

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 10월 3일 (03.10.2024)

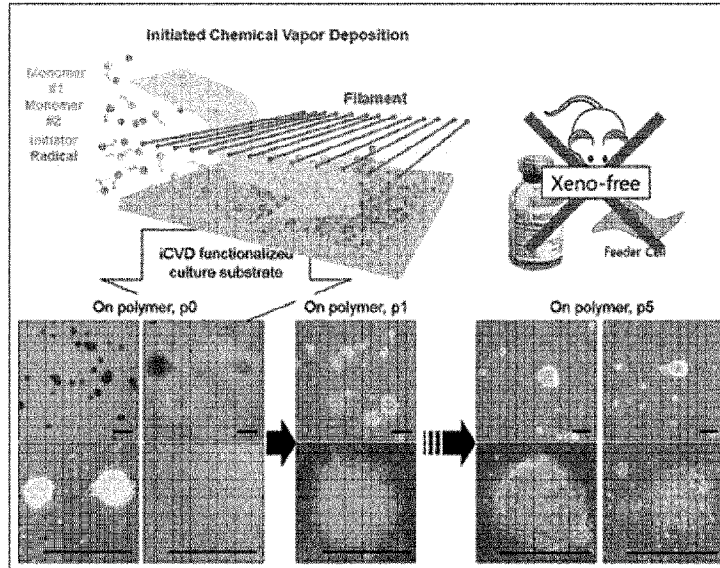


(10) 국제공개번호
WO 2024/205202 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/00* (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/003789
- (22) 국제출원일: 2024년 3월 26일 (26.03.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0039856 2023년 3월 27일 (27.03.2023) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 임성갑 (IM, Sung Gap); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 손미영 (SON, Mi-Young); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정원지 (JEONG, Wonji); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 조영학 (CHO, Young-hak); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 박성현 (PARK, Seong Hyeon); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 정광보 (JUNG, Kwang Bo); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권오만 (KWON, Ohman); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: METHOD FOR XENO-FREE CULTIVATION OF STEM CELLS USING BIOCOMPATIBLE FUNCTIONAL THIN FILM

(54) 발명의 명칭: 생체적합성 기능성 박막을 이용한 줄기세포의 무이종 배양방법



(57) Abstract: The present invention relates to a cell culture substrate and a method for culturing stem cells using same, wherein the cell culture substrate has a polymer thin film deposited thereon for stem cell cultivation, which can replace animal-derived materials that are essential in pluripotent stem cell culture. According to the present invention, human pluripotent stem cells, which are conventionally cultured using animal-derived feeder cells or Matrigel, can also be cultured on a cell culture vessel that is coated with a polymer thin film and excludes animal-derived materials, whereby safer stem cell therapeutics can be produced.

(57) 요약서: 본 발명은 만능 줄기세포 배양에서 필수적으로 사용되는 동물 유래 물질을 대체할 수 있는 줄기세포 배양을 위한 고분자 박막이 증착된 세포배양기판 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 종래 동물유래의 피더세포나 매트리지엘을 이용하여 배양하는 인간 전분화능 줄기세포를 동물유래 물질이 배제된 고분자 박막이 증착된 세포배양 용기에서도 부착배양이 가능하여, 보다 안전한 줄기세포치료제를 제조할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2024/205202 A1

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 생체적합성 기능성 박막 을 이용한 줄기세포의 무이종 배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 생체적합성 기능성 박막을 이용한 줄기세포의 무이종 배양방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 전분화능 줄기세포 배양에서 필수적으로 사용되는 동물유래의 매트릭젤과 생체외기질(ECM)을 대체할 수 있는 생체적합성 고분자 박막이 증착된 세포 배양 기판을 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 줄기세포는 자가 재생 능력과 성체 세포로의 분화 가능성으로 인해 환자 맞춤형 치료를 가능하게 하는 세포치료제로서 각광 받고 있다. 특히, 배아줄기세포 (Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)와 같은 인간 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell, PSC)는 모든 성체 세포로의 분화 가능성 및 환자 유래 세포 가능성으로 인해 줄기 세포 치료제 개발에 널리 이용되고 있다(Curr Stem Cell Rep 2:299-303, 2016; Nature, 557:335-342, 2018).
- [4] 세포 치료제로서 전분화능 줄기세포의 활용을 위해서는, 체외에서 세포 배양에 있어 대량생산이 가능한 배양시스템이 필요하다(Biotechnology and Bioengineering, 102:1636-1644, 2009). 전통적으로 전분화능 줄기세포는 세포 외 기질 단백질(Extracellular matrix, ECM)과 사이토카인 등의 미세 환경을 제공받을 수 있는 쥐 배아 섬유아세포(mouse embryonic feeder cell, MEF)를 피더층으로 배양한 후 공배양하는 방식으로 배양되어 왔다(Science, 282:1145-1147, 1998). 그 이후에는 마우스 Sarcoma에서 추출한 ECM 단백질과 성장인자를 제공하는 매트릭젤(Matrigel) 물질이 개발되었고, 세포 배양액의 개발과 함께 MEF 피더층을 배제한 배양 조건을 확립하였다.(Nature medicine, 11: 228-232, 2005).
- [5] 현재 줄기세포 배양기술은 세포 부착과 양분공급을 위해 매트릭젤과 같은 동물 유래 세포외 기질 코팅 및 생쥐 유래의 피더세포가 일반적으로 사용되고 있으나, 이들의 화학적 조성이 명확히 알려져 있지 않고, 임상 적용 시 면역원 및 병원체의 위협으로 인해 그 한계가 명확하며, 임상으로의 적용이 제한된다. 따라서 인간 전분화능 줄기세포가 안전하고 효과적으로 임상에 적용되기 위해서는, 배양 시에 동물유래물질의 배제가 반드시 필요하다.
- [6] 인간 전분화능 줄기세포는 세포치료제 개발 연구분야에서 원천 재료로써 중요성이 대두되고 있으며 이에 따라 임상등급의 인간 전분화능 줄기세포의 무이종 배양 기술 개발이 중요하게 대두되고 있다 (Curr Stem Cell Rep 2016, 2, 299-303, Nature 2018, 557, 335-342).

- [7] 현재까지 널리 활용되는 인간 전분화능 줄기세포의 전통적 배양 기술로는 매트릭셀 (Matrigel)과 같은 생체 외 기질 (extracellular matrix)을 활용하여 줄기세포의 성장과 분화를 조절하고 지지하는 역할의 미세환경을 조성하는 방법이다 ((Science 1998, 282 1145-1147).
- [8] 하지만, 현재 주로 활용되는 매트릭셀과 같은 대부분의 생체 외 기질들은 이를 다량 생산하는 특성을 보유한 암 세포를 활용하여 생산하는 과정 때문에 생산되는 생체 외 기질에 동물 유래 성분이 포함되어 결과적으로 인간 전분화능 줄기세포의 무이종 배양이 불가능한 원인으로 작용한다.
- [9] 제품화된 암 세포 유래 생체 외 기질은 세포를 원천 소재로 활용함으로써 배치 (batch)간 물리 화학적 조성을 일정하게 조절하는 것이 불가능하기 때문에 배치간 큰 상이성을 야기하고 세포의 품질 유지에도 영향을 미칠 것으로 우려되고 있다.
- [10] 특히 암 세포를 활용한 기존의 세포 외 기질을 활용할 경우 이종간 감염 (xenogenic infection)의 위험성이 있어 세포치료제 개발 활용에는 제한이 있는 큰 한계점이 존재한다.
- [11] 매트릭셀의 다양한 기능을 대체할 수 있는 새로운 ECM 혹은 합성 생체재료들이 개발되고 있으나 줄기세포 배양 시 낮은 부착율, 낮은 성장속도 등 한계점이 명확히 드러나 새로운 대체제 개발이 요구되고 있다. 따라서 물리적 화학적 조성이 명확하고 배치 간 상이성 없이 일정한 조성과 기능을 유지하고, 이종간 감염으로부터 완전히 무결한 새로운 배양 근간 시스템을 개발할 필요가 있다.
- [12] 이에, 본 발명자들은 개시제를 이용한 기상 고분자 증착방법을 채택하여 인간 배아 줄기세포와 인간 iPSC를 동물유래물질이 배제된 배양환경에서 배양하기 위한 고분자 플랫폼을 개발하고자 하였으며, 이를 위해, 아민과 반응성을 가지는 단량체와 카복시산을 가지는 단량체의 공중합체를 합성한 후, 고분자 박막 표면에 아민 그룹을 포함하는 물질을 반응시켜 세포의 초기 부착력을 강화시킨 고분자 공중합체 박막을 제조하였으며, 이를 이용하여 인간 전분화능 줄기세포를 배양하는 경우, 동물 유래 물질 없이 인간 전분화능 줄기세포의 안정적인 부착을 유도할 수 있었고, 또한 분화되지 않고 성장이 잘 되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [13]
- [14] **발명의 요약**
- [15] 본 발명의 목적은 만능 줄기세포 배양에서 필수적으로 사용되는 세포외 기질이 없는 조건에서 인간 전분화능 줄기세포세포를 배양할 수 있도록 기상 증착 방식을 이용한 고분자 박막의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 고분자 박막을 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판을 제공하는데 있다.

- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 세포 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 제공하는데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 전분 화능 줄기세포를 처리하여 배양하는 단계;를 포함하는 전분화능 줄기세포 배양 방법을 제공하는데 있다.
- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 고분자 박막의 제조방법을 제공한다:
- [21] (a) 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아민 그룹과 반응 가능한 제 1 단량체와 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군으로부터 선택되는 제 2 단량체를 화학기상증착법(initiated chemical vapor deposition, iCVD)으로 공중합하여, 공중합체 박막을 제조하는 단계; 및
- [22] (b) 상기 공중합체 박막에 아민 그룹을 가지는 물질을 반응시켜 개질시키는 단계.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 고분자 박막을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막을 제공한다:
- [25] [화학식 1]
- [26] $[Y]_n-[X-Z]_m$
- [27] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [28] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [29] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [30] 상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;
- [31] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 함.
- [32] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판을 제공한다.
- [33] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 세포 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 제공한다.

