



- (51) 국제특허분류:
C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/09 (2010.01)
D04H 1/728 (2012.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007394
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 16일 (16.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0089858 2014년 7월 16일 (16.07.2014) KR
10-2014-0098995 2014년 8월 1일 (01.08.2014) KR
- (71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 609-836 부산시 금정구 부산대학교 63번길 2 (장전동, 부산대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 윤식 (YOON, Sik); 609-310 부산시 금정구 금샘로 262, 206동 1402호, Busan (KR). 박종영 (KWAK, Jong-Young); 443-821 경기도 수원시 영통구 월드컵로 185, 1동 904호, Gyeonggi-do (KR). 진송완 (JIN, Song-Wan); 429-740 경기도 시흥시 시청로 59, 508동 1803

호, Gyeonggi-do (KR). 정영훈 (JEONG, Young Hun); 706-749 대구시 수성구 신천동로 320, 3동 208호, Daegu (KR). 김창근 (KIM, Chang Gun); 442-190 경기도 수원시 팔달구 권광로 367번길 11, 604호, Gyeonggi-do (KR). 최다정 (CHOI, Da Jeong); 702-736 대구시 북구 동천로 156, 110동 1307호, Daegu (KR). 강해영 (KANG, Hae Yeong); 306-761 대전시 대덕구 계족로 761번길 24, 107동 1703호, Daejeon (KR). 파즐리서반 (FAZLI, Subhan); 626-870 경상남도 양산시 물금읍 부산대학교 49 부산대학교 의학전문대학원 해부학교실, Gyeongsangnam-do (KR). 이크람무하마드 (IKRAM, Muhamad); 626-870 경상남도 양산시 물금읍 부산대학교 49 부산대학교 의학전문대학원 해부학교실, Gyeongsangnam-do (KR).

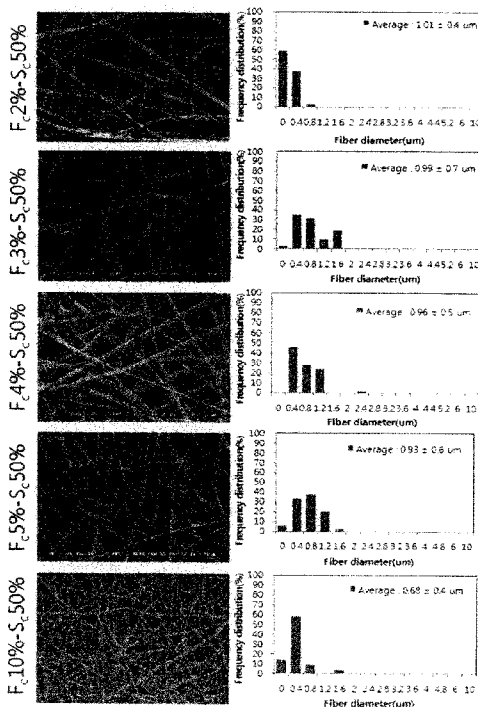
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOMIMETIC SUPPORT FOR THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURING, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 생체모사 3차원 세포배양용 지지체, 이의 제조방법 및 이의 용도

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention provides a method for manufacturing a composite nanofiber support and a fish collagen/synthetic polymer nanofiber support manufactured by the method, wherein the method comprises: a first step for dissolving a synthetic polymer in an organic solvent; a second step for dissolving a fish collagen in water to prepare an aqueous fish collagen solution; a third step for adding the aqueous fish collagen solution prepared in the second step to the synthetic polymer solution prepared in the first step, followed by mixing; and a fourth step for electrospinning the mixture liquid prepared in the third step to manufacture a nanofiber support. In addition, the present invention provides a method for three-dimensional cell culturing using an agarose-collagen-alginate composite hydrogel support, and more specifically, to a method for three-dimensional cell culturing, the method comprising the steps of: mixing an alginate solution and cells, followed by culturing; adding a collagen solution to the cultured mixture to prevent the detachment of the cells; and adding an agarose solution to the collagen-added mixture, followed by standing and gelation.

(57) 요약서: 본 발명은 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1 단계; 피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2 단계; 상기 제 1 단계에서

[다음 쪽 계속]



LC, LK, LR, LS, 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, 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, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

제조한 합성고분자 용액에 제 2 단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 혼합하는 제 3 단계; 및 상기 제 3 단계에서 제조한 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 피쉬콜라겐/합성고분자 나노섬유 지지체를 제공한다. 또한, 본 발명은 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3 차원 세포배양 방법으로, 보다 상세하게는 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및 상기 콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3 차원 세포배양 방법을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 생체모사 3차원 세포배양용 지지체, 이의 제조방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 친수성 천연고분자인 피쉬콜라겐 및 소수성 합성고분자를 유효성분으로 포함한 혼합액에 전기방사법을 이용하여 제조된 나노섬유 지지체의 제조방법 및 이의 용도와 아가로스, 콜라겐 및 알지네이트를 유효성분으로 함유하는 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 생체모사 3차원 세포배양방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 조직공학은 세포, 공학재료 및 적절한 생리/생화학적 인자 등을 복합적으로 사용하여 생체 기능을 유지, 증진 및 복구시키거나 대체함으로써 임상적으로 치료를 위한 목적으로 응용하고자 하는 융복합 학문으로 최근 주목받고 있는 분야이다.
- [3] 이러한 조직공학의 가장 핵심적인 기술은 생체 조직에서 분리한 세포들을 생분해성 중합체로 만든 다공성 지지체(porous scaffold)에 부착시켜 생체내로 이식하거나 체외에서 일정기간 동안 배양하여 새로운 생체조직을 생성하는 것으로, 세포를 이용하여 뼈, 연골, 혈관, 망막, 피부, 근육과 같은 조직의 일부 혹은 전체를 복원하거나 대체하는 등의 다양한 분야에서 이용되어 짐에 따라, 인공 조직/장기(artificial tissue/organ)를 개발하기 위한 조직공학의 발전을 위해서는 공학재료, 생체재료, 세포, 생물학적 활성인자 뿐만 아니라, 생체환경 모사 기술의 발전이 필수적이다.
- [4] 지금까지의 세포배양 방법은 부착성 세포(adherent cell)의 성장을 지지해주기 위해 폴리스티렌(polystyrene) 혹은 유리(glass)로 된 기질(substrate)로 이루어진 2차원 표면에서 세포를 배양하는 것을 기반으로 하였다. 그러나 이러한 2차원 표면에서 배양하는 단층(monolayer) 세포배양 방법은 세포외기질(extracellular matrix)에 부착되어 3차원적으로 성장하는 세포의 생체조직 환경을 정확히 반영할 수 없으므로 세포의 생체조직 환경과는 많은 차이를 나타낸다. 그 결과, 2차원적 세포배양과 3차원적 세포배양은 전반적인 형태학적 차이를 나타내며, 통상적인 2차원적 세포배양을 통하여 일어나는 수용체의 발현, 유전자의 전사조절, 세포의 이동 및 세포자멸사(apoptosis)와 같은 생명현상은 실제 생체 조직 환경에서 일어나는 현상과 크게 다르다.
- [5] 또한 기존의 2차원적 세포배양은 한 종류의 동일한 세포를 배양하므로, 서로 다른 종류의 세포 간 상호작용을 고려할 수 없다. 일부에서 2차원적 공동배양(2D co-culture)을 통해 이러한 문제를 부분적으로 해결하고자 시도되고 있으나, 그럼에도 불구하고 생체 조직에서의 세포 환경과는 많은 차이점이 나타났다.

- [6] 이러한 2차원적 세포배양에서 나타나는 문제를 해결하기 위해 세포의 공간적인 구조(spatial organization)를 고려한 3차원적 세포배양 방법에 대한 연구 및 개발에 대한 필요성이 요구되어 졌으며, 문제 해결을 위해 조직공학에서는 생체조직 모사 세포배양 환경을 조성하기 위한 방법으로 세포를 구멍이 존재하는 생체적합성 지지체(porous biocompatible scaffold)에서 배양하여 3차원적 세포배양 환경을 조성하기 위한 연구개발이 진행되어 왔으며, 그 결과 많은 합성고분자 및 천연고분자들을 이용한 지지체(scaffold) 제작 방법 및 연구하고자 하는 조직에 따른 정확한 세포배양 방법의 연구가 진행되어 졌다.
- [7] 그러나, 현재까지 생체조직을 재생하는데 있어서, 가장 적합한 지지체(scaffold) 제작 방법은 알려진 것이 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 상기 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 친수성 천연고분자인 피쉬콜라겐과 소수성 합성고분자인 폴리카프로락톤[poly(ϵ -caprolactone); 이하 PCL]의 혼합용액을 전기방사하여 제조하는 나노섬유 지지체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의한 나노섬유 지지체를 제공하여 이를 이용한 고효율/고기능성 생체모사 3차원 세포배양 모델을 제공하고자 하며, 천연고분자 소재로 널리 사용되고 있는 아가로스, 콜라겐 및 알지네이트의 복합 소재로 특수하게 제조된 하이드로겔 지지체를 통한 3차원 세포 배양기술을 이용하여 기존의 천연고분자 소재들의 문제점을 해결할 수 있는 신규한 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용하여 세포배양 효율이 매우 우수한 3차원적 세포배양 방법과 그 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계; 피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계; 상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계; 및 상기 제 3단계에서 제조한 혼합용액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법을 제공한다.
- [10] 본 발명은 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계; 피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계; 상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 상기 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계; 상기 제 3단계에서 제조한 혼합용액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계; 및 상기 제 4단계에서 제조된 나노섬유 지지체에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포배양 방법을 제공한다.
- [11] 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및 상기

콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법을 제공한다.

- [12] 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 상기 콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및 상기 3차원 배양 세포의 성장, 증식, 사멸, 분화 및 이동을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 활성 측정방법을 제공한다.

- [13] 또한 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 상기 콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및 상기 3차원 배양 세포에 항암제를 첨가하여 세포 생존율을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 감수성의 측정방법을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 피쉬콜라겐/합성고분자 나노섬유 지지체는 기존의 합성고분자 소재에 천연고분자인 피쉬콜라겐을 첨가하여 혼합한 용액을 전기방사하여 제조된 복합 나노섬유 지지체로서, 기존의 합성고분자 소재의 나노섬유 지지체보다 높은 기계적 안정성을 나타낼 수 있다. 또한 본 발명의 피쉬콜라겐/합성고분자 나노섬유 지지체를 이용한 세포배양 결과, 본 발명의 피쉬콜라겐/합성고분자 나노섬유 지지체는 생체와 매우 유사한 세포배양 환경을 조성하여 세포부착능, 세포생존능 및 세포분포효율 등 3차원 세포배양 효율을 현저히 향상시켰을 뿐만 아니라 우수한 생체모사 기능을 나타내어 3차원 세포배양 지지체로 적합한 것을 확인하였다. 또한 용매의 농도 조절이 용이함에 따라, 배양하고자 하는 세포에 따라 적합한 3차원 환경을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 피쉬콜라겐/합성고분자 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 약물 감수성 검사 및 암세포의 형성, 성장, 전이 및 사멸 연구에 사용할 수 있는 3차원 세포배양 모델로 적합하며, 뼈, 연골, 혈관, 방광, 피부, 근육과 같은 조직의 일부 혹은 전체를 복원하거나 대체가능한 생체조직 개발을 위한 연구 및 치료에 사용될 수 있다.

- [15] 또한, 본 발명에 따른 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체는 기존의 이온을 이용한 화학적 가교 없이 물리적인 방법으로 겔화를 유도함으로써, 화학적 가교에 의한 세포독성 문제를 해결하였으며, 높은 투명도를 제공하여 배양 중 세포 관찰이 용이하다. 또한 본 발명의 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔은 해양 유래의 콜라겐(이하 해양콜라겐)을 사용하여 기존의 동물성콜라겐을 사용한 복합 하이드로겔 지지체와 동일한 세포성장효과를 나타내면서 동물성콜라겐 보다 경제적으로

우수하고 높은 세포친화성 및 생체적합성과 낮은 세포독성으로 세포배양시 세포에 안전하고 효율적인 세포배양 방법을 제공할 수 있다.

- [16] 상기 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 생체와 매우 유사한 세포배양 환경을 조성하며, 스페로이드 형성능, 약물 확산능 및 세포 성장능이 우수한 것이 확인되었다. 따라서 본 발명에 따른 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 생체모사 3차원 세포배양 방법은 세포의 성장, 증식, 사멸, 분화 및 이동 관찰을 통한 생물 활성 분석에 사용될 수 있다. 또한 암의 발생, 악성화, 침습 및 전이 기전 연구와 항암제에 대한 감수성 및 암의 예후 분석 또는 평가에 사용될 수 있으며, 생체 적용성이 우수한 치료제 개발을 위한 연구에서도 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 구조 및 피쉬콜라겐-PCL 혼합도를 확인하기 위해 로다민(rhodamine) 염색 후 공초점레이저주사현미경으로 분석한 사진이다($\times 400$).
- [18] 도 2는 PCL 나노섬유 지지체 및 Fc0.1 중량%-Sc20 중량%, Fc1 중량%-Sc20 중량% 및 Fc2 중량%-Sc20 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 세포부착성을 섬유형액틴 염색법을 이용하여 확인한 공초점레이저주사현미경 사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [19] 도 3은 S_c50 중량% 피쉬콜라겐 저장액을 사용하여 제조된 F_c2 중량%, F_c3 중량%, F_c4 중량%, F_c5 중량% 및 F_c10 중량%의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 미세구조를 확인한 주사전자현미경 사진이다.
- [20] 도 4는 S_c70 중량% 피쉬콜라겐 저장액을 사용하여 제조된 F_c2 중량%, F_c3 중량%, F_c4 중량%, F_c5 중량% 및 F_c10 중량%의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 미세구조를 확인한 주사전자현미경 사진이다.
- [21] 도 5는 S_c20 중량%, S_c30 중량%, S_c40 중량% 및 S_c50 중량% 농도의 피쉬콜라겐 저장액을 이용하여 제조된 F_c2 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 미세구조를 보여주는 주사전자현미경 사진이다.
- [22] 도 6은 S_c40 중량% 및 S_c50 중량% 농도의 피쉬콜라겐 저장액을 이용하여 제조된 F_c4 중량% 피쉬콜라겐/PCL 지지체의 미세구조를 보여주는 주사전자현미경 사진이다.
- [23] 도 7은 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%; PCL 100%)에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [24] 도 8은 F_c2 중량%-S_c30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람

비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [25] 도 9는 F_c2 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [26] 도 10은 F_c2 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [27] 도 11은 F_c5 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c5 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [28] 도 12는 F_c5 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c5 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [29] 도 13은 F_c10 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μ m 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다(x400).

- [30] 도 14는 F_c10 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c10 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여

세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

- [31] 도 15는 F₆15 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₆15 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [32] 도 16은 F₆20 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₆20 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [33] 도 17은 PCL 나노섬유 지지체(F₆0%; PCL 100%)에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [34] 도 18은 F₆2 중량%-S₆30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₆2 중량%-S₆30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [35] 도 19는 F₆2 중량%-S₆50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₆2 중량%-S₆50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [36] 도 20은 F₆2 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₆2 중량%-S₆70 중량% 피쉬콜라겐/PC 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된

- 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [37] 도 21은 F_c5 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [38] 도 22는 F_c5 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c5 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [39] 도 23은 F_c10 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c10 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [40] 도 24는 F_c10 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [41] 도 25는 F_c15 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c15 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [42] 도 26은 F_c20 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c20 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [43] 도 27은 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%; PCL 100%)에서 마우스

B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[44] 도 28은 F₂ 중량%-S₃₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₂ 중량%-S₃₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[45] 도 29는 F₂ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₂ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[46] 도 30은 F₂ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[47] 도 31은 F₅ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₅ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[48] 도 32는 F₅ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₅ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[49] 도 33은 F₁₀ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₁₅ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여

세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[50] 도 34는 F_c15 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c20 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[51] 도 35는 F_c20 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c20 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[52] 도 36는 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%; PCL 100%)에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[53] 도 37는 F_c2 중량%-S_c30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c30 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[54] 도 38는 F_c2 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).

[55] 도 39는 F_c2 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F_c2 중량%-S_c70 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된

- 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [56] 도 40은 F₅ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₅ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [57] 도 41은 F₅ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원적으로 1일간 배양한 후, F₅ 중량%-S₇₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 섬유형액틴 염색법을 이용하여 세포의 3차원 분포특성을 공초점레이저주사현미경하에서 1 μm 간격의 Z-stack으로 관찰한 연속 사진(A), 3차원 재구성 사진(B) 및 확대된 이미지(C)사진으로, 녹색은 F-액틴이며, 파랑색은 DAPI이다($\times 400$).
- [58] 도 42는 PCL 나노섬유 지지체 및 F₂ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 세포배양시 각각의 나노섬유 지지체가 마우스 B세포림프종세포의 생존에 미치는 효과를 분석한 결과로, 마우스 B세포림프종세포 접종 후 2일 동안 배양하고 Live/Dead 세포를 공초점레이저주사현미경으로 확인한 결과이다($\times 400$).
- [59] 도 43은 PCL 나노섬유 지지체 및 F₂ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 세포배양시 각각의 나노섬유 지지체가 마우스 B세포림프종세포의 생존에 미치는 효과를 분석한 결과로, 마우스 B세포림프종세포 접종 후 6일 동안 배양하고 Live/Dead 세포를 공초점레이저주사현미경으로 확인한 결과이다($\times 400$).
- [60] 도 44는 3차원 환경에서 암세포에 도달하는 약물의 확산능력을 평가하기 위하여, 본 발명의 F₂ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 마우스 T림프종세포의 3차원 배양모델에 림프종의 표준 항암제인 독소루비신(doxorubicin)을 1 μM 농도로 처리하고 항암제의 확산 정도를 공초점레이저주사현미경으로 확인한 결과이다.
- [61] 도 45는 통상적인 2차원 환경 및 본 발명의 F₄ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 환경에서 배양한 사람 폐암세포(NCI-H1703, A) 및 전립선암세포(DU-145, B)의 항암제 감수성을 세포생존을 측정을 통하여 확인한 결과이다.
- [62] 도 46은 통상적인 2차원 환경 및 본 발명의 F₄ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 환경에서 배양된 각각의 사람 전립선암세포(DU-145)에서 악성화와 관련된 Hes 1과 Notch 유전자의 발현 정도를 RT-PCR법으로 확인한 결과이다.
- [63] 도 47은 통상적인 2차원 환경 및 본 발명의 F₄ 중량%-S₅₀ 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 환경에서 배양된 각각의 사람

전립선암세포(DU-145)에서 악성도와 밀접한 관련이 있는 snail, slug, endothelin-1, CD44, VEGF 그리고 HIF-1 α 유전자의 발현정도를 RT-PCR법으로 확인한 결과이다.

- [64] 도 48은 본 발명의 F₂ 중량%-S₀50 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 배양된 마우스 T세포림프종세포주의 암줄기세포 형성능 및 암세포의 분화능을 측정한 유세포분석 결과이다.
- [65] 도 49는 본 발명에 따른 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 조성을 나타낸 모식도이다.
- [66] 도 50은 본 발명에 따른 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 제작과정을 나타낸 모식도이다.
- [67] 도 51은 마우스 정상 세포인 CREC 및 암세포주인 EL4, R182 및 A2780에 다양한 농도의 CaCl₂ (10, 50, 100, 200 및 300 mM)를 18-24 시간 동안 처리하고 CaCl₂에 대한 세포독성효과를 확인한 WST-1 분석결과이다.
- [68] 도 52는 0.5, 1 및 1.5 중량% 아가로스 단독 소재의 하이드로겔과 혼합액에서 아가로스의 최종농도가 0.125 중량%이고 알지네이트의 최종농도가 1 중량%인 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔(이하 “0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔”) 지지체에서 각각 A2780 세포를 배양하고 3차원 세포성장 환경을 비교한 위상차현미경 사진이다.
- [69] 도 53은 0.5, 1, 1.5 및 2 중량% 농도의 아가로스 단독 소재의 하이드로겔에서 EL4 세포를 2, 5 및 10일 동안 3차원 배양한 후 EL4 세포의 성장을 확인한 위상차현미경 사진이다.
- [70] 도 54 및 도 55는 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 혼합액에 동물성 콜라겐인 흰쥐꼬리콜라겐(rat tail collagen, RC)을 최종농도가 0.05 중량%가 되도록 첨가한 복합 하이드로겔 지지체와 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 혼합액에 해양콜라겐을 최종농도가 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 중량%가 되도록 첨가한 복합 하이드로겔 지지체에 각각 EL4 세포를 3차원 배양한 후 겔 밖으로 탈리된 세포를 확인한 결과로, 도 54는 탈리된 세포를 확인한 위상차현미경 사진이며, 도 55는 각각의 하이드로겔 지지체 밖으로 탈리된 세포 수를 나타낸 그래프이다.
- [71] 도 56은 0.125 중량% 아가로스-콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 포함되는 콜라겐으로서 일반적으로 널리 사용되는 동물성콜라겐과 본 발명에서 최초로 시도된 해양콜라겐의 효과를 비교한 결과로, 각각의 콜라겐을 포함하는 지지체에서 EL4 세포를 3차원 환경에서 배양한 후 위상차현미경으로 세포 성장을 확인한 결과이다.
- [72] 도 57은 0.125 중량% 아가로스-콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 포함되는 콜라겐으로서 일반적으로 널리 사용되는 동물성콜라겐과 본 발명에서 시도된 해양콜라겐의 효과를 비교한 결과로, 각각의 콜라겐을 포함하는 지지체에서 A2780 세포를 3차원 환경에서 배양한 후

위상차현미경으로 세포 성장을 확인한 결과이다.

[73] 도 58은 본 발명에 따른 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 투명도를 확인한 위상차현미경 사진이다.

[74] 도 59은 1 중량% 알지네이트 단독, 0.125 중량% 아가로스 단독, 7.5 또는 10 중량% 해양콜라겐 단독 하이드로겔 지지체, 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 및 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 및 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트복합 하이드로겔 지지체의 단면을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하여 비교한 사진이다.

[75] 도 60은 1 중량% 알지네이트 단독, 0.125 중량% 아가로스 단독, 7.5 또는 10 중량% 해양콜라겐 단독 하이드로겔 지지체, 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체, 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 및 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 대한 FT-IR 분석 결과이다.

[76] 도 61은 각각의 하이드로겔 소재의 분자구조에 대한 모식도로, 도 61A는 아가로스의 분자구조 모식도이며, 도 61B는 해양콜라겐의 분자구조 모식도이며, 도 61C는 알지네이트의 분자구조 모식도이다.

[77] 도 62은 증류수 및 PBS 내에서 본 발명에 따른 신규 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 및 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 팽윤 거동을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[78] 도 63은 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 사람 난소암세포를 7일간 배양한 후 형성된 세포 스페로이드를 광학현미경(a), H&E 염색(b), DAPI 염색(c), 및 F-actin 염색(d)하여 확인한 결과이다.

[79] 도 64는 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 EL4 세포를 1, 3, 5일간 배양한 후 형성된 세포 스페로이드를 위상차현미경으로 관찰한 결과이다.

[80] 도 65는 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 A2780 세포를 배양한 후 세포 스페로이드 형성에 중요한 역할을 하는 스페로이드 버딩 현상을 관찰한 결과로, 도 65A는 위상차현미경 관찰 결과이며, 도 65B는 H&E 염색결과이다.

[81] 도 66은 3차원 환경에서 암세포에 도달하는 약물의 확산능력을 확인한 결과로, 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 사람 난소암세포 A2780의 3차원 배양모델을 이용하여 약물의 확산 정도를 확인한 결과이다.

[82] 도 67은 사람 난소암세포인 A2780을 2차원 배양 환경 및 본 발명에 따른 0.125

중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 배양 환경에서 각각 1, 3, 5, 및 7일간 배양한 후 세포 증식능을 비교한 결과이다.

[83] 도 68은 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 CREC 및 EL4 세포를 3차원 배양한 후 세포 증식을 확인한 CFSE 염색결과이다.

[84] 도 69 및 도 70은 본 발명에 따른 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체가 세포배양시 세포독성을 나타내는지 확인한 결과로, 도 69는 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 사람 난소암세포인 A2780을 파종하고 7 및 10일간 배양한 후 Live/Dead 세포를 공초점레이저현미경으로 확인한 결과이며, 도 70은 본 발명의 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 CREC 및 EL4 세포를 파종하고 14일간 배양하여 세포독성을 나타내는지 여부를 Live/Dead 세포를 공초점레이저현미경으로 관찰하여 확인한 결과이다.

[85] 도 71은 EL4 세포를 2차원 배양 및 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원적으로 배양한 후 암세포의 악성도와 밀접한 관련이 있는 Notch의 발현 정도를 RT-PCR 분석법으로 확인한 결과이다.

[86] 도 72는 사람 난소암세포주인 A2780세포를 2차원 배양 및 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원적으로 배양한 후 암세포의 악성도 마커인 스네일(snail) 및 비멘틴(vimentin)과 암줄기세포(cancer stem cell)의 중요한 마커인 CD44, 종양의 성장과 전이에 핵심적인 역할을 하는 엔도테린-1(endothelin-1)의 발현 정도를 확인한 결과이다.

[87] 도 73은 2차원 배양 및 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 림프종세포(EL4) 및 사람 난소암세포(A2780)를 3차원 환경에서 배양한 후 항암제에 대한 세포생존율을 확인한 결과이다.

[88] 도 74는 2차원 및 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 사람 난소암세포(A2780)를 3차원 배양한 후 난소암에 대한 표준 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel) 및 다양한 암세포에 대해 항암효과를 갖는 커큐민(curcumin)에 대한 세포생존율을 확인한 결과이다.

[89] 도 75는 본 발명에 따른 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 사람 난소암세포(A2780)를 3차원 환경에서 배양한 후 상피세포에 특이적으로 발현되는 마커인 싸이토케라틴(cytokeratin)에 대한 항체로 면역염색한 후 위상차 현미경 및

형광형미경으로 세포 관찰한 결과이다.

- [90] 도 76은 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원 배양된 EL4 세포에 대한 암줄기세포 형성능 및 암세포의 분화능을 측정한 유세포분석 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [91] 본 발명은 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계; 피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계; 상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계; 및 상기 제 3단계에서 제조한 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법을 제공한다.
- [92] 상기 제 1단계의 합성고분자 용액은 유기용매 100 중량부에 대하여 합성고분자를 8 내지 10 중량부로 용해시킬 수 있다. 보다 바람직하게는 8.8 중량% 합성고분자 용액으로 제조할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [93] 상기 합성고분자의 첨가 범위를 벗어날 경우 전기방사가 이루어지지 않거나, 전기방사시 균질한 나노섬유를 제작하기 어려운 문제가 야기될 수 있다.
- [94] 상기 합성고분자는 폴리카프로락톤[poly(e-caprolactone); PCL], 폴릴락트산[(poly)lactic acid; PLA], 폴리글리콜산[(poly)glycolic acid; PGA], 폴리하이드록시발레레이트[poly(hydroxy valerate); PHV], 폴리(락트산-co-글리콜산)[poly(lactic-co-glycolic acid); PLGA], 폴리하이드록시부티레이트(poly-hydroxy butyrate; PHB), 폴리하이드록시발레레이트[poly(hydroxy butyrate-co-valerate); PHBV], 폴리안하이드리드(polyanhydride), 폴리ortho에스터(polyorthoester), 폴리비닐알콜[poly(vinyl alcohol); PVA], 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리아크릴산(polyacrylic acid; PAA), 폴리-N-이소프로필아크릴아미드[poly(N-isopropylacrylamide)], 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르(polyester) 및 폴리에스테르-아미드(polyester-amide)/폴리에스테르-우레탄(polyester-urethane)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는 합성고분자는 폴리카프로락톤[poly(e-caprolactone); PCL]을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [95] 상기 폴리카프로락톤[poly(e-caprolactone); PCL]은 반결정의 분말 형태와 낮은 녹는점을 가지는 합성고분자로서, 다른 고분자와 비교하여 손쉽게 녹는 특징을 갖고 있다. 또한 폴리카프로락톤[poly(e-caprolactone); PCL]은 무독성과 생체적합성인 물질로, 매우 느린 분해속도를 나타냄으로, 조직공학용 인공지지체의 소재로 널리 이용되고 있다.
- [96] 상기 유기용매는 클로로포름, 헥사플루오로이소프로판, 테트라히드로퓨란,

디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [97] 상기 제 2단계의 피쉬콜라겐 수용액은 물 100 중량부에 대하여 피쉬콜라겐을 10 내지 70 중량부로 용해시킬 수 있다.
- [98] 상기 피쉬콜라겐의 첨가 범위를 벗어날 경우 피쉬콜라겐이 물에 균질하게 용해되지 않거나, 피쉬콜라겐-PCL 혼합액이 균질하게 제조되지 않거나 또는 균질한 나노섬유가 제조되지 않는 문제가 야기될 수 있다.
- [99] 상기 콜라겐은 해양생물에서 추출된 콜라겐일 수 있으며, 보다 바람직하게는 피쉬콜라겐일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [100] 콜라겐은 섬유형태의 단백질로, 결합조직내의 세포바깥바탕질의 주성분을 이루고 있는 천연고분자이다. 이러한 콜라겐은 세포의 인식 및 세포의 부착과 증식을 조절하는 역할을 통하여 조직이나 장기를 지탱하고 체표를 둘러싼 체형을 유지시키고 조직 재생의 역할을 하는 물질로 스폰지, 섬유형태, 겔, 솔루션, 심질소재 및 관 형상의 소재 등 다양한 형태의 가공이 가능한 장점이 있다. 피쉬콜라겐은 해양생물인 생선 비늘로부터 추출된 천연고분자 물질로, 이러한 해양생물에서 추출된 콜라겐은 포유류에서 추출한 콜라겐보다 저분자 펩타이드화가 용이하며, 인체 흡수율이 뛰어나다. 또한 해양생물에서 추출된 콜라겐의 아미노산 조성은 인간 콜라겐의 조성보다 특별한 항체에 의해 쉽게 구별가능하다.
- [101] 그러나 콜라겐은 매우 낮은 수준의 기계적 강도와 분해속도의 제어가 어려울 뿐만 아니라 콜라겐 단독 사용으로는 겔화가 어려운 단점이 있다.
- [102] 상기 물은 자연계에서 가장 일반적인 용매로서, 유기용매보다 경제성이 높으며, 독성을 나타내지 않는다. 본 발명은 전기방사를 이용한 나노섬유 제조시 사용되는 혼합액을 구성하는 용매 중에 물이 사용될 수 있다는 사실을 최초로 입증하였다. 상세하게는 세포에 독성을 나타내는 유기용매 대신, 독성을 갖지 않는 물을 사용하여 천연고분자를 용해시켜 전기방사를 위한 혼합액을 제조할 수 있으며, 향후 피쉬콜라겐 외에도 물을 용매로 사용할 수 있는 다른 종류의 천연고분자 성분을 이용한 전기방사법에 의한 나노섬유 제조에 적용될 수 있다.
- [103] 상기 제 3단계의 혼합액은 혼합액 100 중량부에 대하여 합성고분자가 6.3 내지 8.5 중량부로 포함될 수 있도록 제 1단계의 합성고분자 용액을 첨가할 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 제 1단계에서 제조된 8.8 중량% 폴리카프로락톤[poly(ϵ -caprolactone); PCL] 용액을 혼합액 100 중량부에 대하여 71.4 내지 97.1 중량부로 포함될 수 있도록 첨가할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한 혼합액 100 중량부에 대하여 피쉬콜라겐은 2 내지 20 중량부로 포함될 수 있도록 상기 제 2단계에서 제조된 피쉬콜라겐 수용액을 첨가할 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다.
- [104] 상기 제 3단계의 혼합액 제조시 합성고분자 용액 및 피쉬콜라겐 수용액의 첨가 범위를 벗어날 경우, 전기방사가 적절하게 이루어지지 않거나, 전기방사시

균질한 나노섬유를 제작하기 어려운 문제가 야기될 수 있다.

- [105] 또한, 상기 제 3단계의 혼합액 100 중량부에 대하여 물이 0.9 내지 10 중량부로 포함될 수 있도록 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [106] 또한 본 발명은 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계; 피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계; 상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 상기 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계; 상기 제 3단계에서 제조한 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계; 및 상기 제 4단계에서 제조된 나노섬유 지지체에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포배양 방법을 제공한다.
- [107] 또한, 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및 상기 콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양방법을 제공한다.
- [108] 보다 상세하게는 상기 3차원 세포배양방법은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 25 내지 37 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 25 내지 37 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및 상기 콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 4 내지 25 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양방법을 제공할 수 있다.
- [109] 상기 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계에서 상기 배양 온도 및 시간 범위는 세포에 영향을 최소한으로 주기 위한 가장 바람직한 온도 및 시간 범위이다.
- [110] 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계에서 상기 콜라겐 용액을 첨가할 때의 온도 범위 또는 시간 범위를 벗어나게 되면, 콜라겐이 균질하게 혼합되지 않거나 세포배양 효율이 낮아지는 문제가 야기될 수 있다.
- [111] 또한 상기 아가로스 용액을 첨가하고 정치시켜 겔화시키는 단계에서 상기 온도범위나 시간범위를 벗어나게 되면, 겔화가 이루어지지 않거나, 세포가 손상되거나 사멸하는 문제가 야기될 수 있다.
- [112] 상기 콜라겐은 해양 생물 유래 콜라겐일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [113] 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 알지네이트를 0.5 내지 2 중량부로 첨가될 수 있으며, 보다 바람직하게는 1 중량부일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [114] 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 콜라겐은 1 내지 30 중량부로 첨가할 수 있으며, 보다 바람직하게는 7.5 내지 10 중량부일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [115] 상기 콜라겐은 섬유형태의 단백질로써, 결합조직내의 세포바깥바탕질의

주성분을 이루고 있는 천연고분자이다. 콜라겐은 세포의 인식 및 세포의 부착과 증식을 조절하는 역할을 통하여 조직이나 장기를 지탱하고 체표를 둘러싼 체형을 유지시키고 조직 재생의 역할을 하는 물질로 스폰지, 섬유형태, 겔, 솔루션, 심질소재 및 관 형상의 소재 등 다양한 형태의 가공이 가능한 장점이 있다. 그러나 콜라겐은 매우 낮은 수준의 기계적 강도와 분해속도의 제어가 어려울 뿐만 아니라 콜라겐 단독 사용으로는 겔화가 어려운 단점이 있다. 따라서, 콜라겐 용액이 상기 함량 범위를 벗어나면 세포의 캡슐화가 되지 않아 세포가 겔에서 빠져나가거나, 세포의 성장능에 영향을 미치는 등의 문제가 야기될 수 있다.

- [116] 또한 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 아가로스를 0.1 내지 0.5 중량부로 첨가할 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.125 중량부일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [117] 상기 아가로스는 해초류에서 추출된 갈락토오스로 구성된 다당류로써, 세포배양 배지로 주로 사용되는 물질로 구조물의 경도를 조정할 수 있어 하이드로겔 형태로 사용가능한데, 이를 통하여 인공지지체 내부에 고르게 세포를 파종할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 아가로스는 이온가교 또는 화학가교의 형성 없이 온도 변화만으로도 겔화를 유도할 수 있다. 다만, 아가로스 용액이 상기 함량 범위를 벗어나면 겔화가 이루어지지 않거나, 세포가 손상되거나 사멸하는 문제가 야기될 수 있다.
- [118] 상기 혼합물에 첨가되는 알지네이트, 콜라겐 및 아가로스는 저장용액 형태로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [119] 상기 혼합액을 제조하기 위해 사용되는 알지네이트 저장용액은 증류수 100 중량부에 대하여 알지네이트를 1 내지 10 중량부로 용해시킨 것일 수 있으며, 상기 아가로스 저장용액은 증류수 100 중량부에 대하여 아가로스를 1 내지 3 중량부로 가열 용해시킨 것일 수 있으며, 상기 콜라겐 저장용액은 증류수 100 중량부에 대하여 콜라겐을 20 내지 30 중량부로 용해시킨 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [120] 본 발명의 3차원 세포배양방법으로 배양될 수 있는 세포는 정상세포 및 암세포에서 선택될 수 있다.
- [121] 상기 암세포는 난소암, 유방암, 위암, 대장암, 직장암, 폐암, 간암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 자궁암, 방광암, 다형성아교모세포종, 피부암, 흑색종, 갑상선암, 두경부암, 후두암, 수모세포종, 인후두암, 구강암, 타액선암, 식도암, 골육종, 허암, 담도암, 신경아교종, 뼈암, 원인불명원발암으로 이루어진 고형암 세포에서 선택될 수 있으며, B세포림프종, T세포림프종, 백혈병 및 다발성골수종과 같은 혈액암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [122] 또한 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 상기

콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및 상기 3차원 배양 세포의 성장, 증식, 사멸, 분화 및 이동을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 활성 측정방법을 제공한다.

- [123] 또한 본 발명은 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 상기 콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및 상기 3차원 배양 세포에 항암제를 첨가하여 세포 생존율을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 감수성의 측정방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [124] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[125]

- [126] <실시예 1> 나노섬유 지지체 제조 및 혼합도 분석

[127] 1-1. PCL 나노섬유 지지체 제조

- [128] 폴리카프로락틴[Polycaprolacton, average Mn 80,000, Sigma (St. Louis, MO, USA); 이하 PCL]에 클로로포름(chloroform)을 가하고 자석교반기(magnetic stirrer)를 사용하여 1시간 동안 균일하게 용해시켜 최종적으로 8.8 중량% PCL 용액을 제조 후 전기방사 하였다. 전기방사시 바늘은 27 게이지, 방사거리 8 cm, 전압 11 kV, 유체속도 0.5 mL/hr, 온도 21~22°C 그리고 습도 40~45%의 조건으로 와이어메쉬형 집전장치(collector, 선경 0.5 mm, 망목 1x1 mm)에 방사하였으며, 방사시간은 60 내지 120분이었으며 바람직하게는 90분 전후이다. 그 후 매트에 포함된 잔존용매를 제거하기 위하여 60°C 오븐에서 10초가량 건조시켜 PCL 나노섬유 지지체를 제조하였다.

[129] 1-2. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체 제조

- [130] 폴리카프로락틴(Polycaprolacton, average Mn 80,000, Sigma; 이하 PCL)에 클로로포름을 첨가하고 자석교반기를 사용하여 1시간 동안 균일하게 용해시켜 최종적으로 8.8 중량% PCL 용액을 제조하였다. 또한 피쉬콜라겐 저장액(stock solution)을 제조하기 위하여, 피쉬콜라겐(fish collagen, Geltech, Busan, Korea)을 증류수에 첨가하고 시험관혼합기(Vortex, Genie-2, 60 Hz, Scientific industries, Bohemia, NY, USA)를 사용하여 균일하게 용해시켜 20 중량% 농도(c_{20} 중량%)의 피쉬콜라겐 수용액[20 wt% fish collagen stock solution; 20 wt% stock (S) solution; S_{c20} 중량%; S_{c20} %)을 제조하였다.

- [131] 그 후 상기 8.8 중량% PCL 용액에 S_{c20} 중량% 피쉬콜라겐 저장액을

피쉬콜라겐의 최종농도가 0.1, 1 및 2 중량%가 되도록 첨가하고 자석교반기를 이용하여 3시간 동안 균일하게 혼합시켜 피쉬콜라겐/PCL 혼합용액을 제조하였다.

- [132] 상기 방법으로 제조된 0.1, 1 및 2 중량% 피쉬콜라겐/PCL 혼합용액을 각각 전기방사장치(electrospinning apparatus)를 이용하여 전기방사 하였다. 전기방사시 바늘은 27 게이지, 방사거리 8 cm, 전압 9 kV, 유체속도 0.4 mL/hr, 온도 21~22°C 및 습도 40~45%의 조건으로 와이어메쉬형 집전장치(collector, 선경 0.5 mm, 망목 1x1 mm)에 방사하였다. 전기방사 시간은 60 내지 90분이었으며, 바람직하게는 70분 전후로 수행하였다.

- [133] 1-3. 로다민(Rhodamine)을 이용한 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 혼합도 분석

- [134] 피쉬콜라겐과 PCL의 혼합을 확인하기 위해, S_c20 중량% 피쉬콜라겐 수용액에 로다민 B(Rhodamine B, Sigma)를 0.01g 첨가하고 시험관혼합기를 사용하여 균일하게 용해시켰다. 그 후 8.8 중량% PCL 용액에 로다민 B가 포함된 S_c20 중량% 피쉬콜라겐 수용액을 피쉬콜라겐 최종농도가 1 중량%가 되도록 첨가한 후 교반하여 로다민-1% 피쉬콜라겐/PCL 혼합용액을 제조하였다.

- [135] 상기 제조된 로다민-1 중량% 피쉬콜라겐/PCL 혼합용액에 실시예 1-2의 전기방사 조건으로 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하였다. 제조된 로다민-1 중량% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 슬라이드글라스에 올린 후 덮개 유리로 봉입한 후 공초점레이저주사현미경을 이용하여 혼합도를 분석하였다.

- [136] 그 결과 도 1에서 볼 수 있듯이, 지지체를 구성하는 나노섬유들이 로다민으로 잘 염색되어 있는 것을 확인하였다.

- [137] 상기 결과로부터 피쉬콜라겐 수용액이 PCL과 균질하게 혼합되어 있음이 확인되었다.

[138]

- [139] <실시예 2> PCL 및 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 세포부착성 분석

- [140] 2-1. PCL 및 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 세포배양

- [141] 정상 마우스 흉선상피세포주(thymic epithelial cell, TEC)의 한 종류인 흉선겉질상피세포주(thymic deep cortex or cortical reticular epithelial cell, 이하 CREC)를 Dr. Barbara B. Knowles (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)에게 제공받아 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 2-3일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.

- [142] 실시예 1과 같이 제조된 PCL 나노섬유 지지체 및 0.1, 1 및 2 중량% 피쉬콜라겐 최종농도의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 각각 96-웰 플레이트에 넣고

CREC 세포를 웰 당 5×10^4 세포로 접종하여 6시간 동안 배양하였다.

[143] 2-2. 섬유형액틴 염색법을 이용한 나노섬유 지지체의 세포부착성 분석

[144] 나노섬유 지지체의 세포부착성을 확인하기 위하여, 상기 세포가 배양된 지지체를 인산염완충생리식염수(phosphate buffered saline, 이하 PBS)로 2회 세척 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 고정액으로 상온에서 20분간 고정하였다. 그 후 PBS로 2회 세척 후 0.1% 트리톤-X(triton-X) 100 용액에 상온에서 5분 동안 침투시킨 후 PBS로 2회 세척하였다.

[145] 비특이적 염색을 제거하기 위해 0.2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 BSA) 용액으로 상온에서 20분 동안 처리 후 PBS로 2회 세척하였다.

