



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월03일
(11) 등록번호 10-1793832
(24) 등록일자 2017년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C12M 1/42 (2017.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 31/10 (2013.01)
C12M 35/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0098391
(22) 출원일자 2016년08월02일
심사청구일자 2016년08월02일
(56) 선행기술조사문헌
JP5159638 B2*
KR1020120063154 A*
W02009050696 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김용록
서울특별시 광진구 광나루로 595, 101동 2201호(광장동, 광장자이아파트)
조인호
충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호(두정동, 이안더센트럴)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 16 항

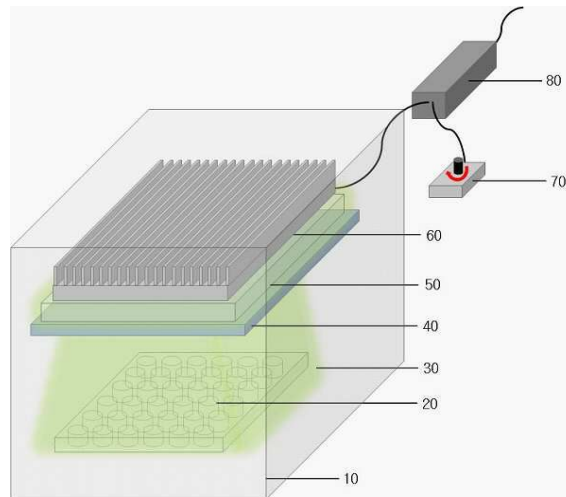
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 광에너지 유도 활성산소종을 이용한 줄기세포 분화유도장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 광에너지 유도 활성산소종을 이용한 줄기세포 분화유도장치 및 방법에 관한 것으로, 인큐베이터; 인큐베이터에 설치되고, 줄기세포를 수용하며, 고분자 수지 및 광감응제를 함유하는 배양 용기; 및 배양 용기에 광을 조사하는 광원을 포함하는 줄기세포 분화유도장치를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)

C12N 2500/02 (2013.01)

C12N 2529/10 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

박종철

인천광역시 계양구 계산로22번길 19-1 (계산동)

유연실

서울특별시 중구 다산로 32, 13동 1502호(신당동, 남산타운아파트)

왕강균

인천광역시 서구 검단로 786, 제305동 904호(불로동, 퀸스타운길훈아파트)

김봉진

경기도 광명시 디지털로 24, 104동 803호(철산동, 철산푸르지오하늘채아파트)

심진희

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 110동 402호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

김하영

경기도 성남시 수정구 수정로154번길 24 (신흥동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049729

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 시/공간적 활성산소의 제어를 이용한 맞춤형 실시간 줄기세포 기능 제어시스템 연구(4/5)

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

인큐베이터;

인큐베이터에 설치되고, 줄기세포를 수용하며, 고분자 수지 및 광감응제를 함유하는 배양 용기; 및

배양 용기에 광을 조사하는 광원을 포함하고,

광감응제는 블루영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 A, 그린영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 B, 및 레드영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 C를 모두 포함하며,

광감응제 A는 하이포크렐린 B(Hypocrelin B), 아크리딘 오렌지(Acridine orange), 쿠마린(Coumarin) 중에서 선택되는 1종 이상이고; 광감응제 B는 로즈 벵갈(Rose Bengal), 로다민 B(Rhodamine B), 메로시아닌 540(Merocyanine 540) 중에서 선택되는 1종 이상이며; 광감응제 C는 메틸렌 블루(Methylene blue), 페오포르바이드 A(Pheophorbide A), 크립토시아닌(Cryptocyanine) 중에서 선택되는 1종 이상이고,

광감응제의 농도는 1×10^{-10} 내지 1×10^{-8} mol/cm²인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

배양 용기 및 광원 사이에 설치되는 자외선 필터를 추가로 포함하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

광원에 밀착 또는 인접하게 설치되는 방열판을 추가로 포함하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

광원과 연결되는 전원; 및 광원의 광량을 조절하는 조광기를 추가로 포함하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

인큐베이터는 CO₂ 인큐베이터인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

배양 용기는 복수의 웰을 포함하는 웰 플레이트로 구성되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

광원은 460 내지 590 nm 파장의 그린 발광 다이오드인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항에 있어서,

고분자 수지는 실리콘, 라텍스, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 14

제1항에 있어서,

배양 용기는 고분자 수지 및 광감응제를 포함하는 혼합물을 교반하여 광감응제를 분산시킨 후, 교반된 혼합물을 배양 용기 형상으로 성형한 다음, 성형된 배양 용기를 경화시킴으로써 제작되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 15

제14항에 있어서,

고분자 수지를 용융시킨 후 용융된 수지와 광감응제를 혼합하고 교반하거나, 고분자 수지와 광감응제 및 용매를 포함하는 용액 형태의 혼합물을 교반하거나, 용매와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한 후 광감응제 용액을 비고형화된 고분자와 혼합하고 교반하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 16

제1항에 있어서,

배양 용기는 용매와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한 후, 광감응제 용액을 배양 용기에 흡수시키는 팽윤법을 통해 광감응제를 배양 용기에 담지시킴으로써 제작되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 17

제16항에 있어서,

팽윤법은 광감응제 용액에 배양 용기를 함침하는 방법, 또는 주사기를 이용하여 광감응제 용액을 배양 용기에 주입하는 방법인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도장치.

