



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월01일

(11) 등록번호 10-2573231

(24) 등록일자 2023년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) **B05D 1/00** (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) **C12M 1/12** (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0622 (2013.01)
B05D 1/60 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0016129
(22) 출원일자 2021년02월04일
심사청구일자 2021년02월04일
(65) 공개번호 10-2022-0112508
(43) 공개일자 2022년08월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180005139 A*
(뒷면에 계속)

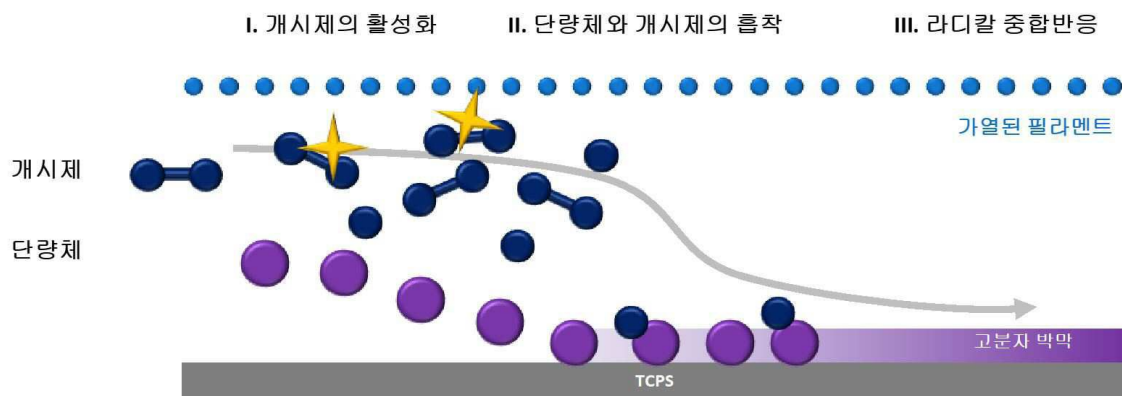
(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
신현정
대전 유성구 대학로 291(구성동)
박은영
대전 유성구 대학로 291(구성동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 정안

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **고분자 박막이 코팅된 소수성 기판을 이용한 뇌 아교세포 분리 배양 방법****(57) 요약**

본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기판에 고분자 박막이 코팅된 소수성 기판을 이용하여 혼합된 아교세포를 분리 배양하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 메타아크릴레이트계 화합물 또는 환형 실록산계 화합물 고분자 박막이 코팅된 배양 기판으로 아교세포를 배양함으로써 단일세포인 미세아교세포, 성상세포 및 희소돌기아교세포로 구성된 3차원 세포 덩이인 스펜로이드로 정밀하고 높은 효율로 분리할 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12M 23/20 (2013.01)
C12M 25/06 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C23C 16/452 (2013.01)
C12N 2509/00 (2013.01)

(72) 발명자

임성갑

대전 유성구 대학로 291(구성동)

이은정

대전 유성구 대학로 291(구성동)

이민석

대전 유성구 대학로 291(구성동)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170047118 A
 KR1020190093108 A*
 KR1020180075126 A
 학위논문(박사), 한국과학기술원, 생명화학공학과,
 유승정, 2019.2
 [HTTPS://KOASAS.KAIST.AC.KR/HANDLE/10203/26489
 1]
 POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY VOL. 22, NO. 3,
 P.242_247, JUNE 2011
 COATINGS 2019, 9, 430, P.1_9 ;
 [DOI:10.3390/COATINGS9070430]
 학위논문(석사), 한국과학기술원, 생명화학공학과,
 김예슬, 2020.8,
 [HTTPS://KOASAS.KAIST.AC.KR/HANDLE/10203/28509
 6]
 KR1020190140451 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711125446
과제번호	N11200027
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국과학기술원
연구사업명	한국과학기술원연구운영비지원(R&D)
연구과제명	신경학적 장애 극복을 위한 혁신적인 재활 공학 기술
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415168619
과제번호	20008777
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업기술개발(R&D)
연구과제명	생체적합성 기능성 박막 기반 표면개질 기술을 통한 임상용 장질환 및 심장질환 줄
기세포 치료제 생산 원천기술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2020.04.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기관에 메타아크릴레이트계 화합물 단량체가 중합된 고분자 박막을 증착 코팅하여 소수성 표면으로 개질하는 단계;

대뇌 피질로부터 혼합된 아교세포를 추출하는 단계;

추출한 아교세포를 코팅된 배양 기관에 배양하는 단계; 및

배양 기관 바닥에 부착된 단일 세포 및 배양액 내에 부유하는 스펜로이드를 분리하는 단계를 포함하며,

상기 메타아크릴레이트계 화합물은 Cyclohexyl methacrylate이고,

상기 고분자 박막은 poly Cyclohexyl methacrylate인 것을 특징으로 하는 iCVD 공정을 이용한 아교세포를 분리 배양하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 코팅된 배양 기관은 접촉각이 80 내지 90° 인 것을 특징으로 하는 iCVD 공정을 이용한 아교세포를 분리 배양하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 혼합된 아교세포를 배양하는 단계는 100,000cells/cm² 이상의 농도로 5일차까지 배양을 지속하는 것을 특징으로 하는 iCVD 공정을 이용한 아교세포를 분리 배양하는 방법.