[146] 그 후 액틴-검출용 Phalloidin-FITC (Promega, Madison, WI, USA)를 0.2% BSA용액에 1:150으로 희석하여 상온에서 40분 동안 반응시킨 다음 트리스완충생리식염수(tris-buffered saline, 이하 TBS)로 3회 세척하고 덮개유리(cover glass) 위에 지지체를 올려놓고 세포의 핵 염색을 위한 DAPI (Vector Lab, Inc. Burlingame, CA, USA) 용액으로 대조 염색하여 봉입한 후 공초점레이저주사현미경(laser confocal microscope)을 이용하여 지지체 대한 세포의 부착능을 확인하였다.

[147] 그 결과, 도 2와 같이 1 중량% 피쉬콜라겐-PCL 나노섬유 지지체는 PCL 나노섬유 지지체와 유사한 부착력을 나타내었으며, 1 및 2 중량% 피쉬콜라겐 지지체는 PCL 나노섬유 지지체보다 세포부착력이 현저하게 증가하였으며, 피쉬콜라겐 농도가 높아질수록 지지체의 세포배양 효율이 우수하게 나타났다. 따라서, 하기 실시예를 통하여 피쉬콜라겐 2 중량% 이상의 농도에서 세포의 3차원 배양에 최적화된 조건을 확인하였다.

[148]

[149] <실시예 3> 최적화된 피쉬콜라겐 농도 분석

[150] 3-1. 2 중량% 이상 농도의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체 제조

[151] 피쉬콜라겐을 증류수에 첨가하여 피쉬콜라겐 저장액의 농도(concentration of fish collagen stock solution, S_c) S_c10 중량%, S_c20 중량%, S_c30 중량%, S_c40 중량%, S_c50 중량%, S_c60 중량%, S_c70 중량%, S_c80 중량%, S_c90 중량% 및 S_c100 중량%로 제조하였으며, 이를 각각 $S_c10\%$, $S_c20\%$, $S_c30\%$, $S_c40\%$, $S_c50\%$, $S_c60\%$, $S_c70\%$, $S_c80\%$, $S_c90\%$ 및 $S_c100\%$ 로 명명하였다. 다만, $S_c100\%$ 의 경우 PCL이 전혀 포함될 수 없으므로 선택 조건에서 제외(표 1의 x표시)하였으며, $S_c80\%$ 이상의 농도는 점도가 너무 높아 정확한 양을 첨가할 수 없으므로 선택조건에서 제외하였다(표 1의 x표시). 또한 $S_c50\%$ 이상의 고농도의 경우 $S_c60\%$ 는 $S_c50\%$ 또는 $S_c70\%$ 와 특별한 차이가 없으므로 $S_c60\%$ 역시 제외하였다.

[152] 따라서, 혼합액에 첨가될 피쉬콜라겐 저장액을 $S_c10\%$, $S_c20\%$, $S_c30\%$, $S_c40\%$, $S_c50\%$ 및 $S_c70\%$ 으로 제조하였다.

[153] 또한 PCL (Polycaprolacton, average Mn 80,000, Sigma)에 클로로포름을 가하고 자석교반기를 사용하여 1시간 동안 균일하게 용해시켜 최종적으로 8.8 중량%

PCL 용액을 제조하였다.

- [154] 그 후, 제조된 8.8 중량% PCL 용액에 각각의 농도로 제조된 피쉬콜라겐 저장액을 첨가하여 피쉬콜라겐의 최종농도(final concentration of fish collagen in the mixed solution, F_C)가 F_C2 중량%, F_C3 중량%, F_C4 중량%, F_C5 중량%, F_C10 중량%, F_C15 중량%, F_C20 중량%, F_C30 중량%, F_C40 중량% 및 F_C50 중량%인 피쉬콜라겐/PCL 혼합용액을 제조하였으며, 이를 각각 $F_C2\%$, $F_C3\%$, $F_C4\%$, $F_C5\%$, $F_C10\%$, $F_C15\%$, $F_C20\%$, $F_C30\%$, $F_C40\%$ 및 $F_C50\%$ 로 명명하였다. 표 1을 참고하면, 혼합액 총 부피 10 mL을 기준으로 포함되는 물의 양이 1.1 mL 이상인 경우 나노섬유 지지체가 균질하게 제조되지 않거나, 방사되지 않았다(이탤릭체로 표시된 괄호 안의 숫자부분). 따라서, 혼합액 총 부피 10 mL을 기준으로 포함되는 물의 양이 0.09 내지 1 mL일 경우 나노섬유 지지체가 성공적으로 제조됨을 확인할 수 있었다 (표 1의 볼드체로 표시된 숫자부분).
- [155] 최종적으로, 혼합액 총 부피 10 mL을 기준으로 표 1의 물의 양, 표 2의 피쉬콜라겐의 양 및 표 3의 8.8 중량% PCL 합성고분자 용액의 양에 따라 제조된 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하였다. 전기방사는 바늘은 27 게이지, 방사거리 8 cm, 전압 9 kV, 유체속도 0.4 mL/hr, 온도 21~22°C 그리고 습도 40~45%의 조건으로 와이어메쉬형 집전장치(collector, 선경 0.5 mm, 망목 1x1 mm)에 방사하였다. 전기방사 시간은 60 내지 90분이었으며, 바람직하게는 70분 전후로 수행하였다.
- [156] 표 1

[Table 1]

혼합액 10mL 기준 포함된 물의 함량 (mL)		혼합액에서 피쉬콜라겐의 최종 농도 (F _c , %)										
		2	3	4	5	10	15	20	30	40	50	100
피쉬콜라겐 저장액 농도(S _c , %)	10	(1.8)	(2.7)	(3.6)	(4.5)	×	×	×	×	×	×	×
	20	0.8	(1.2)	(1.6)	(2)	(4)	×	×	×	×	×	×
	30	0.47	0.7	0.93	(1.17)	(2.33)	(3.5)	(4.67)	×	×	×	×
	40	0.3	0.45	0.6	0.75	(1.5)	(2.25)	(3)	(4.5)	×	×	×
	50	0.2	0.3	0.4	0.5	1	(1.5)	(2)	(3)	(4)	×	×
	60	0.13	0.2	0.27	0.33	0.67	1	(1.33)	(2)	(2.67)	(3.33)	×
	70	0.09	0.13	0.17	0.21	0.43	0.64	0.86	(1.29)	(1.71)	(2.14)	×
	80	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	90	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	100	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

[157]

[158] 표 2

[Table 2]

혼합액 10mL 기준 포함된 피쉬콜라겐 의 함량 (mL)		혼합액에서 피쉬콜라겐의 최종 농도 (F _c , %)										
		2	3	4	5	10	15	20	30	40	50	100
피쉬콜 라겐 저장액 농도(S _c , %)	10	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	20	0.2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	30	0.2	0.3	0.4	×	×	×	×	×	×	×	×
	40	0.2	0.3	0.4	0.5	×	×	×	×	×	×	×
	50	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	×	×	×	×	×	×
	60	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	1.5	×	×	×	×	×
	70	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	1.5	2.0	×	×	×	×
	80	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	90	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	100	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

[159] 표 3

[Table 3]

혼합액 10mL 기준 포함된 8.8 중량% PCL 용액의 함량 (mL)		혼합액에서 피쉬콜라겐의 최종 농도 (F _c , %)										
		2	3	4	5	10	15	20	30	40	50	100
피쉬콜라겐 저장액 농도(S _c , %)	10	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	20	9.00	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	30	9.33	9.00	8.67	×	×	×	×	×	×	×	×
	40	9.50	9.25	9.00	8.75	×	×	×	×	×	×	×
	50	9.67	9.40	9.20	9.00	8.00	×	×	×	×	×	×
	60	9.67	9.50	9.33	9.17	8.33	7.50	×	×	×	×	×
	70	9.71	9.57	9.43	9.29	8.57	7.86	7.14	×	×	×	×
	80	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	90	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	100	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

[160] 3-2. 피쉬콜라겐 농도에 따른 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 구조 및 직경 분석

[161] 실시예 1-1에서 제조된 PCL 나노섬유 지지체와 실시예 3-1에서 제조된 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 표면 구조를 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 확인하기 위해 먼저, 각 나노섬유 지지체를 2.5% glutaraldehyde 고정액으로 24시간 동안 냉장(4°C) 고정한 후 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide)로 상온에서 1시간 동안 추가 고정하였다. 고정한 지지체 표본들을 0.1 M 인산완충액(phosphate buffer; pH 7.4)으로 2-3번 세척하고 에탄올 시리즈(ethanol series)를 거치면서 탈수하였다. 탈수된 각각의 나노섬유 지지체 표본들을 -80°C에서 3시간 동안 냉동시킨 후 진공동결건조기(FDS series, ilShinBioBase)를 이용하여 12시간 동안 동결건조하고, 이온 스파터(ion sputter; E-1010, Hitachi, Tokyo, Japan)로 표면 처리한 후 주사전자현미경(Hitachi)으로 가속전압 20 kV 하에서 나노섬유 지지체의 표면구조를 분석하였다. F_c2%-S_c50%, F_c3%-S_c50%, F_c4%-S_c50%, F_c5%-S_c50%, F_c10%-S_c50%, F_c3%-S_c70%, F_c5%-S_c70%, F_c10%-S_c70%, F_c15%-S_c70%, F_c20%-S_c70%, F_c2%-S_c20%, F_c2%-S_c30%, F_c2%-S_c40% 및 F_c4%-S_c40% 조건의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 3000배의 배율에서 직경 및 나노/마이크로 섬유 분포도를 측정하였다.

- [162] 그 결과, 도 3, 4, 5 및 6에서 확인할 수 있듯이, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 구성하는 섬유는 나노미터 직경을 가지는 나노섬유와 마이크로미터 직경을 가지는 마이크로섬유가 혼재된 나노/마이크로 하이브리드 섬유이라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 클로로포름과 같은 유기용매에 용해된 PCL 용액과 물에 용해된 피쉬콜라겐 용액의 혼합용액은 유기용매와 물의 혼합용매로 만들어진 고분자 용액으로 전기방사하여 지지체를 제작할 경우에도, 나노/마이크로 하이브리드섬유로 구성된 피쉬콜라겐/PCL 매트릭스를 성공적으로 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [163] 또한 S_c50% 저장액을 이용한 F_c2%, F_c3%, F_c4%, F_c5% 및 F_c10% 최종 피쉬콜라겐 농도의 지지체의 미세구조를 주사현미경으로 확인한 결과, 도 3과 같이 지지체의 최종 콜라겐 농도가 증가할수록 나노섬유 사이의 공극의 크기가 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 지지체의 최종 콜라겐 농도가 증가할수록 나노섬유의 평균 직경이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [164] S_c70% 저장액을 이용한 F_c2%, F_c3%, F_c4%, F_c5% 및 F_c10% 최종 피쉬콜라겐 농도로 제조된 지지체의 미세구조를 주사현미경으로 확인한 결과, 지지체의 최종 콜라겐 농도가 증가할수록 나노섬유 사이의 공극의 크기가 감소된다는 것을 확인할 수 있었다. 특히 S_c50% 및 S_c70% 저장액을 사용하여 제조된 지지체에서 F_c5% 이상의 고농도의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 전반적으로 공극의 크기 및 나노섬유의 직경이 작았으므로 세포의 3차원적 분포에 이상적인 환경을 제공하기 어려운 구조일 것이라 판단되어 F_c2% 및 F_c4%에서 저장액의 농도에 따라 지지체의 미세구조를 관찰하였다.
- [165] 그 결과 도 5를 참고하면, F_c2% 나노섬유의 평균직경은 각각 $1.47 \pm 0.6 \mu\text{m}$ (S_c20%), $1.31 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (S_c30%), $1.28 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (S_c40%) 그리고 $1.01 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (S_c50%)이었다. 또한 도 6을 참고하면, F_c4% 나노섬유의 평균직경은 각각 $1.53 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (S_c40%) 그리고 $0.96 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (S_c50%)이었다. 뿐만 아니라 도 5 및 도 6에서 볼 수 있듯이, F_c2% 및 F_c4% 저장액의 농도가 증가할수록 공극의 크기가 작아지는 것을 확인하였다.
- [166] 상기 결과로부터 F_c5% 미만의 지지체에서는 저장액의 농도가 증가할수록 나노섬유의 평균직경 및 공극이 감소하는 것을 확인되었다.
- [167]
- [168] <실시예 4> 피쉬콜라겐/PCL 나노/마이크로 하이브리드 섬유 지지체에서 피쉬콜라겐 농도함량에 따른 고휘암세포의 3차원 배양 특성 분석
- [169] 4-1. 세포 및 세포배양
- [170] 사람 비소세포폐암주(human non-small cell lung cancer cell, NCI-H1703)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 사람 전립선암세포주(human prostate cancer cell, DU-145)는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. NCI-H1703 및 DU-145 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ mL

페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 $\mu\text{g/mL}$

스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 RPMI-1640 배지(HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 2-3일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.

[171] 4-2. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[172] 피쉬콜라겐의 농도에 따라 다양하게 제조된 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 세포의 3차원 배양 특성을 비교하기 위해 다음과 같이 실험군을 설정하였다.

[173] 피쉬콜라겐/PCL 혼합액 제조시 사용된 피쉬콜라겐 저장액의 농도(S_c)와 전기방사시 사용된 피쉬콜라겐/PCL 혼합액에서 최종 피쉬콜라겐의 농도(F_c)에 따라 $F_c0\%$ (PCL 100%), $F_c2\%-S_c30\%$, $F_c2\%-S_c50\%$, $F_c2\%-S_c70\%$, $F_c5\%-S_c50\%$, $F_c5\%-S_c70\%$, $F_c10\%-S_c50\%$, $F_c10\%-S_c70\%$, $F_c15\%-S_c70\%$, $F_c20\%-S_c70\%$ 으로 10가지 종류의 실험군으로 나누고 상기 실시예 1의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 제조 방법에 따라, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 제조한 후 96-웰 플레이트에 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 넣고, 5×10^4 cells/웰 농도로 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703) 및 사람 전립선암주(DU-145) 세포를 각각 접종한 후 배양하였다.

[174] 4-3. 액틴 염색을 이용한 사람 고형암 세포의 3차원 분포 특성 분석

[175] 상기 방법으로 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용하여 1일 동안 3차원 배양된 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703) 및 전립선암세포주(DU-145)의 섬유형액틴(F-actin) 염색을 실시하였다.

[176] 먼저, 세포가 배양된 피쉬콜라겐/PCL 복합 나노섬유 지지체를 4% 파라포름알데하이드 고정액으로 상온에서 20분간 고정하였다. 그 후 PBS로 2회 세척하고 0.1% 트리톤-x (triton-x) 100 용액에 상온에서 5분 동안 침투시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 비특이적인 염색을 제거하기 위해 0.2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 BSA) 용액으로 상온에서 20분 동안 처리 후 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 액틴-검출용 Phalloidin-FITC (Promega, Madison, WI, USA)를 0.2% BSA용액에 1:150으로 희석하여 40분 동안 반응시킨 다음 트리스완충생리식염수(tris-buffered saline, 이하 TBS)로 3회 세척하여 슬라이드에 올려놓고 세포의 핵 염색을 위한 DAPI (Vector Lab, Inc. Burlingame, CA, USA) 용액으로 대조 염색하여 덮개유리(cover glass)를 덮어 봉입한 후, 공초점레이저주사현미경(FV1000-IX81, Olympus, Japan)으로 각각의 나노섬유 지지체에서 세포의 3차원 분포특성을 확인하였다.

[177] 그 결과, PCL 나노섬유 지지체 ($F_c0\%$; PCL 100%)에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703) 세포를 3차원 배양한 결과인 도 7과 사람 전립선암세포주(DU-145) 세포를 3차원 배양한 결과인 도 17을 참고하면, 사람 비소세포폐암세포(NCI-H1703)들은 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 55 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었으며, 사람 전립선암세포주(DU-145)

세포들은 약 28 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었다.

- [178] 상기 결과로부터 PCL 나노섬유 지지체($F_c0\%$)에서 나노섬유 사이의 공극이 비교적 넓어 세포들이 상당히 깊은 부위까지 이르는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 1 μm 간격의 각 단면을 관찰한 도 7C 및 도 17C를 참고하면, 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703) 세포 및 사람 전립선암세포주(DU-145) 세포들이 나노섬유에 부착되어 납작하게 뻗어 있기보다는 일반적으로 부착되지 않은 세포의 형태인 둥근 형태의 모습을 취하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포의 생존, 증식 및 상호작용과 관련된 배양 특성인 세포가 서로 부착되어 성장하고 있는 모습은 거의 관찰되지 않았으며, 대부분의 세포들이 단독으로 흩어져 분포하고 있었다.
- [179] 반면, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 8, 9 및 10와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 18, 19 및 20을 참고하면, $F_c2\%-S_c30\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 경우, 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 42 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었으며(도 8), 사람 전립선암세포들은 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 58 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었다(도 18). 또한 $F_c2\%-S_c50\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 36 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 9), 사람 전립선암세포주(DU-145)들은 약 100 μm 이상의 깊이까지 들어갔다(도 19). $F_c2\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 경우 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 36 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 10), 사람 전립선암세포주(DU-145)들은 약 100 μm 이상의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 20).
- [180] 상기 결과로부터 $F_c2\%-S_c30\%$, $F_c2\%-S_c50\%$ 및 $F_c2\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체들은 세포들이 상당히 깊은 부위까지 이를 수 있도록 나노섬유 사이의 공극이 충분히 넓은 것으로 확인되었다. 또한 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 8C, 9C 및 10C와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 18C, 19C 및 20C를 참고하면, $F_c2\%-S_c30\%$, $F_c2\%-S_c50\%$ 및 $F_c2\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 배양된 대부분의 세포들이 세포의 생존, 증식 및 상호작용을 반영하는 형태학적 특성으로서 세포들이 서로 부착되어 성장하고 있는 모습을 나타내었으며, 도 7C 또는 도 17C의 PCL 나노섬유 지지체($F_c0\%$)의 세포배양 특성과 달리 세포들이 단독으로 흩어져 존재하고 있는 모습은 전혀 발견되지 않았다.
- [181] 따라서, $F_c2\%-S_c30\%$, $F_c2\%-S_c50\%$ 및 $F_c2\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 이상적인 3차원 세포 성장 환경을 제공함으로써, 높은 3차원 세포배양 효율을 나타내는 것을 확인하였다.

- [182] 또한 F_c5%-S_c50% 및 F_c5%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 11 및 12와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 21 및 도 22를 참고하면, F_c5%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 20 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 11), 사람 전립선암세포주(DU-145)들은 약 38 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 21). 또한 F_c5%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 24 μm 의 깊이까지 들어간 것으로 확인되었으며(도 12), 사람 전립선암세포주(DU-145)들은 약 20 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 22).
- [183] 상기 결과로부터 F_c5%-S_c50% 및 F_c5%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체보다 나노섬유 사이의 공극이 좁아 세포들이 상대적으로 얇게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 1 μm 간격의 각 단면을 확인한 결과, 앞선 도 8C 및 9C의 세포들과 같이 고르게 분포되어 있었다. 또한 F_c5%-S_c50% 및 F_c5%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 11C 및 12C와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 21C 및 22C를 참고하면 대부분의 세포들이 세포의 생존, 증식 및 상호작용을 위해 서로 부착되어 성장하는 모습을 나타내었으며, 도 7C의 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%)의 세포배양 특성과 달리 세포들이 단독으로 흩어져 존재하고 있는 모습은 전혀 발견되지 않았다. 따라서, F_c5%-S_c50% 및 F_c5%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 이상적인 3차원 세포 성장 환경을 제공함으로써, 높은 3차원 세포배양 효율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [184] 또한 F_c10%-S_c50% 및 F_c10%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 13 및 14와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 23 및 도 24를 참고하면, F_c10%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 22 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 13), 사람 전립선암세포주(DU-145)는 약 22 μm 의 깊이까지 들어갔다(도 23). 또한 F_c10%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 26 μm 의 깊이까지 들어간 것으로 확인되었으며(도 14), 사람 전립선암세포주(DU-145)는 약 22 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 24).
- [185] 상기 결과로부터 F_c10%-S_c50% 및 F_c10%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체보다 나노섬유 사이의 공극이 좁아져 세포들이 상대적으로 얇게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 1 μm 간격의 각 단면을 확인한 결과, 앞선 도 8C 및 9C의 세포들과 같이 고르게 분포되어 있었다. 또한 F_c10%-S_c50% 및 F_c10%-S_c70%

피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 13C 및 도 14C와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 23C 및 24C를 참고하면, 대부분의 세포들이 세포의 생존, 증식 및 상호작용을 위해 서로 부착되어 성장하는 모습을 나타내었으며, 도 7C의 PCL 나노섬유 지지체($F_c0\%$)의 세포배양 특성과 달리 세포들이 단독으로 흩어져 존재하고 있는 모습은 전혀 발견되지 않았다. 따라서, $F_c10\%-S_c50\%$ 및 $F_c10\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 이상적인 3차원 세포 성장 환경을 제공함으로써, 높은 3차원 세포배양 효율을 나타내는 것을 확인하였다.

- [186] 또한 $F_c15\%-S_c70\%$ 및 $F_c20\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)를 3차원 배양한 결과인 도 15 및 16와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 25 및 도 26을 참고하면, $F_c15\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 $18\ \mu\text{m}$ 의 깊이까지 들어갔으며(도 15), 사람 비소세포폐암주는 약 $20\ \mu\text{m}$ 의 깊이까지 들어갔다(도 25). 또한 $F_c20\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 사람 폐암 세포들이 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 $26\ \mu\text{m}$ 의 깊이까지 들어간 것으로 확인되었으며(도 16), 사람 비소세포폐암주는 약 $24\ \mu\text{m}$ 의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 26).

- [187] 상기 결과로부터 $F_c15\%-S_c70\%$ 및 $F_c20\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 $F_c2\%-S_c30\%$ 및 $F_c2\%-S_c50\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체보다 나노섬유 사이의 공극이 좁아져 세포들이 상대적으로 얇게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 $1\ \mu\text{m}$ 간격의 각 단면을 확인한 결과, 앞선 도 8C 및 9C의 세포들과 같이 고르게 분포되어 있었다. 또한 $F_c15\%-S_c70\%$ 및 $F_c20\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에 3차원 배양된 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)결과인 도 15C 및 도 16C와 사람 전립선암세포주(DU-145)를 3차원 배양한 결과인 도 25C 및 26C를 참고하면, 대부분의 세포들이 세포의 생존, 증식 및 상호작용을 위해 서로 부착되어 성장하는 모습을 나타내었으며, 도 7C의 PCL 나노섬유 지지체($F_c0\%$)의 세포배양 특성과 달리 세포들이 단독으로 흩어져 존재하고 있는 모습은 전혀 발견되지 않았다. 따라서, $F_c15\%-S_c70\%$ 및 $F_c20\%-S_c70\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 이상적인 3차원 세포 성장 환경을 제공함으로써, 높은 3차원 세포배양 효율을 나타내는 것을 확인하였다.

- [188] 상기 결과들로부터 $F_c2\%$, $F_c5\%$, $F_c10\%$, $F_c15\%$ 및 $F_c20\%$ 피쉬콜라겐/PCL 혼합액에서 최종 피쉬콜라겐의 농도(F_c)가 $F_c2\%$ 이상의 피쉬콜라겐이 포함된 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703) 및 사람 전립선암세포주(DU-145)의 3차원 배양에 효과적으로 활용될 수 있다는 사실이 입증되었다. 특히 $F_c2\%$ 이상을 포함하는 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체 중에서도 $F_c2\%-S_c30\%$ 내지 $F_c2\%-S_c50\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체가 세포의 3차원 배양에 유용하게 활용될 수 있음이 확인되었다.

[189]

[190] <실시예 5> 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 피쉬콜라겐 농도함량에 따른 혈액암세포의 3차원 배양 특성 분석

[191] 5-1. 세포 및 세포배양

[192] 마우스 T세포림프종세포주(mouse T cell lymphoma cell, EL4) 및 마우스 B세포림프종세포주(mouse B cell lymphoma cell, A20) 는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. EL4 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ ml 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. A20 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 RPMI-1640 medium (HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 2-3일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.

[193] 5-2. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[194] 피쉬콜라겐의 농도에 따라 다양하게 제조된 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 세포의 3차원 배양 특성을 비교하기 위해 다음과 같이 실험군을 설정하였다.

[195] 피쉬콜라겐/PCL 혼합액 제조시 사용된 피쉬콜라겐 저장액의 농도(S_c)와 전기방사시 사용된 피쉬콜라겐/PCL 혼합액에서 최종 피쉬콜라겐의 농도(F_c)에 따라 F_c0% (PCL 100%), F_c2%-S_c30%, F_c2%-S_c50%, F_c2%-S_c70%, F_c5%-S_c50%, F_c5%-S_c70%, F_c10%-S_c50%, F_c10%-S_c70%, F_c15%-S_c70%, F_c20%-S_c70%으로 10가지 종류의 실험군으로 나누고 상기 실시예 1의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 제조 방법에 따라, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 제조한 후 96-웰 플레이트에 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 넣고, 4x10⁵ cells/웰 농도로 마우스 T세포림프종세포주(EL4) 및 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 각각 접종한 후 배양하였다.

[196] 5-3. 액틴 염색을 이용한 마우스 혈액암 세포의 3차원 분포 특성 분석

[197] 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용하여 1일 및 3일 동안 3차원 배양된 마우스 B세포림프종세포주(A20) 및 마우스 T세포림프종세포주(EL4)의 섬유형액틴(F-actin) 염색을 실시하기 위해 먼저 세포가 배양된 피쉬콜라겐/PCL 복합 나노섬유 지지체를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 고정액으로 상온에서 20분간 고정하였다. 그런 다음 PBS로 2회 세척 후 0.1% 트리톤-X(triton-X) 100 용액에 상온에서 5분 동안 침투시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 비특이적인 염색을 제거하기 위해 0.2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 BSA) 용액으로 상온에서 20분 동안 처리 후 PBS로 2회 세척하였다. 그 후

액틴-검출용 Phalloidin-FITC (Promega, Madison, WI, USA)를 0.2% BSA용액에 1:150으로 희석하여 40분 동안 반응시킨 다음

트리스완충생리식염수(tris-buffered saline, 이하 TBS)로 3회 세척하여 슬라이드에 올려놓고 세포의 핵 염색을 위한 DAPI (Vector Lab, Inc. Burlingame, CA, USA) 용액으로 대조 염색하여 덮개유리(cover glass)를 덮어 봉입한 후, 공초점레이저주사현미경(FV1000-IX81, Olympus, Japan)으로 확인하였다.

- [198] 그 결과, PCL 나노섬유 지지체 (F_c0%; PCL 100%)에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원 배양한 결과인 도 27과 마우스 T세포림프종세포주(EL4) 세포를 3차원 배양한 결과인 도 36을 참고하면, 마우스 B세포림프종세포주(A20)들은 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 40 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었으며, 마우스 T세포림프종세포주(EL4) 세포들 역시 약 40 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었다.
- [199] 상기 결과로부터 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%)에서 나노섬유 사이의 공극이 비교적 넓어 세포들이 상당히 깊은 부위까지 이르는 것을 확인할 수 있었다.
- [200] 그러나, 1 μm 간격의 각 단면을 관찰한 도 27C 및 도 36C를 참고하면, 마우스 B세포림프종세포주(A20) 세포 및 마우스 T세포림프종세포주(EL4) 세포들의 분포하고 있는 세포들의 수가 상당히 적었으며, F-액틴이 세포막을 따라 균질하게 분포하지 않고 발현이 매우 감소했거나 국소부위에 불규칙적인 형태로 축적되어 있었다. 또한 세포 크기도 대부분 정상세포보다 작았으며 매우 불규칙적인 크기와 형태를 나타내었다.
- [201] 상기 결과로부터 PCL 나노섬유 지지체가 혈액암 세포의 3차원 배양에 적합한 환경을 제공하지 못하는 것을 확인할 수 있었다.
- [202] 반면, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 마우스 B세포림프종세포주(A20)를 3차원 배양한 결과인 도 28, 29 및 30과 마우스 T세포림프종세포주(EL4)를 3차원 배양한 결과인 도 37, 38 및 39을 참고하면, F_c 2%-S_c30% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 경우, 마우스 B세포림프종세포는 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 66 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었으며(도 28), 마우스 T세포림프종세포들은 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 60 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인할 수 있었다(도 37). 또한 F_c 2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서는 마우스 B세포림프종세포는 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 70 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 29), 마우스 T세포림프종세포들은 약 80 μm 의 깊이까지 들어갔다(도 38). F_c2%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 경우 마우스 B세포림프종세포는 나노섬유 지지체의 표면으로부터 약 110 μm 의 깊이까지 들어갔으며(도 30), 마우스 T세포림프종세포들은 약 42 μm 의 깊이까지 들어간 것을 확인하였다(도 39).
- [203] 상기 결과로부터 F_c2%-S_c30%, F_c2%-S_c50% 및 F_c2%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체들은 세포들이 상당히 깊은 부위까지 이를 수 있도록 나노섬유 사이의 공극의 크기가 적절할 뿐만 아니라 나노섬유의 물성이 세포의 이주 및

유지에 적합한 환경을 제공해주기 때문이다. 또한 1 μm 간격의 각각의 단면을 확인하였을 때, 상당한 두께에 걸쳐 세포들이 충분히 높은 밀도로 고르게 분포하고 있었다. 또한 마우스 B세포림프종세포를 3차원 배양한 결과인 도 28C 및 29C와 마우스 T세포림프종세포를 3차원 배양한 결과인 도 37C 및 38C를 참고하면, F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 나노섬유 지지체의 대부분의 세포들이 도 27C 또는 도 36C의 PCL 나노섬유 지지체(F_c0%)의 세포배양 특성과 달리 분포하고 있는 세포의 수가 상당히 많았을 뿐만 아니라, F-액틴이 세포막을 따라 균질하게 분포하여 정상적인 세포결질의 둥근 형태를 매우 잘 나타내고 있었다. 또한 세포의 크기도 대부분 정상세포와 유사하였을 뿐만 아니라 전반적으로 규칙적인 크기와 형태를 나타내었다.

- [204] 따라서, F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체는 이상적인 3차원 세포 성장 환경을 제공함으로써, 높은 3차원 세포배양 효율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [205] 반면, F_c2%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 경우 도 30C 및 도 39C를 참고하면, 세포들의 크기, 형태 및 F-액틴 염색특성은 대체로 정상세포와 유사하였으나 분포하는 세포 사이의 밀집도가 F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체보다 낮게 나타났다. 또한 F_c5%-S_c50%(도 31), F_c5%-S_c70%(도 32), F_c10%-S_c70%(도 33), F_c15%-S_c70%(도 34), F_c20%-S_c70%(도 35) 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체들의 경우 마우스 B세포림프종세포가 각각 약 46 μm , 36 μm , 26 μm , 34 μm 및 24 μm 깊이까지 들어간 것을 확인하였다.
- [206] 상기 결과로부터 F_c5%-S_c50%, F_c5%-S_c70%, F_c10%-S_c70%, F_c15%-S_c70%, F_c20%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체들은 F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체보다 좁은 공극을 가지므로 세포가 상대적으로 얇게 분포하는 것으로 확인되었다. 그러나 도 31C, 32C, 33C, 34C 및 35C의 확대된 단면의 세포들이 F_c2%-S_c30% 및 F_c2%-S_c50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 세포들처럼 고르게 분포하고 있었으며, 세포들의 크기, 형태 및 F-액틴 염색특성은 대체로 정상세포와 유사하였다.
- [207] 다만, F_c2%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체와 같이 세포 밀집도는 낮게 나타났다.
- [208] 마우스 T세포림프종세포는 F_c5%-S_c50%(도 40) 및 F_c5%-S_c70%(도 41) 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 각각 30 μm 및 20 μm 깊이까지 들어간 것이 확인되었으나, 그 밖의 F_c10%-S_c70%, F_c15%-S_c70%, F_c20%-S_c70% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체들에서는 지지체의 표면으로부터 깊이까지 들어가지 못하였으며, 세포 수 역시 매우 적게 확인되었다.
- [209] 상기 결과로부터 F_c10% 이상 농도의 지지체(F_c10%-S_c50%, F_c10%-S_c70%, F_c15%-S_c70%, F_c20%-S_c70%)에는 양호한 3차원 세포성장 환경을 제공하지 못하는 것을 확인하였다.
- [210] 따라서, 본 발명의 상기 실시예를 통하여, F_c2%, F_c5%, F_c10%, F_c15% 및 F_c20%

피쉬콜라겐/PCL 혼합액에서 최종 피쉬콜라겐의 농도(F_c)가 $F_c2\%$ 내지 $F_c5\%$ 정도의 피쉬콜라겐이 포함된 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체가 3차원 세포배양에 적합한 배양 환경을 제공하며, 보다 바람직하게는 $F_c2\%-S_c30\%$ 내지 $F_c2\%-S_c50\%$ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체가 3차원 세포배양에 적합한 지지체임이 확인되었다.

[211]

[212] <실시예 6> 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 배양된 세포의 생존능 측정

[213] 6-1. 세포 및 세포배양

[214] 마우스 B세포림프종세포주(mouse B cell lymphoma cell, A20)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. A20 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen)을 함유한 RPMI-1640 배지(HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 1-2일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.

[215] 6-2. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[216] 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 배양된 세포의 생존능을 측정하기 위해, 피쉬콜라겐/PCL 혼합액 제조시 사용된 피쉬콜라겐 저장액의 농도(S_c)과 전기방사시 사용된 피쉬콜라겐/PCL 혼합액에서 최종 피쉬콜라겐의 농도(F_c)에 따라 분류된 $F_c0\%$ (PCL100%) 및 $F_c2\%-S_c50\%$ 의 지지체를 이용하였다. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체의 제조 방법은 상기 실시예 1의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 제조방법으로 수행되었다. 96-웰 플레이트에 각각의 나노섬유 지지체를 넣고 A20 세포를 2×10^5 cells/웰 농도로 접종 후 배양하였다.

[217] 6-3. Live/Dead 염색

[218] 본 발명에 따른 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 세포 배양시 지지체가 A20 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 Live/Dead 염색을 실시하였다.

[219] 먼저 실시예 6-2와 같이 피쉬콜라겐/PCL 복합 나노섬유 지지체에서 A20 세포를 접종하고 2일 및 6일간 배양하였다. 그 후 각 나노섬유 지지체를 PBS로 1회 세척 후 2 μL 칼세인(calcein) AM 과 0.5 μL 에티듐(EthD)-1 (LIVE/DEAD Viability Kit, Molecular Probes)를 1 ml PBS에 희석하여 20분간 어두운 곳에서 염색하여 공초점레이저주사현미경(FV1000-IX81, Olympus, Japan)으로 분석하였다.

[220] 그 결과, 배양 2일째인 도 42와 배양 6일째인 도 43과 같이 PCL 나노섬유 지지체보다 본 발명에 따른 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 배양된 A20 세포의 생존률이 매우 높게 나타났다.

[221] 상기 결과로부터 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체가 A20 세포의 3차원 배양에 적절한 성장환경을 제공하는 것을 확인할 수 있었다.

[222]

[223] <실시예 7> 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 배양된 암세포에 대한 인-비보 모사 모델 적합성 분석

[224] 7-1. 세포 및 세포배양

[225] 항암화학요법-감수성(chemotherapy-sensitive)을 나타내는 사람 비소세포폐암주(human non-small cell lung cancer cell, NCI-H1703)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 사람 전립선암세포주(human prostate cancer cell, DU-145)는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. NCI-H1703 세포주와 DU-145 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 RPMI-1640 medium (HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 마우스 T세포림프종세포주(mouse T cell lymphoma cell, EL4)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. EL4 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/ ml 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 1-2일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.

[226] 7-2. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 배양된 암세포에 대한 약물확산능 측정

[227] 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 환경에서 암세포에 도달하는 약물의 확산능력을 확인하기 위해, F₂-S₅₀ 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 제작한 후 96-웰 플레이트에 넣고 EL4 세포를 1x10⁵ cells/웰 농도로 접종 후 3일간 배양하였다.

[228] 그 후 항암제인 독소루비신(doxorubicin; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)을 1 μ M 농도로 12 및 24시간 동안 처리하고 PBS로 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 세척한 후 DAPI 용액으로 핵을 염색하여 지지체 내에서 독소루비신의 분포를 공초점레이저현미경(FV1000-IX81, Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인하였다. 상기 결과는 각각의 분석에 대한 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었다. 통계적 분석은 양측t검정(two-tailed t-test)을 통해 수행하였으며, 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 일 때를 기준으로 평가하였다.

[229] 그 결과, 도 44와 같이 독소루비신이 지지체 내에 마우스 T림프종세포인 EL4 세포가 분포하고 있는 대부분의 지역까지 확산 되어있는 것을 확인할 수 있었다.

[230] 상기 결과로부터 본 발명에 따른 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양모델은 항암제 등 다양한 약물의 감수성 검사를 위한 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

- [231] 7-3. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 배양된 암세포에 대한 항암제 감수성 측정
- [232] 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델의 적합성을 확인하기 위해, 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델의 항암제 감수성을 분석하였다.
- [233] 먼저, 상기 실시예 1과 같은 방법으로 F₄4%-S₄50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 제작하여 96-웰 플레이트에 넣고 NCI-H1703 및 DU-145 세포를 각각 5×10^4 cells/웰 농도로 접종 후 배양하였다.
- [234] 그 후 통상적인 2차원 배양조건에서 배양된 NCI-H1703 및 DU-145 세포와 상기 나노섬유 지지체에서 3차원으로 배양된 NCI-H1703 및 DU-145 세포에 3 μ M 독소루비신(doxorubicin, 5927; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 3 μ M 파클리탁셀(paclitaxel, T7402, Sigma)을 각각 24 및 48시간 동안 처리한 후 WST-1 시약을 처리하여 미세플레이트리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고 백분율 성장률을 측정하였다. 상기 결과는 각각의 분석에 대한 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었다. 통계적 분석은 양측t검정(two-tailed t-test)을 통해 수행하였으며, 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 일 때를 기준으로 평가하였다.
- [235] 그 결과, 도 45A를 참고하면, 사람 비소세포폐암주(NCI-H1703)에 독소루비신을 3 μ M 농도로 24시간 처리했을 경우 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 55.1% ($P < 0.01$)의 생존율을 나타내었으며, 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 94.5% ($P < 0.01$)의 세포생존율을 나타내었다. 또한 48시간 후 측정 시 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 40.8% ($P < 0.01$)의 생존율을 나타내었으며, 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 95.7%의 세포생존율을 나타내었다.
- [236] 또한 사람 전립선암세포주(DU-145)에 파클리탁셀(paclitaxel)을 3 μ M 농도로 처리한 경우, 도 45B를 참고하면, 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 50.2% ($P < 0.05$)의 생존율을 나타내었으며, 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 93.5% ($P < 0.01$)의 세포생존율이 나타났고, 48시간 처리한 경우 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 14.6% ($P < 0.01$)의 생존율을 나타내었으며, 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 64.2% ($P < 0.05$)의 세포생존율을 나타내었다.
- [237] 상기 결과로부터 2차원 환경보다 3차원 환경이 항암제에 대한 약물내성을 효과적으로 나타낼 수 있으며, 이를 통하여 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델이 항암제에 대한 약물 내성 기전 연구 및 항암제 감수성을 검사하는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [238] 7-4. 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체에서 3차원 암세포 배양에 따른 악성화능 분석
- [239] 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델에서 악성화능 분석을 위해, 상기 실시예 1과 같은 방법으로 제작된 F₄4%-S₄50% 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 96-웰 플레이트에 넣고 DU-145 세포를 5×10^4 cells/웰 농도로 접종 후 2일간 배양하였으며 대조군으로 DU-145 세포를 동일한

조건을 2차원 배양하였다. 그 후 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 분석(semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis, RT-PCR)을 수행하였다.

- [240] 먼저, 각각의 배양된 DU-145 세포에 트리졸 시약(trizol reagent; Ambion, Invitrogen)을 사용하여 제조사 설명서에 따라 배양 세포로부터 총 RNA를 분리하였다.
- [241] RT-PCR을 수행하기 위해, 0.5 μ g 올리고(dT)12-18 [oligo(dT)12-18] Oligo (dT) 프라이머(primer), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 40 mM DTT, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP) mixture, 10 units RNase inhibitor 및 200 unit MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사 중합효소(reverse transcriptase; Promega, Madison, WI, USA)를 포함하는 완충용액 25 μ L를 사용하여 1 μ g의 총RNA로부터 단사슬(single-strand)cDNA를 합성하였다.
- [242] 유전자 증폭을 위한 PCR 반응을 확인하기 위해, 표 4의 프라이머를 사용하였다. 사람 Hes1과 Notch-1, -2, -3, 4의 PCR 반응은 프라이머 10 pmol과 1 μ L cDNA 샘플, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP 혼합액 및 5 unit Taq DNA 중합효소(polymerase; Promega)를 포함하는 완충용액 25 μ L를 사용하여 94°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 45초 및 72°C에서 45초의 반응을 35 사이클(cycle)로 수행하였고, CD44, 스네일(Snail) 및 GAPDH는 94°C에서 30초, 57°C에서 45초 및 72°C에서 45초의 반응을 30 사이클(cycle)로 수행하였다. 또한 사람 slug, HIF-1 α , VEGF, endothelin-1의 경우 94°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 45초 및 72°C에서 45초의 반응을 30 사이클(cycle)로 수행하였다. PCR 반응 후에는 2% 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)을 통해 생산된 반응생성물 시료를 EtBr (Ethidium bromide)로 염색한 후 자외선 조명기(UV light illumination)하에서 분석하였다.
- [243] 그 결과, 도 46과 같이 사람 전립선암세포(DU-145)를 2차원 또는 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 배양한 후 암세포의 악성도와 밀접한 관련이 있는 Hes 1과 Notch-1, -2, -3, 4의 발현을 RT-PCR 분석법으로 확인한 결과, 2차원 배양보다 3차원 환경에서 배양된 암세포에서 Hes 1 및 Notch-1, -2, -3, 4 모두의 발현이 증가된 것을 확인하였다.
- [244] 상기 결과로부터 2차원 환경과는 달리 3차원 환경에서 배양된 암세포들은 악성도가 증가한다는 것이 확인되었으며, 본 발명에 따른 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포배양모델에서는 생체(인-비보) 환경이 잘 모사되는 것이 확인되었다.
- [245] 또한 도 47을 참고하면, 암세포의 악성도 특히 상피중간엽세포이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT)과 밀접한 관련이 있는 마커인 스네일(snail) 및 slug, 암세포의 혈관내피세포 성장인자인 VEGF와,

VEGF를 분비하게 하는 인자인 HIF-1 α , 암줄기세포(cancer stem cell)의 중요한 마커인 CD44, 그리고 종양의 성장과 전이에 핵심적인 역할을 하는 endothelin-1의 발현이 2차원 환경보다 3차원 환경에서 배양된 암세포에 더 높게 나타났다.