[34] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 전분화능 줄기세포를 처리하여 배양하는 단계;를 포함하는 전분화능 줄기세포 배양 방법을 제공한다.

[35]

도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 개시제를 이용한 화학 기상 증착 공정에 의해 제작된 공중합체 고분자 박막제작 방법 및 이를 이용한 전분화능 줄기세포 배양 방법을 나타내는 도면이다.

[37] 도 2는 본 발명에 따라 합성된 고분자 박막의 화학적 성분을 FT-IR과 XPS 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[38] 도 3은 본 발명에 따라 제조된 고분자 공중합체 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA)에서 단량체인 GMA(glycidyl methacrylat)와 CaEAe(Carboxylethyl acrylate)의 분율 조절에 따른 표면 조성비를 Fourier Transform infrared (FT-IR) 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[39] 도 4는 본 발명에 따라 합성된 각 고분자의 물에 대한 접촉각(water contact angle)을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[40] 도 5는 본 발명에 따라 합성된 공중합체 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA가 증착된 세포 배양용 기판에서, 단량체인 GMA(glycidyl methacrylat)와 CaEAe(Carboxylethyl acrylate)의 분율 조절에 따른 표면 에너지의 변화를 물에 대한 접촉각(water contact angle) 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[41] 도 6은 본 발명에 따라 합성된 각 고분자가 증착된 세포 배양용 기판의 표면 및 기존에 사용되는 매트릭셀 기판에서 인간 전분화능 줄기세포가 부착하여 성장하는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[42] 도 7은 인간 배아줄기세포(hESCs)와 인간 역분화줄기세포(hiPSCs)를 고분자 박막에서 배양하고 계대배양을 진행한 후 각 passage 별 세포 콜로니 (colony)의 형태를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 스케일 바는 500 μm 이다.

[43] 도 8은 고분자 박막 상에서 배양한 hESCs 와 hiPSCs 의 전분화능 유지 여부를 확인하기 위해 인간 전분화능 줄기세포 특성 분석 중 Alkaline phosphatase 활성을 AP staining 을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[44] 도 9는 고분자 박막에서 배양한 hESCs 와 hiPSCs 에서 인간 전분화능 줄기세포의 마커 단백질인 OCT4, NANOG, Tra-1-81, Tra-1-60, SSEA3, 그리고 SSEA4 의 발현을 면역형광염색 (immunocytochemistry, ICC) 을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[45] 도 10은 간 전분화능 줄기세포의 마커 유전자 발현 패턴을 고분자 박막에서 배양한 hESCs 와 hiPSCs 에서 분석한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 전분화능 마커 유전자인 OCT4와 NANOG의 발현을 대조군 (1% 매트릭셀에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포) 대비 비교 분석한 결과를 나타낸 것이고, (B)는 초기 내배엽

(SOX9), 중배엽 (ISL1), 그리고 외배엽 (OLIG2) 분화 마커 유전자의 발현을 대조군 대비 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[46] 도 11은 고분자 박막에서 배양한 hESCs와 hiPSCs의 핵형을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[47] 도 12는 고분자 박막에서 배양한 hESCs와 hiPSCs의 분화 가능성을 검증하기 위해 세포를 자연분화 시킨 후 외배엽 (NESTIN, TUJ1) 중배엽 (α -SMA, DESMIN), 그리고 내배엽 (SOX17, FOXA2) 마커 단백질의 발현을 면역형광염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[48] 도 13은 본 발명에 따른 방법으로 제작된 공중합체 고분자 박막, p(GMA(Guanidine)-co-CaEA)에서 인간 전분화능 줄기세포를 무이종(xeno-free) 배양하는 방법을 나타낸 것이다.

[49] 도 14는 본 발명에 따른 고분자 박막에 대해 hESCs의 부착 성능을 아마이르기를 포함한 타 고분자와의 성능 비교를 진행한 결과를 나타낸 것이다.

[50]

[51] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[52] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[53] 본 발명에서는 개시제를 이용한 기상 고분자 증착방법을 채택하여 인간 배아줄기세포와 인간 iPSC를 동물유래물질이 배제된 배양환경에서 배양하기 위한 고분자 플랫폼을 개발하였으며, 세포의 초기 부착력을 높이기 위해 세포 부착에 적합한 접착각을 가지면서도 분화가 일어나지 않고 안정적으로 배양이 가능한 조성을 가지는 고분자를 개발하고자 하였다. 이를 위해, 아민과 반응성을 가지는 단량체와 카복시산을 가지는 단량체의 공중체를 합성한 후, 고분자 박막 표면에 아민 그룹을 포함하는 물질을 반응시켜 세포의 초기 부착력을 강화시켰다. 기상 고분자 증착법은 세포에 유해한 용매를 사용하지 않으므로 잔류 용매에 대한 위험을 배제할 수 있고 다양한 배양용기에 매우 균일한 고분자 박막의 증착이 가능하여 재현성 높은 배양 시스템을 구축할 수 있다. 개발된 고분자 박막은 화학적 조성이 명확하고 pathogen등의 감염우려가 없어 기존에 사용했던 기질외물질(ECM)이 가지는 단점을 보완하여 인간 전분화능 줄기세포를 무이종 배양할 수 있음을 확인하였다.

[54] 본 발명의 일 양태에서는 세포 배양용 기판에 아민 그룹과 반응 가능한 제 1 단량체인 글리실 메타크릴레이트(GMA)와 카복시산을 포함하는 제 2 단량체인 카르복시에틸 아크릴레이트(CaEA)를 화학기상증착법(iCVD)으로 라디칼 중합시켜 수득한 공중합체를 구아니딘(guanidine)으로 개질하여, p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자 박막이 코팅된 세포 배양 기판을 수득하고, 상기 수득된 기판 상에

전분화능 줄기세포를 배양하는 경우, 세포 부착이 원활이 진행되어 계대를 거듭하여도 전분화능 줄기세포 성공적으로 부착배양 할 수 있다는 것을 확인하여, 매트릭셀이나 ECM 등의 동물 유래 물질을 사용하지 않고, 전분화능 줄기세포를 무이종(xeno-free) 배양할 수 있다는 것을 확인하였다(도 13 참조).

[55] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 다음 단계를 포함하는 고분자 박막의 제조방법에 관한 것이다:

[56] (a) 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아민 그룹과 반응 가능한 제 1 단량체와 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군으로부터 선택되는 제 2 단량체를 화학기상증착법(initiated chemical vapor deposition, iCVD)으로 공중합하여, 공중합체 박막을 제조하는 단계; 및

[57] (b) 상기 공중합체 박막에 아민 그룹을 가지는 물질을 반응시켜 개질시키는 단계.

[58] 본 발명의 상기 (a) 단계는 화학기상 증착기 챔버에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[59] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 개시제를 첨가하여 수행되는 것이 바람직하며, 본 발명에서 사용할 수 있는 개시제는 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide, TBPO), 펄플루오로부테인설포닐 플루오라이드(perfluorobutanesulfonyl fluoride, PFBSF), 펄프루오로옥테인설포닐 플루오라이드 (Perfluorooctanesulfonyl fluoride, PFOSF), tert-아밀 퍼옥사이드 (tert-amyl peroxide, TAPO), tert-부틸 퍼옥시벤조에이트 (Tert-butyl-peroxidbenzonate, TBPOB) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide, TBPO)를 사용할 수 있다.

[60] 본 발명의 방법에서, 상기 아민 그룹을 가지는 물질은 구아니딘(guanidine), 다이시안다이아마이드 (Dicyandiamide), 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine) 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[61] 본 발명의 일 양태에서는 상기 제 1 단량체는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)를 사용하고 제 2 단량체로 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA)사용하고, 상기 아민 그룹을 가지는 물질로 개질된 공중합체가 증착된 박막을 제조하였다.

[62] 상기 아민 그룹을 가지는 물질은 구아니딘, 다이시안다이아마이드 또는 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

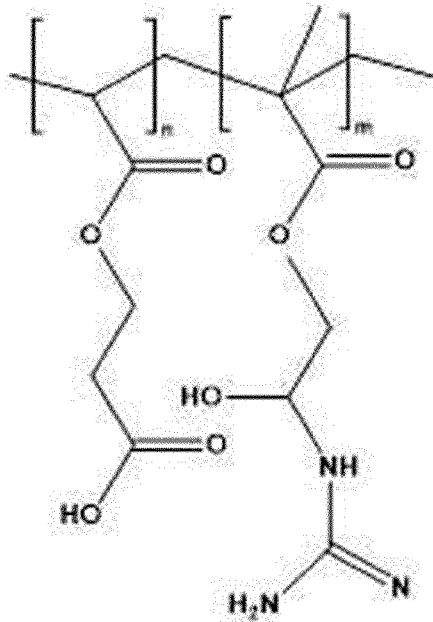
[63] [화학식 2]~[화학식 4]에는 상기 방법으로 제조된 고분자 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA), p(GMA(Dicyandiamide)-co-CaEA) 및 p(GMA(1,1,3,3-Tetramethylgua

nidine)-co-CaEA)의 화학식을 나타내었으며, [화학식 5]에는 화학식 2의 고분자를 제조하는 반응식을 나타내었다.