청구항 8

개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 메타아크릴레이트계 화합물 단량체가 중합된 고분자 박막이 코팅된 아교세포 분리용 배양 기관으로서,

상기 메타아크릴레이트계 화합물은 Cyclohexyl methacrylate이고,

상기 고분자 박막은 poly Cyclohexyl methacrylate인 것을 특징으로 하는 아교세포 분리용 배양 기관.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 코팅된 배양 기관은 접촉각이 80 내지 90° 인 것을 특징으로 하는 배양 기관.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기관에 고분자 박막이 코팅된 소수성 기관을 이용하여 혼합된 아교세포를 분리 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌는 잘 알려진 신경세포 외에도, 미세아교세포(microglia), 성상세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)로 구성된 통칭 아교세포(Glia)들이 함께 복잡한 구조로 얹혀 구성되어 있다. 최근 다양한 뇌 질병 모델에서 이러한 아교세포의 중요성이 부각됨에 따라 각세포들의 기능성을 보다 자세히 규명하고자 체외 세포 배양을 기반한 실험들이 많이 진행되고 있다.

[0003] 아교세포를 세포 종류 별로 구분하고 체외에서 배양하기 위해서 다양한 세포 분리 방법이 개발되어 왔으나 현존하는 분리 기술에는 비용과 기술의 복잡성에 장단점이 있다. 이중 처음 제안된 방법으로, 가장 많이 사용되는 shaking method (1986년 D Giulian and T J Baker, J Neurosci)의 경우 다양한 세포가 얹혀 부착된 후 세포를 분리하는 과정으로, 순도와 수율에 한계를 보이고 있고, 또한 분리 과정의 복잡성으로 세포의 기능성 변화를 유도한다는 단점이 있다(2017 년 L Lin et al J Neuroinflammation).

[0004] 다음으로 많이 사용되는 chemical treatment에 해당하는 mild trypsinization 방법(2003년 J Saura J M Tusell J Serratos Glia)의 경우 다양한 세포를 얹혀 부착시킨 후 아교세포 단층을 하나의 시트로 박리함으로써 바닥에 강하게 부착되어 남아있는 미세아교세포를 획득하도록 하는 방법으로, 이는 앞선 방법과 마찬가지로 접근성이 용이한 점에서 다수 사용되고 있지만 세포를 획득하는데 최소 2 주 이상의 시간이 소요되는 단점이 있다.

[0005] 상기 단점을 극복하기 위해서 2006 년 이후, MACS(Magnetic activated cell sorting), FACS(Fluorescent activated cell sorting), Immunopanning 방법들이 제안되었으며, 이러한 방법들은 다양한 세포 종류를 높은 정확도로 1 일 이내로서 빠르게 분리할 수 있는 장점을 가지고 있으나, 기본적으로 항원 항체의 결합 반응을 이용하는 방법에 해당하여 추가적인 재료 장비를 요구하거나 막대한 비용을 필요로 한다는 단점이 존재한다.

[0006] 이에, 본 발명에서는 종래 분리 방법과는 상이한 방법으로 접근하여, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)에 기반한 배양 기관에 고분자 박막을 증착하여 세포 고유의 부착 특성의 상이함에 따른 아교세포 분리 및 이의 배양 방법을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개공보 제10-2019-0140451호 (2019.12.19)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기관에

고분자 박막이 코팅된 소수성 기판을 이용하여 아교세포를 분리 배양하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기판에 단량체가 중합된 고분자 박막을 증착 코팅하여 소수성 표면으로 개질하는 단계; 대뇌 피질로부터 혼합된 아교세포를 추출하는 단계; 추출한 아교세포를 코팅된 소수성 배양 기판에 배양하는 단계; 및 배양 기판 바닥에 부착된 단일 세포 및 배양액 내에 부유하는 3차원 세포 덩이인 스페로이드(spheroid)를 분리하는 단계를 포함하는 iCVD 공정을 이용한 아교세포를 분리 배양하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 상기 단량체는 메타아크릴레이트계 화합물 또는 환형 실록산계 화합물일 수 있다.

[0012] 상기 메타아크릴레이트계 화합물은 Cyclohexyl methacrylate일 수 있다.

[0013] 상기 환형 실록산계 화합물은 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane일 수 있다.

[0014] 상기 코팅된 배양 기판은 접촉각이 80 내지 90° 일 수 있다.

[0015] 상기 고분자 박막은 poly Cyclohexyl methacrylate 또는 poly 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane일 수 있다.

[0016] 상기 혼합된 아교세포를 배양하는 단계는 100,000cells/cm² 이상의 농도로 5일차까지 배양을 지속하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 단량체가 중합된 고분자 박막이 코팅된 배양 기판에 관한 것이다.

[0018] 상기 단량체는 메타아크릴레이트계 화합물 또는 환형 실록산계 화합물일 수 있다.

[0019] 상기 메타아크릴레이트계 화합물은 Cyclohexyl methacrylate일 수 있다.

[0020] 상기 환형 실록산계 화합물은 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane일 수 있다.

[0021] 상기 코팅된 배양 기판은 접촉각이 80 내지 90° 일 수 있다.

[0022] 상기 고분자 박막은 poly Cyclohexyl methacrylate 또는 poly 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기판에 고분자 박막이 코팅된 소수성 기판을 이용하여 아교세포를 분리 배양하는 방법을 제공하는 것으로, 아교세포를 고분자 박막이 코팅된 소수성 특성의 배양 기판에서 배양함으로써 단일세포인 미세아교세포, 성상세포 및 희소돌기아교세포로 구성된 3차원 스페로이드로 정밀하고 높은 효율로 분리할 수 있는 이점이 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 아교세포를 분리 배양하는 방법은 분리 기술이 단순하여 국내 외 아교세포 연구 분야에 쉽게 활용이 가능하므로, 분리된 미세아교세포와 성상세포 희소돌기아교세포의 기능에 대한 신경과학 및 뇌질환의 병태생리의 체외 세포 연구 및 이를 기반으로 한 뇌 질환 치료 방법 개발에 적용 가능한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 개시제를 이용한 화학 기상 증착(initiated Chemical Vapor Deposition; iCVD)을 설명하기 위한 모식도이다.

