



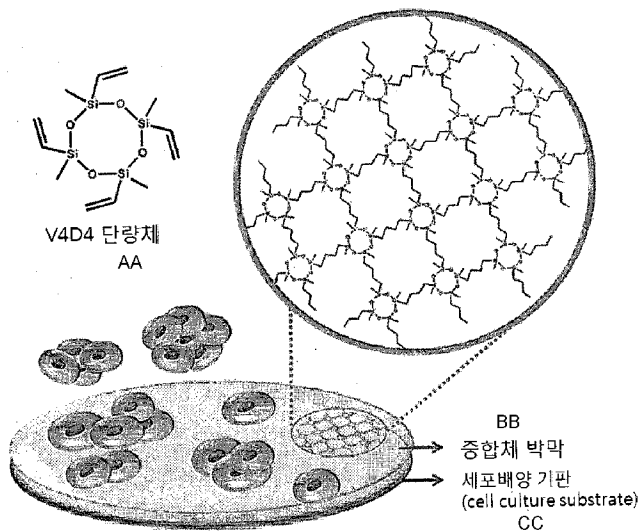
- (51) 국제특허분류: *C12M 3/00* (2006.01) *C07F 7/08* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007113
- (22) 국제출원일: 2014년 8월 1일 (01.08.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0069970 2014년 6월 10일 (10.06.2014) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 임성갑 (IM, Sung Gap); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 이학래 (LEE, Hak Rae); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 전상용 (JON, Sang Yong); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 최민석 (CHOI, Min Suk); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELL CULTURE SUBSTRATE, MANUFACTURING METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 세포배양 기판, 이의 제조방법 및 용도

도 1



AA ... V4D4 monomer
BB ... Polymer thin membrane
CC ... Cell culture substrate

(57) Abstract: The present invention provides a cell culture substrate comprising a polymer formed of a cyclosiloxane compound and a manufacturing method therefor, and a method for preparing a cell spheroid type of cell aggregate or induced pluripotent stem cells using the cell culture substrate. The cell spheroid type of cell aggregate can be easily formed by culturing cells on the cell culture substrate of the present invention, and further, the cell culture substrate can be utilized as a cell culture platform for preparing the induced pluripotent stem cells.

(57) 요약서: 본 발명은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판과 이의 제조방법, 및 상기 세포배양 기판을 이용하여 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체 또는 유도만능줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 세포배양 기판 상에서 세포를 배양함으로써 손쉽게 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체를 형성시킬 수 있고, 나아가 상기 세포배양 기판은 유도만능줄기세포의 제조를 위한 세포 배양 플랫폼으로 활용가능하다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

【명세서】

【발명의 명칭】

세포배양 기판, 이의 제조방법 및 용도

5 【기술 분야】

본 발명은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판과 이의 제조방법, 및 상기 세포배양 기판을 이용하여 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체 또는 유도만능줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

10

【배경 기술】

동물세포 배양은 동물체에서 생체조직을 잘라내 세포를 분리한 후, 배양기 내에서 증식시키는 과정을 의미한다. 세포의 종류에 따라 한천배지 등의 기질에 부착시켜 배양하는 방법과 배양액에 부유시키는 방법 등이
15 있는데, 3차원 배양 세포들을 얻기 위한 다양한 배양법들이 많이 연구되어 왔다(Haycock JW., *Methods Mol Biol*, 695 (2011), pp.1-15).

이러한 방법으로는, 콜라겐, 다공성 지지체(scaffold), 수화겔 등의 지지체(scaffold)를 이용하는 방법이 있으며(Chevallay B, Herbage D., *Med Biol Eng Comput*, 38(2) (2000), pp.211-218; Ma L et al., *Biomed*
20 *Microdevices*, 12(4) (2010), pp.753-760; Tibbitt MW et al., *Biotechnol Bioeng*, 103(4) (2009), pp.655-663), 지지체에 의존하지 않는 방법으로는 세포 스페로이드(cell spheroid)를 형성하는 현적배양(hanging-drop culture) 방식이 있다. 상기 현적배양 방식은 지지체를 사용하지 않는다는 장점은 있으나, 1 mm 이하의 미세 세포조직만 제조할 수 있는 한계가 있다.

25 최근에는 세포의 표면에 부착하는 RGD 염기배열을 갖는 자화된 수화겔과 나노 마이크로입자 크기의 물질 중합체를 이용한 자력 부상을 기반으로 하는 새로운 배양법이 개발되었다(Souza GR et al., *Nat Nanotechnol*, 5(4) (2010), pp.291-296). 하지만, 이 배양 방법은 세포 표면에 인공적인 물질을 부착해야 하는 한계점이 있다.

30

한편, 유도만능줄기세포(induced Pluripotent Stem Cell, iPCS)란

배아줄기세포와 달리, 수정란이나 여성의 난자를 사용하지 않아 윤리적 문제에서 자유로우면서도 분화능력은 배아줄기세포와 비슷한 수준인 줄기세포이다. 이는 체세포에 유전자 변형을 가해 배아줄기세포와 비슷한 분화 특성을 갖는 줄기세포를 유도하는 방식으로 만들어지는데, 그

5 방법에는 체세포로부터 분리한 핵과 핵을 제거한 난자를 결합해 배아줄기세포를 만드는 방법과, 체세포에 4가지 유전자를 주입하는 방법, 그리고 최근에 발표된 외부 환경적 자극을 통해 분화능력을 유도하는 방법 등이 알려져 있다.

기존의 방법 중 핵치환 방법은 성공률이 낮는데다 난자를 사용하기

10 때문에 생명윤리적인 논란에서 자유롭지 못하다는 문제가 있었으며, 동시에 면역반응이 하나의 문제점으로 지적되고 있었다. 2012년 노벨생리의학상을 받은 일본 교토대학의 야마나카 신야 교수 연구팀에 의해 체세포에 4가지 유전자 발현인자를 주입하는 방식으로 유도만능줄기세포를 만드는 데는

15 성공했지만, 바이러스를 이용하기 때문에 부작용으로 암의 발생이 높아질 수 있다는 단점을 해결하지 못한 상태다. 또한, 세포를 채취하고 줄기세포로 역분화시키는 과정을 거쳐 안정성을 확보하려면 최소 6개월을 시간이 소요되기 때문에 암 환자 치료에 효과적으로 사용되기 어렵다는 단점도 존재한다.

최근 일본에서 체세포를 유전자 조작 없이 약산성에 담가놓는

20 것만으로 어떤 세포로든 분화할 수 있는 만능성 세포를 유도할 수 있다는 발표가 있었으나, 실험결과를 조작했다는 논란이 있는 등 현재로서는 신뢰할만한 결과로 볼 수 있는 상태가 아니다.

이러한 연구에 앞서, 중국의 연구팀에 의해 유전자를 사용하지 않고

7가지 소분자 화합물들을 이용하여 유도만능줄기세포를 만든 연구도

25 존재하지만, 기존의 유전자를 이용한 방법보다 주입되는 소분자 화합물의 수가 더 많을 뿐만 아니라, 효율도 기존의 유도만능줄기세포 유도 방법들과 같이 1%에도 미치지 못한다는 한계를 지니고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그

30 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준

및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

- 5 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 사이클로실록산 화합물이 형성한 동중 중합체 또는 공중합체 상에서 암세포, 줄기세포 및 체세포 등과 같은 다양한 세포를 배양하여 유도만능줄기세포의 초기 분화 단계로 알려진 세포 스페로이드(cell spheroid)를 형성시켰으며, 유전자 및 단백질 발현 분석을 통하여 이들 세포 스페로이드가
- 10 재프로그래밍 되었음을 확인함으로써, 상기 중합체를 세포배양을 위한 플랫폼으로 활용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 세포배양 기판을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

- 15 본 발명의 또 다른 목적은 유도만능줄기세포의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 세포배양 기판의 제조방법을 제공하는 데 있다.

- 20 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

- 25 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판을 제공한다.

- 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 사이클로실록산 화합물이 형성한 동중 중합체 또는 공중합체 상에서 암세포, 줄기세포 및 체세포 등과 같은 다양한 세포를 배양하여 유도만능줄기세포의 초기 분화 단계로 알려진 세포 스페로이드(cell spheroid)를 형성시켰으며, 유전자 및 단백질 발현 분석을 통하여 이들 세포 스페로이드가
- 30

재프로그래밍 되었음을 확인함으로써, 상기 중합체를 세포배양을 위한 플랫폼으로 활용할 수 있음을 확인하였다.

본 명세서에서 사용된 표현, "사이클로실록산이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판"은, 사이클로실록산이 형성한 중합체가 세포배양
5 기판의 일부분인 경우(예를 들어, 상기 중합체로 표면이 코팅된 세포배양 기판)를 의미하는 것뿐만 아니라, 사이클로실록산이 형성한 고상의 중합체 자체를 세포배양 기판으로 사용할 수 있음을 의미하기 위하여 사용된다.

본 발명에 따르면, 상기 세포배양 기판은 세포를 배양할 수 있는 임의의 공간을 제공하는 것으로 충분하기 때문에 이의 형태는 제한이 없다.
10 예를 들어, 상기 세포배양 기판은 디쉬(배양 접시), 살레나 플레이트(예컨대, 6웰, 24웰, 48웰, 96웰, 384웰, 9600웰 등의 마이크로타이터 플레이트, 마이크로 플레이트, 딥 웰 플레이트 등), 플라스크, 챔버 슬라이드, 튜브, 셀 팩토리, 롤러 보틀, 스피너 플라스크, 중공 섬유(hollow fibers), 마이크로 캐리어, 비즈 등의 형상을 가질 수
15 있다.

또한, 지지성을 갖는 물질이라면 상기 세포배양 기판으로 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 플라스틱(예컨대, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등), 금속, 실리콘 및 유리 등을 세포배양 기판으로 사용할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따른 세포배양 기판의 구조는 도 1에
20 도시되어있다.

본 명세서에서 사용된 표현, "사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체"는 (i) 동종의 사이클로실록산 화합물이 중합하여 형성한 동종 중합체(homopolymer), (ii) 이종의 사이클로실록산 화합물이 중합하여 형성한 공중합체(copolymer), 및 (iii) 동종 또는 이종의 사이클로실록산
25 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.

따라서, 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산
30 화합물이 형성한 중합체는 동종의 사이클로실록산 화합물이 중합하여 형성한 동종 중합체이다.

본 발명의 다른 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체는 상기 사이클로실록산 화합물인 제 1 단량체와, 이와 중합할 수 있는 제 2 단량체가 형성한 공중합체이다. 하기 실시예에서 확인한 바와 같이, 사이클로실록산 화합물을 포함하는 공중합체 상에서
5 세포를 배양함으로써 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체를 제조할 수 있다(도 10 참조).