[64]

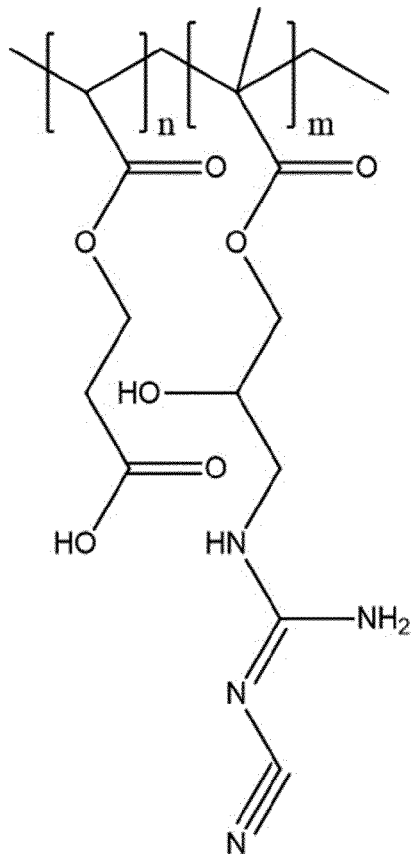
[65] [화학식 2]

[66]



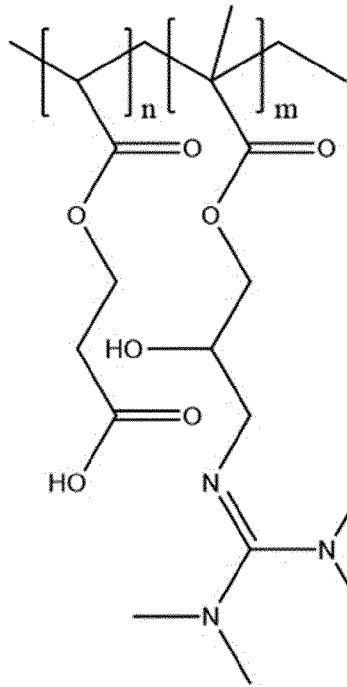
[67] [화학식 3]

[68]



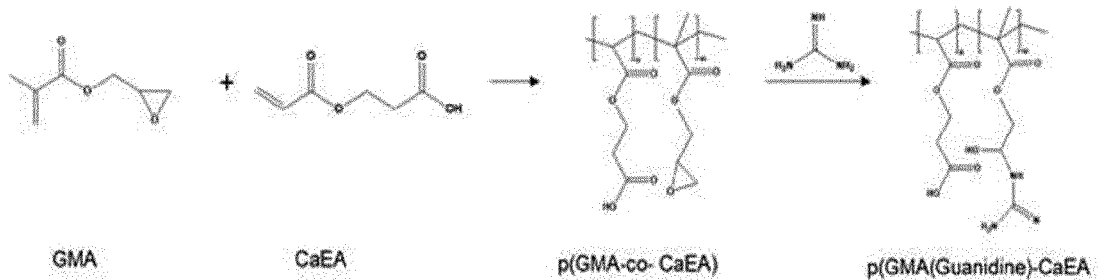
[69] [화학식 4]

[70]



[71] [화학식 5]

[72]



[73] 본 발명의 다른 양태에서는 고분자 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA)의 GMA: CaEA의 단량체 비율에 따라 고분자 내 각 단량체의 함량이 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[74] 고분자 박막이 증착된 세포 배양 기판에 세포가 부착되기 위해서는 세포 표면 흡착 단백질을 매개로한 고분자 박막의 표면 에너지에 영향을 받으며, 이는 세포가 접촉할 수 있는 고분자 박막의 접촉각(water contact angle)이 예리해 지는 것의 의해 개선될 수 있다.

[75] 본 발명의 또 다른 양태에서는 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 세포배양 기판(배양플레이트)을 접촉각 측정장비(Contact Angle Analyzer (Phoenix 150, SEO, Inc.))를 이용하여 기판의 표면 접촉각을 측정하였으며, 그 결과, 다양한 단량체에 의해 형성된 중합체에 의해 표면 개질이 되어서 접촉각이 달라지는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조). 상기 결과를 통해 사용되는 단량체의 비율을 조절함에 따라, 접촉각을 조절할 수 있다는 것을 알 수 있다.

- [76] 본 발명에 있어서, 상기 고분자 박막은 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 및 플라스틱으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 위에서 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 플라스틱은 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리아미드(polyamides, PA), 폴리에스터(polyester, PES), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리우레탄(polyurethanes, PU), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리염화비닐리덴(polyvinylidene chloride, PVDC), 폴리테트라플루오르에틸(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK) 및 폴리에테르이미드(polyetherimide, PEI)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 고분자 박막은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다:
- [78] [화학식 1]
- [79] **[Y]_n-[X-Z]_m**
- [80]
- [81] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [82] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [83] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [84] 상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;
- [85] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65°범위인 것을 특징으로 함.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [87] 본 발명의 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65° 범위인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 12~30°, 더욱 바람직하게는 10~25° 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [88]
- [89] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 고분자 박막에 관한 것이다.
- [90] 또 다른 관점에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막에 관한 것이다:

- [91] [화학식 1]
- [92] **[Y]_n-[X-Z]_m**
- [93]
- [94] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [95] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [96] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [97] 상기 n 및 상기 m은 각각 1-20의 수이며;
- [98] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65°범위인 것을 특징으로 함.
- [99] 본 발명에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [100] 또 다른 관점에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 관한 것이다:
- [101] [화학식 1]
- [102] **[Y]_n-[X-Z]_m**
- [103]
- [104] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [105] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [106] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [107] 상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;
- [108] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65°범위인 것을 특징으로 함.
- [109] 본 발명에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [110] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있으며, 기 줄기세포는 전분화능 줄기세포로 배아줄기세포 (Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포 (induced pluripotent stem cell, iPS)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [111] 또 다른 관점에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기관에서 세포를 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법에 관한 것이다:
- [112] [화학식 1]
- [113] **[Y]_n-[X-Z]_m**
- [114]
- [115] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [116] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [117] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [118] 상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;
- [119] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65°범위인 것을 특징으로 함.
- [120] 본 발명에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시아나디아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [121] 본 발명에서 “줄기세포(stem cell)”는 배아 또는 성체에 있는, 여러 종류의 조직으로 분화할 수 있는 미분화 세포를 의미하며, 전분화능 줄기세포(pluripotent cell)로 배아줄기세포(Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS), 성체줄기세포로 조혈모세포(hematopoietic stem cell), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 신경줄기세포(neural stem cell) 등이 있다.
- [122] 또 다른 관점에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기관에서 전분화능 줄기세포를 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포 배양방법에 관한 것이다:
- [123] [화학식 1]
- [124] **[Y]_n-[X-Z]_m**
- [125]

- [126] 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질 클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;
- [127] 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;
- [128] 상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;
- [129] 상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;
- [130] 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5-65°범위인 것을 특징으로 함.
- [131] 본 발명에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시아나디아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 (1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로
- [132] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)이고, 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA)이고, 상기 Z는 구아니딘(guanidine)이며, n 및 m은 동일한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [133] 본 발명에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아줄기세포 (Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포 (induced pluripotent stem cell, iPS)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [134] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 피더세포 또는 매트리젤(Matrigel) 부재(free)하에 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [135] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 전분화능 줄기세포 배양용 배지 하에 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [136] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 줄기세포 배양을 위한 배지로서, 이 기술분야의 통상의 기술자들에게 널리 알려진 배지라면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 기본배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, mTeSR-1(Stemcell Technologies), TeSR-E8(Stemcell Technologies), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), MEF 및 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [137] 본 발명에 있어서, 상기 배양 배지는 ROCK 억제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 ROCK 억제제는 R-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexane carboxamide dihydrochloride monohydrate (Y-27632)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[138]

[139] 본 발명의 일 양태에서는, p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 세포 배양 기관에서 실질적으로 인간 전분화능 줄기세포가 증식하는지를 H9 배아줄기세포(Wicell Research Institute, Madison, WI, USA)를 사용하여 확인하였으며, 고분자가 증착된 세포배양 기관에서 피더세포나 매트릭셀 코팅 없이도 H9 배아줄기세포가 부착하여 성장하는 것을 확인하였다(도 6 참조).

[140] 본 발명에 사용되는 개시제를 이용한 화학 기상 증착(initiated chemical vapor deposition, iCVD)을 활용하여 합성된 고분자 공중합체 표면에 구아니딘을 결합 시킴으로써 표면젖음성을 낮춰 세포와의 부착력을 높이는 고분자 박막을 활용하여 인간 전분화능 줄기세포의 초기 부착 증진 및 계배대배양이 가능하도록 하였다. 또한 고분자 박막 상에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포의 기능성 유지 여부를 검증하기 위해 마커 유전체 및 단백질 발현 수준과 효소 활성 여부를 확인함으로써 매트릭셀에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포 대비 생물학적 특성 및 기능성이 유지됨을 확인하였다. 따라서 세포외기질이 없는 조건하에서 고분자 박막 코팅된 배양용기에서 인간 전분화능 줄기세포의 계대배양 및 분화능도 효율적으로 이루어질 수 있는 배양방법을 제공할 수 있다.

[141]

[142] [실시예]

[143] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 해당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[144]

[145]

[146] 실시예 1: 증착된 고분자 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA), p(GMA(Guanidine)-co-AA), p(GMA(Guanidine)-co-BA) 및 p(GMA(Guanidine)-co-PA)의 합성

[147] 고분자 박막 증착 시, 화학기상증착 반응기(iCVD, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)를 사용하여, 한 가지 혹은 두 가지 단량체와 개시제(tert-butyl peroxide, TBPO)를 일정 비율로 iCVD 반응기 내에 흘려 주면서 (표 1), 반응기 내의 필라멘트의 온도는 140°C 반응기 내의 기관 온도는 20 내지 40°C 반응기 내 챔버의 압력은 150 내지 300 mTorr로 유지하면서 증착을 수행하여, 300nm 두께의 공중합체가 증착된 세포배양 기관(배양플레이트)을 수득하였다.