청구항 18

제1항의 줄기세포 분화유도장치를 이용하여 줄기세포를 배양하는 단계; 및

배양 중에 줄기세포에 광을 조사하는 단계를 포함하는 줄기세포 분화유도방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포 또는 편도 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

광에너지 유도 활성산소종을 이용하여 줄기세포의 골 형성 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

배양 중에 0.1 내지 5 mW/cm²의 범위에서 광량을 제어하여 10분 내지 5시간 동안 연속적 또는 간헐적으로 광을 조사하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화유도방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광에너지 유도 활성산소의 제어를 통해 줄기세포의 분화 촉진 및 특정 세포로의 분화를 유도할 수 있는 줄기세포 분화유도장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포 연구는 난치병 정복을 위한 21세기 생명과학계의 중요한 이슈로서, 심혈관계, 신경계, 혈액 및 면역계, 유전병, 간질환, 내분비 질환, 골, 연골, 피부 질환 등 의학의 거의 모든 영역에서 도입을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 성체 줄기세포의 경우, 체외배양 등의 조건에서 호르몬, 사이토카인, 성장인자 제어 및 미세가공 기술(micro-electro-mechanical systems)을 이용하여 증식 및 분화 유도 연구가 진행되고 있다.

[0003] 줄기세포 관련 세계시장은 2005년 69억 달러 규모에서 연평균 24.63%의 성장률을 보이며, 2012년 324억 달러 규모를 형성할 것으로 전망되고 있다. 현재 지역별로는 북미에서 30% 정도의 점유율로 가장 큰 시장을 형성하고 있으나, 유럽과 아시아-태평양 지역에서 빠른 성장률을 보이면서 시장 규모가 크게 증가되고 있다. 이러한 줄기세포 시장은 크게 줄기세포의 종류, 기술, 치료 대상체 등 세 가지로 분류되며, 이중 줄기세포 종류와 관련된 시장에서는 성체줄기 세포가 연간 180억 달러로 전체시장에서 55.7%의 비중을 형성하고 있으며, 줄기세포의 기술적 측면에서 시장규모는 줄기세포의 이식에 관련된 시장규모가 전체 시장의 28%를 차지하고 있다. 즉, 줄기세

포 관련 산업에서 성체줄기세포를 이용한 세포 이식관련 산업분야가 매우 큰 비중을 차지하고 있고, 현재 줄기세포를 이용한 산업적 활용은 줄기세포 치료제, 혈액, 세포은행 분야, 그리고 질환별로는 심혈관 질환, 당뇨, 골질환 등에 집중되고 있다. 이러한 산업분야에서 대표적인 선두기업은 영국 국적의 기업체가 가장 많으나, 전반적으로 특정 국가에 한정되어 있지 않은 상황으로, 시장 선점을 위한 각축전이 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 종전의 약물 또는 생장증식 인자 투여가 아닌 세포 외부에서의 제어된 활성산소를 이용함으로써 도입되는 약물 등에 의한 2차적 반응이 없고, 또한 광에너지를 이용한 제어된 활성산소를 이용함에 따라 다양한 줄기세포에 적용 가능한 줄기세포 분화유도장치 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 상술한 목적을 달성하기 위해, 인큐베이터; 인큐베이터에 설치되고, 줄기세포를 수용하며, 고분자 수지 및 광감응제를 함유하는 배양 용기; 및 배양 용기에 광을 조사하는 광원을 포함하는 줄기세포 분화유도장치를 제공한다.

[0006] 본 발명에 따른 장치는 배양 용기 및 광원 사이에 설치되는 자외선 필터를 추가로 포함할 수 있다.

[0007] 본 발명에 따른 장치는 광원에 밀착 또는 인접하게 설치되는 방열판을 추가로 포함할 수 있다.

[0008] 본 발명에 따른 장치는 광원과 연결되는 전원; 및 광원의 광량을 조절하는 조광기를 추가로 포함할 수 있다.

[0009] 본 발명에서 인큐베이터는 CO₂ 인큐베이터일 수 있다.

[0010] 본 발명에서 배양 용기는 복수의 웰을 포함하는 웰 플레이트로 구성될 수 있다.

[0011] 본 발명에서 광원은 460 내지 590 nm 파장의 그린 발광 다이오드일 수 있다.

