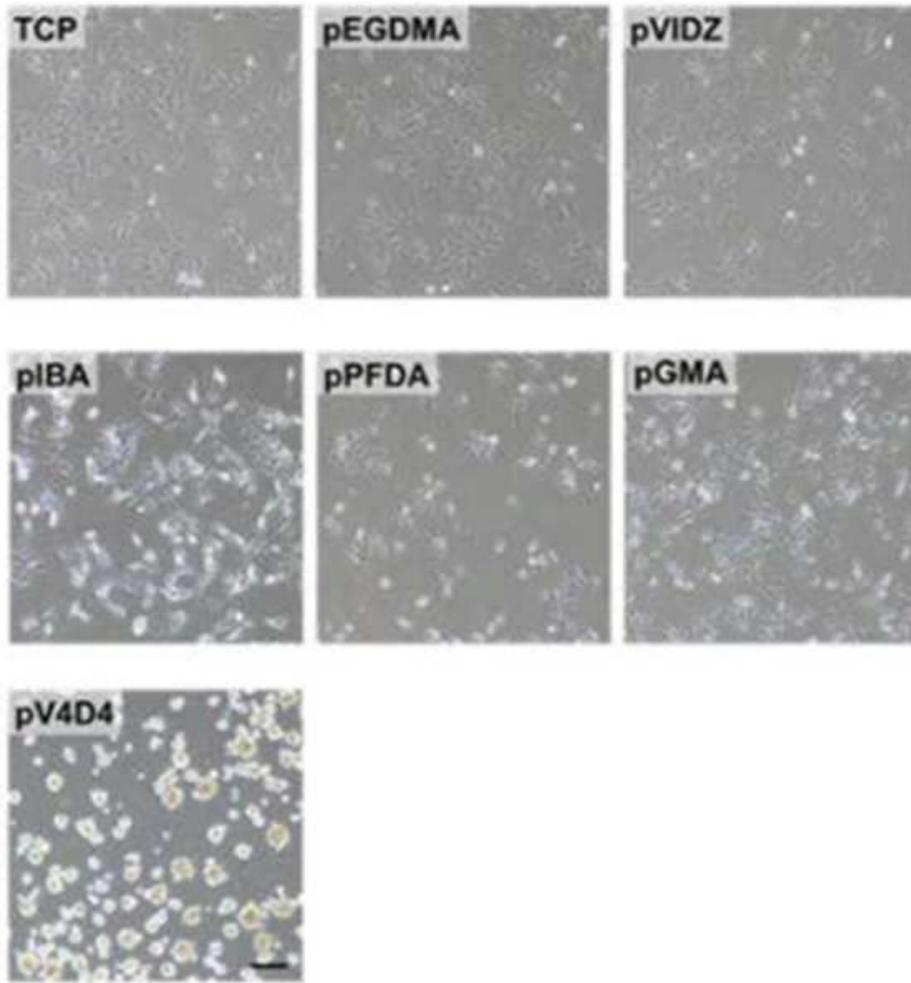


**2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-
Dodecamethylcyclohexasiloxane**

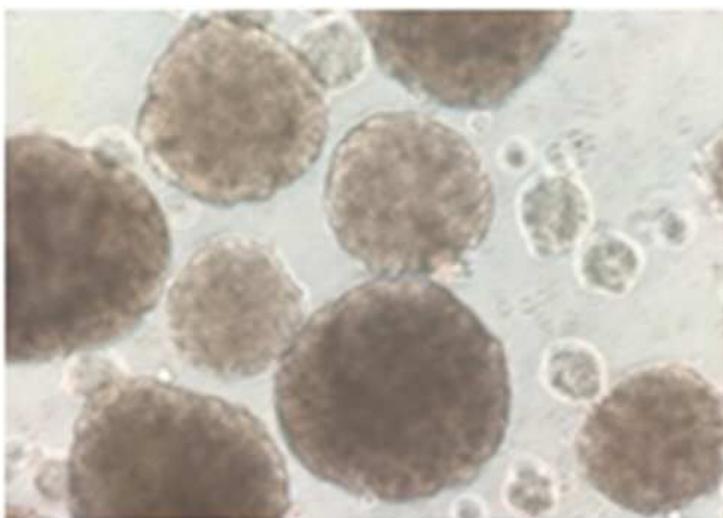
도면 1m



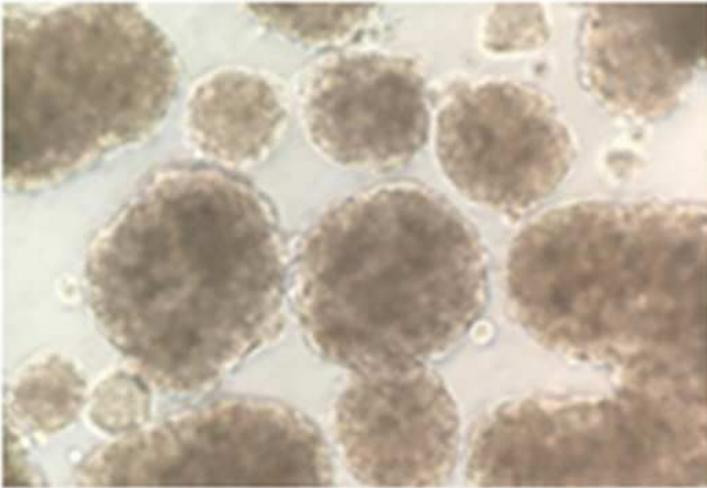
도면1n



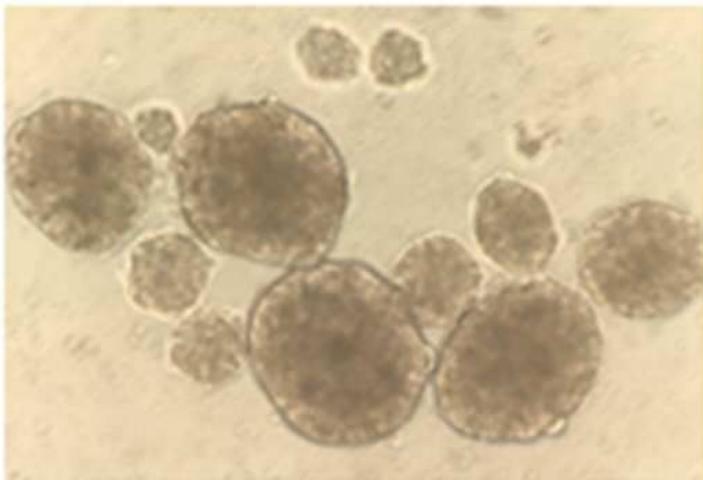
도면1o



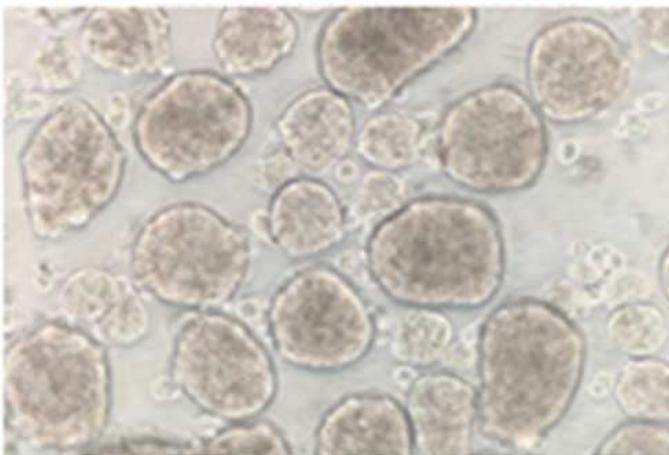
도면1p



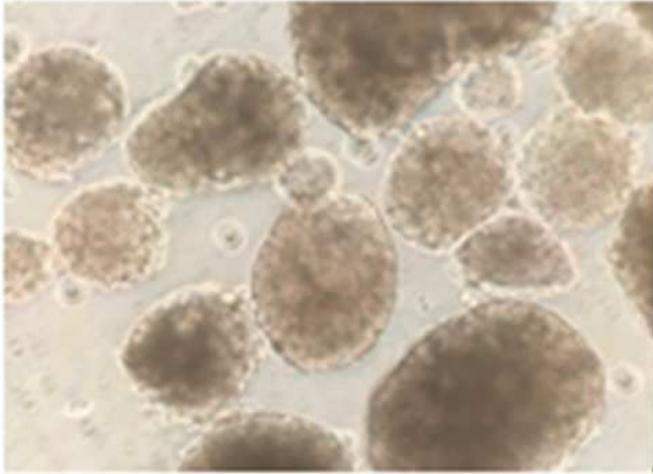
도면1q



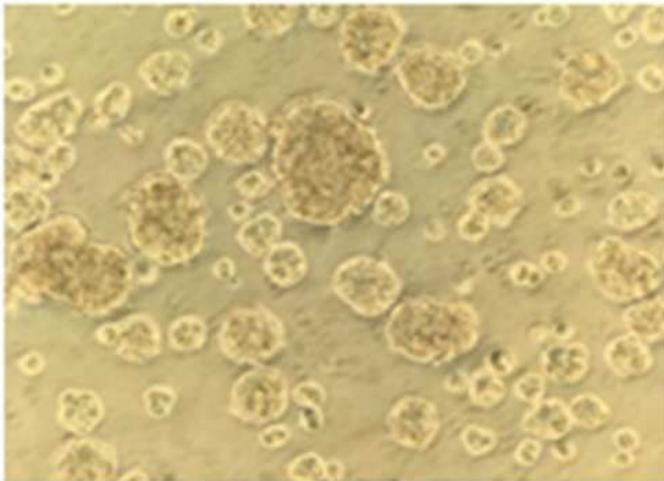
도면1r



