



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0052547
(43) 공개일자 2019년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C12M 23/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0148317
(22) 출원일자 2017년11월08일
심사청구일자 2017년11월08일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
황창모
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 310동 3002호
(신천동, 파크리오)
차홍원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 310동 312호
(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

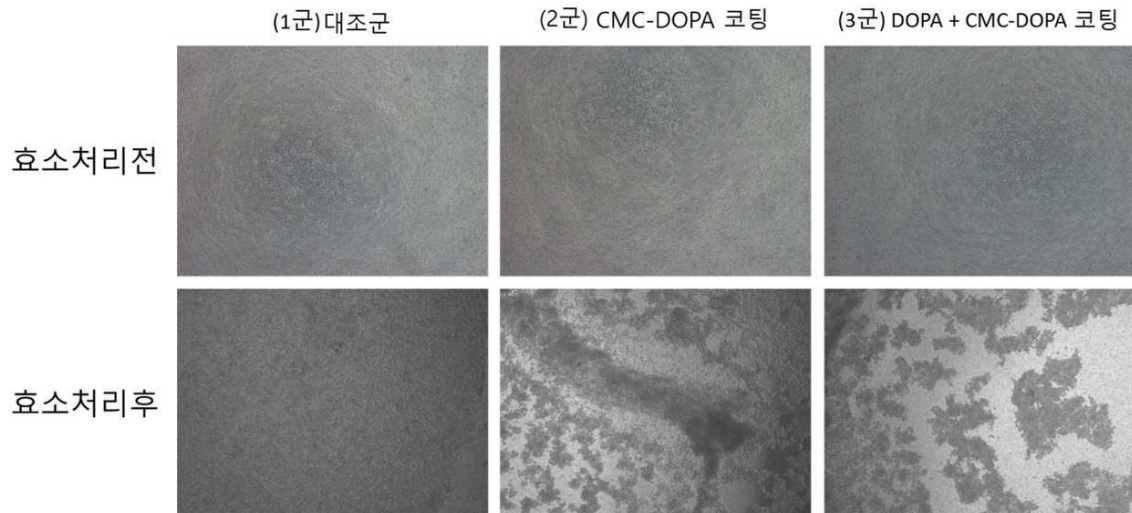
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양 기재 및 세포 시트를 제조하는 방법

(57) 요약

카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계, 상기 단계에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계, 및 상기 단계에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는 세포 시트 제조방법, 상기 방법에 따른 세포 배양 기재, 및 상기 제조방법에 의해 제조된 세포시트를 제공한다. 상기 방법에 따르면, 세포 시트 획득 과정에서 세포 시트의 형태가 수축되지 않고 유지되며, 세포 시트 내 세포의 활성 및 생존능이 우수하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/50 (2013.01)

C12N 2533/70 (2013.01)

(72) 발명자

홍소영

서울특별시 송파구 위례광장로 163, 2206동 1103호
(장지동, 위례22단지)

정보영

서울특별시 도봉구 우이천로48길 3-11 (쌍문동)

김지선

서울특별시 송파구 토성로 12, 지하 1층 03호 (풍
납동, 칼라하우스106)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0193

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 효소감응성 소재 기반 세포시트 제조법 및 전층 각막 체외배양용 시스템연구

기 여 율 6/10

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015KIA4A3046807

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 ICT국제화사업

연구과제명 아산-미네소타 이식 이노베이션 센터

기 여 율 4/10

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 다당체는 카르복시메틸셀룰로스, 카르복시에틸셀룰로스, 카르복시부틸셀룰로스, 카르복시프로필셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 텍스트린, 텍스트란, 텍스트란 셀페이트, 알긴산, 히알루론산, 키틴, 키토산, 젤란검, 글루칸, 베타글루칸, 콘드로이틴 셀페이트, 글리코젠, 전분, 아가로스, 셀룰로스, 자일란, 재생셀룰로스, 말토텍스트린, 프락탄, 갈락탄, 아미노갈락탄, 카라기난, 만난, 풀루란, 펙틴, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 카테콜 중합체는 L-도파, 도파민, 노르에피네프린, 에피네프린, 갈릭산, 카테킨, 탄닌산, 파이로갈롤 2-아미노에탄, 또는 이들의 조합의 중합체인 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체는 카테콜 중합체 및 다당체가 공유 결합, 이온 결합, 금속 결합, 수소 결합, 반데르 발스 결합, 또는 이들의 조합을 형성한 것인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체는 다당체의 단량체 및 카테콜 중합체의 단량체의 몰비가 1 : 0.02 내지 200로 혼합되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, (a) 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계는,

카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물을 다당체에 결합시키는 단계; 및

상기 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물이 결합된 다당체를 pH 7.0 내지 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체를 형성시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, (a) 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계 후, (b) 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계 전에,

상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 단백질을 결합시키는 단계;를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 단백질은 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 피브로넥틴, 피브린, 라미닌, 비트로넥틴, 폴리-엘-라이신, 폴리-디-라이신, 폴리-엘-오르티닌, 아르기닌-글리신-아스파틱 산을 포함한 펩티드, 세포외기질, 매트릭셀 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, (c) 상기 세포 층을 분리시키는 단계는,
pH 4.0 내지 10.0의 용매에 용해한 다당체에 대하여 분해가능한 효소 용액을 다당체와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 기제는 다공성 표면을 가진 형상인 것인 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 효소는 분해가능한 다당체를 특이적으로 분해하는 것으로서, 셀룰라제, 아밀라제, 알지네이트 리아제, 젤라나제, 히알루로니다제, 키틴나제, 키토사나제, 자이알리나제, 만나제, 글루코실트란스퍼라제, 글루코시다제, 펙티나제, 락타제, 말타제, 수크라제, 글루카나제, 콘드로이타나제, 아가라제, 갈락토시다제, 프럭타나제, 갈락타네즈, 텍스트라나제, 리소자미아르, 풀루라나제, 아말라제, 인버타제 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 12

- (a) 카테콜 중합체를 기체에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 다당체를 결합시키는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에 의해 결합된 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계;
- (d) 상기 단계 (c)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법.

청구항 13

- (a) 카테콜 중합체를 기체에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 결합시키는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계;
- (d) 상기 단계 (c)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법.

청구항 14

기체의 표면에 카테콜 중합체-다당체의 복합체가 결합된 세포 배양 기재.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체는 기체의 표면에 카테콜 중합체 및 다당체가 순차적으로 결합된 것인 세포 배양 기재.

청구항 16

청구항 1의 방법에 의해 제조된 세포 시트.

청구항 17

청구항 12의 방법에 의해 제조된 세포 시트.