[0012] 본 발명에서 광감응제는 포르피린계 화합물 및 그 치환체, 프탈로시아닌계 화합물 및 그 치환체, 염료 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 광감응제는 5,10,15-트리페닐-20-(4-카르복시페닐)-포르피린 백금(5,10,15-triphenyl-20-(4-carboxyphenyl)-porphyrin platinum, PtCP), 5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린 백금(5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin platinum, t-PtCP), 테트라페닐포르피린(tetraphenyl porphyrin, H₂TTP), 헤마토포르피린(hemato porphyrin, HP), 프로토포르피린(proto porphyrin, PP), 인도시아닌그린(indocyanin green, ICG), 메조-테트라키스(p-설포나토페닐) 포르피린(meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl)porphyrin, TSPP) 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 광감응제는 블루영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 A, 그린영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 B, 및 레드영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 C 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 광감응제 A는 하이포크렐린 B(Hypocrellin B), 아크리딘 오렌지(Acridine orange), 쿠마린(Coumarin) 중에서 선택되는 1종 이상이고; 광감응제 B는 로즈 벵갈(Rose Bengal), 로다민 B(Rhodamine B), 메로시아닌 540(Merocyanine 540) 중에서 선택되는 1종 이상이며; 광감응제 C는 메틸렌 블루(Methylene blue), 페오포르바이드 A(Pheophorbide A), 크립토시아닌(Cryptocyanine) 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 광감응제의 농도는 1×10^{-10} 내지 1×10^{-8} mol/cm²일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 고분자 수지는 실리콘, 라텍스, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 배양 용기는 고분자 수지 및 광감응제를 포함하는 혼합물을 교반하여 광감응제를 분산시킨 후, 교반된 혼합물을 배양 용기 형상으로 성형한 다음, 성형된 배양 용기를 경화시킴으로써 제작될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 고분자 수지를 용융시킨 후 용융된 수지와 광감응제를 혼합하고 교반하거나, 고분자 수지와 광감응제 및 용매를 포함하는 용액 형태의 혼합물을 교반하거나, 용매와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한

후 광감응제 용액을 비고형화된 고분자와 혼합하고 교반할 수 있다.

- [0020] 본 발명에서 배양 용기는 용매와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한 후, 광감응제 용액을 배양 용기에 흡수시키는 팽윤법을 통해 광감응제를 배양 용기에 담지시킴으로써 제작될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 팽윤법은 광감응제 용액에 배양 용기를 함침하는 방법, 또는 주사기를 이용하여 광감응제 용액을 배양 용기에 주입하는 방법일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상술한 줄기세포 분화유도장치를 이용하여 줄기세포를 배양하는 단계; 및 배양 중에 줄기세포에 광을 조사하는 단계를 포함하는 줄기세포 분화유도방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에서 줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포 또는 편도 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 광에너지 유도 활성산소종을 이용하여 줄기세포의 골 형성 분화를 유도할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 배양 중에 0.1 내지 5 mW/cm²의 범위에서 광량을 제어하여 10분 내지 5시간 동안 연속적 또는 간헐적으로 광을 조사할 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 기술은 종전의 약물 또는 성장증식인자 투여가 아닌 세포 외부에서의 제어된 활성산소를 이용함으로써 도입되는 약물 등에 의한 2차적 반응이 없고, 또한 광 에너지를 이용한 제어된 활성산소를 이용함에 따라 다양한 줄기세포에 적용 가능하다는 범용성이 있다.
- [0027] 본 발명에 따라 활성산소를 이용한 줄기세포의 성장제어 기술은 광물리적 특성과 이에 따른 생물학적 효능과의 상관관계를 규명함으로써 새로운 융합학문의 장을 열게 될 것이며, 기존의 생물학적 효능 또는 생체물질에 대한 새로운 시야에서 다각적인 연구를 진행하는데 토대가 될 것으로 예상된다. 특히 활성산소를 이용한 줄기세포의 분화제어 연구는 대상 맞춤형 세포재생을 통한 재생의학 부분에 신기원을 마련할 것으로 사료된다.
- [0028] 또한, 본 발명 기술을 토대로 줄기세포를 이용한 재생의학분야에서 치료기간 단축을 통한 환자부담과 병원재정 및 의료보험 등 직/간접적인 사회의료 지출비용을 경감시킬 것이다. 또한 원천기반기술 확보를 통해 향후 유관 연구와 산업분야에서 우선권을 확보함으로써 작게는 기술료 수입에서 크게는 기술수출에 따른 막대한 경제적 수익을 창출할 것이며, 관련한 국내인력 양상과 고용인력 증대 등의 국내 시장 활성화에 크게 이바지할 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명에 따른 줄기세포 분화유도장치의 구성도이다.
- 도 2는 본 발명에서 사용 가능한 광원의 파장 범위를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 광에너지 유도 활성산소 생성 소재부(배양 용기)를 제조하는 일 예를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따라 인간 중간엽 줄기세포의 골 형성 분화를 유도한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따라 편도 중간엽 줄기세포의 골 형성 분화를 유도한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명에 따라 편도 중간엽 줄기세포의 여러 가지 분화를 유도한 결과를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0031] 본 발명은 광에너지 유도 활성산소종을 이용한 줄기세포 분화유도장치 및 방법에 관한 것으로, 제어된 광에너지를 조사하는 시스템, 광에너지 유도에 의해 활성산소를 생성하는 소재, 광에너지 유도에 의해 생성되는 활성산소에 의한 줄기세포 분화 유도 조건을 포함할 수 있다.
- [0032] 도 1은 본 발명에 따른 줄기세포 분화유도장치의 구성도로서, 본 발명에 따른 장치는 인큐베이터(10), 배양 용기(20), 자외선 필터(40), 광원(50), 방열판(60), 조광기(70), 전원(80) 등을 구비할 수 있다.
- [0033] 인큐베이터(incubator)(10)는 통상적인 세포 배양용 인큐베이터의 구조와 기능을 구비할 수 있다. 예를 들어, 온도조절수단, 현탁 배양을 위한 세이킹(shaking) 수단 등을 필요에 따라 선택적으로 구비할 수 있다. 바람직하