[148] 본 실시예에서 공중합체 합성에 사용한 단량체는 glycidyl methacrylate(GMA) (Sigma-Aldrich), carboxyethyl acrylate(CaEA)(Sigma-Aldrich), acrylic acid(AA) (Sigma-Aldrich), 3-butenic acid (BA)(Sigma-Aldrich) 및 4-pentenoic acid(PA) (Sigma-Aldrich)이며, 상기 합성방법을 통해 합성된 고분자에 0.1 M의 중화된 guanidine hydrochloride 용액을 80°C에서 2시간 처리하여 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA), p(GMA(Guanidine)-co-AA), p(GMA(Guanidine)-co-BA) 및

p(GMA(Guanidine)-co-PA)가 각각 고분자 박막 형태로 증착된 배양 플레이트를 수득하였다.

[149] [표1]

Monomer 1: monomer 2	Monomer 1 flow	Monomer 2 flow	Chamber P
GMA: CaEA	70 mTorr / min	45 mTorr / min	300 mTorr
GMA: AA	60 mTorr / min	20 mTorr / min	270 mTorr
GMA: BA	60 mTorr / min	25 mTorr / min	270 mTorr
GMA: PA	60 mTorr / min	25 mTorr / min	270 mTorr

[150]

[151] 실시예 2: 증착된 고분자 박막의 화학적 기능기 확인

[152] 실시예 1 에서 수득한 공중합체 박막을 증착한 후, 푸리에 변환 적외선 분광학(FT-IR, ALPHA FT-IR 흡광모드, Bruker Optics)을 이용하여 중합체의 화학적 특정 기능기를 확인하였다.

[153] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 2800-3000, 3350-3310, 3500 cm⁻¹ 피크를 통해 N-H stretching 기능기를, 1640-1690 cm⁻¹ 피크를 통해 C=N stretching 기능기를, 1020-1250 cm⁻¹ 피크를 통해 C-N stretching 기능기를, 1580-1650 cm⁻¹ 피크를 통해 N-H bending 기능기를, 2500-3300 cm⁻¹ 피크를 통해 O-H stretching 기능기를, 759, 847, 907 cm⁻¹ 피크를 통해 C-O-C 기능기를 확인함으로써 중합체가 성공적으로 합성된 것을 확인하였다.

[154] 또한, GMA와 CaEA 단량체의 비율을 각각 0:1, 1:1, 2:3, 1:2 및 1:0으로 달리하여, 실시예 1의 방법으로 공중합체를 제조하고, GMA: CaEA의 단량체 비율에 따라 고분자 내 단량체 함량의 차이를 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, GMA: CaEA의 단량체 비율에 따라 고분자 내 각 단량체의 함량이 증가하는 것을 확인하였다.

[155]

[156] 실시예 3: 증착된 고분자 박막의 접촉각 확인

[157] 고분자 박막이 증착된 세포 배양 기판에 세포가 부착되기 위해서는 세포 표면 흡착 단백질을 매개로한 고분자 박막의 표면 에너지에 영향을 받으며, 이는 세포가 접촉할 수 있는 고분자 박막의 접촉각(water contact angle)이 예리해 지는 것에 의해 개선될 수 있다.

[158] 실시예 1 수득한 고분자가 증착된 세포배양 기판(배양플레이트)을 접촉각 측정장비(Contact Angle Analyzer (Phoenix 150, SEO, Inc.))를 이용하여 5 μ l의 증류수에 대하여 기판의 표면 접촉각을 측정하였다.

[159] 도 4는 공중합체에 구아니딘을 처리한 후, 접촉각이 개선되는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 5는 단량체의 GMA: CaEA 비율을 0:1, 1:1, 2:3, 1:2 및 1:0으

로 달리하여 제조한 공중합체에 의접촉각을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상기 결과를 통해 사용되는 단량체의 비율을 조절함에 따라, 접촉각을 조절할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[160]

[161] 실시예 4: 인간 전분화능 줄기세포의 배양 방법

[162] 실시예 1에서 수득한 고분자가 증착된 세포배양 기관에서 실질적으로 인간 전분화능 줄기세포가 부착하여 증식하는 지를 확인하였다.

[163] 본 실시예에서는 인간 전분화능 줄기세포는 H9 배아줄기세포(Wicell Research Institute, Madison, WI, USA)를 사용하였다. H9 배아줄기세포는 mTeSR (StemCell Technology, Canada) 배양매지를 이용하여 배양하였다. 인간 전분화능 줄기세포는 본 발명을 통해 개발된 고분자가 코팅된 세포 배양접시 위에서 배양하였으며, 양성 대조군으로 마우스 배아 섬유아세포를 피더세포로 사용한 층 위 또는 매트릭셀(Matrigel)이 코팅된 세포 배양접시에서 배양하였다.

[164] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 고분자가 증착된 세포배양 기관에서 피더세포나 매트릭셀 코팅 없이도 H9 배아줄기세포가 부착하여 성장하는 것을 확인하였다.

[165]

[166] 실시예 5: 본 발명의 배양용기에서 배양된 인간 전분화능줄기세포의 분석

[167] 본 실시예에서는 인간 전분화능 줄기세포로 인간 체세포 (ATCC, catalog number CRL-2097; American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 리프로그래밍을 통해 제작한 인간 역분화 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)와 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs) H9를 사용하였다. 인간 역분화 줄기세포는 공지된 방법에 따라 Episomal iPSC 리프로그래밍 벡터(Cat. No. A14703. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 전기천공법(electroporation)으로 트랜스펙션시켜서 리프로그래밍 되었다. 전기천공 5일 후, 섬유아세포를 매트릭셀(Matrigel)(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)-코팅된 6-웰 플레이트에 1×10^5 개/웰로 플레이팅하고, E8 배지(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)로 배양하였다. 3주 후, 인간 역분화 줄기세포 콜로니를 선택하고, 계대배양 및 추후 특징 설정을 위해 세포수를 증대시켰다.

[168] 인간 역분화 줄기세포(hiPSCs)와 인간 배아줄기세포(hESCs) H9는 1% 매트릭셀을 코팅한 세포 배양 용기에서 mTeSR-1 (Stemcell)와 TeSR-E8 (Stemcell) 배지를 사용하여, 배양하였다. 계대 배양 시에는 콜로니를 $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ 크기로 자른 후 5% 콜라게네이즈 2mL를 1분간 처리하여 분리했다. 고분자 박막 코팅된 배양 용기에서는 Y-27632(Toris) $10\mu\text{M}$ 첨가한 TeSR-E8 배지에서 배양하였다.

[169] 상기 고분자 박막 코팅된 배양용기는 실시예 1에서 제조한 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자 중 GMA: CaEA 비율을 1:1로한 pG1C1 고분자 박막이 코팅된 배양용기를 사용하였으며, 이후의 실시예에서는 모두 pG1C1 고분자 박막이 코팅된 배양용기를 사용하였다.

- [170] 인간 배아줄기세포와 인간 역분화줄기세포를 고분자 박막에서 배양하고 계대 배양을 진행한 후 각 계대(passage) 별 세포콜로니 (colony)의 형태를 확인한 결과를 도 7에 나타내었으며, hESCs와 hiPSCs에서 모두 정상적인 콜로니를 형성하는 것을 확인하였다.
- [171] 인간 전분화능 줄기세포를 고분자 박막이 증착된 배양용기에서 배양한 후 줄기세포 특성 및 기능성 유지 여부를 검증할 수 있는 분석 실험을 수행하였다. Alkaline phosphatase kit(Sigma)를 활용하여 전분화능 줄기세포의 알칼라인 포스파테이즈(Alkaline phosphatase) 기능성을 확인하였다.
- [172] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, hESCs와 hiPSCs에서 모두 알칼라인 포스파테이즈 활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [173] 아울러, 인간 전분화능 줄기세포의 마커 단백질인 OCT4, NANOG, Tra-1-81, Tra-1-60, SSEA3 및 SSEA4의 발현을 면역형광염색 (immunocytochemistry, ICC) 을 통해 확인하였다.
- [174] 고분자 박막 코팅된 배양 용기에서 배양된 줄기세포의 Total RNA는 RNeasy mini kit (QIAGEN) 을 활용하여 준비되었으며, cDNA 는 Superscript IV cDNA synthesis kit (Invitrogen) 을 활용하여 합성하였다. 유전자 발현 분석을 위해 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 활용하였다. 면역형광염색 기반 마커 단백질 발현 분석을 위해 세포는 4% paraformaldehyde 로 fixation 된 후 0.1% Triton X-100 처리를 통해 permeabilization 하였다. 이후 마커에 맞는 1차 항체와 처리 후 형광 물질이 결합된 2차항체를 반응시킨 후 형광현미경을 통해 관찰하였다.
- [175] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, hESCs와 hiPSCs에서 인간 전분화능 줄기세포의 마커 단백질인 OCT4, NANOG, Tra-1-81, Tra-1-60, SSEA3 및 SSEA4의 발현이 확인되었다.
- [176] 도 10(A)는 전분화능 마커 유전자인 OCT4와 NANOG의 발현을 대조군 (1% 마트리젤에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포) 대비 비교 분석한 결과를 나타내었으며, 도 10(B)는 초기 내배엽 (SOX9), 중배엽 (ISL1), 그리고 외배엽 (OLIG2) 분화 마커 유전자의 발현을 대조군 대비 비교 분석한 결과를 나타내었다.
- [177] Matrigel 코팅과 비교했을 때, p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 기판에서 배양된 인간 전분화능 줄기세포는 OCT4와 NANOG의 발현이 상대적으로 높거나, 분화 마커의 경우 차이 없이 발현되어 인간 전분화능 줄기세포 배양에 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자의 활용이 가능함을 확인하였다.
- [178] 도 11에는 고분자 박막에서 배양한 hESCs와 hiPSCs의 핵형을 분석한 결과를 나타내었다. p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 기판에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포의 핵형이 정상임을 확인하여, 인간 전분화능 줄기세포 배양에 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자의 활용이 가능함을 확인하였다.
- [179] 도 12는 고분자 박막에서 배양한 hESCs와 hiPSCs의 분화 가능성을 검증하기 위해 세포를 자연분화 시킨 후 외배엽 (NESTIN, TUJ1) 중배엽 (α -SMA, DESMIN),

그리고 내배엽 (SOX17, FOXA2) 마커 단백질의 발현을 면역형광염색을 통해 확인한 결과를 나타내었다. p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 기관에서 배양한 인간 전분화능 줄기세포의 삼배엽으로의 분화능력이 유지되는 것을 확인하여, 인간 전분화능 줄기세포 배양에 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자의 활용이 가능한 것을 확인하였다.