하나의 특정예에 따르면, 상기 제 2 단량체는 제 1 단량체와 상이한 사이클로실록산 화합물이다(이종의 사이클로실록산 화합물이 형성한 공중합체).

10 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,
15 아크릴레이트계 단량체, 방향족 비닐계 단량체(예컨대, 디비닐벤젠, 비닐벤조에이트, 스티렌 등), 아크릴아마이드계 단량체(예컨대, N-아이소프로필아크릴아마이드, 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
20 사이클로알케인(예컨대, 1,2,4-트리비닐사이클로헥세인 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.

25 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-헵타데카
30 플루오로데실메타크릴레이트, 헥실메타크릴레이트, 메타아크릴릭 안하이드라이드, 펜타플루오로페닐메타크릴레이트, 프로파질메타크릴레이트, 테트라하이드로퍼퍼릴메타크릴레이트, 뷰틸메타크릴레이트, 메타크릴로일

클로라이드 및 디(에틸렌글리콜)메틸에스터메타크릴레이트 등이 있다.

상기 아크릴레이트계 단량체에는, 예를 들어, 아크릴레이트, 2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트, 에틸렌글라이콜디아크릴레이트, 1H, 1H, 7H-도데카플루오로헵틸아크릴레이트, 1H, 1H, 7H-도데카플루오로
 5 헵틸아크릴레이트, 아이소보닐아크릴레이트, 1H, 1H, 2H, 2H-퍼플루오로데실아크릴레이트, 테트라하이드로퍼퓨릴아크릴레이트, 폴레(에틸렌글리콜)디아크릴레이트, 1H, 1H, 7H-도데카플루오로헵틸아크릴레이트 및 프로파질아크릴레이트 등이 있다.

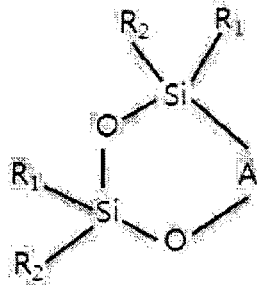
본 발명의 공중합체는 본 명세서에서 언급한 단량체 외에 다른
 10 단량체를 공단량체로 추가 포함할 수 있다.

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:
 15 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.

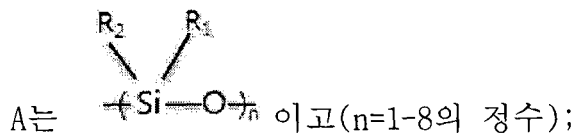
본 명세서에서 사용된 용어, "사이클로실록산 화합물"은 사이클로실록산 구조를 기본 골격으로 가지면서, 이의 규소 원자 위치에 작용기(예컨대, 알킬기, 알케닐기 등)를 갖는 화합물을 포괄하기 위하여
 20 사용된다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 하기
 25 화학식 1로 표시된다.

화학식 1



상기 식에서,



R_1 은 서로 독립적으로 수소 또는 C_{2-10} 알케닐이고(단, R_1 중 적어도 두 곳은 C_{2-10} 알케닐임);

R_2 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 할로, 금속원소, C_{5-14} 헤테로사이클, C_{3-10} 사이클로알킬 또는 C_{3-10} 사이클로알케닐이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "알킬"은 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸 또는 헥실 등을 포함한다. C_1-C_{10} 알킬은 탄소수 1 내지 10의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며, C_1-C_{10} 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C_1-C_{10} 알킬은 C_1-C_8 알킬, C_1-C_7 알킬 또는 C_1-C_6 알킬이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "알케닐"은 지정된 탄소수를 가지는 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 불포화 탄화수소기를 나타내며, 예컨대, 비닐, 프로페닐, 알릴, 이소프로페닐, 부테닐, 이소부테닐, t-부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐을 포함한다. C_{2-10} 알케닐은 탄소수 1 내지 10의 알케닐 유니트를 가지는 알케닐기를 의미하며, C_{2-10} 알케닐이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C_{2-10} 알케닐은 C_{2-8} 알케닐, C_{2-6} 알케닐, C_{2-5} 알케닐, C_{2-4} 알케닐 또는 C_{2-3} 알케닐이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 R_1 중 적어도 세 곳은 C_{2-10} 알케닐이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산은 R_1 위치에 $n+1$ 개 또는 $n+2$ 개의 C_{2-10} 알케닐을 갖는다. 예를 들어, n 이 2인 경우 화학식 1의 화합물은 R_1 위치에 3 또는 4개의 C_{2-10} 알케닐을 갖는 사이클로테트라실록산이 된다. 이러한 알케닐기는 중합반응에 관여한다.

5 본 명세서에서 사용된 용어, "할로"는 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.

본 명세서에서 사용된 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),
10 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 홀원소물질을 만드는 원소를 의미한다.

15 본 명세서에서 사용된 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,
20 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 C_{5-14} 헤테로사이클의 예이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "사이클로알킬"은 사이클릭 탄화수소
25 라디칼을 의미하며, 이는 사이클로프로필, 사이클로부틸 및 사이클로펜틸을 포함한다. C_{3-10} 사이클로알킬은 링 구조를 형성하는 탄소수가 3-10인 사이클로알킬을 의미하며, C_{3-10} 사이클로알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C_1 - C_{10} 사이클로알킬은
30 C_1 - C_8 사이클로알킬, C_1 - C_7 사이클로알킬 또는 C_1 - C_6 사이클로알킬이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "사이클로알케닐"은 최소 하나의 이중

결합을 갖는 사이클릭 탄화수소기를 의미하며, 예컨대 사이클로펜텐, 사이클로헥센 및 사이클로헥사디엔을 포함한다. C_{3-10} 사이클로알케닐은 링 구조를 형성하는 탄소수가 3-10인 사이클로알케닐을 의미하며, C_{3-10} 사이클로알케닐이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

5 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 명세서에서 C_{2-10} 사이클로알케닐은 C_{2-8} 사이클로알케닐, C_{2-6} 사이클로알케닐, C_{2-5} 사이클로알케닐, C_{2-4} 사이클로알케닐 또는 C_{2-3} 사이클로알케닐이다.

10 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 R_2 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐이다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 R_2 중 적어도 두 곳 또는 적어도 세 곳은 C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐일 수 있다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 사이클로실록산은 R_2 위치에 $n+1$ 개 또는 $n+2$ 개의 C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐을 가질 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 n 은 1-7의 정수, 1-6의 정수, 1-5의 정수, 1-4의 정수 또는 1-3의 정수이다.

15 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 2,4,6,8-테트라(C_{1-10})알킬-2,4,6,8-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5-트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 20 1,3,5-트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 25 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 헥사(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 옥타(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 데카(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

30 하나의 특정예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물은 2,4,6,8-테트라(C_{1-6})알킬-2,4,6,8-테트라(C_{2-4})알케닐사이클로테트라실록산(일예로, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5-

트리(C_{1-6})알킬-1,3,5-트리(C_{2-4})알케닐사이클로트리실록산(일 예로, 1,3,5-
 트라이소프로필-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C_{1-6})
 알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-4})알케닐사이클로테트라실록산(일 예로, 1,3,5,7-
 테트라이소프로필-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-
 5 펜타(C_{1-6})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-4})알케닐사이클로펜타실록산(일 예로, 1,3,
 5,7,9-펜타이소프로필-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 1,3,5-
 트리(C_{1-6})알킬-1,3,5-트리(C_{2-4})알케닐사이클로트리실록산(일 예로, 1,3,5-
 트리-sec-뷰틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C_{1-6})
 알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-4})알케닐사이클로테트라실록산(일 예로, 1,3,5,7-
 10 테트라-sec-뷰틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-
 펜타(C_{1-6})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-4})알케닐사이클로펜타실록산(일 예로, 1,3,
 5,7,9-펜타-sec-뷰틸-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 1,3,5-트리
 (C_{1-6})알킬-1,3,5-트리(C_{2-4})알케닐사이클로트리실록산(일 예로, 1,3,5-트리
 에틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산), 1,3,5,7-테트라(C_{1-6})알킬-1,3,
 15 5,7-테트라(C_{2-4})알케닐사이클로테트라실록산(일 예로, 1,3,5,7-테트라에틸-
 1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산), 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-6})알킬-1,3,
 5,7,9-펜타(C_{2-4})알케닐사이클로펜타실록산(일 예로, 1,3,5,7,9-펜타에틸-1,3,
 5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산), 헥사(C_{2-4})알케닐사이클로트리실록산
 (일 예로, 헥사비닐사이클로트리실록산), 옥타(C_{2-4})알케닐사이클로테트라
 20 실록산(일 예로, 옥타비닐사이클로테트라실록산), 데카(C_{2-4})알케닐사이클로
 펜타실록산(일 예로, 데카비닐사이클로펜타실록산) 및 이들의 조합으로
 구성된 군으로부터 선택된다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포배양 기판은 세포
 스페로이드 형태의 세포 집합체 제조를 위한 세포배양 기판이다. 분화 또는
 25 미분화 세포를 본 발명의 세포배양 기판 상에서 배양하여 세포 스페로이드
 형태의 세포 집합체를 형성시킬 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포배양 기판은
 유도만능줄기세포 제조를 위한 세포배양 기판이다. 체세포, 생식세포,
 암세포 등의 분화된 세포를 본 발명의 세포배양 기판 상에서 배양하여 이들
 30 분화세포로부터 만능줄기세포를 유도(형성)할 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한

중합체는 세포배양 기관의 상에 코팅된다. 이러한 중합체의 표면 코팅은 당해분야에 잘 알려진 화학 기상 증착법으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포배양 기관은 세포배양을 위한 배양기구(배양장치) 내에 구비될 수 있다.

- 5 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포배양 기관은 물 접촉각이 90도 이상(예컨대, 90-100도)이다.

- 10 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 세포배양 기관 상에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 세포배양 기관 상에서 분화된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 유도만능줄기세포의 제조방법을 제공한다.

- 15 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포의 배양은 배지에서 실시한다. 즉, 세포의 배양은 배지의 존재 하에서 사이클로실록산이 형성한 중합체 상에서 이루어진다. 본 명세서에서 사용된 용어, "배지(culture media)"는 체외배양 조건에서 세포의 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 달리 선택할 수
20 있다. 배양에 사용되는 배지로는, 예를 들어, 세포배양 최소배지(cell culture minimum medium; CCMM)를 사용할 수 있으며, 상기 세포배양 최소배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포배양 최소배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle),
25 RPMI1640, F-10, F-12, αMEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있다.

- 30 세포의 배양 방법이나 배양 조건은 본 발명의 세포배양 기관을 사용하는 점을 제외하면, 통상의 세포배양 방법이나 배양 조건을 그대로 사용할 수 있다. 동물세포의 배양 방법 및 배양 조건은 당해분야에 잘 알려진 참고 서적인 Animal Cell Culture: A Practical Approach

제3판(Masters편, Oxford University Press, 2000)에 나타나 있으며, 세포 배양을 위한 시약 및 키트류는 Sigma-Aldrich사, Invitrogen/GIBCO사, Clontech사, Stratagene사 등의 시판 업자로부터 입수 가능하다.