게는, 배지 pH의 완충효과 등을 위해, 이산화탄소를 첨가한 기체 환경을 유지하는 기능을 갖춘 CO₂ 인큐베이터를 사용할 수 있다.

- [0034] 배양 용기(20)는 줄기세포 및 배지를 수용하는 역할을 하며, 인큐베이터(10)의 내부에, 주로 아래쪽에 설치될 수 있다. 바람직하게는, 배양 용기(20)는 복수의 웰을 포함하는 웰 플레이트(well plate)로 구성될 수 있다. 웰의 개수는 예를 들어 2 내지 200개, 바람직하게는 10 내지 100개일 수 있다. 본 발명에 따른 배양 용기(20)는 광기능성 배양 용기로서, 광에너지 유도 활성산소종을 이용하여 줄기세포 분화를 유도하는 역할을 하며, 이를 위해 고분자 수지 및 광감응제를 포함할 수 있다.
- [0035] 자외선 필터(UV filter)(40)는 배양 용기(20) 및 광원(50) 사이에 설치되어 줄기세포에 해로운 자외선을 흡수 또는 차단하는 역할을 한다.
- [0036] 광원(light source)(50)은 배양 용기(20)에 광(light)(30)을 조사하여 광에너지 유도 활성산소종을 발생시키는 역할을 한다. 광원(50)은 인큐베이터(10)의 내부에서 배양 용기(20)의 상부에 설치될 수 있다. 광원(50)으로는 예를 들어 발광다이오드(LED), 레이저, 제논램프 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 그린 LED(GLED)를 사용할 수 있으며, 예를 들어 인쇄회로기판을 포함한 GLED PCB 보드를 사용할 수 있다. 도 2를 참고하면, GLED는 460 내지 590 nm 파장 범위를 가질 수 있다. 광원(50)의 광량은 예를 들어 0.1 내지 5 mW/cm²일 수 있다.
- [0037] 방열판(radiator panel)(60)은 광원(50)에서 발생한 열을 방출하여 인큐베이터(10)의 온도 상승을 방지하는 역할을 한다. 방열판(60)은 광원(50)에 밀착 또는 인접하게 설치될 수 있고, 복수의 핀 구조를 구비할 수 있다.
- [0038] 조광기(dimmer)(70)는 광원(50)의 광량을 조절하는 역할을 하고, 전원(power supply)(80)은 광원(50)과 연결되어 광원(50)에 전기를 공급하는 역할을 한다.
- [0039] 고분자 수지는 배양 용기(20)를 구성하는 것으로서, 고분자 수지는 특별히 제한되지 않고 모든 종류의 수지를 사용할 수 있다. 예를 들어, 실리콘, 라텍스, 실리콘-라텍스 혼합물, 고어텍스, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET) 중에서 1종을 선택하여 사용하거나, 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 실리콘 수지의 경우 구하기가 용이하고 열에 의해 쉽게 변형 가능하다는 이점이 있다. 또한 실리콘의 경우 생체적합 고분자소재로서 소재 자체의 생물학적 독성이 없다는 이점이 있다.
- [0040] 광감응제는 고분자 배양 용기에 포함되어 광에너지 유도에 의해 활성산소를 생성하는 역할을 하며, 구체적으로 400 nm 내지 800 nm의 흡수파장 영역에서 광에너지를 흡수하고, 유도된 광에너지(빛)에 의해 활성산소를 생성하여 줄기세포의 분화를 유도할 수 있다.
- [0041] 광감응제는 특별히 제한되지 않고 모든 종류의 광감응제를 사용할 수 있다. 예를 들어, 포르피린계 화합물 및 그 치환체, 프탈로시아닌계 화합물 및 그 치환체, 염료 등을 1종 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있는데, 구체적으로 5,10,15-트리페닐-20-(4-카르복시페닐)-포르피린 백금(5,10,15-triphenyl-20-(4-carboxyphenyl)-porphyrin platinum, PtCP), 5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린 백금(5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin platinum, t-PtCP), 테트라페닐포르피린(tetraphenyl porphyrin, H₂TPP), 헤마토포르피린(hemato porphyrin, HP), 프로토포르피린(proto porphyrin, PP), 인도시아닌그린(indocyanin green, ICG), 메조-테트라키스(p-설포나토페닐) 포르피린(meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl)porphyrin, TSPP) 및 페오포르바이드 A(pheophorbide A) 등을 사용할 수 있다.
- [0042] 특히, PtCP의 경우 단일항 산소의 생성효율이 높은 이점이 있다. 또한 PtCP를 포함한 포르피린 계열의 광감응제의 경우 실리콘 등의 고분자 내에 도입된 후에도 광물리적 특성의 변화(광감응제의 흡수 또는 형광 파장범위)가 거의 없다는 이점이 있다.
- [0043] 또한, 각기 다른 파장대역에서 광흡수피크를 갖는 복수의 광감응제를 조합함으로써, 빛을 더 많이 흡수하도록 하여 활성산소 생성효율을 더욱 개선할 수 있다. 구체적으로, 블루영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 A; 그린영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 B; 및 레드영역의 중심파장대에서 광흡수피크를 갖는 광감응제 C 중에서 선택되는 적어도 1종 이상을 사용할 수 있다. 이에 따라, 400 내지 750 nm의 파장 영역에서 고른 광흡수효율을 갖는 배양 용기를 얻을 수 있다.
- [0044] 블루영역 중심파장대란, 가시광선 영역 중에서 청색 계열의 색을 가진 광이 주로 분포하는 영역을 의미하며, 예를 들어 430 내지 495 nm 범위를 포함할 수 있다.
- [0045] 그린영역 중심파장대란, 가시광선 영역 중에서 녹색 계열의 색을 가진 광이 주로 분포하는 영역을 의미하며, 예