- [246] 상기 결과로부터 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체 기반의 3차원적 암세포배양의 경우 암의 성장, 진행, 전이 및 악성화 등 암세포의 배양환경이 생체와 매우 유사한 특성을 나타낼 수 있으며, 기존의 2차원 세포배양 방법에서 제공할 수 없었던 인-비보 모사 환경을 제공해 준다는 점에서, 본 발명의 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 암세포의 발암, 성장, 전이 및 악성화 기작 연구뿐만 아니라 암세포에 대한 치료제의 개발에 있어서 유용하게 이용될 수 있다.

- [247] 표 4

[Table 4]

유전자 이름	서열번호	프라이머 서열
Human Hes 1	1	정방향: 5'-CCTGTCATCCCCGTCTACAC-3'
	2	역방향: 5'-CACATGGAGTCCGCCGTAA-3'
Human Notch-1	3	정방향: 5'-TACAAGTGCGACTGTGACCC-3'
	4	역방향: 5'-CACACGTAGCCACTGGTCAT-3'
Human Notch-2	5	정방향: 5'-CAACCGCAATGGAGGCTATG-3'
	6	역방향: 5'-GCGAAGGCACAATCATCAATGTT-3'
Human Notch-3	7	정방향: 5'-TGGCGACCTCACTTACGACT-3'
	8	역방향: 5'-CACTGGCAGTTATAGGTGTTGAC-3'
Human Notch-4	9	정방향: 5'-CCTGGCTCCTTCAACTGCC-3'
	10	역방향: 5'-GCAAGTAGGTCCAGACAGGT-3'
Human Snail	11	정방향: 5'-AGACCCACTCAGATGTCAA-3'
	12	역방향: 5'-CATAGTTAGTCACACCTCGT-3'
Human Slug	13	정방향: 5'-GGTCAAGAAGCATTTC AAC-3'
	14	역방향: 5'-GGTAATGTGTGGGTCCGA-3'
Human VEGF	15	정방향: 5'-CGAAACCATGAACTTTCTGC-3'
	16	역방향: 5'-CCTCAGTGGTCACACACTCC-3'
Human HIF-1 α	17	정방향: 5'-GGCGCGAACGACAAGAAAA-3'
	18	역방향: 5'-GTGGCAACTGATGAGCAAGC-3'
Human CD44	19	정방향: 5'-CTCCAGTGAAAGGAGCAGCA-3'
	20	역방향: 5'-AGCAGGGATTCTGTCTGTGC-3'
Human Endothelin-1	21	정방향: 5'-TGCTCCTGCTCTTCCCTGATGGATAAAGAGTG TGTC-3'
	22	역방향: 5'-GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT-3'
Human GAPDH	23	정방향: 5'-TGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'
	24	역방향: 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'

- [249] <실시예 8> 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 배양된 암세포에 대한 인-비보 모사 암줄기세포유도/성장 및 암세포분화 모델 적합성 분석
- [250] 8-1. 세포 및 세포배양
- [251] 마우스 T세포림프종세포주(mouse T cell lymphoma cell, EL4)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.
- [252] EL4 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다. 배양액은 2-3일에 한 번씩 새것으로 교환하였다.
- [253] 8-2. 고처리 유세포 분석기(flow cytometer) 분석
- [254] 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델에서 암줄기세포 형성능 및 암세포의 분화능을 분석하기 위해 상기 실시예 1과 같은 방법으로 F₂2%-S_c50% 나노섬유 지지체를 제작한 후 제작된 나노섬유 지지체를 96-웰 플레이트에 넣은 후 EL4 세포를 2x10⁵ cells/웰 농도로 접종한 후 2일 동안 배양하였다.
- [255] 배양된 세포를 분리하여 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GibcoLife Technologies)로 2번 세척하고 FACS 버퍼(BSA 0.1%, sodium azide 0.1%, HBSS 500 mL) 3 mL에 재부유하여 4°C에서 1500 rpm으로 4분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 세포를 재부유시킨 후 항체와 비특이적 결합을 피하기 위해 항(anti)-FcγRII/III(2.4G2, hybridoma supernatant)와 함께 세포를 전배양하였다.
- [256] 그 후 2% FBS 함유된 HBSS 내에서 목적하는 형광-표지된 일차 항마우스 단일클론 항체(primary anti-mouse monoclonal antibody)인 FITC 또는 PE가 결합된 항-CD4 항체(FITC-CD4 혹은 PE-CD4), APC-결합 항-CD8 항체(APC-CD8), c-kit-결합 항-c-kit 항체(c-kit-PE-CY7-c-kit) 및 APC-결합 항-sca-1 항체(APC-sca-1)를 이용하여 5-10 µg/mL 농도로 얼음 냉각 하에 30분 동안 반응시켰다. 배경 형광(background fluorescence)은 이소타입-유사 음성반응 항체(isotype-matched nonreactive antibodies)와 반응시킨 세포를 통해 결정하였다.
- [257] 그 후 세포를 HBSS로 두 번 세척한 후, FACS 버퍼 500 µL에 세포를 재부유시킨 후 처리유세포분석기를 이용하여 세포표면분자의 발현을 Dot-plot법으로 분석하였으며, 얻어진 결과는 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 통해 분석하였다.
- [258] 그 결과, 도 48과 같이 2D 환경하에서 2일간 배양한 EL4 세포들 중 암줄기세포(cancer stem cell)에 해당하는 c-kit⁺sca-1⁺ 세포의 비율은 0.97%이었으나, 3D 환경하에서 2일간 배양한 EL4 세포들 c-kit⁺sca-1⁺ 암줄기세포의 비율은 4.45%로 증가하였다.
- [259] 상기 결과로부터 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체 기반의 3차원적 암세포배양의 경우, 암줄기세포의 형성 및 성장과 관련된 암세포의 배양환경이

생체와 유사한 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 2차원 세포배양 방법에서 제공할 수 없었던 인-비보 모사 환경을 제공해 준다는 점에서, 본 발명의 피쉬콜라겐/PCL 나노섬유 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 암줄기세포 및 항암제내성기전 연구와 고효율성 항암치료법 개발에 유용한 세포배양 모델로 사용될 수 있다.

[260]

[261] 하기의 참조예는 하기의 실시예 9 내지 에 공통적으로 적용되는 참조예를 제공하기 위한 것이다.

[262] <참조예 1> 세포 및 세포 배양

[263] 하기 실시예에서 사용된 세포주의 종류는 다음과 같다.

항암화학요법-감수성(chemotherapy-sensitive)을 나타내는 사람 난소암세포주인 A2780 세포주는 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 마우스 T세포림프종세포주(mouse T cell lymphoma cell, EL4)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 항암화학요법-감수성(chemotherapy-sensitive)을 나타내는 사람 난소암세포주인 R182 세포는 Dr. J. Shah (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA)에 의해 제공되었으며, 정상 마우스 흉선상피세포주(thymic epithelial cell, TEC)의 한 종류인 흉선겉질상피세포주(thymic deep cortex or cortical reticular epithelial cell, CREC)는 Dr. Barbara B. Knowles (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)에 의해 제공되었다.

[264] R182 세포 및 A2780 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 RPMI-1640 medium (HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다.

[265] 또한 CREC 및 EL4 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Invitrogen), 100 IU/mL 페니실린(penicillin; Gibco, Invitrogen) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco, Invitrogen) 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 함유 대기 조건하에 배양 및 유지하였다.

[266] 모든 세포의 배양액은 2-3일에 한 번씩 새 배양액으로 교환하였다.

[267] <참조예 2> 통계분석

[268] 모든 결과는 각각의 분석에 대한 평균 ± 표준편차(SD)로 나타내었다. 통계적 분석은 양측t검정(two-tailed t-test)을 통해 수행하였으며, 통계적 유의성은 P < 0.05일 때를 기준으로 평가하였다.

[269]

[270] <실시예 9> 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 제작

[271] 하이드로겔 지지체를 도 49와 같은 방법으로 제작하였다.

- [272] 하이드로젤 지지체 제작을 위해, 소듐알지네이트(sodium alginate, Sigma-Aldrich)를 3 중량%의 농도로 16 시간 동안 증류수에 녹여 저장액으로 제조한 후 멸균하였으며, 아가로스(Affymetrix, Cleveland, Ohio, USA)는 멸균한 증류수에 2 중량%가 되도록 첨가하고 100°C에서 끓을 때까지 가열하여 아가로스 저장액으로 만들었다. 또한 해양생물 유래 콜라겐(이하 “해양콜라겐”, Geltech, Busan, Korea)을 증류수에 25 중량%가 되도록 첨가한 후 와류시켜 녹임으로써 해양콜라겐 저장액을 만들었다.
- [273] 상기 방법으로 만들어진 각각의 용액을 25°C 내지 37°C 온도에서 혼합하였다. 먼저, 3 중량% 알지네이트 저장액 33.3 μ L와 세포를 혼합한 후, 25 중량%인 해양콜라겐 저장액 30 μ L 또는 40 μ L와 혼합하고 마지막으로 2 중량% 아가로스 저장액을 6.25 μ L 첨가하여, 혼합액에서 최종농도가 알지네이트의 경우 1 중량%, 해양콜라겐의 경우 7.5 또는 10 중량% 그리고 아가로스의 경우 0.125 중량%가 되도록 하였다(이하 “0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트” 또는 “0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트”라 함). 그 후 상기 방법으로 혼합한 혼합물을 4°C에서 5-30분 동안 정치시켰으며, 보다 바람직하게는 5-10분에서 정치시킨 것이 가장 바람직하였다.
- [274] 본 발명의 하이드로젤 지지체를 이용한 3차원 세포배양은 상기 혼합물을 세포배양에 사용될 배양 용기에 직접 넣어 겔화 시킨 후 세포 배양하거나, 겔을 다른 용기로 이동시킬 경우도 50과 같은 방법으로 혼합액을 1 mL 주사기의 끝부분을 자른 다음 혼합액을 부어서 겔화시킨 후 주사기의 피스톤을 이용하여 겔을 24-웰 플레이트 내로 이동시켜 세포를 배양하였다.
- [275] 따라서, 본 발명의 하이드로젤을 이용하면, 세포 배양용기의 크기 및 형상에 맞추어 겔을 제작할 수 있으며, 이렇게 제작된 하이드로젤 지지체를 이용한 3차원 세포배양이 가능하다.
- [276]
- [277] <실시예 10> Ca^{2+} 양이온에 의한 세포독성 확인(cell cytotoxicity assay)
- [278] 세포독성평가는 통상적인 방법[H.W. Lee 등, Regul. Pept. (2008), 147, 72-81]에 따라 다음과 같이 수행하였다. 상기 참조예 1의 세포를 96-웰 플레이트에서 10% FBS 함유 세포배양액 0.1 mL과 함께 R182 및 A2780 세포의 경우 1×10^4 세포/웰 농도로, R182 및 A2780 세포의 경우 1×10^5 세포/웰 농도로 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양시키고 나서 FBS가 없는 조건에서 12-16 시간 동안 추가로 배양을 시켰다.
- [279] 배양된 세포에 다양한 농도의 염화칼슘(CaCl_2 , Sigma-Aldrich)을 10, 50, 100, 200 및 300 mM의 농도로 처리한 뒤 18~24시간 배양한 후, WST-1 assay 법(EZ-Cytox Cell Viability Assay kit, Daeillab Service, Seoul, Korea)으로 세포독성 평가를 수행하였다.
- [280] WST-1 시약 10 μ L를 각 웰에 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 조건인

습윤배양기내에서 2시간 동안 배양한 후 미세플레이트리더(microplate reader, Tecan, M, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하여 백분을 성장률을 산정하였다.

[281] 또한 모든 결과는 각각의 분석에 대한 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었다.

통계적 분석은 양측t검정(two-tailed t-test)을 통해 수행하였으며, 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 일 때를 기준으로 평가하였다.

[282] 그 결과, 도 51과 같이 CREC 세포에 CaCl_2 10 mM을 처리한 경우 81.1%, 50 mM에서 36.8% ($P < 0.01$), 100 mM에서 23.0% ($P < 0.01$), 200 mM에서 9.9% ($P < 0.001$), 300 mM에서 10.3% ($P < 0.001$)로 용량의존적

세포독성효과(dose-dependent cytotoxic effect)가 나타났으며, 암세포의 한 종류인 마우스 T세포림프종세포(EL4)에 CaCl_2 를 처리한 후 세포독성효과를 측정한 결과, 10 mM에서 101.3%, 50 mM에서 59.2% ($P < 0.001$), 100 mM에서 25.4% ($P < 0.001$), 200 mM에서 11.2% ($P < 0.001$), 300 mM에서 9.7% ($P < 0.001$)로 용량-의존적 세포독성효과를 나타내었다.

[283] 또한 사람 난소암 세포인 R182세포에서는 CaCl_2 50 mM에서 34.1% ($P < 0.001$), 100 mM에서 26.4% ($P < 0.001$), 150 mM에서 21.1% ($P < 0.001$), 200 mM에서 21.4% ($P < 0.001$), 250 mM에서 24.9% ($P < 0.001$) 그리고 300 mM에서 25.6% ($P < 0.001$)로 50 mM 이상의 모든 농도에서 매우 강한 세포독성효과를 나타내었다. 또한 다른 종류의 사람 난소암 세포인 A2780세포에서는 CaCl_2 50 mM에서 74.9%, 100 mM에서 65.9%, 150 mM에서 41.5% ($P < 0.05$), 200 mM에서 37.9% ($P < 0.05$), 250 mM에서 39.5% ($P < 0.05$) 그리고 300 mM에서 43.7% ($P < 0.05$)로 용량-의존적 세포독성효과를 나타내었다.

[284] 상기 결과로부터 CaCl_2 는 통상적인 농도에서 정상세포 뿐만 아니라 다양한 종류의 고형암 및 혈액암 세포에 대해 유의한 세포독성효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 하이드로겔 기반의 세포배양 지지체의 소재로 일반적으로 가장 널리 사용되고 있는 알지네이트 기반의 하이드로겔 세포배양 지지체의 제작 시 필수적인 단계인 겔화과정에서 경화제로 널리 사용되고 있는 CaCl_2 가 정상 및 암세포 모두에 강한 독성인자로 작용한다는 사실을 나타내므로, 이러한 부작용을 줄이거나 없앨 수 있는 하이드로겔의 겔화 방법을 개발하는 것이 매우 중요하다.

[285]

[286] <실시예 11> 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 소재 및 조성에 따른 특성 분석

[287] 상기 실시예 9와 같은 복합 하이드로겔 지지체를 제조하기 위한 소재 및 가장 적합한 소재의 조성비율을 확인하기 위해 아가로스 단독 하이드로겔, 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔 및 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔을 상기 실시예 9와 같은 방법으로 제조하고 그 특성을 분석하였다.

[288] 아가로스 단독 하이드로겔은 통상적으로 사용하는 농도인 0.5, 1, 1.5 및 2

중량% 농도로 제조하였으며, 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔은 3 중량% 알지네이트 저장액과 2 중량% 아가로스 저장액을 만든 후 혼합하여 최종적으로 알지네이트 1 중량% 및 아가로스 0.125 중량% 농도가 되도록 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔은 실시예 9와 같은 방법으로 제조하였다.

- [289] 상기 방법으로 제조된 각각의 하이드로겔 지지체로 세포배양을 위해, 실시예 9와 같은 방법으로 A2780 세포를 0.5, 1 및 1.5 중량% 아가로스 단독 하이드로겔과 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양한 후 배양 1, 3 및 5일째에 위상차현미경으로 세포 형태를 관찰하였다. 또한 EL4 세포를 0.5, 1, 1.5 및 2 중량% 아가로스 단독 하이드로겔 지지체에 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하고, 배양 2, 5 및 10일째에 위상차현미경으로 세포 형태를 관찰하였다.
- [290] 그 결과, 도 52와 같이 A2780 세포를 아가로스 단독 하이드로겔 지지체에서 배양한 경우, 세포배양 기간이 경과할수록 사멸된 세포수가 증가하였으며, 0.5, 1 및 1.5 중량% 아가로스 단독 하이드로겔 모두 72시간 이후부터 사멸된 세포 수가 증가하였다. 알지네이트-아가로스 복합 하이드로겔 지지체의 경우 사멸된 세포는 거의 존재하지 않았으나, 하이드로겔의 기계적 강도가 약하여 세포들이 겔과 안정적으로 결합되지 못하고 겔 밖으로 빠져나오는 문제점이 확인되었다.
- [291] 또한 다양한 농도 및 배양 시간에 따라 아가로스 단독 소재의 하이드로겔 지지체에서 EL4 세포를 3차원적으로 배양한 결과, 도 53을 참고하면, 아가로스 단독 하이드로겔 지지체의 경우 아가로스의 농도 및 세포배양 기간이 증가할수록 EL4 세포의 성장이 감소하고 사멸 세포수가 증가하였는데, 0.5 중량% 아가로스에서는 2일째에 세포의 성장이 느려졌고 5일째부터는 성장이 거의 일어나지 않았을 뿐만 아니라 사멸 세포수도 증가하였다. 또한 1 중량% 아가로스에서는 0.5 중량% 아가로스 보다 세포성장이 더 느려졌으며 사멸되어 가는 세포의 수도 더 많이 확인되었으며, 1.5 중량% 아가로스 역시 세포성장이 감소하고 사멸되어 가는 세포의 수도 더 많이 확인되었다. 특히, 2 중량% 아가로스에서는 배양 후 2일째부터 세포의 성장이 거의 이루어지지 않았으며, 시간이 지날수록 모든 세포들이 사멸되어 가는 것을 확인하였다.
- [292] 반면, 본 발명에 따라 제작된 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체는 도 54 및 도 55와 같이 혼합액에서 최종 농도가 0.05 중량%가 되도록 동물성콜라겐을 첨가한 경우 약 4500개의 EL4 세포가 겔 밖으로 빠져나왔으며, 해양콜라겐의 경우 최종농도가 0.05 중량%에서 230개, 최종농도가 0.1 중량%에서 2050개, 최종농도가 0.2 중량%에서 18000개, 최종농도가 0.5 중량%에서 17500개, 최종농도가 1 중량%에서 11500개, 최종농도가 2 중량%에서 5500개 그리고 최종농도가 5 중량%에서 4000개의 탈리된 세포를

확인할 수 있었다.

- [293] 상기 결과로부터 아가로스 단독 소재의 하이드로겔 지지체에 비해 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 A2780 및 EL4 세포의 생존 및 성장이 우수하였으며, 알지네이트-아가로스 복합 하이드로겔 지지체 보다 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 안정적인 세포결합력을 나타내었다.
- [294] 따라서, 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 세포배양은 아가로스 단독 하이드로겔 보다 세포 생존 및 성장에 우수하고, 기계적 강도가 약한 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 세포 탈리 현상을 해결함으로써, 3차원 세포 배양에 매우 적합한 것으로 확인되었다.
- [295]
- [296] <실시에 12> 동물성콜라겐 또는 해양콜라겐 사용에 따른 특성 분석
- [297] 앞선 실험에서 확인한 바와 같이, 아가로스-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법의 경우, 세포들이 겔 밖으로 탈리되는 문제점이 확인되었다. 그러나, 콜라겐이 첨가된 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법을 통하여, 세포 탈리 문제점이 해결되는 것이 확인됨에 따라, 콜라겐의 효율성을 확인하기 위해 동물성콜라겐과 해양콜라겐 사용에 따른 효과를 분석하였다.
- [298] 상기 실시예 9와 같은 방법으로 0.125 중량% 아가로스-0.05 중량% 흰쥐꼬리콜라겐-1.0 중량% 알지네이트 그리고 0.125 중량% 아가로스-(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10) 중량% 해양콜라겐-1.0 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 이와 같은 각각의 하이드로겔 지지체 제조시 5×10^4 세포/겔의 EL4 세포가 포함되게 하였다. 그 다음, 혼합액을 1 mL 주사기에 80 μ L 씩 넣고 4°C에 5-10분간 겔화시킨 후 48-웰 플레이트에 넣어서 배양하고 도 56과 같이 배양 후 1, 2, 3 및 4일째 위상차현미경으로 관찰하였다.
- [299] 또한 0.125 중량% 아가로스-0.05 중량% 흰쥐꼬리콜라겐-1.0 중량% 알지네이트 그리고 0.125 중량% 아가로스-(0.05, 0.1, 1, 3, 5, 7.5, 10 및 15) 중량% 해양콜라겐-1.0 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 이와 같은 각각의 하이드로겔 지지체 제조 시 A2780 세포가 포함되게 하였다. 그 다음, 혼합액을 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에서 5-10분간 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양한 후 도 57과 같이 배양 1 및 3일째 세포를 위상차현미경으로 관찰하였다.
- [300] 그 결과, EL4 세포를 관찰한 도 56 및 A2780 세포를 관찰한 도 57과 같이 0.05 중량% 동물성콜라겐을 사용한 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체와 5-10 중량% 해양콜라겐을 사용한 두 종류의 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 세포 성장이 동일한 효과를 나타내었다. 다만, 해양콜라겐의 경우 동물성콜라겐과 동일한 효과를 나타내기 위해서는 동물성콜라겐 보다 약 100배 높은 농도의 해양콜라겐을

사용해야 하지만, 해양콜라겐의 경우 동물성콜라겐 보다 약 10,000 ~ 100,000배 정도 저렴하기 때문에 해양콜라겐을 이용한 아가로스-콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체는 동물성콜라겐 이용한 복합 하이드로겔 지지체와 유사한 효과를 나타내면서 경제적으로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[301]

[302] <실시예 13> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 투명도 특성 확인

[303] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 투명도를 확인하기 위해, 상기 실시예 9와 같은 방법으로 제조된 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체와 전기방사법에 의해 제작된 나노섬유 지지체, 100 mM CaCl₂에 의한 화학적 가교 방법에 의해 형성된 하이드로겔 지지체 및 통상적인 2차원적 96-웰 세포배양용 플레이트에 각각 4x10⁴ 세포/겔의 EL4 세포를 첨가하여 배양한 후 위상차현미경 관찰을 통하여 각각의 지지체의 투명도를 비교하였다.

[304] 그 결과 도 58과 같이, 통상적으로 사용되는 이온에 의한 화학적 가교 방법에 의해 형성된 하이드로겔 지지체(b) 및 조직공학에서 많이 이용되고 있는 전기방사법에 의해 제작된 나노섬유 지지체(c)와 다르게, 일반적인 2차원적 세포배양(a)에서 볼 수 있는 것처럼, 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체(d)는 매우 높은 투명도를 제공하기 때문에 위상차현미경으로 EL4 세포의 형태를 관찰하는데 용이한 것이 확인되었다. 따라서 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체는 3차원 세포배양에서 칼슘과 같은 이온으로 가교된 알지네이트 기반 하이드로겔 혹은 나노섬유 기반 지지체에서 불가능하였던 세포의 다양한 형태 관찰을 위상차현미경으로 가능하게 할 수 있다.

[305]

[306] <실시예 14> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 물리적 특성 분석

[307] 1. 하이드로겔 지지체 제작

[308] 지지체의 구조를 분석하기 위해 사용된 실험군으로는 첫째, 1 중량% 알지네이트 단독 하이드로겔, 둘째, 0.125 중량% 아가로스 단독 하이드로겔, 셋째, 7.5중량% 해양콜라겐 단독 하이드로겔, 넷째, 10 중량% 해양콜라겐 단독 하이드로겔, 다섯째, 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔, 여섯째, 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 일곱째, 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔을 실시예 9와 같은 방법으로 제조하였다.

[309] 2. 주사전자현미경을 이용한 하이드로겔 지지체 구조 분석

[310] 상기 실시예 14-1에서 제조된 7가지 실험 군의 하이드로겔 지지체를 1 mL

주사기에 100 μ L 씩 분주하여 4°C 에서 5-10분 동안 겔화시킨 후 -20°C 에서 24시간 동안 냉동시켜 진공동결건조기(FDS series, ilShinBioBase)로 24시간 동안 건조시켰으며 ion sputter (E-1010, Hitachi, Japan)로 표면 처리한 후 주사전자현미경(JSM-6490LV, JEOL, Japan)으로 가속전압 20 kV 하에서 관찰하였다.

- [311] 그 결과 도 59과 같이, 1 중량% 알지네이트, 0.125 중량% 아가로스, 7.5 및 10 중량% 해양콜라겐 단독 하이드로겔 및 0.125 중량% 아가로스- 1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 단면을 관찰하였을 때, 전체적으로 불규칙적인 공극 구조로 이루어져 있었으나, 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 또는 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 단면을 관찰하였을 때는 전체적으로 공극의 구조가 규칙적인 형태를 이루고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.
- [312] 3. FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) 분석
- [313] 상기 실시예 14-1에서 제조된 7가지 실험 군의 하이드로겔 지지체를 1 mL 주사기에 100 μ L 씩 분주하여 4°C 에서 5-10분 동안 겔화시킨 후 -20°C에서 24시간 동안 냉동시켜 진공동결건조기(FDS series, ilShinBioBase)로 24시간 동안 건조시켜 적외선분광분석시스템(FT-IR Microscopy System)으로 측정하였다.
- [314] 그 결과, 도 60과 같이 0.125 중량% 아가로스-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 FT-IR 스펙트럼은 모체분자(parent molecule)의 특성을 나타내었으며, 유의적인 추가 밴드는 존재하지 않았다. 또한 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 FT-IR 스펙트럼은 모체분자(parent molecule), 특히 7.5 중량% 해양콜라겐의 특성을 나타내었으며, 유의한 추가적인 밴드는 존재하지 않았다.
- [315] 상기 결과로부터 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 FT-IR 스펙트럼 주성분은 주로 7.5 중량% 해양콜라겐임이 확인되었다.
- [316] 이와 유사하게 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체복합 하이드로겔 지지체의 FT-IR 스펙트럼은 모체분자(parent molecule)로 10 중량% 해양콜라겐의 특성을 나타내었으며, 유의한 추가적인 밴드는 존재하지 않았다. 이 또한 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 FT-IR 스펙트럼은 주로 그 주성분인 10 중량% 해양콜라겐을 나타내는 것이다.
- [317] 상기 결과들로부터 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에는 새로운 화학적 가교(chemical cross-links)가 형성되지 않으며, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 화학적 가교(chemical cross-links)는 형성되지 않더라도 구성 분자의 물리적 특성에 따른 수소결합 또는 다른 상호작용과 같은 물리적인 결합으로 인하여 겔화가

일어나는 것을 확인하였다.

- [318] 이는 분자에 존재하는 프로톤공여체(proton donor)와 프로톤수용체(proton acceptor) 사이에 수소결합이 형성되기 때문으로, 도 61과 같이 해양콜라겐과 아가로스 그리고 해양콜라겐과 알지네이트 사이의 상호작용은 수소결합(hydrogen bond)에 의해 형성될 수 있으며, 이때 콜라겐에 존재하는 OH, -NH₂, 및 C=O기가 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 무게를 측정하고 37°C에서 인산염완충생리식염수(phosphate buffered saline, 이하 “PBS”)와 증류수에 각각 담근 후 시간 간격을 두고 무게를 측정하여 함수율을 구하였다. 무게 측정은 실온에서 진행되었으며 건져 올렸을 때 흘러내리는 용액은 제거하고 측정하였다. 함수율은 다음 식으로 계산하였다.

- [319] 4. 팽윤 거동 측정 (함수율; swelling kinetics)

- [320] 상기 실시예 14-1에서 제조된 7가지 실험 군의 하이드로겔 지지체를 1 mL 주사기에 100 μ L 씩 분주하여 4°C 에서 5-10분 동안 겔화시킨 후 40°C 에서 24시간 동안 건조시켰다. 건조된 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 무게를 측정하고 37°C에서 인산염완충생리식염수(phosphate buffered saline, 이하 “PBS”)와 증류수에 각각 담근 후 시간 간격을 두고 무게를 측정하여 함수율을 구하였다. 무게 측정은 실온에서 진행되었으며 건져 올렸을 때 흘러내리는 용액은 제거하고 측정하였다. 함수율은 다음 식으로 계산하였다.

- [321] 함수율(%) = [(팽윤된 겔의 무게-건조된 겔의 무게)/팽윤된 겔의 무게] $\times$ 100

- [322] 그 결과, 도 62와 같이 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 및 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 모두에서 PBS에서의 팽윤도가 증류수에서보다는 약간 지연되는 결과가 나타났다. 이는 PBS 보다 증류수에서 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체의 삼투압이 크게 작용하기 때문일 것으로 사료된다.

- [323] 또한 이들 지지체들은 상당히 빠른 팽윤성을 나타내었으며 2시간 이내에 평형상태(equilibrium state)에 도달하였다.

- [324]

- [325] <실시예 15> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 세포의 3차원 배양 특성 분석

- [326] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

- [327] 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 세포를 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하였다.

- [328] 2. 액틴염색 및 헤마톡실린-에오신 염색을 이용한 스페로이드(spheroid)의 형성능 분석

- [329] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용하여 7일간 3차원 배양된 사람 난소암세포 A2780의 전체 겔에서 F-actin 염색을 실시하기 위해 먼저 세포가 배양된 복합 하이드로겔 지지체를 PBS로 2회 세척 후 100%

methanol 고정액으로 -20°C에서 20분간 고정하였다. 그런 다음 PBS로 2회 세척 후 0.1% 트리톤-x(triton-x) 100 용액에 상온에서 5분 동안 침투시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 비특이적인 염색을 제거하기 위해 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 “BSA”) 용액으로 상온에서 1시간 동안 처리 후 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 액틴-검출용 Phalloidin-FITC (Promega, Madison, WI, USA)를 0.2% BSA용액에 1:50으로 희석하여 4°C에서 18시간 동안 반응시킨 다음 트리스완충생리식염수(tris-buffered saline, 이하 “TBS”)로 3회 세척하고 덮개유리(cover glass) 위에 복합 하이드로겔 지지체를 올려놓고 세포의 핵 염색을 위한 DAPI (Vector Lab, Inc. Burlingame, CA, USA) 용액으로 대조 염색하여 봉입한 후, 형광현미경으로 분석하였다.

- [330] 또한 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용하여 7일간 3차원 배양된 사람 난소암세포(A2780)에 대한 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin; H-E) 염색을 실시하였다. 먼저, 세포가 배양된 복합 하이드로겔 지지체를 PBS로 1회 세척하고 100% 메탄올 고정액으로 -20°C에서 20분간 고정하였다. 복합 하이드로겔 지지체를 헤마톡실린에서 5-10분 동안 핵염색한 후 물로 세척한 후 에오신에서 5-7분 동안 세포질을 염색하였다. 그 후 100% 에탄올로 세척 후 복합 하이드로겔 지지체의 일부를 떼어내서 슬라이드에 올려놓고 덮개 유리(cover glass)를 덮어 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.
- [331] 그 결과, 도 63과 같이 광학현미경(a), 헤마톡실린-에오신 염색(b), DAPI(c) 및 F-actin 염색(d) 결과를 종합하여 볼 때 세포 스페로이드가 유사한 크기로 매우 규칙적으로 형성됨이 확인되었다. 따라서, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 매우 효과적인 세포 스페로이드를 유도하는 것을 확인하였다.
- [332] 또한 도 64와 같이 EL4 세포를 1, 3, 5일간 배양한 후 위상차현미경으로 관찰한 결과, 세포 스페로이드의 형성이 매우 규칙적이며, 배양기간이 증가할수록 세포 스페로이드가 효과적으로 유도됨을 확인할 수 있었다.
- [333] 상기 결과로부터 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 암세포의 미세 환경과 상호작용에 대한 기전을 연구하는데 매우 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [334] 3. 스페로이드 버딩(spheroid budding) 형성능 분석
- [335] 앞선 실험 결과의 세포 스페로이드 형성에 중요한 역할을 하는 스페로이드 버딩(spheroid budding) 현상을 분석하기 위해, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 A2780 및 R182 세포를 7일간 배양한 후 전체 하이드로겔에 헤마톡실린-에오신 염색을 수행하고 광학현미경으로 관찰하였다. 이와 동시에 염색하지 않은 세포를 위상차현미경으로도 관찰하였다.
- [336] 그 결과인 도 65와 같이 위상차현미경 관찰(a) 및 헤마톡실린-에오신 염색(b) 결과를 종합하여 분석한 결과, 스페로이드 버딩(spheroid budding) 현상이 매우

효과적으로 확인되었다. 따라서, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 스페로이드 버딩(spheroid budding) 현상 연구에도 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다.

[337] 4. 스페로이드내 약물확산(drug diffusion)능 분석

[338] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 환경에서 암세포에 도달하는 약물의 확산능력을 평가하기 위해, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 사람 난소암세포(A2780)의 3차원 배양모델을 통해 약물의 확산 정도를 측정하였다.

[339] 먼저, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 스페로이드가 형성될 때까지 세포를 배양한 후 항암제인 독소루비신(doxorubicin; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)을 $1\ \mu\text{M}$ 농도로 24시간 동안 처리하였다. PBS로 하이드로겔 지지체를 세척한 후 DAPI 용액으로 핵 염색을 하여 스페로이드 내에서 독소루비신(doxorubicin)의 분포를 공초점레이저현미경(FV1000-IX81, Olympus, Japan)으로 확인하였다.

[340] 그 결과, 도 66과 같이 독소루비신(doxorubicin)이 스페로이드내의 모든 지역에 있는 암세포에 잘 도달한다는 사실을 확인할 수 있었다.

[341] 상기 결과로부터 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양모델을 통해 항암제를 비롯한 다양한 약물의 감수성 검사를 위한 스크리닝 방법에 매우 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

[342]

[343] <실시에 16> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양을 통한 세포 성장능 분석

[344] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[345] 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐, 1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, A2780 세포를 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C 에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하였다. 또한 3차원 세포배양에 대한 대조군으로서 통상적인 2차원 세포배양도 실시하였다.

[346] 2. 세포성장능 측정(cell growth assay)

[347] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에 5×10^5 세포/겔의 사람 난소암세포인 A2780 세포를 배양하고 0, 1, 3, 5, 7일 후 세포의 스페로이드의 생성을 위상차현미경으로 관찰하였다. 스페로이드 크기는 5일 및 7일째 측정하였다. 또한 WST-1 시약을 2시간 동안 처리하여 미세플레이트리더를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율 성장률을 산정하였다.

[348] 그 결과, 도 67A 및 67B와 같이 배양 초기에는 2차원 환경에서 세포가 더 빠르게 증식하였으나, 배양 5일 이후에는 3차원 환경에서 더 빠르게 증식한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 도 67C와 같이 3차원 환경에서 5일군 보다

7일군에서 세포 스페로이드의 크기가 더 증가한 것을 확인할 수 있었다.

- [349] 상기 결과로부터 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 2차원 세포배양에 비해 생체에 더 유사한 3차원 세포배양 환경 조성에 적합한 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 본 발명에서 개발된 세포지지체를 통해 세포배양 연구에 적합한 모델을 구축에 이용할 수 있음이 확인되었다.

[350] 3. CFSE 염색 분석

- [351] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 세포 증식능을 확인하기 위해 CFSE 염색을 수행하였다. EL4 및 CREC 세포에 CellTracker™ Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 37°C에서 8분간 처리하여 염색한 후 PBS로 두 번 세척하였다. CFSE로 표지한 세포를 복합 하이드로겔 지지체에서 0, 1, 2, 3일간 배양 후 형광현미경을 이용하여 세포 증식능을 관찰하였다.

- [352] 그 결과, 도 68과 같이 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 배양된 세포들은 배양 시간이 경과함에 따라 CFSE 양성 반응을 보이는 세포의 수가 감소하는 것이 확인되었다. 따라서 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 배양할 경우 EL4 세포의 증식이 유도됨을 확인할 수 있었다.

- [353] 또한 EL4와 CREC 세포를 공동배양할 경우, EL4 세포 단독 배양보다 EL4 세포의 증식이 더 느린 것을 확인할 수 있었다.

- [354] 상기 결과로부터 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체가 CREC 및 EL4 세포가 증식하는데 적합한 3차원적 환경을 제공해줄 뿐만 아니라 세포의 증식을 연구하는데 매우 유용한 수단으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[355]

- [356] <실시예 17> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 세포의 3차원 배양을 통한 세포 생존능 분석

[357] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

- [358] 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 세포를 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하였다.

[359] 2. Live/Dead 염색 분석

- [360] 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 세포배양에서 본 발명의 하이드로겔 지지체가 세포 독성을 나타내는지 여부를 확인하기 위해, 상기 실시예 16-1의 방법으로 제조된 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 사람 난소암세포(A2780)를 7일 및 10일간 배양하였으며, EL4와 CREC 세포는 2주

동안 단독 배양 또는 공동배양 하였다. 그 후 복합 하이드로겔 지지체를 PBS로 1회 세척 후 2 μ L calcein AM 과 0.5 μ L EthD-1 (LIVE/DEAD Viability Kit, Molecular Probes)를 1 mL PBS에 희석하여 30분간 어두운 곳에서 염색하여 공초점레이저현미경(FV1000-IX81, Olympus, Japan)으로 분석하였다.

[361] 그 결과, 도 69와 같이 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 배양된 사람 난소암세포의 생존률이 매우 높게 나타났다. 또한 도 70을 참고하면, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 배양된 EL4 및 CREC 세포의 생존률이 매우 높게 나타났다.

[362] 상기 결과로부터 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체는 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

[363]

[364] <실시예 18> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원 암세포 배양에 따른 악성화능 분석

[365] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[366] EL4 세포의 경우, 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 세포를 첨가한 후 혼합액을 1 mL 주사기에 80 μ L 씩 넣고 4°C에 5-10분간 겔화시킨 후 48-웰 플레이트에 넣어서 배양하였다. A2780 세포의 경우에도 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 세포를 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하였다. 또한 3차원 세포배양에 대한 대조군으로서 통상적인 2차원 세포배양도 실시하였다.

[367] 2. 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 분석(semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis, RT-PCR)

[368] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 EL4 세포를 2차원 및 3차원 환경에서 배양한 후 암세포의 악성도와 밀접한 관련이 있는 notch의 발현 정도를 RT-PCR 분석법으로 확인하였다.

[369] Notch의 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, 이하 “RT-PCR”) 분석법으로 관찰하기 위해, 복합 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 하이드로겔 지지체에 EL4 세포를 2주간 배양하였다.

[370] 그 후 1.5 mL QG buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA)와 2 mL RLT buffer (Qiagen)를 복합 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 하이드로겔 지지체와 혼합하여 실온에서 복합 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 하이드로겔 지지체를 용해시킨 후, 트리졸 시약(trizol reagent; Ambion, Invitrogen)을 사용하여 제조사 설명서에 따라 배양 세포로부터 총 RNA를 분리하였다.

[371] RT-PCR을 수행하기 위해, 0.5 μ g 올리고(dT)12-18 [oligo(dT)12-18] Oligo (dT)

프라이머(primer), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 40 mM DTT, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 혼합물(mixture), 10 units RNase 억제제(inhibitor) 및 200 unit MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사 중합효소(reverse transcriptase; Promega, Madison, WI, USA)를 포함하는 완충용액 25 μ L를 사용하여 2 μ g의 총 RNA로부터 단사슬(single-strand) cDNA를 합성하였다.

- [372] 마우스 Notch-1, Notch-2 및 GAPDH 유전자 증폭을 위한 PCR 반응은 표 1의 서열번호 25 및 26의 마우스 Notch-1 전방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머, 서열번호 27 및 28의 마우스 Notch-2 전방향 및 역방향 프라이머, 또는 서열번호 29 및 30의 마우스 GAPDH 전방향 및 역방향 프라이머 0.4 pmol과 1 μ L cDNA 샘플, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP 혼합액 및 5 unit Taq DNA 중합효소(polymerase; Promega)를 포함하는 완충용액 25 μ L를 사용하여 94°C에서 3분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 및 72°C에서 30초의 반응을 35 사이클(cycle)로 수행하였으며, GAPDH의 경우 반응은 30 사이클로 수행하였다.
- [373] 사람 스네일(snail), 비멘틴(vimentin), CD44 및 GAPDH 유전자 증폭을 위한 PCR 반응은 서열번호 31 및 32의 사람 스네일(snail) 전방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머, 서열번호 33 및 34의 사람 비멘틴(vimentin) 전방향 및 역방향 프라이머, 서열번호 35 및 36의 사람 CD44 전방향 및 역방향 프라이머, 서열번호 37 및 38의 사람 엔도테린-1(endothelin-1) 전방향 및 역방향 프라이머 또는 서열번호 39 및 40의 사람 GAPDH 전방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머 0.4 pmol과 1 μ L cDNA 샘플, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP 혼합액 및 5 unit Taq DNA 중합효소(polymerase; Promega)를 포함하는 완충용액 25 μ L를 사용하여 CD44, Snail 및 GAPDH는 94°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 57°C에서 30초 및 72°C에서 30초의 반응을 27사이클(cycle)로 수행하였다.
- [374] 비멘틴(vimentin)의 경우 94°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 및 72°C에서 30초의 반응을 27사이클(cycle)로 수행하였다. 마지막으로 엔도테린-1(endothelin-1)은 94°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94°C에서 30초, 65°C에서 30초 및 72°C에서 30초의 반응을 27사이클(cycle)로 수행하였다.
- [375] PCR 반응 후에는 2% 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)을 통해 생산된 반응생성물 시료를 EtBr (Ethidium bromide)로 염색한 후 자외선 조명기(UV light illumination)하에서 분석하였다.
- [376] 그 결과, 도 71과 같이 2차원 배양보다 3차원 환경에서 배양된 림프종세포는 Notch-1 및 Notch-2 모두의 발현이 증가되었다. 이는 2차원 환경과는 달리 3차원

환경에서 배양된 암세포들은 악성도가 증가한다는 것을 확인한 결과이다.