5 세포의 배양은 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체가 형성될 때까지 이루어질 수 있으며, 예를 들어 10시간 내지 60시간(일예로, 10시간 내지 48시간 또는 20 시간 내지 48시간) 동안 이루어질 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 분화된 세포는 체세포 또는 암세포이다. 상기 체세포는 생체를 구성하는 세포 중 생식세포 이외의 모든 세포를 포함한다. 하나의 특정예에 따르면, 상기 체세포는 포유류(예컨대, 10 마우스, 랫트, 토끼, 돼지, 양, 염소, 소, 원숭이 및 인간)의 체세포이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체의 제조를 위하여 본 발명의 세포배양 기관 상에서 배양되는 세포는, 분화된 세포(예컨대, 체세포, 생식세포, 암세포) 또는 미분화 세포(예컨대, 중간엽줄기세포와 지방 유래 줄기세포와 같은 줄기세포)이다.

15 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포 스페로이드는 SOX2, OCT4 또는 Nanog를 발현한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 세포 스페로이드는 β -카테닌과 서바이빈(survivin) 단백질을 부착세포에 비하여 더 높은 수준으로 발현한다.

20 하기 실시예에서는 중합체 박막이 증착된 세포배양 기관에서 체세포를 배양하여 세포 스페로이드 형태의 집합체를 형성시킨 후, 세포 스페로이드의 유전자 및 단백질 발현 양상이 본래의 세포와 차이가 있음을 확인하여 세포가 재프로그래밍 되었음을 확인하였다(도 3 내지 8 참조). 또한, 쥐 유래의 섬유아세포를 상기 세포배양 기관에서 배양한 결과, 25 미분화 다능성줄기세포에서 반드시 발현되어야 하는 유전자인 OCT4와 Nanog가 발현되었음을 확인하였으며(도 5 및 8 참조), RT-PCR을 통하여 유전자 레벨에서도 다능성과 관련된 유전자인 SOX2의 발현을 확인하였다(도 6 참조).

30 유도만능줄기세포 형성을 확인하는 방법(세포 다능성을 확인하는 방법)으로는, AP 염색, 세포 형광 염색, 줄기세포-특이적 유전자 발현 및 바이러스 유전자 사일런싱의 정량 PCR 분석, 키메라 형성 분석 및 생식

계열 트랜스미션 검출 등의 방법을 이용할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 사이클로실록산 화합물을 단량체로 포함하는 중합체 박막을 증착을 통하여 기판 상에
5 형성시키는 단계를 포함하는 본 발명의 세포배양 기판의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 중합체 박막은 화학 기상 증착법으로 기판 상에 형성된다. 일례로, 상기 중합체 박막은 개시제를 이용하는 화학 기상 증착법(iCVD)으로 기판 상에 형성될 수 있다. iCVD는
10 공정 전체에서 첨가제나 용매가 전혀 사용되지 않아 생성된 고분자 박막의 순도가 대단히 높기 때문에 세포배양에의 적용에 있어서 유해한 용매를 사용하지 않는다는 장점이 있다. iCVD에 의한 증착은 중합체 박막이 증착되는 기판 표면의 온도를 35-45℃, 반응기 내 챔버의 압력을 200-250 mbar로 유지하면서 30-60분 동안 실시할 수 있다.

15

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판과 이의 제조방법, 및 상기 세포배양 기판을 이용하여 세포
20 스페로이드 형태의 세포 집합체 또는 유도만능줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

(ii) 본 발명의 세포배양 기판 상에서 세포를 배양함으로써 손쉽게 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체를 형성시킬 수 있고, 나아가 상기 세포배양 기판은 유도만능줄기세포의 제조를 위한 세포 배양 플랫폼으로
25 활용가능하다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 세포배양 기판의 모식도를 보여준다.

30 도 2는 증착 전후의 세포배양 기판의 표면 접촉각을 측정한 결과를 보여준다.

도 3은 본 발명의 세포배양 기관 상에서 배양하여 형성된 세포 스페로이드의 이미지를 보여준다.

도 4 및 5는 면역 염색법을 통한 세포 스페로이드의 분석 결과를 보여준다. 스케일 바는 100 μm 이다.

5 도 6은 세포 스페로이드의 유전자 분석 결과를 보여준다.

도 7은 세포 스페로이드의 단백질 분석 결과를 보여준다.

도 8은 세포 스페로이드에서 Nanog가 발현되었음을 보여준다. 스케일 바는 100 μm 이다.

10 도 9는 다양한 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체로 표면 코팅된 각각의 세포배양 기관 상에서 배양하여 형성된 세포 스페로이드의 이미지를 보여준다.

도 10은 사이클로실록산 화합물을 포함하는 다양한 공중합체로 표면 코팅된 각각의 세포배양 기관 상에서 배양하여 형성된 세포 스페로이드의 이미지를 보여준다.

15

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

20

실시예

실시예 1. 중합체 박막이 표면 코팅된 세포배양 기관의 제조

25 도 1에 나타낸 바와 같이, 화학기상증착 반응기(iCVD, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)의 단량체통에 단량체인 V4D4(2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산, Sigma-Aldrich)를 넣고, 70°C로 가열하였다. TBPO(tert-butyl peroxide, Sigma-Aldrich)를 개시제로 하여, 이를 개시제통에 넣고 상온으로 유지하였다. 폴리스티렌 세포 배양 플레이트를 기관으로 하여 증착을 진행하였다. V4D4 증착 시, V4D4 단량체와 TBPO를 1:1 비율(유량 기준, 단위: sccm)로 화학기상증착 반응기
30 내에 흘려주면서, 반응기 내의 필라멘트의 온도를 200°C, 반응기 내의 기관

온도를 40℃, 반응기 내 챔버의 압력을 200 mbar 로 유지하면서 40 분 증착을 수행하여, 약 200 nm 두께의 pV4D4(poly-V4D4)가 증착된 세포배양 기판을 제조하였다.

5 실시예 2. 접촉각 측정

중합체 박막을 증착한 후 접촉각 측정장비(Phoenix series, S. E. O. Co. Ltd)를 이용하여 각 측정 마다 8 μ l 증류수 물방울을 기판의 표면에 떨어뜨리고, 기판의 표면 접촉각을 측정하였다.

그 결과, 도 2 에 나타난 바와 같이, 실리콘 웨이퍼 표면의 중합체 박막 증착 전후의 접촉각 사진을 비교할 때, 중합체 박막이 기판의 표면에 균일하게 도포되면서 접촉각이 증착 후에 달라지는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

실시예 3. 세포 스페로이드 형성

15 실시예 1 에서 제조한 중합체 박막이 증착된 세포배양 기판(접시)에서 세포를 배양한 후, 세포 스페로이드 형성 여부를 확인하였다. 사용한 세포는 도 3 에 나타난 사람 유래의 암세포, 줄기세포, 체세포 및 쥐 유래의 체세포와 암세포들이다. 암세포의 배양은 최소배지(cell culture minimum medium; CCMM)에 10%(v/v)의 소태아
20 혈청(fetal bovine serum, Thermo) 및 5%의 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신(penicillinestreptomycin, Gibco)을 첨가한 조성의 배지를 사용하여 실시하였으며, NIH3T3 와 같은 체세포와 hMSC(Human Mesenchymal stem cells)와 hADSC(Human adipose-derived stem cells)와 같은 줄기세포의 배양은 아래의 표 1(인간줄기세포) 및 2(쥐 줄기세포)에
25 나타난 조성의 배지(Gibco)를 사용하여 실시하였다. 배양은 24 시간 동안 실시하였다.

【표 1】

시약	최종 농도	100 mL 내 용량
KnockOut™ DMEM	1X	78 mL
KnockOut™ SR	20%	20 mL

NEAA*	0.1 mM	1 mL
bFGF	4 ng/mL	40 μ L
L-glutamine	2 mM	1 mL
2-Mercaptoethanol**	0.1 mM	182 μ L

* 비필수 아미노산; ** 사용 전에 첨가

【표 2】

시약	최종 농도	100 mL 내 용량
KnockOut™ DMEM	1X	83 mL
KnockOut™ SR	15%	15 mL
NEAA*	0.1 mM	1 mL
LIF	10 ng/mL	100 μ L
L-glutamine	2 mM	1 mL
2-Mercaptoethanol**	0.1 mM	182 μ L

* 비필수 아미노산; ** 사용 전에 첨가

5 도 3 에 나타난 바와 같이, 중합체 박막 상에서 다양한 세포를 배양한 결과, 배양 24 시간 내에 특정 세포에 국한되지 않고 모든 세포에서 세포 스페로이드 형태의 세포 집합체를 얻을 수 있었다(도 3).

실시예 4. 세포 스페로이드의 면역형광염색

10 실시예 1 에서 제조한 중합체 박막이 증착된 세포배양 기판(접시)에서 얻어진 세포 스페로이드를 면역형광염색법을 통해 염색하였다. 면역형광염색법을 위해, 세포 스페로이드를 0.1% 젤라틴(Gelatin)으로 코팅된 커버 글라스(Cover glass)에 옮겨서 하루 동안 배양하였다. 세포를 실온에서 10 분 동안 4% 파라포름알데하이드
15 (paraformaldehyde)를 이용하여 고정시켰다. DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)을 이용하여 3 번 세척한 후에, 15 분 동안 실온에서 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)에 세포투과 시켰고, 다시 DPBS 를 이용하여 3 번 세척하였다. 1 차 항체의 비특이적 반응을 막기 위해 10 분 동안 1% BSA(Bovine serum albumin)을 처리하였다. 세포를 DPBS/0.1% BSA 로

회색시킨 테나신(Tenascin)에 부착하는 1 차 항체(CHEMICON)를 사용하여
 4℃에서 12 시간 동안 반응하였다. 세척 후, 세포를 1 시간 동안 실온에서
 DPBS 에 회색시킨 FITC(Fluorescein isothiocyanate)가 부착된 2 차
 항체(SantaCruz)를 사용하여 반응하였다. 세척한 후, 세포를 DPBS 에
 5 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 회색시킨 Hoechst 33342(Invitrogen) 5 분 동안 대비염색하였다.
 커버 글래스는 마운팅 미디엄(Mounting medium)을 이용하여 슬라이드
 글래스(Slide glass) 위에 고정하여 니콘 공초점 현미경(Nikon confocal
 microscope)으로 분석하였다. 사용된 항체를 표 3 에 나타내었다.