를 들어 505 내지 570 nm 범위를 포함한다.

- [0046] 레드영역 중심파장대란, 가시광선 영역 중에서 적색 계열의 색을 가진 광이 주로 분포하는 영역을 의미하며, 예를 들어 610 내지 720 nm 범위를 포함할 수 있다.
- [0047] 위에서 언급된 각 영역별 중심파장대의 범위는 통상적인 상태에서의 범위를 나타낸 것으로, 주변 환경 등의 조건 등에 따라 상술한 범위를 벗어날 수도 있다.
- [0048] 광감응제 A로는 하이포크렐린 B, 아크리딘 오렌지($\lambda_{\max}$ 492 nm), 쿠마린 등을 사용할 수 있고, 광감응제 B로는 로즈 벵갈($\lambda_{\max}$ 549 nm), 로다민 B($\lambda_{\max}$ 554 nm), 메로시아닌 540($\lambda_{\max}$ 555 nm) 등을 사용할 수 있으며, 광감응제 C로는 메틸렌 블루($\lambda_{\max}$ 665 nm), 페오포르바이드 A, 크립토시아닌($\lambda_{\max}$ 648 nm, 703 nm) 등을 사용할 수 있다.
- [0049] 실험결과에 따르면, 광감응제가 한가지씩만 도입된 경우에 비해, 두 가지 광감응제를 합하여 도입한 경우에서 활성산소 생성효율이 50% 이상 개선될 수 있다.
- [0050] 또한, 광감응제 A, 광감응제 B, 광감응제 C 중 적어도 1종 이상과; PtCP, t-PtCP, H₂TPP, HP, PP, ICG, TSPP 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0051] 배양 용기 중 광감응제의 농도는 1×10^{-10} 내지 1×10^{-8} mol/cm³일 수 있다. 이러한 범위의 농도에서 우수한 분산성을 얻을 수 있다. 이 농도 범위는 도입된 광감응제가 상호 엉킴현상이 없고, 또한 도입되는 광감응제의 농도에 의존적으로 활성산소를 발현하는 범위이다.
- [0052] 본 발명의 일 실시형태에 따른 배양 용기는 교반법을 이용하여 제조될 수 있다. 구체적으로, 고분자 수지 및 광감응제를 포함하는 혼합물을 교반하여 광감응제를 분산시킨 후, 교반된 혼합물을 배양 용기 형상으로 성형한 다음, 성형된 배양 용기를 경화시킴으로써 제작될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 실시형태에 따라 교반법을 이용하여 배양 용기를 제조하는 방법은 크게 교반 단계, 성형 단계, 및 경화 단계로 구성된다.
- [0054] 먼저, 교반 단계는 고분자 수지 및 광감응제를 포함하는 혼합물을 교반하여 광감응제를 분산시키는 단계로서, 두 가지 형태로 실시할 수 있는데, 첫 번째는 용융 수지를 이용하는 경우이고, 두 번째는 용매를 이용하는 경우이다.
- [0055] 첫 번째 교반 방법은 고분자 수지를 용융시킨 후 용융된 수지와 광감응제를 혼합하고 교반하는 방법이다. 이 방법의 경우 고분자 수지 및 광감응제만이 사용되며, 용매를 필요로 하지 않는다. 그러나, 필요에 따라 용매를 사용하거나, 분산제 등의 첨가제를 사용할 수도 있다.
- [0056] 교반방법은 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 10 내지 1,000 rpm의 속도로 1 내지 10분간 수행할 수 있다. 이러한 범위의 교반속도와 교반시간에서 우수한 분산성을 얻을 수 있다.
- [0057] 두 번째 교반 방법은 고분자 수지, 광감응제 및 용매를 포함하는 용액 형태의 혼합물을 교반하는 방법이다. 구체적으로, 용매와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한 후, 광감응제 용액을 비고형화된 고분자(기존의 액정 표면 코팅 고분자를 포함함)와 혼합하고 교반할 수 있다.
- [0058] 용매를 사용하는 경우 용융 수지를 사용하는 경우보다 분산성 측면에서 유리하다. 즉, 용융수지에 직접 광감응제를 분산시킬 수 있으나, 용매에 광감응제를 용해시켜 사용할 경우 더 균일하게 용융수지와 교반되는 이점이 있다.
- [0059] 용매는 특별히 제한되지 않고 모든 종류의 용매를 사용할 수 있고, 또한 하나의 용매 또는 2개 이상의 혼합 용매를 사용할 수 있으며, 예를 들어 디클로메탄, 에탄올, 톨루엔, 테트라하이드로푸란 등을 사용할 수 있다. 이 용매 중 에탄올의 경우 휘발성이 좋고 유기독성이 작다는 이점이 있다. 고분자 수지 용해용으로 따로 용매를 사용하지 않으며, 용매는 광감응제를 효율적으로 용해시킬 수 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0060] 다음, 성형 단계는 교반된 혼합물을 성형하여 배양 용기 형태의 성형물을 얻는 단계이다. 성형 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 압출, 사출, 캐스팅 방법 등을 통해 배양 용기 형태로 제작할 수 있다.
- [0061] 다음, 경화 단계는 성형된 배양 용기를 경화하여 완제품을 얻는 단계이다. 경화 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 열경화 방법을 사용할 수 있다. 열경화 방법으로는 예를 들어 물중탕을 이용하는 방법, 오븐을 이용