청구항 18

청구항 13의 방법에 의해 제조된 세포 시트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 세포 시트를 제조하는 방법, 세포 배양 기재 및 상기 방법에 의해 제조된 세포 시트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 손상된 조직을 재건하기 위한 이식 방법에는 이종 이식, 동종 이식, 자가 이식이 있다. 이종이식은 면역 부적합성 및 레트로바이러스를 포함하는 인수 공통 병원체 전달의 문제를 갖는다. 또한, 동종 이식은 제공자의 면역 거부 및 이용불가능성의 문제를 가지며, 자가 이식은 필요한 양만큼의 적절한 조직을 얻기 어려우며 환자에 대한 외상의 증가의 문제를 가진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 인공 대체물이나 세포를 배양하여 조직화시킨 것을 그대로 이식하는 기술이 주목받고 있다. 2004년 순수한 세포 자체를 이용하여 제작한 세포 시트(cell sheet)를 이용한 망막 재생에 관한 연구가 New England journal of Medicine에 발표된 뒤 조직공학 분야에서 세포만을 이용한 3차원 인공 조직에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 최근, 일본 동경여자대학교 오카노 교수 등은 세포 시트 공학(Cell Sheet Engineering)을 통해 배양 세포들을 간단히 온도만을 낮추어줌으로써 세포들이 서로 연결된 '시트 모양' 조직으로 이용할 수 있다고 제시한 바 있다. 구체적으로, 세포 배양용 폴리스티렌 접시에 온도에 따라 친수성 또는 소수성 특성이 변화하는 온도감응성 고분자인 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(poly-N-isopropylacrylamide: PNIPAAm)를 라디칼 중합 방법에 의하여 고정시켰다. 그러나, 이와 같은 기술은 저온 처리시 세포 및 세포 시트의 가장자리에서부터 물이 침투되고 그로 인해 표면에 그래프트된 온도 감응성 고분자의 친수화가 서서히 진행되므로 세포 및 세포 시트를 회수하는 시간이 매우 느린바, 수율이 낮고, 세포 전달을 이용한 치료에 있어 전달하고자 하는 세포의 활성 및 생존능을 저해하는 원인이 될 수 있어 임상적 적용 및 삼차원적 인공 조직체로의 적용에는 한계가 존재한다. 또한, 세포 시트 획득 과정에서 세포의 수축으로 인해 세포 시트의 온전한 형태 및 기능의 유지가 어렵다는 단점이 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 세포의 활성 및 생존능이 우수한 세포 시트를 획득하기 위하여 예의 노력한 결과, 효소에 의해 분해가능한 물질을 세포 배양 기재에 코팅하고, 효소와의 반응에 의해 상기 물질을 분해시켜, 간단한 방식으로 세포 시트를 회수할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 세포 시트를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 다른 양상은 세포 배양 기재에 관한 것이다.

[0007] 다른 양상은 상기 방법에 의해 제조된 세포 시트에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 (a) 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법을 제공한다. 상기 방법은 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재와 접촉시켜 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재에서 세포를 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 다당체에 대하여 분해 가능한 효소와 접촉시켜, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재 및 세포 층으로 분리시키는 단계; 및 분리된 세포 층을 회수하는 단계를 포함한다.

[0009] 상기 다당체는 세포 층 및 카테콜 중합체와 결합한다. 상기 다당체는 다당체 층을 형성할 수 있다. 상기 다당체는 카르복시메틸셀룰로스, 카르복시에틸셀룰로스, 카르복시부틸셀룰로스, 카르복시프로필셀룰로스, 히드록시메

텔룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 텍스트린, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 알긴산, 히알루론산, 키틴, 키토산, 젤란검, 글루칸, 베타글루칸, 콘드로이틴 설페이트, 글리코젠, 전분, 아가로스, 셀룰로스, 자일란, 재생셀룰로스, 말토텍스트린, 프락탄, 갈락탄, 아미노갈락탄, 카라기난, 만난, 폴루란, 펙틴 또는 이들의 조합인 것일 수 있다.

[0010] 상기 다당체는 효소와의 반응에 의해 분해가 가능하다. 상기 효소는 분해가능한 다당체를 특이적으로 분해한다. 상기 다당체는 기질이며, 상기 효소는 다당체와 효소-기질 복합체를 형성한다. 상기 효소는 셀룰라제, 아밀라제, 알지네이트 리아제, 겔라나제, 히알루로니다제, 키틴나제, 키토사나제, 자이알리나제, 만나제, 글루코실트란스퍼라제, 글루코시다제, 펙티나제, 락타제, 말타제, 수크라제, 글루카나제, 콘드로이타나제, 아가라제, 갈락토시다제, 프락타나제, 갈락타네즈, 텍스트라나제, 리소자미아르, 폴루라나제, 아말라제, 인버타제 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 효소는 다당체를 특이적으로 분해할 수 있고, 세포의 생존 등에 영향을 주지 않는 것이면, 제한되지 않는다.

[0011] 예를 들면, 상기 다당체가 셀룰로스를 포함하는 경우, 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 셀룰로스분해효소, 즉 셀룰라제 (cellulase)인 것일 수 있다. 상기 다당체가 히알루론산인 경우, 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 히알루론산분해효소, 즉 히알루로니다제 (hyaluronidase)인 것일 수 있다. 상기 다당체가 키틴인 경우, 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 키틴 분해효소, 즉 키틴나제인 것일 수 있다. 상기 다당체가 전분인 경우, 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 전분 분해효소, 즉 알파-아밀라제, 베타-아밀라제, 글루코아밀라제, 아이소아밀라제 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 다당체에 따라 통상의 기술자가 선택할 수 있다.

[0012] 상기 카테콜 중합체는 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물, 즉 카테콜계 화합물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 카테콜 중합체는 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물을 중합시켜 형성된 것일 수 있다. 상기 카테콜계 화합물은 생물학적 카테콜류인 것일 수 있다. 상기 카테콜계 화합물은 금속, 비금속, 유기 고분자, 무기 물질 등에 대하여 강한 접착력을 갖는 것일 수 있다. 상기 카테콜계 화합물은, 6 탄소 고리 및 인접하여 붙어있는 2개의 히드록실기 (-OH)를 포함하는 카테콜기, 이의 유도체 또는 이들의 조합을 갖는 화합물인 것일 수 있다. 상기 카테콜기의 유도체를 갖는 화합물은 L-도파, 도파민, 노르에피네프린, 에피네프린, 갈락산, 카테킨, 탄닌산, 파이로갈롤 2-아미노에탄, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 카테콜계 화합물은 다당체와 결합하고, 기재에 안정적으로 고정되면서, 카테콜 중합체 층을 형성한다.