【표 3】

항체	카탈로그 No.	제조사	희석
anti-Tenascin	AB19011	Chemicon	1:100 (면역염색)
anti-rabbit IgG-FITC	SC-2012	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (면역염색)
anti- β Catenin	SC-7963	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (웨스턴 블랏)
anti-survivin	71G4B7	Cell Signalling	1:1000 (웨스턴 블랏)
anti-GAPDH	SC-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (웨스턴 블랏)
anti-rabbit IgG-HRP	NCI1460	Thermo scientific	1:5000 (웨스턴 블랏)
anti-mouse IgG-HRP	NCI1430	Thermo scientific	1:5000 (웨스턴 블랏)

10

그 결과, 도 4 및 5 에 나타난 바와 같이, 본래의 세포와는 달라진
 유전자 발현 현상이 세포 스페로이드 내부에 존재한다는 것을
 확인하였다(도 4 및 5).

15 실시예 5. 세포 스페로이드의 유전자 분석

실시예 1 에서 제조한 중합체 박막이 증착된 세포배양
 기판(접시)에서 얻어진 세포 스페로이드를 대상으로 유전자 분석을
 실시하였다. 전체 RNA(Ribonucleic acid)는 Hybrid-R™ 키트(GeneAll)를
 사용하여 형성된 세포 스페로이드로부터 추출하였다. cDNA 합성은
 20 AccuPower RocketScript RT-PCR premix 키트(Bioneer)를 사용하여

수행하였다. 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 다음 조건에 따라 Thermal Cyclers PCR 기계(Bio-Rad)를 사용하여 수행하였다. 42℃에서 60 분간 cDNA 합성을, 그 다음 95℃에서 5 분간 미리 변성과정(pre-denaturation)을, 다시 95℃에서 30 초간 변성(denaturation)을, 55℃에서 30 초간 열처리 과정(annealing)을, 72℃에서 10 초간 연장 과정(extension)을 마치고 변성과정으로의 반복을 35 주기(cycles) 실시하고, 72℃에서 5 분 동안 마지막 연장하였다. 사용한 프라이머를 표 4 에 나타내었다.

【표 4】

유전자	정방향 프라이머	역방향 프라이머
human Sox2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAACAGG (서열목록 제1서열)	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG (서열목록 제2서열)
human Gapdh	CGTCTTCACCACCATGGAGA (서열목록 제3서열)	CGGCCATCACGCCACAGTTT (서열목록 제4서열)
mouse Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA (서열목록 제5서열)	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA (서열목록 제6서열)
mouse Gapdh	TGTCCGTCGTGGATCTGAC (서열목록 제7서열)	CCTGCTTCACCACCTTCTTG (서열목록 제8서열)

그 결과, 도 6 에 나타난 바와 같이, 기존의 PS 세포배양 접시에서 배양된 세포에 비하여 유전자 발현 정도가 달라졌으며(도 6), 이러한 결과는 세포가 재프로그래밍 되었음을 보여준다.

실시에 6. 세포 스펜로이드의 단백질 분석

실시에 1 에서 제조한 중합체 박막이 증착된 세포배양 기판(접시)에서 얻어진 세포 스펜로이드를 단백질 수준에서 분석하였다. 형성된 세포 스펜로이드를 단백질분해효소 억제제 혼합물(Thermo scientific)이 포함된 RIPA 완충액으로 용해하고, 얼음에서 15 분 동안 배양한 다음, 4℃에서 10 분 동안 20,000 g 로 원심분리 하였다. 상층액을 분리하여 Bradford assay 키트(Bio-Rad)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 분리된 단백질을 SDS PAGE 로 분획하였고, 4℃에서

전기이동장치를 이용하여 PVDF(Polyvinylidene fluoride) 멤브레인(Millipore)으로 단백질을 이동시켰다. 막을 실온에서 30 분 동안 0.1% 트윈-20(Tween-20)과 5 % 탈지유(Skim milk)가 포함된 PBS 에서 반응시키고, 4℃에서 12 시간 동안 5% 탈지유가 포함된 PBS 에 희석된 1 차 항체(mouse anti-beta catenin, rabbit anti-survivin)를 반응시켰다. 0.1% 트윈-20 이 포함된 PBS 로 3 번 세척한 후, 막을 HRP(Horseradish peroxidase)가 부착된 2 차 항체(anti-mouse, anti-rabbit)로 실온에서 1 시간 동안 반응하였다. 상기 밴드를 ECL(Enhanced chemiluminescence, Thermo scientific) 용액으로 시각화하였다. 밴드를 ChemiDoc™ MP System(Bio-Rad)를 사용하여 단백질 밀도를 분석하였고, 로딩 대조군(GAPDH) 밴드로 표준화하였다. 사용된 항체를 상기 표 3 에 나타내었다.

그 결과, 도 7 에 나타난 바와 같이, 기존의 PS 세포배양 접시에서 배양된 세포에 비하여 단백질 발현 정도가 달라졌으며(도 7), 이러한 결과는 세포가 재프로그래밍 되었음을 보여준다.

실시에 7. 마우스 배아섬유아세포의 세포 스페로이드 형성

Nanog 가 발현되면 녹색형광단백질(Green fluorescence protein; GFP)이 동시에 발현되도록 유전자 변형된 암컷 쥐(STOCK Tg(Nanog-GFP,Puro)1Yam (No.RBRC02290), RIKEN BRC)에서, 임신 후 16 일째의 배아 상태의 쥐를 채취하여 체세포(Mouse embryonic fibroblast)를 배양하였다. 실시예 1 에서 제작된 중합체 박막이 증착된 세포배양 기판(접시)에서 7 일 동안 배양하는 동안 배양액을 1 번 갈아주었다. 세포 배양액의 경우 표 2 에 나타난 배양성분이 포함된 쥐 줄기세포 배양액을 사용하였다. 배양 7 일째 형성된 세포 스페로이드는 공초점 현미경으로 관찰하기 위해 고정액(4% paraformaldehyde)을 사용하여 고정하였고, 고정된 세포 스페로이드를 공초점 현미경(Zeiss confocal microscope)으로 관찰하였다.

그 결과, 도 8 에 나타난 바와 같이, 형성된 세포 스페로이드에서 녹색형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며(도 8), 이러한 결과는 줄기세포의 표지인자 중 하나인 Nanog 가 세포 스페로이드 내에서 발현됨의 보여준다.

실시예 8. 다양한 사이클로실록산 중합체의 세포 스페로이드 형성 효과

실시예 1 과 같이, 화학기상증착 반응기(iCVD, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)의 단량체통에 단량체인 표 5 의 사이클로실록산(Sigma-Aldrich)을 넣고, 70℃로 가열하였다. TBPO(tert-butyl peroxide, Sigma-Aldrich)를 개시제로 하여, 이를 개시제통에 넣고 상온으로 유지하였다. 폴리스티렌 세포 배양 플레이트를 기관으로 하여 증착을 진행하였다. 증착 시, 단량체와 TBPO 를 1:1 비율(유량 기준, 단위: sccm)로 화학기상증착 반응기 내에 흘려 주면서, 반응기 내의 필라멘트의 온도를 200℃, 반응기 내의 기관 온도를 40℃, 반응기 내 챔버의 압력을 200 mbar 로 유지하면서 40 분 증착을 수행하여, 약 200 nm 두께의 사이클로실록산 중합체가 증착된 세포배양 기관을 제조하였다.

【표 5】

사이클로실록산 단량체	
①	1,3,5-트라이소프로필-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산
②	1,3,5,7-테트라소프로필-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산
③	1,3,5,7,9-펜타소프로필-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산
④	1,3,5-트리-sec-뷰틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산
⑤	1,3,5,7-테트라-sec-뷰틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산
⑥	1,3,5,7,9-펜타-sec-뷰틸-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산
⑦	1,3,5-트리에틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산
⑧	1,3,5,7-테트라에틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산
⑨	1,3,5,7,9-펜타에틸-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산
⑩	헥사비닐사이클로트리실록산
⑪	옥타비닐사이클로테트라실록산
⑫	데카비닐사이클로펜타실록산

이후, 사이클로실록산 중합체 박막이 증착된 세포배양 기관에서 세포를 배양한 후, 세포 스페로이드 형성 여부를 확인하였다. 사용한 세포는 도 9 에 나타난 암세포들이며, 이의 배양은 최소배지에 10%(v/v)의

소태아 혈청(Thermo) 및 5%의 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 첨가한 조성의 배지를 사용하여 48 시간 동안 실시하였다.

실험 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9의 ①은 1,3,5-트라이소프로필-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산이 형성한 중합체 상에서 T47D 세포를 배양한 결과를 보여주며, ②는 1,3,5,7-테트라소프로필-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산이 형성한 중합체 상에서 NCI-H358 세포를 배양한 결과를 보여주고, ③은 1,3,5,7,9-펜타소프로필-1,3,5,7,9-펜타비닐사이클로펜타실록산이 형성한 중합체 상에서 HELA 세포를 배양한 결과를 보여주며, ④는 1,3,5-트리-sec-뷰틸-1,3,5-트리비닐 사이클로트리실록산이 형성한 중합체 상에서 22RV1 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑤는 1,3,5,7-테트라-sec-뷰틸-1,3,5,7-테트라 비닐사이클로 테트라실록산이 형성한 중합체 상에서 22RV1 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑥은 1,3,5,7,9-펜타-sec-뷰틸-1,3,5,7,9-펜타비닐 사이클로펜타 실록산이 형성한 중합체 상에서 U251 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑦은 1,3,5-트리에틸-1,3,5-트리비닐사이클로트리실록산이 형성한 중합체 상에서 CACO2 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑧은 1,3,5,7-테트라에틸-1,3,5,7-테트라비닐사이클로테트라실록산이 형성한 중합체 상에서 NCI-H358 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑨는 1,3,5,7,9-펜타에틸-1,3,5,7,9-펜타비닐 사이클로펜타실록산이 형성한 중합체 상에서 U251 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑩은 헥사비닐사이클로트리실록산이 형성한 중합체 상에서 HEPG2 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑪은 옥타비닐사이클로테트라실록산이 형성한 중합체 상에서 MCF-7 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑫는 데카비닐사이클로펜타실록산이 형성한 중합체 상에서 MCF-7 세포를 배양한 결과를 보여준다.

도 9에 나타난 바와 같이, 다양한 사이클로실록산 화합물이 형성한 각각의 중합체 상에서 세포를 배양함으로써 세포 스페로이드를 형성시킬 수 있었다(도 9).

