



등록특허 10-2728823



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월13일

(11) 등록번호 10-2728823

(24) 등록일자 2024년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C12M 1/22 (2023.01)
C12N 5/0784 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12M 23/20 (2013.01)
C12M 23/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0002320

(22) 출원일자 2022년01월06일

심사청구일자 2022년01월06일

(65) 공개번호 10-2023-0106434

(43) 공개일자 2023년07월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR101643106 B1*

KR1020180075126 A*

KR1020190024250 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

임성갑

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

강석조

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

공병욱

전체 청구항 수 : 총 2 항

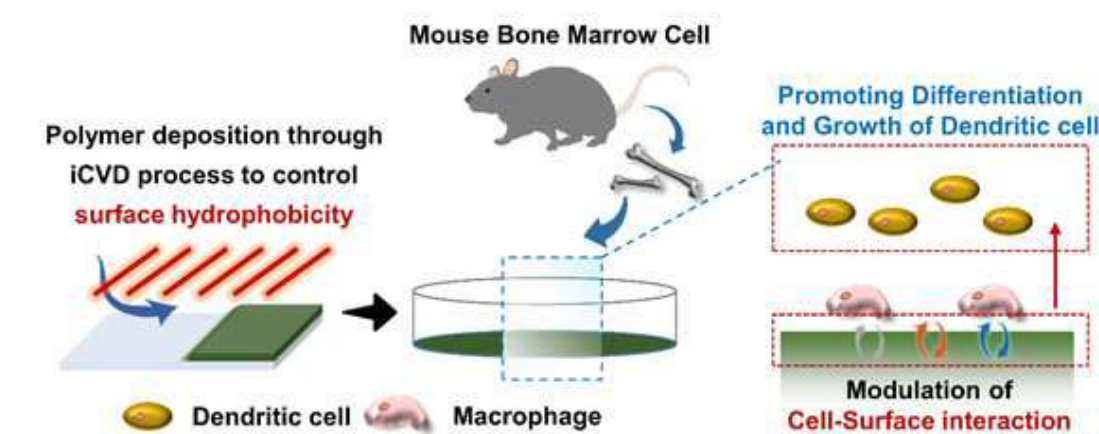
심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 배양 기관의 표면 에너지를 조절함으로써 수지상 세포 분화 및 성장 유도 배양법

(57) 요약

본 발명은 배양 기관의 표면 에너지를 조절함으로써 수지상 세포의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 배양 방법에 관한 것이다. 본 방법의 방법을 이용하는 경우 수지상 세포, 특히 cDC1(classical dendritic cell 1)으로의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 바, 수지상 세포 기반 백신의 개발 및 생체 외 수지상 세포 관련 기초 연구에 전반적으로 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0639 (2023.05)

C12N 2533/30 (2024.08)

(72) 발명자

이민석

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

전동민

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109850
과제번호	2018R1A5A1024261
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	세포 정체성 연구 센터
기 여 율	50/100
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2018.06.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132180
과제번호	2021R1A2B5B03001416
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	이온성/극성 고분자 박막 기반 고성능 소재 개발 및 응용
기 여 율	25/100
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415172264
과제번호	20008777
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업기술개발(R&D)
연구과제명	생체적합성 기능성 박막 기반 표면개질 기술을 통한 임상용 장질환 및 심장질환 줄기세포 치료제 생산 원천기술 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

골수 세포를 표면이 폴리 사이클로헥실 메타크릴레이트(poly cyclohexyl methacrylate, pCHMA), 또는 폴리 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(poly ethylene glycol dimethacrylate, pEGDMA) 박막으로 코팅된 수지상 세포 배양 플레이트 상에서 배양하는 단계를 포함하는 수지상 세포 분화 유도 촉진 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수지상 세포는 pDC(plasmacytoid dendritic cell), cDC(classical dendritic cell), cDC1(classical dendritic cell 1), 및 cDC2(classical dendritic cell 2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 서브타입(subtype)으로 분화되는 것인, 수지상 세포 분화 유도 촉진 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포 분화 및 성장 유도 배양법에 관한 것으로, 본 배양법은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)을 활용하여 배양 기관의 표면 에너지를 조절함으로써 수지상 세포의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수지상 세포(Dendritic cell)는 대표적인 항원 전달 세포로, 감염이나 조직 손상의 신호를 받아들이고 외부 항원을 전달하여 T 세포의 면역 반응을 촉진할 수 있어, 선천성 면역 반응과 후천성 면역 반응 사이의 매개체로서

가능하다고 알려져 있다.

[0003] 수지상 세포-기반 백신은 항암 면역 반응 활성화를 통해 종양을 효과적으로 제거할 수 있는 차세대 항암 치료제로 주목받고 있다. 현재까지 300건 이상의 임상 시험이 수지상 세포의 항암 면역 치료제로서의 적용 가능성을 평가하기 위해 수행되었으며, 수지상 세포 기반 백신 개발을 위한 수많은 노력이 여전히 진행 중이다.

[0004] 항암 면역 치료제를 포함한 수지상 세포 관련 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는, 체외에서 수지상 세포를 효율적이고 경제적으로 분화 및 성장시킬 수 있는 배양법의 개선 및 발전이 요구된다. 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 공급함으로써, 쥐 골수로부터 수지상 세포를 분화 및 성장시킬 수 있는 배양법(Inaba, K et al, J Exp Med, 1992, 176 (6), 1693-702)이 개발된 이래로, 배양 기간, 성장 인자, 배양 기관 특성의 조절 등 다양한 방면으로 배양법을 발전하기 위한 연구들이 보고되고 있으며, 특히 수지상 세포의 여러 서브타입(subtype)으로의 분화를 특이적으로 유도하는 배양법에 대한 전 세계적인 관심이 지대하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-1290061 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 수지상 세포의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 배양 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 일반 배양 기관에 비해 소수성을 가지는 고분자를 이용하여 배양 기관의 표면 에너지를 조절하고 이에 따른 수지상 세포의 특정 서브타입(cDC1)으로의 분화 및 성장 유도를 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 배양 표면이 소수성 고분자 박막으로 코팅된, 수지상 세포 배양 플레이트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 골수 세포를 상기 수지상 세포 배양 플레이트 상에서 배양하는 단계를 포함하는 수지상 세포 유도 배양 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 수지상 세포의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 배양 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 일반 배양 기관에 비해 소수성을 가지는 고분자를 이용하여 배양 기관의 표면 에너지를 조절하고 이에 따른 수지상 세포의 특정 서브타입(cDC1)으로의 분화 및 성장 유도를 규명하였다.

[0010] 본 발명은 수지상 세포 배양 방법에 관한 것이다.

[0011] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 배양 표면이 소수성 고분자 박막으로 코팅된, 수지상 세포 배양 플레이트를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 소수성 분자는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)에 의해 배양 표면에 코팅된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명에서 "개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)"은 기화된 개시제와 단량체가 기상 반응기에 주입된 후, 에너지원에 의해 라디칼화되어 고분자 중합반응을 통해 고분자 박막을 형성하는 공정을 의미한다.