[0013] 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체는 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 것으로서, 다당체 및 카테콜 중합체가 결합된 중합체이다. 상기 다당체 및 카테콜 중합체는 공유 결합, 이온 결합, 금속 결합, 수소 결합, 반데르발스 결합, 또는 이들의 조합을 형성한 것일 수 있다. 상기 다당체 및 카테콜 중합체는 공유 결합된 것일 수 있다. 중합체를 공유 결합시키는 방법은 통상의 기술자가 선택할 수 있다. 상기 다당체 및 카테콜 중합체가 공유 결합을 형성한 경우, 상기 공유 결합은 N-히드록시석신이미드 (N-Hydroxysuccinimide: NHS) 및/또는 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드히드로클로라이드 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride: EDC)를 이용하여, 다당체 및 카테콜 중합체가 공유 결합된 것일 수 있다. 또는, 상기 공유 결합은 가교제를 이용하는 것일 수 있으며, 예로서 작용기를 갖는 예로서 가교제, 예를 들면, 부탄디올디글리시딜에테르 등을 이용하여, 다당체 및 카테콜 중합체가 공유 결합된 것일 수 있다.

[0014] 상기 다당체의 단량체 및 카테콜 중합체의 단량체의 몰비는 1 : 0.02 내지 200, 1 : 0.04 내지 100, 1 : 0.1 내지 40, 1 : 0.2 내지 20, 1 : 0.4 내지 10, 또는 1 : 1 내지 4인 것일 수 있다. 상기 다당체의 분자량은 250 내지 2500000, 500 내지 1250000, 1250 내지 500000, 2500 내지 250000, 5000 내지 125000, 또는 12500 내지 50000인 것일 수 있다. 상기 다당체 및 카테콜 중합체의 질량비는 1 : 0.01 내지 100, 1 : 0.02 내지 50, 1 : 0.05 내지 20, 1 : 0.1 내지 10, 1 : 0.2 내지 5, 또는 1 : 0.5 내지 2인 것일 수 있다.

[0015] 상기 (a) 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계는, 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물을 다당체에 결합시키는 단계; 및 상기 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물이 결합된 다당체를 pH 7.0 내지 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체를 형성시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계로서, 다당체 및 카테콜계 화합물을 혼합하여 카테콜계 화합물을 다당체에 결합시키는 단계; 상기 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 pH 약 7.0 내지 약 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 생성하는 단계를 포함한다. 상기 카테콜기 또는 이의 유도체를 갖는 화합물은 카테콜 중합체의 단량체인 것일 수 있다.

[0016] 상기 카테콜계 화합물을 다당체에 결합시키는 단계는 통상의 기술자가 커플링 방법을 선택할 수 있다. 예를 들

면, 다당체 및 카테콜계 화합물을 공유 가교시키는 경우, 다당체, NHS 및/또는 EDC, 및 카테콜계 화합물을 pH 약 4 내지 약 7, pH 약 4.5 내지 약 6.5, 또는 pH 약 5.0 내지 pH 약 6.0의 용매에서 혼합하여, 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 형성하는 것일 수 있다. 상기 다당체의 농도는 약 0.0004mM 내지 약 4mM, 약 0.004mM 내지 약 0.4mM, 약 0.008mM 내지 약 0.2mM, 또는 약 0.02mM 내지 약 0.08mM인 것일 수 있다. 상기 다당체의 단량체의 농도는 약 0.2mM 내지 약 2000mM, 약 2mM 내지 약 200mM, 약 4mM 내지 약 100mM, 또는 약 10mM 내지 약 40mM인 것일 수 있다. 상기 카테콜계 화합물의 농도는 약 0.5mM 내지 약 5000mM, 약 5mM 내지 약 500mM, 약 10mM 내지 약 250mM, 또는 약 25mM 내지 약 100mM인 것일 수 있다. 상기 NHS의 농도는 약 0.5mM 내지 약 5000mM, 약 5mM 내지 약 500mM, 약 10mM 내지 약 250mM, 또는 약 25mM 내지 약 100mM인 것일 수 있다. 상기 EDC의 농도는 약 1mM 내지 약 10000mM, 약 10mM 내지 약 1000mM, 약 20mM 내지 약 500mM, 또는 약 50mM 내지 약 200mM인 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 다당체 및/또는 카테콜계 화합물의 농도는 카테콜계 화합물이 결합된 다당체 용액 중에 약 0.01 내지 약 1000 mg/mL, 약 0.02 내지 약 500 mg/mL, 약 0.05 내지 약 200 mg/mL, 약 0.1 내지 약 100 mg/mL, 약 0.2 내지 약 50 mg/mL, 약 0.5 내지 약 50 mg/mL, 약 1 내지 약 20 mg/mL, 약 5 내지 약 20 mg/mL, 또는 약 10mg/mL인 것일 수 있다.

[0017] 상기 결합은 교반, 진탕 또는 정치하여 수행되는 것일 수 있다. 상기 혼합은 약 1°C 내지 약 40°C, 약 15°C 내지 약 35°C, 약 20°C 내지 약 30°C, 또는 약 25°C, 또는 상온에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 혼합은 동시에 또는 순차적으로 수행되는 것일 수 있다.

[0018] 상기 방법은 생성된 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 투석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 투석은 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 포함하는 용액을 반투과성 막으로 싸고, 이것을 순수 또는 다량의 용매에 담가두어 저분자 또는 이온과 같은 불순물이 막 밖으로 확산되는 것을 이용하여 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 포함하는 용액을 정제하는 것일 수 있다. 상기 투석은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 반투과성 막은 중합체에 따라 통상의 기술자가 선택할 수 있다.

[0019] 상기 방법은 생성된 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 포함하는 용액을 건조하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 건조는 약 1시간 이상, 약 2시간 이상, 약 4시간 이상, 약 8시간 이상, 약 16시간 이상, 약 32시간 이상, 약 40 시간 이상, 또는 약 48시간 이상, 또는 약 0.5일 이상, 약 1일 이상, 또는 약 2일 동안 수행되는 것일 수 있다. 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 포함하는 용액을 건조하여, 분말상의 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 수득할 수 있다.

[0020] 상기 카테콜계 화합물이 결합된 다당체를 pH 약 7.0 내지 약 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체를 생성하는 것은, 카테콜계 화합물이 염기성 조건 하에서 자가-중합 반응 (self-polymerization)을 통하여 카테콜 중합체를 형성하고, 카테콜 중합체 및 다당체가 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 형성하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 것은, 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재와 접촉시키는 것일 수 있고, 상기 접촉에 의해 기재의 표면에 다당체 층 및 카테콜 중합체 층을 형성하는 것일 수 있다. 예를 들면, 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 pH 약 7.0 내지 약 10.0의 용매에서 용해한 카테콜 중합체-다당체의 복합체 용액을 기재와 접촉시키는 것일 수 있다.