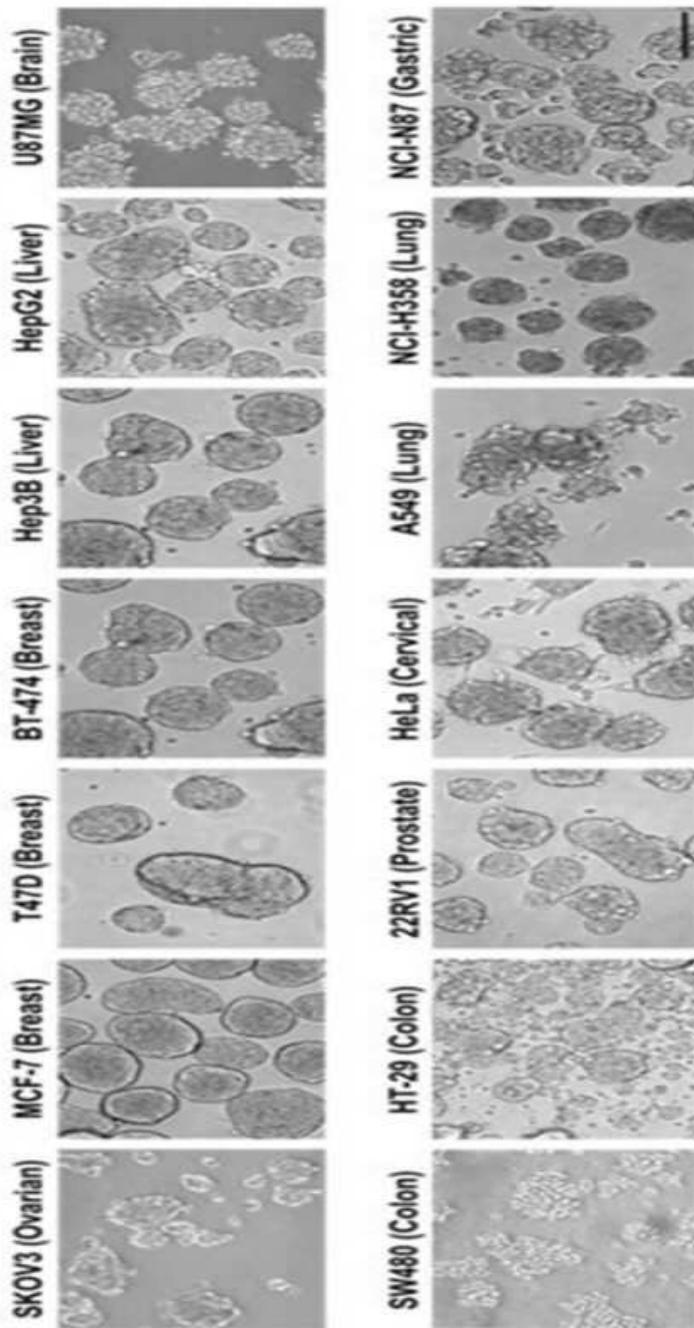
도면1s



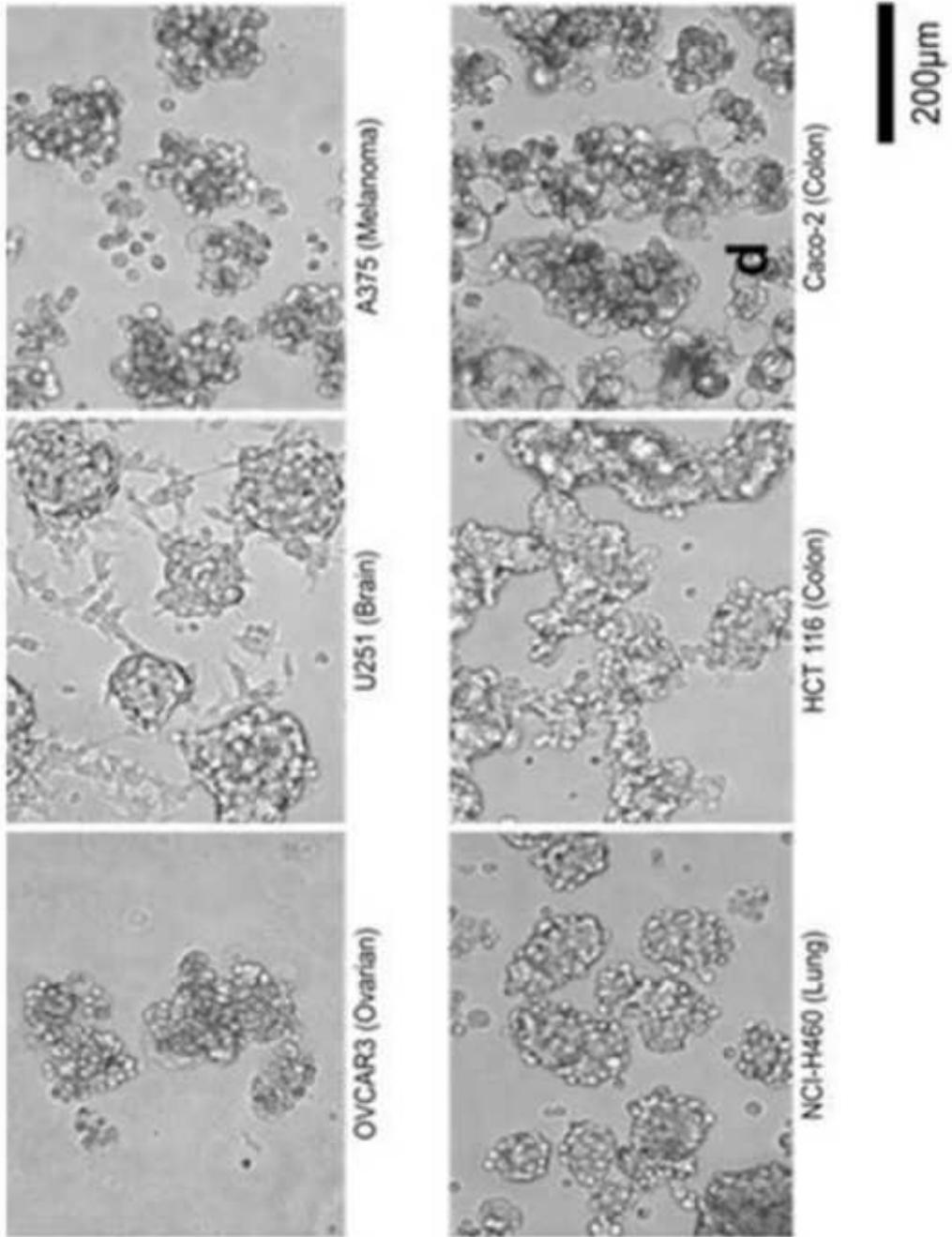
도면1t



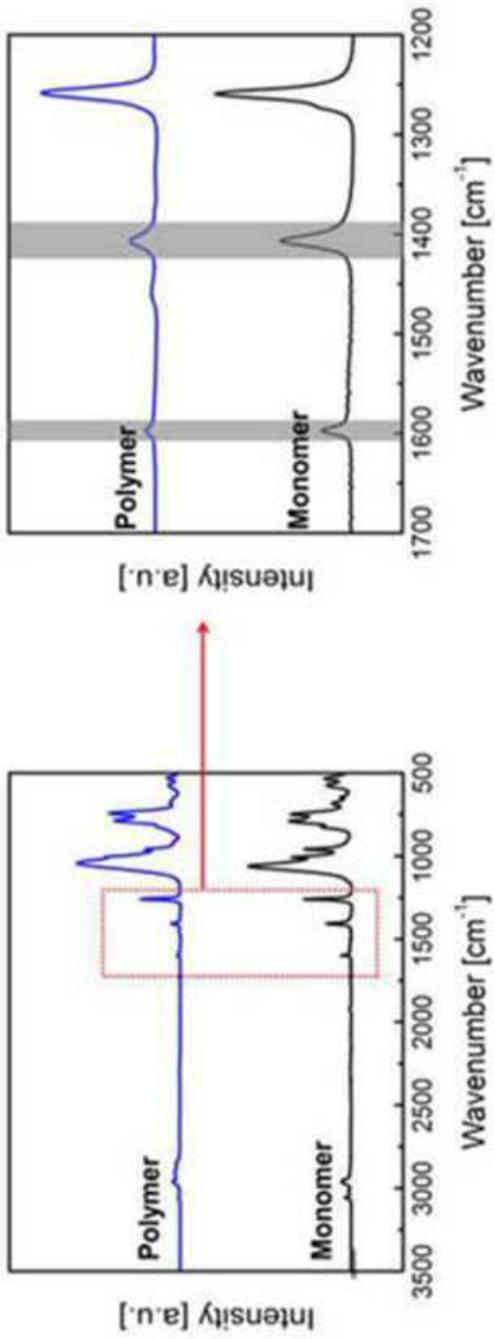
도면2a



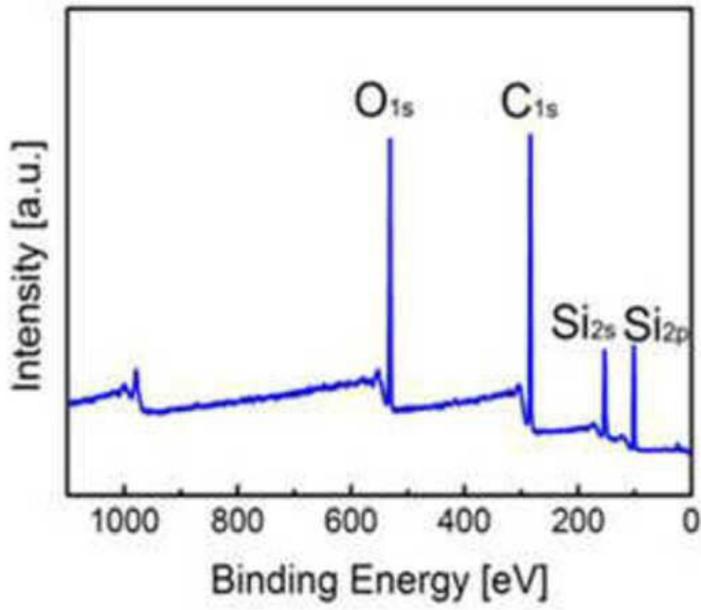
도면2b



도면3a



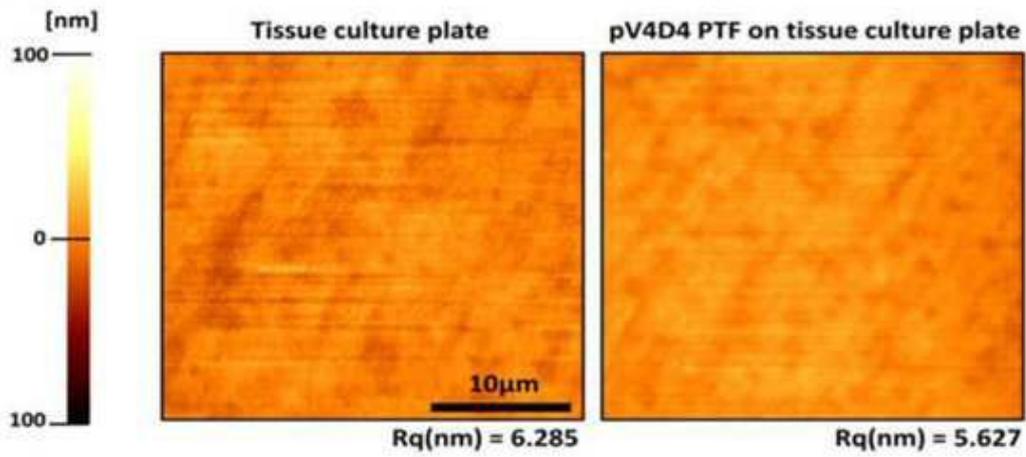
도면3b



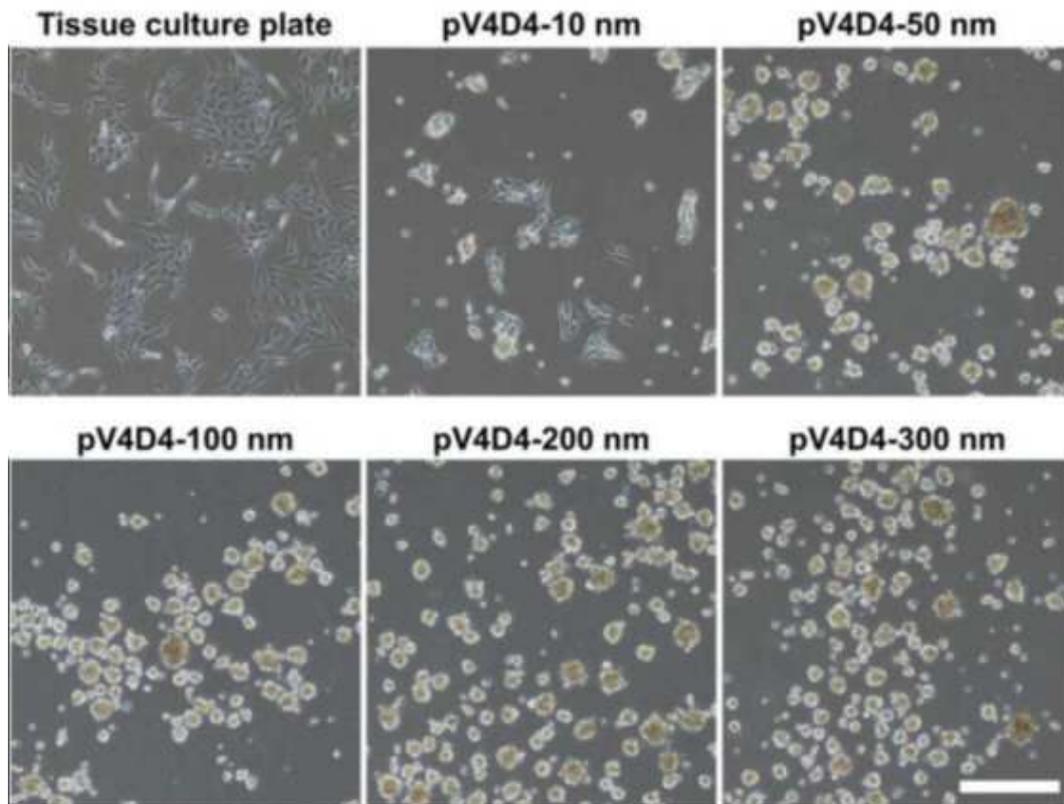
도면3c

Substrate	Image	Contact Angle [°]
Si wafer		36° ± 0.04
pV4D4 PTF on Si wafer		96.36° ± 0.91
Tissue culture plate		57.4° ± 0.65
pV4D4-coated plate		89.8° ± 2.45