도 2는 종래 방법 대비 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 아교세포 배양 및 분리과정의 전반적인 흐름을 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기판의 표면 특성 정량화 분석값을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기관의 부착 특성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 부착된 세포 특성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 부유하는 세포 특성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 부유하는 세포 특성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 poly Cyclohexyl methacrylate 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 의한 세포 배양 농도의 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 따른 iCVD 공정을 이용한 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane 고분자 박막이 코팅된 배양 기관의 부착 특성 평가 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명의 바람직한 실시형태들을 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.
- [0027] 뇌 아교세포 체외 배양을 위하여, 특정 아교세포를 분리하고 체외에서 배양하여 뇌 질환 모델을 만드는 연구는 지속적으로 수행되어 왔으며 체내에서 밝히기 어려운 아교세포의 복잡한 기능과 반응성을 탐색하는데 중요한 연구 물자로서 활용되어왔다.
- [0028] 다만, 뇌조직 및 세포는 체외 세포 분리가 까다롭고 시행하는 방법에 따라 높은 수준의 획득 수율 및 순도를 얻지 못하는 한계가 존재하는 실정이다. 또한, 종래의 방법은 분리과정의 복잡성으로 인하여 장시간 외부 자극에 노출된 세포의 기능성이 약화되거나 활성도가 증가하여 아교세포를 연구에 활용하는 데에 문제가 있다.
- [0029] 본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)으로 배양 기관에 고분자 박막이 코팅된 접촉각이 80 내지 90° 인 소수성 기관을 이용하여 아교세포를 분리 배양하는 방법으로서 세포 고유의 부착 특성의 상이함을 기반으로 혼합된 아교세포를 수일 내에 세포 스스로 분리 배양될 수 있는 방법을 제공한다.
- [0031] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0033] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법으로 배양 기관에 고분자 박막을 증착 코팅하는 단계; 대뇌 피질로부터 혼합된 아교세포를 추출하는 단계; 추출한 아교세포를 코팅된 배양 기관에 배양하는 단계; 및 배양 기관 바닥에 부착된 단일 세포 및 배양액 내에 부유하는 스페로이드를 분리하는 단계를 포함하는 iCVD 공정을 이용한 아교세포를 분리 배양하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명에서의 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)은 기화된 개시제와 단량체가 기상 반응기에 주입된 후, 에너지원에 의해 라디칼화되어 고분자 중합반응을 통해 고분자 박막을 형성하는 공정을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서의 배양 기관은 세포 배양용 폴리스티렌계 배양 기관(tissue culture polystyrene; TCPS)으로, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법으로 상기 배양 기관에 고분자 박막을 증착 코팅할 수 있다.
- [0036] 또한, 개시제를 이용한 화학 기상 증착법으로 고분자 박막이 증착 코팅된 배양 기관의 접촉각은 80 내지 90° 일 수 있다. 상기 접촉각의 범위 내에서 배양 기관은 소수성을 구현함으로써, 부착 특성에 따라 아교세포를 바닥에 부착되거나 배양액 내에 부유하는 세포로 분리할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서의 개시제는 화학 기상 증착법에 적용되는 것으로 반응기에서 열의 공급에 의해 분해되어 자유 라디칼을 형성하는 물질로서 단량체를 활성화시켜 고분자 중합반응을 통해 박막을 형성할 수 있는 물질이면 특별히 한정하지 않는다. 바람직하게 상기 개시제는 과산화물일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 개시제는 TBPO(tert-