[0022] 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 용액 중에 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체는 약 0.05 mg/mL 내지 약 500 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 250mg/mL, 약 0.25 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 50mg/mL, 약 1 mg/mL 내지 약 25 mg/mL, 약 2 mg/mL 내지 약 10 mg/mL로 포함되는 것일 수 있다.

[0023] 상기 결합은 기재를 카테콜 중합체-다당체의 복합체의 존재하에서 인큐베이션하는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 기재를 카테콜 중합체-다당체의 복합체 용액에 침지한 상태로 두는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 교반, 진탕 또는 정치하여 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 1°C 내지 약 40°C, 약 15°C 내지 약 35°C, 약 20°C 내지 약 30°C, 또는 약 25°C, 또는 상온에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 1.5 시간 내지 약 160시간, 약 3시간 내지 약 80시간, 약 6시간 내지 약 40시간, 또는 약 12시간 내지 약 20시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 결합은 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재의 표면에 코팅하는 것일 수 있다. 이 때, 카테콜 중합체는 기재에 안정적으로 고정, 결합 또는 접촉되어, 기재의 표면에 카테콜 중합체 층 및 다당체 층이 순차적으로 코팅되는 것일 수 있다. 상기 코팅은 딥 코팅, 스프레이 코팅, 롤 코팅, 정전기적 침적 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 인큐베이션 또는 코팅은 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 카테콜 중합체가 기재에 고정, 결합 또는 접촉될 수 있는 방법이면, 제한되지 않는다.

- [0024] 상기 방법은 (a) 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계 후, (b) 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계 전에, 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 단백질을 결합시키는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 방법은 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계 후, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계 전에, 단백질을 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재와 접촉시켜 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층, 및 단백질 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 다당체 층과 결합하여, 세포의 부착, 증식, 및/또는 분화를 촉진하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 단백질은 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 피브로넥틴, 피브린, 라미닌, 비트로넥틴, 폴리-엘-라이신, 폴리-다-라이신, 폴리-엘-오르티닌, 아르기닌-글리신-아스파틱 산을 포함한 펩티드, 세포외기질, 매트릭셀, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 피브로넥틴은 인테그린이라고 불리는 막-통과 수용체 단백질에 결합하는 세포외기질의 당단백질이다. 콜라겐은 동물의 결합 조직의 주요 구조 단백질이다. 콜라겐은 콜라겐 유형 I, 콜라겐 유형 II, 콜라겐 유형 III, 또는 콜라겐 유형 IV인 것일 수 있다. 피브린은 혈액응고 과정에 작용하는 단백질이다. 라미닌은 세포외기질의 단백질이다. 라미닌은 예를 들면, 엔탁틴 (entactin), 피브로넥틴, 및 퍼레칸 (perlecan)을 통해 콜라겐과 결합할 수 있고, 인테그린 수용체 등을 통해 세포막에 결합하는 것일 수 있다. 엘라스틴은 결합 조직의 단백질로서, 세포외기질 단백질의 성분이다. 비트로넥틴은 혈장, 세포외기질, 및 뼈에 존재하는 당단백질이다. 비트로넥틴은 막-결합 인테그린, 예를 들면 비트로넥틴 수용체에 대한 결합 부위를 포함한다. 상기 단백질은 세포의 부착, 증식, 및/또는 분화의 목적에 따라 통상의 기술자가 선택할 수 있다.
- [0026] 상기 결합은 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 단백질의 존재하에서 인큐베이션하는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 단백질 용액에 침지한 상태로 두는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 교반, 진탕 또는 정지하여 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 1°C 내지 약 40°C, 또는 약 20°C 내지 약 40°C에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 10분 내지 약 30시간, 약 20분 내지 약 15시간, 약 40분 내지 약 8시간, 또는 약 1시간 내지 약 3시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 결합은 상기 단백질을 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재의 표면에 코팅하는 것일 수 있다. 상기 코팅은 딥 코팅, 스프레이 코팅, 롤 코팅, 정전기적 침적 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 인큐베이션 또는 코팅은 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 단백질이 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재에 고정 또는 결합될 수 있는 방법이면, 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 방법은 생성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 인산염 완충 식염수 (Phosphate-Buffered Saline: PBS)로 1회 이상 세척하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 방법은 생성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 약 20°C 내지 약 60°C, 약 25°C 내지 약 55°C, 약 30°C 내지 약 50°C, 또는 약 35°C 내지 약 45°C에서, 약 30분 이상, 약 1시간 이상, 약 2시간 이상, 약 4시간 이상, 약 8시간 이상, 약 12시간 이상, 또는 약 16시간 이상 건조하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 기재 또는 세포 배양 기재는 다공성 박막의 형상인 것일 수 있다. 상기 기재 또는 세포 배양 기재는 전체 또는 일부에 다공성을 갖는 것일 수 있다. 상기 다공성은 원형, 사각형, 다각형, 부정형 또는 이들의 조합의 프레이밍을 갖는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 기재는 다당체 및/또는 카테콜 중합체와 접촉하지 않은 세포 배양을 위한 기관을 의미한다. 상기 기재는 금속, 중합체, 유리, 실리콘, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 금속은 예를 들면, 스테인레스 스틸, 니켈-크로뮴 합금, 니켈-티타늄 합금, 코발트-크로뮴 합금, 백금-크로뮴 합금, 탄탈륨, 백금, 티타늄, 니티놀, 알루미늄, 지르코늄, 크로뮴 및 니켈, 금, 은, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 중합체는 예를 들어, 폴리락티드 (polylactide), 폴리글리콜리드 (polyglycolide), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리디옥사논 (polydioxanone), 폴리락틱글리콜리드 (polylactic-glycolide), 폴리디메틸실록산 (polydimethylsiloxane), 폴리스티렌 (polystyrene), 폴리메틸메타크릴레이트 (polymethyl Methacrylate), 폴리테트라플루오로에틸렌 (polytetrafluoroethylene: PTFE), 폴리에틸렌 (polyethylene: PE), 폴리우레탄 (polyurethane: PU), 폴리에틸렌테레프탈레이트 (polyethyleneterephthalate: PET), 폴리카보네이트 (polycarbonate: PC), 폴리술폰 (polysulfone: PS), 폴리아크릴 (polyacryl) 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 기재는 카테콜 중합체가 결합할 수 있고, 세포를 배양할 수 있는 것이면, 제한되지 않는다.