하는 방법 등을 사용할 수 있다.

- [0062] 본 발명의 다른 실시형태에 따른 배양 용기는 팽윤법(swelling method)을 이용하여 제조될 수 있다. 구체적으로, 용매(테트라하이드로푸란, 디클로로메탄 등)와 광감응제를 혼합하여 광감응제 용액을 제조한 후, 광감응제 용액을 배양 용기에 흡수시키는 팽윤법을 통해 광감응제를 배양 용기에 담지시킴으로써 제작될 수 있다.
- [0063] 예를 들어, 도 3을 참고하면, 배양 용기를 헥산, 아세톤, 에탄올 등으로 씻어 유기물을 제거한 후 광감응제 용액에 넣고, 50 내지 300 rpm으로 교반하면서 5 내지 20시간 동안 25 내지 135℃의 온도로 가열하는 스웰링 공정; 및 반응 후 배양 용기를 에탄올 등으로 여러 번(2 내지 5회) 씻어 표면에 잔존하는 광감응제를 제거한 후, 10 내지 40℃에서 10 내지 100시간 동안 건조하여 용매를 제거하는 디스웰링(deswelling) 공정을 통해 제작할 수 있다.
- [0064] 팽윤법을 이용한 제조방법에서 팽윤법은 광감응제 용액에 배양 용기를 함침하는 방법, 또는 주사기를 이용하여 광감응제 용액을 배양 용기에 주입하는 방법일 수 있다.
- [0065] 상술한 교반법과 팽윤법을 비교하여 보면, 교반법이 여러 가지 측면에서 유리하다. 팽윤법을 이용할 경우, 광감응제의 분산성이 떨어져서 배양 용기의 위치에 따라 광감응제의 농도가 불균일할 수 있고, 또한 광감응제가 특정 농도 이상으로 도입될 경우 오히려 활성산소 생성효율이 감소될 수 있다. 반면에, 교반법을 이용하여 광기능성 배양 용기를 제조할 경우, 광감응제 분산성을 개선시킬 수 있고, 이에 따라 활성산소 생성효율을 개선시킬 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은 상술한 줄기세포 분화유도장치를 이용하여 줄기세포를 배양하는 단계; 및 배양 중에 줄기세포에 광을 조사하는 단계를 포함하는 줄기세포 분화유도방법을 제공한다.
- [0067] 줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포(H-MSC: human mesenchymal stem cell) 또는 편도 중간엽 줄기세포(T-MSC: tonsil mesenchymal stem cell)일 수 있다.
- [0068] 본 발명에 따라 광에너지 유도 활성산소종을 이용하여 줄기세포의 골 형성 분화(osteogenesis differentiation)를 유도할 수 있다.
- [0069] 광에너지 유도 활성산소의 제어를 통해 줄기세포의 분화 촉진 및 특정 세포로의 분화를 유도할 수 있도록, 배양 중에 0.1 내지 5 mW/cm²의 범위에서 광량을 제어하여 10분 내지 5시간 동안 연속적 또는 간헐적으로 광을 조사할 수 있다.
- [0070] 이하, 실시예 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0071] [실시예]
- [0072] 도 1과 같은 구성의 줄기세포 분화유도장치를 이용하였다. 인큐베이터로는 CO₂ 인큐베이터, 광원으로는 GLED PCB 보드를 이용하였다. 배양용기는 도 3에 예시된 Swell-encapsulation shrink method을 이용하여 웰 플레이트로 제작하였고, 이때 고분자로는 PET, 광감응제로는 HP(농도 1.14×10^{-9} mol/cm²)를 이용하였다.
- [0073] [시험예]
- [0074] 도 4는 본 발명에 따라 H-MSC의 골 형성 분화를 유도한 결과를 나타낸 그래프로서, GLED를 500 μW/cm²의 광량으로 30분씩 2회간 조사하였을 때, H-MSC의 경우 골 형성 분화 인자로 알려진 ALP(alkaline phosphatase)와 OPN(osteopontin)의 mRNA 수치가 기준 대비 약 20% 이상 증가하는 것을 확인하였다.
- [0075] 도 5는 본 발명에 따라 T-MSC의 골 형성 분화를 유도한 결과를 나타낸 그래프로서, GLED를 각각 2.8 mW/cm² 광량으로 30분 1회, 1 mW/cm² 광량으로 2시간 1회 조사하였을 때, T-MSC의 경우 골 형성으로의 분화가 기준 대비 증가함을 확인하였으나, 광량이 증가할수록 그 효율은 줄어들었다. 도 5 및 6에서 PS는 광감응제를 포함한 배양용기를 사용한 경우이고, PET는 광감응제를 포함하지 않은 배양용기를 사용한 경우이다.
- [0076] 도 6은 본 발명에 따라 T-MSC의 여러 가지 분화를 유도한 결과를 비교한 그래프로서, GLED를 각각 2.8 mW/cm² 광량으로 30분 1회, 1 mW/cm² 광량으로 2시간 1회 조사하였을 때, T-MSC의 경우 지질 형성(adipogenesis) 및 연골 형성(chondrogenic) 분화에 비해, 골 형성으로의 분화가 선택적으로 일어남을 확인하였다.