butyl peroxide) 일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

- [0038] 본 발명에서의 단량체는 화학 기상 증착법에서 휘발성을 가지며 개시제에 의해 활성화될 수 있는 물질로서 감압 및 승온 상태에서 기화될 수 있다. 바람직하게 상기 단량체는 메타아크릴레이트계 화합물 또는 환형 실록산계 화합물일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 단량체는 Cyclohexyl methacrylate 또는 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane일 수 있으며, 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 본 발명에서의 상기 아교세포(gila)는 뇌에 존재하는 세포 중 가장 많은 부분을 차지하는 세포로서, 뇌 세포 수의 약 40 내지 90% 정도를 담당하고 있으며 미세아교세포(Microglia), 성상세포(Astrocyte) 및 희소돌기아교세포(Oligodendrocyte)로 구성되는 세포를 의미한다. 상기 성상세포는 신경세포의 보호, 영양공급 및 염증에 관여하며, 상기 미세아교세포는 뇌에서 염증을 담당하는 세포이다.
- [0040] 한편, 본 발명에 따른 개시제를 이용한 화학 기상 증착법으로 고분자 박막이 코팅된 소수성 배양 기관에 혼합된 아교세포의 배양을 수행한다. 상기 배양에 의하여 혼합된 아교세포는 배양 기관 바닥에 부착된 단일 세포 및 배양액 내에 부유하는 3차원 세포 덩이인 스페로이드(spheroid)로 분리될 수 있다. 이 때, 혼합된 아교세포는 100,000cells/cm² 이상의 농도로 배양하며, 5일차까지 배양을 지속하는 것이 바람직하다.
- [0041] 상기 배양에 의하여 바닥에 부착된 단일 세포인 미세아교세포의 성장과 분열이 지속됨에 따라 수가 증가하고, 배양액 내에 부유하는 3차원 세포 덩이인 스페로이드에서도 세포의 성장과 분열이 지속됨에 따라 내부적으로 결속이 단단해진다. 상기 스페로이드는 성상세포 및 희소돌기아교세포가 세포 덩이로서, 스페로이드의 중심부는 성상세포이고 이는 3차원 형태로서 기존의 분리 배양 방법에 의한 2 차원 배양 세포와 비교해 체내 특성을 잘 유지하고 있으며, 스페로이드의 외곽은 희소돌기아교세포로 구성된다.
- [0042] 본 발명에 따른 아교세포의 분리 방법은 세포의 접착 특성이 서로 다른 세포를 자연적으로 분리할 수 있는 방법으로서, 미세아교세포는 세포 바닥 부착력만이 존재하고 타 세포와 강한 세포 사이의 부착을 형성하지 않는 반면, 희소돌기아교세포 및 성상세포는 서로 세포 사이의 부착력이 존재한다.
- [0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0046] [실시예]
- [0048] **실시예 1. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 소수성 배양 기관의 제조 및 아교세포의 분리 및 배양**
- [0050] 화학 기상 증착법으로 고분자 박막이 코팅된 소수성 배양 기관을 제조하였다. 먼저, iCVD 반응기(대기 하이테크사)에서 단량체 통에 단량체인 Cyclohexyl methacrylate를 넣고 60℃로 가열하였다. 개시제로서 Tert-butyl peroxide를 개시제 통에 넣고 상온으로 유지하였다.
- [0052] 배양 기관 TCPS(tissue culture polystyrene)을 iCVD 반응기에 넣고 28.5℃로 유지한 상태에서 반응기 내의 필라멘트의 온도는 180℃ 반응기 내 챔버의 압력은 280mTorr로 유지하면서 약 20~60분간 증착을 시도하여 100nm 두께의 pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막을 배양 기관 표면에 증착 코팅하였다.
- [0054] 이후, 1-3일령 쥐의 대뇌 피질로부터 미세아교세포, 성상세포, 희소돌기아교세포가 혼합된 아교세포를 종래의 방법(Yang, et al., Plos One, 2011)을 통해 획득하고 이를 단일 세포로 분리한 후, pCHMA 고분자 박막이 코팅된 TCPS를 100,000cells/cm² 이상의 농도로 배양하였다. 배양 후, 수 시간부터 바닥에 부착된 단일 세포 및 배양액 내에 부유하는 다수의 세포가 뭉친 스페로이드가 관측되며, 이를 배양 4일차까지 지속하였다. 배양 4일차에 세포 덩이인 스페로이드가 바닥에 부착되려는 특성을 보이므로 모든 세포를 TrypLE 처리를 통해 바닥으로부터 떼어낸 후, 새로운 pCHMA 고분자 박막이 코팅된 TCPS에 재배양 하였으며, 이로부터 1일 후 (초기 배양으로부터 5일 후) 바닥에 부착된 단일 세포 및 부유하는 스페로이드를 분리하였다.
- [0056] 세포의 성장과 분열이 지속됨에 따라 바닥에 부착된 단일 세포 수 및 배양액 내에 부유하는 스페로이드가 증가하였으며, 이는 96% 순도 이상의 미세아교세포로 확인된다. 배양 5 일차에 스페로이드 단면을 확인한 결과 세포 덩이 중심부는 성상세포, 외곽은 희소돌기아교세포이고, 성상세포로 구성된 세포 덩이는 3차원 형태로서 종래의 2차원 배양 세포와 비교해 체내 특성을 잘 유지하고 있다.
- [0058] **실시예 2. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기관의 표면 특성 평가**
- [0060] 소수성 특성을 가진 pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막에 의한 표면 자유에너지와 특정 아교세

포 부착 특성을 규명하기 위하여 평가를 수행하였다.

[0062] TCPS 배양 기판에 pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅에 따른 표면 특성을 정량화하기 위하여 FT-IR, 접촉각 및 표면 자유에너지를 분석하여 도 3에 나타내었다. 도 3의 A는 FT IR, B는 접촉각 특성, C는 표면 자유에너지에 따른 pCHMA 코팅 전, 후에 따른 분석결과를 나타낸다.

[0064] TCPS 배양 기판에 pCHMA이 코팅될 경우, 코팅전과 대비하여 유사한 FT-IR 값을 갖는 것이 확인되어 화학 기상 증착 후에도 CHMA의 화학적 특성의 유지되며, 물과의 접촉각이 증가하여 80 내지 90° 범위를 보이며 자유에너지가 감소하는 결과 값을 통하여 pCHMA가 코팅된 TCPS이 배양 기판이 코팅되지 아니한 TCPS과 대비하여 소수성 특성을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0066] **실시예 3. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기판의 부착 특성 평가**

[0068] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅에 따른 TCPS 배양 기판의 아교세포 부착 특성을 평가하기 위하여, 무 코팅 TCPS 배양 기판, PDL (poly-D-Lysine) 단백질이 코팅된 PDL coated 배양 기판, 본 발명의 pCHMA이 코팅된 TCPS 배양 기판을 준비하였다. 한편, PDL (poly-D-Lysine) 단백질이 코팅된 PDL coated 배양 기판은 100 µg/mL 농도로 희석한 PDL을 TCPS에 올려두고 37℃ 조건에서 2시간 기다림으로 획득하였다. 이후 세포 배양 전, PDL 코팅된 배양 기판 표면은 완전히 건조한 후 사용하였다.

[0070] 도 4에 나타낸 바와 같이, 무 코팅 TCPS 배양 기판에서는 배양 초기 세포가 잘 붙지 못하나 시간이 지날수록 모든 아교세포가 동일하게 바닥에 부착되고, PDL 단백질이 코팅된 PDL coated 배양 기판에서는 배양 초기부터 후기까지 모두 세포가 잘 부착되며, pCHMA이 코팅된 배양 기판의 경우 세포가 바닥에 부착되거나 배양액 내에 부유하며 스펜드로이드를 형성하는 모습이 관측됨을 확인하였다. 따라서, 배양 기판 바닥의 부착 특성에 따라서 아교세포의 부착 특성이 상이함을 알 수 있다.

[0072] **실시예 4. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기판 표면에 부착된 세포 특성 평가**

[0074] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅된 TCPS 배양 기판으로 분리된 아교세포 중 배양 기판 표면에 부착된 세포의 특성을 평가하였다.