- [0031] 상기 방법은 생성된 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 멸균 또는 소독하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 멸균은 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재에, 자외선 조사, 방사선 조사, 전자빔 조사, 플라즈마 처리, 고압증기 멸균, 에틸렌옥사이드 가스 노출 또는 이들의 조합을 수행하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 방법은 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 상기 카테콜 중합체-다당체 층이 결합된 세포 배양 기재에서 세포를 배양하여 카테콜 중합체-다당체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0033] 세포는 카테콜 중합체 층에 부착, 증식, 및/또는 분화되어 세포 층을 형성한다. 상기 세포는 세포 층 및/또는 세포 시트를 구성하는 것일 수 있다. 상기 세포는 포유동물, 예를 들면 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스 또는 토끼로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 세포는 내피 세포, 내피 전구 세포, 혈관 내피 세포, 섬유아세포, 골아세포, 연골 세포, 표피 세포, 줄기 세포, 근육 세포, 근아세포, 간 세포, 신장 세포, 지방 세포, 신경 세포, 상피 세포, 망막 색소 상피 세포, 각막 내피 세포, 각막 운부 세포, 중간엽 줄기 세포, 지방 유래 줄기 세포, 근육 줄기 세포, 배아 줄기 세포 또는 이로부터 분화된 세포, 유도 분화 줄기 세포 (induced pluripotent stem cells: iPSC) 또는 이로부터 분화된 세포, 직접 리프로그래밍한 세포, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 세포는 세포 층 및/또는 세포 시트를 구성하는 것으로, 통상의 기술자가 용도에 따라 선택할 수 있으며, 세포의 종류는 제한되지 않는다.
- [0034] 세포 층으로부터 분리된 세포 시트는 그 용도에 따라 통상의 기술자가 선택할 수 있다. 세포 배양은 세포의 증식 속도 및 특성을 고려하여, 통상의 기술자가 선택할 수 있다.
- [0035] 상기 방법은 상기 단계 (b)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 다당체에 대하여 분해가능한 효소와 접촉시켜, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재 및 세포 층으로 분리시키는 단계를 포함한다.
- [0036] 상기 다당체에 대하여 분해가능한 효소는 전술한 바와 같다. 상기 효소에 의해 다당체가 분해되는 경우, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층에서 카테콜 중합체 층만이 기재에 고정, 접착 또는 결합된 채로 남아있으므로, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재가 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재 및 세포 층으로 분리된다.
- [0037] 상기 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계는, 다당체에 대하여 분해가능한 효소를 pH 약 4.0 내지 약 10.0 또는 pH 약 6.0 내지 약 8.0의 용매에 용해한 다당체에 대하여 분해가능한 효소 용액을 다당체와 접촉시키는 것일 수 있다. 상기 접촉은 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재의 다당체를 다당체에 대하여 분해가능한 효소의 존재에서 인큐베이션하는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 다당체에 대하여 분해가능한 효소 용액에 침지한 상태로 두는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 교반, 진탕 또는 정치하여 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 20℃ 내지 약 60℃, 약 25℃ 내지 약 55℃, 약 30℃ 내지 약 50℃, 또는 약 35℃ 내지 약 45℃, 약 37℃ 또는 상온에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 약 0.5시간 내지 약 240시간, 약 4시간 내지 약 120시간, 약 8시간 내지 약 60시간, 또는 약 16시간 내지 약 30시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 효소는 효소 용액 중에 약 0.1mg/ml 내지 약 120mg/ml, 약 2.5mg/ml 내지 약 60mg/ml, 약 5mg/ml 내지 약 30mg/ml, 또는 약 10mg/ml 내지 약 15mg/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 용매는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, HBSS (Hank's balanced salt solution), 배양 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.
- [0038] 상기 방법은 분리된 세포 층을 회수하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 회수는 배지 상단에 형성된 세포 층을 수득하는 것일 수 있다. 상기 세포 층은 물리적으로 걷어내거나 배지를 제거함으로써 회수되는 것일 수 있다. 상기 세포 층은 박막의 모양을 훼손시키지 않고 유지한 채로 회수되는 것일 수 있다. 상기 세포 층은 세포 시트로 불린다.
- [0039] 다른 양상은 (a) 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 다당체를 결합시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)에 의해 결합된 다당체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체 및

다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계; (d) 상기 단계 (c)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법을 제공한다. 상기 방법은 카테콜계 아민계 화합물을 기재와 접촉시켜 기재의 표면에 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 효소와의 반응에 의해 분해가능한 다당체와 접촉시켜 상기 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재에서 세포를 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 다당체에 대하여 분해가능한 효소와 접촉시켜, 상기 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재 및 세포 층으로 분리시키는 단계; 및 분리된 세포 층을 회수하는 단계를 포함한다.

[0040] 상기 방법은 (a) 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 다당체를 결합시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 카테콜계 아민계 화합물을 기재와 접촉시켜 기재의 표면에 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 및 상기 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 효소와의 반응에 의해 분해가능한 다당체와 접촉시켜 상기 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계를 포함한다.

[0041] 상기 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계는, 카테콜계 화합물을 pH 약 7.0 내지 약 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체를 생성하는 단계 및 카테콜 중합체를 기재와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 카테콜계 화합물은 염기성 조건 하에서 자가-중합 반응을 통하여 카테콜 중합체를 형성하고, 상기 접촉에 의해 기재의 표면에 카테콜 중합체 층을 형성하는 것일 수 있다. 상기 접촉은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 약 0.5시간 내지 약 240시간, 약 4시간 내지 약 120시간, 약 8시간 내지 약 60시간, 또는 약 16시간 내지 약 30시간 동안 수행되는 것일 수 있다.

[0042] 상기 카테콜 중합체에 다당체를 결합시키는 단계는, 다당체를 pH 약 4 내지 약 7, pH 약 4.5 내지 약 6.5, 또는 pH 약 5.0 내지 약 6.0의 용매에서 용해하여 다당체 용액을 생성하는 단계 및 다당체 용액을 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 접촉은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 약 0.2시간 내지 약 120시간, 약 2시간 내지 약 60시간, 약 4시간 내지 약 30시간, 또는 약 8시간 내지 약 15시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉에 의해 기재의 표면에 카테콜 중합체 층 및 다당체 층이 순차적으로 형성될 수 있다. 상기 다당체 및 카테콜 중합체는 공유 결합된 것일 수 있다. 상기 접촉은 다당체 용액을 NHS 및/또는 EDC의 존재에서 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재와 인큐베이션하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 카테콜계 화합물, 다당체, 카테콜 중합체, 카테콜 중합체-다당체의 복합체, 단백질, 접촉, NHS, 및 EDC, 및 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계, 세포 층을 분리시키는 단계에 대하여는 전술한 바와 같다.