- [377] 상기 결과로부터 본 발명에 따른 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 암세포배양모델은 생체(인-비보) 환경을 효과적으로 모사할 수 있음이 확인되었다.
- [378] 또한 2차원 및 3차원 환경에서 배양된 사람 난소암세포주인 A2780 세포에서 암세포의 악성도 특히, 상피중간엽세포이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT)과 밀접한 관련이 있는 마커인 스네일(snail) 및 비멘틴(vimentin), 암줄기세포(cancer stem cell)의 중요한 마커인 CD44 그리고 종양의 성장과 전이에 핵심적인 역할을 하는 엔도테린-1(endothelin-1)의 발현을 확인하였다.
- [379] 그 결과, 도 72와 같이 2차원 환경보다 3차원 환경에서 배양된 암세포가 상기암의 악성화와 관련된 마커의 발현을 증가시키는 결과를 확인할 수 있었다.
- [380] 상기 결과로부터 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 기반의 3차원적 암세포배양은 암의 성장, 진행, 전이 및 악성화 등 암세포의 배양환경이 생체와 매우 유사한 특성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 기존의 2차원 세포배양 방법에서 제공할 수 없었던 인-비보 모사 환경을 제공해 준다는 점에서, 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 암세포의 발암, 성장, 전이 및 악성화 기작 연구뿐만 아니라 암세포에 대한 치료제의 개발에 있어서 유용하게 이용될 수 있다.
- [381] 표 5

[Table 5]

유전자	서열번호	프라이머 서열
mouse Notch-1	25	(정방향) 5'-CCCAGCAGGTGCAGCCACAG-3'
	26	(역방향) 5'-GGTGATCTGGGACGGCATGG-3'
mouse Notch-2	27	(정방향) 5'-ATGTGGACGAGTGTCTGTTGC-3'
	28	(역방향) 5'-GGAAGCATAGGCACAGTCATC-3'
mouse GAPDH	29	(정방향) 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3'
	30	(역방향) 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'
Human Snail	31	(정방향) 5'-AGACCCACTCAGATGTCAA-3'
	32	(역방향) 5'-CATAGTTAGTCACACCTCGT-3'
Human vimentin	33	(정방향) 5'-GAGGAGATGCGGGAGCTGCG -3'
	34	(역방향) 5'-CTGCCCTGCGTGACGTACGT-3'
Human CD44	35	(정방향) 5'-CTCCAGTGAAAGGAGCAGCA-3'
	36	(역방향) 5'-AGCAGGGATTCTGTCTGTGC-3'
Human endothelin-1	37	(정방향) 5'-TGCTCCTGCTCTTCCCTGATGGATAAAGAGT GTGTC-3'
	38	(역방향) 5'-GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT-3'
Human GAPDH	39	(정방향) 5'-TGGAGAAACCTGCCAAGTATG -3'
	40	(역방향) 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'

[382] <실시예 19> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원 배양된 암세포에 대한 항암제 감수성 측정 : 인-비보 모사 항암제 감수성 측정 모델로서의 적합성 분석

[383] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[384] EL4 세포의 경우, 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, 세포를 첨가한 후 혼합액을 1 mL 주사기에 80 μ L 씩 넣고 4°C 에 5-10분간 겔화시킨 후 48-웰 플레이트에 넣어서 배양하였다. A2780 세포의 경우에도 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 0.125 중량% 아가로스-7.5 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며,

세포를 첨가한 후 96-웰 플레이트에 넣어서 4°C에 5-10분 동안 겔화시킨 후 배지를 넣고 배양하였다. 또한 3차원 세포배양에 대한 대조군으로서 통상적인 2차원 세포배양도 실시하였다.

[385] 2. 세포성장능 측정(cell growth assay)

[386] 항암제에 대한 감수성시험을 실시하기 위해, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 EL4 및 사람 난소암세포 A2780를 2차원 및 3차원 환경에서 배양한 후 항암제에 대한 효능 검사를 수행하였다.

[387] 2차원 배양조건에서 배양된 EL4 세포와 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원 배양된 EL4 세포에 대해서는 독소루비신(doxorubicin; 5927, cell signaling) 5 μ M 및 레스베라트롤(resveratrol) 100 μ M을 처리하였고, 사람 난소암세포 A2780에 대해서는 파클리탁셀(paclitaxel) 0.5 μ M 농도로 24시간 동안 처리한 다음 WST-1 시약을 처리하여 미세플레이트리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율 성장률을 산정하였다.

[388] 또한 2차원 배양조건에서 배양된 A2780과 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 7일간 3차원 배양된 A2780 세포에 파클리탁셀(paclitaxel) 10 및 20 μ M과 커큐민(curcumin) 30 및 50 μ M을 2일간 처리하고 대조군에는 실험군과 동일 농도의 DMSO를 처리하였다. 그 후 WST-1 시약을 처리하여 미세플레이트리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율 성장률을 산정하였다.

[389] 그 결과, 도 73A와 같이 마우스 림프종세포인 EL4 세포에 독소루비신(doxorubicin)을 5 μ M 농도로 처리한 경우, 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 58.6% ($P < 0.001$) 생존율을 나타내었으며, 3차원 환경에서는 대조군에 비해 71.4% ($P < 0.01$)의 세포생존율이 나타났다. 또한 도 73B와 같이 레스베라트롤(resveratrol)을 100 μ M 농도로 처리한 경우, 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 50.2% ($P < 0.001$) 생존율을 나타냈으며, 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 93.5%로 증가된 세포생존율이 나타났다.

[390] 또한 도 73C와 같이 사람 난소암세포 A2780에 파클리탁셀(paclitaxel)을 0.5 μ M 농도로 처리한 경우, 2차원 환경에서는 대조군과 비교하여 60.9% ($P < 0.001$) 생존율이 나타났으며 3차원 환경에서는 대조군과 비교하여 94.2%의 세포생존율을 나타냈다.

[391] 상기 결과로부터 본 발명의 따른 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델은 항암제에 대한 약물내성 기전 연구와 항암제에 감수성을 검사하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다.

[392] 또한 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 A2780세포를 2차원 및 3차원 환경에서 배양한 후 난소암에 대한 항암제인 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 커큐민(curcumin) 효능 검사를 수행한 결과, 도 74와

같이 2차원 환경에서는 파클리탁셀(paclitaxel) 10 μ M을 처리한 경우 12.3% ($P<0.01$) 생존율을 나타내었으며, 20 μ M의 경우 6.4% ($P<0.001$)의 세포생존율이 나타난 반면, 3차원 환경에서 파클리탁셀(paclitaxel) 10 μ M을 처리한 경우 40.2% ($P<0.001$)의 생존율이 나타났으며, 20 μ M의 경우 51.4% ($P<0.05$)의 세포생존율을 나타내었다.

[393] 또한 커큐민(curcumin)을 30 및 50 μ M의 농도로 처리하였을 때, 2차원 환경에서는 30 μ M의 경우 42.5% ($P<0.001$) 세포생존율이 나타났으며, 50 μ M의 경우 36.7% ($P<0.001$)의 세포생존율을 나타내었고, 3차원 환경에서는 30 μ M의 경우 95.0% 그리고 50 μ M의 경우 82.4%의 세포생존율을 나타내었다.

[394] 상기 결과로부터 2차원 환경보다 3차원 환경에서 항암제에 대한 약물내성을 효과적으로 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델이 항암제에 대한 약물내성 기전 연구 및 항암제에 감수성을 검사하는 방법으로 탁월한 것이 확인되었다.

[395] 3. 세포의 형태학적 특징 및 싸이토케라틴(cytokeratin) 염색

[396] 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 사람 난소암세포를 3차원 환경에서 배양한 후 상피세포에 특이적으로 발현되는 마커인 싸이토케라틴(cytokeratin)에 대한 항체로 면역염색을 수행하였다.

[397] 먼저, A2780 세포를 본 발명의 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서 3차원 배양 후, 통상적인 2차원 배양에서 사람 난소암세포에 대해 높은 살해효과를 가지는 것으로 잘 알려진 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel) 10 μ M 및 커큐민(curcumin) 30 μ M을 각각 2일간 처리하고 대조군에는 실험군과 동일 농도의 DMSO를 2일간 처리하였다. 그 후 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 PBS로 1회 세척 후 100% 메탄올(methanol) 고정액으로 -20°C에서 20분간 고정하였다. 비특이적인 염색을 제거하기 위해 1% BSA 용액으로 상온에서 1시간 동안 처리 후 1:50으로 희석한 판-싸이토케라틴(pan-cytokeratin) 항체(Sigma-Aldrich)로 18시간 동안 4°C에서 염색하였다. 그 후 PBS로 1회 세척 후 DAPI 용액으로 실온에서 30분간 핵염색을 수행하여 형광현미경으로 관찰하였다. 이와 동시에 염색하지 않은 세포를 위상차현미경으로도 관찰하였다.

[398] 그 결과, 도 75와 같이 2차원 환경과는 다르게 3차원 환경에서 배양된 세포들은 항암제에 대한 약물내성을 효과적으로 나타내는 결과를 확인할 수 있었다.

[399] 상기 결과로부터 본 발명에 따른 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 암세포 배양 모델은 항암제에 대한 약물내성 기전 연구와 항암제에 감수성을 검사하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다.

[400]

[401] <실시예 20> 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체에서

3차원 배양된 암세포에 대한 암줄기세포 형성능 및 암세포의 분화능 측정 :
인-비보 모사 암줄기세포유도/성장 및 암세포분화 모델로서의 적합성 분석

[402] 1. 하이드로겔 세포배양 지지체를 이용한 3차원 세포배양

[403] 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 최종농도로 0.125 중량% 아가로스- 10 중량% 해양콜라겐-1 중량% 알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 제조하였으며, EL4 세포를 첨가한 후 혼합액을 1mL 주사기에 80 μ L 씩 넣고 4°C에서 5-10분간 겔화시킨 후 48-웰 플레이트에 넣고 배양하였다.

[404] 2. 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용한 세포표면분자 발현 분석

[405] 3차원 환경(3D)인 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체와 2차원 환경(2D)인 96-웰 플레이트에 EL4 세포를 10일 동안 배양한 후 유세포분석기(FACS canto II, flow cytometer (BD Biosciences))로 분석하였다.

[406] 하이드로겔 지지체에서 배양된 세포를 분리하기 위하여 40 μ m 셀 스트레이너(cell strainer, SPL Life Sciences)를 이용하였고, 2D 세포는 통상적인 방식을 이용하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GibcoLife Technologies)로 2번 세척하고 FACS 버퍼(BSA 0.1%, sodium azide 0.1%, HBSS 500 mL) 3 mL에 재부유하여 4°C에서 1500 rpm으로 4분 동안 원심분리를 시행하였다. 상층액을 제거한 후 세포를 재부유한 다음, 항체와의 비특이적 결합을 피하기 위해 세포를 항(anti)-Fc γ RII/III(2.4G2, hybridoma supernatant)와 함께 전배양한 후, 2% FBS 함유 HBSS 내에서 목적하는 형광-표지된 일차 항-마우스 단일클론 항체(primary anti-mouse monoclonal antibody), 즉 FITC 혹은 PE가 결합된 항-CD4 항체(FITC-CD4 혹은 PE-CD4), APC-결합 항-CD8 항체(APC-CD8), PE-CY7-결합 항-c-kit 항체(PE-CY7-c-kit) 및 APC-결합 항-sca-1 항체(APC-sca-1)를 이용하여 5-10 μ g/mL 농도로 얼음 냉각 하에 30분 동안 반응시켰다.

[407] 배경 형광(background fluorescence)은 이소타입-유사 음성반응 항체(isotype-matched nonreactive antibodies)와 반응시킨 세포를 통해 결정하였다.

[408] 그 다음 세포를 HBSS로 두 번 세척한 후, FACS 버퍼 500 μ L에 세포를 재부유시킨 후 유세포분석기를 이용하여 세포표면분자의 발현을 Dot-plot법으로 분석하였다. 얻어진 결과는 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 통해 분석하였다.

[409] 그 결과, 도 76과 같이 2D 환경하에서 10일간 배양한 EL4 세포들 중 암줄기세포(cancer stem cell)에 해당하는 c-kit⁺sca-1⁺ 세포의 비율은 4.6% 이었으나, 3D 환경하에서 10일간 배양한 EL4 세포들 c-kit⁺sca-1⁺ 암줄기세포의 비율은 31.9%로 매우 증가하였다. 이는 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체 기반의 3차원적 암세포배양이 암줄기세포의 형성 및 성장과 같은 암세포의 배양환경이 생체와 매우 유사한 특성을 나타내는 것을 확인한 결과이다.

[410] 따라서, 기존의 2차원 세포배양 방법에서 제공할 수 없었던 인-비보 모사

환경을 제공해 준다는 점에서 본 발명에 따른 아가로스-해양콜라겐-알지네이트 복합 하이드로겔 지지체를 이용한 3차원 세포배양 방법은 암줄기세포 및 항암제내성기전 연구와 고효율성 항암치료법 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[411]

[412] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

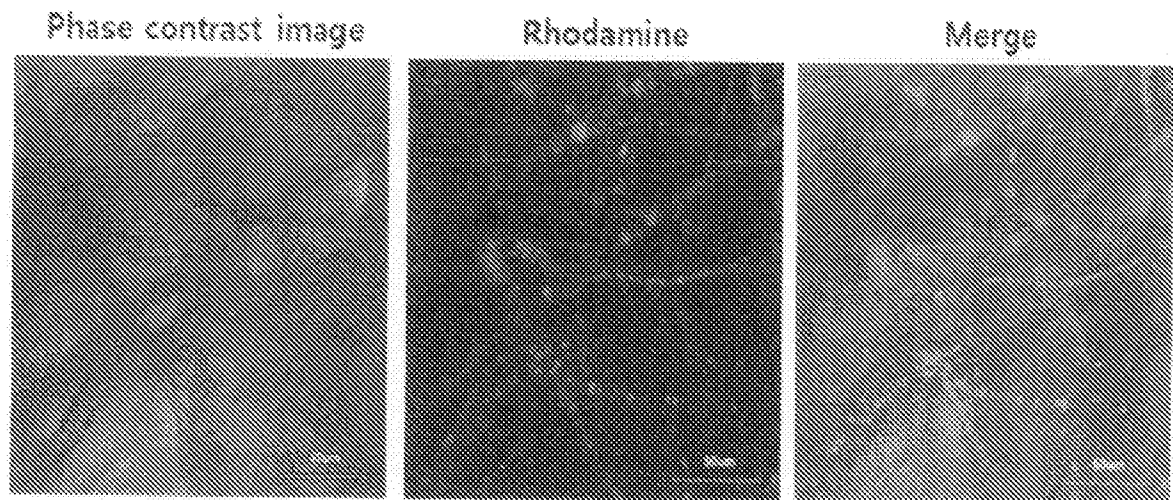
청구범위

- [청구항 1] 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계;
피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계;
상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 상기 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계; 및
상기 제 3단계에서 제조한 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 제 1단계의 합성고분자 용액은 유기용매 100 중량부에 대하여 합성고분자를 8 내지 10 중량부로 용해시키는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 3] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 합성고분자는 폴리카프로락톤[poly(ϵ -caprolactone); PCL], 폴리락트산[(poly)lactic acid; PLA], 폴리글리콜산[(poly)glycolic acid; PGA], 폴리하이드록시발레레이트[poly(hydroxy valerate); PHV], 폴리(락트산-co-글리콜산)[poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA], 폴리하이드록시부티레이트(poly-hydroxy butyrate; PHB), 폴리하이드록시발레레이트[poly(hydroxy butyrate-co-valerate); PHBV], 폴리안하이드리드(polyanhydride), 폴리오르토에스터(polyorthoester), 폴리비닐알콜[poly(vinyl alcohol); PVA], 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리아크릴산(polyacrylic acid; PAA), 폴리-N-이소프로필아크릴아미드[poly(N-isopropylacrylamide)], 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르(polyester) 및 폴리에스테르-아미드(polyester-amide)/폴리에스테르-우레탄(polyester-urethane)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 4] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 유기용매는 클로로포름, 헥사플루오로이소프로판, 테트라히드로퓨란, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 제 2단계의 피쉬콜라겐 수용액은 물 100 중량부에 대하여 피쉬콜라겐을 10 내지 70 중량부로 용해시키는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.

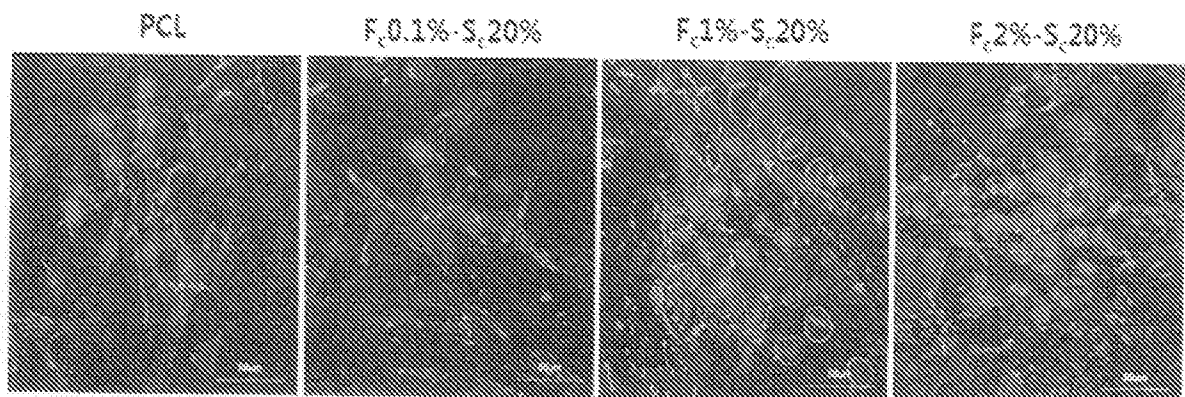
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 제 3단계의 혼합액은 혼합액 100 중량부에 대하여 합성고분자가 6.3 내지 8.5 중량부로 포함될 수 있도록 합성고분자 용액을 첨가하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 제 3단계의 혼합액은 혼합액 100 중량부에 대하여 피쉬콜라겐이 2 내지 20 중량부로 포함될 수 있도록 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 제 3단계의 혼합액은 혼합액 100 중량부에 대하여 물이 0.9 내지 10 중량부로 포함될 수 있도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 복합 나노섬유 지지체 제조방법.
- [청구항 9] 합성고분자를 유기용매에 용해시키는 제 1단계;
피쉬콜라겐을 물에 용해시켜 피쉬콜라겐 수용액을 제조하는 제 2단계;
상기 제 1단계에서 제조한 합성고분자 용액에 상기 제 2단계에서 제조한 피쉬콜라겐 수용액을 첨가하여 균질하게 혼합하는 제 3단계;
상기 제 3단계에서 제조한 혼합액을 전기방사하여 나노섬유 지지체를 제조하는 제 4단계; 및
상기 제 4단계에서 제조된 나노섬유 지지체에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 10] 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계;
상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및
상기 콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 25 내지 37 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 배양하는 단계;
상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 25 내지 37 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 세포의 탈리를 방지하는 단계; 및
상기 콜라겐이 첨가된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하고 4 내지 25 °C의 온도에서 5 내지 30 분 동안 정치시켜 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 12] 청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 콜라겐은 해양 생물 유래 콜라겐인 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 13] 청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 배양된 혼합물 100

- 중량부에 대하여 알지네이트를 0.5 내지 2 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 14] 청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 콜라겐을 1 내지 30 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 15] 청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 아가로스 0.1 내지 0.5 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 16] 청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 세포는 정상세포 및 암세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 암세포는 난소암, 유방암, 위암, 대장암, 직장암, 폐암, 간암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 자궁암, 방광암, 다형성교모아세포종, 피부암, 흑색종, 두경부암, 후두암, 수모세포종, 인후두암, 구아암, 타액선암, 식도암, 골육종, 혀암, 담도암, 신경아교종, 뼈암, 원인불명원발암으로 이루어진 군에서 선택된 고형암세포인 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 18] 청구항 16에 있어서, 상기 세포는 B세포림프종, T세포림프종, 백혈병 및 다발성골수종으로 이루어진 군에서 선택된 혈액암세포인 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.
- [청구항 19] 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계;
상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계;
상기 콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및
상기 3차원 배양 세포의 성장, 증식, 사멸, 분화 및 이동을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 활성 측정방법.
- [청구항 20] 알지네이트 용액과 세포를 혼합하여 배양하는 단계;
상기 배양된 혼합물에 콜라겐 용액을 첨가하여 세포의 탈리를 방지하는 단계;
상기 콜라겐이 포함된 혼합물에 아가로스 용액을 첨가하여 정치시키고 겔화시켜 세포를 3차원으로 배양하는 단계; 및
상기 3차원 배양 세포에 항암제를 첨가하여 세포 생존율을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 감수성의 측정방법.

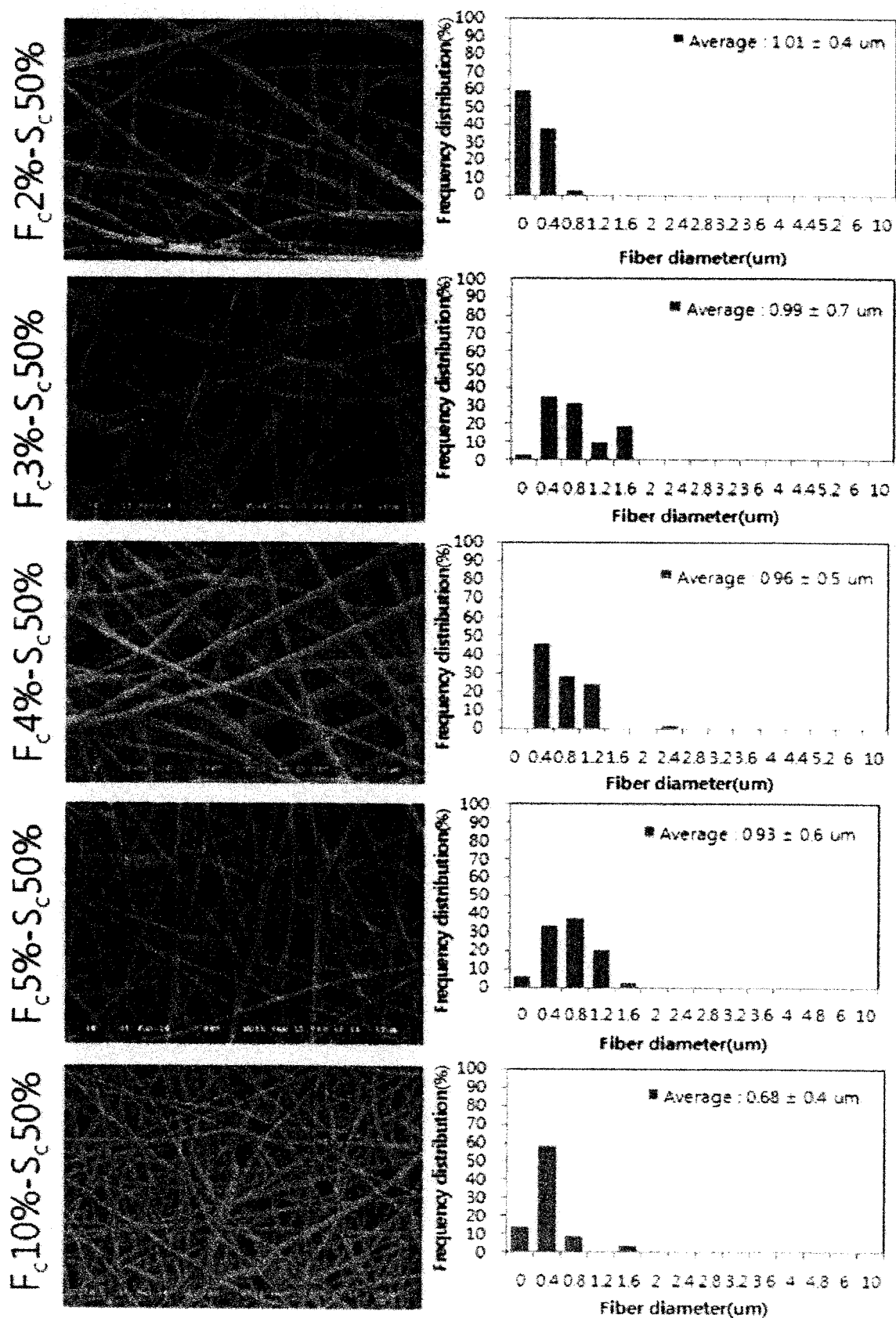
[Fig. 1]



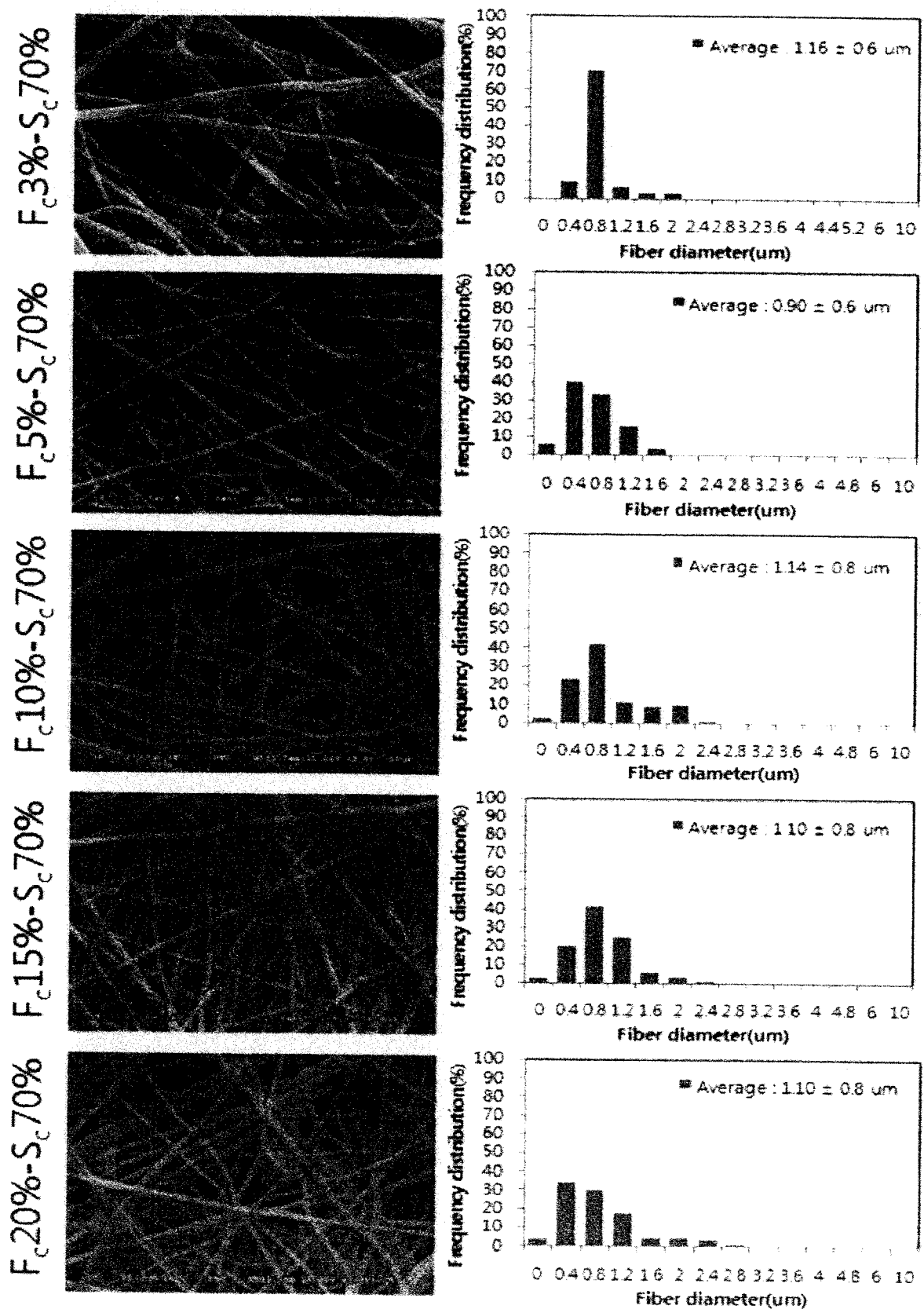
[Fig. 2]



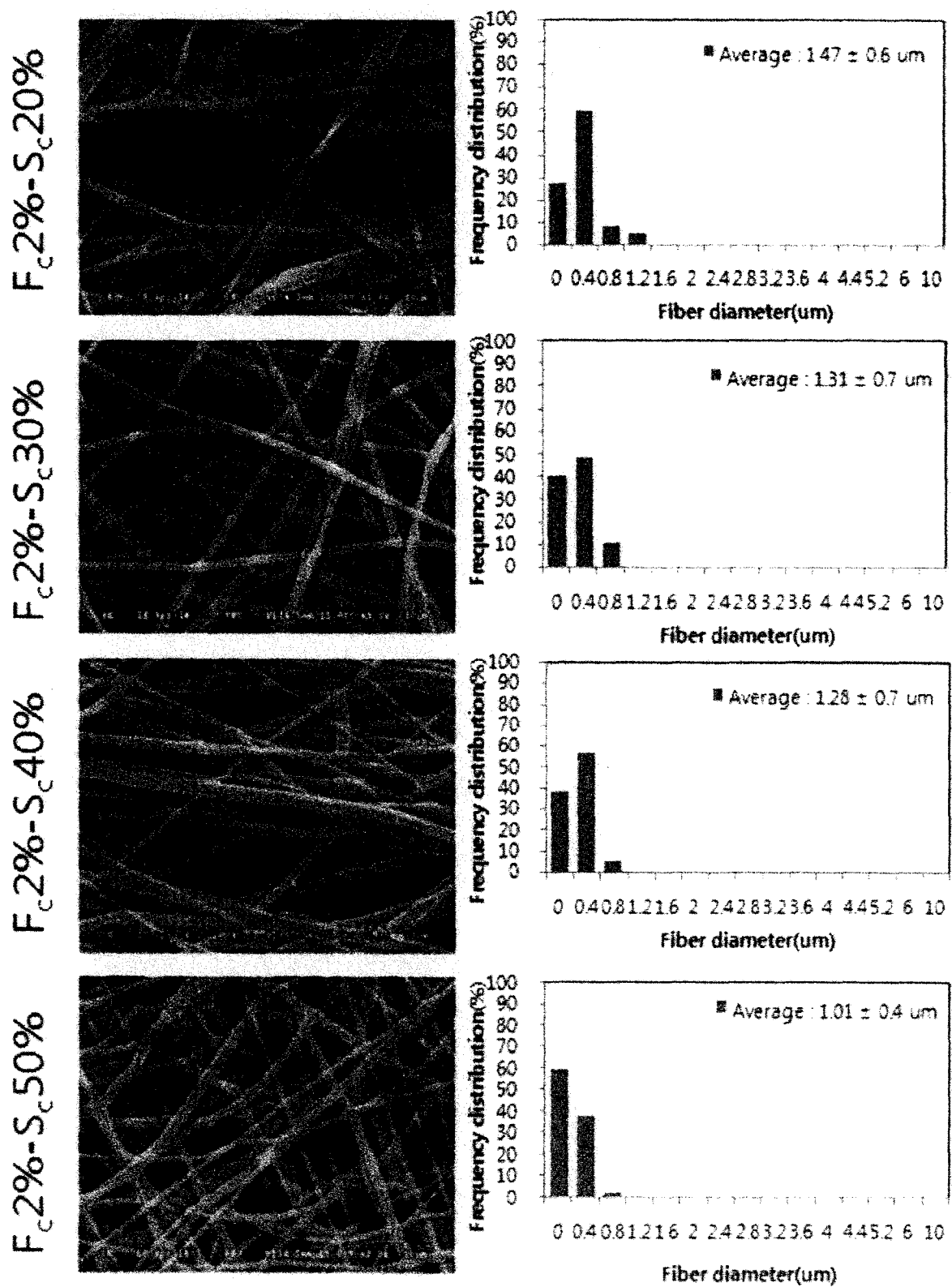
[Fig. 3]



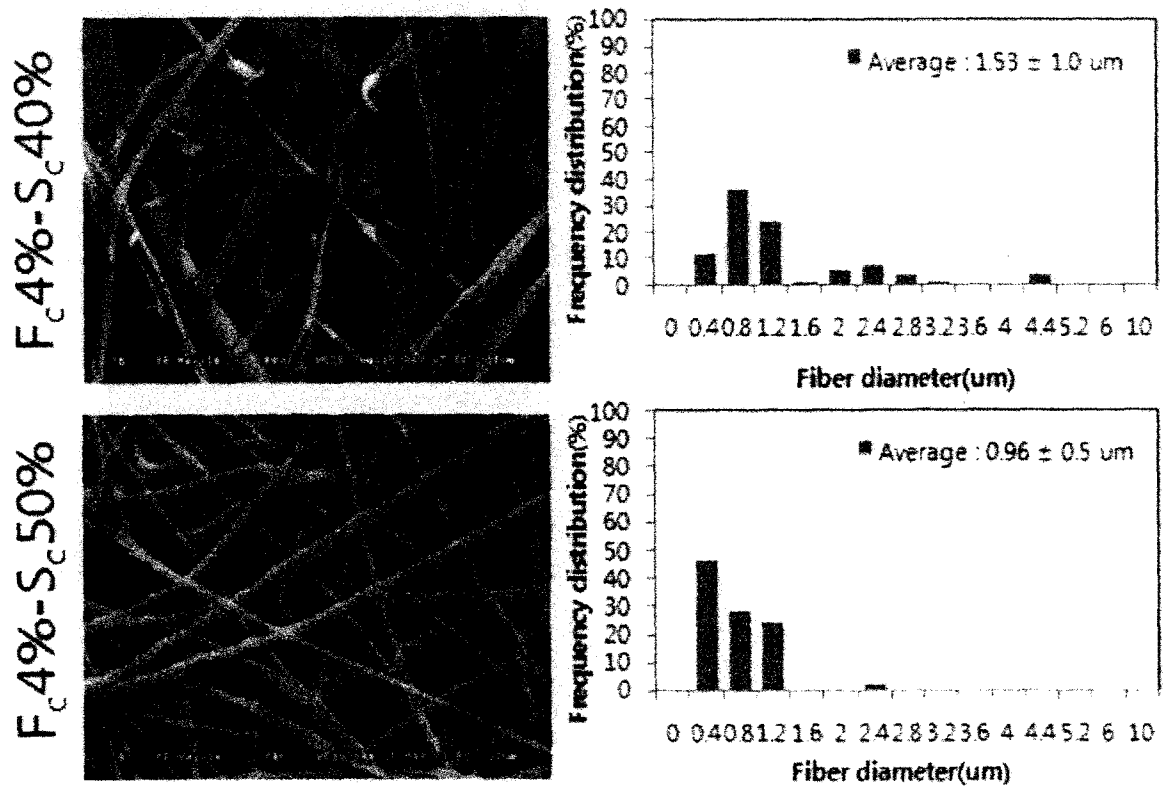
[Fig. 4]



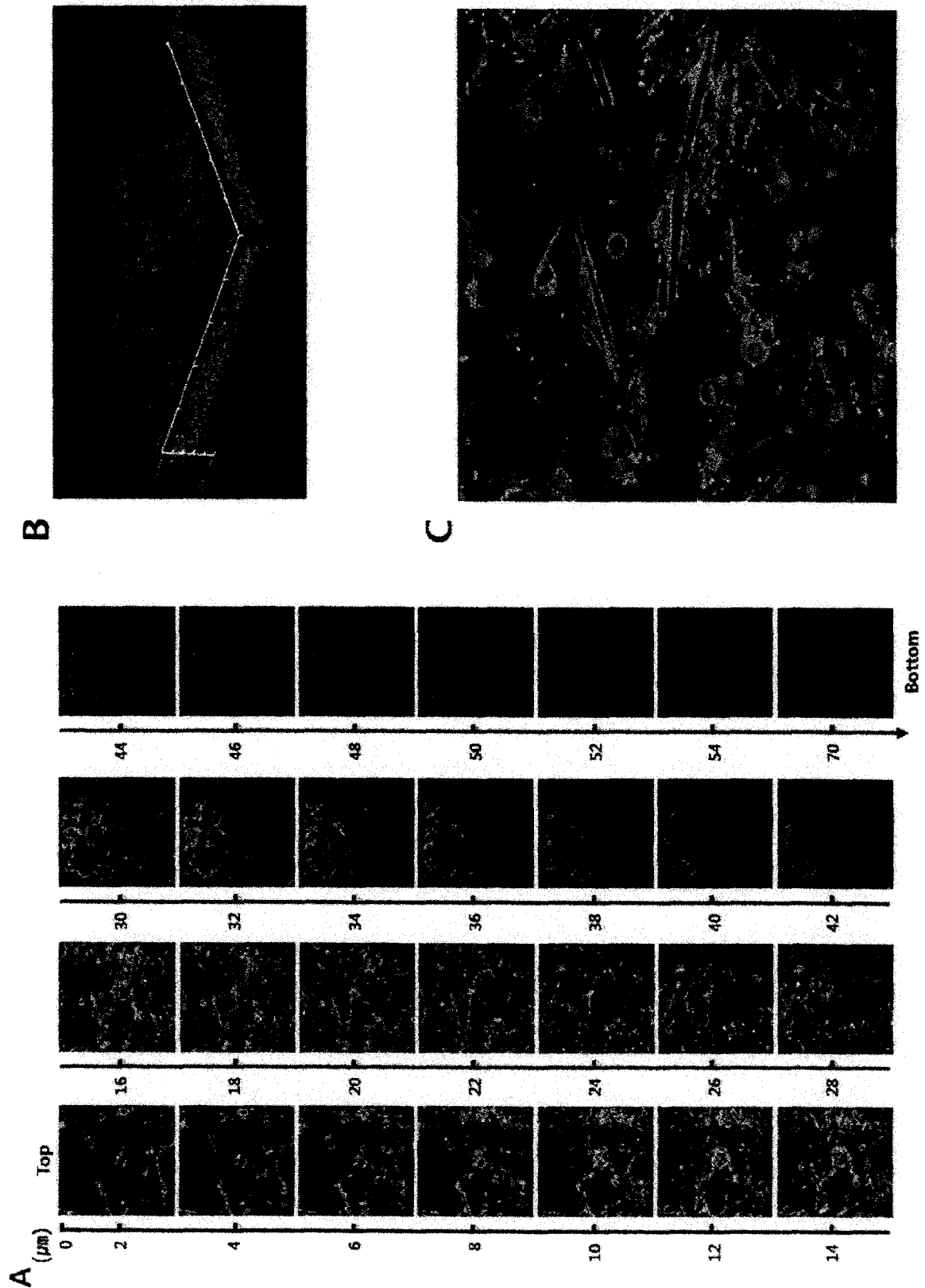
[Fig. 5]



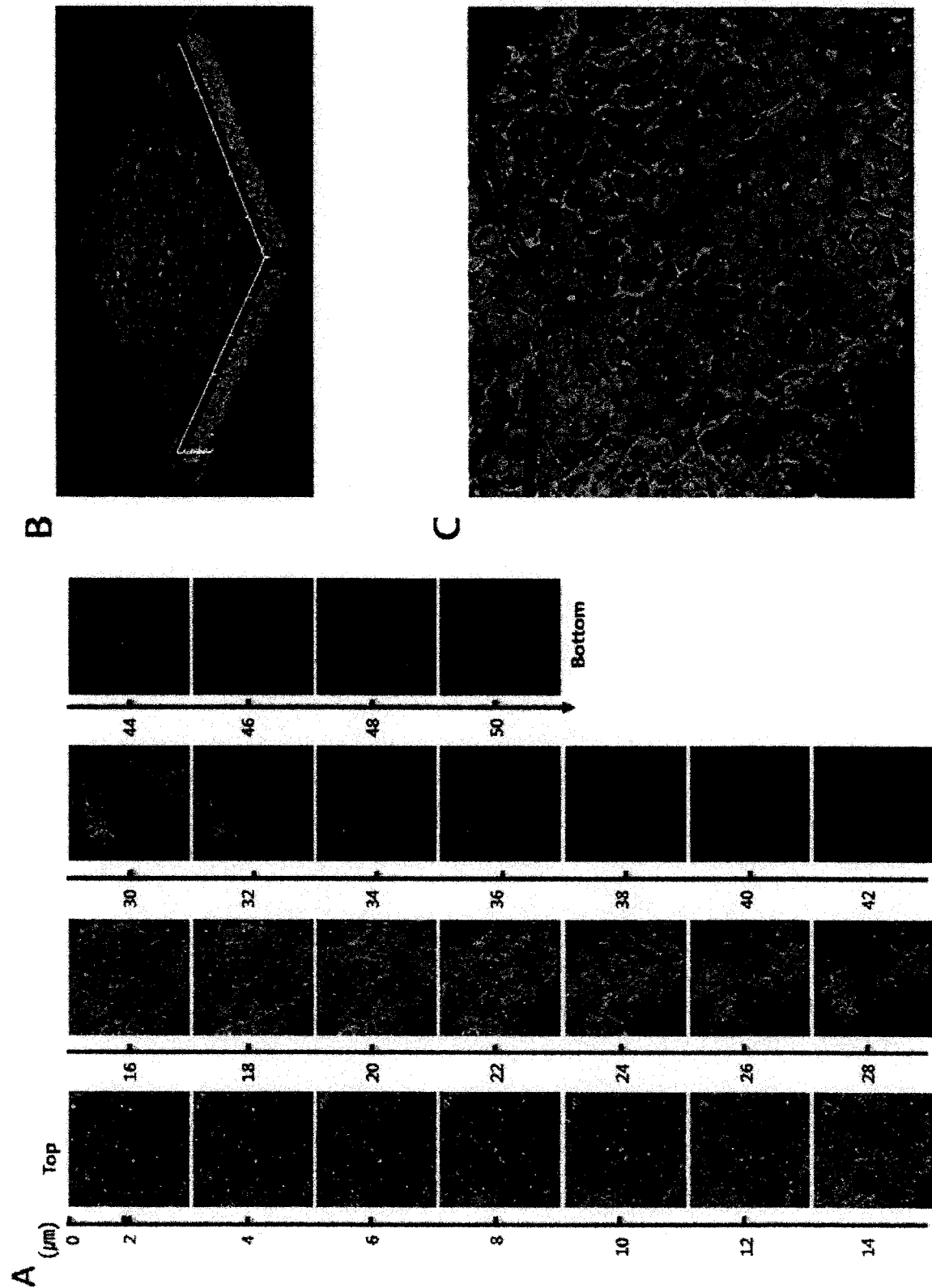
[Fig. 6]