[0076] 도 5 A는 pCHMA이 코팅된 배양 기판에서 바닥에 부착된 단일 세포의 형광면역염색 사진으로, 녹색은 IBA1 마커로 해당하며 미세아교세포를 나타내며, 육안상으로도 바닥에 부착된 단일 세포는 미세아교세포인 것이 확인된다. 도 5 B는 pCHMA이 코팅된 배양 기판에서 획득한 미세아교세포의 분리 순도(purity) 결과이며, Mild trypsinization(mildT) 및 shaking method 대비 pCHMA 코팅된 배양 기판으로 획득한 미세아교세포의 순도가 96% 이상에 해당하여 고순도임을 확인할 수 있다. 도 5 C는 pCHMA이 코팅된 배양 기판에서 획득한 미세아교세포의 분리 수율 (yield) 결과이며, Mild trypsinization(mildT) 및 shaking method와 비교했을 때, shaking method 대비 수율은 낮으나 결과의 표준편차가 작음을 알 수 있다. 결론적으로, pCHMA 이 코팅된 배양 기판 표면에 부착된 세포는 고순도의 미세아교세포임을 알 수 있다.

[0078] **실시예 5. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기판 표면에 부유하는 세포 특성 평가(1)**

[0080] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅된 TCPS 배양 기판으로 분리된 아교세포 중 배양 기판 표면에 부유하는 세포의 특성을 평가하였다.

[0082] 도 6 A 및 도 6 B에 나타난 바와 같이 pCHMA이 코팅된 배양 기판 바닥에 부착되지 않고 배양액 내에 부유하는 스펜드로이드를 형태학적 모습 및 배양 5일차의 스펜드로이드의 단면 지름의 사이즈를 확인하였다. 또한, 도 6 C 내지 E를 통하여, 배양 일차에 따른 스펜드로이드의 원형도(Circularity), 굴곡성(Roundness) 및 종횡비(Aspect ratio)를 분석하였다. 원형도 및 굴곡성은 배양 1일차부터 5일차까지 점차 1에 가까워지는 결과를 보이며, 종횡비는 1보다 큰 값에서 점차 1로 수렴하였다. 이는 세포 덩이가 내부적으로 접합을 증가시키며, 구형에 가까운 형태로 변화되는 것을 의미한다. 결론적으로, pCHMA이 코팅된 배양 기판 표면에 부유하는 스펜드로이드는 배양 과정 동안 내부적으로 단단해지는 과정을 거침을 확인할 수 있다.

[0084] **실시예 6. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기판 표면에 부유하는 세포 특성 평가(2)**

[0086] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅된 TCPS 배양 기판으로 분리된 아교세포 중 배양 기판 표면에 부유

하는 세포 덩이의 특성을 추가로 평가하였다.

[0088] 도 7 A는 pCHMA이 코팅된 배양 기관에서 바닥에 부착되지 않고 배양액 내에 부유하는 스페로이드의 배양 5일차 세포 종류를 나타내는 형광면역염색 사진의 단면도이다. 스페로이드는 내부적으로는 정상세포가, 외부는 주로 희소돌기아교세포가 구분되어 배치되어 있음을 알 수 있다. 도 7 B는 희소돌기아교세포가 단면도 중심을 기준으로 배치된 거리 정량화 그래프로서, 도 7 A에서 관측된 구분된 현상을 확인할 수 있다. 도 7 C는 스페로이드에 미세아교세포(IBA1)와 정상세포(GFAP)염색한 결과를 나타낸 것으로, 스페로이드에 일부 미세아교세포가 섞여 있음을 확인할 수 있다.

[0090] 결론적으로, pCHMA 이 코팅된 배양 기관 표면에 부유하는 스페로이드는 주로 정상세포와 희소돌기아교세포로 구성되어 있으며, 이들 세포는 내부적으로 특이적인 배치 형태를 보이고 있음을 알 수 있다.

[0092] **실시예 7. pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 의한 세포 배양 농도 평가**

[0094] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 코팅된 TCPS 배양 기관과 아교세포의 관계성을 규명하기 위하여 세포 배양 농도를 검증하였다.

[0096] 도 8 A를 참조하면, pCHMA 코팅된 배양 기관으로 배양 시 아교세포의 배양 농도에 따라 '바닥에 부착되는 단일 세포' 또는 '배양액 내에 부유하는 3차원 세포 덩이인 스페로이드'의 관측이 달라지는 양상을 보임을 확인할 수 있으며, 특정 농도(백만개 세포/35mm디쉬) 이상에서, 두개의 부착 특성이 관측되는 현상이 뚜렷함을 알 수 있다. 도 8 B는 배양 농도에 따른 배양 기관 바닥에 부착된 단일 세포 수(Obtained single cell) 및 이의 수율(Yield)을 나타낸 그래프이며, 배양되는 세포 농도(Seeding density)가 접시 당 1백만 세포 이상에서 두개의 부착 특성으로 분리가 가능함을 확인할 수 있다.

[0098] **실시예 8. pV4D4(poly 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane) 고분자 박막이 코팅된 배양 기관 표면에 의한 혼합된 아교세포 분리 및 평가**

[0100] pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막 코팅된 배양 기관과 유사한 소수성(hydrophobic) 특성을 가진 pV4D4(poly 2,4,6,8-tetravinyl-2,4,6,8-tetramethyl cyclotetrasiloxane) 코팅된 TCPS 배양 기관에서 동일한 세포 배양 과정을 검증하였다. 실시예 1의 조건에서 단량체를 pCHMA 대신에 pV4D4를 사용하는 조건을 제외하고 동일한 방법으로 배양 기관에 코팅을 진행하였다.