[0044] 다른 양상은 (a) 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 결합시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계; (d) 상기 단계 (c)에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는, 세포 시트 제조방법을 제공한다. 상기 방법은 카테콜계 화합물을 기재와 접촉시켜 기재의 표면에 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를, 효소와의 반응에 의해 분해가능한 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 접촉시켜, 상기 카테콜 중합체 층 및 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체 층 및 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재에서 세포를 배양하여 카테콜 중합체 층, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계; 상기 카테콜 중합체 층, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 다당체에 대하여 분해가능한 효소와 접촉시켜, 상기 카테콜 중합체 층, 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재를 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재 및 세포 층으로 분리시키는 단계; 및 분리된 세포 층을 회수하는 단계를 포함한다.

- [0045] 상기 방법은 (a) 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에 의해 결합된 카테콜 중합체에 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0046] 상기 카테콜 중합체를 기재에 결합시키는 단계는, 카테콜계 화합물을 pH 약 7.0 내지 약 10.0의 용매에서 용해하여 카테콜 중합체를 생성하는 단계 및 카테콜 중합체를 기재와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 카테콜계 화합물은 염기성 조건 하에서 자가-중합 반응을 통하여 카테콜 중합체를 형성하고, 상기 접촉에 의해 기재의 표면에 카테콜 중합체 층을 형성하는 것일 수 있다. 상기 접촉은 1회 이상 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 약 0.5시간 내지 약 240시간, 약 4시간 내지 약 120시간, 약 8시간 내지 약 60시간, 또는 약 16시간 내지 약 30시간 동안 수행되는 것일 수 있다.
- [0047] 상기 카테콜 중합체에 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 결합시키는 단계는, 기재 대신에 카테콜 중합체 층이 결합된 기재를 사용한 것을 제외하고, 전술한 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 생성하는 단계와 동일한 방법으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0048] 상기 카테콜계 화합물, 다당체, 카테콜 중합체, 카테콜 중합체-다당체의 복합체, 단백질, 접촉, NHS, 및 EDC, 및 카테콜 중합체에 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 결합시키는 단계, 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계, 및 세포 층을 분리시키는 단계에 대하여는, 기재 대신에 카테콜 중합체 층이 결합된 세포 배양 기재를 사용한 것을 제외하고, 전술한 바와 같다.
- [0049] 다른 양상은 상기 방법에 의해 제조된 세포 배양 기재를 제공한다.
- [0050] 상기 세포 배양 기저는 기재의 표면에 카테콜 중합체-다당체의 복합체가 결합된 것일 수 있다. 상기 세포 배양 기저는 기재 (scaffold or substrate)의 표면에 효소와의 반응에 의해 분해가능한 다당체 및 카테콜 중합체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 것일 수 있다. 상기 세포 배양 기저는 기재의 표면에 카테콜 중합체 층 및 다당체 층이 순차적으로 결합된 것일 수 있다.
- [0051] 상기 세포 배양 기저는 기재의 표면에 카테콜 중합체 및 카테콜 중합체-다당체의 복합체가 결합된 것일 수 있다. 상기 세포 배양 기저는 기재의 표면에 카테콜 중합체 층, 및 카테콜 중합체 및 효소와의 반응에 의해 분해가능한 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 결합된 것일 수 있다. 상기 세포 배양 기저는 기재의 표면에 카테콜 중합체 층 및 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층이 순차적으로 결합된 것일 수 있다.
- [0052] 다른 양상은 상기 방법에 의해 제조된 세포 시트를 제공한다.
- [0053] 상기 제조방법에 의하면, 온도 등의 변화를 가하지 않고 다당체 만을 분해시켜, 세포 시트가 카테콜 중합체-다당체의 복합체 층 및 세포 층이 순차적으로 결합된 세포 배양 기재로부터 자연적으로 분리되어, 세포 시트의 형태, 세포의 활성 및 생존능이 유지되므로, 목표체로 세포 시트를 용이하게 전달 및 적용가능하다.

발명의 효과

- [0054] 카테콜 중합체 및 다당체를 포함하는 카테콜 중합체-다당체의 복합체를 기재에 결합시키는 단계, 상기 단계에 의해 결합된 카테콜 중합체-다당체의 복합체와 세포를 함께 배양하여 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 세포 층을 형성시키는 단계, 및 상기 단계에 의해 세포 층이 형성된 카테콜 중합체-다당체의 복합체에 다당체 분해 효소를 처리하여 세포 층을 분리시키는 단계를 포함하는 세포 시트 제조방법, 상기 방법에 따른 세포 배양 기재, 및 상기 제조방법에 의해 제조된 세포 시트를 제공한다. 상기 방법에 따르면, 세포 시트 획득 과정에서 세포 시트의 형태가 수축되지 않고 유지되며, 세포 시트 내 세포의 활성 및 생존능이 우수하며, 기질-효소 반응과 같은 간단히 방식으로 세포 시트를 회수할 수 있다. 상기 세포 시트는 의료용 세포 전달, 치료 시스템, 세포 기반 재생의학용 인공 조직 이식체로의 응용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 메틸셀룰로스-도파민을 제조하는 방법의 흐름도를 나타낸다.
- 도 2는 세포 시트를 제조하는 방법의 흐름도를 나타낸다.
- 도 3는 대조군 및 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 결합된 세포 배양 기재 상에 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 각각 배양하고, 효소와 반응시킨 후, 세포 시트가 분리되었는지 여부를 도립 광학 현미경으로 확인한 이미지이다.
- 도 4는 대조군, 카르복시메틸셀룰로스-도파민, 도파민 코팅 후 카르복시메틸셀룰로스-도파민 가교층이 결합된

세포 배양 기재 상에 HaCaT 세포를 각각 배양하고, 효소와 반응시킨 후, 세포 시트가 분리되었는지 여부를 도립 광학 현미경으로 확인한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 세포 시트 제작 1

1. 카르복시메틸셀룰로스-도파민 용액 제조

다당체인 카르복시메틸셀룰로스의 용액을 제조하였다 (도 1). MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate, 4-Morpholineethanesulfonic acid) 수화물 (hydrate) (Sigma, M2933, MW 195.24) 0.195g을 탈이온수 20ml에 첨가하고, 볼텍싱 (vortexing)으로 혼합하여, 50mM의 MES 버퍼를 제조하였다. 이어서, 1M의 NaOH 150 μ l를 첨가하고, 상온에서 300rpm으로 10분 동안 교반하여 pH를 약 5.5로 조정하였다. 카르복시메틸셀룰로스 소듐염 (Carboxymethylcellulose sodium salt: Na-CMC) (Sigma, C4888, MW 25000) 200mg을 50mM의 MES 버퍼 20ml에 첨가하고 상온에서 300rpm으로 밤새 교반하여, 0.04mM의 Na-CMC 용액을 제조하였다.