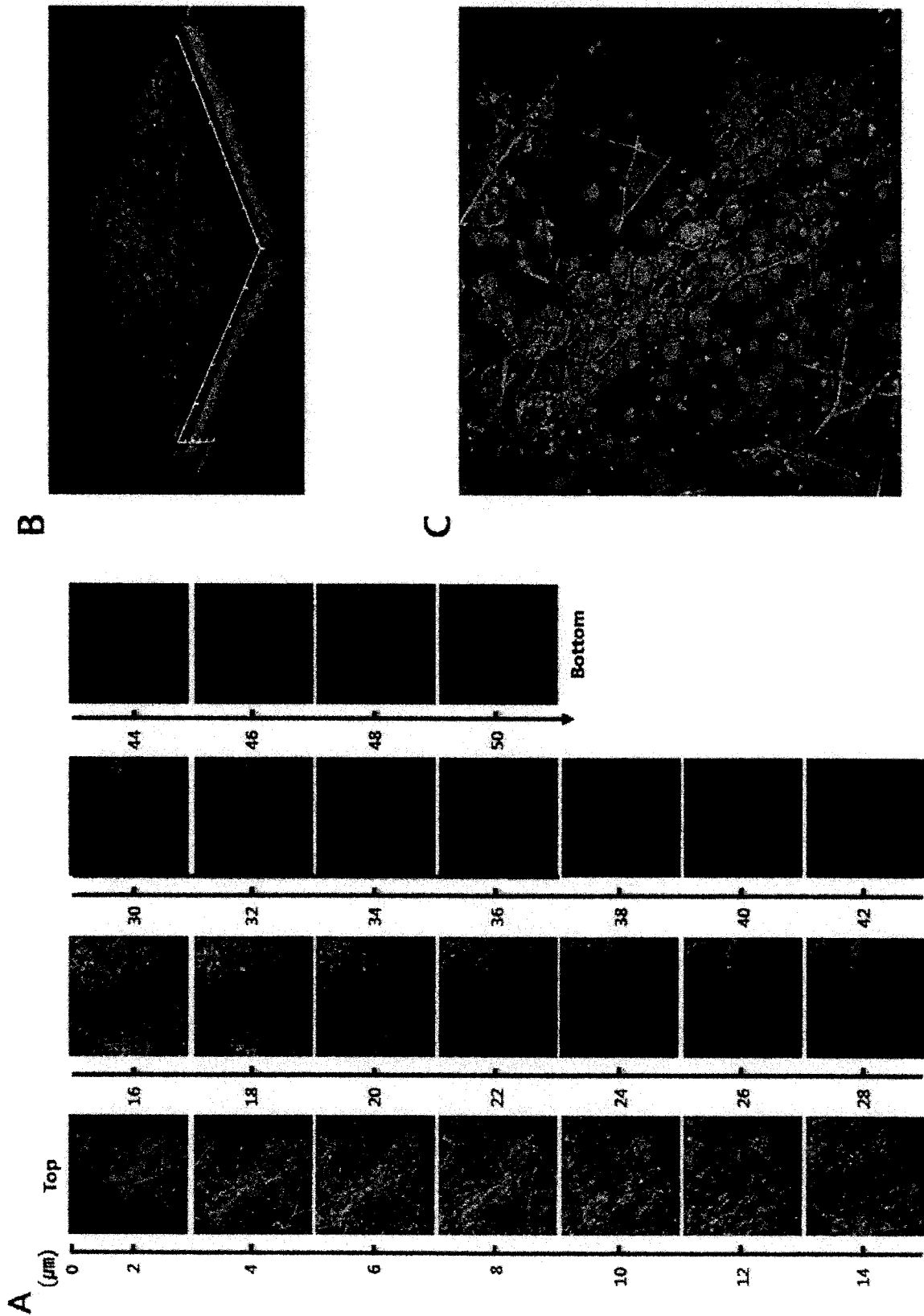
[Fig. 7]



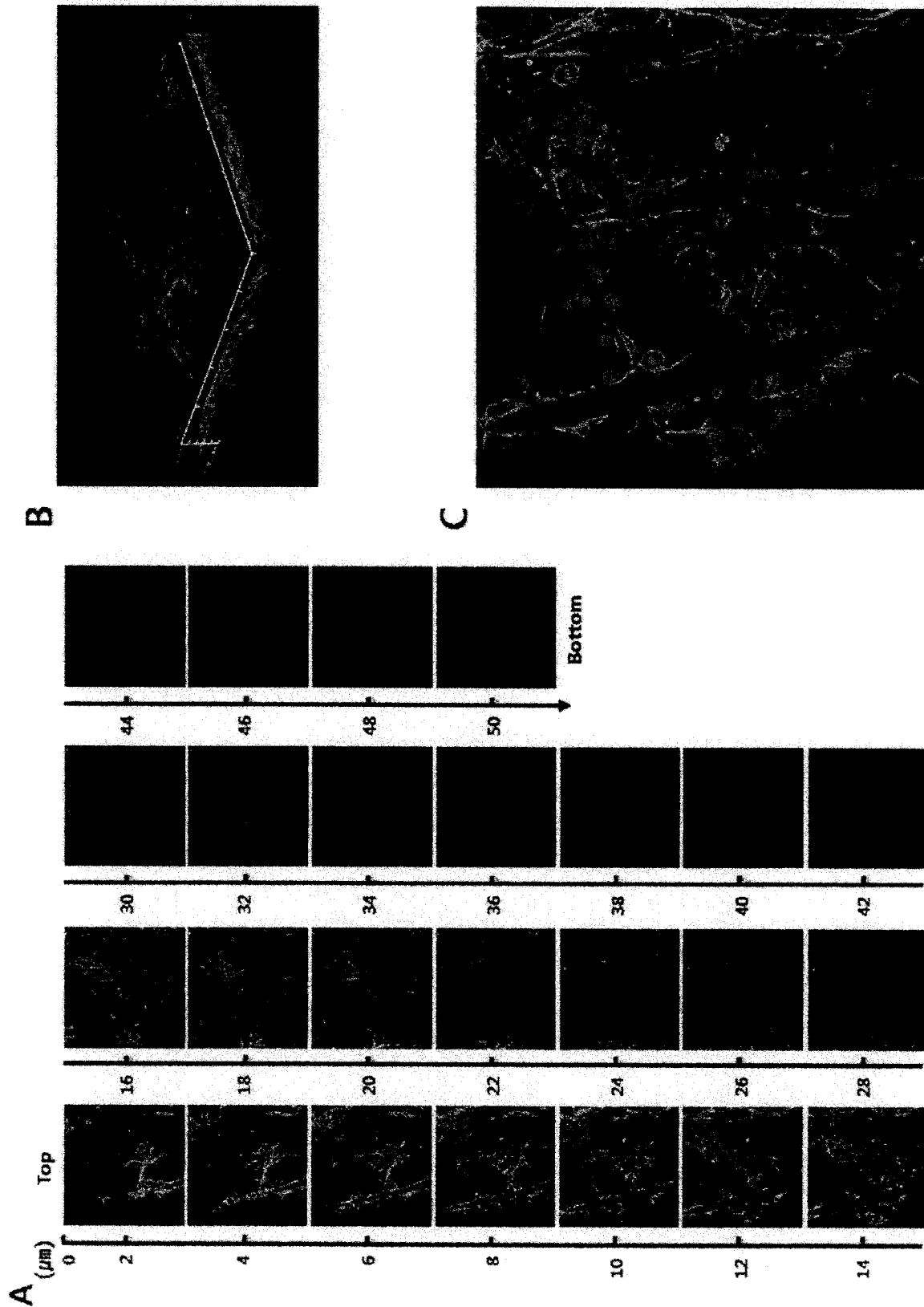
[Fig. 8]



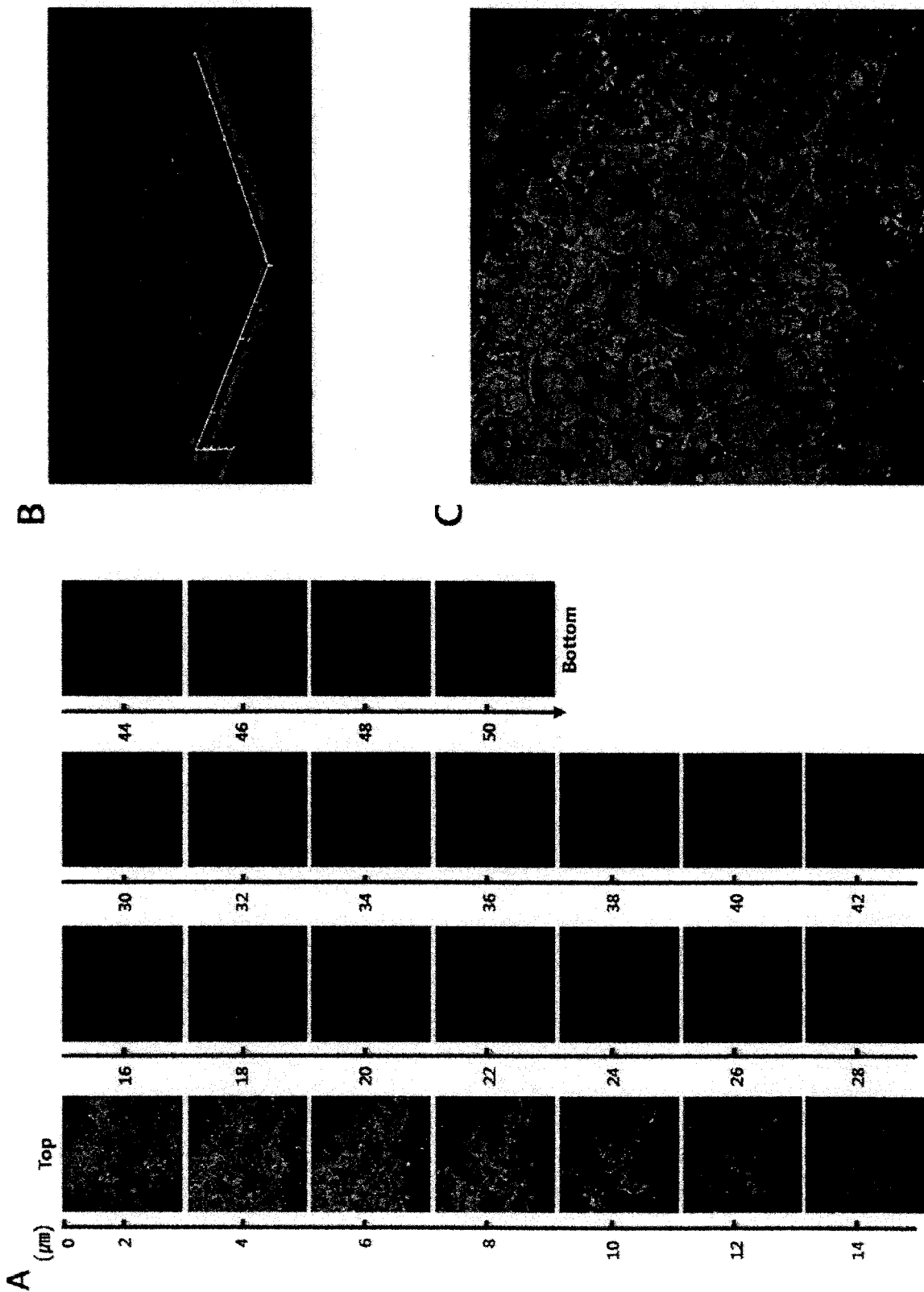
[Fig. 9]



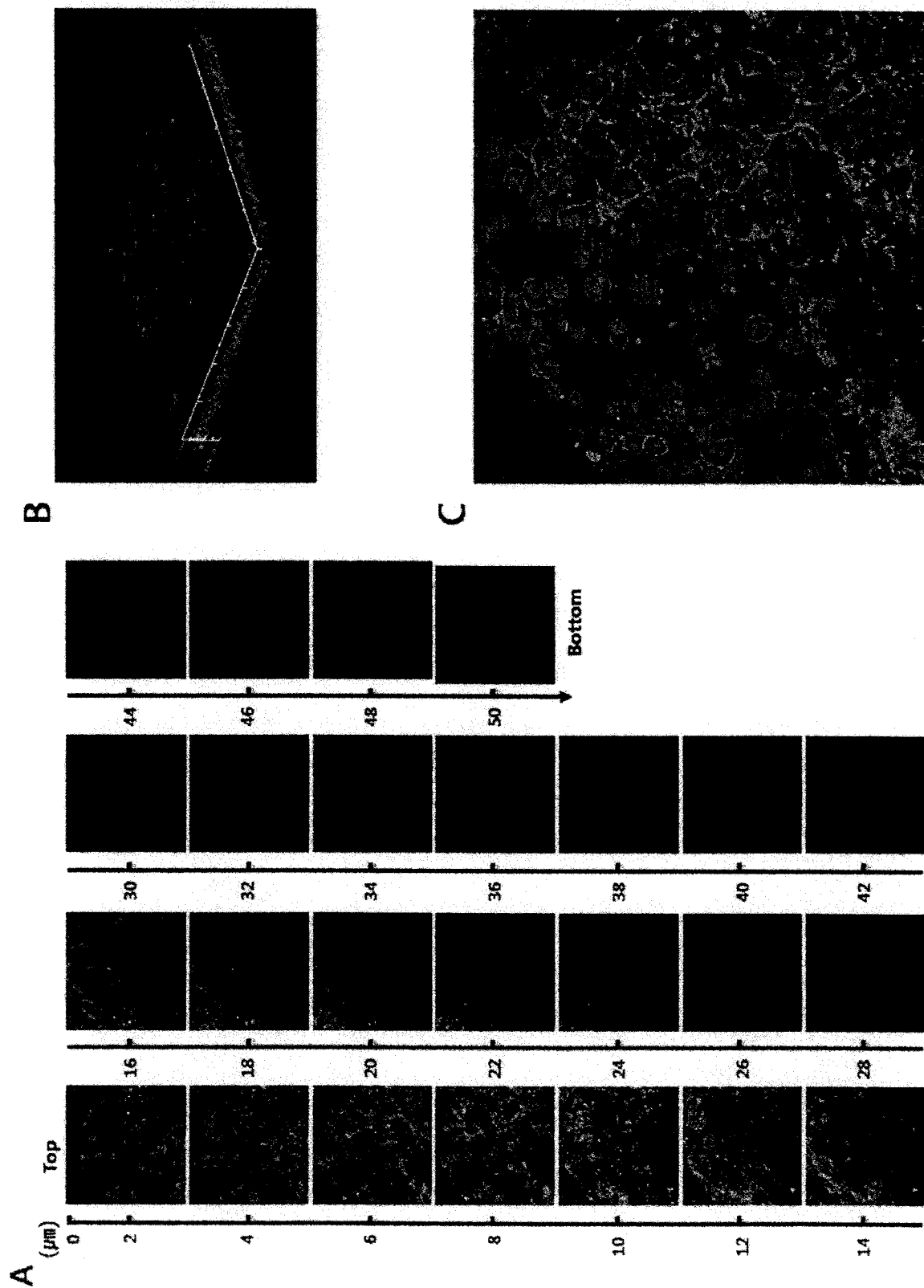
[Fig. 10]



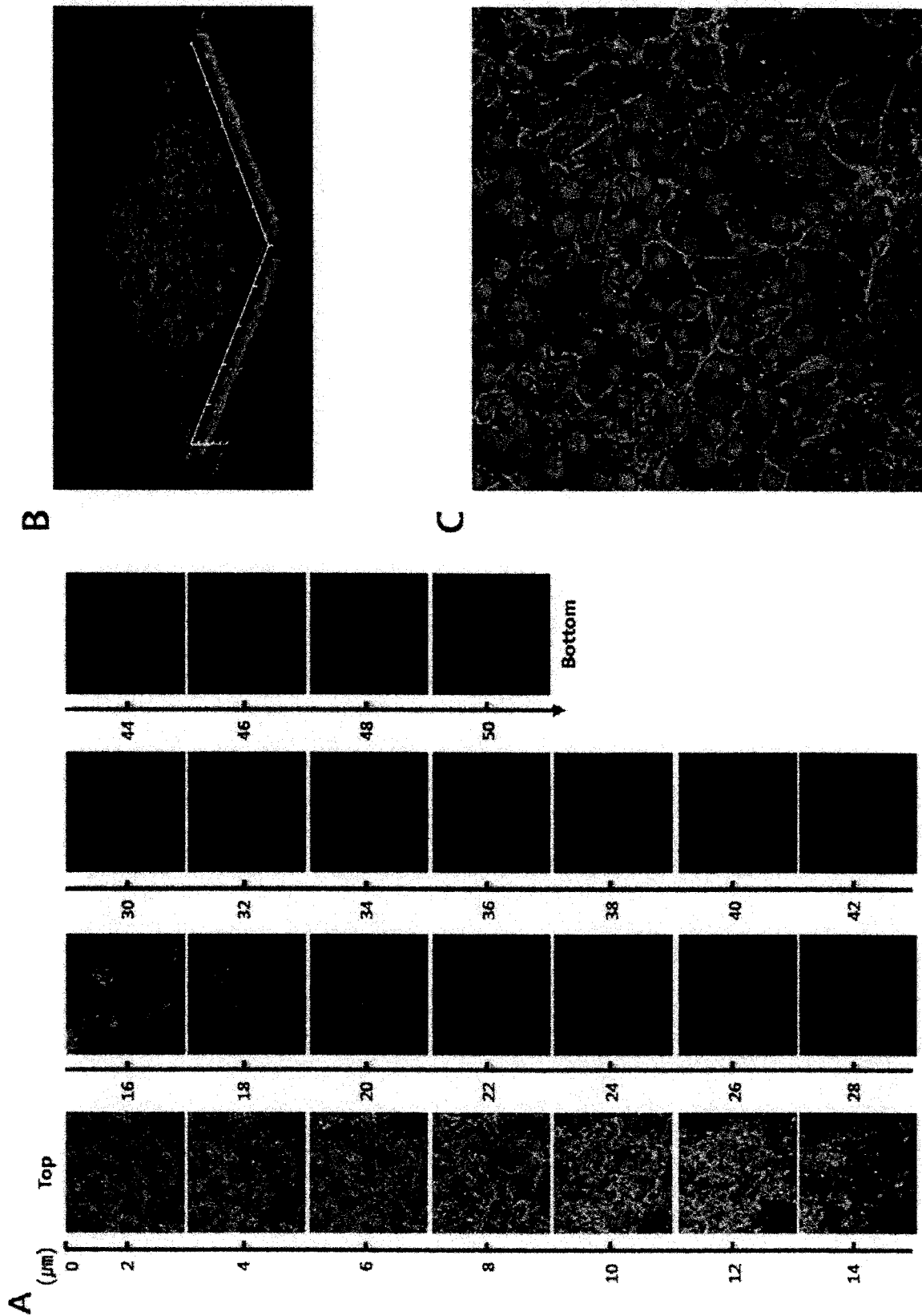
[Fig. 11]



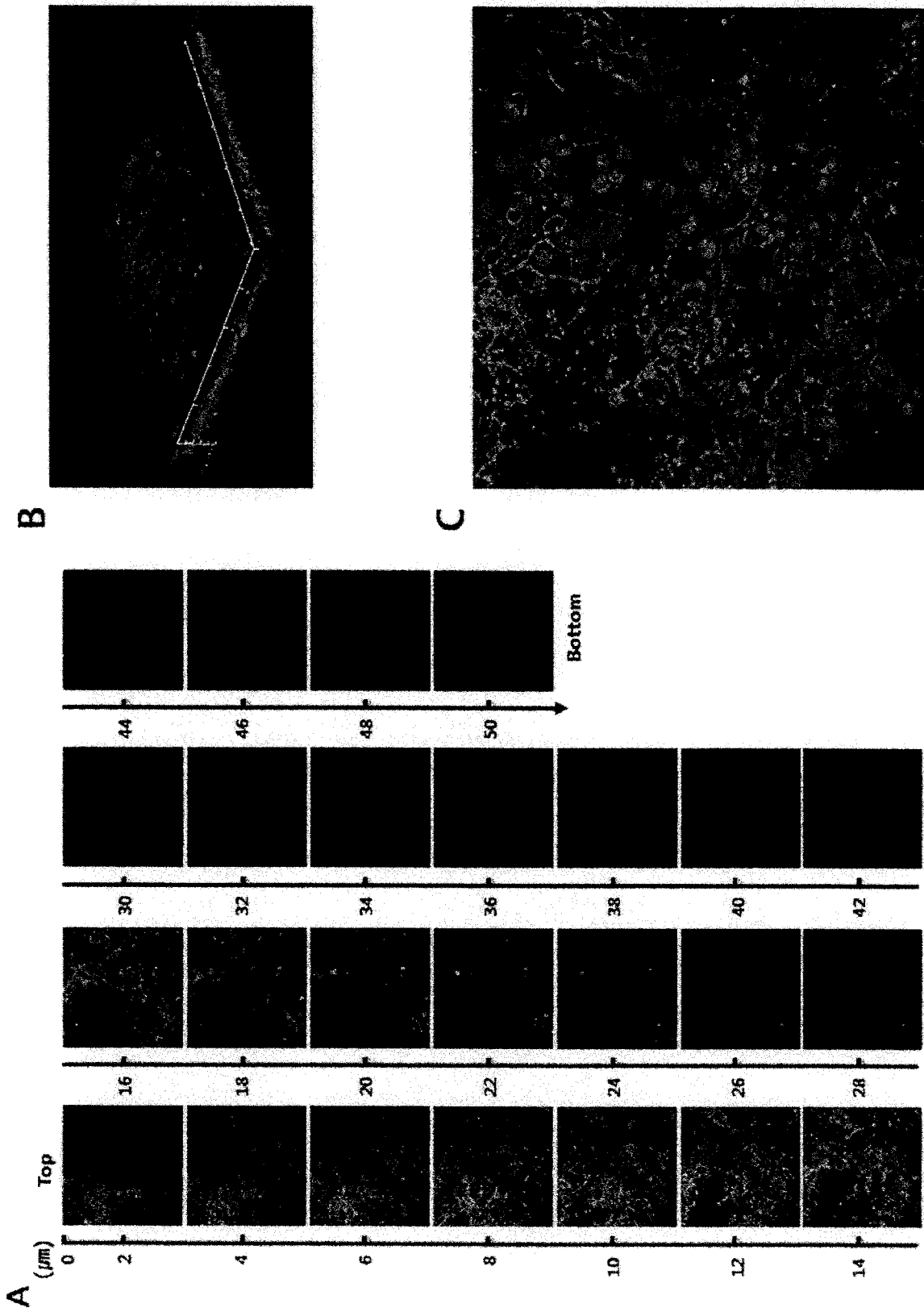
[Fig. 12]



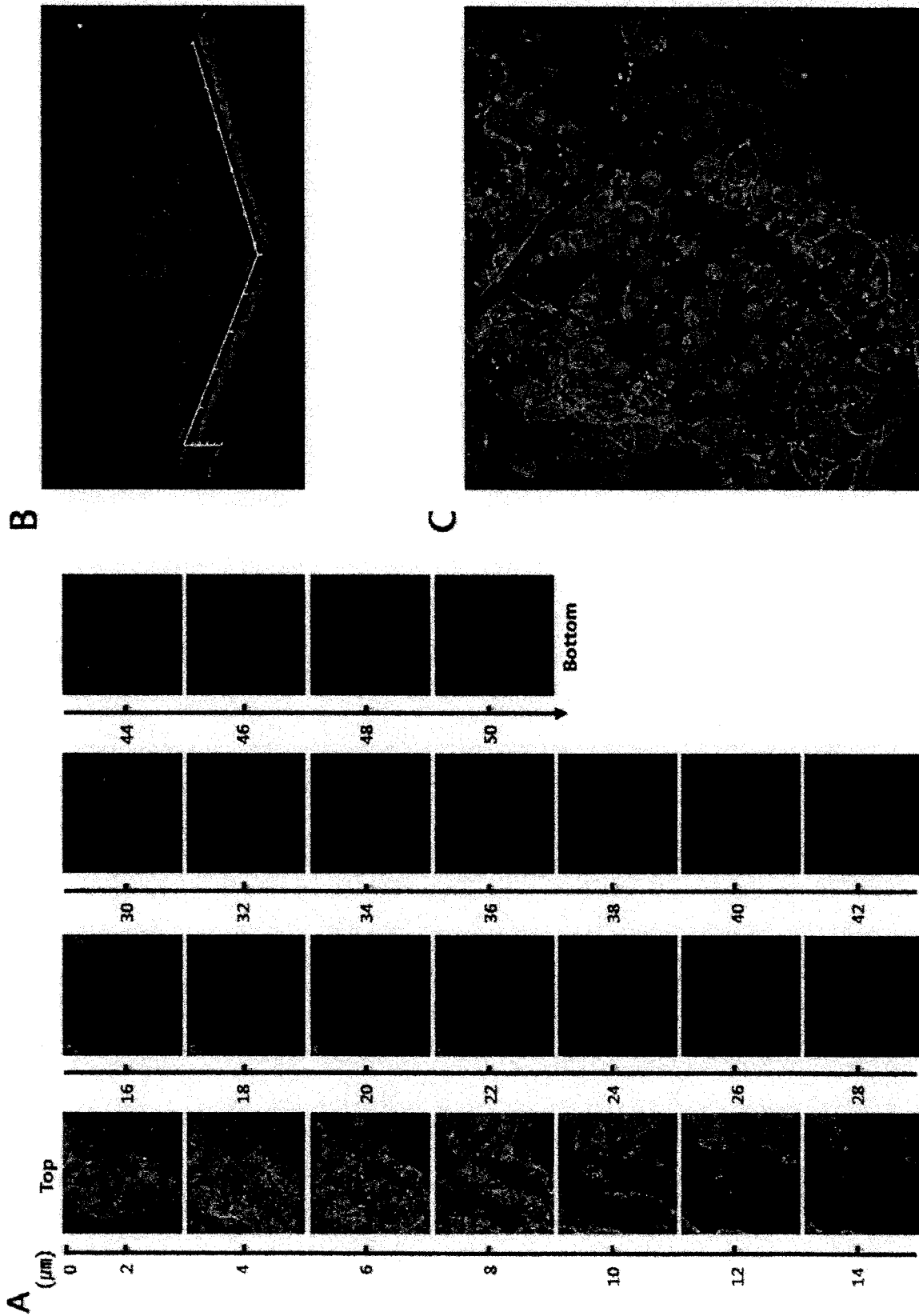
[Fig. 13]



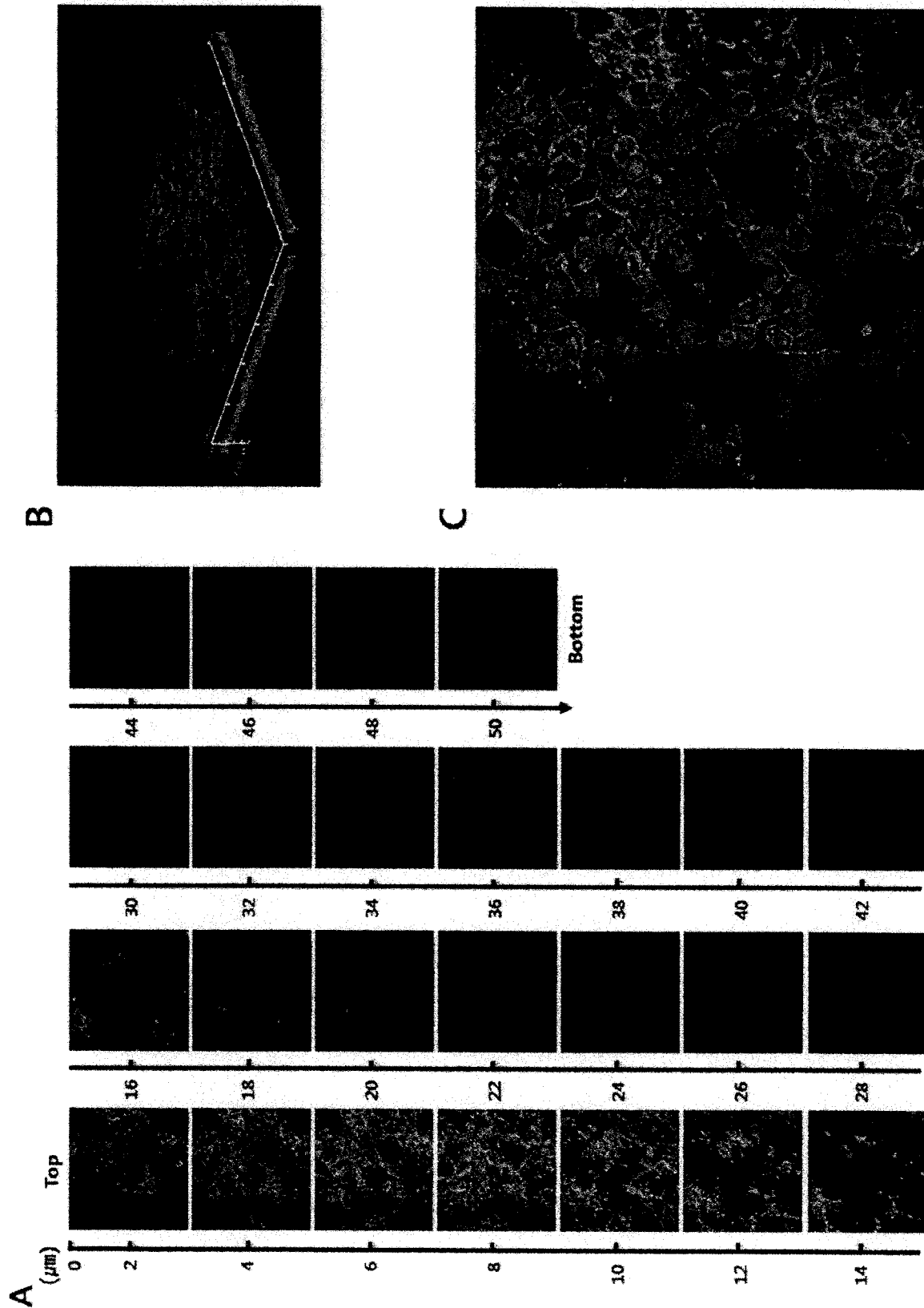
[Fig. 14]



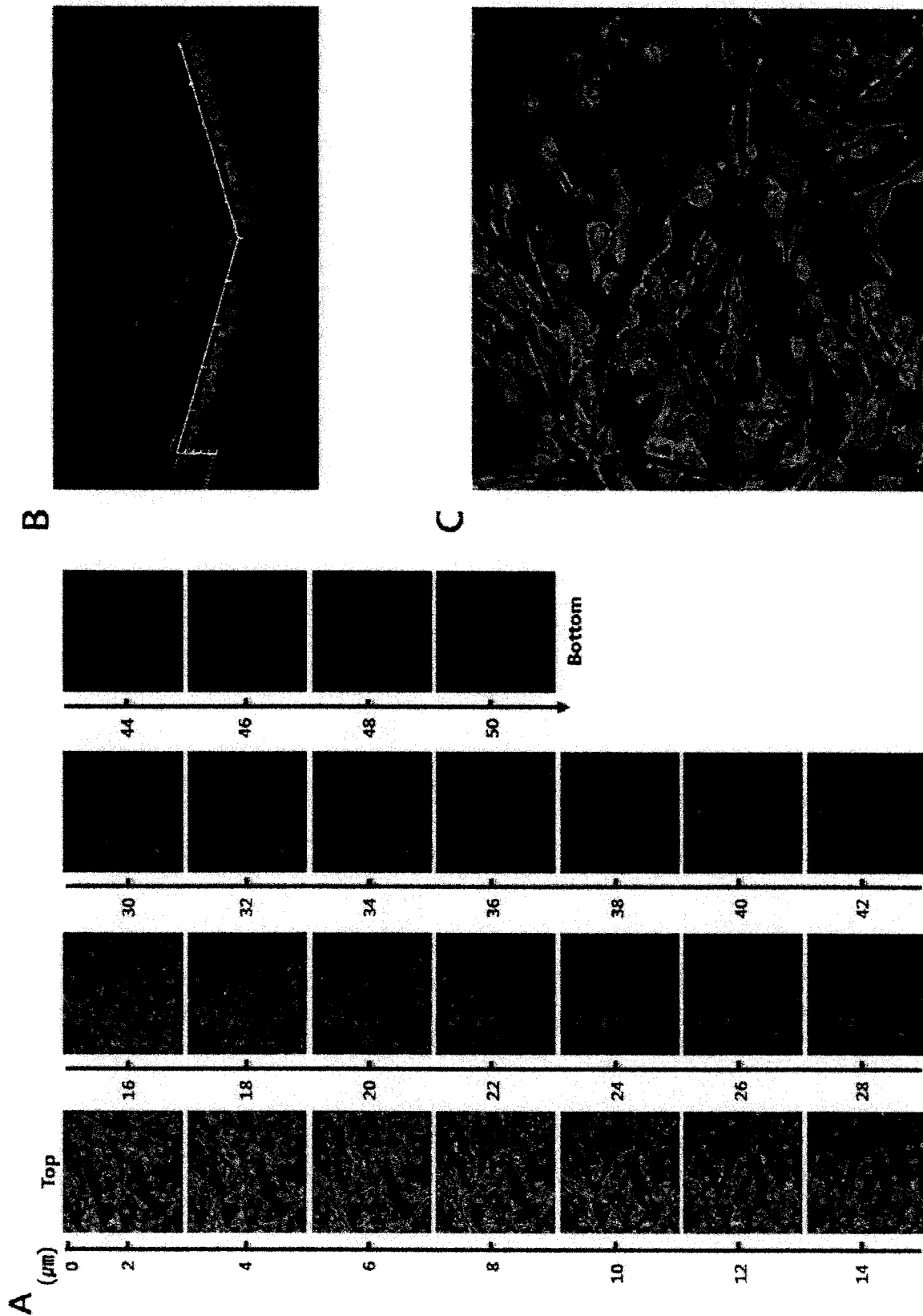
[Fig. 15]



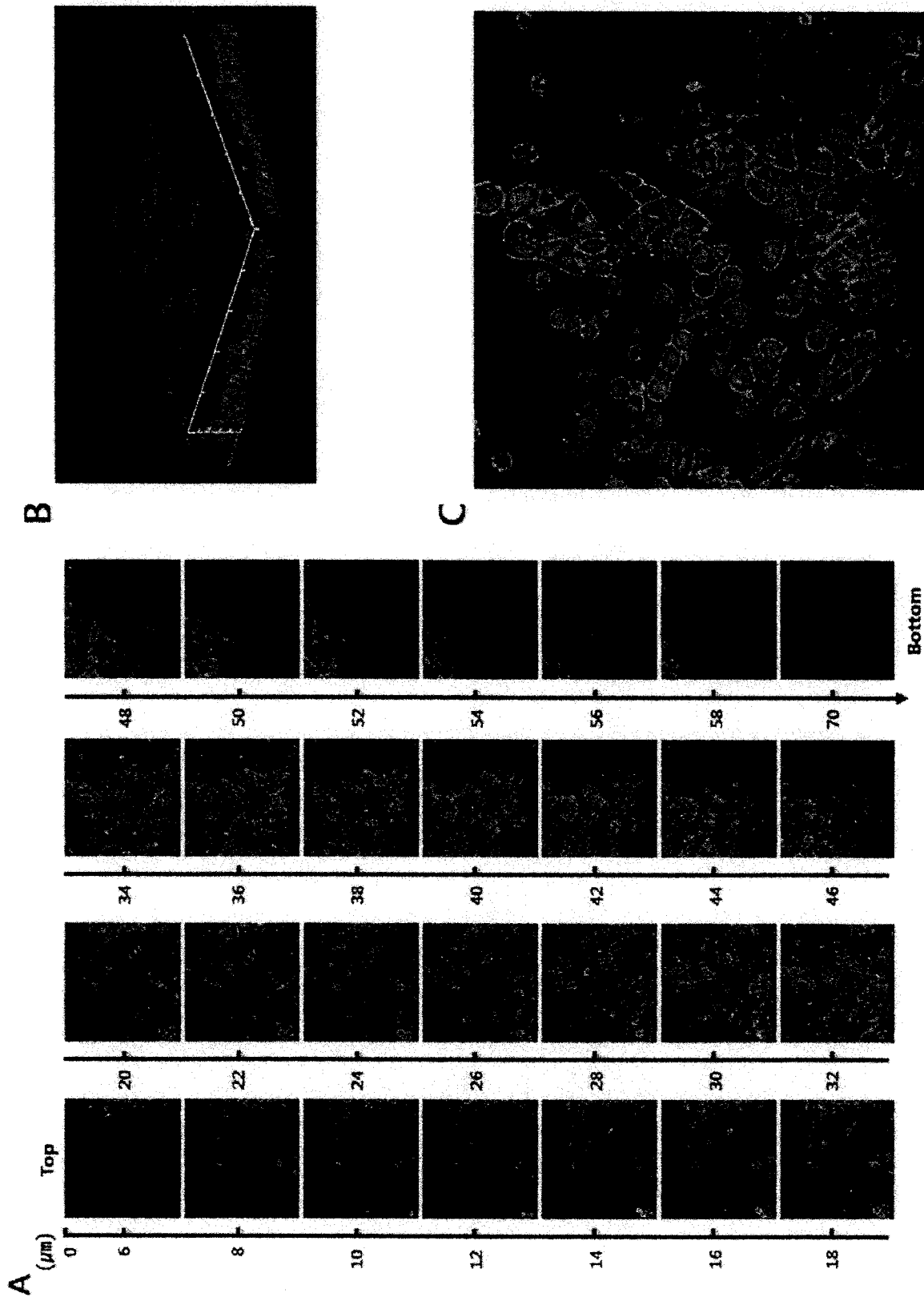
[Fig. 16]



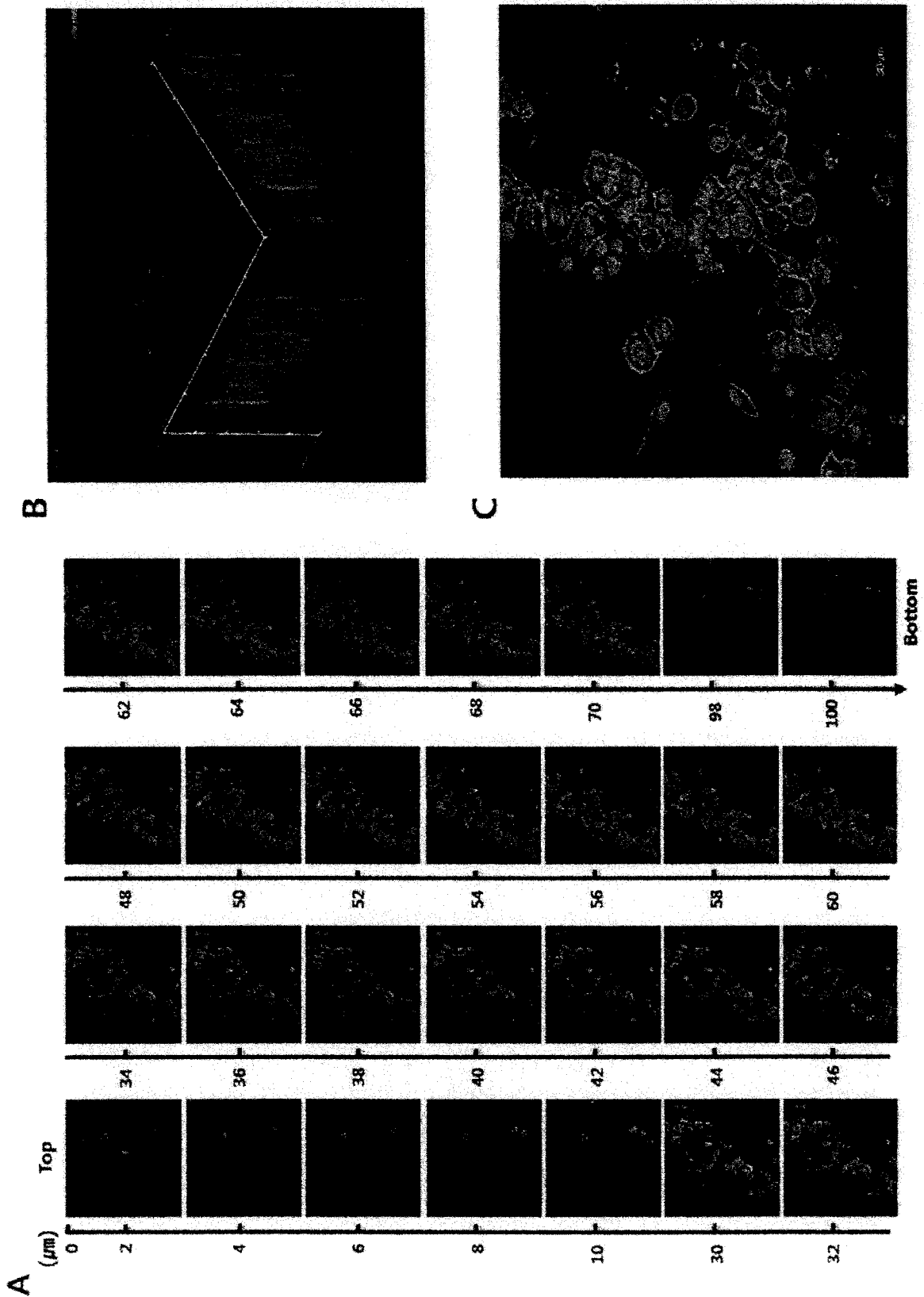
[Fig. 17]



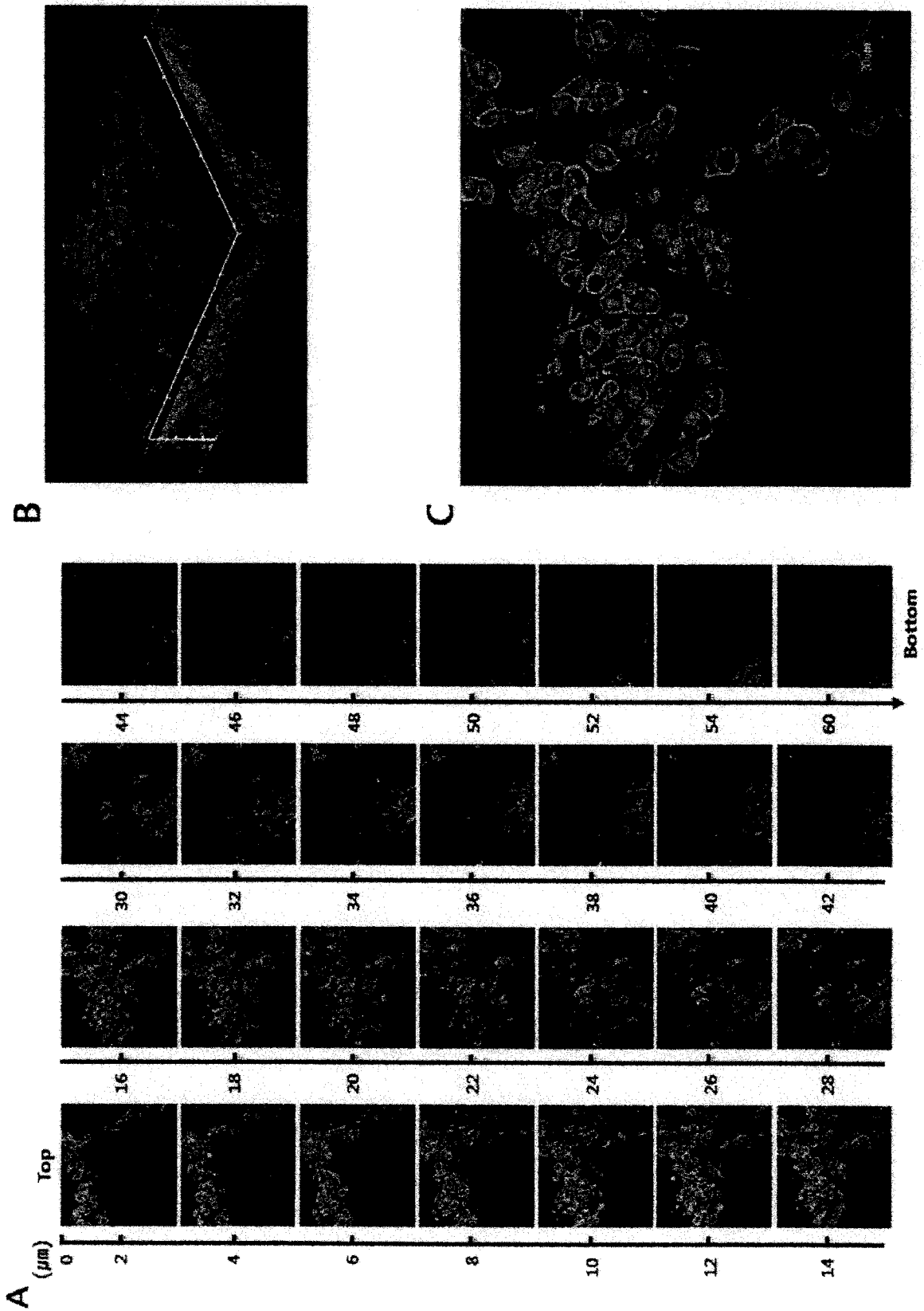
[Fig. 18]