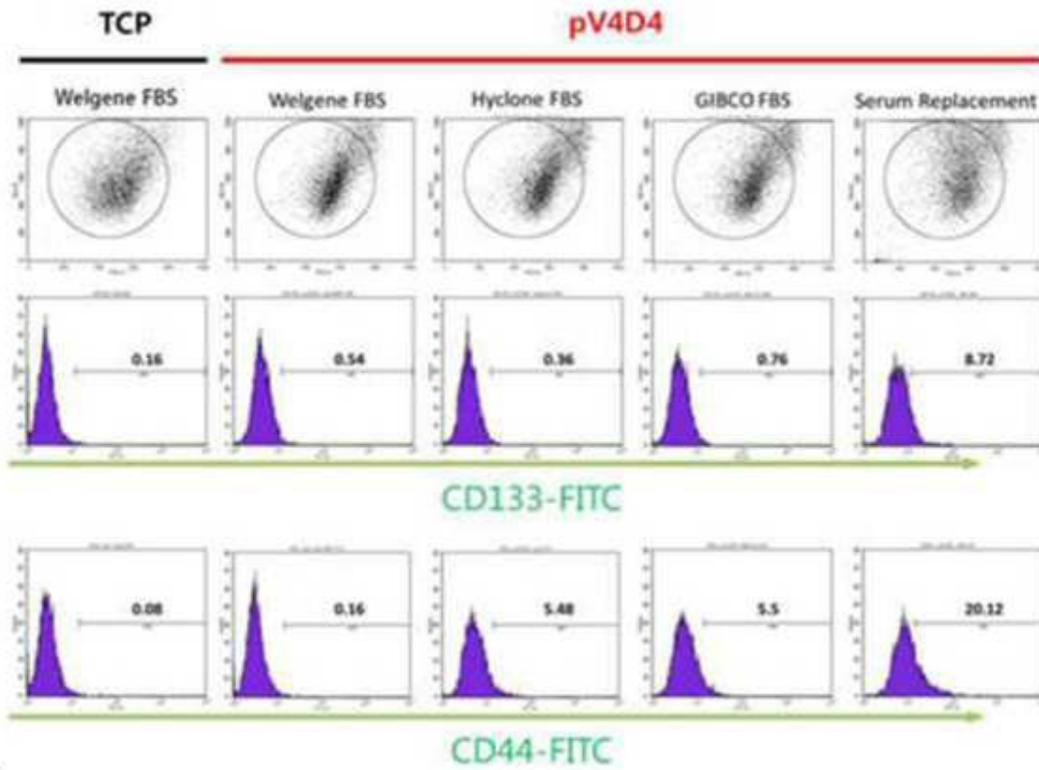
도면3d



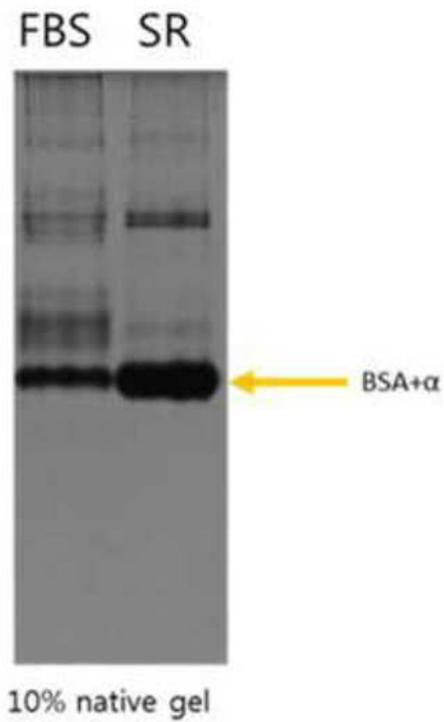
도면4



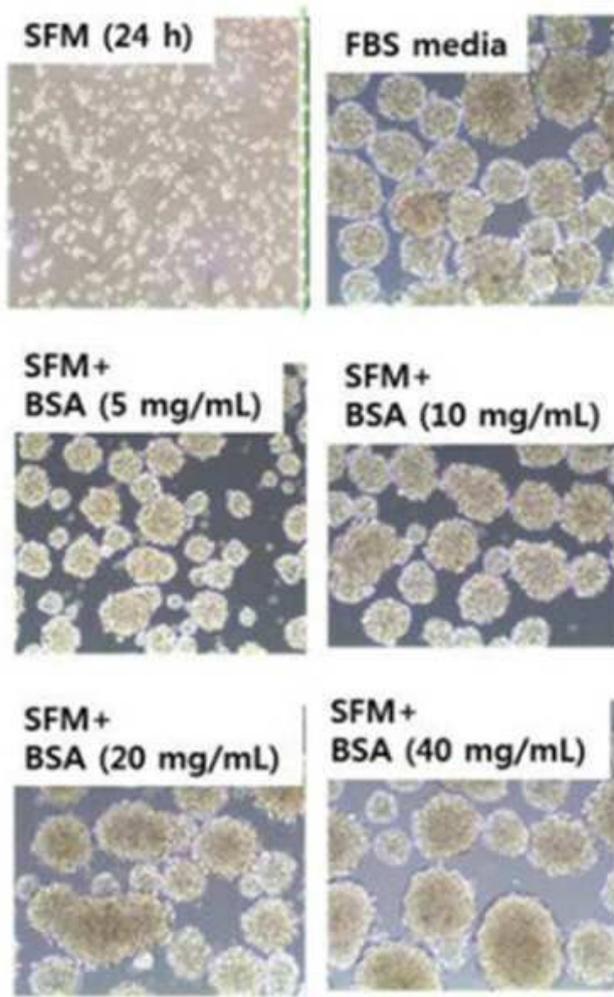
도면5a



도면5b

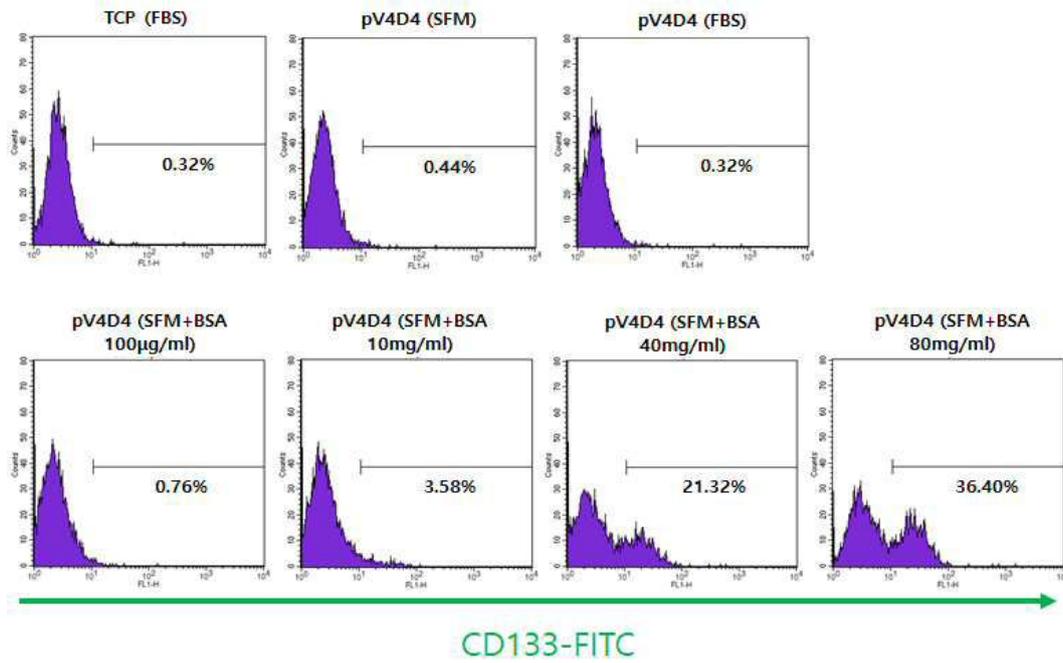


도면6a



표면: pV4D4 /이미징: 24 h

도면6b



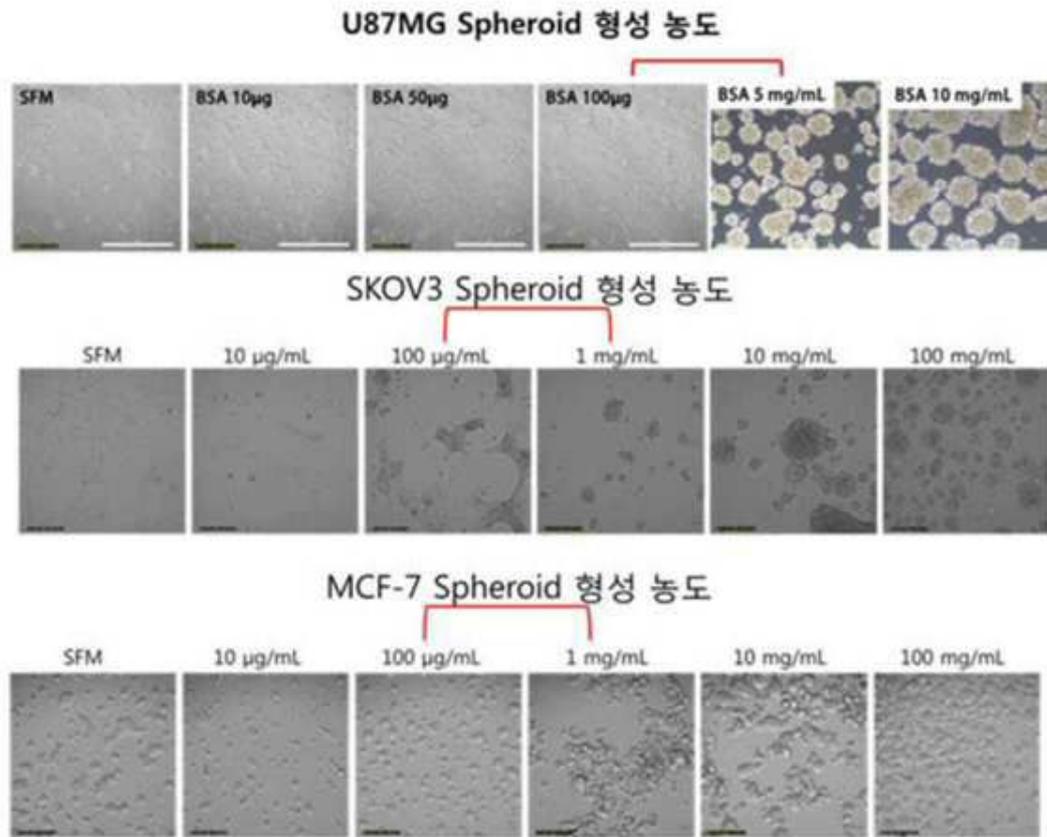
TCP: tissue culture plate
SFM: serum free media

도면7a

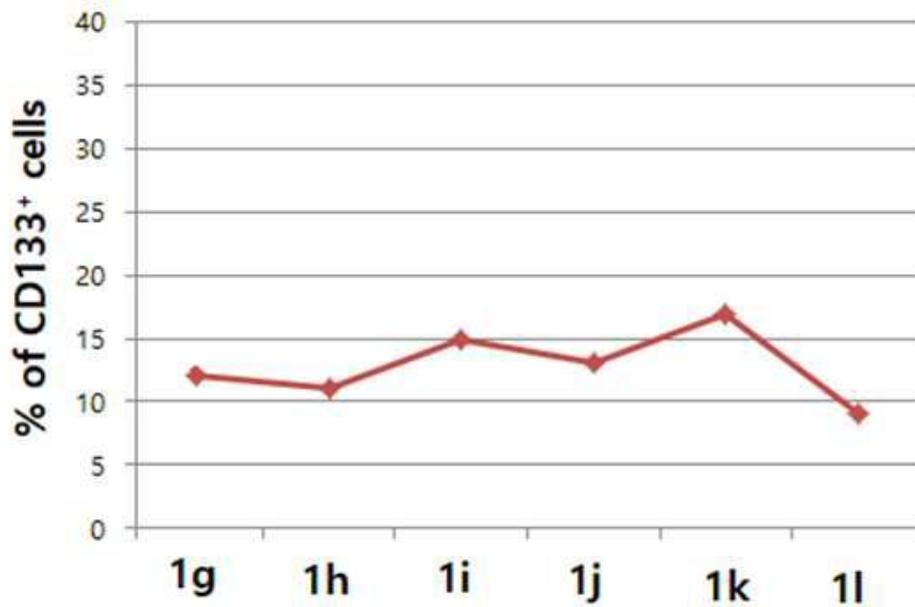
		TCP			pV4D4		
		FBS	SR	SFM +BSA 40mg/mL	FBS	SR	SFM +BSA 40mg/mL
% of CD133 ⁺ cells	Cell line						
	U87MG	0.1	0.2	6.27	0.37	4.38	28.52
	SKOV3	0.08	0.34	1.62	1.21	28.64	37.92
	MCF7	0.28	0.82	1.25	1.84	34.78	41.36