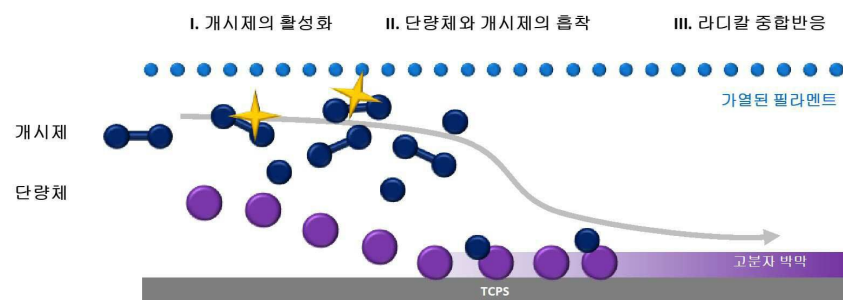
[0101] 도 9에 나타난 바와 같이, pV4D4이 코팅된 배양 기관의 경우 pCHMA이 코팅된 배양 기관과 마찬가지로 세포가 바닥에 부착되거나 배양액 내에 부유하며 스페로이드를 형성하는 모습이 관측됨을 확인하였다.

[0103] 결과적으로, iCVD 공정을 통해 획득한 특정 범위의 소수성 표면과 아교세포의 관계성을 확인할 수 있었다.

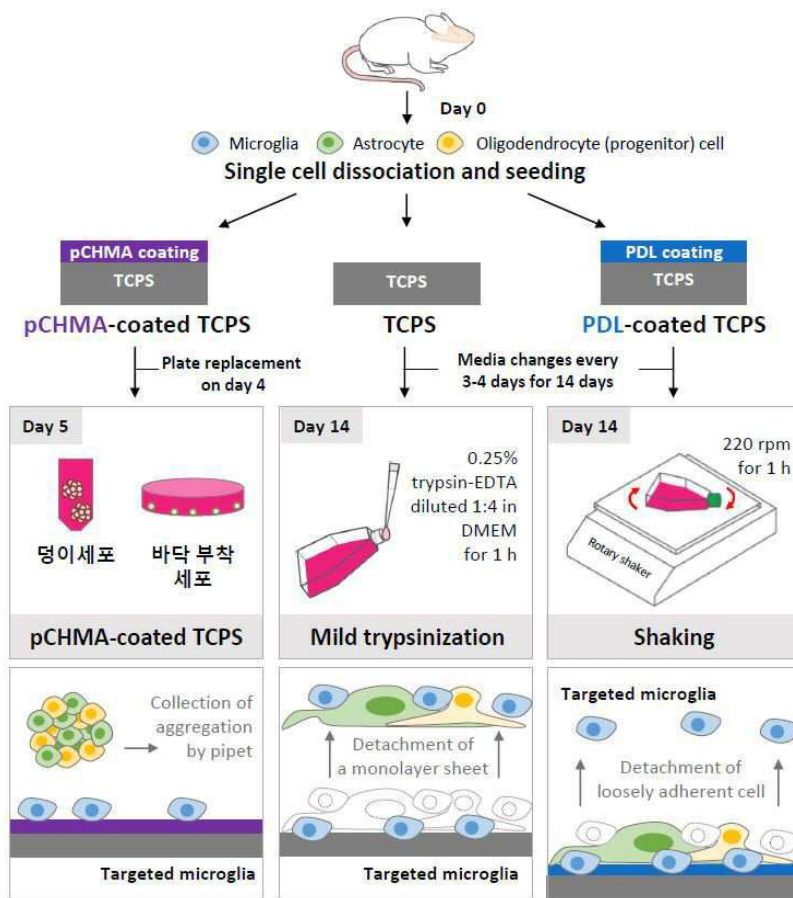
[0105] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