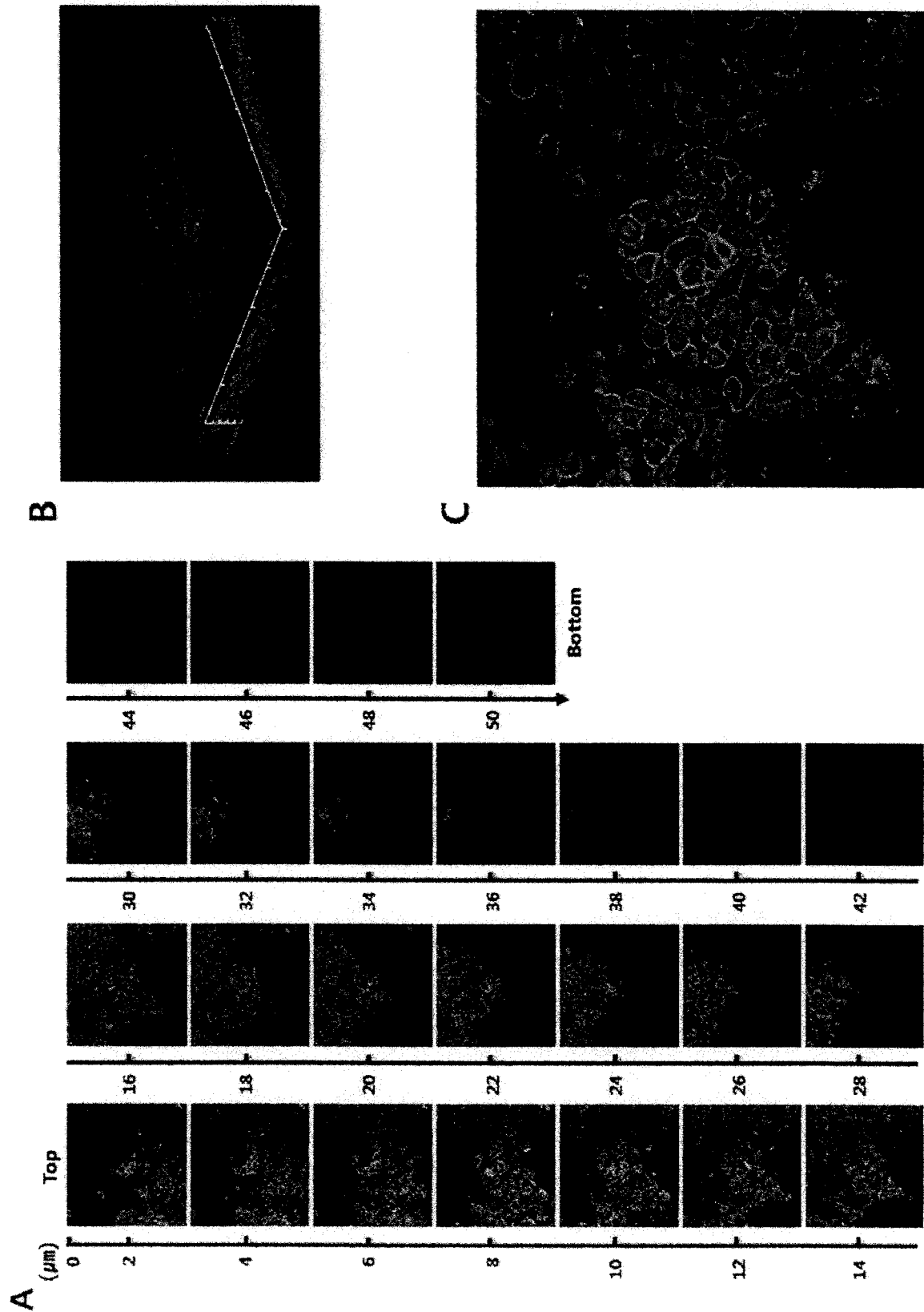
[Fig. 19]



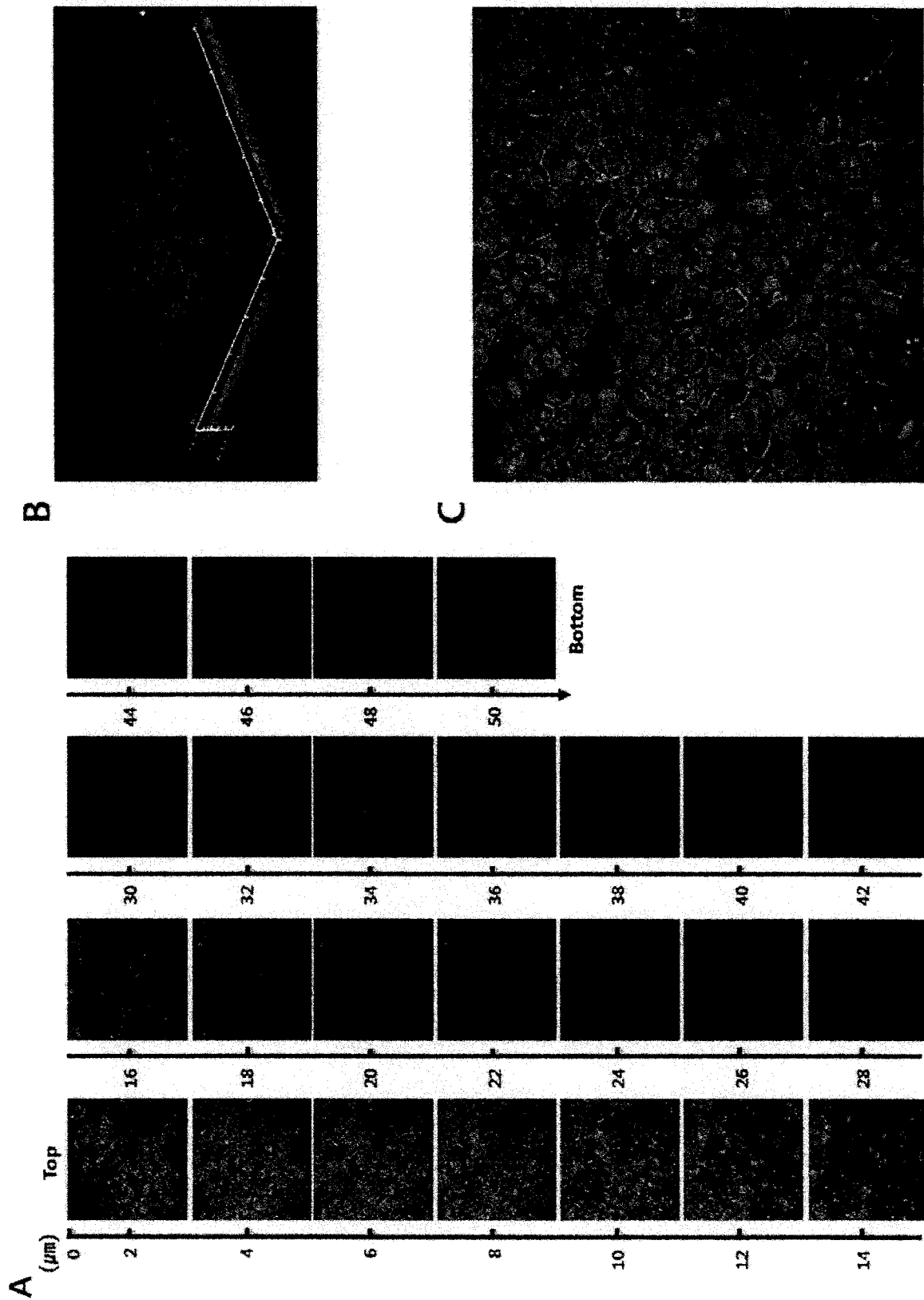
[Fig. 20]



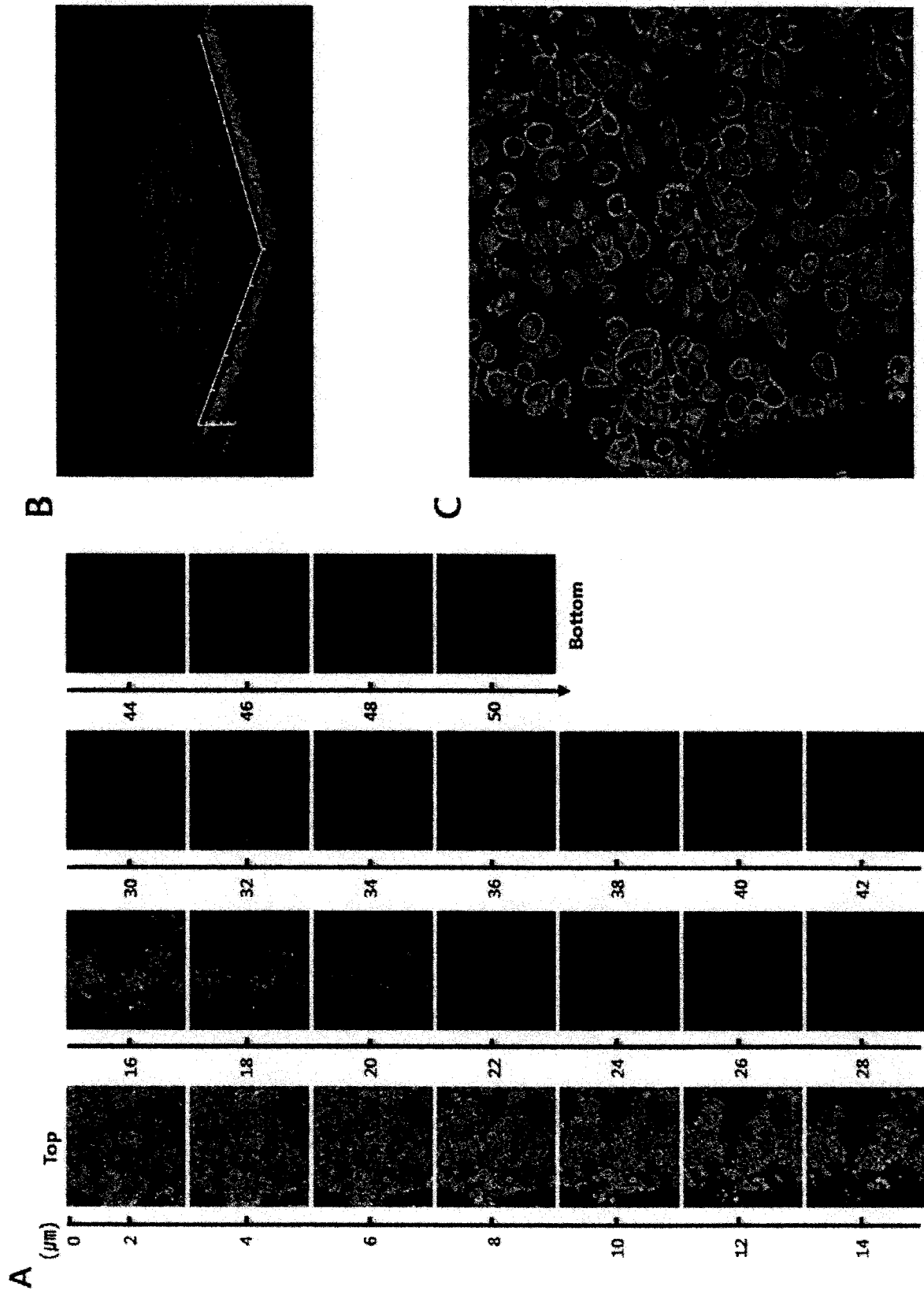
[Fig. 21]



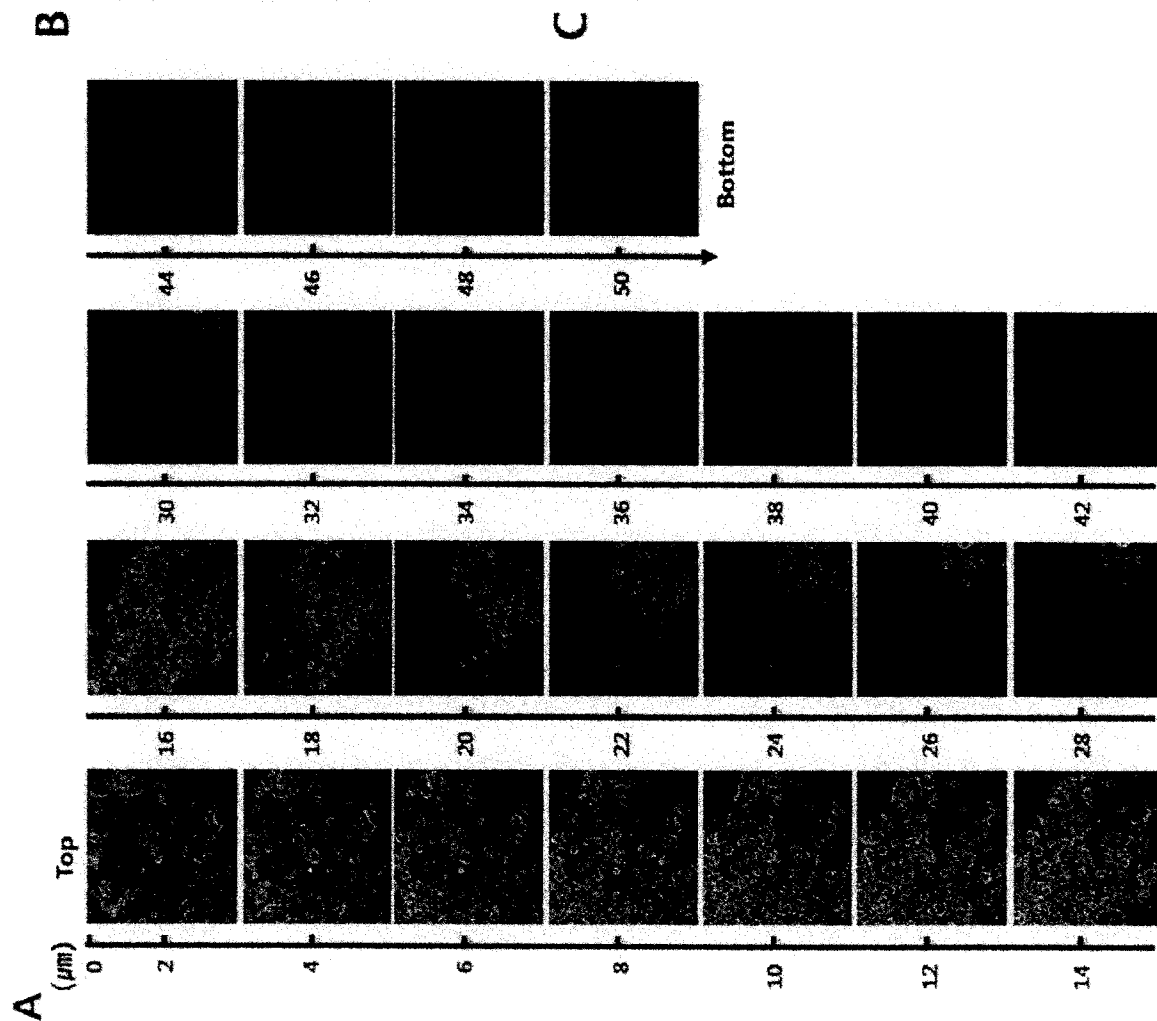
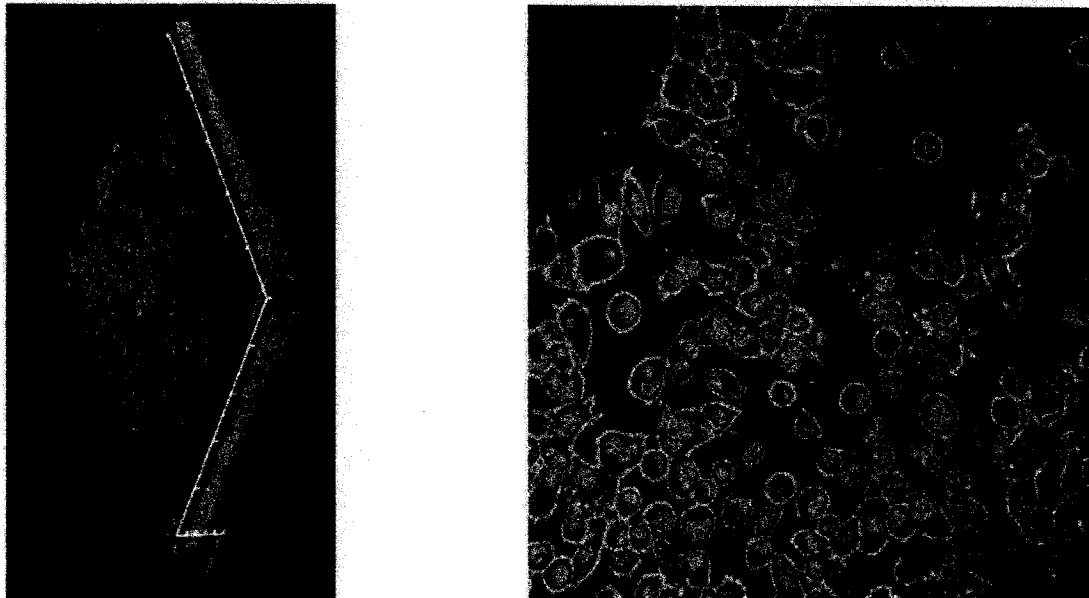
[Fig. 22]



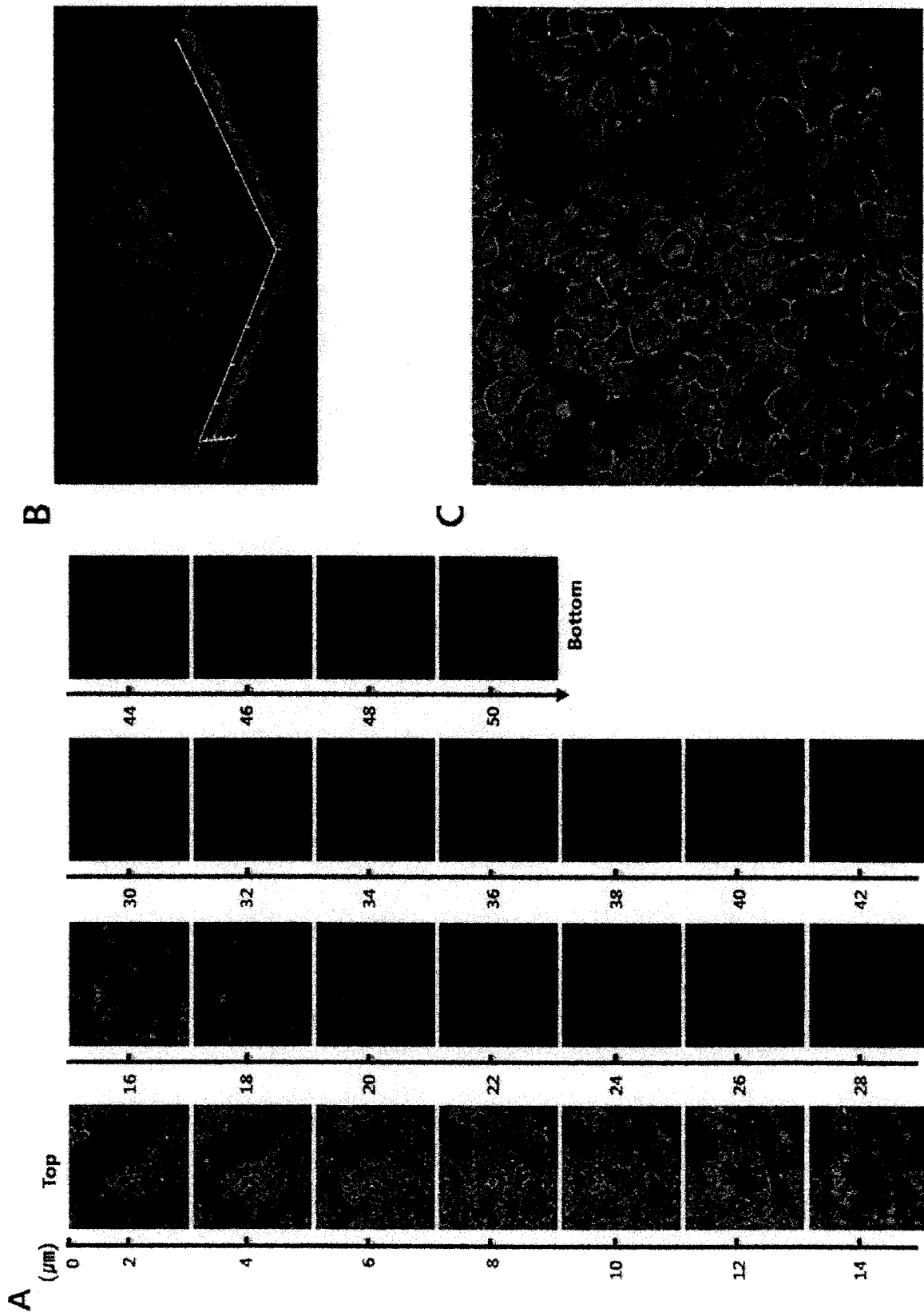
[Fig. 23]



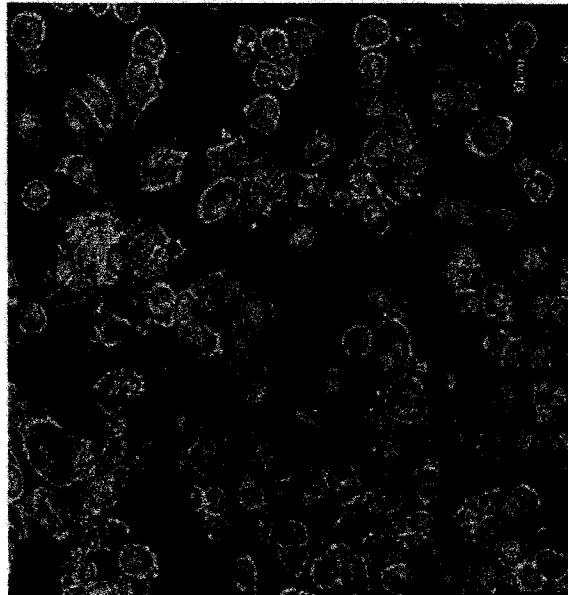
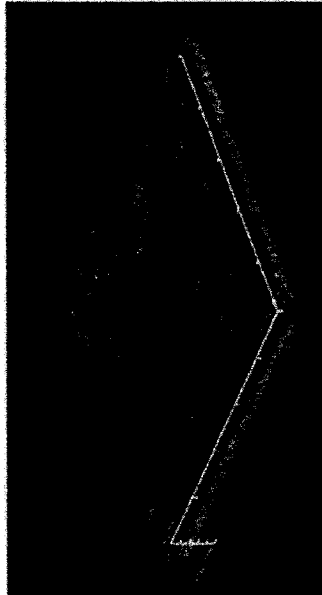
[Fig. 24]



[Fig. 25]

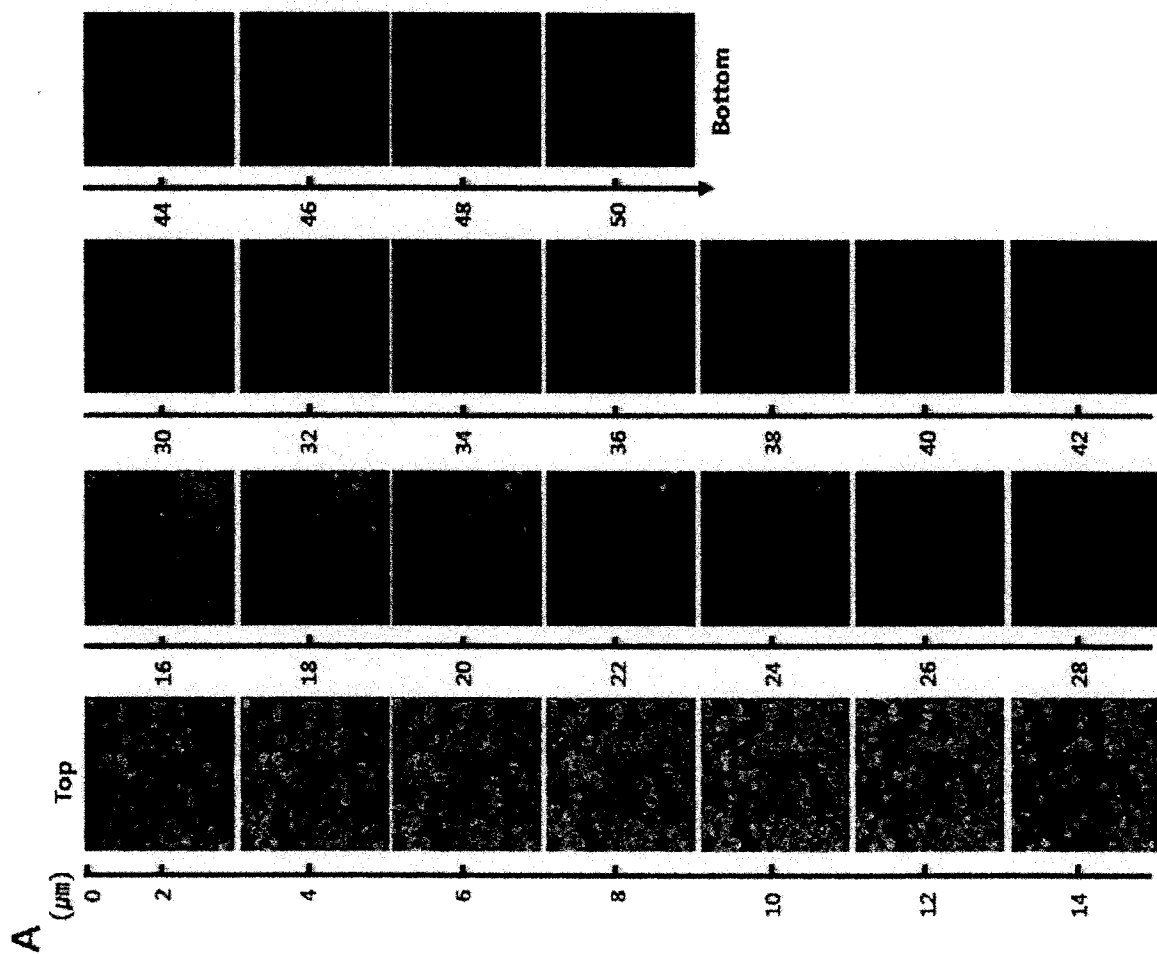


[Fig. 26]

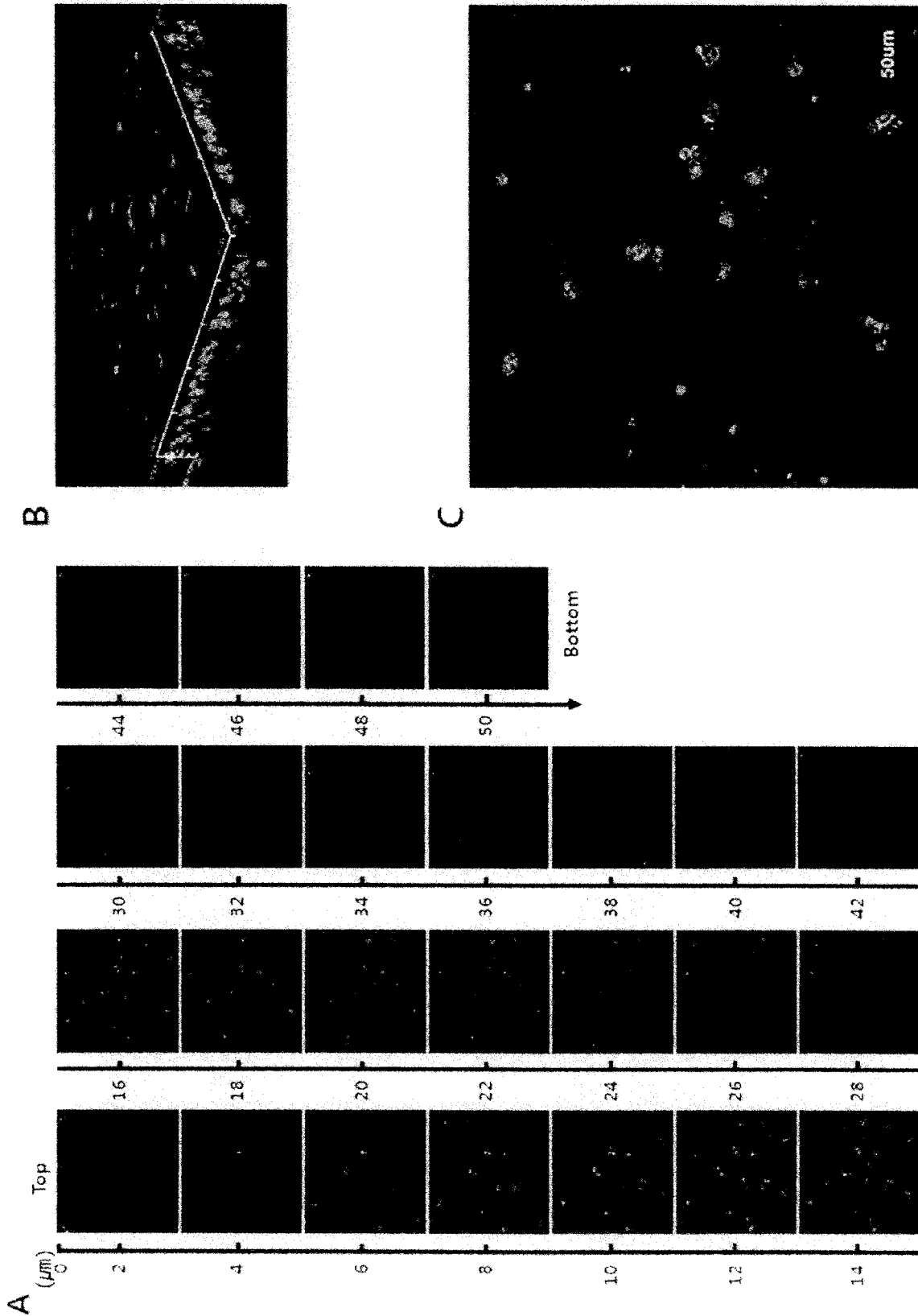


B

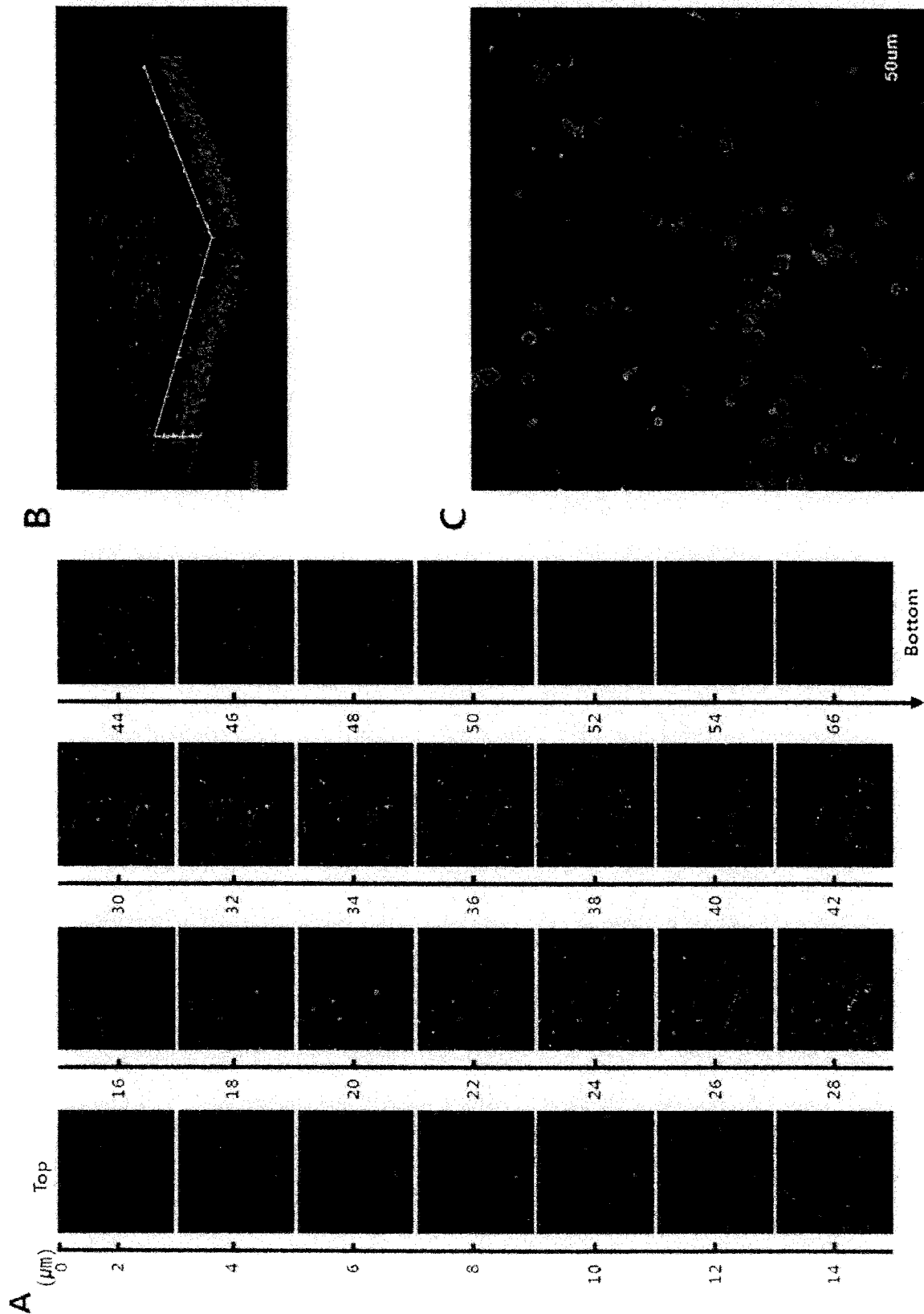
C



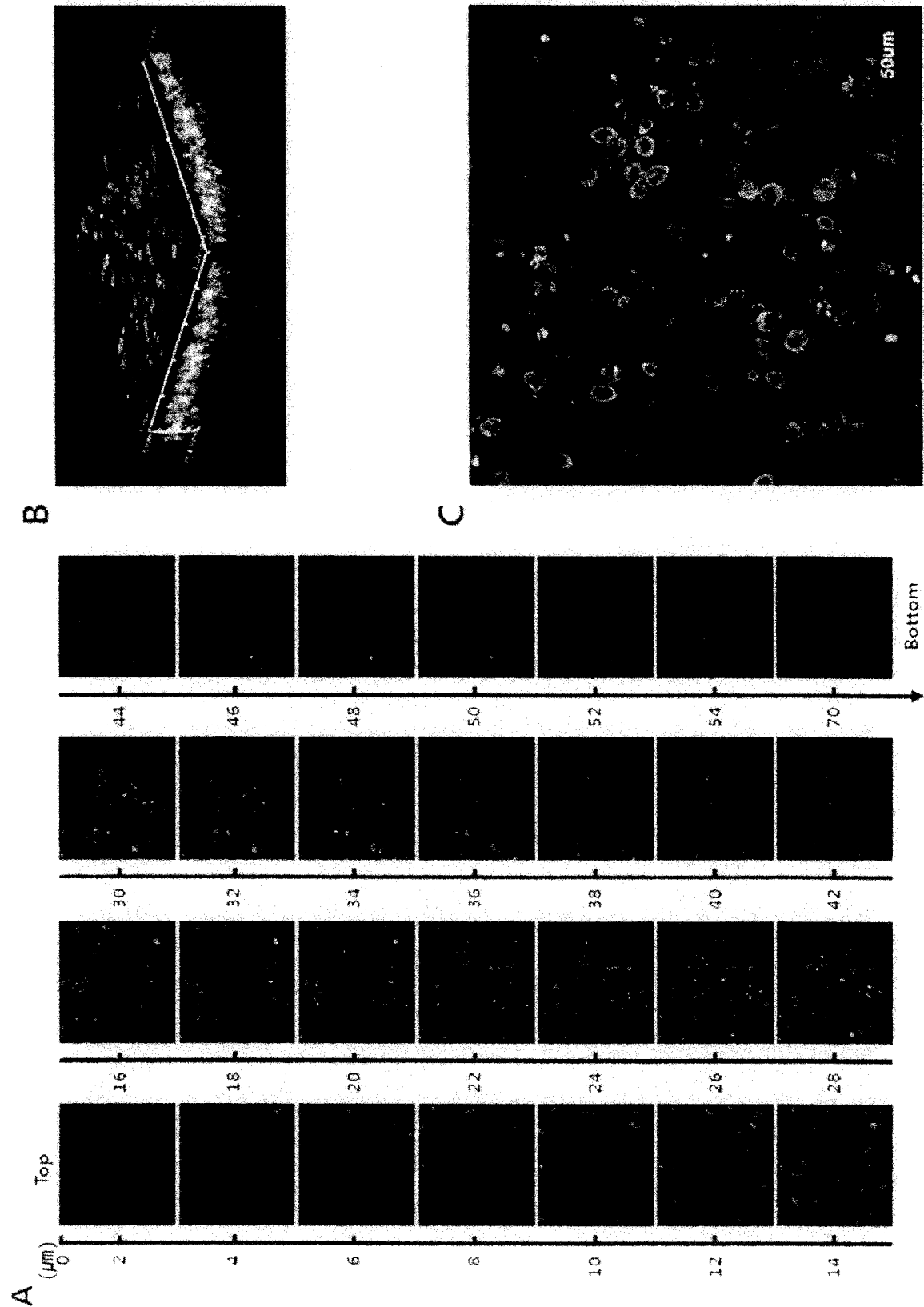
[Fig. 27]



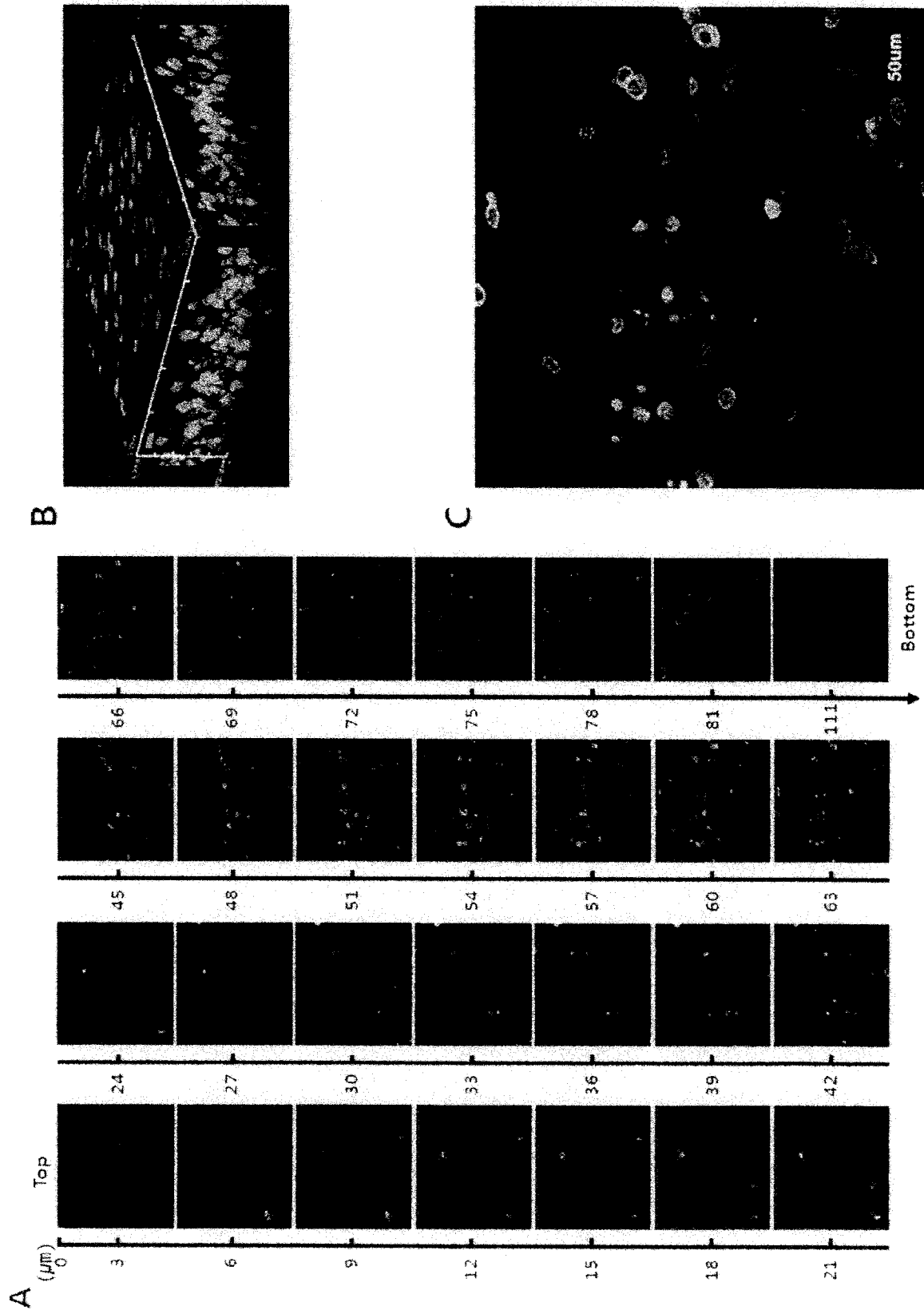
[Fig. 28]