[0016] 상기 개시제는 열의 공급에 의해 분해되어 자유 라디칼을 형성하는 물질로서, 단량체를 활성화시켜 고분자 중합반응을 통해 박막을 형성할 수 있는 물질이면 특별히 한정하지 않는다. 구체적으로, 상기 개시제는 과산화물, 보다 구체적으로 TBPO(tert-butyl peroxide)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0017] 상기 단량체는 휘발성을 가지며 개시제에 의해 활성화될 수 있는 물질로서, 감압 및 승온 상태에서 기화될 수 있다.

- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 소수성 고분자는 메타크릴레이트계 화합물 단량체가 이중결합을 통해 중합된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 소수성 고분자는 메타크릴레이트계 화합물 단량체가 이중결합을 통해 중합된 것일 수 있다.
- [0021] 상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 배양 플레이트는 세포 배양용 폴리스티렌계(tissue culture polystyrene; TCPS) 배양 플레이트일 수 있고, 본래의 세포, 조직 또는 기관 등에 유의한 염증 반응, 면역원성 또는 세포 독성을 유도하지 않는 기능을 가지는 당업계에서 공지된 어떠한 물질도 사용 가능하다. 개시체를 이용한 화학 기상 증착법으로 상기 배양 플레이트에 고분자 박막을 증착 코팅할 수 있다.
- [0023] 상기 고분자 박막은 폴리 사이클로헥실 메타크릴레이트(poly Cyclohexyl methacrylate, pCHMA) 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(poly Ethylene glycol dimethacrylate, pEGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 고분자 박막의 두께는 상기 iCVD에 의한 고분자 증착 공정의 소요 시간에 따라 달라질 수 있고, 100 nm 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서, 상기 배양 표면이 소수성 고분자 박막으로 코팅된, 수지상 세포 배양 플레이트의 접촉각은 80° 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 접촉각의 범위 내에서 배양 기관은 소수성을 구현함으로써, 부착 특성에 따라 배양액 내에 부유(suspension)하는 수지상 세포의 분율을 높일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 골수 세포를 상술한 본 발명의 수지상 세포 배양 플레이트 상에서 배양하는 단계를 포함하는 수지상 세포 유도 배양 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 상기 수지상 세포는 외부항원 뿐만 아니라 체내의 손상/변형된 세포에 대한 선천면역과 적응면역을 연결하는 기능을 가진 항원 제시 세포로서, 외부항원을 인식할 뿐만 아니라 T 세포반응 조절한다. 수지상 세포가 외부항원을 탐식하고 활성화가 되어 T 세포로 항원을 제시하는 능력은 생체 면역반응 조절에 중요하며 수지상 세포의 이러한 기능 저하나 손상은 암, 자가면역질환 및 만성염증 등 여러 면역성 질환의 발생을 초래한다.
- [0029] 상기 수지상 세포는 분화 단계별로 크게 미성숙(immature) 및 성숙(mature) 수지상 세포로 나눌 수 있다. 미성숙 수지상 세포는 말초조직에서 항원을 획득하고 성숙 수지상 세포는 림프조직에서 이들 항원을 T 세포에 제시한다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 수지상 세포는 pDC(plasmacytoid dendritic cell), cDC(classical dendritic cell), cDC1(classical dendritic cell 1), 및/또는 cDC2(classical dendritic cell 2)의 서브타입(subtype)으로 분화/성숙될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명의 수지상 세포 배양 플레이트 상에서 배양된 수지상 세포는 배양 기관 바닥에 부착된 세포 및 배양액 내에 부유하는 세포로 분리될 수 있다.
- [0032] 상기 배양액은 당업계에서 세포의 배양 및/또는 분화에 사용 가능한 배양액이라면 어떠한 배양액도 포함할 수 있으며, 상기 배양액에 포함되는 성분 또는 인자의 종류 및/또는 농도는 배양되는 세포에 따라 통상의 기술자가 용이하게 조절할 수 있다.
- [0033] 상기 유도 배양 방법은 상술한 수지상 세포 배양 플레이트를 사용하므로, 수지상 세포 배양 플레이트의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 화학 기상 증착법(iCVD)을 활용하여 배양 기관의 표면 에너지를 조절함으로써 수지상 세포의 분화 및 성장을 유도할 수 있는 방법을 제공한다. 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0035] (a) 개시제를 이용한 화학 기상 증착법을 활용하여 얻어진 고분자 기반 배양 기판을 통해, 기존 방법에 비해 수지상 세포, 특히 cDC1으로의 분화 및 성장을 매우 효과적으로 향상시킬 수 있다.

[0036] (b) 기존 배양법의 경제적 단점을 해결할 수 있다는 점에서, 생체 외 수지상 세포 배양 과정에서의 범용적인 플랫폼 기술로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 배양 플레이트의 제작 과정을 나타낸다.

도 2a 내지 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명의 배양 플레이트(pCHMA-플레이트 및 pEGDMA-플레이트)의 표면 특성을 평가한 것으로, 푸리에 변환 적외선 분광(FT-IR) 스펙트럼(도 2a), 접촉각 및 표면 에너지(도 2b), 및 표면 거칠기(도 2c)를 평가한 도이다.

도 3a 내지 3e는 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명의 배양 플레이트(pCHMA-플레이트 및 pEGDMA-플레이트)의 고분자 박막의 특성을 평가한 것으로, 도 3a 및 3b는 XPS(X-ray Photoelectron Spectroscopy)를 통한 pEGDMA(도 3a) 및 pCHMA(도 3b)의 원소 분석 결과, 도 3c는 엘립소미터(Ellipsometer)를 통해 확인한 고분자 박막의 두께, 도 3d 및 3e는 GC-MS(Gas Chromatography Mass Spectrometry) 분석을 통한 고분자 박막의 세포 배양 안정성을 확인한 도이다.

도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명의 배양 플레이트(pCHMA-플레이트 및 pEGDMA-플레이트)에서 수지상 세포로 분화시킨 결과를 확인한 것으로, 도 4a는 세포 수확 전과 후의 이미지, 도 4b는 플레이트에 부착된 세포(Adherent cell)와 부유 세포(Suspension cell)의 수와 비율을 나타낸 도이다.

도 5a 내지 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명의 배양 플레이트(pCHMA-플레이트)에서 수지상 세포로 분화시킨 결과를 확인한 것으로, 유세포 분석을 통한 분화된 세포의 서브타입(subtype) Number(도 5a), 서브타입 비율(도 5b), gating 결과(도 5c)를 나타낸 도이다.

도 6a 내지 6e는 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명의 배양 플레이트(pCHMA-플레이트)에서 분화된 수지상 세포로부터 분리된 cDC1(classical dendritic cell 1)의 특성을 확인한 것으로, 도 6a는 LPS 또는 poly(I:C) 처리 시 CD80 및 CD86 단백질의 발현, 도 6b는 LPS 처리 시 분비되는 IL-12의 농도, 도 6c 내지 6e는 유세포 분석을 통한 OVA-A647 흡수 능력(도 6c), DQ-OVA 표지 능력(도 6d), 및 OT-1 CD8+ T 세포 활성화 능력(도 6e)을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0040] **제조예. 수지상 세포 배양용 고분자-기반 플레이트 제조**

[0041] 1. pCHMA-플레이트 제조

[0042] 단량체인 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA)(98.0%, TCI)를 55 ℃로 가열하여 기화시켰다. 기화된 단량체 및 개시제인 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide)(98%, Aldrich)를 iCVD 챔버(Daeki Hi-Tech Co. Ltd.)에 도입하였다. 배양 기판 TCPS(tissue culture polystyrene)을 iCVD 반응기에 넣고, 기판 온도는 28 ℃, 필라멘트 온도는 130 ℃로 유지하였다. 챔버의 압력을 290 mTorr로 유지하면서 고분자 증착 공정을 진행하였다. 상기 과정을 통해, pCHMA(poly Cyclohexyl methacrylate) 고분자 박막을 배양 기판 표면에 증착 코팅하였다.