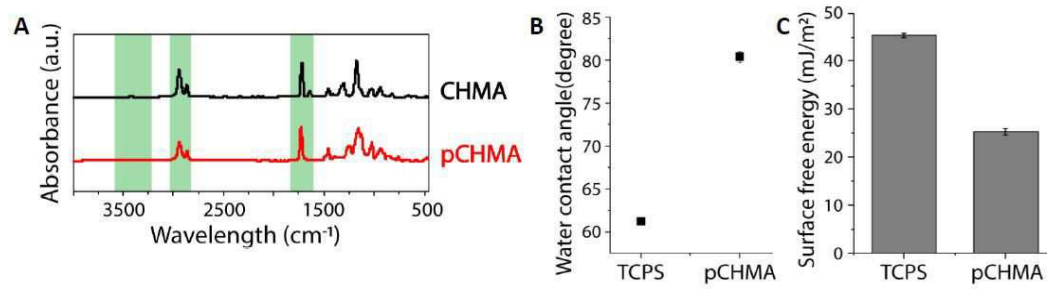
도면1



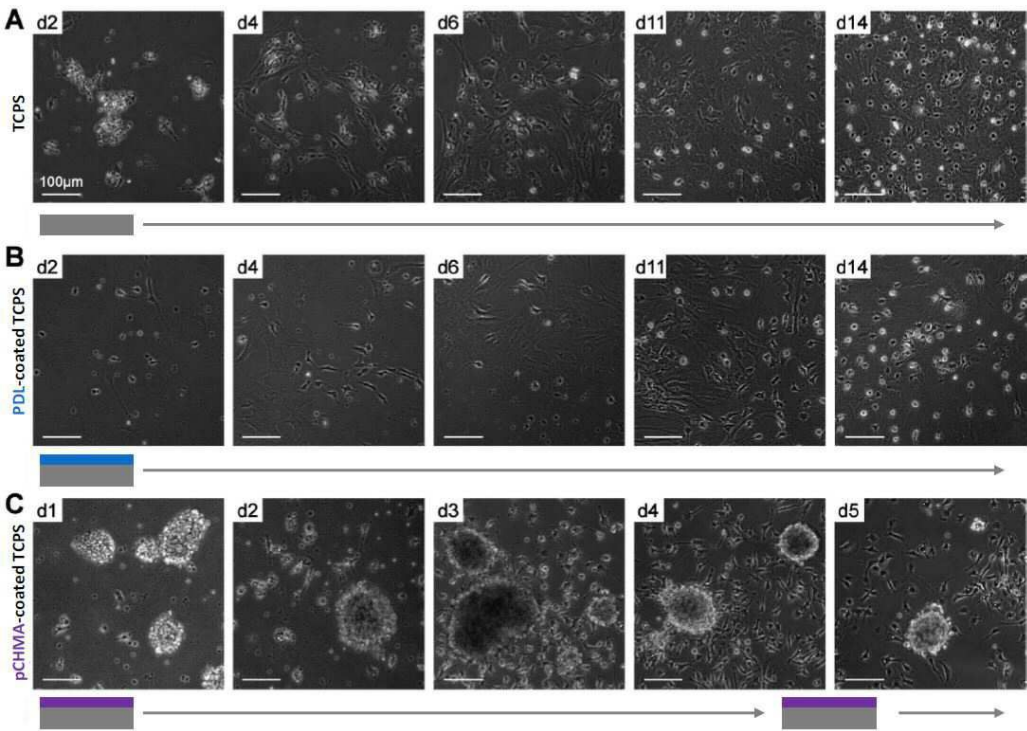
도면2



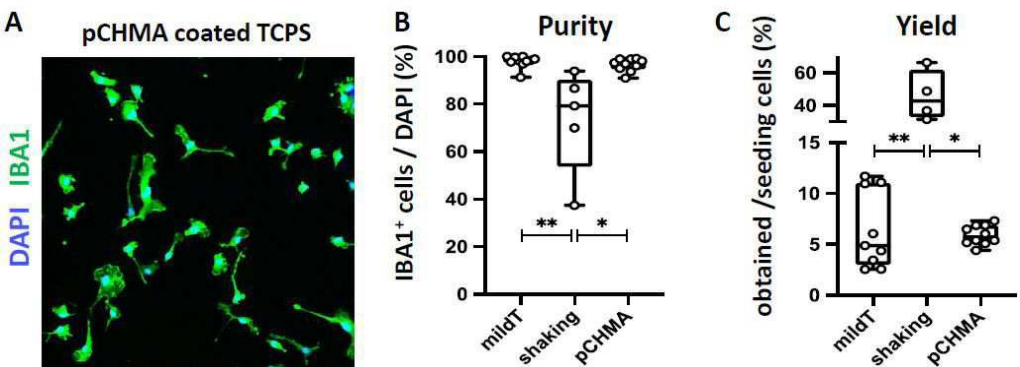
도면3