이어서, N-히드로석신이미드 (N-Hydroxysuccinimide: NHS) (Sigma, 130672 Aldrich, MW 115.09) 0.115g 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드히드로클로리드 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride: EDC) (Sigma, 03449, MW 191.70) 0.383g을 Na-CMC 용액에 첨가하고, 상온에서 300rpm으로 2시간 동안 교반하였다.

도파민 히드로클로리드 (Sigma, H8502, MW 198.64) 200mg을 상기 Na-CMC 용액에 첨가하고 상온에서 300rpm으로 24시간 동안 교반하여, CMC-DOPA 용액을 제조하였다.

투석용 멤브레인 (MWCO 3500Da) 및 5M의 HCl 2ml가 든 탈이온수 2l를 이용하여, 8시간 마다 2회씩 교환해주면서, 도파민 자가-중합 반응을 억제하고, CMC-DOPA 용액을 정제하였다. 그 후, 정제된 CMC-DOPA 용액을 2일 동안 동결 건조하였다 (이하, CMC-DOPA라고 함).

2. 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 결합된 세포 배양 기재 제작

1에서 제조한 CMC-DOPA를 pH 약 8.5, 및 10mM의 트리스 버퍼에 5mg/ml의 농도로 용해하여 CMC-DOPA 용액을 제조하였다. 기재인 24웰 폴리스티렌 세포 배양용 플레이트에 상기 CMC-DOPA 용액을 분주하여, 기재의 표면을 CMC-DOPA 용액에 침지하고, 상온에서 16시간 동안 150rpm으로 교반하면서 두었다. 교반 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다.

이어서, 피브로넥틴 (우혈청 유래 피브로넥틴, Sigma Aldrich, F1141)을 인산염 완충 식염수 (PBS, Gibco, pH 7.4)에 1 μ g/50 μ l로 용해하여 피브로넥틴 용액을 제조하였다. 상기 CMC-DOPA 층이 결합된 세포 배양 기재에 피브로넥틴 용액을 첨가하고, 상온에서 0.5 내지 2시간 동안 150rpm으로 교반하면서 두었다. 교반 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다. 이 후, 약 40℃에서 16시간 이상 건조시키고, 자외선을 약 30분 동안 조사하여 멸균시켰다.

3. 세포 배양, 셀룰로스분해효소에 의한 셀룰로스 분해 및 세포 시트 분리

2에서 제조한 세포 배양용 플레이트의 웰에 NIH3T3 세포를 5x10⁵ 세포/웰의 농도로 분주하고, 약 7일 내지 14일 동안 배양하였다. 이 때, 세포 배양액은 10%의 우혈청 및 1%의 항생제를 함유하는 돌베코 수정 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)를 사용하였다.

그 후, 셀룰로스분해효소 (cellulose, Sigma, 22178)를, 우혈청이 제외된 세포 배양액에 12.5mg/ml로 용해하여 셀룰로스분해효소 용액을 제조하였다. 상기 세포가 배양된 세포 배양 기재에 셀룰로스분해효소 용액을 첨가하고, 배양기에서 약 24시간 동안 두어 셀룰로스분해효소와 셀룰로스의 효소-기질 반응을 유도하였다.

이 후, 세포 층이 분리되는 것을 관찰하고, 다른 플레이트로 세포 시트를 옮겨 세포 시트를 수득하였다.

도 3는 대조군 및 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 결합된 세포 배양 기재 상에 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 각각 배양하고, 효소와 반응시킨 후, 세포 시트가 분리되었는지 여부를 도립 광학 현미경으로 확인한 이미지이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 결합된 세포 배양 기재는 셀룰로스분해효소의

분해 반응에 의하여, 세포 시트가 분리되었다. 반면, 상기 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 형성되지 않은 대조군은 세포가 세포 배양 플레이트의 바닥에 붙어있는 것을 확인하였다.

[0071] 실시예 2: 세포 시트 제작 2

[0072] 1군 (대조군)은 24웰 폴리스티렌 세포 배양용 플레이트 그대로를 사용하였다. 2군은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 카르복시메틸셀룰로스-도파민 (CMC-DOPA)을 5mg/ml의 농도로 첨가하여 CMC-DOPA 용액을 제조하고, 상기 CMC-DOPA 용액에서 16 시간 동안 교반한 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하고, 건조한 것을 사용하였다. 3군은 다음과 같이 제작하였다. 도파민 히드로클로리드 (Sigma, H8502, MW 198.64)를 pH 약 8.5 및 10mM의 트리스 버퍼에 2mg/ml의 농도로 첨가하여 도파민 용액을 제조하고, 상기 도파민 용액을 웰에 넣고 24시간 동안 교반한 후 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다. 이어서, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 카르복시메틸셀룰로스-도파민 (CMC-DOPA)을 5mg/ml의 농도로 첨가하여 CMC-DOPA 용액을 제조하고, 상기 CMC-DOPA 용액에서 16 시간 동안 교반한 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하고, 건조한 것을 사용하였다. 4군은 다음과 같이 제작하였다. 도파민 히드로클로리드 (Sigma, H8502, MW 198.64)를 pH 약 8.5 및 10mM의 트리스 버퍼에 2mg/ml의 농도로 첨가하여 도파민 용액을 제조하고, 상기 도파민 용액을 웰에 넣고 24시간 동안 교반한 후 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다. 이어서, 카르복시메틸셀룰로스 소듐염 (분자량: 25,000)을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 pH 약 5.5 및 50mM의 MES 버퍼에 5mg/ml의 농도로 첨가하고, 300rpm으로 밤새 교반하여 0.2mM의 Na-CMC 용액을 제조하였다. 제조된 Na-CMC 용액에 NHS 0.115g 및 EDC 0.383g를 첨가한 후, Na-CMC, NHS 및 EDC가 혼합된 용액을 웰에 넣고 24시간 동안 300rpm으로 교반한 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하고, 건조한 것을 사용하였다.