[0044] 2. pEGDMA-플레이트 제조

[0045] 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)(>97.0%, TCI)를 75 ℃로 가열하여 단량체를 기화시키고, iCVD 챔버의 압력을 220 mTorr로 유지하는 것을 제외하고, 상기 pCHMA-플레이트와 동일한 방법으로 pEGDMA(poly Ethylene glycol dimethacrylate) 고분자 박막을 배양 기판 표면에 증착 코팅하였다.

[0047] **실시예 1. 수지상 세포 배양용 고분자-기반 플레이트의 표면 특성 평가**

[0048] 상기 제조예에서 제조된 각 플레이트에 대하여, 푸리에 변환 적외선 분광(FT-IR) 스펙트럼, 접촉각 및 표면 자

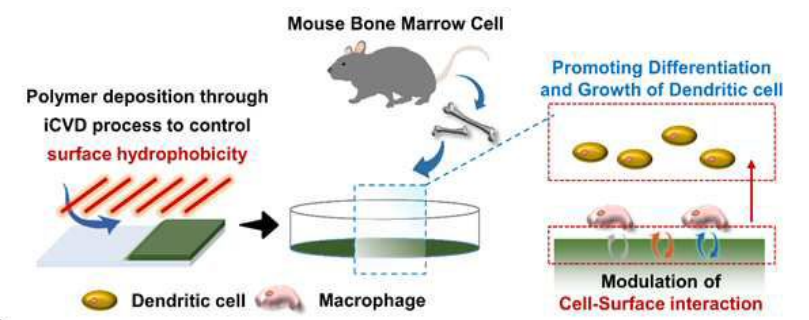
유에너지, 및 표면 거칠기를 분석하여 표면 특성을 평가하였다.

- [0049] 도 2a에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관에 pCHMA 또는 pEGDMA가 코팅될 경우 코팅 전과 대비하여 유사한 FT-IR 값을 갖는 것으로 나타나 화학 기상 증착 후에도 CHMA 또는 EGDMA의 화학적 특징의 유지되는 것을 알 수 있었다.
- [0050] 또한, 도 2b에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관에 pCHMA 또는 pEGDMA가 코팅될 경우 물과의 접촉각이 증가하고 자유에너지가 감소하는 것으로 나타나 pCHMA pEGDMA가 코팅될 경우 코팅되지 아니한 TCPS과 대비하여 소수성 특성을 보이는 것을 알 수 있었다.
- [0051] 끝으로, 도 2c에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관에 pCHMA 또는 pEGDMA가 코팅될 경우 표면 거칠기가 유사함을 알 수 있었다.
- [0053] **실시예 2. 수지상 세포 배양용 고분자-기반 플레이트의 고분자 박막 특성 평가**
- [0054] 상기 제조예에서 제조된 각 플레이트에 대하여, 구성 원소, 두께 및 안정성을 분석하여 고분자 박막의 특성을 평가하였다.
- [0055] 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, 이중결합을 통해 pCHMA 또는 pEGDMA 고분자 중합 반응이 일어났음을 알 수 있었다. 또한, 도 3c에서 확인할 수 있듯이, 약 200 nm 두께의 pCHMA 또는 pEGDMA 고분자 박막이 형성되었음을 알 수 있었다. 도 3d 및 3e에서 확인할 수 있듯이, pCHMA 또는 pEGDMA의 고분자로 증착된 형태에서는 다시 액상의 단량체가 거의 분출되지 않는 것을 알 수 있었다.
- [0057] **실시예 3. 수지상 세포의 배양(분화) 및 확인**
- [0058] 세포 배양
- [0059] 8주령 쥐(C57BL/6, 암컷, DBL)에서 태퇴골과 경골을 추출한 뒤, 70% 에탄올로 멸균하고 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum)(Welgene, Korea), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco, USA), 10mM HEPES(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonicacid) 및 50 μ m b-머캅토에탄올(b-mercaptoethanol)을 포함한 배지에 담가 두었다. 배지를 이용하여 3번의 세척 과정을 거친 뒤, 주사기를 통해 골수를 분리하였다. 분리된 골수에 ACK(ammonium-chloride-potassium) 용해 버퍼를 5분 동안 얼음에서 처리하여 적혈구를 제거하였다. ACK 용해 버퍼를 씻어 낸 후, 100 ng/ml의 flt3l이 첨가된 완전 성장 배지와 함께 상기 제조예에서 제조된 각 pCHMA-플레이트 및 pEGDMA-플레이트에 1.0×10^6 cells/ml의 농도로 뿌려주었다. 배양 과정 동안 2일 마다 70%의 배지를 새로운 완전 성장 배지로 교체해 주었으며, 10일차까지 배양하였다.
- [0061] 수지상 세포로의 분화 확인
- [0062] [pCHMA-플레이트 및 pEGDMA-플레이트]
- [0063] 배양(분화)된 세포에 대하여, 세포 수확 전과 후의 이미지를 촬영하고, 배양 기관에의 부착 상태에 따라, 부착된 세포(Adherent cells) 및 부유 세포(Suspension cells)로 분류하여 분화된 세포 수확 전 후의 세포 형태(Morphology)를 통하여 그 비율을 확인하였다.
- [0064] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, 분화된 세포 수확 후(After harvest), TCPS 배양 기관에서는 부착 세포가 많이 존재하였으나 pCHMA 및 pEGDMA가 코팅된 기관에서는 부착된 세포의 수가 줄어드는 것을 알 수 있었다. 특히, 고분자 표면의 소수성이 증가할수록(pEGDMA→pCHMA) 부착된 세포의 수가 더 줄어들었다. 또한, 도 4b에서 확인할 수 있듯이, pCHMA가 코팅된 기관에서 배양된 세포의 부유 세포 비율이 매우 증가된 것을 알 수 있었다.
- [0066] [pCHMA-플레이트]
- [0067] 상기 결과에 기초하여, pCHMA가 코팅된 기관에서 배양(분화)된 세포에 대하여, 추가적으로 유세포 분석을 통한 서브타입(subtype) Number(= 서브타입 비율 x 전체 세포수), 비율, gating 결과를 확인하였다.
- [0068] 그 결과, 도 5a에서 확인할 수 있듯이, pCHMA가 코팅된 기관에서 배양된 세포가 DC, 특히 cDC1(classical dendritic cell 1)으로의 분화 유도 비율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한, 도 5b에서 확인할 수 있듯이, pCHMA가 코팅된 기관에서 수지상 세포의 2가지 서브타입(pDC or cDC) 중 특히 cDC로의 분화를 더 촉진하였다. 나아가, 도 5c에서 확인할 수 있듯이, cDC 중에서도 서브타입(cDC1 or cDC2) cDC1으로의 분화 유도 비율이 더 증가하는 것을 알 수 있었다.