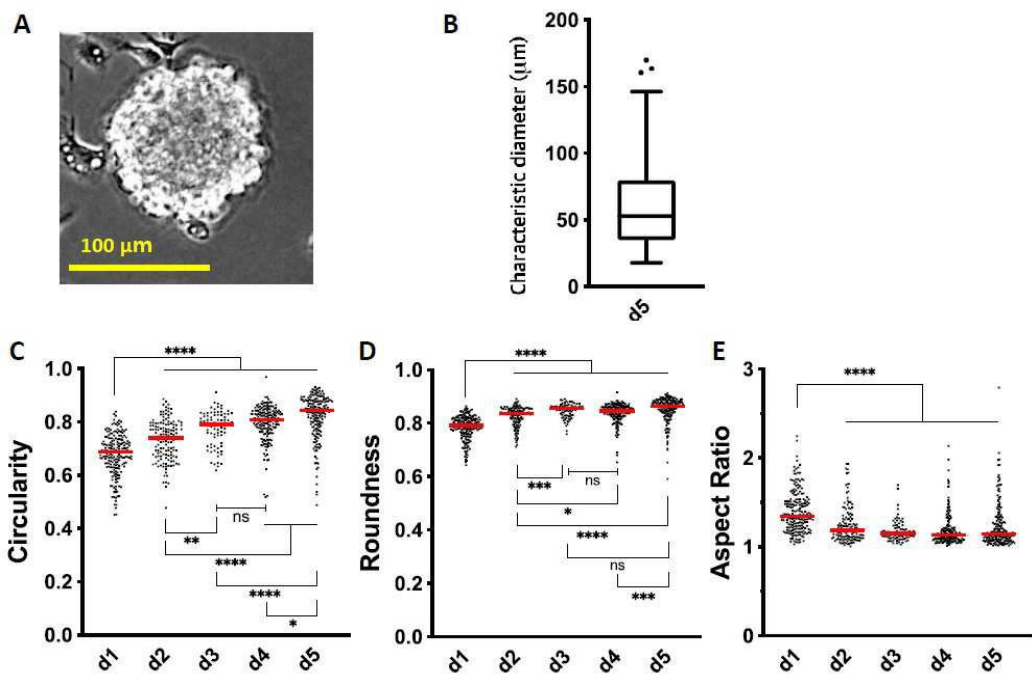
도면4



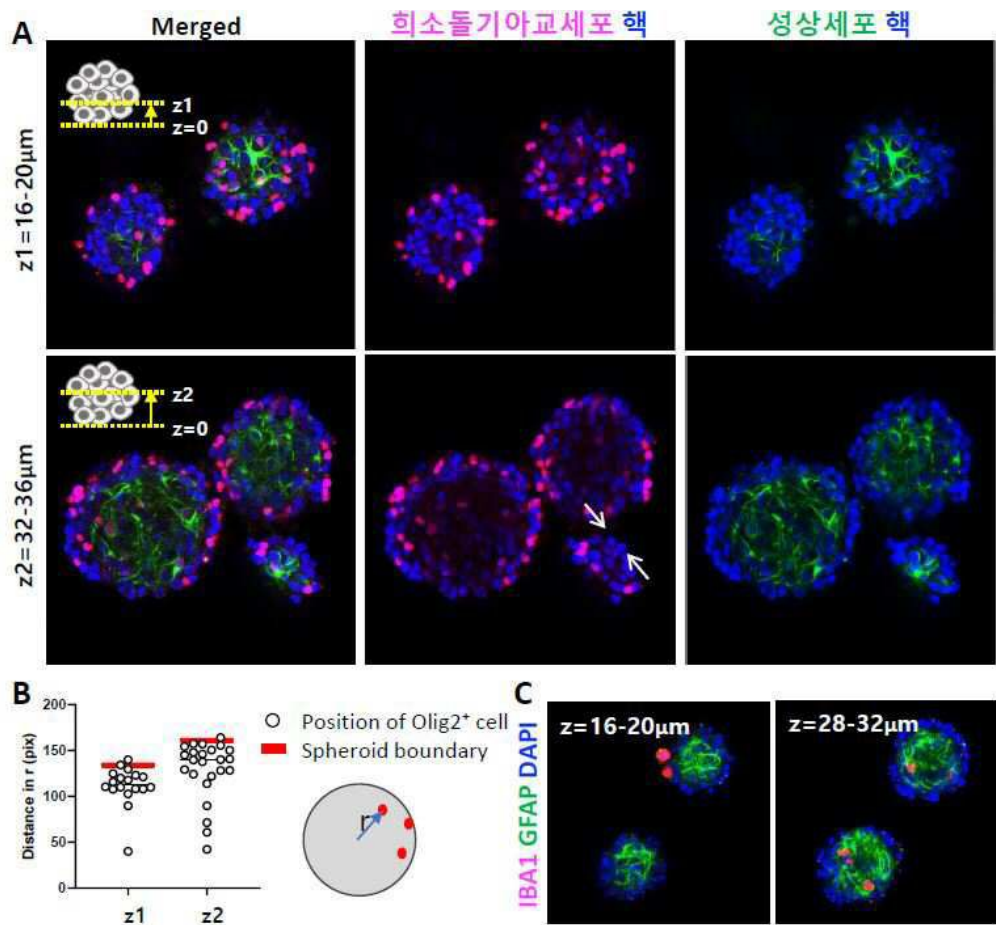
도면5



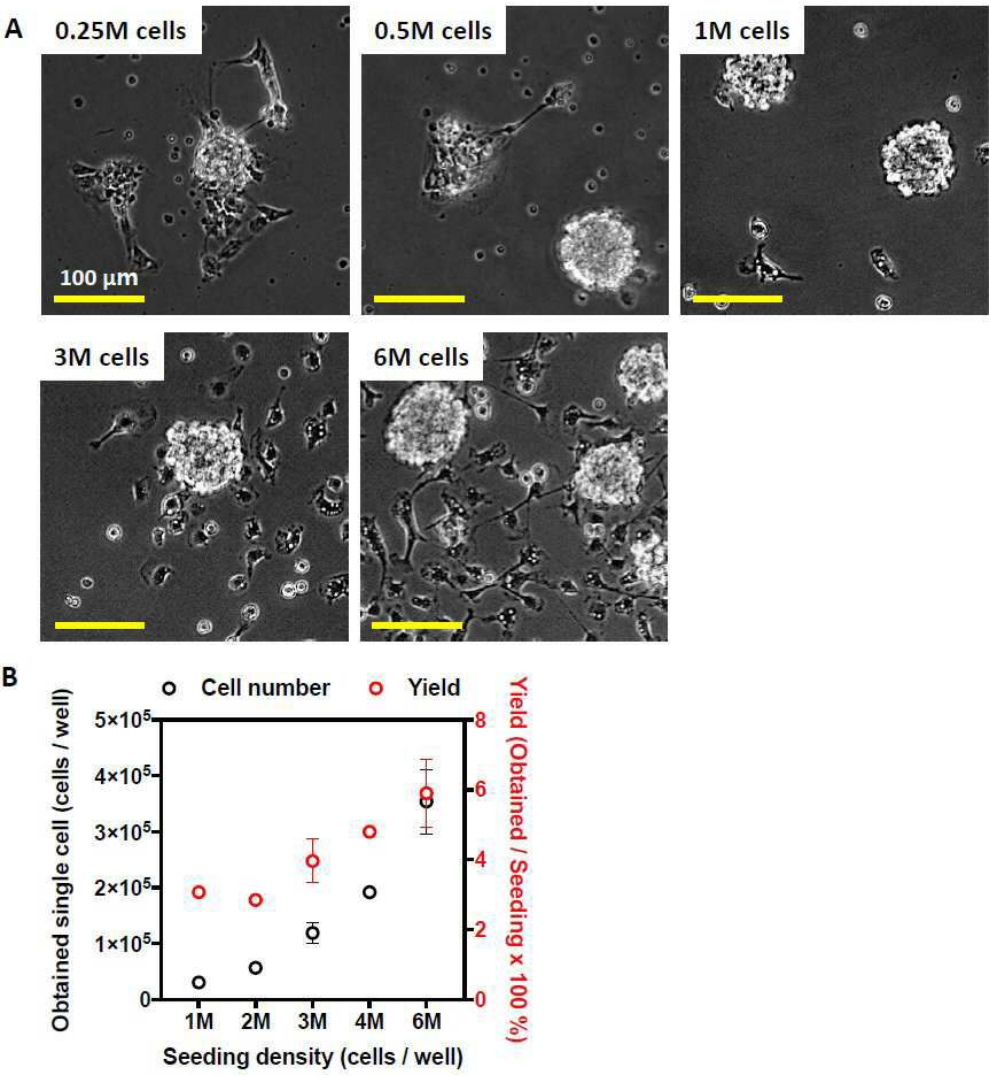
도면6



도면7



도면8



도면9