[180]

[181] 실시예 6: 아마이드기를 포함한 타 고분자와의 세포부착 성능 비교

[182] 실시예 1에서 수득한 고분자에 대해 기보고된 아마이드기를 포함한 고분자와 성능 비교를 진행하였다. 성능 비교에 이용된 고분자는 p(Dimethyl acrylamide) (pDMAm), p(Dimethyl acrylamide-co-Vinyl benzyl chloride) (p(DMAm-co-VBC), p(Dimethyl acrylamide-co-Glycidyl methacrylate) (p(DMAm-co-GMA) 이며 hESCs를 배양하여 부착 성능을 비교하였다. 인간 역분화 줄기세포 (hiPSCs)를 이용해 세포부착 성능을 비교한 결과이다. 동일한 양의 세포를 각 고분자 표면에 뿌리고 24시간 이후에 부착한 세포를 떼어내어 세포수를 정량화하였다. 뿌려준 세포 수 대비 부착한 세포 수를 계산하여 세포 부착 효율을 계산하였다.

[183] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 p(GMA(Guanidine)-co-CaEA) 고분자가 증착된 기관에서 타 기관에 대해 4배 이상의 hESCs 부착 성능이 확인되었다.

[184]

산업상 이용가능성

[185] 본 발명에 따르면, 종래 사용되는 동물유래의 피더세포나 세포외기질이 없는 조건에서도 인간 전분화능 줄기세포를 안정적으로 배양할 수 있어, 보다 안전한 줄기세포치료제를 제조할 수 있다.

[186]

[187] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 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.

청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 고분자 박막의 제조방법;
 (a) 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아민 그룹과 반응 가능한 제 1 단량체와 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군으로부터 선택되는 제 2 단량체를 화학기상증착법(initiated chemical vapor deposition, iCVD)으로 공중합하여, 공중합체 박막을 제조하는 단계; 및
 (b) 상기 공중합체 박막에 아민 그룹을 가지는 물질을 반응시켜 개질시키는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 화학기상 증착기 챔버에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 개시제를 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 개시제는 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide, TBPO), 펄플루오로부테인설포닐 플루오라이드(perfluorobutanesulfonyl fluoride, PFBSF), 펄프루오옥테인설포닐 플루오라이드(Perfluorooctanesulfonyl fluoride, PFOSF), tert-아밀 퍼옥사이드(tert-amyl peroxide, TAPO) 및 tert-부틸 퍼옥시벤조에이트(Tert-butyl-peroxidbenzonate, TBPOB)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 아민 그룹을 가지는 물질은 구아니딘(guanidine), 다이시아나디아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 고분자 박막은 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 및 플라스틱으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기판 위에서 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 플라스틱은 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리아미드(polyamides, PA), 폴리에스터(polyester, PES), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리우레탄(polyurethanes, PU), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리염화비닐리덴(polyvinylidene chloride, PVDC), 폴리테트라

플루오르에틸(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK) 및 폴리에테르이미드(polyetherimide, PEI)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 고분자 박막은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 방법:

[화학식 1]

[Y]_n-[X-Z]_m

상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;

상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;

상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;

상기 n 및 상기 m은 각각 1-20의 수임.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이어마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-Tetramethyl guanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된, 고분자 박막.

[청구항 12] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막:

[화학식 1]

[Y]_n-[X-Z]_m

상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;

상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;

상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;

상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;

상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 함.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이어마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-

Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 고분자 박막.

[청구항 14] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판:
[화학식 1]

[Y]_n-[X-Z]_m

상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;

상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;

상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;

상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;

상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 함.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시아나디아마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 기판.

[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 세포 배양 기판.

[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 줄기세포는 전분화능 줄기세포로 배아줄기세포(Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)인, 세포 배양 기판.

[청구항 18] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 세포 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법:
[화학식 1]

[Y]_n-[X-Z]_m

상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;

상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;

상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;

상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;

상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 함.

[청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이어마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 방법.

[청구항 20] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 기판에 전분화능 줄기세포를 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포 배양방법:

[화학식 1]

[Y]_n-[X-Z]_m

상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 4-비닐 벤질클로라이드(4-vinyl benzylchloride, VBC), 클로로데틸아크릴레이트(chloroethyl acrylate, CEA) 및 1, 3-프로판 설통(1,3-propane sultone, PrSt)으로 구성된 군에서 선택되는 제1단량체이고;

상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA), 아크릴 산(acrylic acid, AA), 4-펜테오닉 산(4-pentenoic acid, PA) 및 3-부테노익 산(3-butenic acid, BA)으로 구성된 군에서 선택되는 제2단량체이며;

상기 Z는 아민 그룹을 가지는 물질이고;

상기 n 및 상기 m은 각각 1~20의 수이며;

상기 고분자 박막은 물에 대한 접촉각(water contact angle)이 5~65°범위인 것을 특징으로 함.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 Z는 구아니딘(guanidine), 다이시안다이어마이드(Dicyandiamide) 및 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘(1,1,3,3-Tetramethylguanidine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 22] 제20항에 있어서, 상기 X는 글리실 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)이고, 상기 Y는 카르복시에틸 아크릴레이트(carboxyethyl acrylate, CaEA)이고, 상기 Z는 구아니딘(guanidine)이며, n 및 m은 동일한 것을 특징으로 하는 방법.

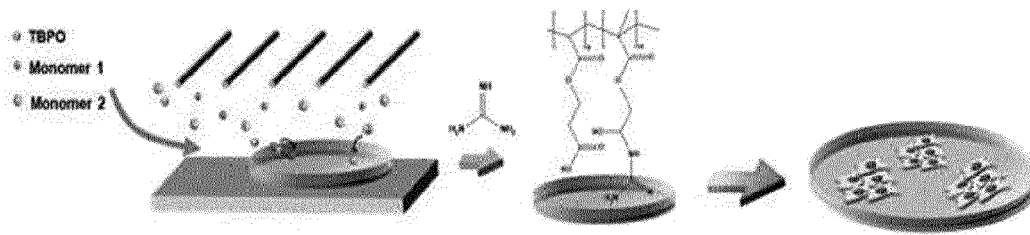
[청구항 23] 제20항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아줄기세포(Embryonic stem cell, ES) 또는 유도전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 24] 제20항에 있어서, 상기 배양은 피더세포 또는 매트릭셀(Matrigel) 부재(free)하에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

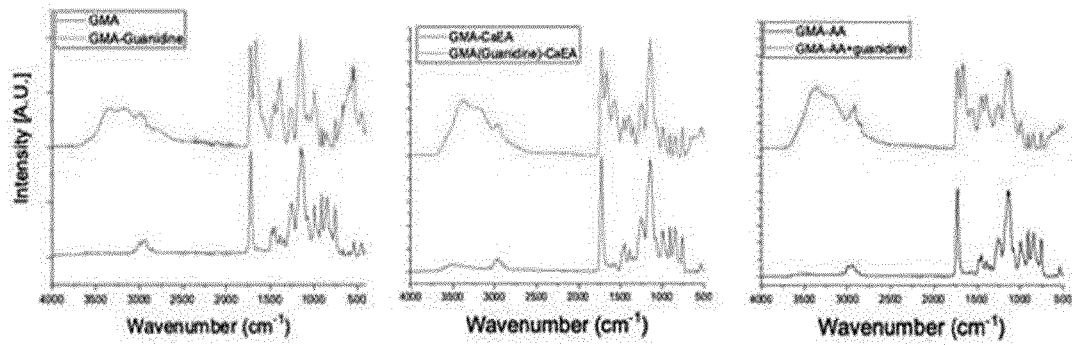
[청구항 25] 제20항에 있어서, 상기 배양은 전분화능 줄기세포 배양용 배지 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 배양용 배지는 ROCK 억제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 R-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexane carboxamide dihydrochloride monohydrate (Y-27632)인 것을 특징으로 하는 방법.