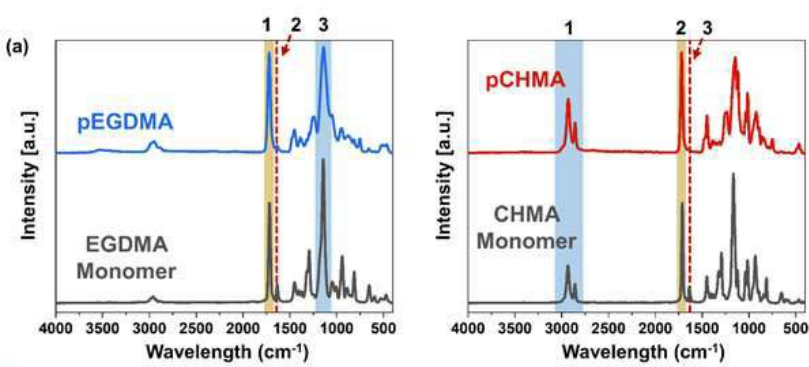
- [0069] 따라서, 본 발명의 고분자 박막이 코팅된 배양 기관에서 배양할 경우 특히 cDC1으로의 분화 유도가 가능함을 알 수 있다.
- [0071] **실시예 4. cDC1(classical dendritic cell 1)의 분리 및 확인**
- [0072] cDC1 분리
- [0073] 상기 실시예 3에서 배양한 세포에서 부유세포만을 수확한 뒤, 형광활성화 세포선택장치(Fluorescence-activated cell sorter)를 통해 cDC1(classical dendritic cell 1)을 분리하고, 하기와 같이 세포 성숙도, 항원 흡수 능력, 항원 표지 능력, T 세포 활성화 능력을 평가하였다.
- [0075] cDC1의 기능 확인
- [0076] 1) 세포 성숙도
- [0077] 분리된 cDC1에 LPS 및 poly(I:C)를 처리하여 유세포 분석을 통해 CD80, CD86의 발현량을 확인하고, LPS 처리하여 효소 결합 면역 흡착 검사를 통해 IL-12의 분비량을 확인하여 평가하였다.
- [0078] 구체적으로, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 200 μL 또는 25 $\mu\text{g/mL}$ poly(I:C) 200 μL 를 각각 96-웰 배양 플레이트의 세포 배양 미디어(10 % FBS, 10 mM HEPES, 1 % 페니실린/스트렙토마이신 및 50 μM b- 머캅토에탄올이 보충된 RPMI 1640)에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 24시간 동안 처리하였다.
- [0079] 그 결과, 도 6a 및 6b에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관 및 이에 pCHMA가 코팅된 기관에서 배양된 세포 사이에 CD80, CD86, IL-12의 발현량의 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서, 본 발명의 고분자 박막이 코팅된 경우에도 정상적으로 공동자극 분자(co-stimulatory molecule)를 발현하고 사이토카인을 분비할 수 있음을 알 수 있다.
- [0081] 2) 항원 흡수 및 표지 능력
- [0082] 분리된 cDC1에 DQTM-OVA(10 $\mu\text{g/mL}$)(Invitrogen)을 37 $^{\circ}\text{C}$, 24시간 동안 처리하였다. 유세포 분석을 통해 평가하였다.
- [0083] 그 결과, 도 6c 및 6d에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관 및 이에 pCHMA가 코팅된 기관에서 배양된 세포 사이에 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서, 본 발명의 고분자 박막이 코팅된 경우에도 정상적으로 항원을 흡수하고 항원 제시 세포로서의 역할을 수행할 수 있음을 알 수 있다.
- [0085] 3) T 세포 활성화 능력
- [0086] 분리된 cDC1에 대하여, OT-1 CD8+ T 세포와의 공배양을 진행하여 평가하였다.
- [0087] 구체적으로, Macs 방법을 통해 분리한 cDC1 세포(5×10^3 in 96-웰 플레이트)를 SIINFEKL 펩타이드(OVA257-264)(1 $\mu\text{g/mL}$)에 6시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, OT-1 CD8+ T 세포(1×10^4)를 SIINFEKL-loaded cDC1 세포와 3일 동안 세포 배양 미디어(10 % FBS, 10 mM HEPES, 1 % 페니실린/스트렙토마이신 및 50 μM b- 머캅토에탄올이 보충된 RPMI 1640)에서 공배양하였다. CD8+ T 세포의 생존력은 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(Roche) 염색 후, BD LSR flow cytometer를 통해서 분석을 진행하였다.
- [0088] 도 6e에서 확인할 수 있듯이, TCPS 배양 기관 및 이에 pCHMA가 코팅된 기관에서 배양된 세포 사이에 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서, 본 발명의 고분자 박막이 코팅된 경우에도 정상적으로 T 세포 활성화가 가능함을 알 수 있다.