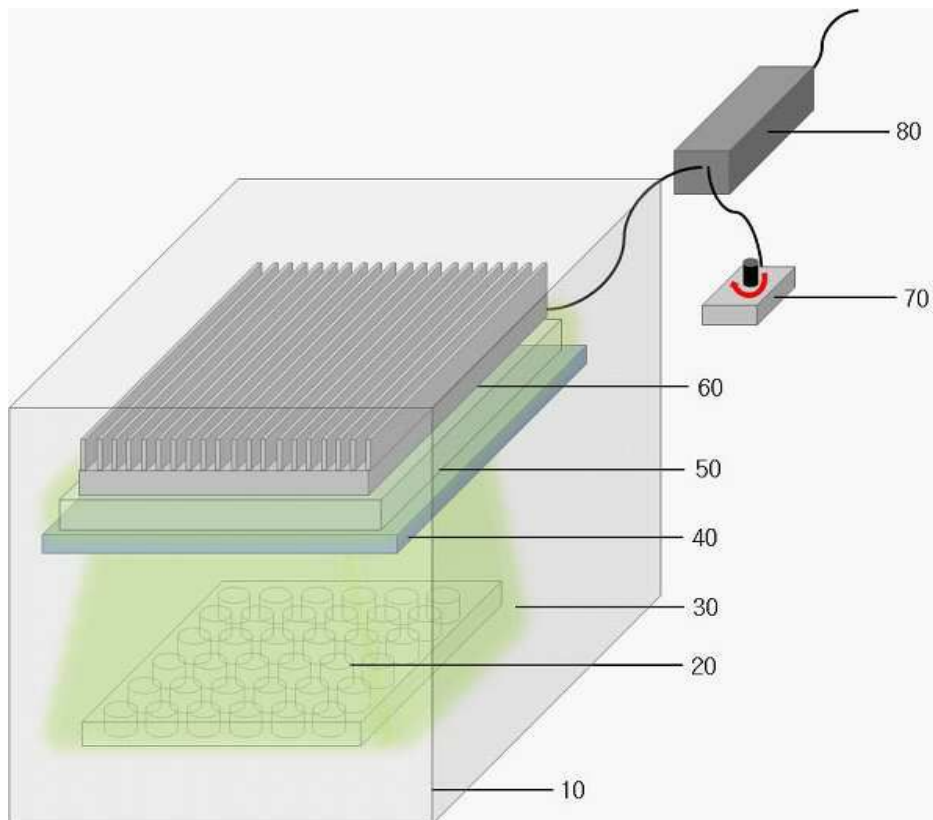
부호의 설명

[0077]

- 10: 인큐베이터
- 20: 배양 용기
- 30: 광
- 40: 자외선 필터
- 50: 광원
- 60: 방열판
- 70: 조광기
- 80: 전원