표 1

번호	군	코팅 조성
1	코팅 없음 (대조군)	-
2	CMC-DOPA	5mg/ml의 CMC-DOPA
3	DOPA + CMC-DOPA	2mg/ml의 DOPA 및 5mg/ml의 CMC-DOPA
4	CMC + DOPA	2mg/ml의 DOPA 및 5mg/ml의 CMC

[0074] 이어서, 콜라겐 (I형 콜라겐, CORNING®)을 인산염 완충 식염수에 40µg/ml로 용해하여 콜라겐 용액을 제조하였다. 상기 대조군(1군), 카르복시메틸셀룰로스-도파민 (CMC-DOPA) 층 코팅(2군), 도파민(DOPA) 층 코팅 후, 카르복시메틸셀룰로스-도파민 (CMC-DOPA) 층 코팅(3군), 및 도파민(DOPA) 층 코팅 후, 카르복시메틸셀룰로스(CMC) 층 코팅(4군)된 세포 배양 기재 각각에 콜라겐 용액을 첨가하고, 약 37℃에서 약 3시간 동안 배양기에 두어 인큐베이션하였다. 그 후, 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다. 이어서, 상기에서 제조한 24웰 폴리스티렌 세포 배양용 플레이트에 HaCaT 세포를 5×10^5 세포/웰의 농도로 분주하고 약 4일 동안 배양하였다. 이 때, 배양액은 10%의 우혈청 및 1%의 항생제를 함유하는 DMEM을 사용하였다.

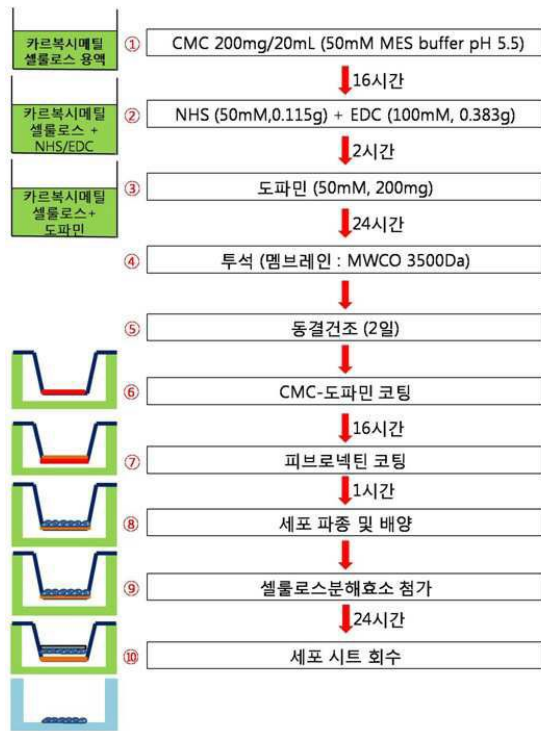
[0075] 우혈청이 제외된 세포 배양액에 셀룰로스분해효소를 10U/ml의 농도로 용해하여 셀룰로스분해효소 용액을 제조하였다. 상기 세포가 배양된 세포 배양용 플레이트에 셀룰로스분해효소 용액을 첨가하고, 배양기에서 약 24시간 동안 두어 셀룰로스분해효소와 셀룰로스의 효소-기질 반응을 유도하였다.

[0076] 이 후, 세포 층이 분리되는 것을 관찰하고, 다른 플레이트로 세포 시트를 옮겨 세포 시트를 수득하였다.

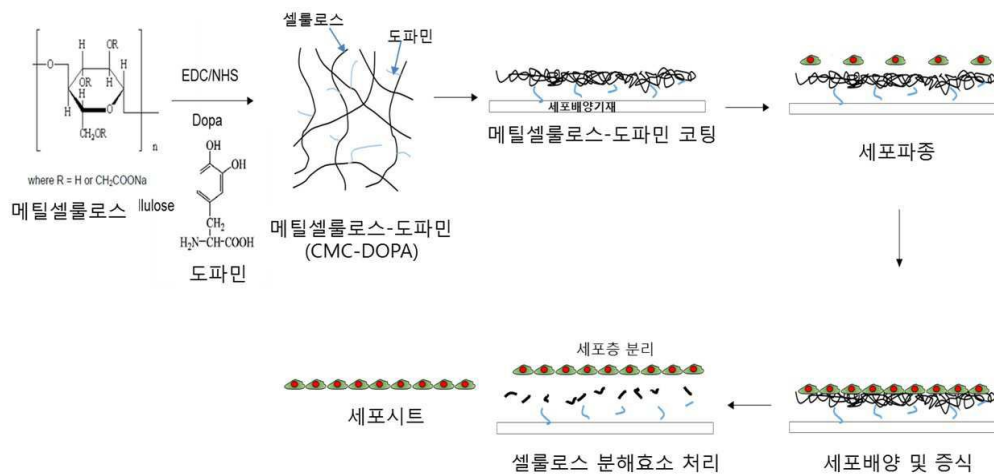
[0077] 도 4는 대조군, 카르복시메틸셀룰로스-도파민, 및 도파민 코팅 후 카르복시메틸셀룰로스-도파민 가교층 코팅된 세포 배양 기재 상에 HaCaT 세포를 각각 배양하고, 효소와 반응시킨 후, 세포 시트가 분리되었는지 여부를 도립 광학 현미경으로 확인한 이미지이다. 도 4에서 나타난 바와 같이, 카르복시메틸셀룰로스 층이 형성된 세포 배양 기재인, 2군 및 3군은 카르복시메틸셀룰로스와 셀룰로스분해효소의 반응에 의하여, 세포 층이 분리되었다. 반면, 상기 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층이 형성되지 않은 대조군은 세포 층이 분리되지 않고 세포 배양 기재의 바닥에 붙어있는 것을 확인하였다. 또한, 2군 및 3군과 대조군에서 세포가 증식한 정도가 유사하여, 카르복시메틸셀룰로스-도파민 층은 부착된 세포 층의 세포 증식 및 세포 시트 형성에 미치는 영향이 우수한 것을 알 수 있다. 4군 또한 카르복시메틸셀룰로스와 셀룰로스분해효소의 반응에 의하여, 세포 층이 분리됨을 확인하였다 (미도시).

도면

도면1

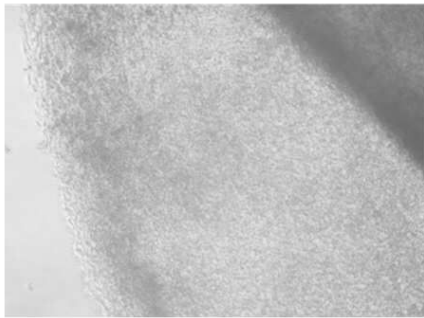


도면2

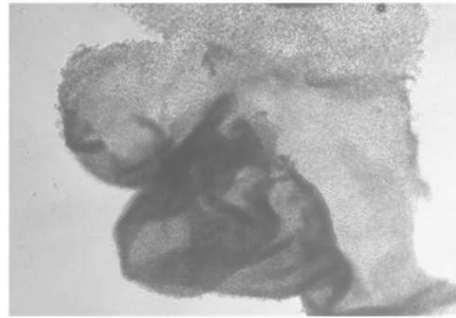


도면3

대조군, 배율: 4X



CMC-DOPA 실험군, 배율: 4X



도면4