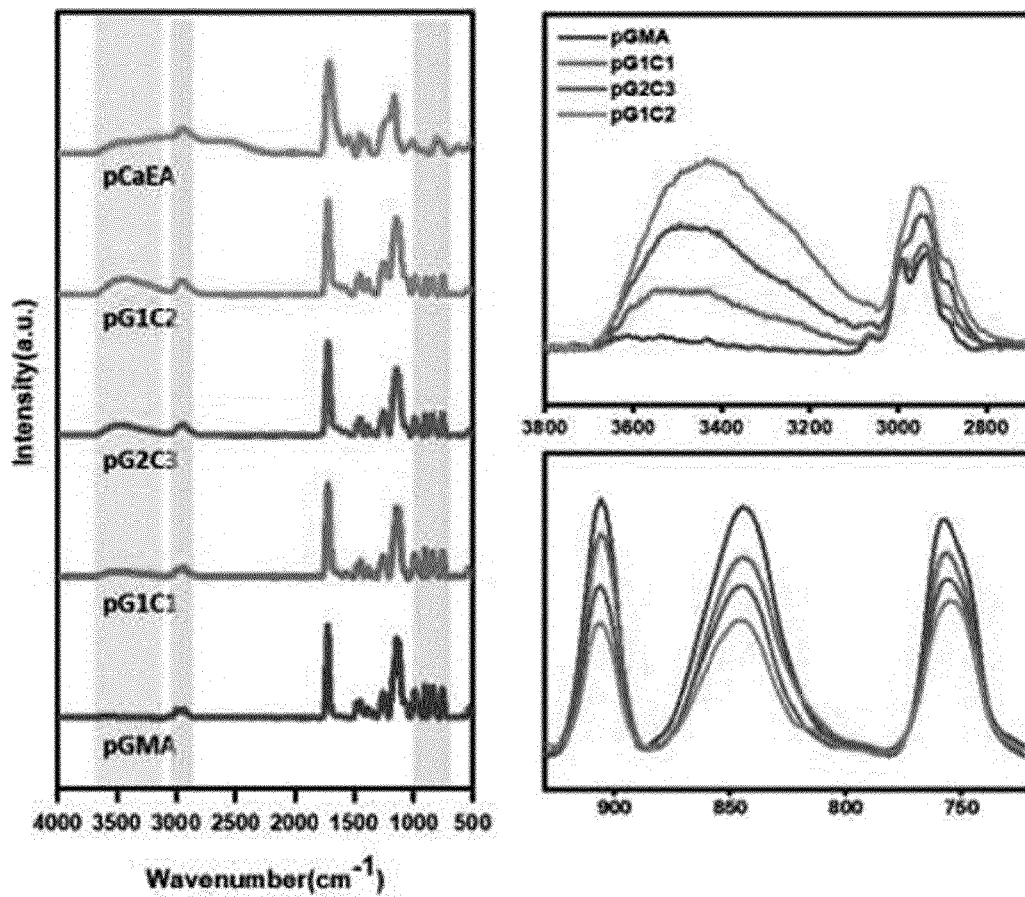
[도1]



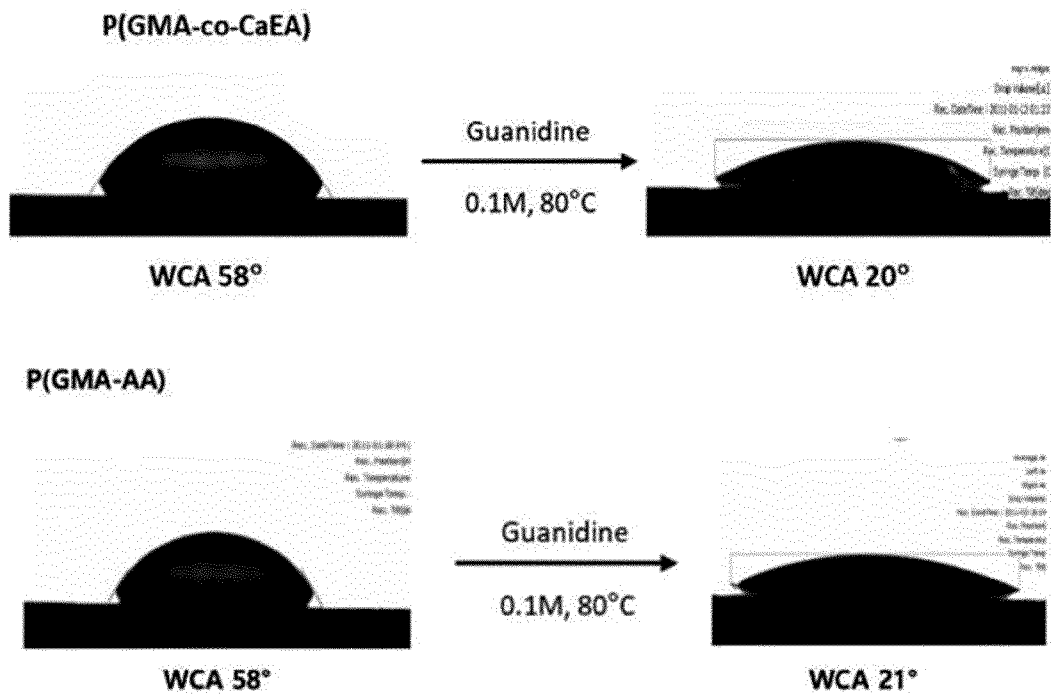
[도2]



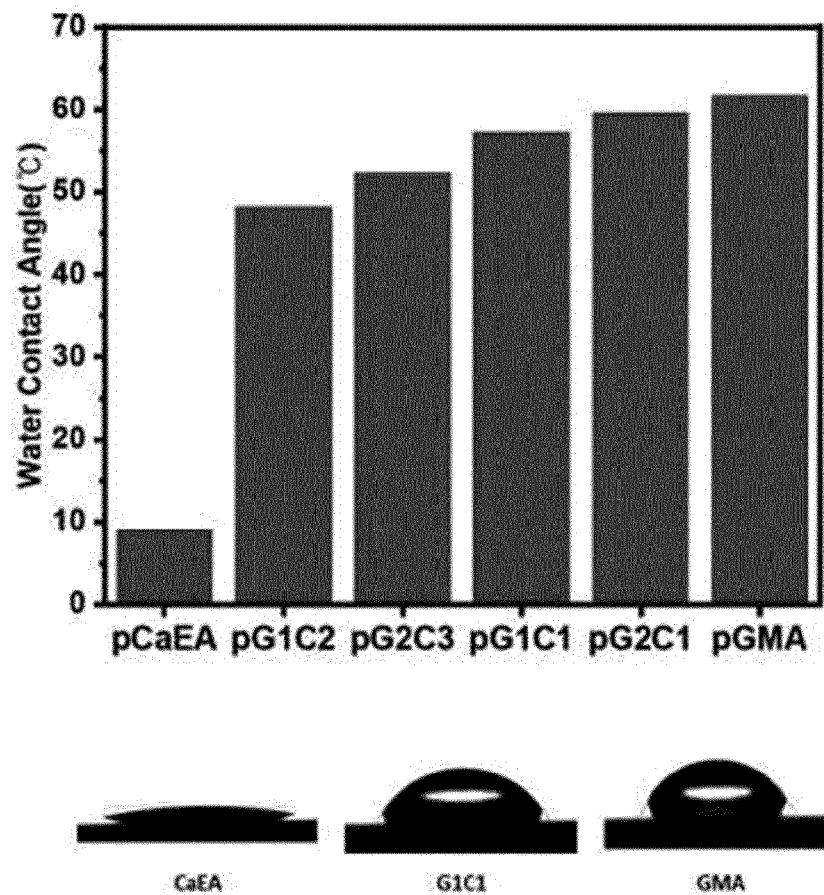
[도3]



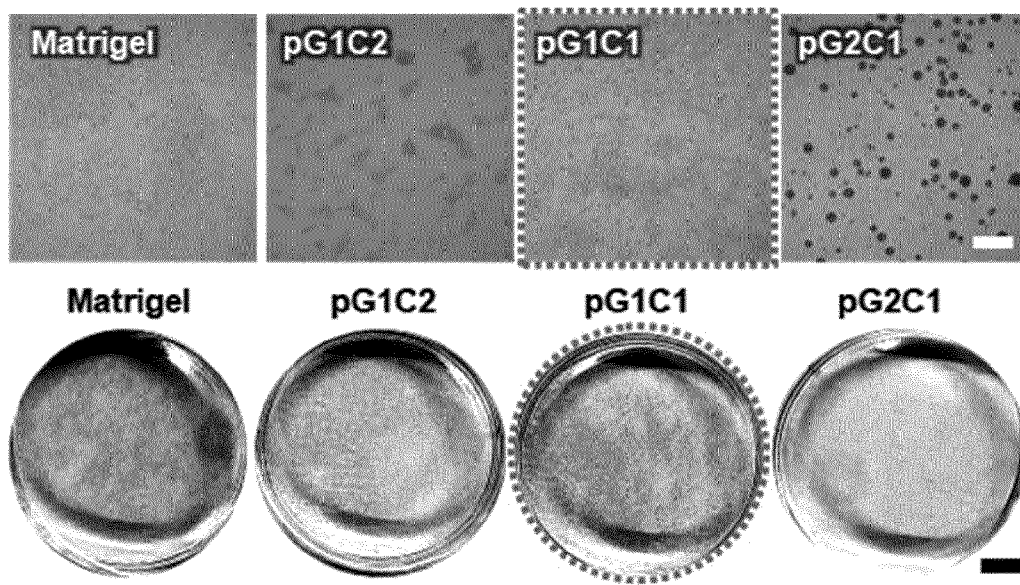
[도4]



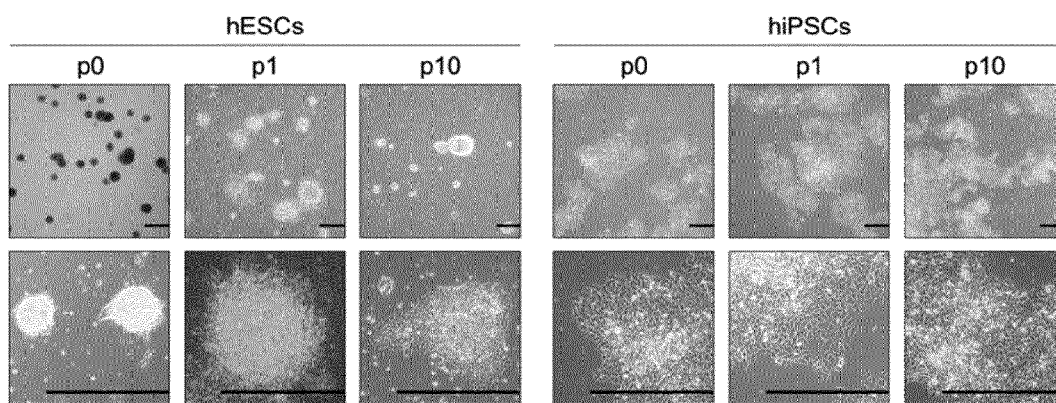
[도5]