도면

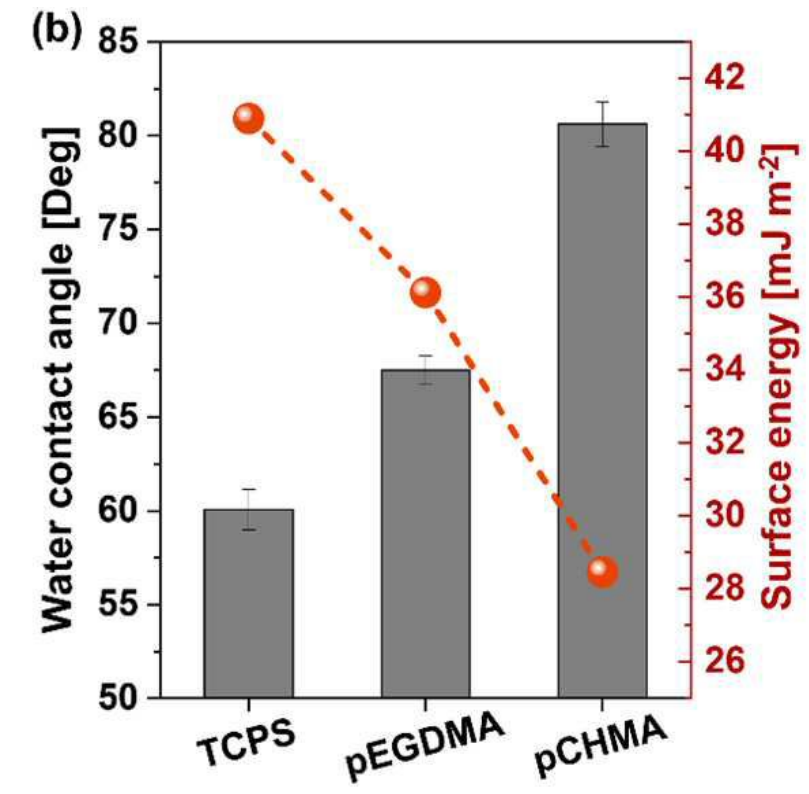
도면1



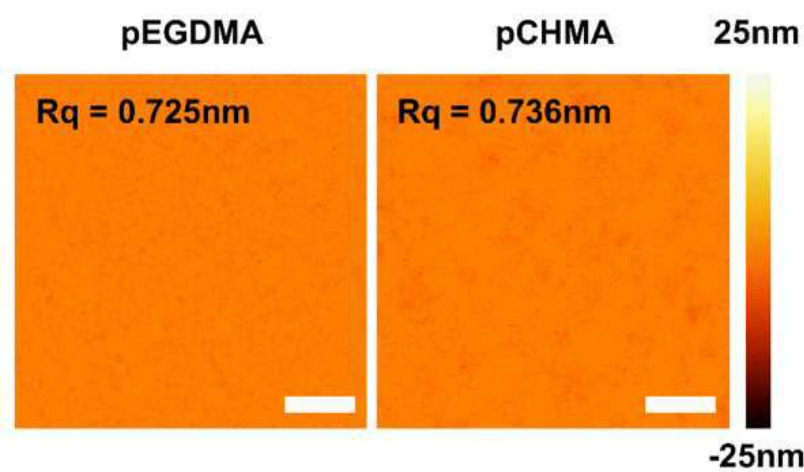
도면2a



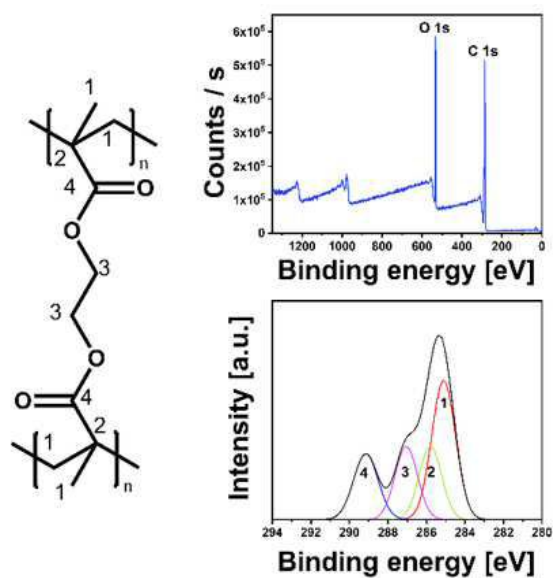
도면2b



도면2c



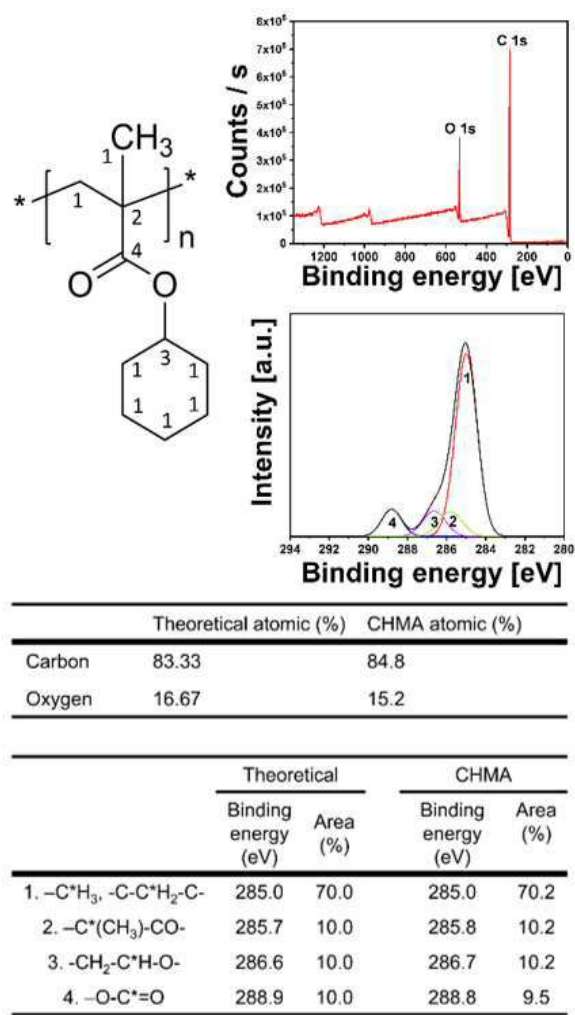
도면3a



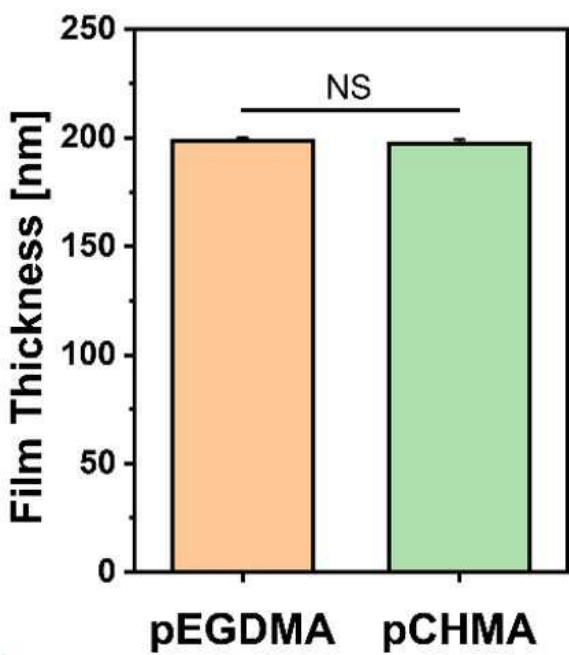
	Theoretical atomic (%)	EGDMA atomic (%)
Carbon	71.43	74.6
Oxygen	28.57	25.4

	Theoretical		EGDMA	
	Binding energy (eV)	Area (%)	Binding energy (eV)	Area (%)
1. $-\text{C}^*\text{H}_3, -\text{C}-\text{C}^*\text{H}_2-\text{C}-$	285.0	40.0	285.1	40.3
2. $-\text{C}^*(\text{CH}_3)-\text{CO}-$	285.7	20.0	285.8	20.0
3. $-\text{CH}_2-\text{C}^*\text{H}-\text{O}-$	286.6	20.0	287.0	20.0
4. $-\text{O}-\text{C}^*=\text{O}$	288.9	20.0	289.1	19.6