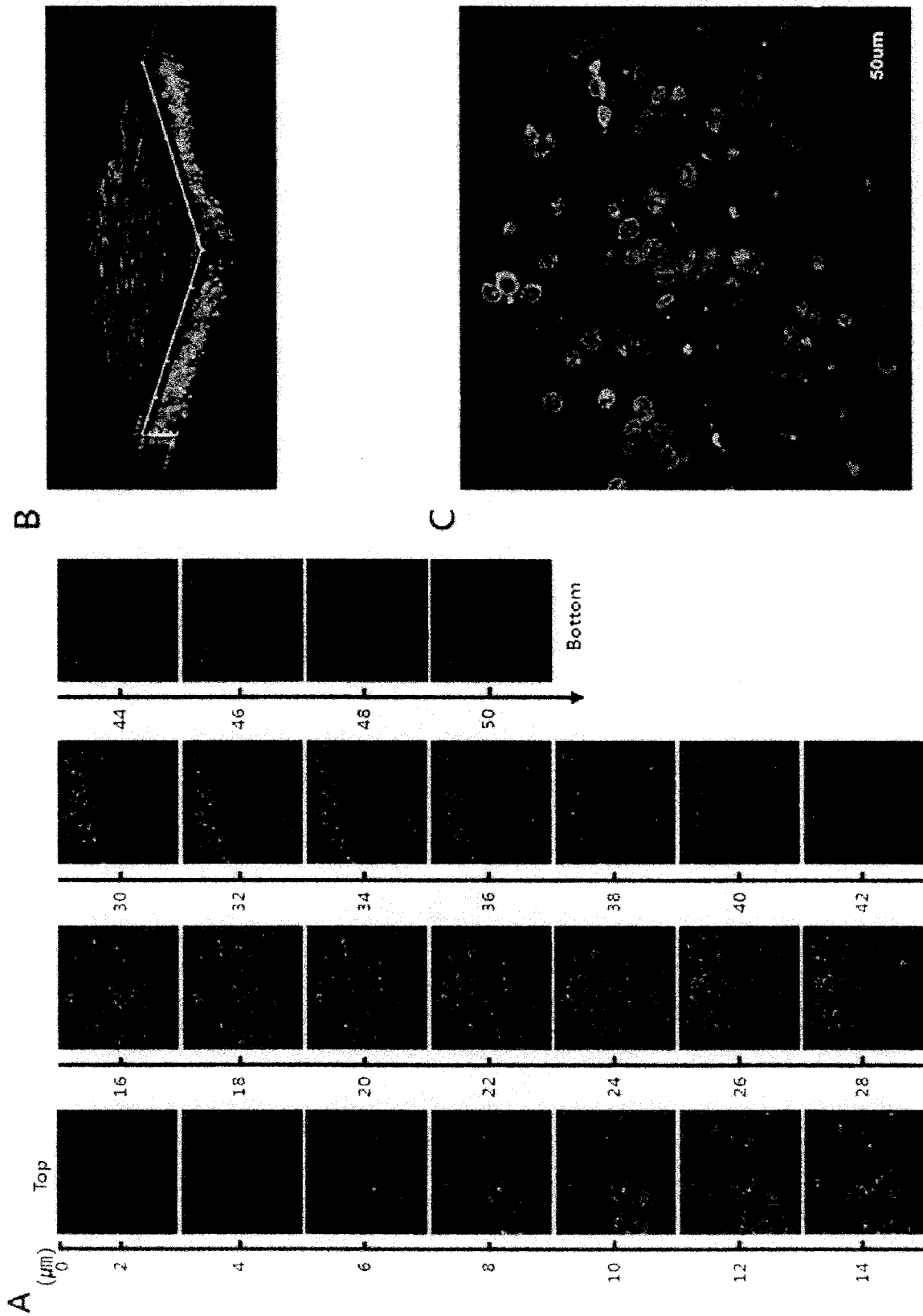
[Fig. 29]



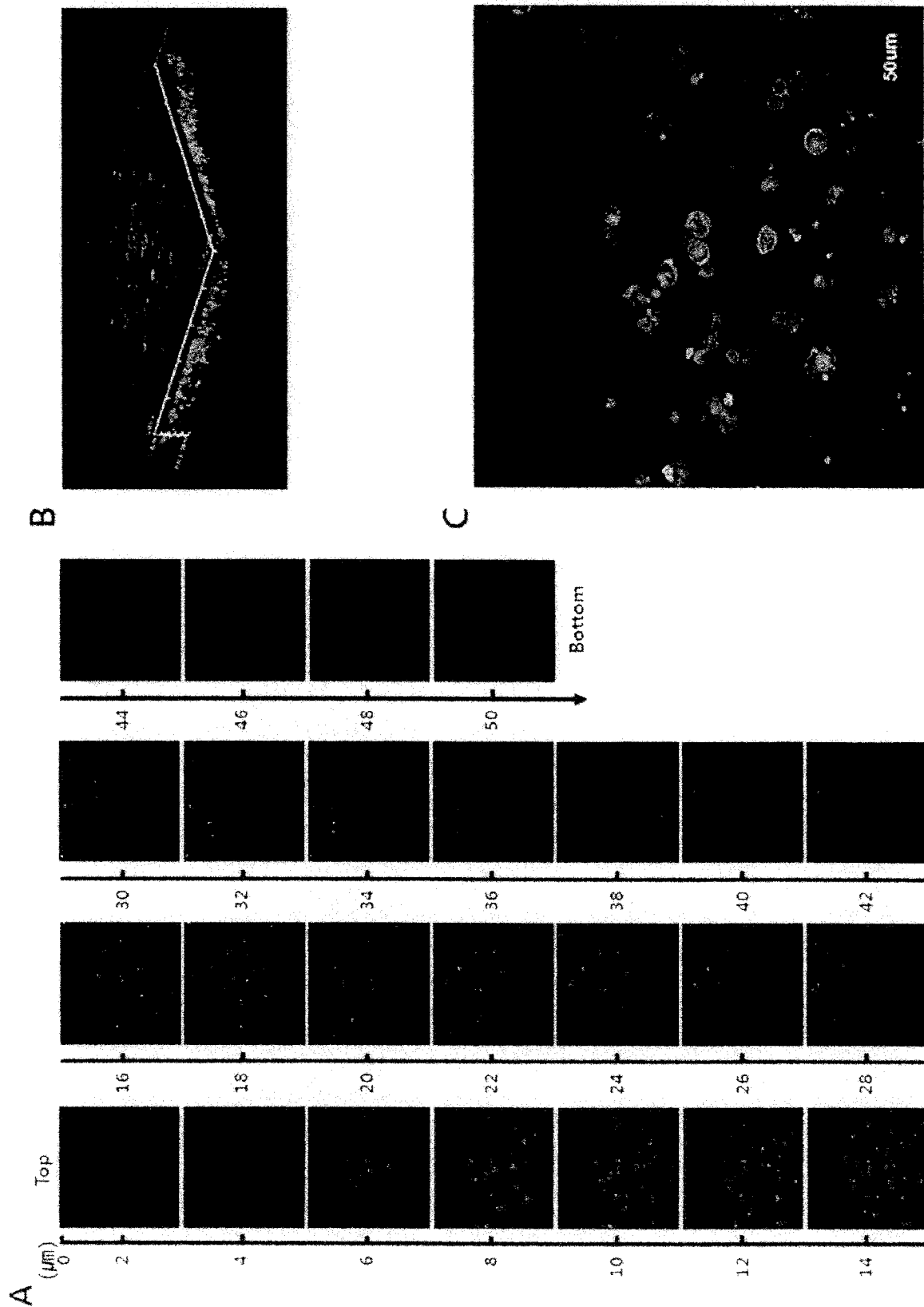
[Fig. 30]



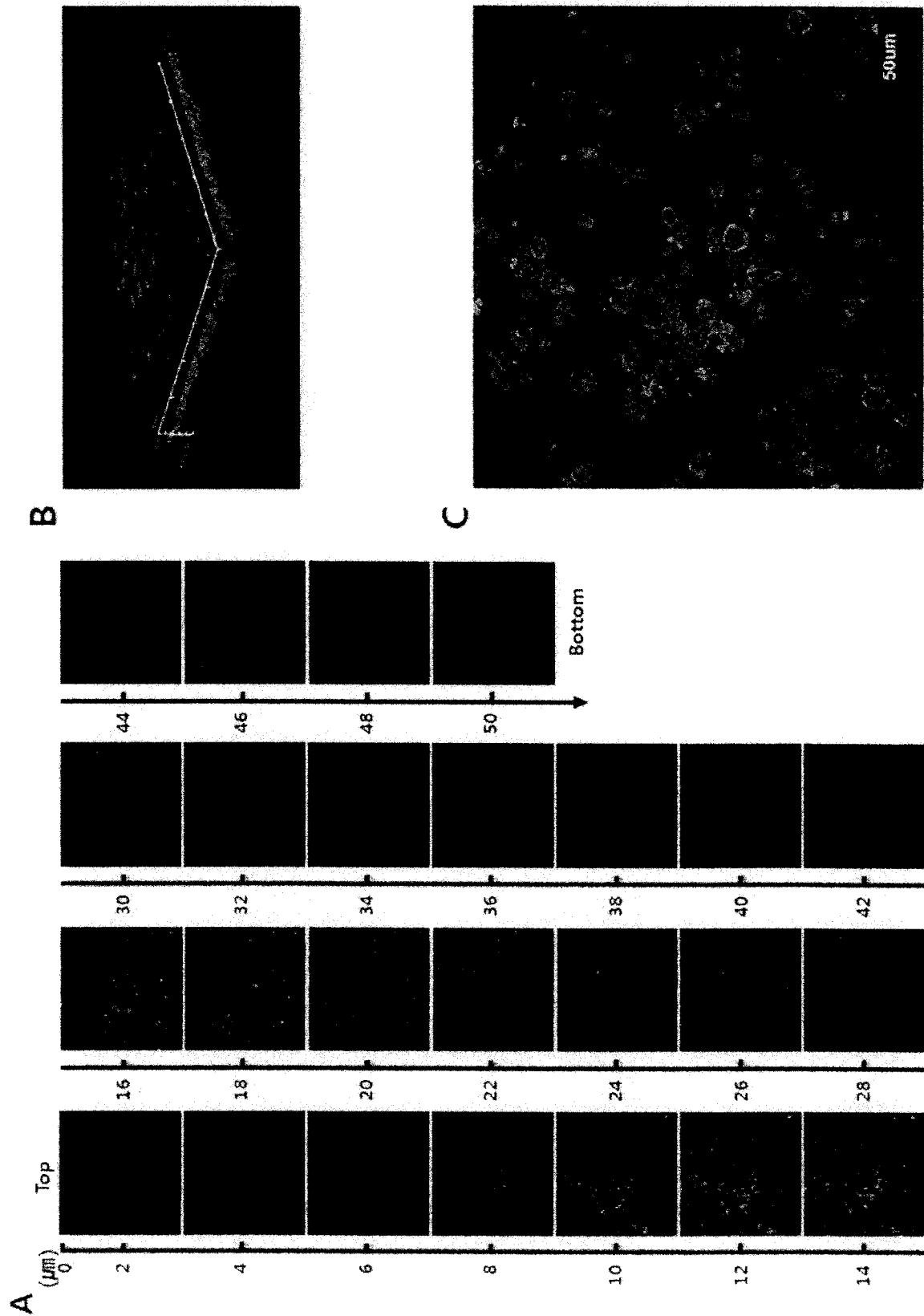
[Fig. 31]



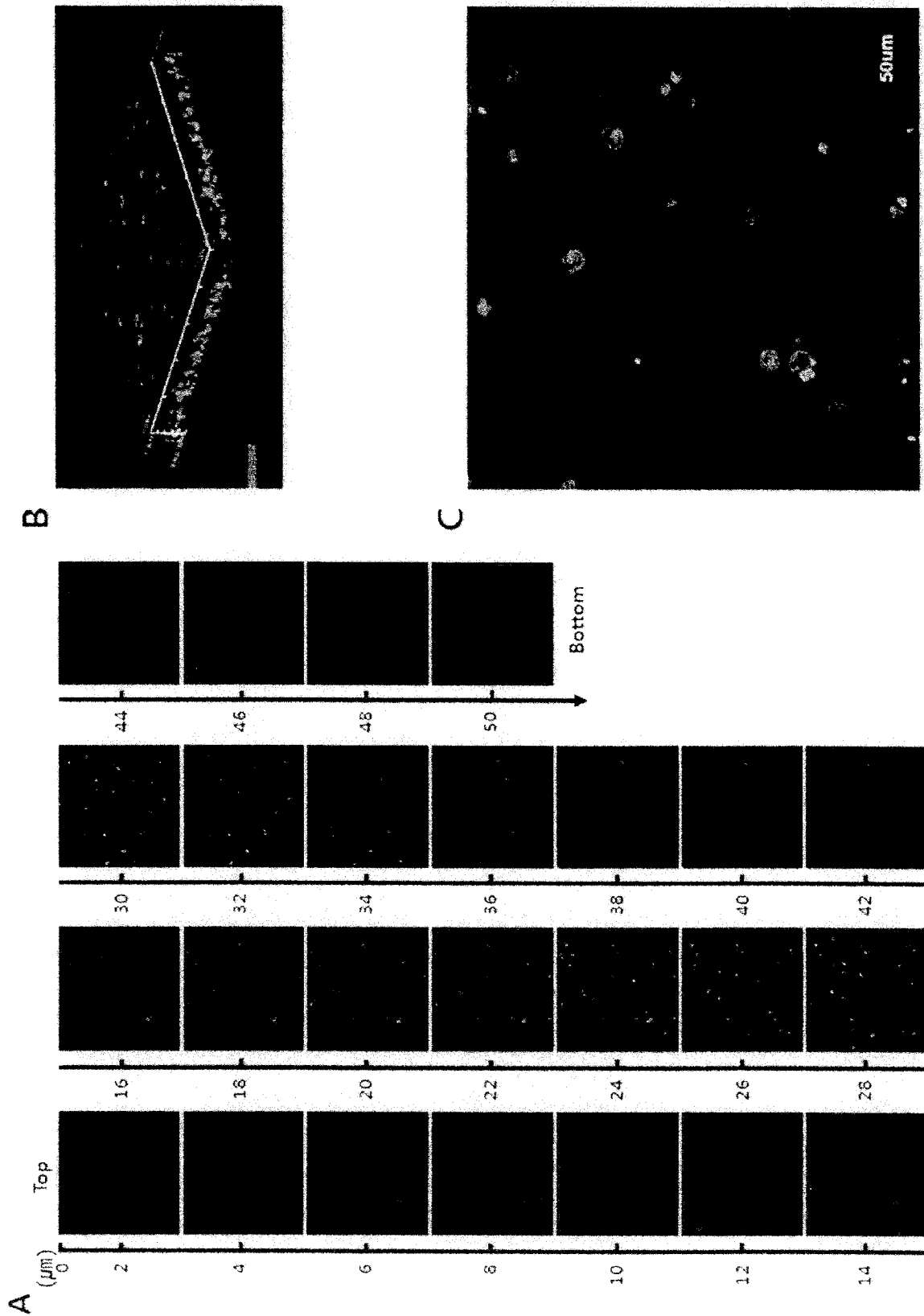
[Fig. 32]



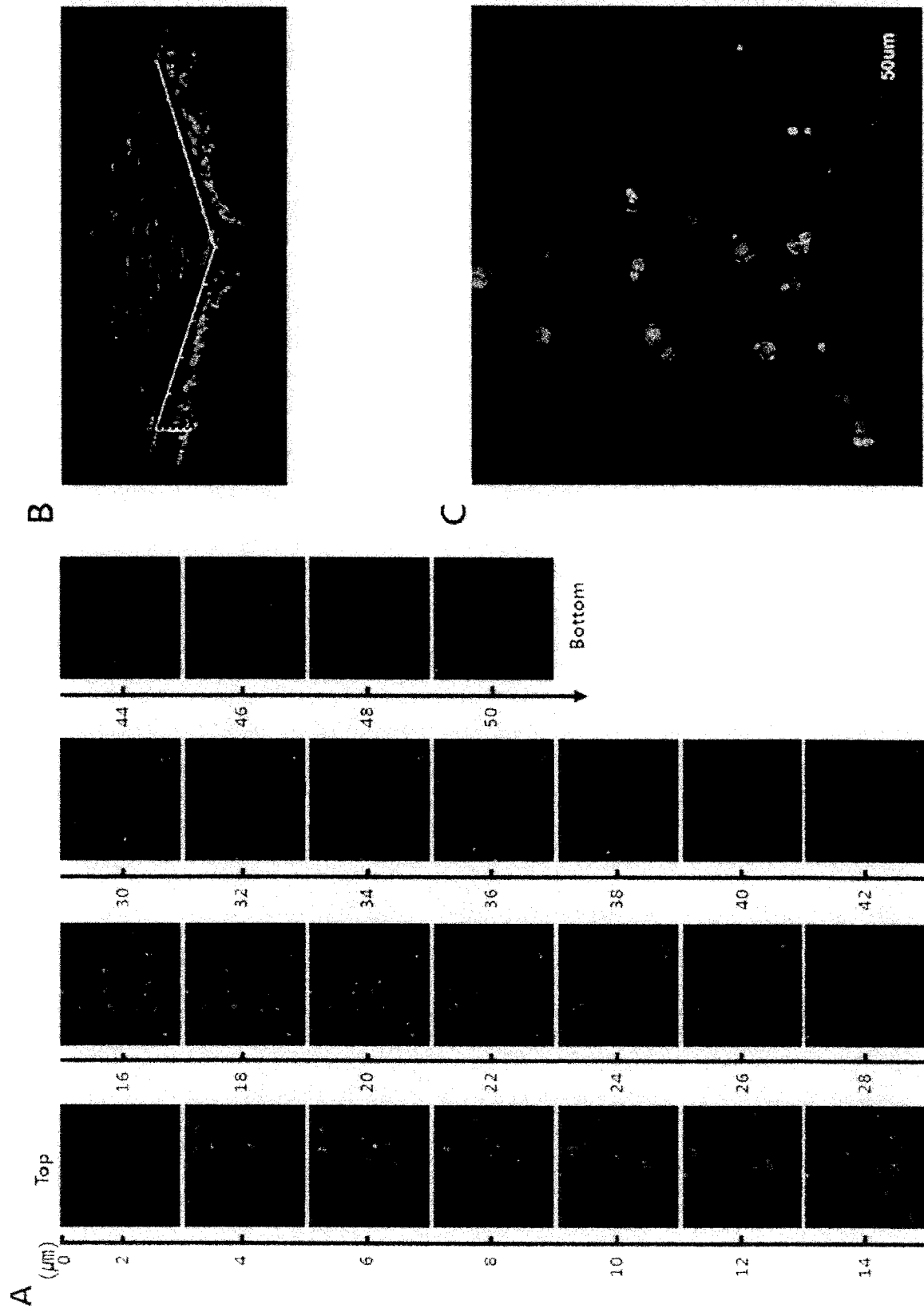
[Fig. 33]



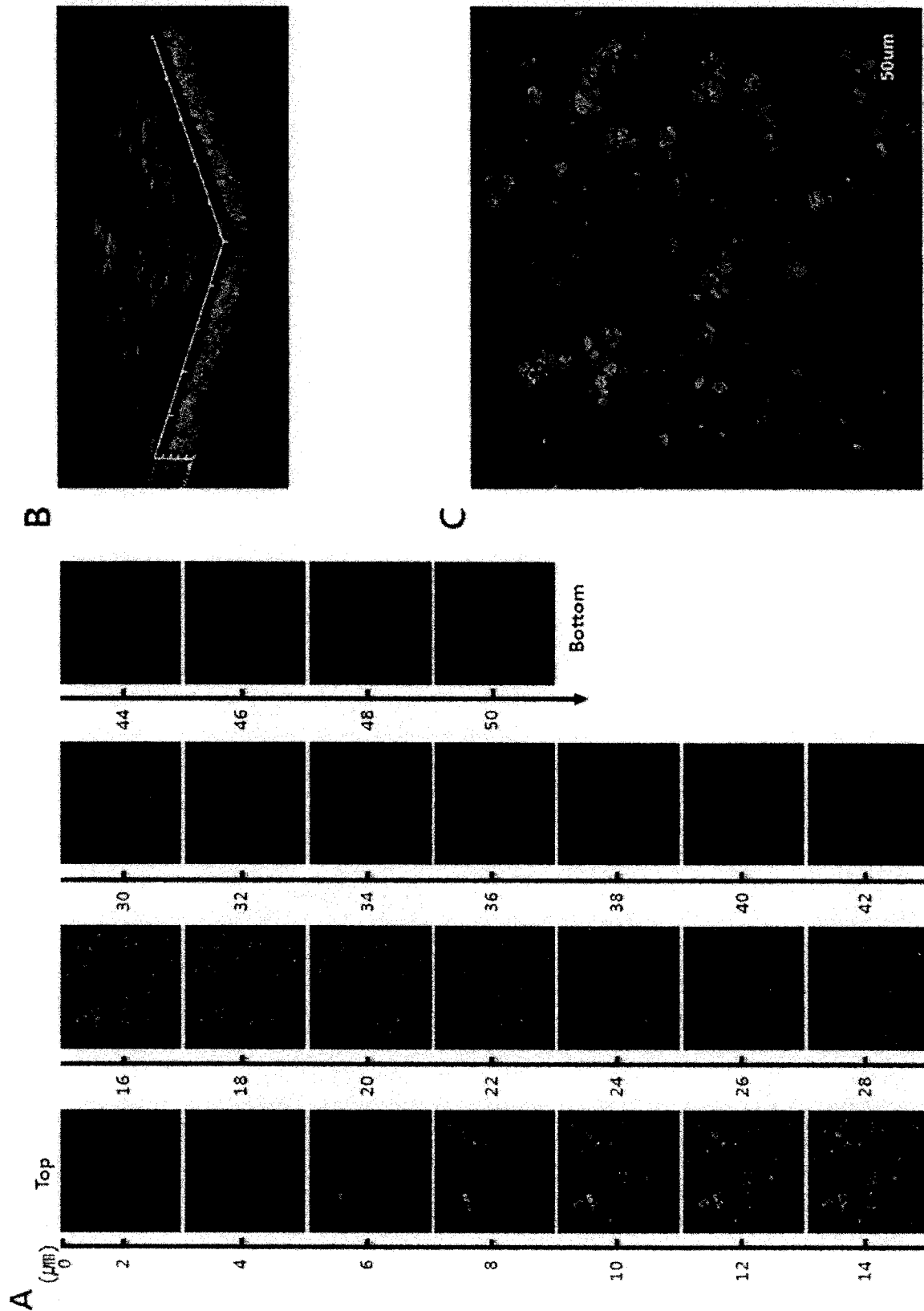
[Fig. 34]



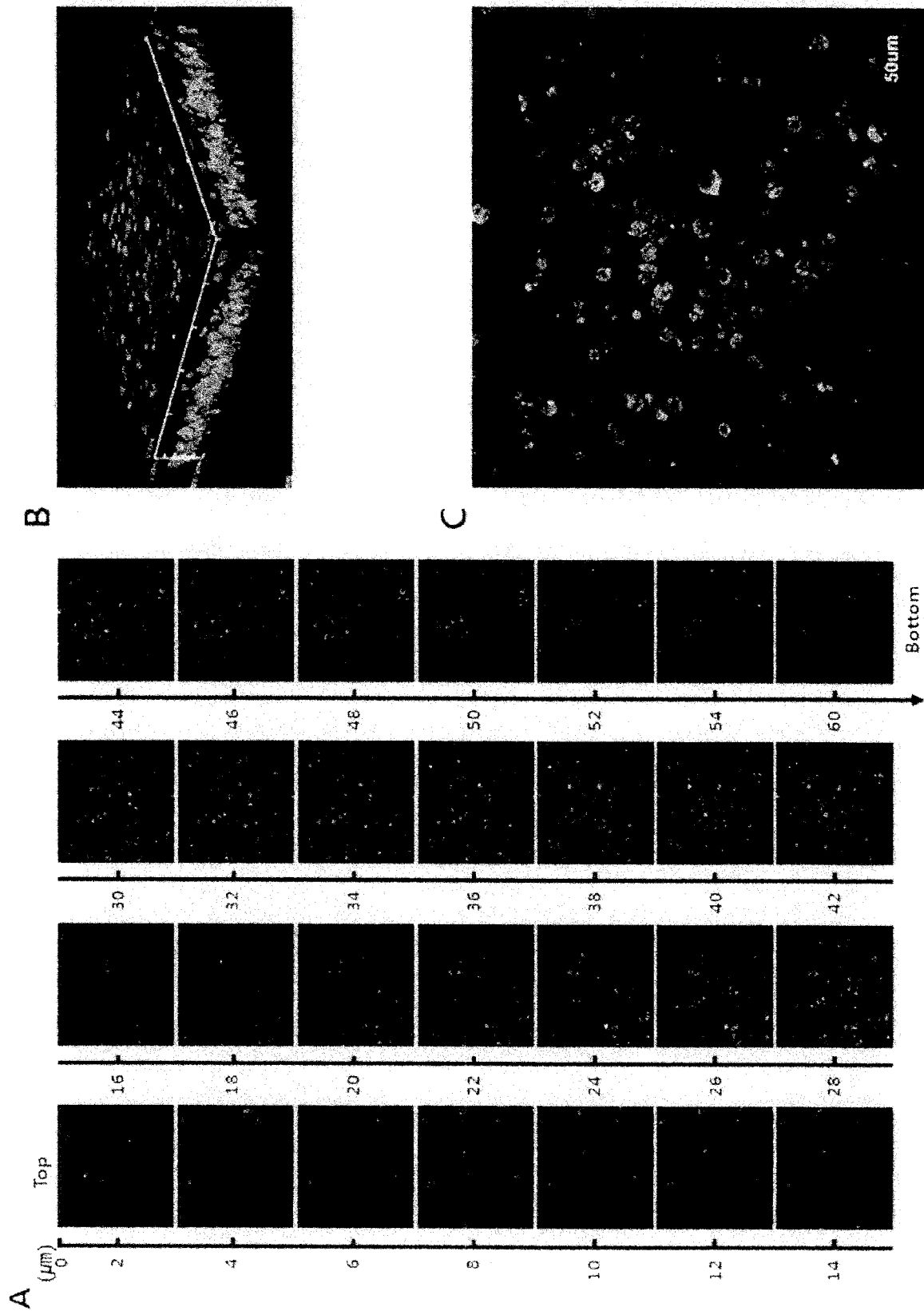
[Fig. 35]



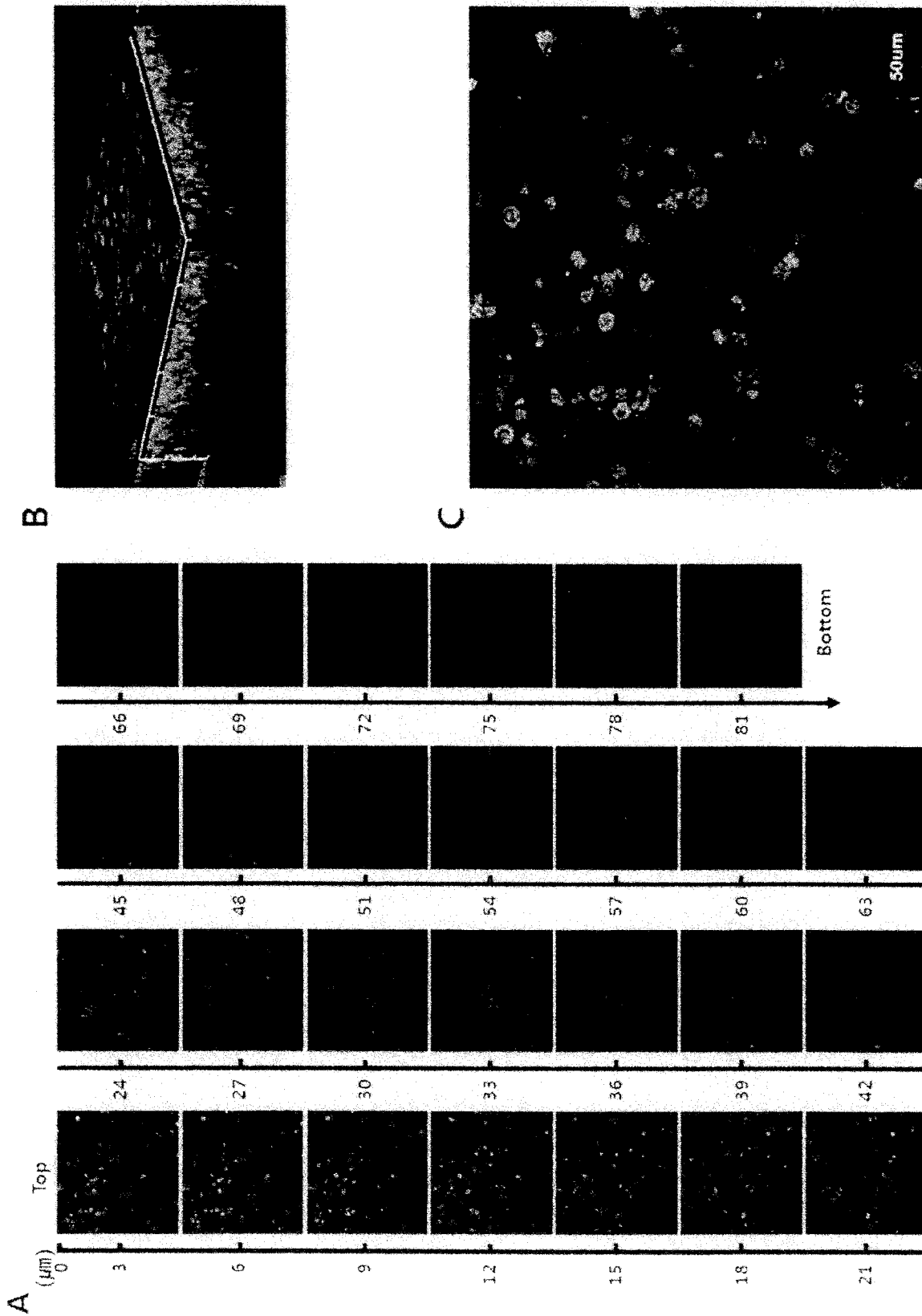
[Fig. 36]



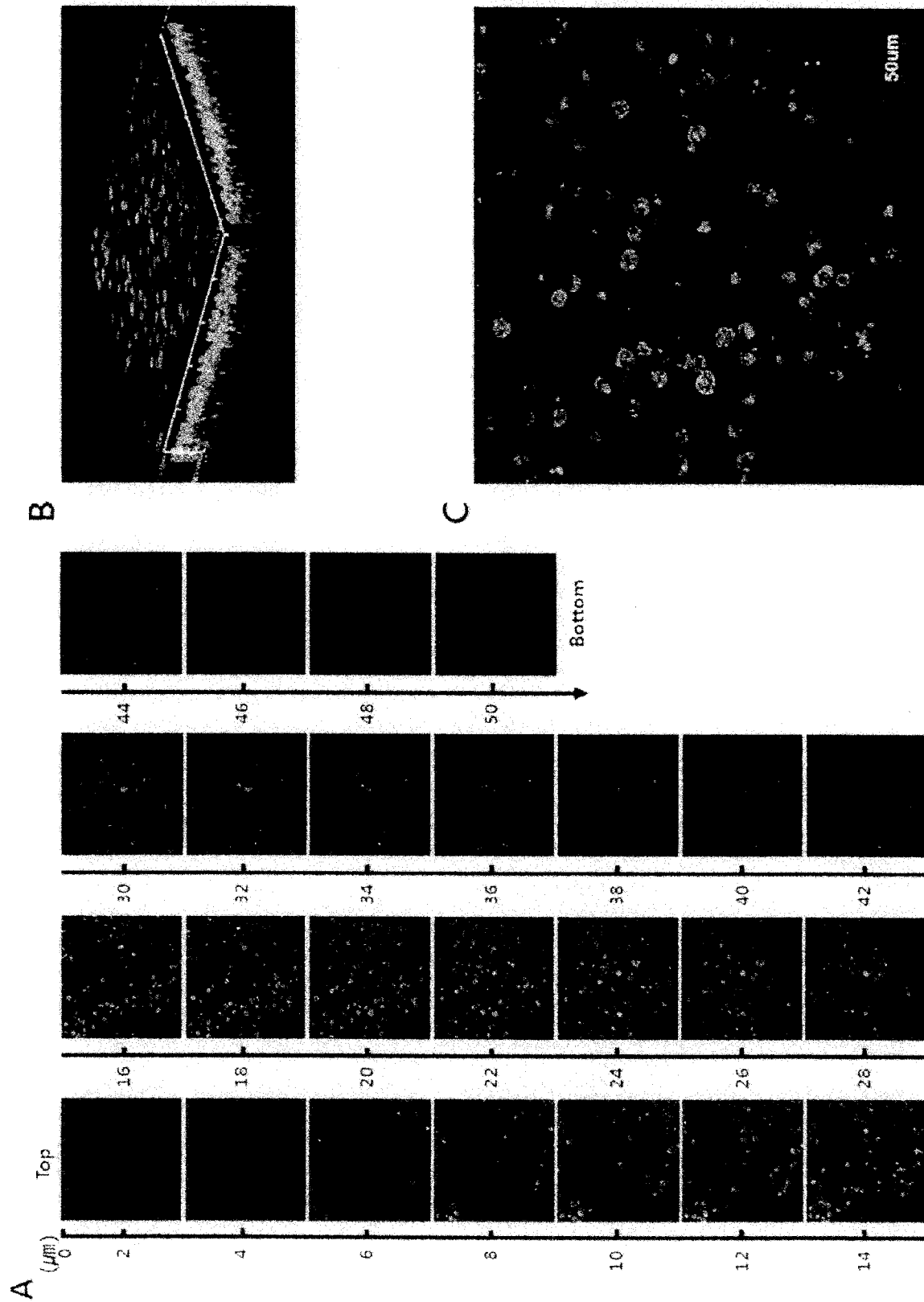
[Fig. 37]



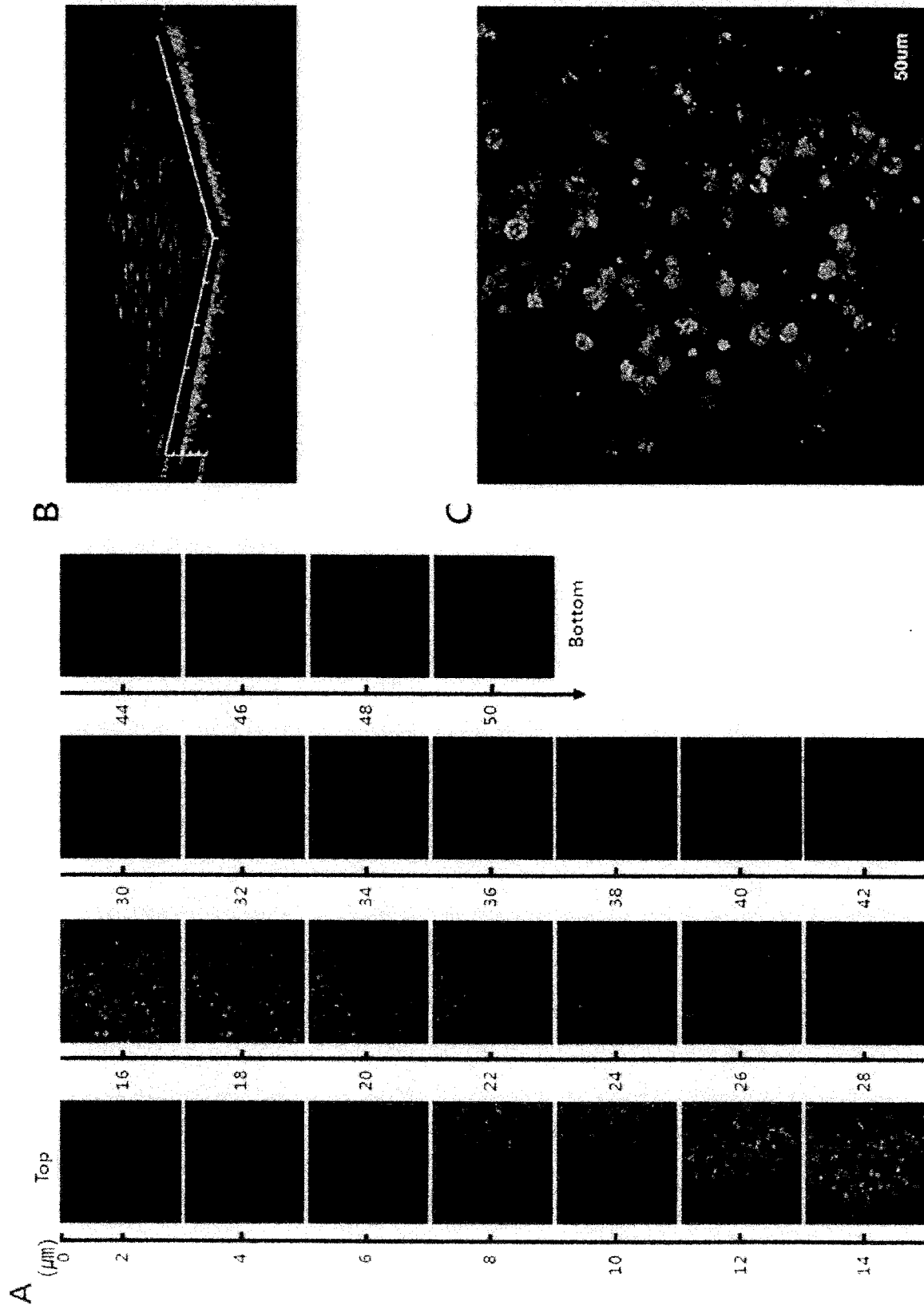
[Fig. 39]

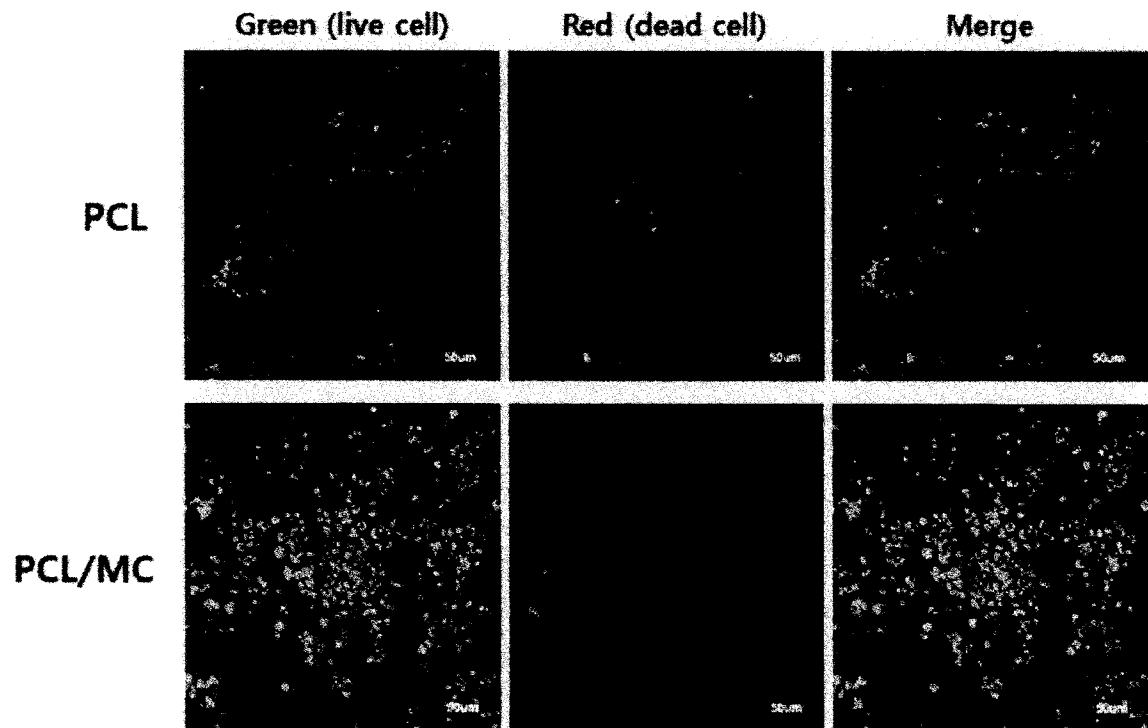
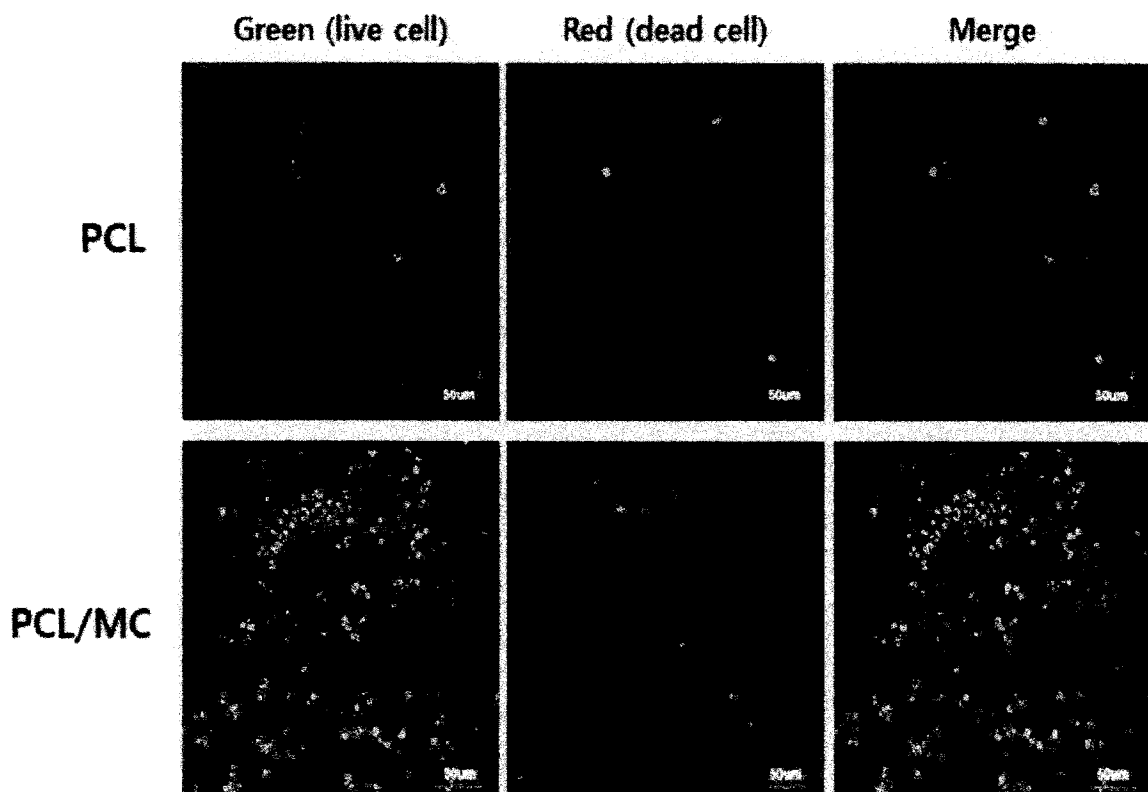