실시에 9. 공중합체의 세포 스페로이드 형성 효과

화학기상증착 반응기(iCVD, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)의 단량체통에 제 1 단량체인 V4D4(Sigma-Aldrich)와 표 6에서 선택된 제 2 단량체를 넣고,

각각 가열하였다. 이때, 가열온도는 다음과 같았다. V4D4: 70℃, ①번 단량체: 70℃, ②번 단량체: 40℃, ③번 단량체: 35℃, ④번 단량체: 가열하지 않음(상온), ⑤번 단량체: 50℃, ⑥번 단량체: 80℃, ⑦번 단량체: 40℃, ⑧번 단량체: 50℃, ⑨번 단량체: 가열하지 않음(상온), ⑩번 단량체: 40℃, ⑪번 단량체: 50℃, ⑫번 단량체: 50℃. TBPO(tert-butyl peroxide, Sigma-Aldrich)를 개시제로 하여, 이를 개시제통에 넣고 상온으로 유지하였다. 폴리스티렌 세포 배양 플레이트를 기판으로 하여 증착을 진행하였다. V4D4 와 제 2 단량체의 공중합체 박막 증착 시, V4D4 단량체, 제 2 단량체, 그리고 TBPO 를 9:1:9 비율(유량 기준, 단위: sccm)로 반응기 내에 흘려주면서, 반응기 내의 필라멘트의 온도를 200℃, 반응기 내의 기판 온도를 40℃, 반응기 내 챔버의 압력을 250 mbar 로 유지하면서 40 분 증착을 수행하여, 약 200 nm 두께의 공중합체가 증착된 세포 배양 플레이트를 얻었다.

【표 6】

공중합체 형성을 위한 제 2 단량체		입수처
①	1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산	Sigma- Aldrich
②	헥사비닐디실록산	Gelest Inc.
③	글라이시딜 메타크릴레이트	Sigma- Aldrich
④	퍼플루오로 메타크릴레이트	Sigma- Aldrich
⑤	벤질메타크릴레이트	Sigma- Aldrich
⑥	3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-헵타데카플루오로데실메타크릴레이트	Sigma- Aldrich
⑦	4-비닐피리딘	Sigma- Aldrich
⑧	뷰틸메타크릴레이트	Sigma- Aldrich
⑨	스티렌	Sigma- Aldrich
⑩	1-비닐이미다졸	Sigma- Aldrich
⑪	디비닐벤젠	Sigma- Aldrich
⑫	프로파질아크릴레이트	Sigma- Aldrich

15

이후, 사이클로실록산 공중합체 박막이 증착된 세포배양 기판에서 세포를 배양한 후, 세포 스페로이드 형성 여부를 확인하였다. 사용한 세포는 도 10 에 나타난 암세포들이며, 이의 배양은 최소배지에 10%(v/v)의 소태아 혈청(Thermo) 및 5%의 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 첨가한 조성의 배지를 사용하여 48 시간 동안 실시하였다.

20

실험 결과는 도 10에 나타내었다. 도 10의 ①은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 1,3,5-트리비닐-1,3,5-트리메틸사이클로트리실록산의 공중합체 표면에서 Hep3B 세포를 배양한 결과를 보여주고, ②는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 헥사비닐디실록산의 공중합체 표면에서 OVCAR3 세포를 배양한 결과를 보여주며, ③은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 글라이시딜 메타크릴레이트의 공중합체 표면에서 NCI-H460 세포를 배양한 결과를 보여주고, ④는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 퍼플루오로 메타크릴레이트의 공중합체 표면에서 HT29 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑤는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 벤질메타크릴레이트의 공중합체 표면에서 HepG2 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑥은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-헵타데카플루오로데실메타크릴레이트의 공중합체 표면에서 Hep3B 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑦은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 4-비닐피리딘의 공중합체 표면에서 B16BL6 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑧은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 뷰틸메타크릴레이트의 공중합체 표면에서 B16BL6 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑨는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 스티렌의 공중합체 표면에서 A549 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑩은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 1-비닐이미다졸의 공중합체 표면에서 BT474 세포를 배양한 결과를 보여주며, ⑪은 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 디비닐벤젠의 공중합체 표면에서 BT474 세포를 배양한 결과를 보여주고, ⑫는 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐사이클로테트라실록산과 프로파질아크릴레이트의 공중합체 표면에서 NCI-H460 세포를 배양한 결과를 보여준다.

도 10에 나타난 바와 같이, 사이클로실록산이 형성한 다양한 공중합체 상에서 세포를 배양함으로써 세포 스페로이드를 형성시킬 수 있었다(도 10).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의
5 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

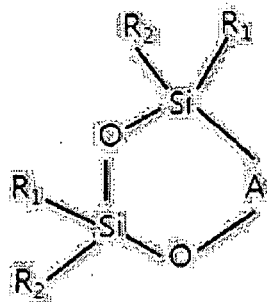
【청구항 1】

사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체를 포함하는 세포배양 기판.

5 【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 사이클로실록산 화합물은 하기 화학식 1 로 표시되는 것을 특징으로 하는 세포배양 기판:

화학식 1



10 상기 식에서,

A 는 $\text{-(Si(R}_1\text{)(R}_2\text{)-O)-}_n$ 이고($n=1-8$ 의 정수);

R_1 은 서로 독립적으로 수소 또는 C_{2-10} 알케닐이고(단, R_1 중 적어도 두 곳은 C_{2-10} 알케닐임);

R_2 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 할로, 금속원소, C_{5-14} 헤테로사이클, C_{3-10} 사이클로알킬 또는 C_{3-10} 사이클로알케닐이다.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 사이클로실록산은 R_1 위치에 $n+1$ 개 또는 $n+2$ 개의 C_{2-10} 알케닐을 갖는 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 사이클로실록산 화합물은 2,4,6,8-테트라(C_{1-10})알킬-2,4,6,8-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5-

- 트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 1,3,5-트리(C_{1-10})알킬-1,3,5-트리(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 1,3,5,7-테트라(C_{1-10})알킬-1,3,5,7-테트라(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 1,3,5,7,9-펜타(C_{1-10})알킬-1,3,5,7,9-펜타(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산, 헥사(C_{2-10})알케닐사이클로트리실록산, 옥타(C_{2-10})알케닐사이클로테트라실록산, 데카(C_{2-10})알케닐사이클로펜타실록산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 5】

- 제 1 항에 있어서, 상기 사이클로실록산 화합물이 형성한 중합체는 상기 사이클로실록산 화합물인 제 1 단량체와, 이와 중합할 수 있는 제 2 단량체가 형성한 공중합체인 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 6】

- 제 5 항에 있어서, 상기 제 2 단량체는 제 1 단량체와 상이한 사이클로실록산 화합물인 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 7】

- 제 5 항에 있어서, 상기 제 2 단량체는 제 1 단량체와의 중합을 위한 탄소이중결합을 갖는 화합물인 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 8】

- 제 7 항에 있어서, 상기 제 2 단량체는 비닐기를 갖는 실록산, 메타크릴레이트계 단량체, 아크릴레이트계 단량체, 방향족 비닐계 단량체, 아크릴아마이드계 단량체, 말레익 안하이드라이드, 비닐기를 갖는 실라잔 또는 사이클로실라잔, 비닐기를 갖는 C_{3-10} 사이클로알케인, 비닐피롤리돈,

2-(메타크릴로일록시)에틸 아세토아세테이트, 1-(3-아미노프로필)이미다졸, 비닐이미다졸, 비닐피리딘, 비닐기를 갖는 실란 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

5 **【청구항 9】**

제 1 항에 있어서, 상기 세포배양 기판은 세포 스페로이드(cell spheroid) 형태의 세포 집합체 제조용인 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 10】

10 제 1 항에 있어서, 상기 세포배양 기판은 유도만능줄기세포 제조용인 것을 특징으로 하는 세포배양 기판.

【청구항 11】

15 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 세포배양 기판 상에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 스페로이드(cell spheroid) 형태의 세포 집합체의 제조방법.

【청구항 12】

20 제 11 항에 있어서, 상기 세포는 체세포, 생식세포, 암세포 또는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 13】

25 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 세포배양 기판 상에서 분화된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 유도만능줄기세포의 제조방법.

【청구항 14】

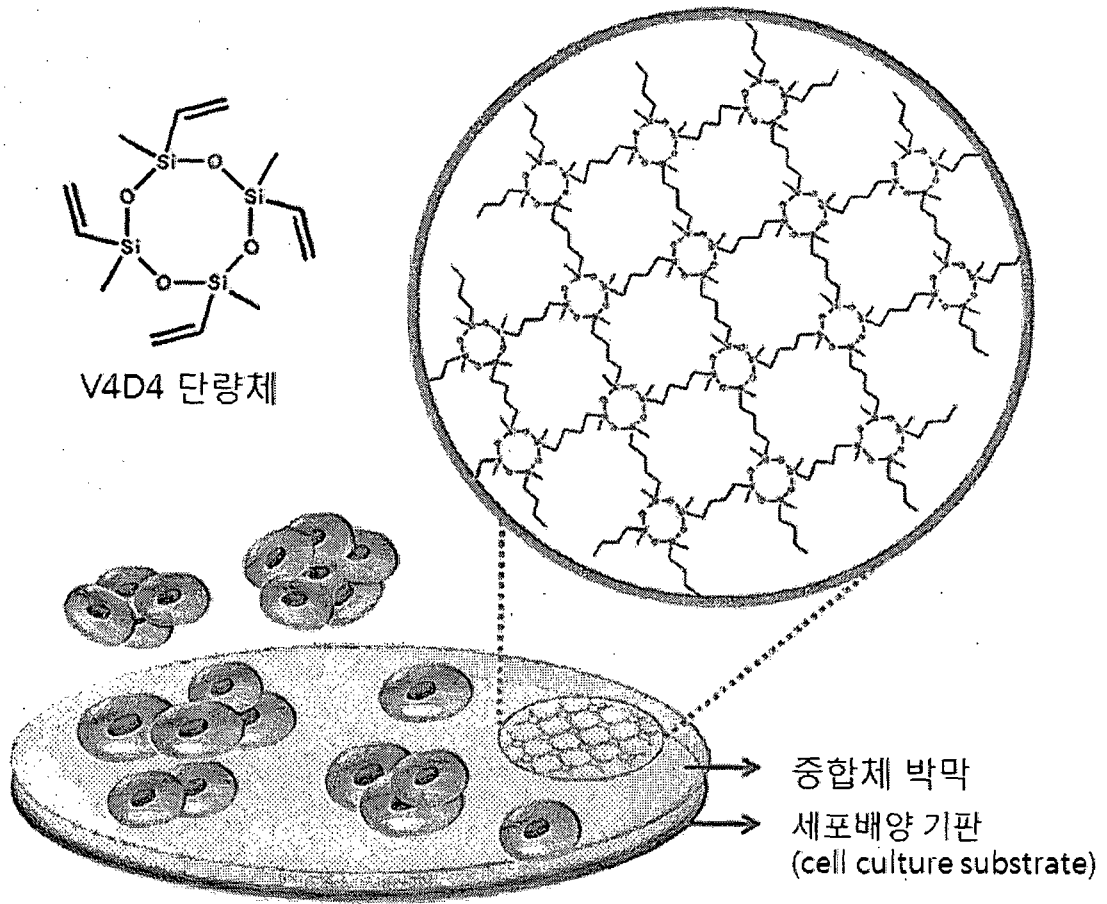
제 13 항에 있어서, 상기 분화된 세포는 체세포 또는 암세포인 것을 특징으로 하는 제조방법.