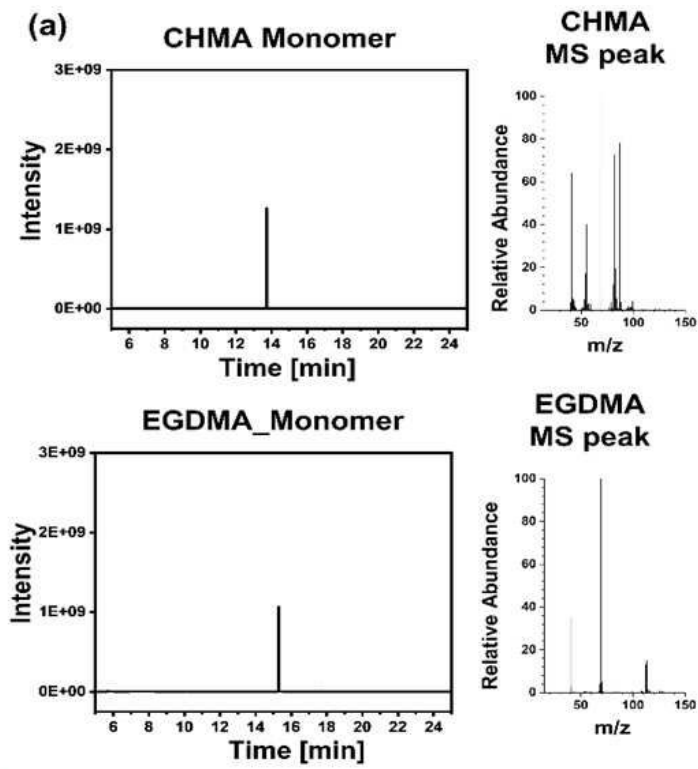
도면3b



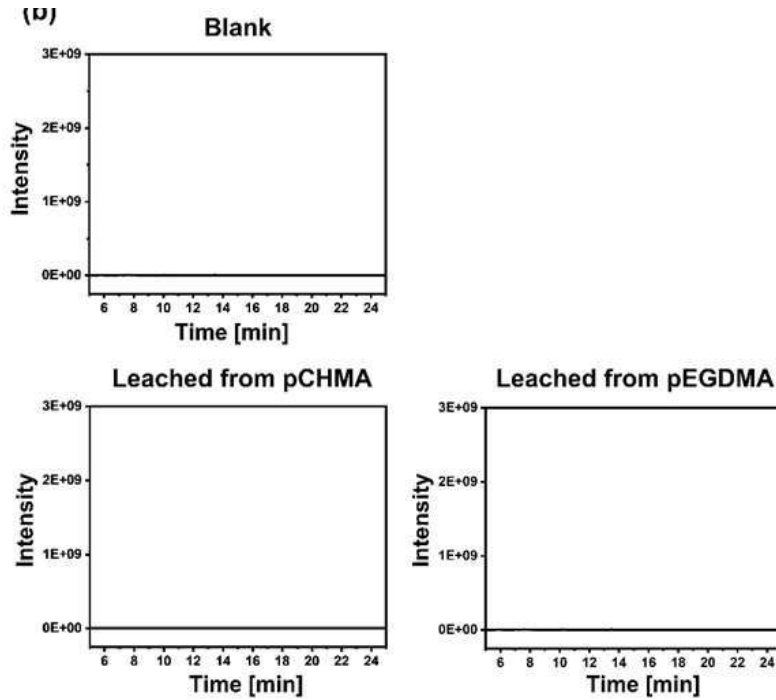
도면3c



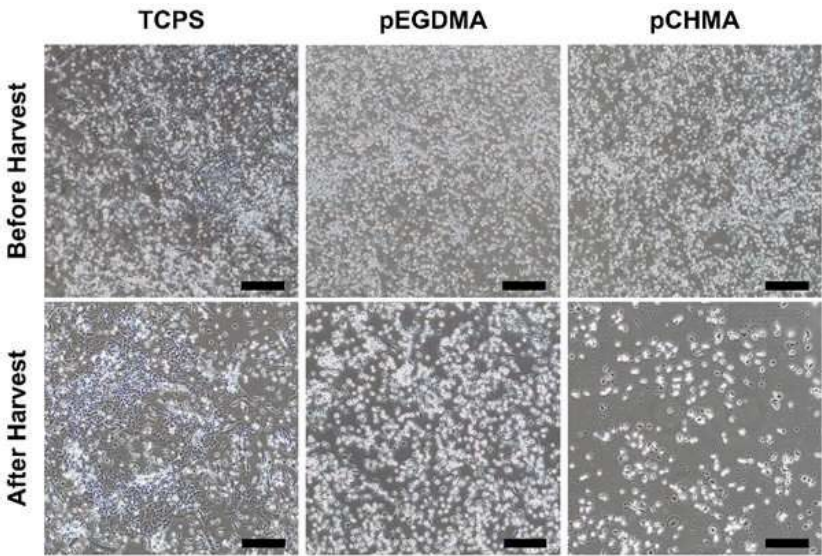
도면3d



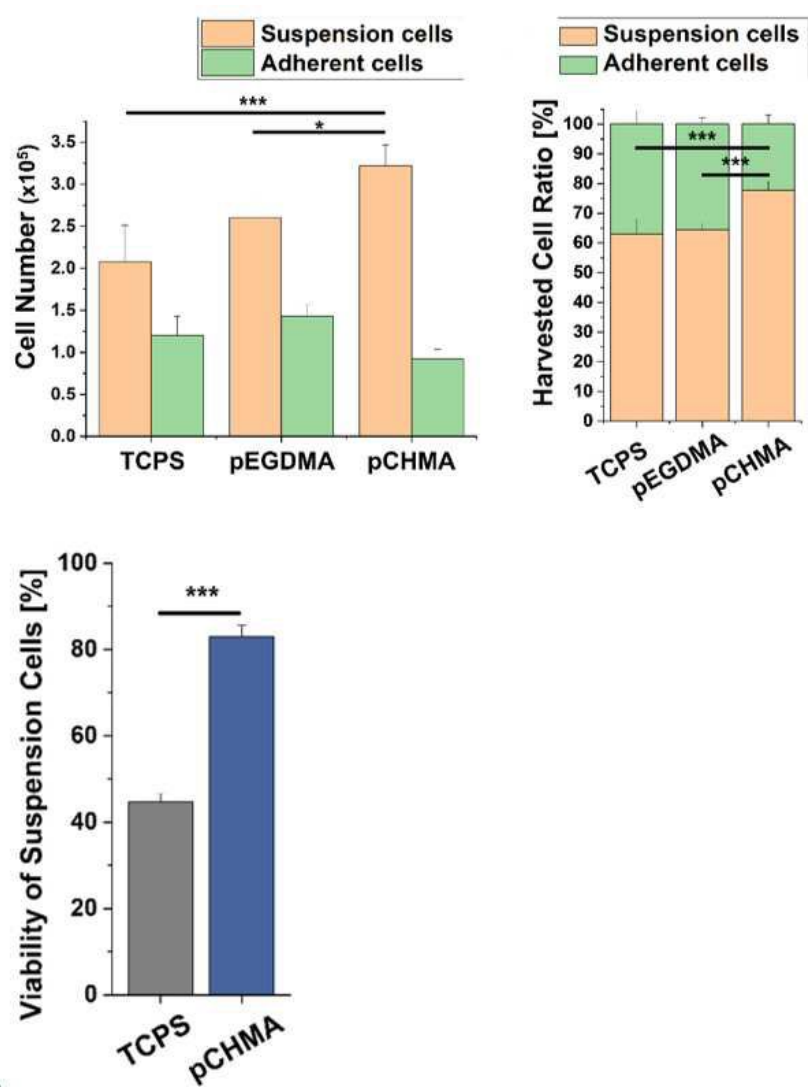
도면3e



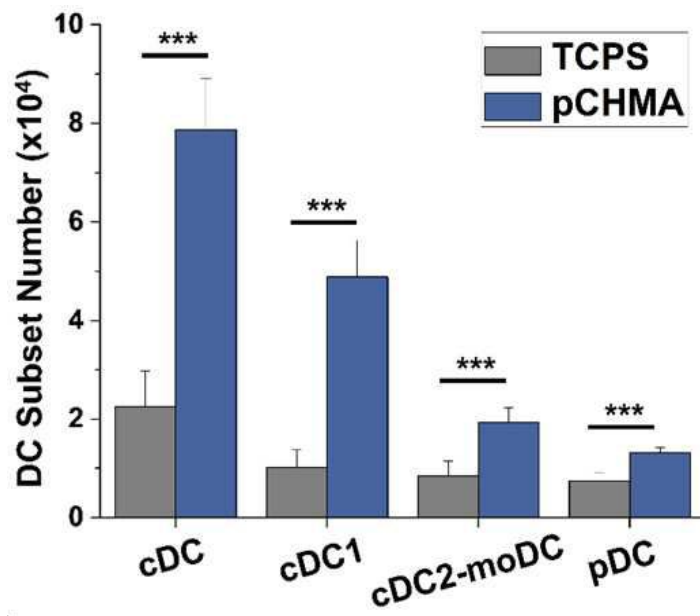
도면4a



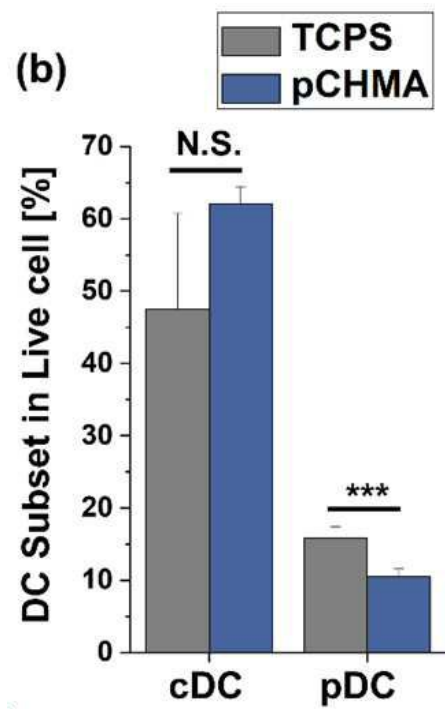
도면4b



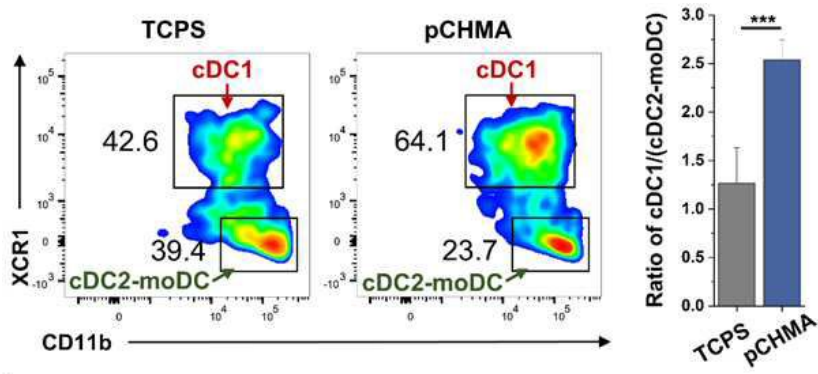
도면5a



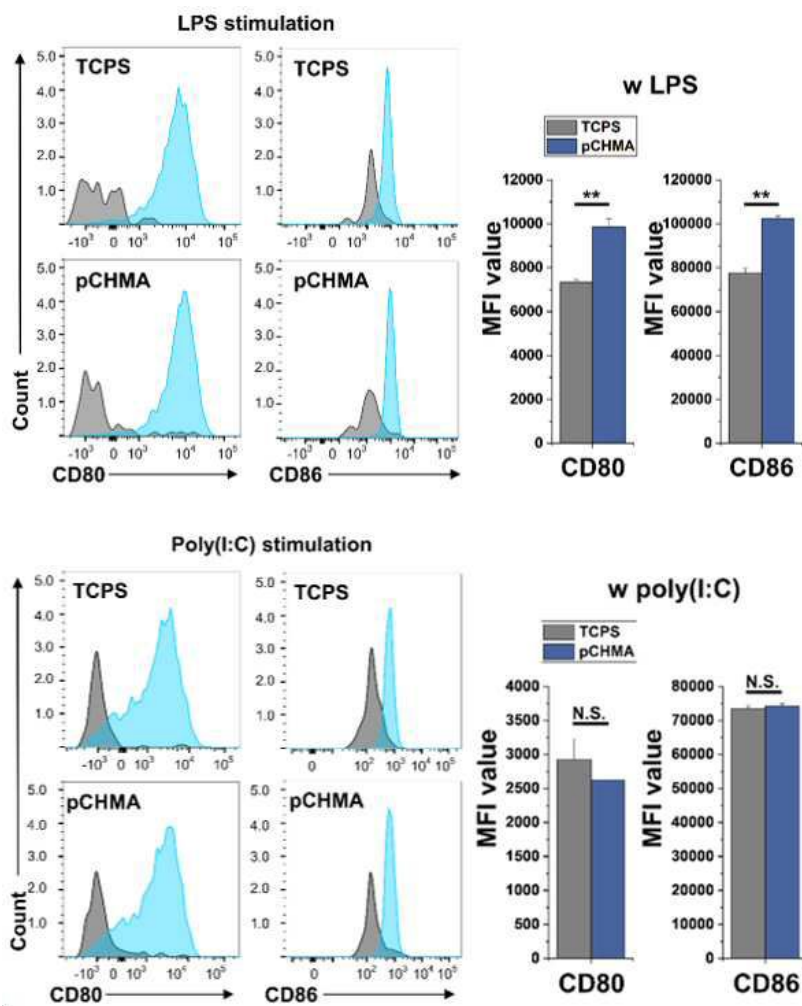
도면5b



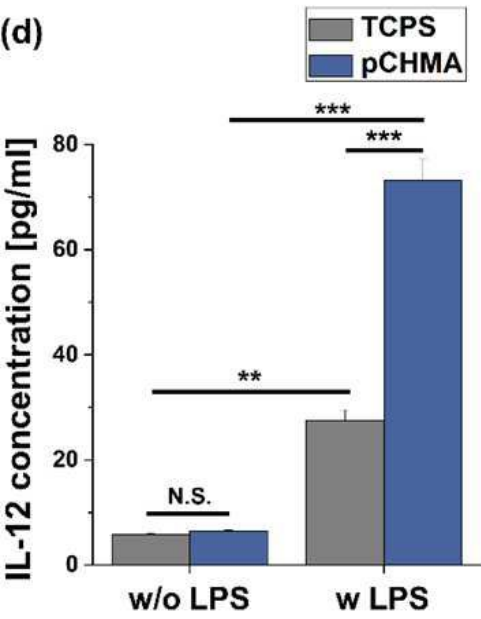
도면5c



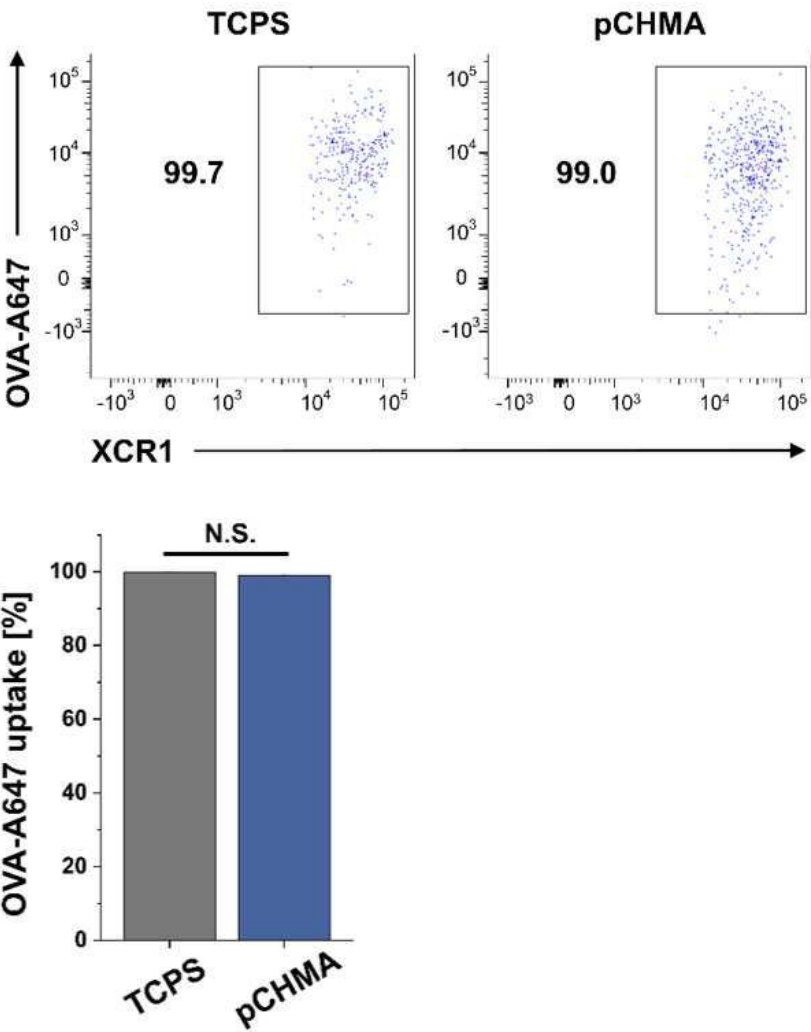
도면6a



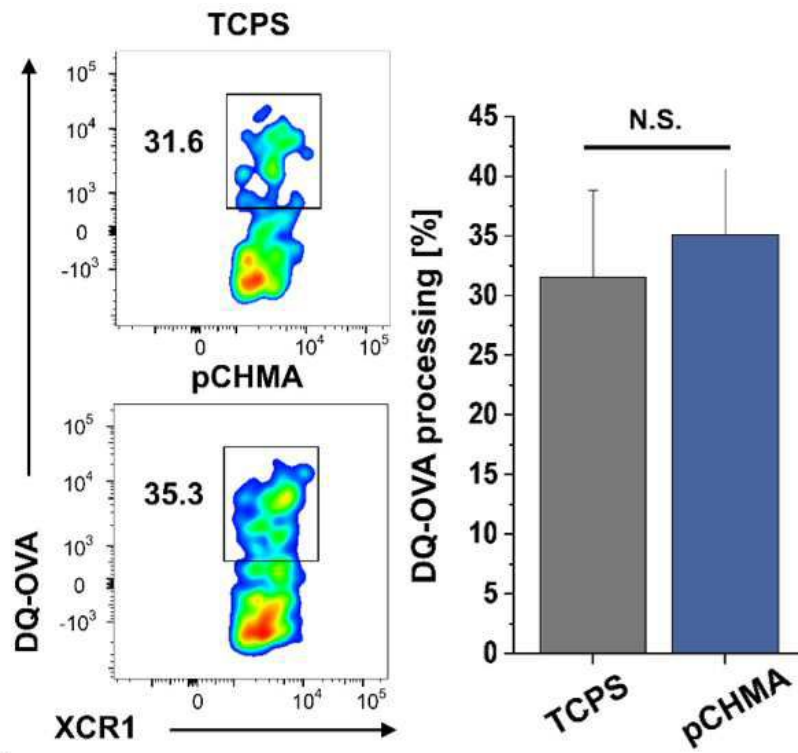
도면6b



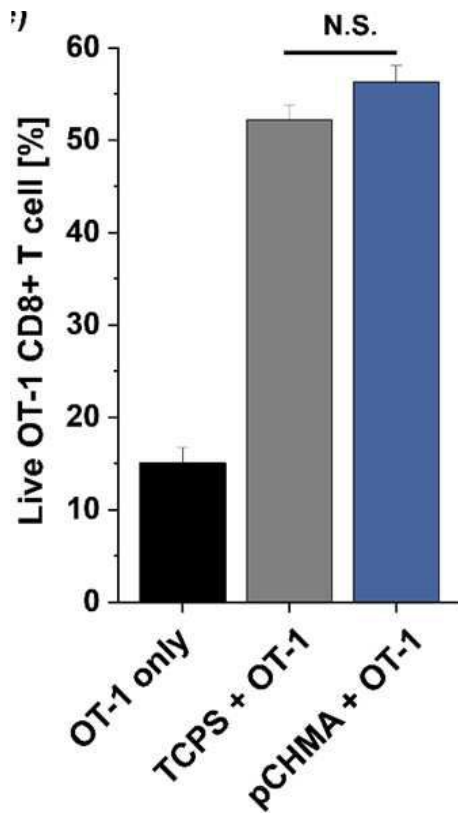
도면6c



도면6d



도면6e



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0019

【변경전】

상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