SFM: serum free media / SR: serum replacement

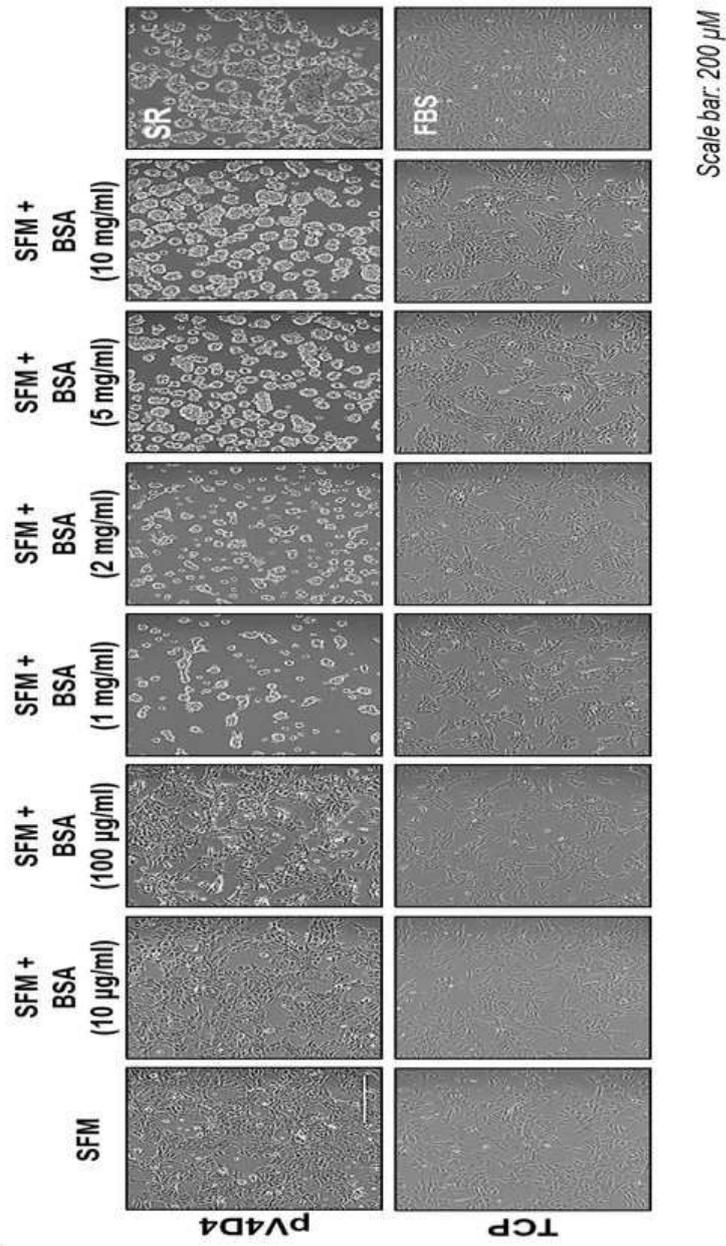
도면7b



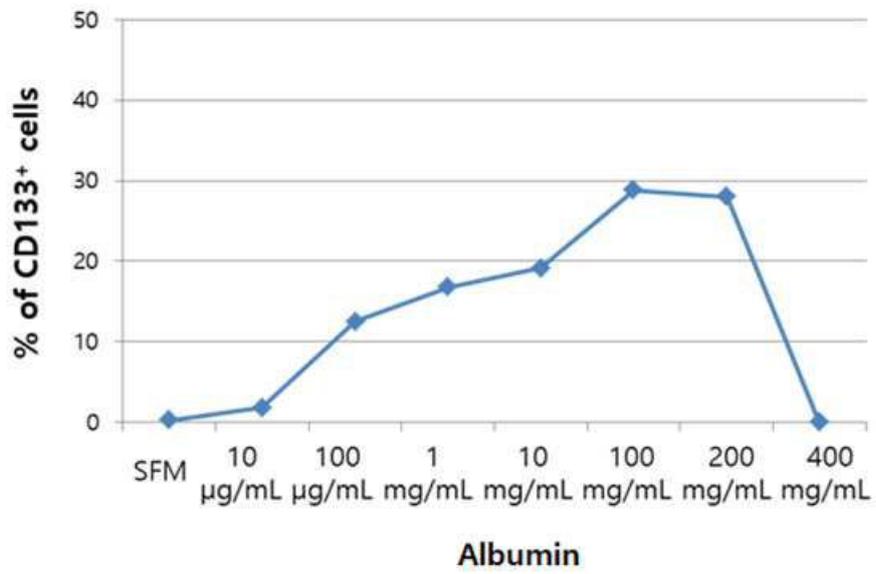
도면7c



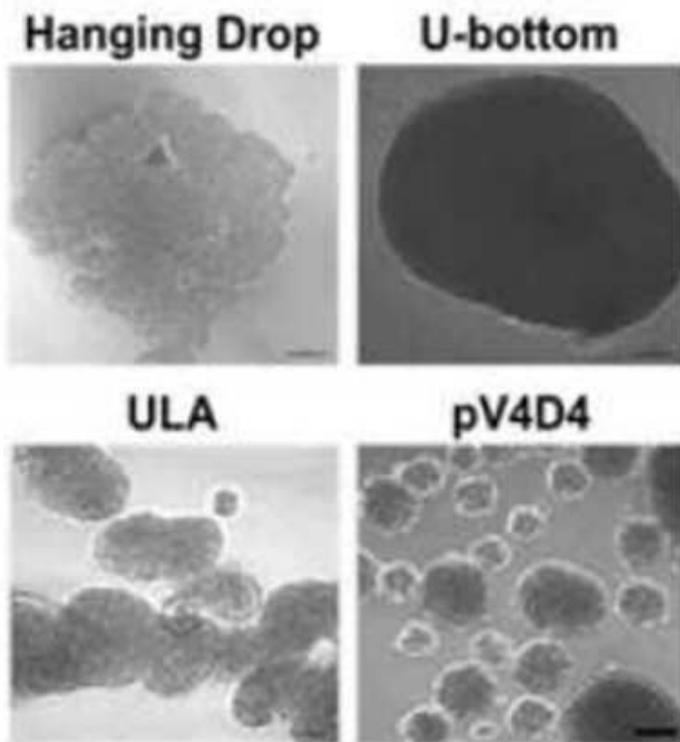
도면7d



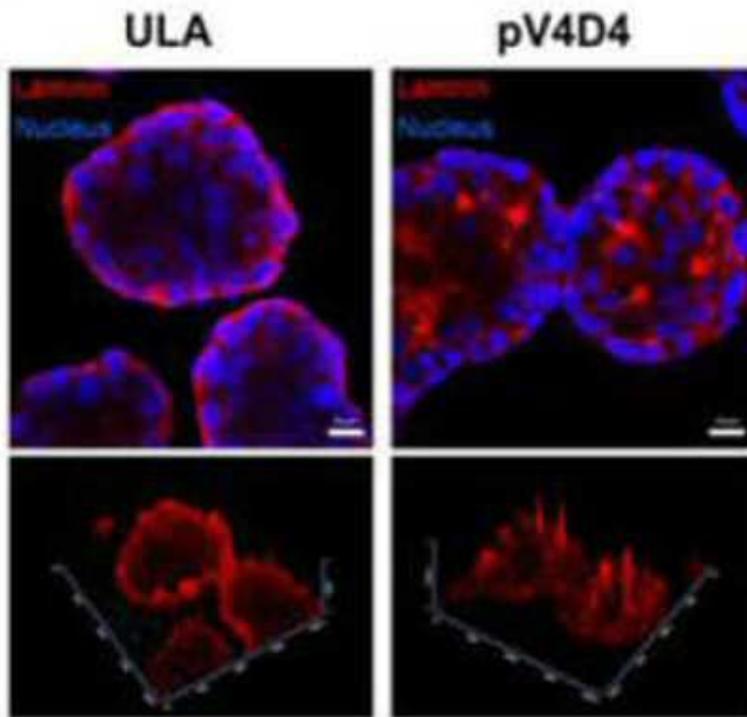
도면7e



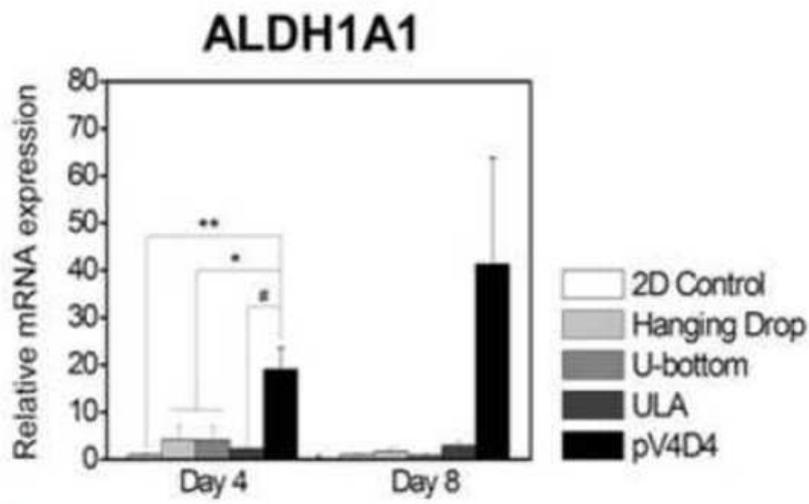
도면8a



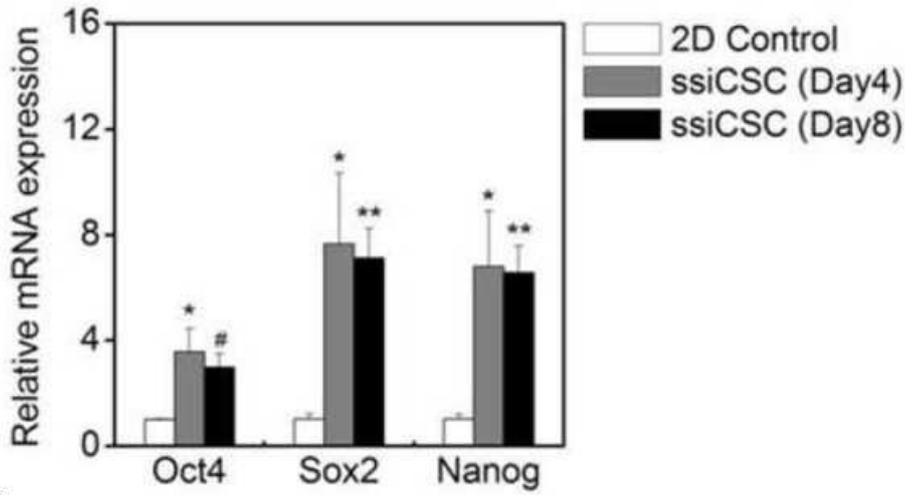
도면8b



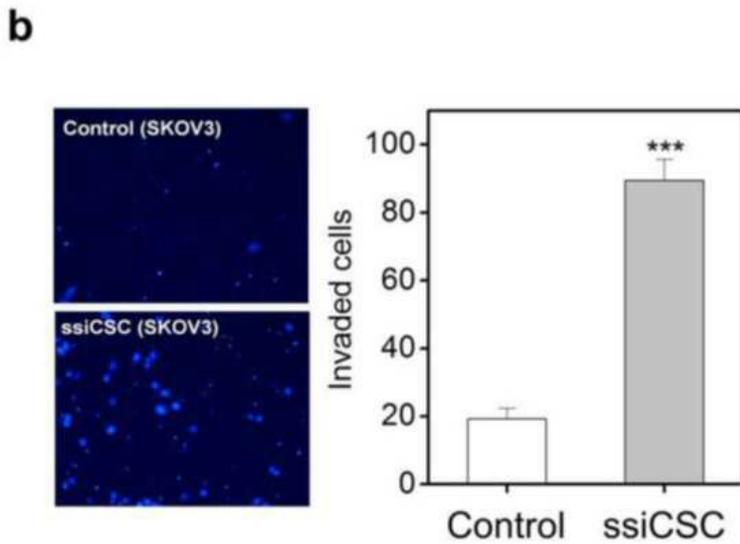
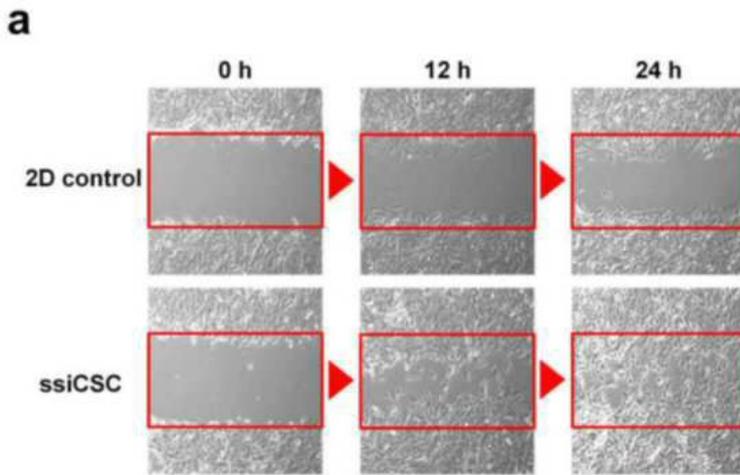
도면8c