30 **【청구항 15】**

사이클로실록산 화합물을 단량체로 포함하는 중합체 박막을 증착을 통하여 기판 상에 형성시키는 단계를 포함하는 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 세포배양 기판의 제조방법.

1/10

도 1



2/10

도 2

기판: Silicon wafer



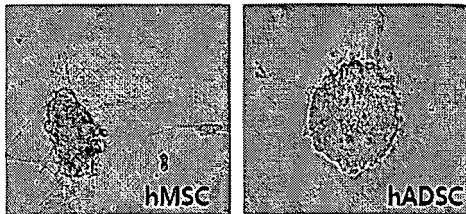
증착 전: 38°

증착 후: 96°

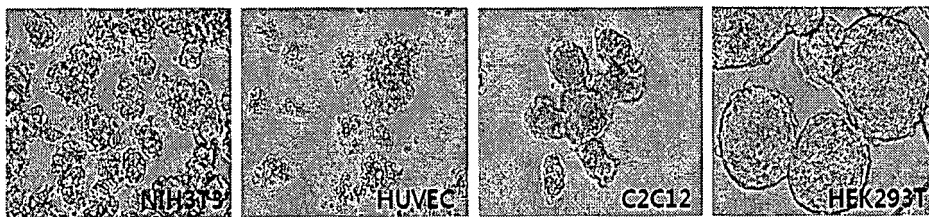
3/10

도 3

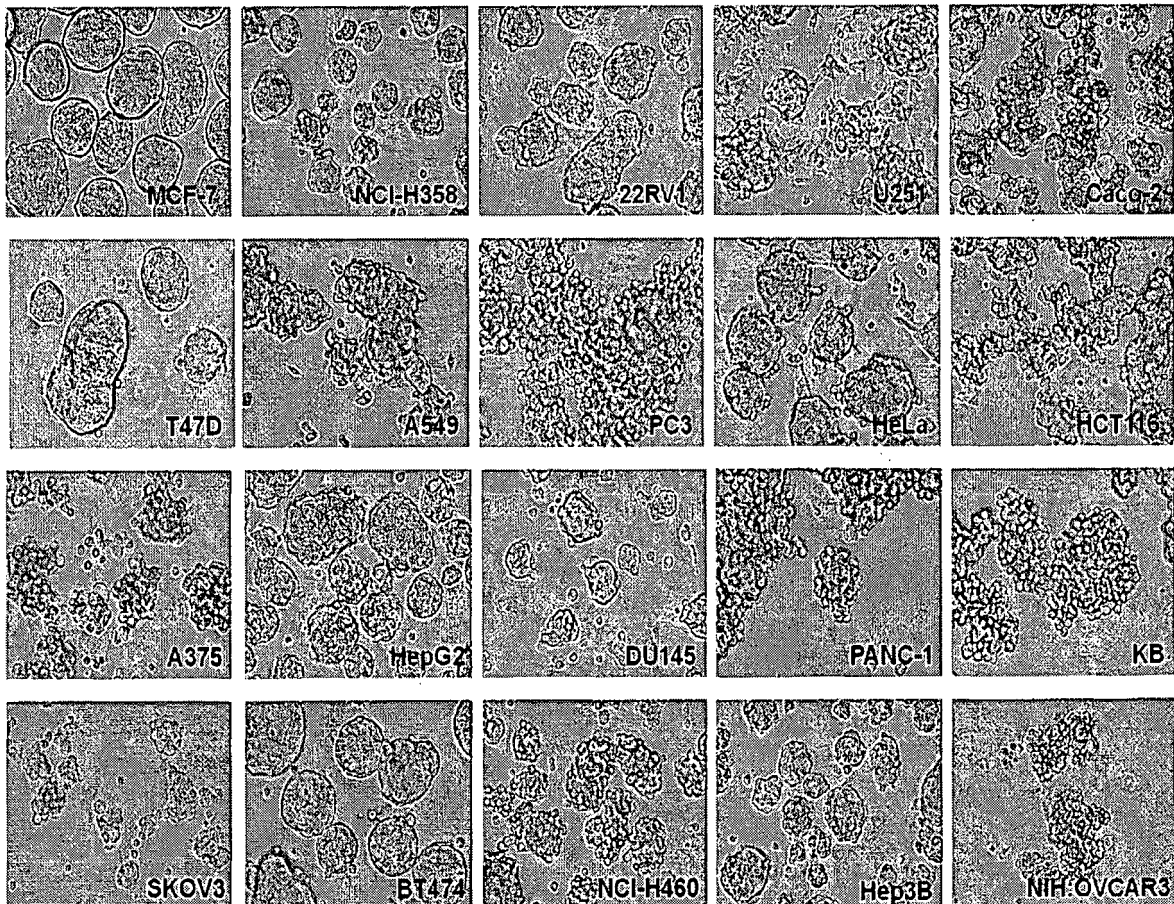
■ 줄기세포



■ 체세포



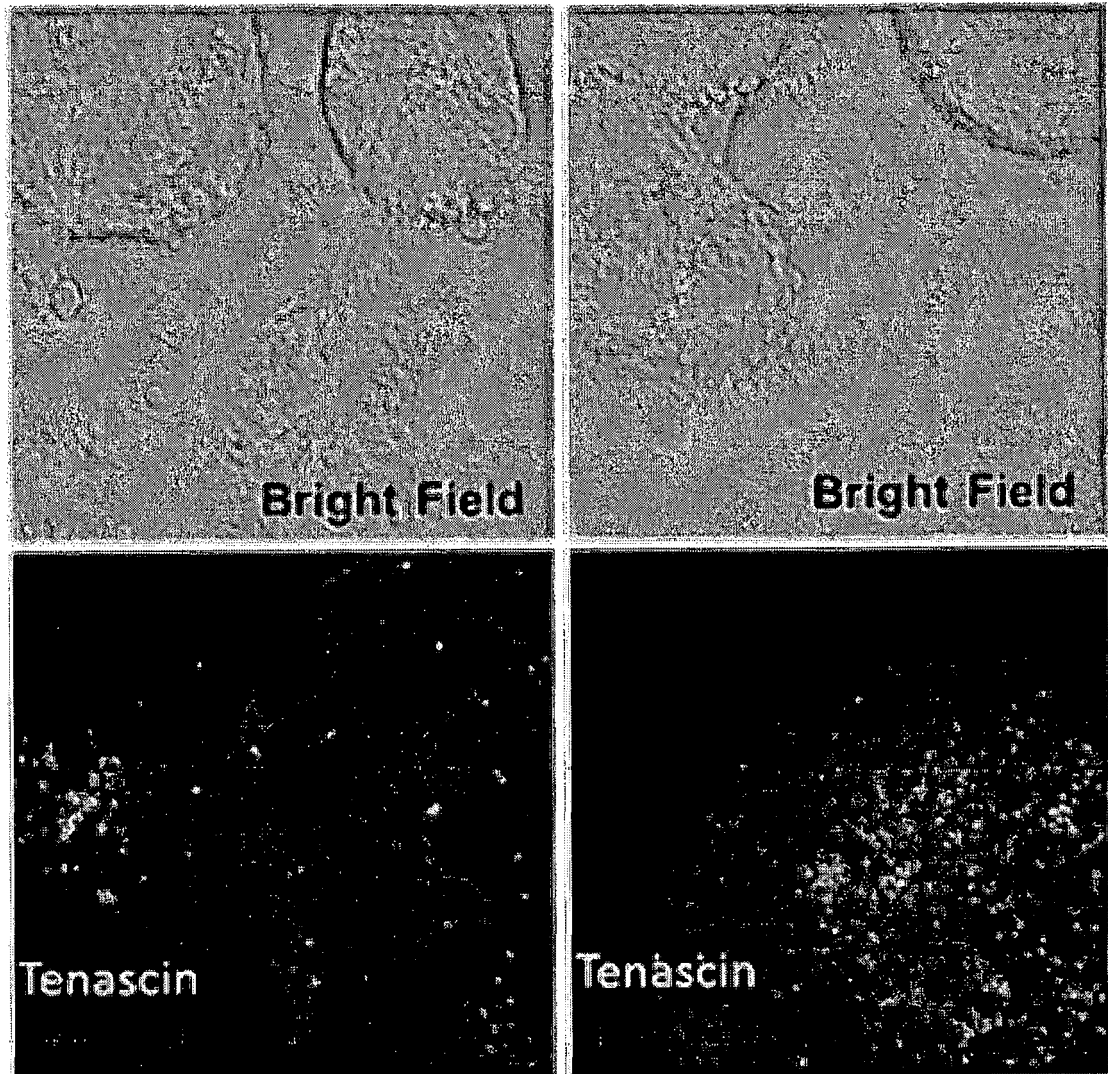
■ 암세포



4/10

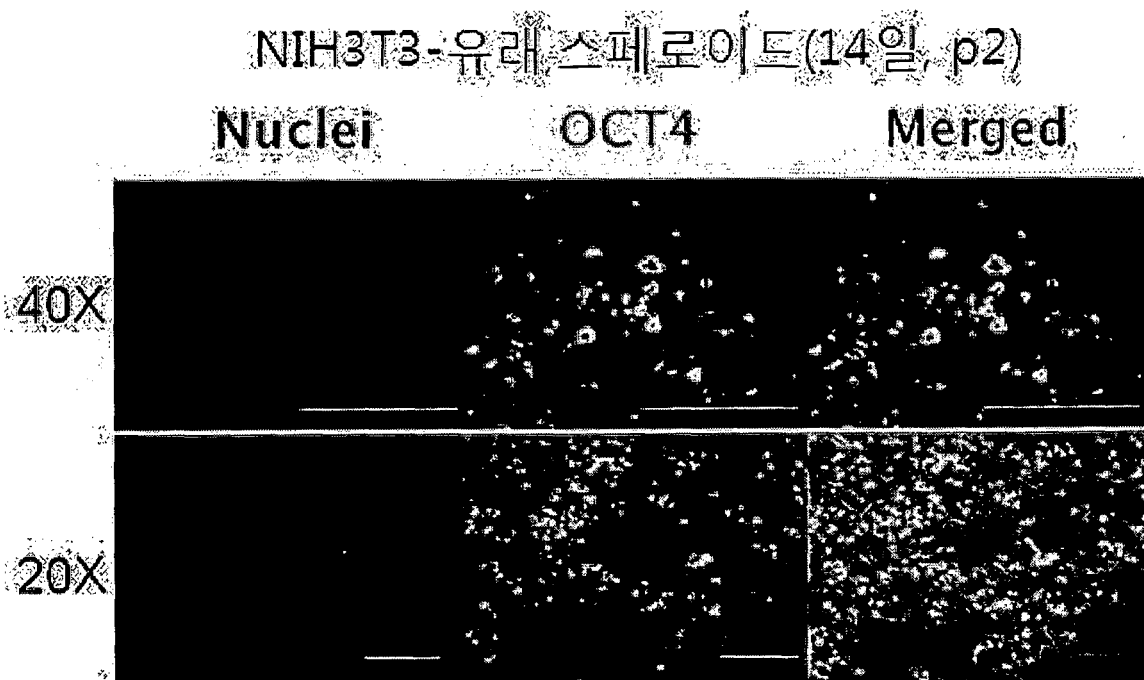
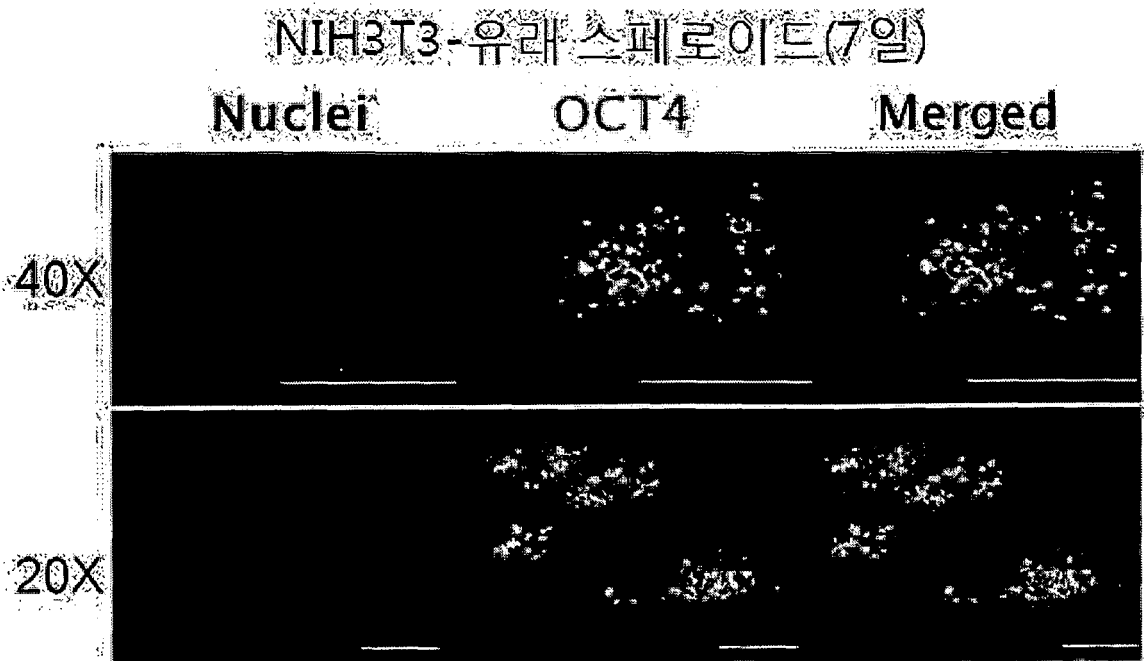
도 4