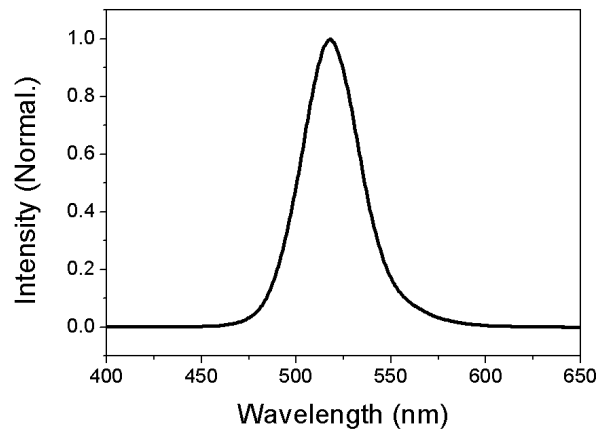
도면

도면1

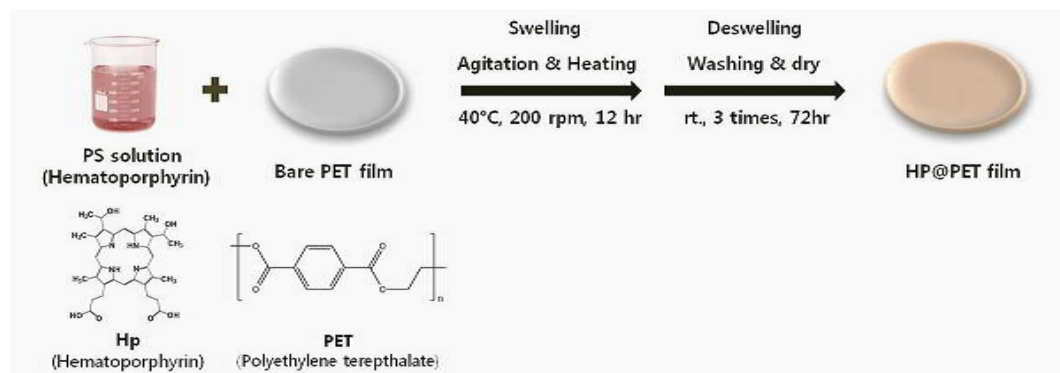


도면2

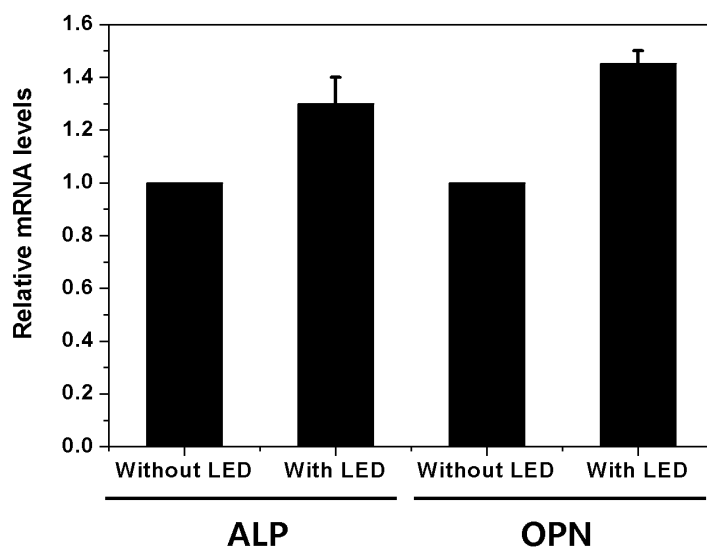
Light source : GLED (460 nm ~ 590 nm)



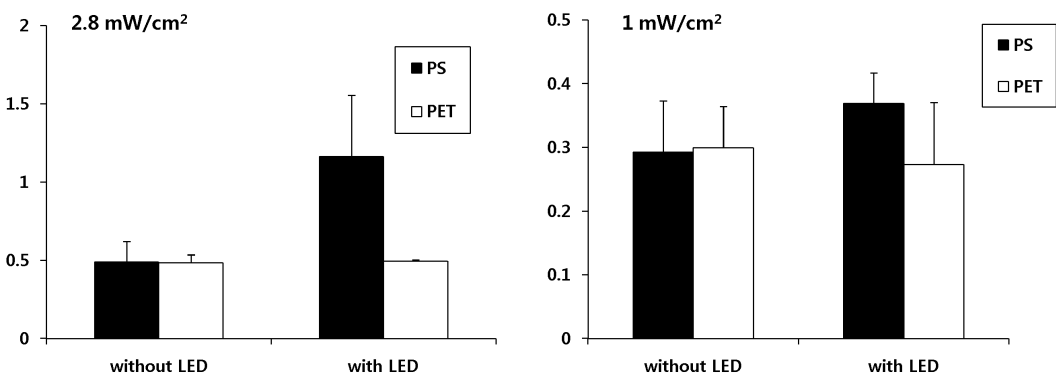
도면3



도면4



도면5



도면6