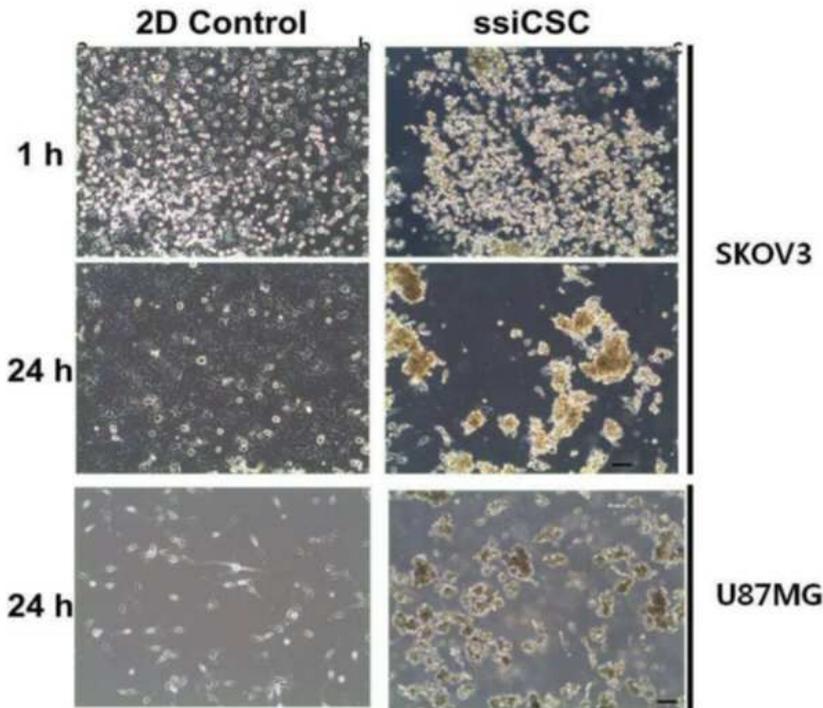
도면8d



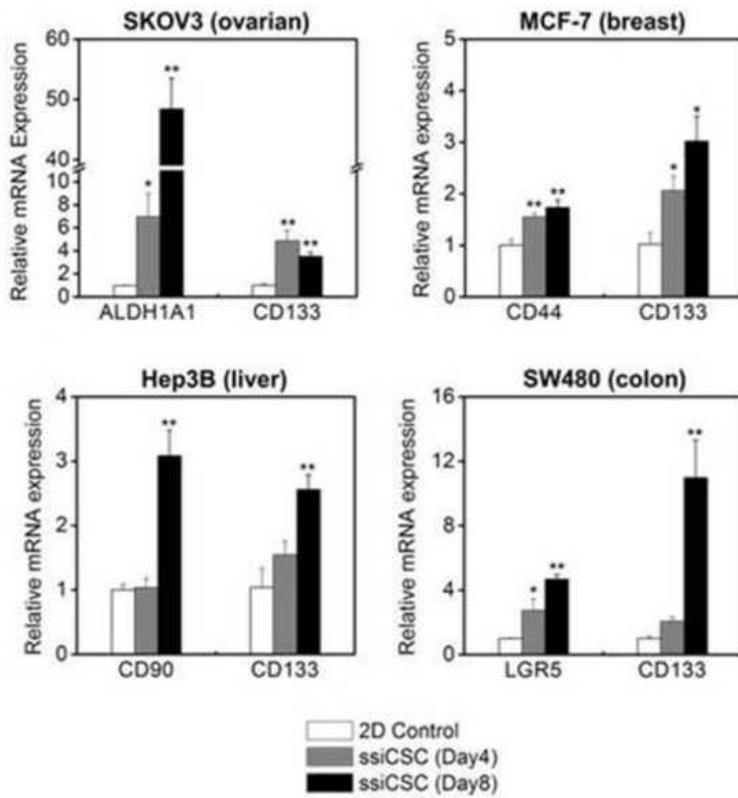
도면9



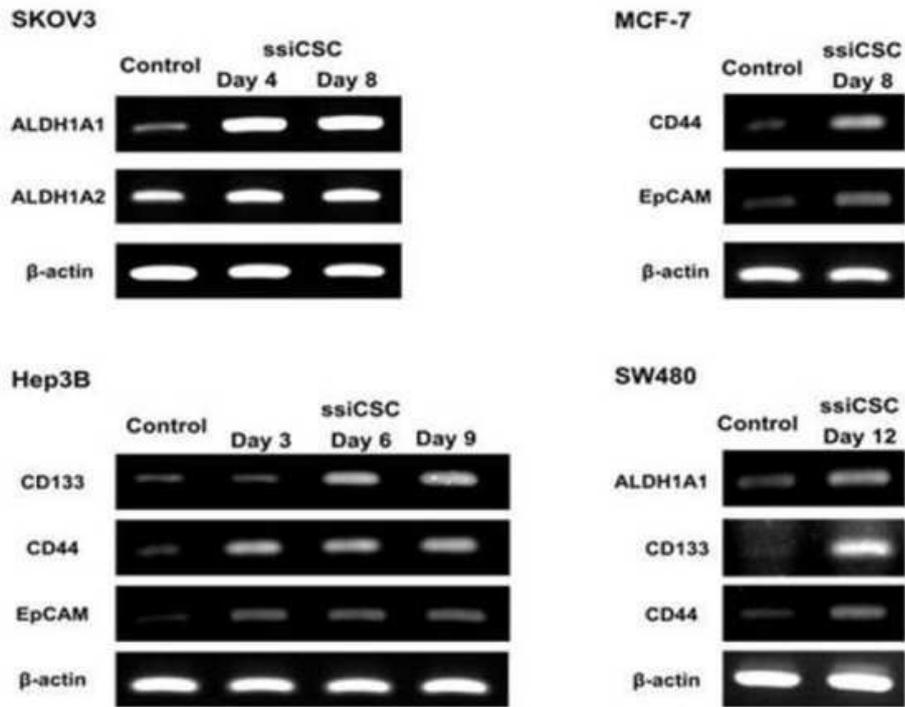
도면10



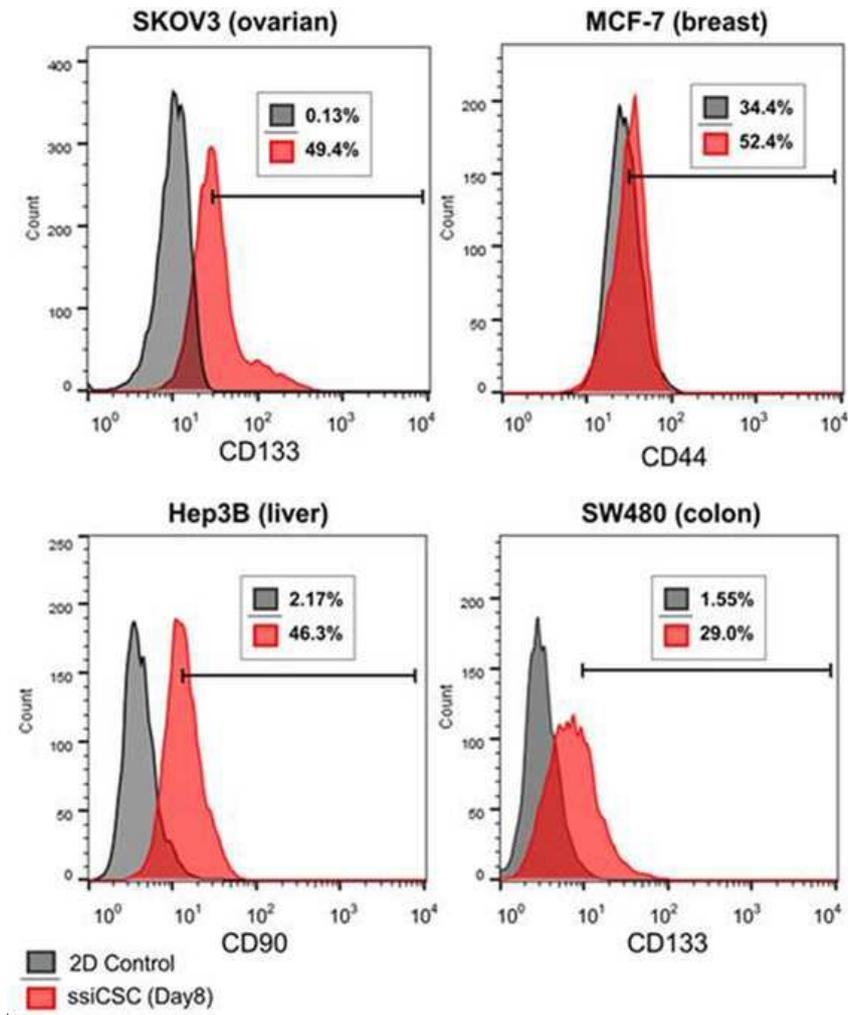
도면11a



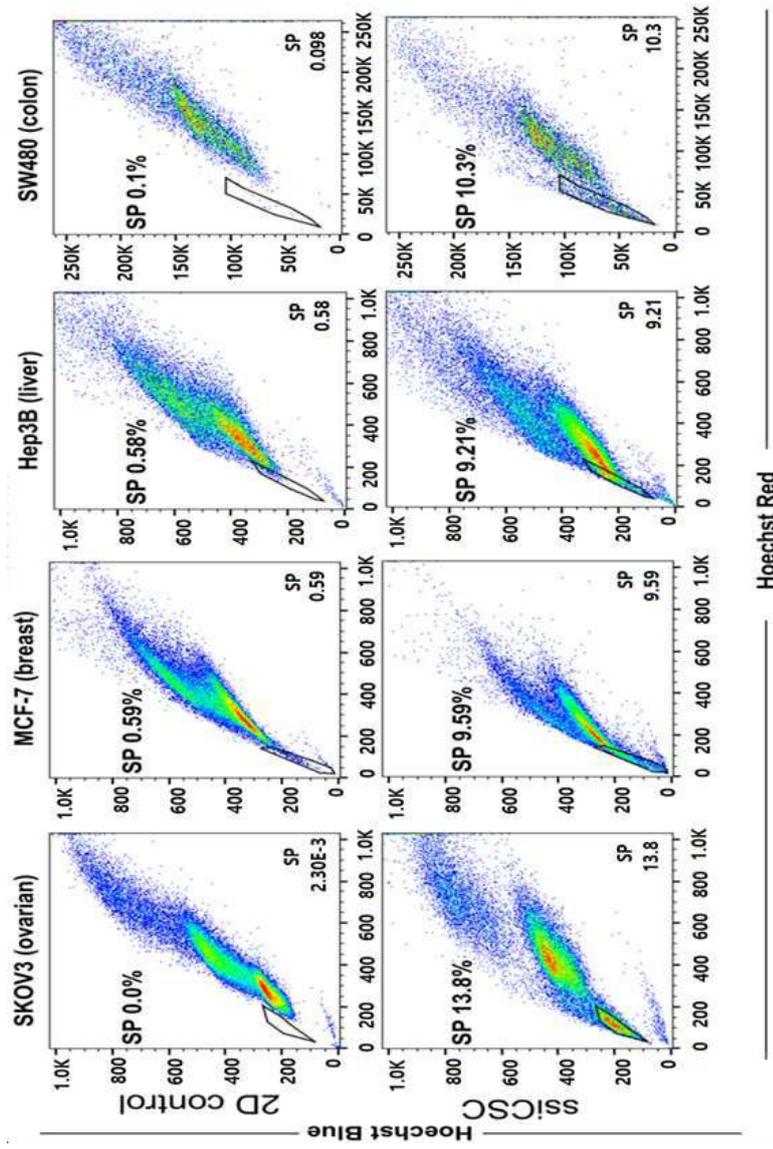
도면11b



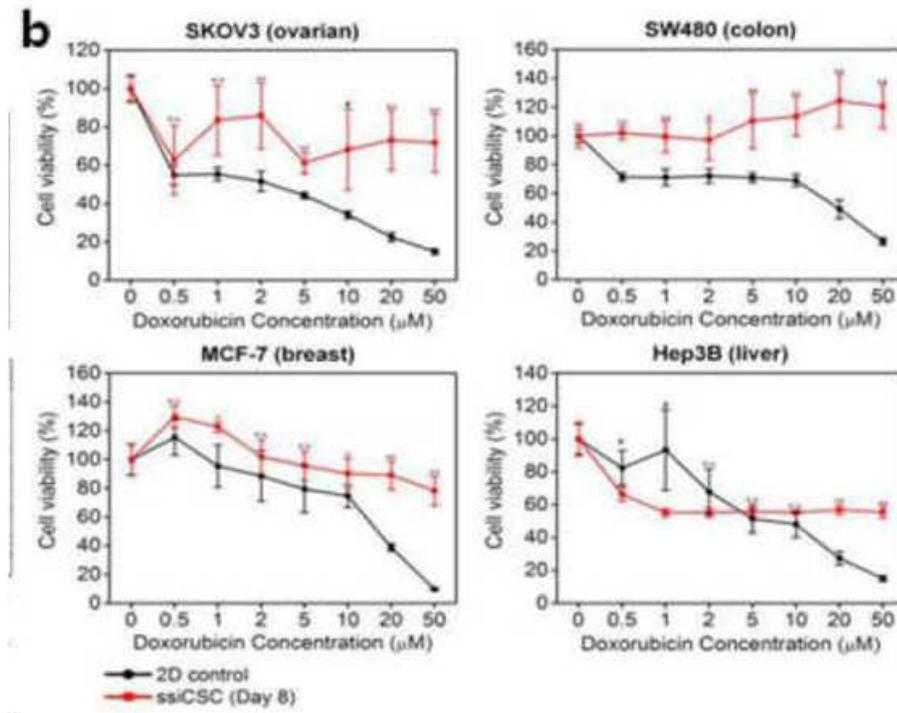
도면11c



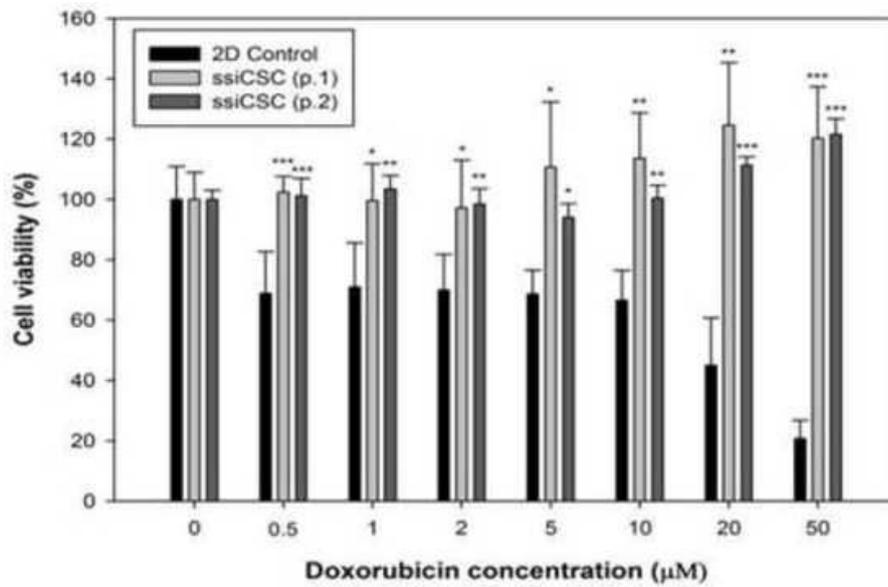
도면12a



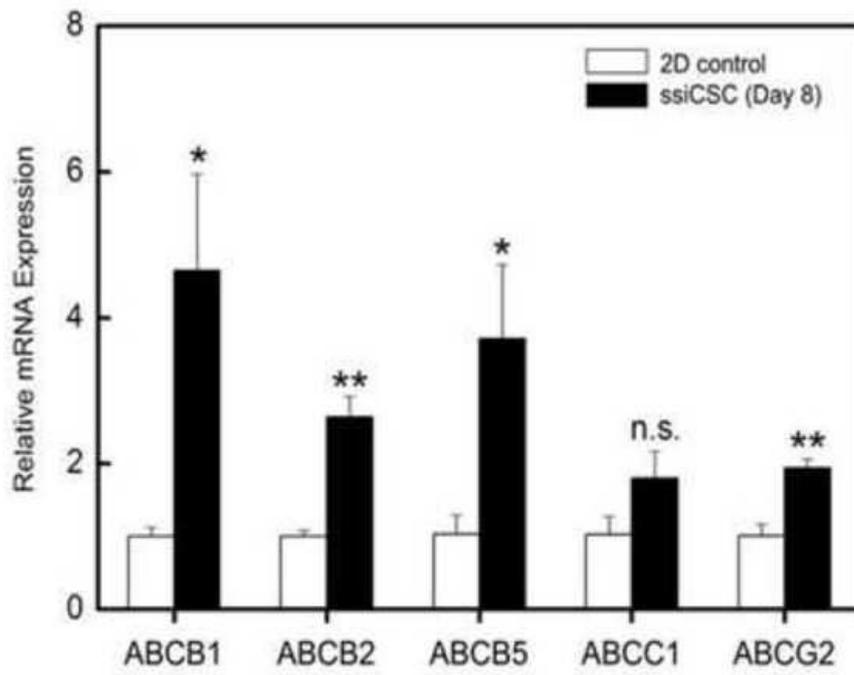
도면12b



도면12c

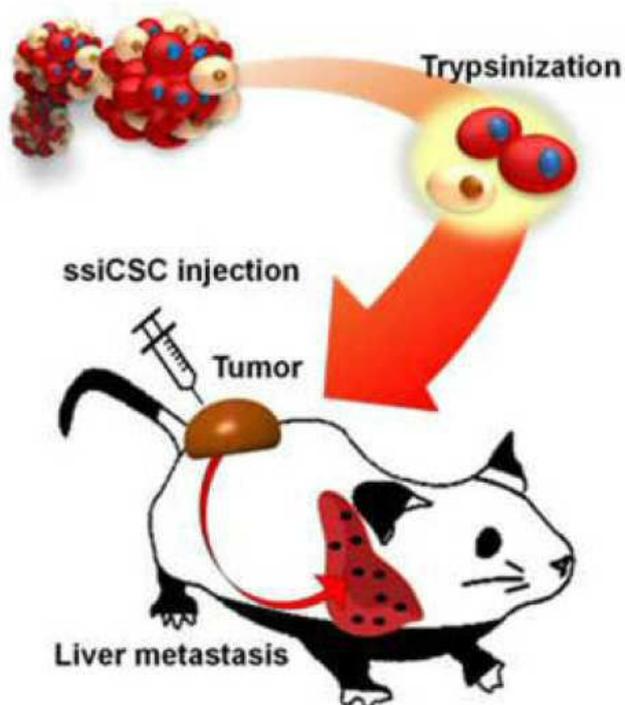


도면12d



도면13a

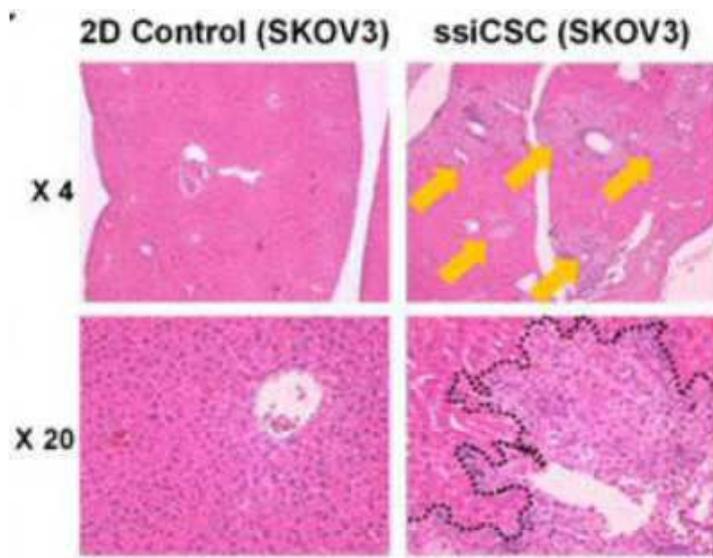
ssiCSC spheroids



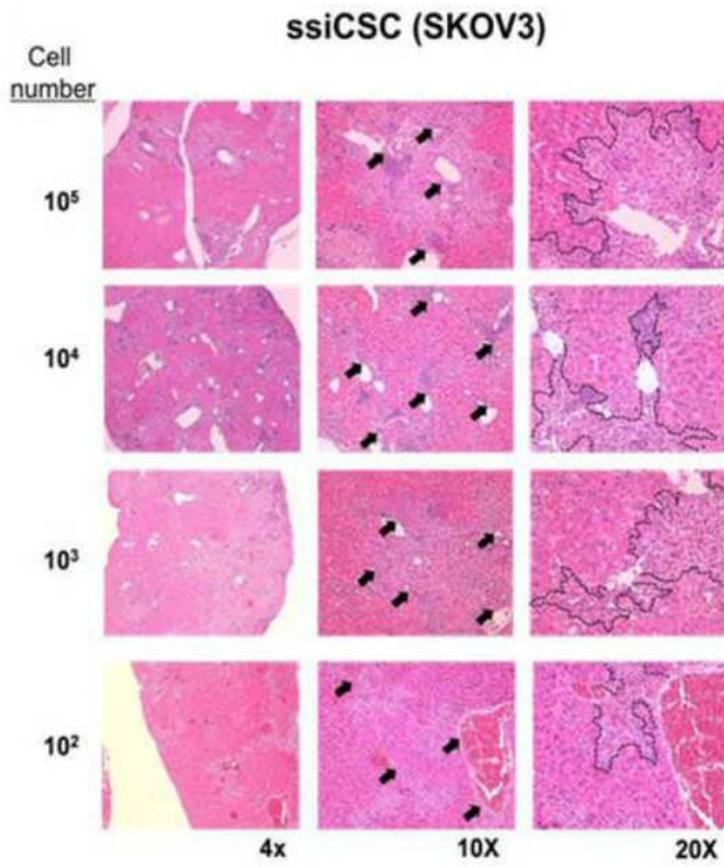
도면13b



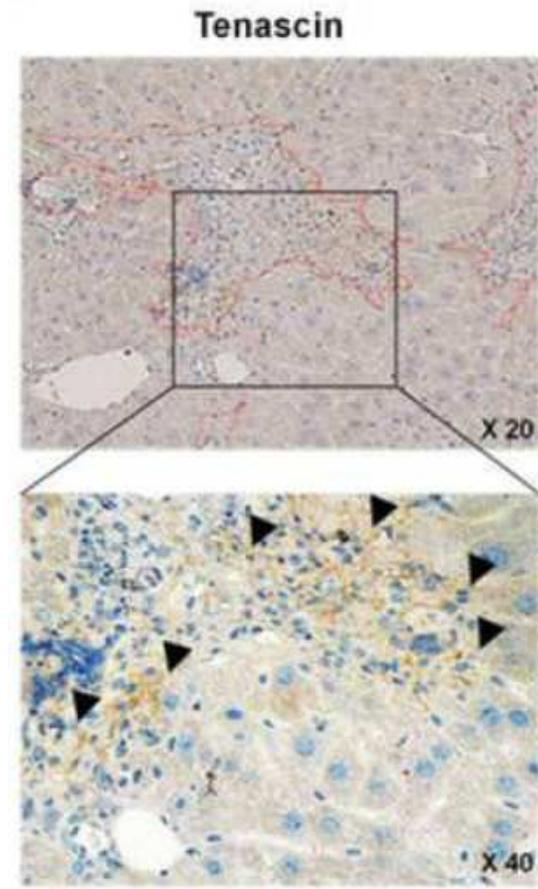
도면13c



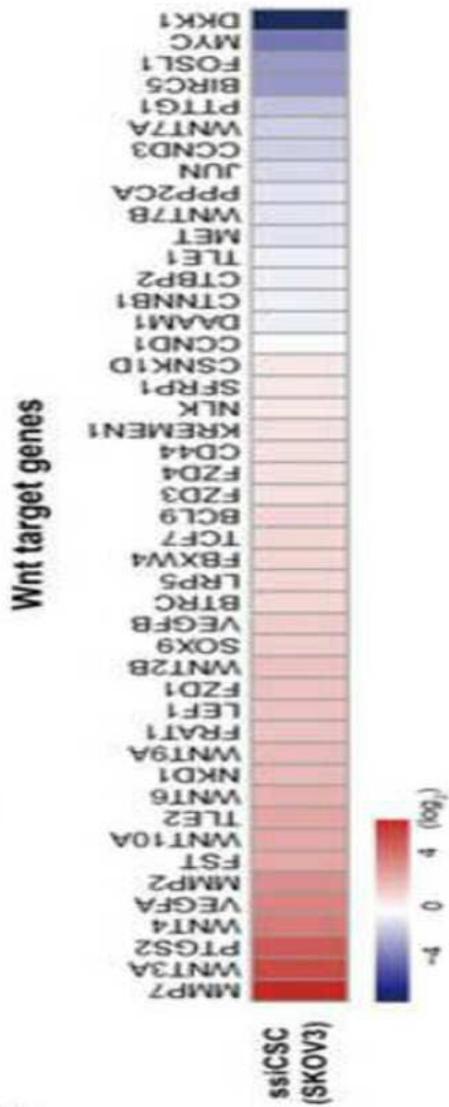
도면13d



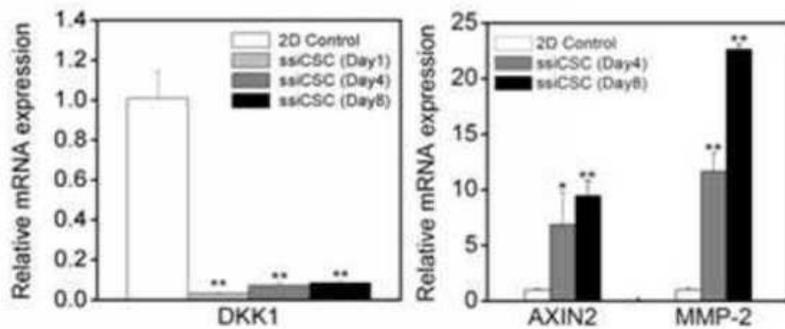
도면13e



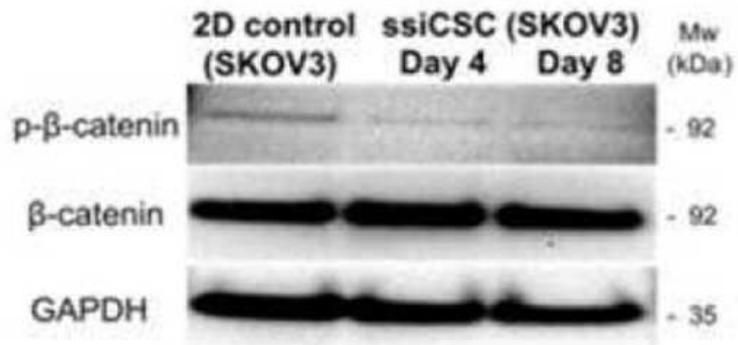
도면14a



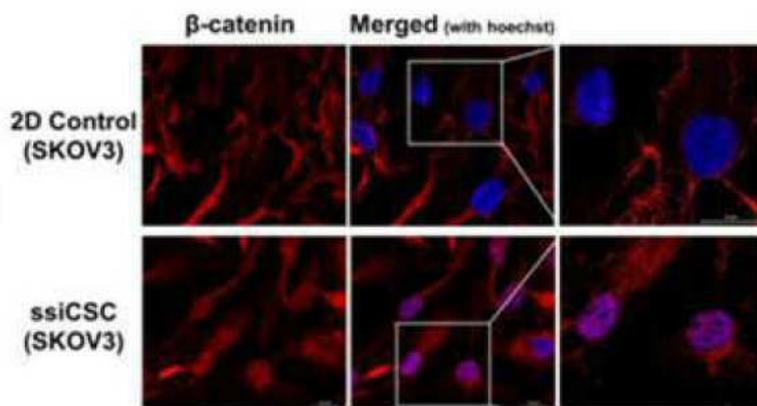
도면14b



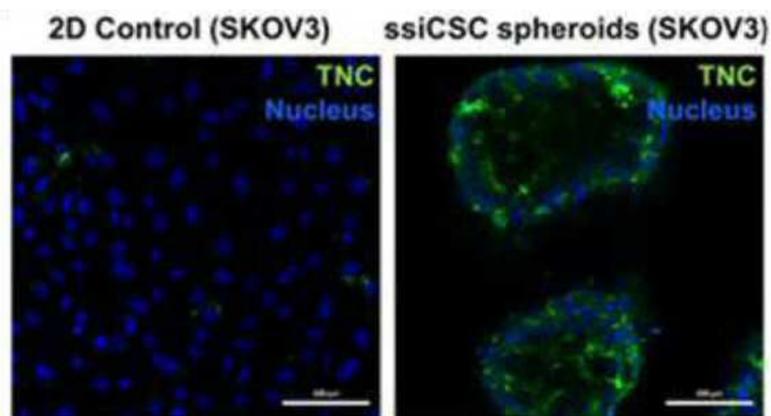
도면14c



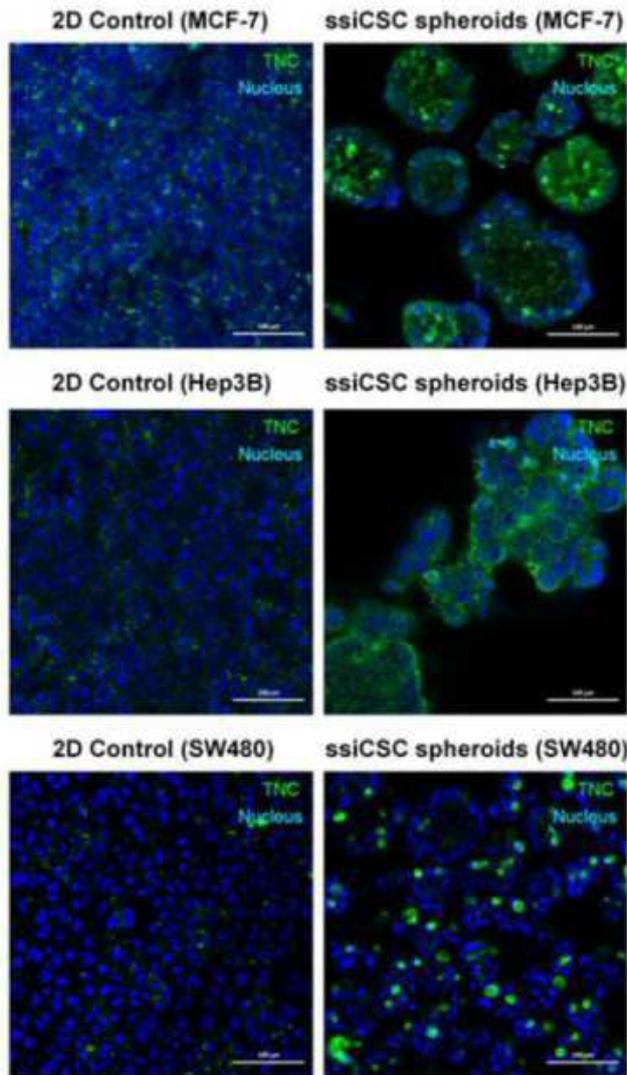
도면14d



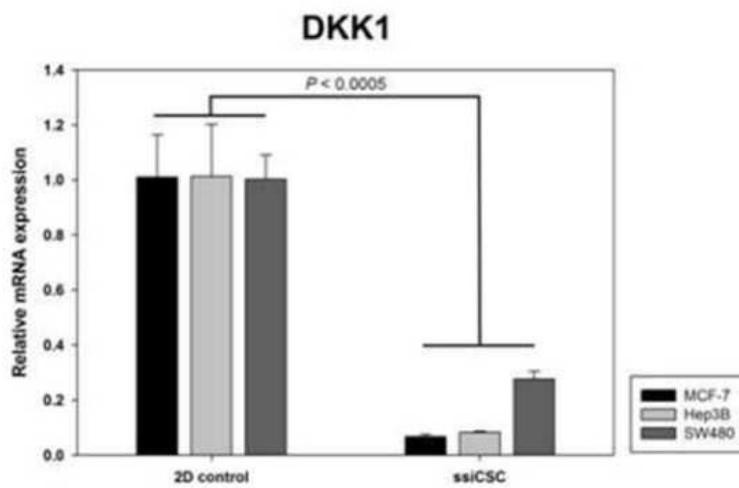
도면14e



도면15a



도면15b



서열 목록

<110> KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Method of producing cancer stem cell spheroid
 <130> DPP20180457KR
 <150> KR 10-2018-0012338
 <151> 2018-01-31
 <160> 40
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human b-actin_F
 <400> 1
 gctttccct ccatcgtg 18