HEK293T cell



5/10

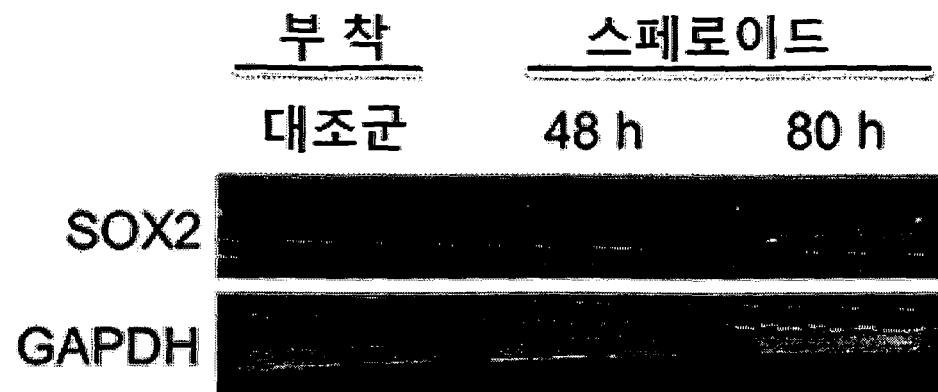
도 5



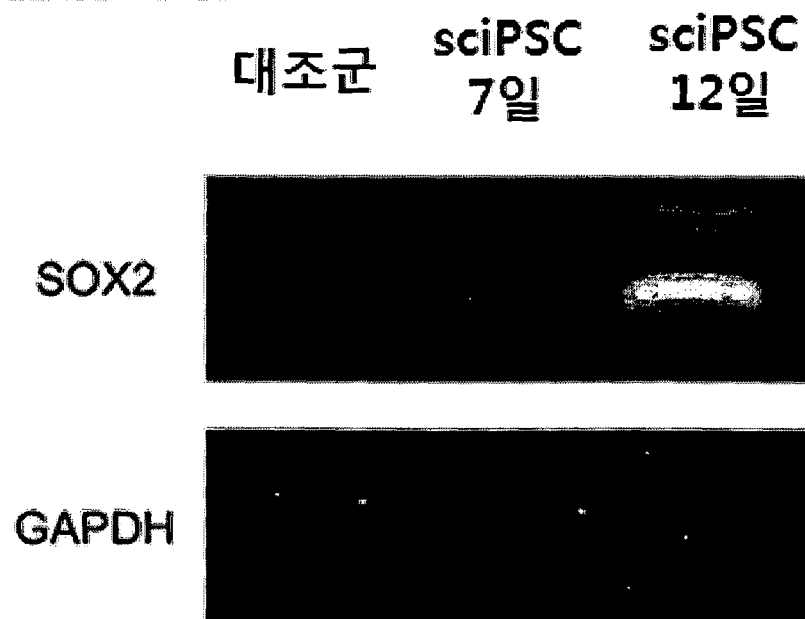
6/10

도 6

HEK293T Cell



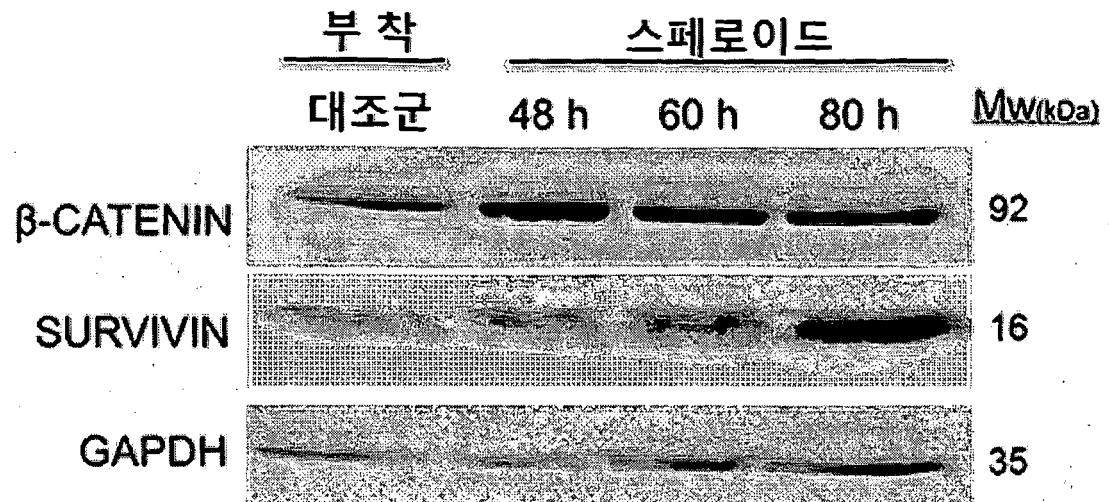
NIH3T3 Cell



7/10

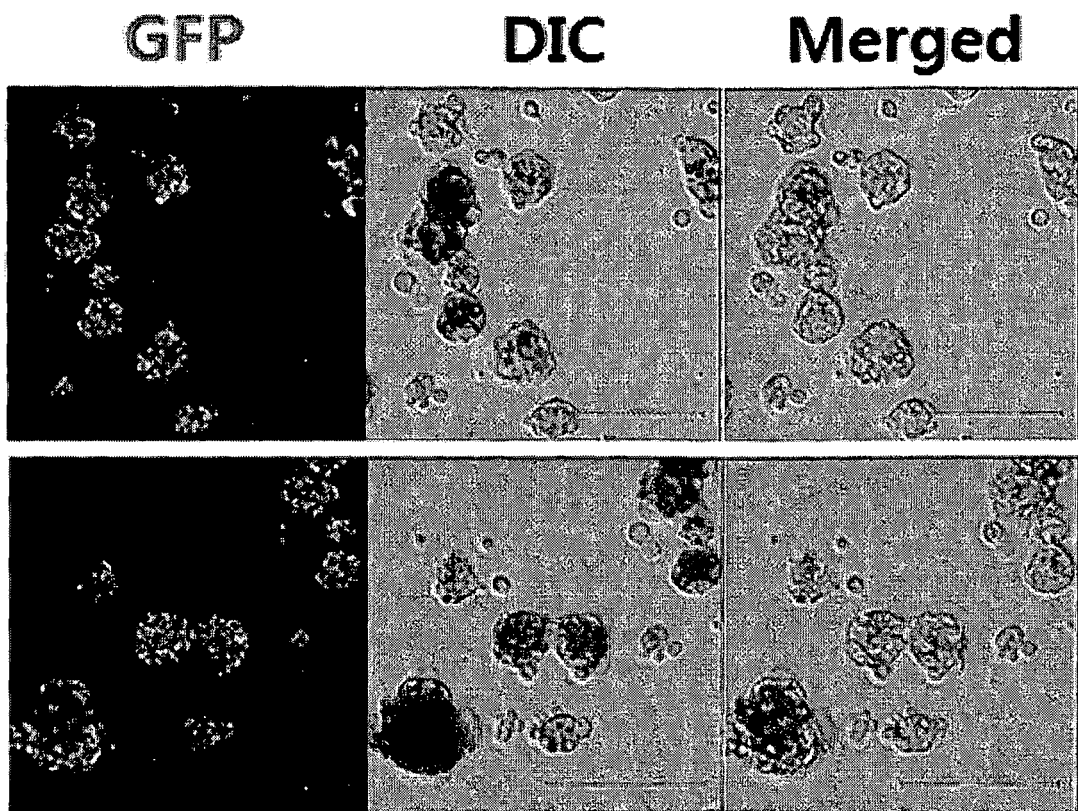
도 7

HEK293T cell



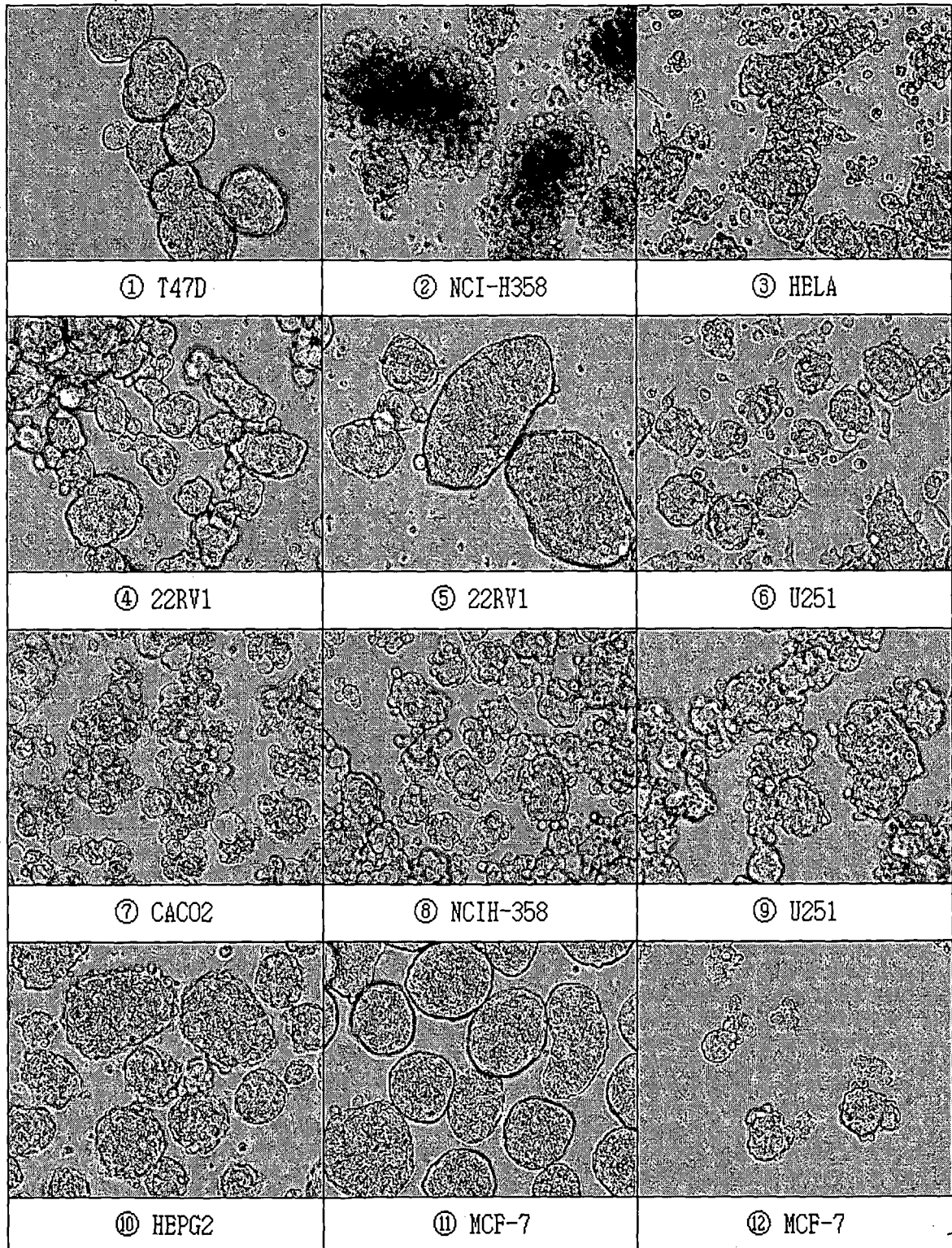
8/10

도 8



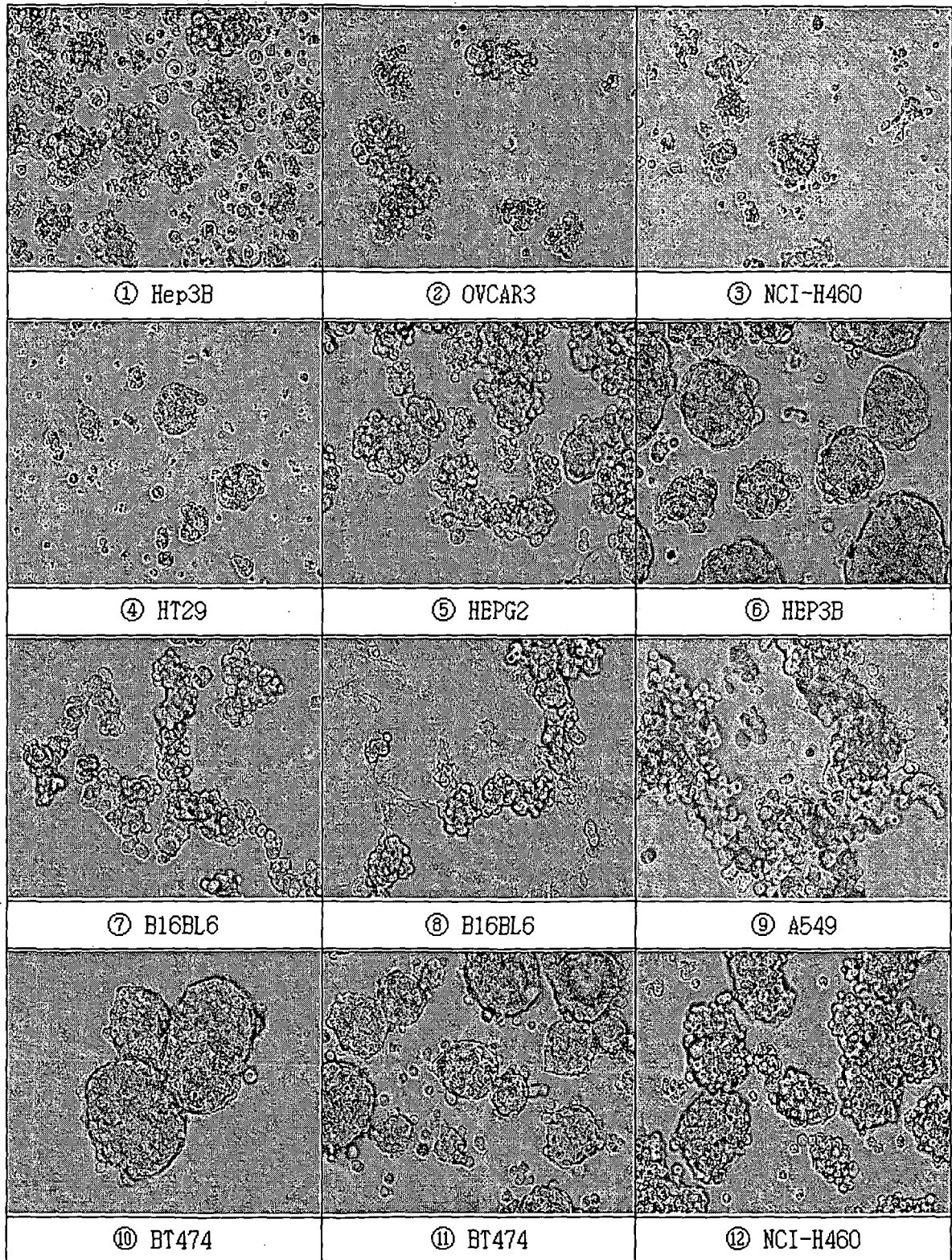
9/10

도 9



10/10

도 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007113**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12M 3/00(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C07F 7/08(2006.01)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)

C12M 3/00; C12M 1/00; C12N 5/06; C12N 5/02; C12M 1/32; C12N 5/074; C07F 7/08

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: cell culturing plate, cyclotetrasiloxane, polymer, cell spheroid, induced pluripotent stem cell**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0024244 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 09 March 2011 See claims 1, 5 and 11.	1-4, 15
A		5-14
A	JP 5155244 B2 (ADEKA CORP.) 06 March 2013 See claims 1 and 3.	1-15
A	JP 2008-289362 A (UNIV. TOKYO) 04 December 2008 See claims 1 and 17.	1-15
A	US 2013-0203159 A1 (ITOH, Tohru et al.) 08 August 2013 See abstract.	1-15
A	JP 2012-249547 A (OJI HOLDINGS CORP.) 20 December 2012 See abstract.	1-15



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

"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

"I" 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

26 FEBRUARY 2015 (26.02.2015)

Date of mailing of the international search report

26 FEBRUARY 2015 (26.02.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0024244 A	09/03/2011	KR 10-1129090 B1 US 2011-0053800 A1	13/04/2012 03/03/2011