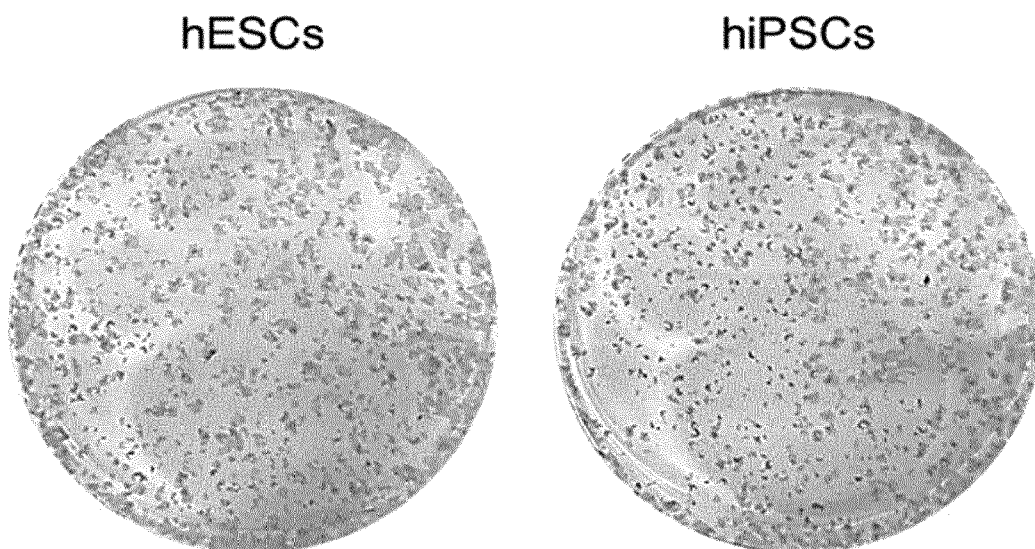
[도6]



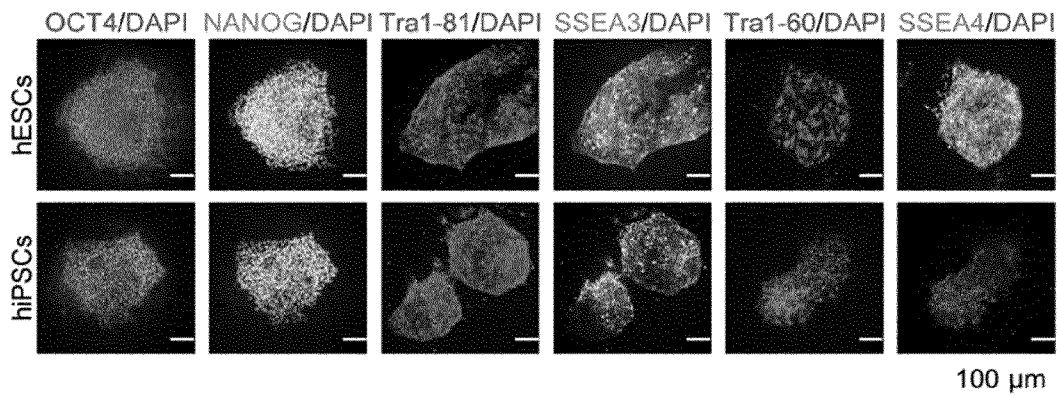
[도7]



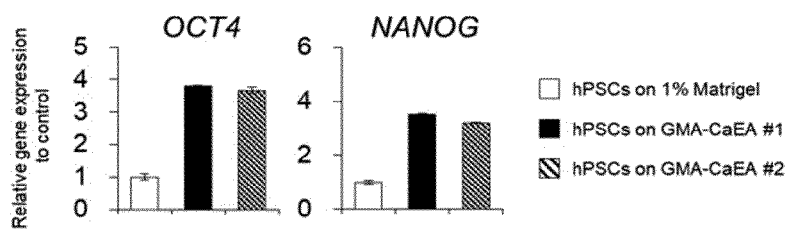
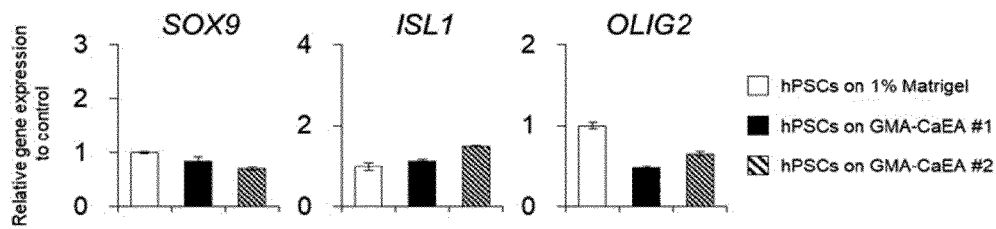
[도8]



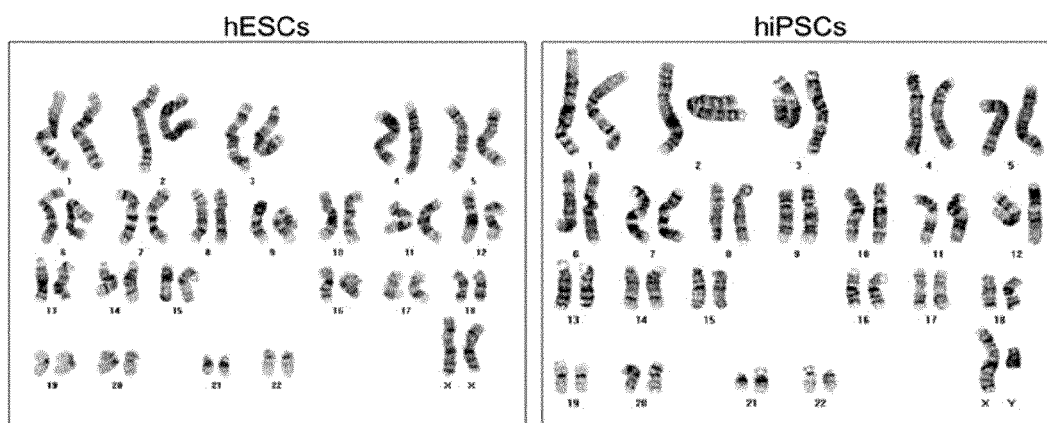
[도9]



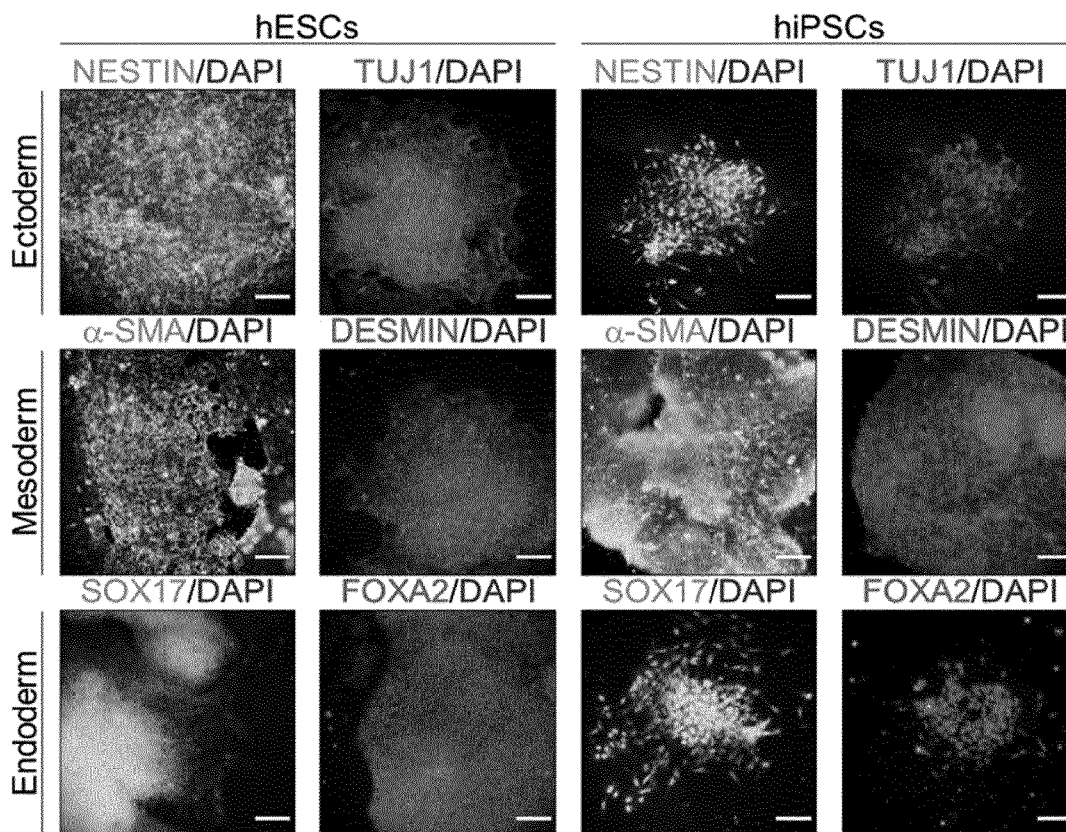
[도10]