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Human b-actin_R
 <400> 2
 aggtgtggtg ccagatttc 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ALDH1A1_F
 <400> 3
 cgccagactt acctgtccta 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ALDH1A1_R
 <400> 4
 gtcaacatcc tccttatctc ct 22

<210>
 > 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ALDH1A2_F
 <400> 5
 cagctttgtg ctgtggcaat 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ALDH1A2_R
 <400> 6
 ggaaagccag ctccttgat 20
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human EpCAM_F
 <400> 7
 agttggtgca caaatactg tcat 24

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human EpCAM_R
 <400> 8
 tcccaagttt tgagccattc 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD44_F

<400> 9
 tccaacacct cccagtatga 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD44_R
 <400> 10
 ggcaggtctg tgactgatg 20

 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD90_F
 <400> 11
 agagacttgg atgaggag 18
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD90_R
 <400> 12
 ctgagaatgc tggagatg 18
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD133_F
 <400> 13
 accagtaag aaccggatc aa 22

 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD133_R
 <400> 14
 caagaattcc gcctcctagc act 23
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human LGR5_F
 <400> 15
 cctgcttgac ttgaggaag acc 23
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human LGR5_R
 <400> 16
 ccagccatca agcaggtgtt ca 22

 <210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Oct3/4_F
 <400> 17
 cttgctgcag aagtgggtgg aggaa 25
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Oct3/4_R
 <400> 18
 ctgcagtgtg ggtttcgggc a 21
 <210> 19
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Sox2_F
 <400> 19

 catcacccac agcaaatgac a 21
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Sox2_R
 <400> 20

 gtcctaccg taccactaga actt 24
 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Nanog_F
 <400> 21

 aatacctcag cctccagcag atg 23
 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Nanog_R
 <400> 22

 tgcgtcacac cattgctatt cttc 24
 <210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB1_F
 <400> 23

 tgacatttat tcaaagttaa aagca 25

<210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB1_R
 <400> 24
 tagacacttt atgcaaacat ttcaa 25

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB2_F
 <400> 25
 cgttgtcagt tatgcagcgg 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB2_R
 <400> 26
 atagatcccg tcaccacga 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB5_F
 <400> 27
 cacaaaaggc cattcaggct 20

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCB5_R

<400> 28
 gctgaggaat ccaccaatc t 21
 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCC1_F
 <400> 29
 ggaataccag caaccccgac tt 22
 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCC1_R
 <400> 30
 ttttggtttt gttgagaggt gtc 23

 <210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCG2_F
 <400> 31
 tcatgttagg attgaagcca aaggc 25
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human ABCG2_R
 <400> 32
 tgtgagattg accaacagac ctga 24
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Human DKK1_F
 <400> 33
 tcccctgtga ttgcagtaaa 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human DKK1_R
 <400> 34
 tccaagagat ccttgcgttc 20

 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human b-catenin_F
 <400> 35
 acagctcggt gtaccgctgg 20

 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human b-catenin_R
 <400> 36

 agcttggggt ccaccactag 20

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human AXIN2_F
 <400> 37
 agtgtgaggt ccacggaaac 20

 <210> 38
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human AXIN2_R
 <400> 38
 cttcacactg cgatgcattt 20
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human MMP-2_F
 <400> 39
 tctcctgaca ttgaccttgg c 21
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human MMP-2_R
 <400> 40
 caagtgctg gctgagtaga tc 22