JP 5155244 B2	06/03/2013	JP 2010-252631 A	11/11/2010
JP 2008-289362 A	04/12/2008	WO 2007-029554 A1	15/03/2007
US 2013-0203159 A1	08/08/2013	CN 103119151 A CN 103119151 B EP 2617807 A1 SG 188505 A1 WO 2012-036011 A1	22/05/2013 04/02/2015 24/07/2013 31/05/2013 22/03/2012
JP 2012-249547 A	20/12/2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 3/00(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C07F 7/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 3/00; C12M 1/00; C12N 5/06; C12N 5/02; C12M 1/32; C12N 5/074; C07F 7/08

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: 세포배양 기관, 사이클로실록산, 중합체, 세포 스페로이드, 유도만능줄기 세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0024244 A (성균관대학교산학협력단) 2011.03.09 청구항 1, 5 및 11 참조.	1-4, 15
A		5-14
A	JP 5155244 B2 (주식회사 아테카) 2013.03.06 청구항 1 및 3 참조.	1-15
A	JP 2008-289362 A (국립대학법인 도쿄대학) 2008.12.04 청구항 1 및 17 참조.	1-15
A	US 2013-0203159 A1 (ITOH, TOHRU 외 2명) 2013.08.08 요약 참조.	1-15
A	JP 2012-249547 A (오지 홀딩스 주식회사) 2012.12.20 요약 참조.	1-15

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 02월 26일 (26.02.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 02월 26일 (26.02.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



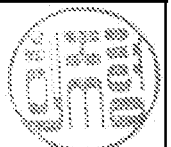
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0024244 A	2011/03/09	KR 10-1129090 B1 US 2011-0053800 A1	2012/04/13 2011/03/03
JP 5155244 B2	2013/03/06	JP 2010-252631 A	2010/11/11
JP 2008-289362 A	2008/12/04	WO 2007-029554 A1	2007/03/15
US 2013-0203159 A1	2013/08/08	CN 103119151 A CN 103119151 B EP 2617807 A1 SG 188505 A1 WO 2012-036011 A1	2013/05/22 2015/02/04 2013/07/24 2013/05/31 2012/03/22
JP 2012-249547 A	2012/12/20	없음	