【변경후】

상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

【직권보정 2】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0021

【변경전】

상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【변경후】

상기 메타크릴레이트계 화합물은 사이클로헥실 메타크릴레이트(Cyclohexyl methacrylate, CHMA) 및/또는 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【직권보정 3】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0023

【변경전】

상기 고분자 박막은 폴리 사이클로헥실 메타크릴레이트(poly Cyclohexyl methacrylate, pCHMA) 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(poly Ethylene glycol dimethacrylate, pEGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【변경후】

상기 고분자 박막은 폴리 사이클로헥실 메타크릴레이트(poly Cyclohexyl methacrylate, pCHMA) 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(poly Ethylene glycol dimethacrylate, pEGDMA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【직권보정 4】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0045

【변경전】

에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)(>97.0%, TCI)를 75 ℃로 가열하여 단량체를 기화시키고, iCVD 챔버의 압력을 220 mTorr로 유지하는 것을 제외하고, 상기 pCHMA-플레이트와 동일한 방법으로 pEGDMA(poly Ethylene glycol dimethacrylate) 고분자 박막을 배양 기판 표면에 증착 코팅하였다.

【변경후】

에틸렌 글리콜 다이메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)(>97.0%, TCI)를 75 ℃로 가열하여 단량체를 기화시키고, iCVD 챔버의 압력을 220 mTorr로 유지하는 것을 제외하고, 상기 pCHMA-플레이트와 동일한 방법으로 pEGDMA(poly Ethylene glycol dimethacrylate) 고분자 박막을 배양 기판 표면에 증착 코팅하였다.