A**B**

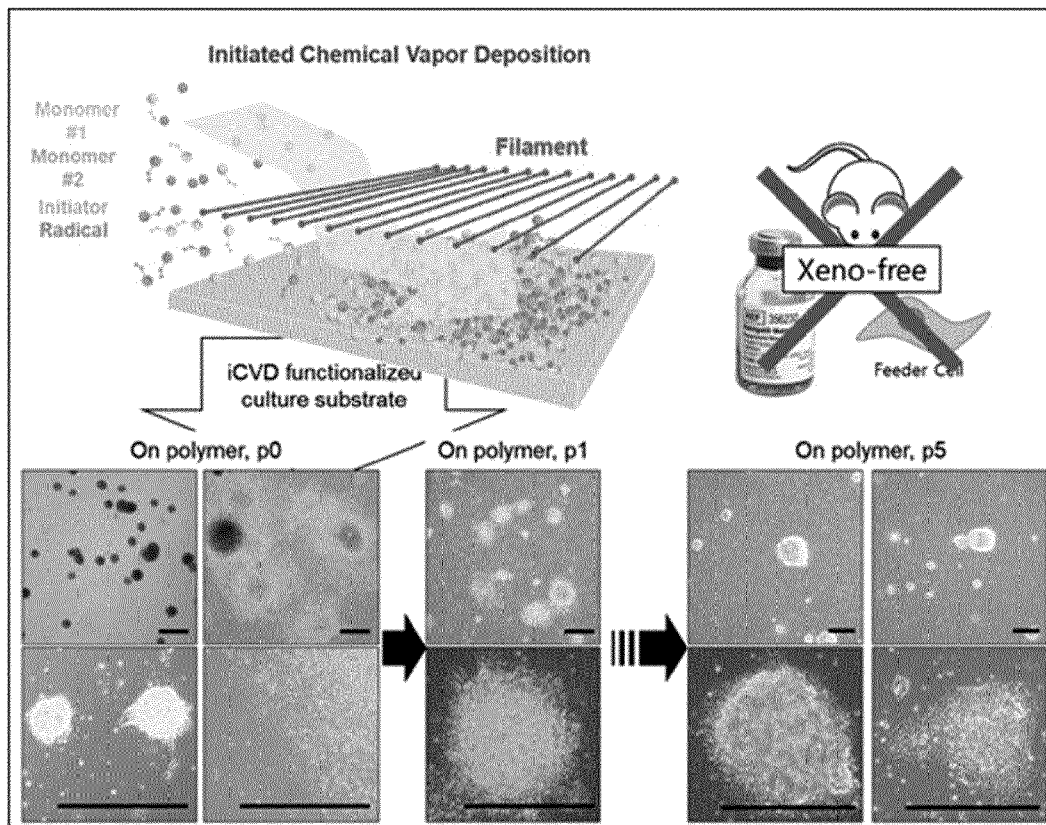
[도11]



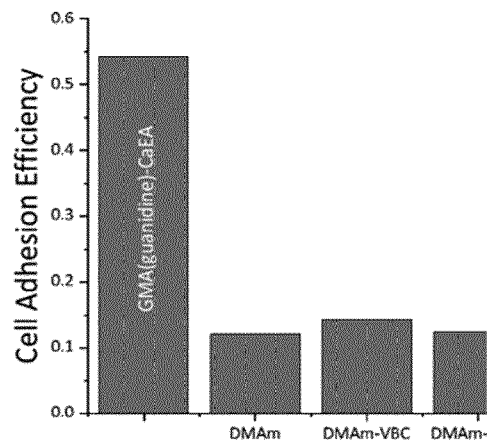
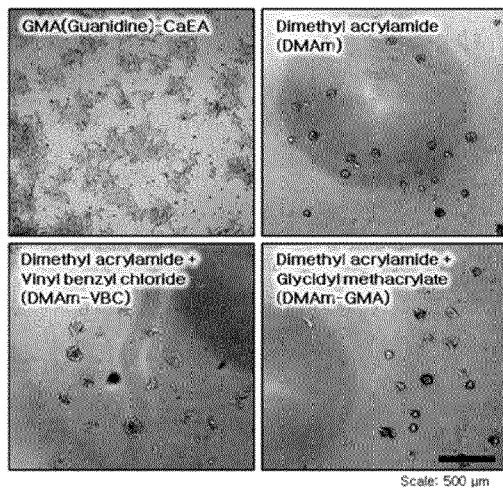
[도12]



[도13]



[도 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/00(2006.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00(2006.01); C08F 212/36(2006.01); C08J 7/18(2006.01); C08L 33/06(2006.01); C12M 1/00(2006.01);
C12M 1/18(2006.01); C12N 5/074(2010.01); C12N 5/0793(2010.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 단량체(monomer), 개시제(initiator), 아민 그룹(amine group), 화학기상증착법
(initiated chemical vapor deposition, iCVD), 공중합체(copolymer), 고분자(polymer), 박막(sheet), 접촉각(contact angle), 제조
(manufacture), 세포(cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 배양(culture), 기판(substrate)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2018-0005139 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 January 2018 (2018-01-15) See abstract; claims 10-13 and 15; paragraphs [0022]-[0023], [0029]-[0030], [0034]- [0036], [0057]-[0058] and [0068]; and figure 1.	1-27
Y	김지혜 등. (MMA-co-GMA-co-AA)형 아크릴레이트 공중합체를 도포한 투명 필름의 제조. Korean Chemical Engineering Research. 2011, vol. 49, no. 1, pp. 62-68 (KIM, Ji-Hye et al. Preparation of Transparent Film by Coating of Acrylate Copolymer as MMA-co-GMA-co-AA.) See abstract; page 63, right column, third paragraph and left column, second paragraph; and figure 3.	1-27
Y	KR 10-2017-0047118 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 May 2017 (2017-05-04) See abstract; claims 1 and 9; and paragraphs [0016], [0018], [0020], [0029], [0031], [0035] and [0081].	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 July 2024

Date of mailing of the international search report

04 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro,
Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0075126 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 July 2018 (2018-07-04) See entire document.	1-27
A	KR 10-2015-0142564 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 22 December 2015 (2015-12-22) See entire document.	1-27
A	KR 10-2015-0033697 A (POLYMERS CRC LIMITED) 01 April 2015 (2015-04-01) See entire document.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/003789

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0005139	A	15 January 2018	JP	2019-522995	A	22 August 2019
				JP	6865264	B2	28 April 2021
				US	2019-0233788	A1	01 August 2019
				WO	2018-008985	A2	11 January 2018
				WO	2018-008985	A3	01 March 2018
KR	10-2017-0047118	A	04 May 2017	KR	10-1760699	B1	25 July 2017
				WO	2017-069429	A1	27 April 2017
KR	10-2018-0075126	A	04 July 2018	KR	10-1969115	B1	16 April 2019
KR	10-2015-0142564	A	22 December 2015	JP	2017-517267	A	29 June 2017
				JP	6401307	B2	10 October 2018
				US	2017-0130195	A1	11 May 2017
				WO	2015-190644	A1	17 December 2015
KR	10-2015-0033697	A	01 April 2015	CN	104603189	A	06 May 2015
				EP	2867285	A1	06 May 2015
				JP	2015-527428	A	17 September 2015
				US	2015-0191693	A1	09 July 2015
				WO	2014-000052	A1	03 January 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/00(2006.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/00(2006.01); C08F 212/36(2006.01); C08J 7/18(2006.01); C08L 33/06(2006.01); C12M 1/00(2006.01); C12M 1/18(2006.01); C12N 5/074(2010.01); C12N 5/0793(2010.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드 : 단량체(monomer), 개시제(initiator), 아민 그룹(amine group), 화학기상증착법(initiated chemical vapor deposition, iCVD), 공중합체(copolymer), 고분자(polymer), 박막(sheet), 접촉각(contact angle), 제조(manufacture), 세포(cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 배양(culture), 기판(substrate)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2018-0005139 A (한국과학기술원) 2018.01.15 요약; 청구항 10-13, 15; 단락 [0022]-[0023], [0029]-[0030], [0034]-[0036], [0057]-[0058], [0068]; 도면 1	1-27
Y	김지혜 등, "(MMA-co-GMA-co-AA)형 아크릴레이트 공중합체를 도포한 투명필름의 제조", Korean Chemical Engineering Research, 2011, 제49권, 제1호, 페이지 62-68 초록; 페이지 63, 오른쪽 컬럼 세 번째 단락, 왼쪽 컬럼, 두 번째 단락; 도면 3	1-27
Y	KR 10-2017-0047118 A (한국과학기술원) 2017.05.04 요약; 청구항 1, 9; 단락 [0016], [0018], [0020], [0029], [0031], [0035], [0081]	1-27
A	KR 10-2018-0075126 A (한국과학기술원) 2018.07.04 전체 문헌	1-27
A	KR 10-2015-0142564 A (한국과학기술원) 2015.12.22 전체 문헌	1-27
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년07월03일(03.07.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년07월04일(04.07.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김태운 전화번호 +82-42-481-3326

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0033697 A (폴리머스 씨알씨 리미티드) 2015.04.01 전체 문헌	1-27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0005139 A	2018/01/15	JP 2019-522995 A	2019/08/22
		JP 6865264 B2	2021/04/28
		US 2019-0233788 A1	2019/08/01
		WO 2018-008985 A2	2018/01/11
		WO 2018-008985 A3	2018/03/01
KR 10-2017-0047118 A	2017/05/04	KR 10-1760699 B1	2017/07/25
		WO 2017-069429 A1	2017/04/27
KR 10-2018-0075126 A	2018/07/04	KR 10-1969115 B1	2019/04/16
KR 10-2015-0142564 A	2015/12/22	JP 2017-517267 A	2017/06/29
		JP 6401307 B2	2018/10/10
		US 2017-0130195 A1	2017/05/11
		WO 2015-190644 A1	2015/12/17
KR 10-2015-0033697 A	2015/04/01	CN 104603189 A	2015/05/06
		EP 2867285 A1	2015/05/06
		JP 2015-527428 A	2015/09/17
		US 2015-0191693 A1	2015/07/09
		WO 2014-000052 A1	2014/01/03