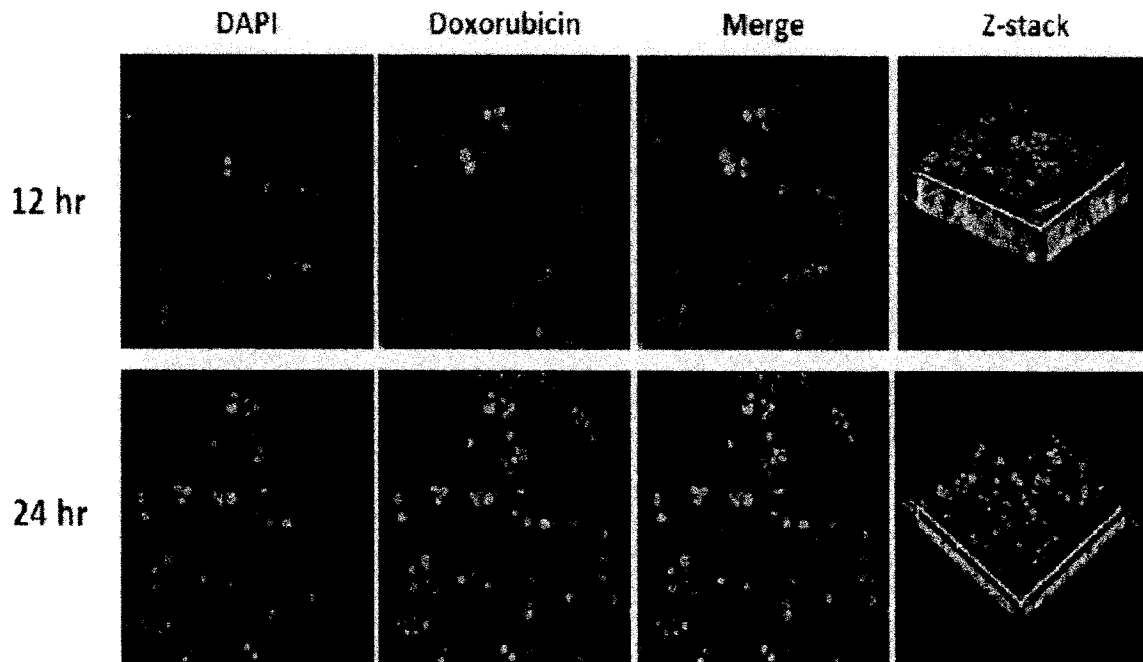
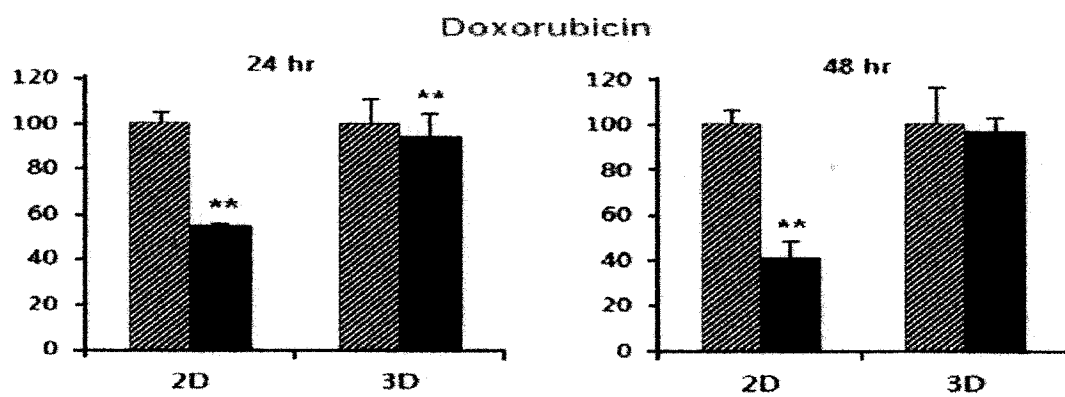
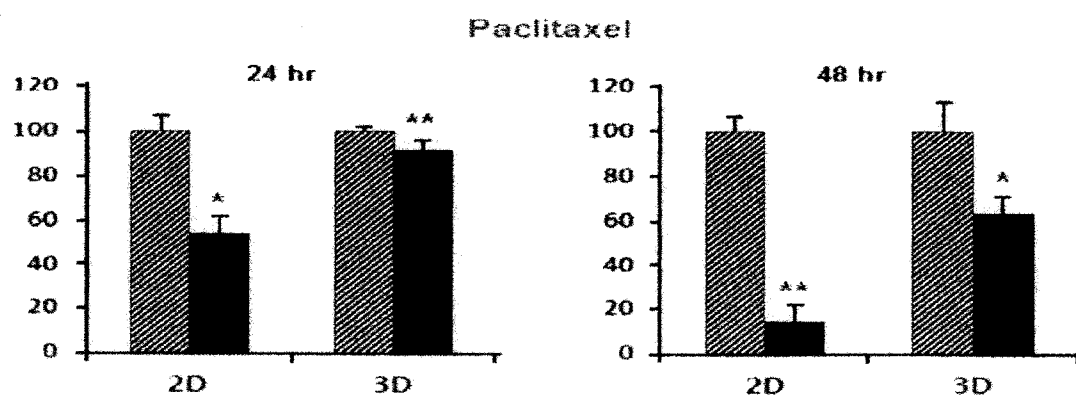
[Fig. 40]



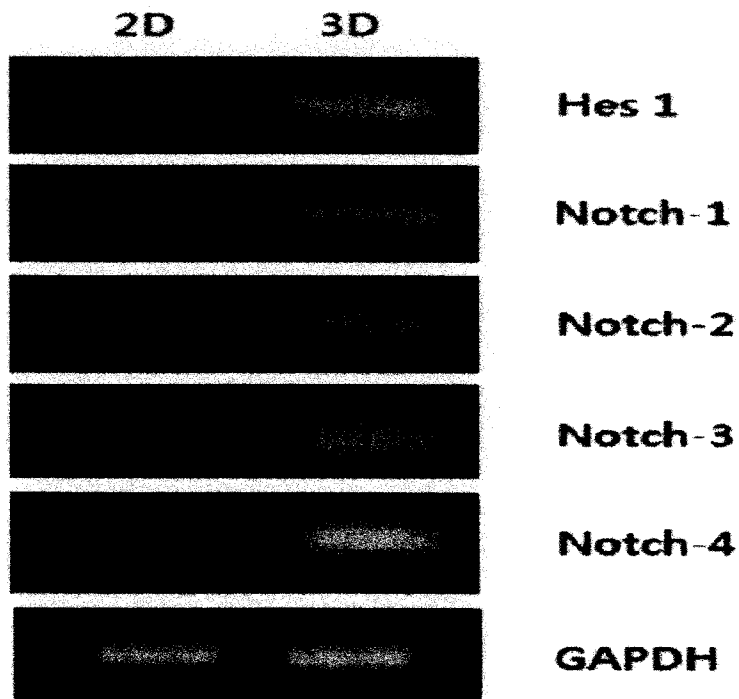
[Fig. 41]



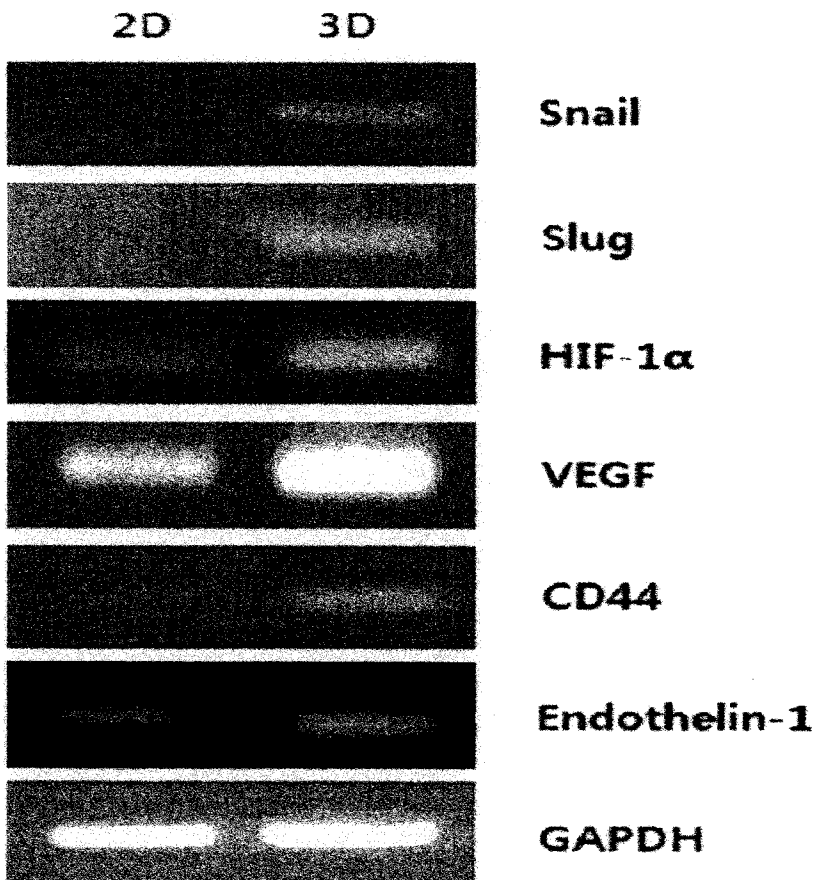
[Fig. 42]**[Fig. 43]**

[Fig. 44]**[Fig. 45]****A.****B.**

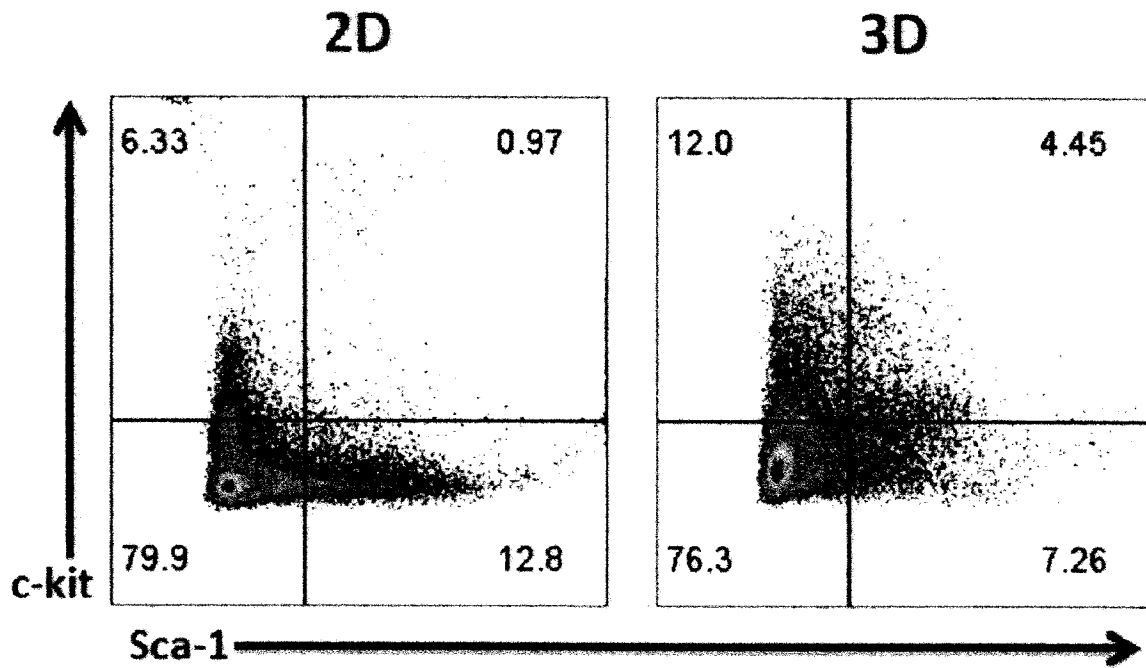
[Fig. 46]



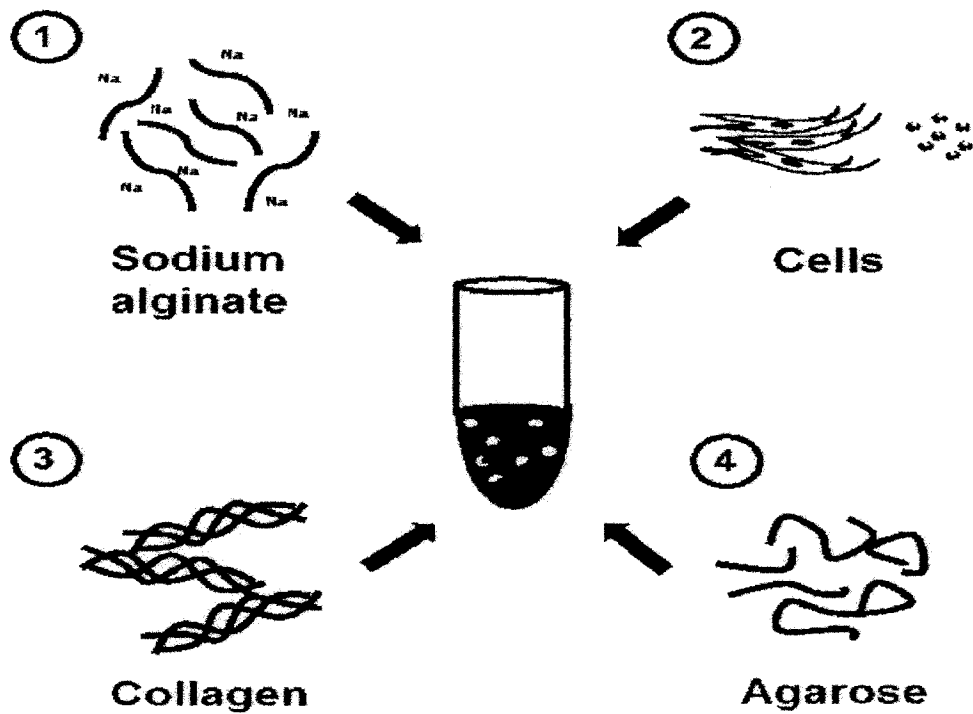
[Fig. 47]



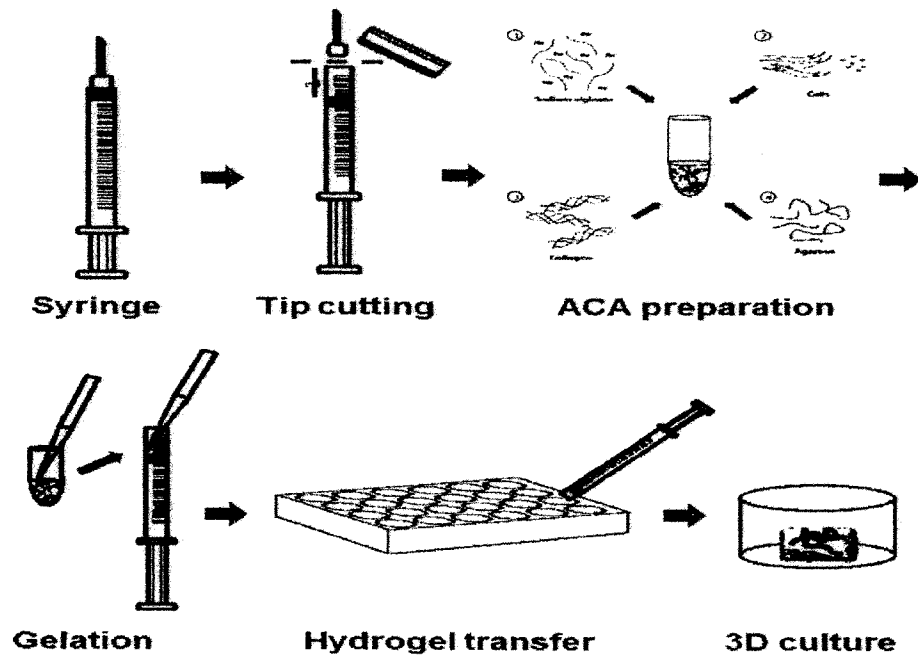
[Fig. 48]



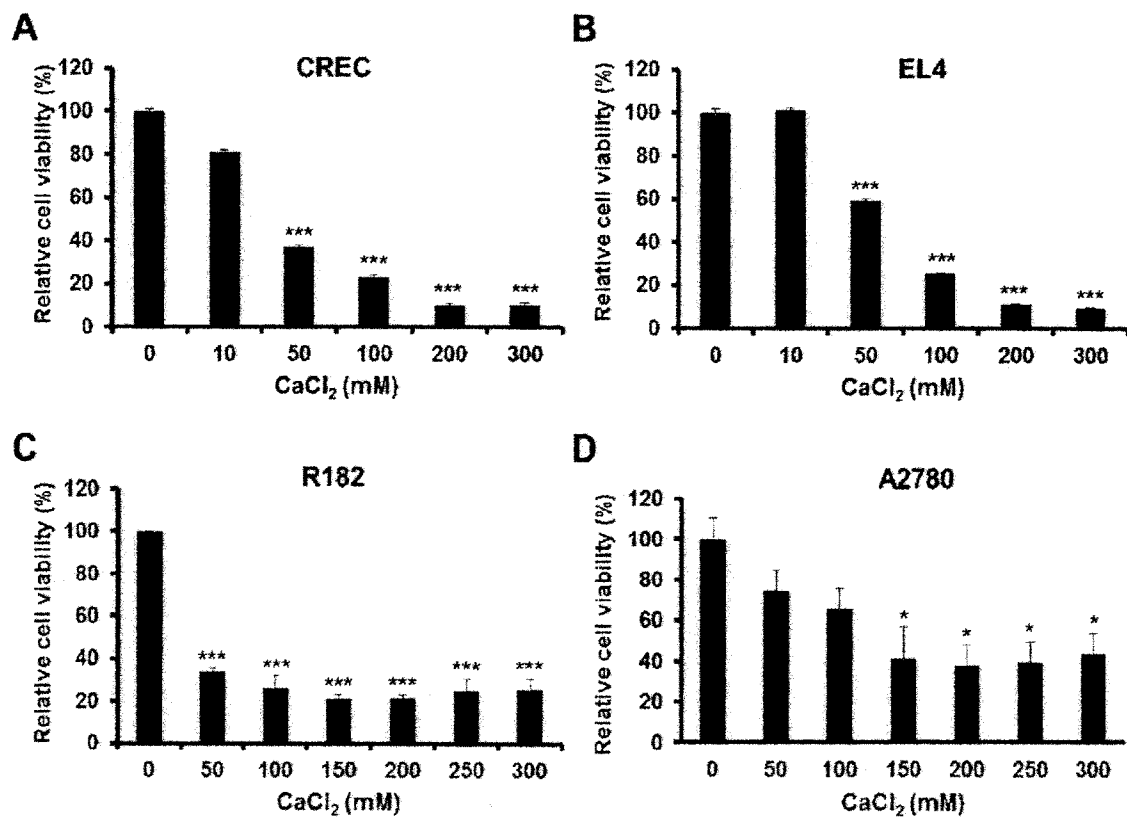
[Fig. 49]



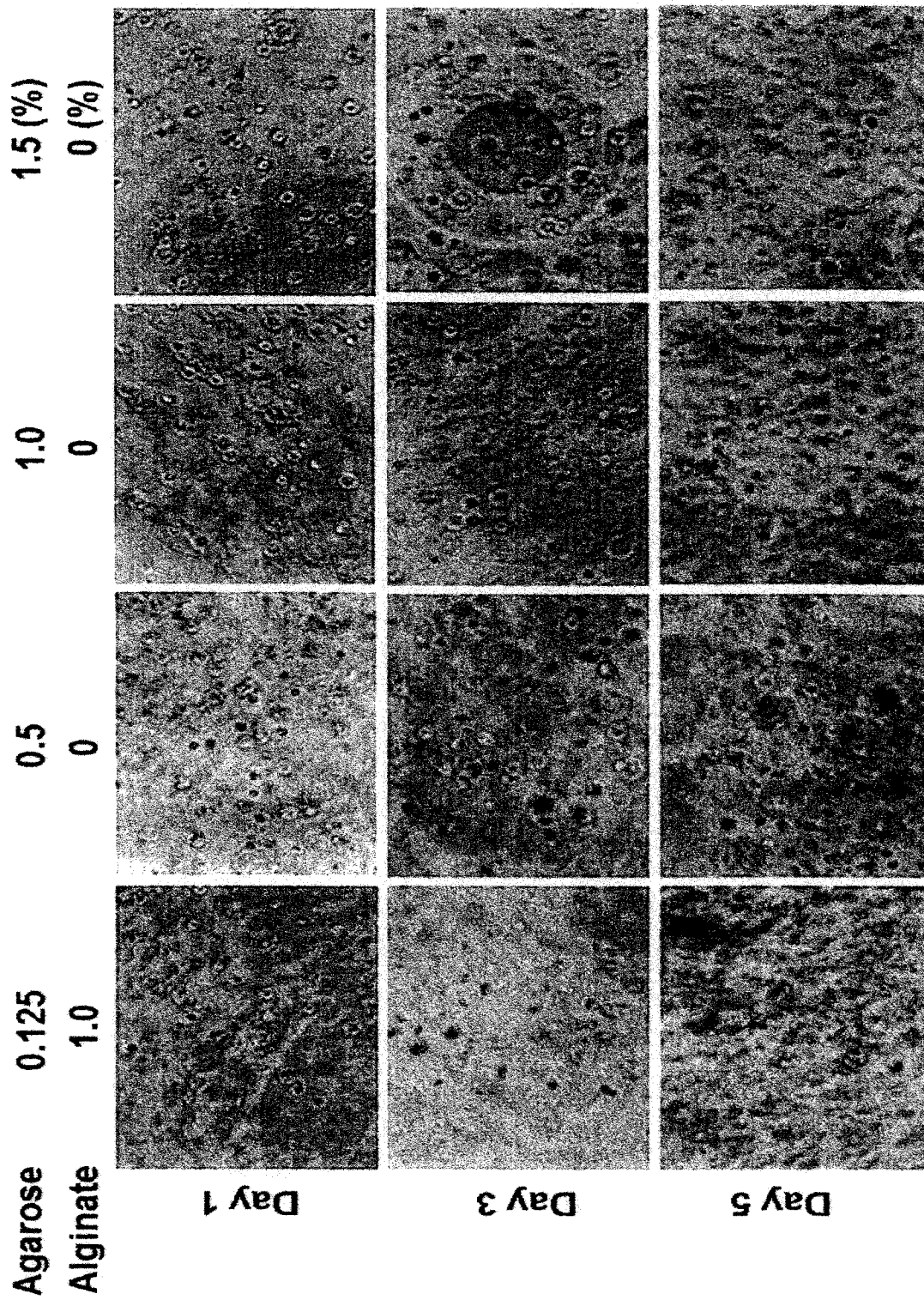
[Fig. 50]



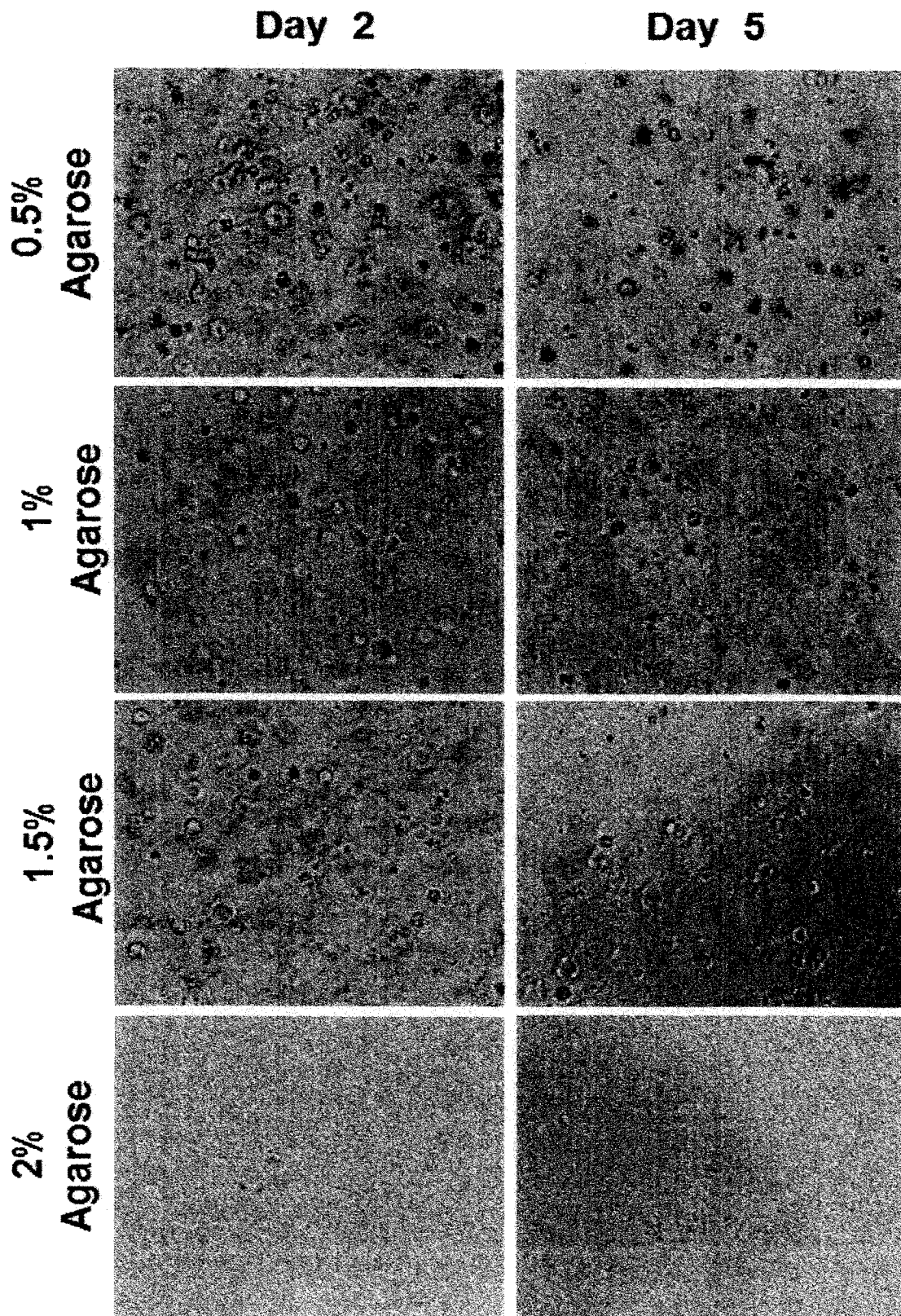
[Fig. 51]



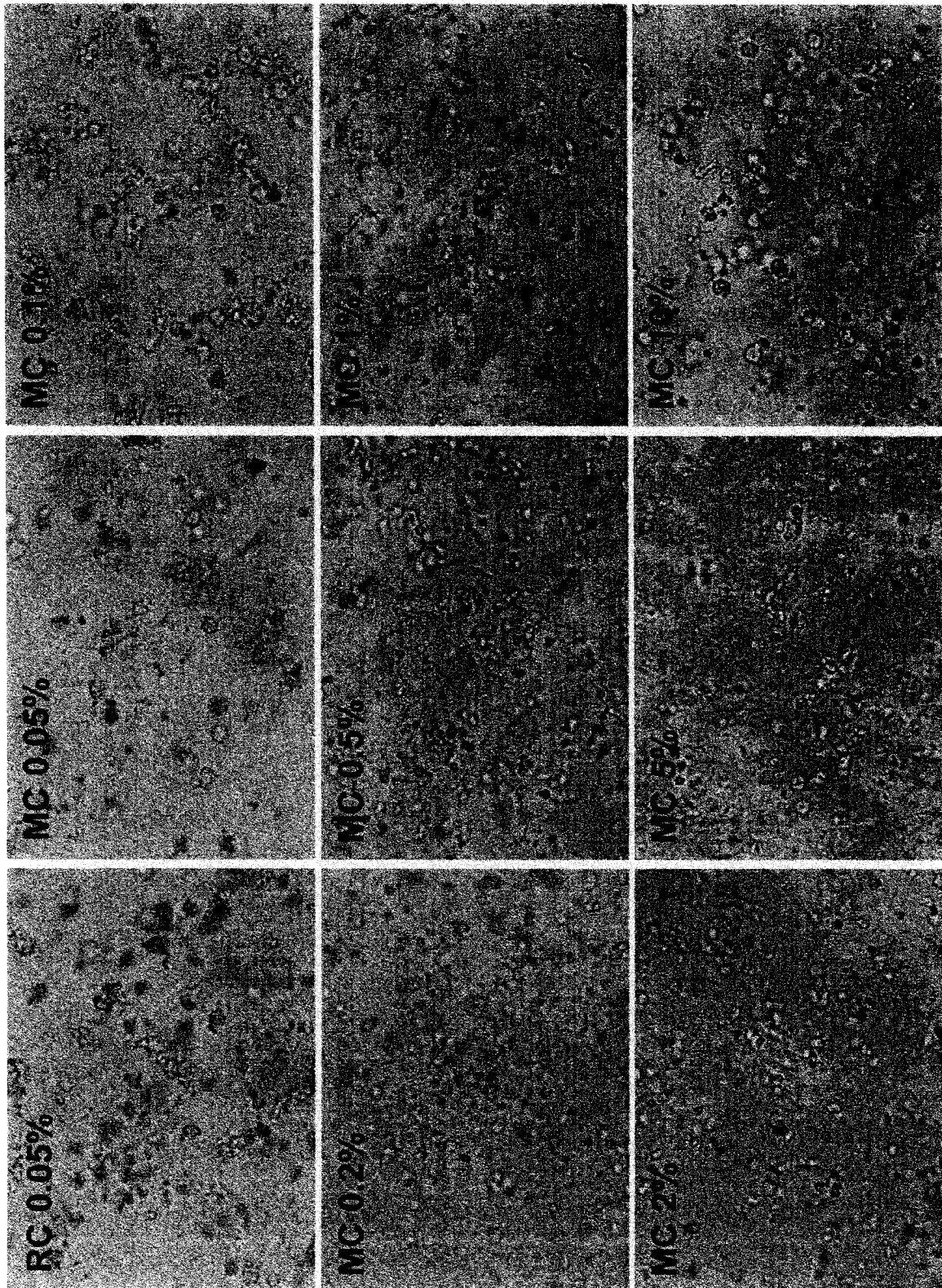
[Fig. 52]



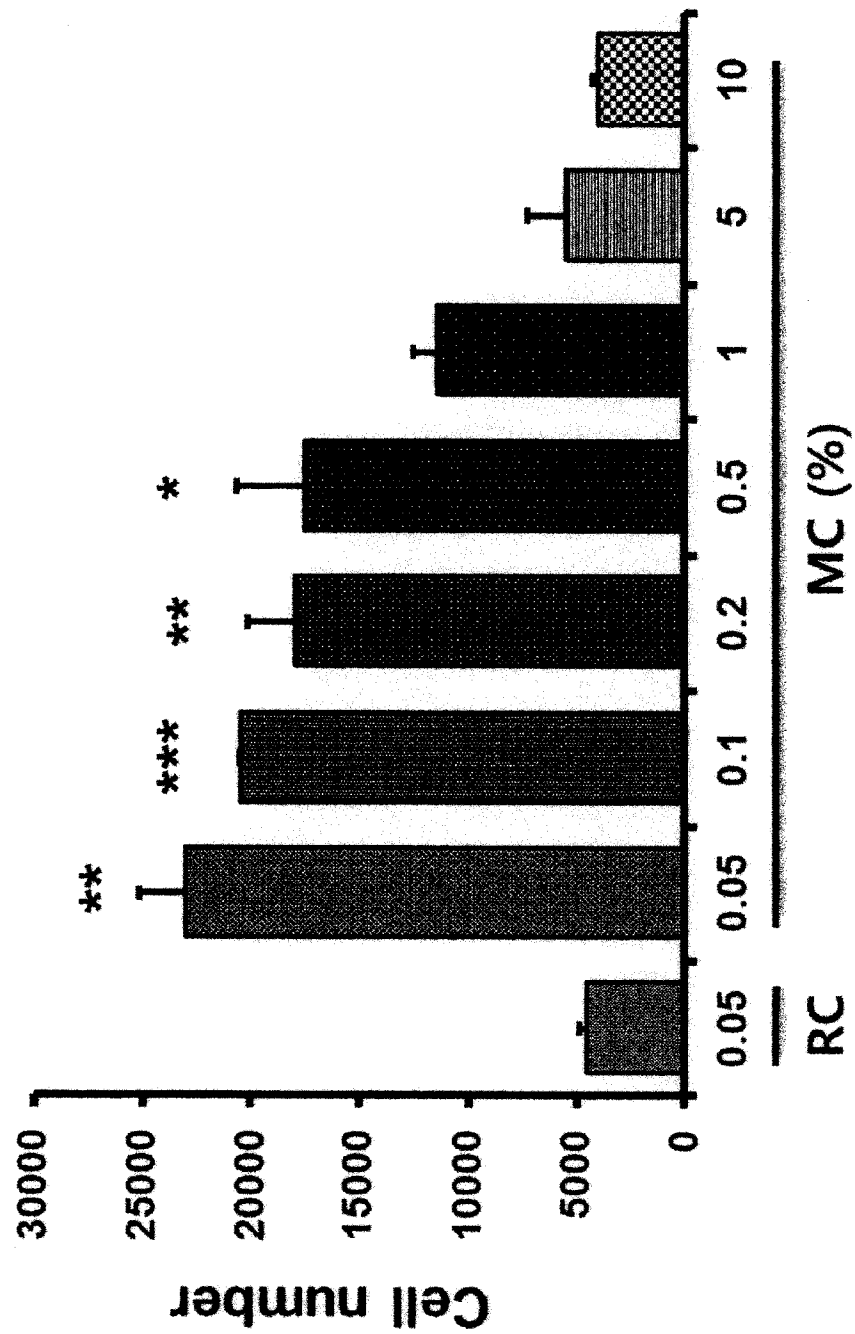
[Fig. 53]



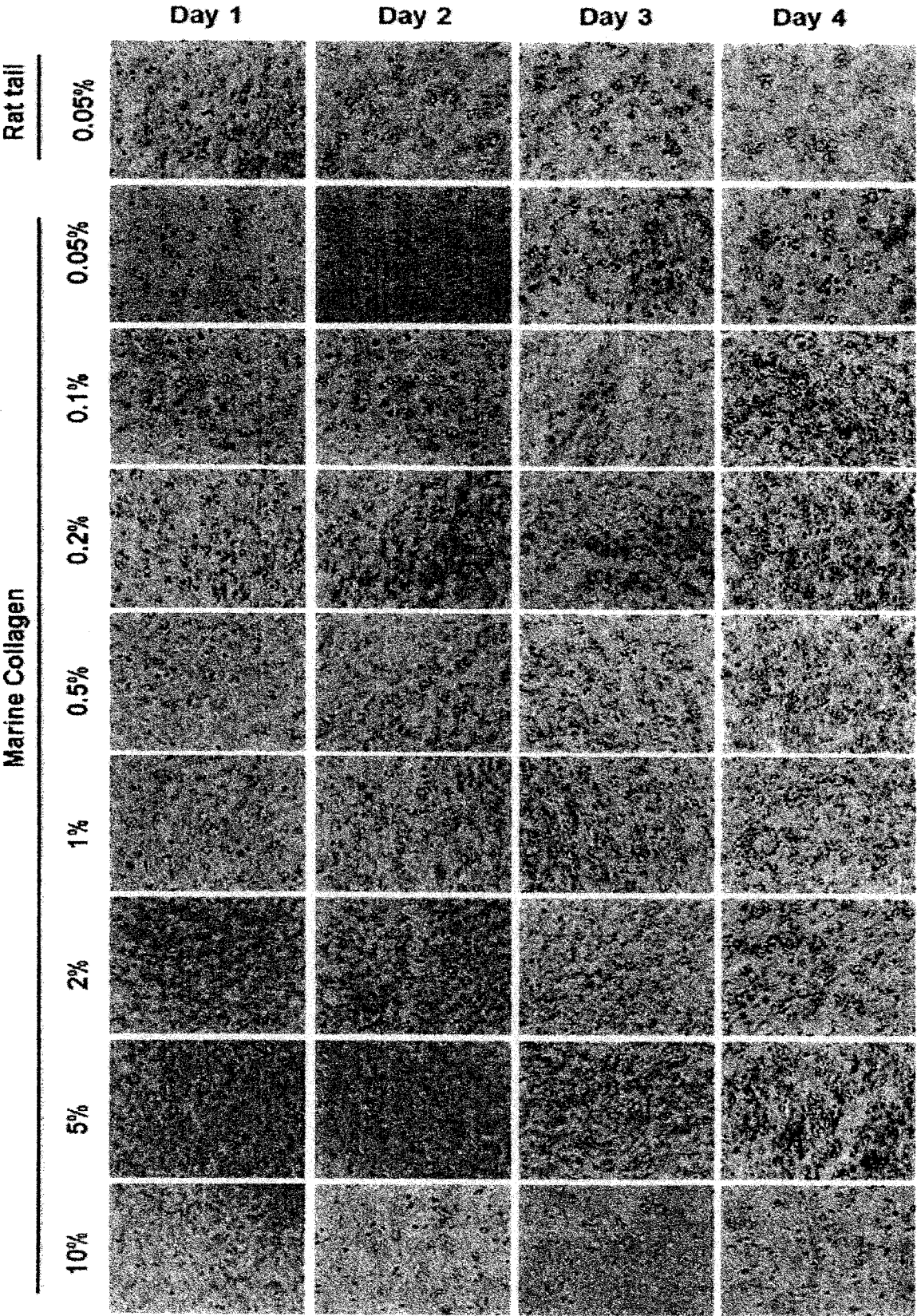
[Fig. 54]



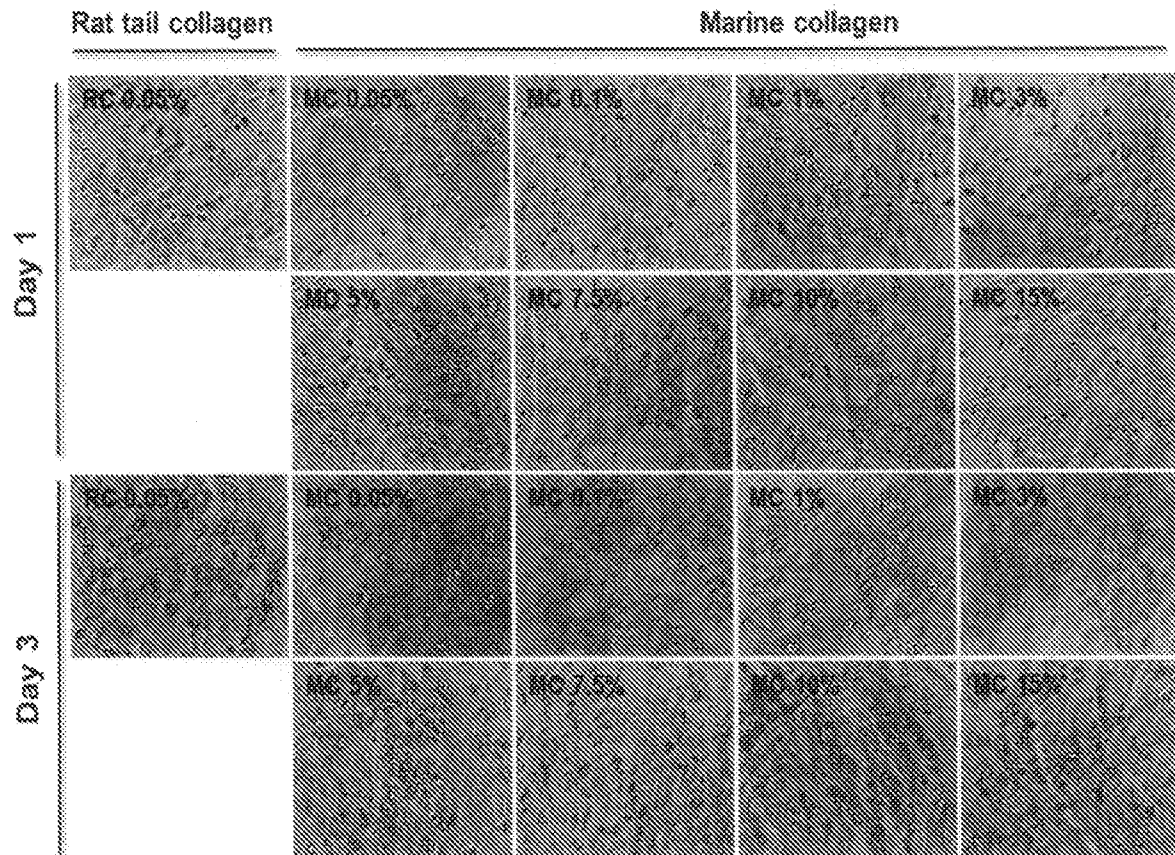
[Fig. 55]



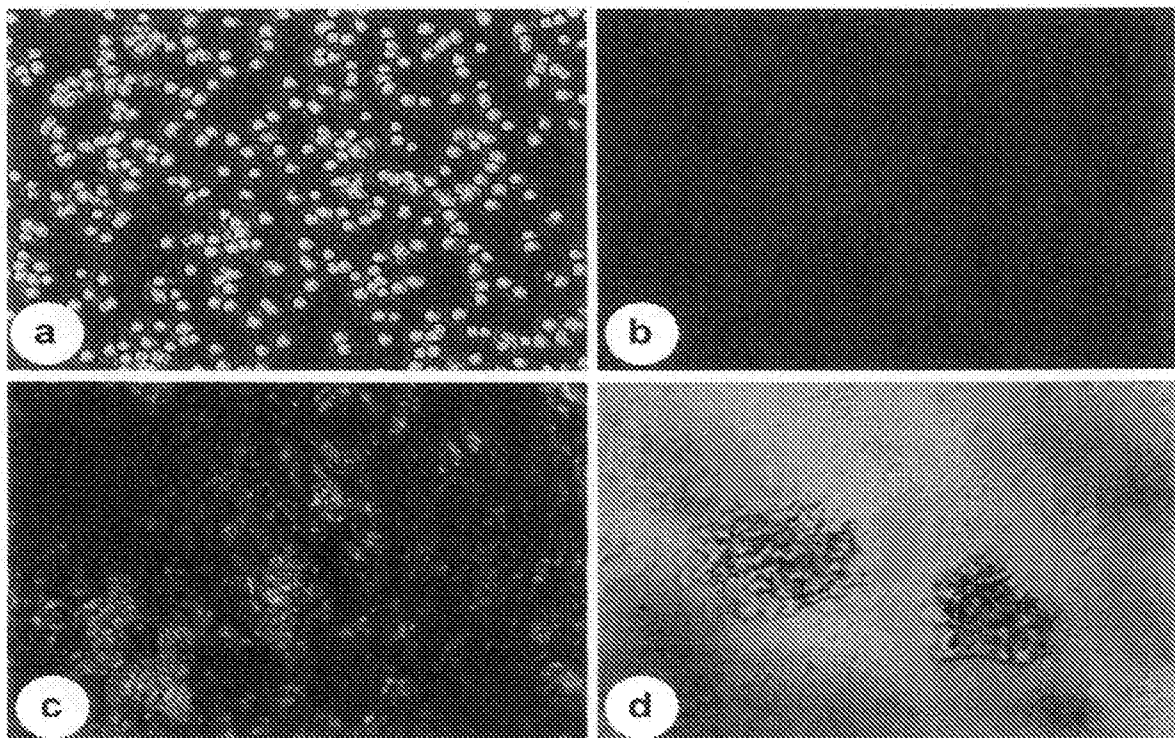
[Fig. 56]



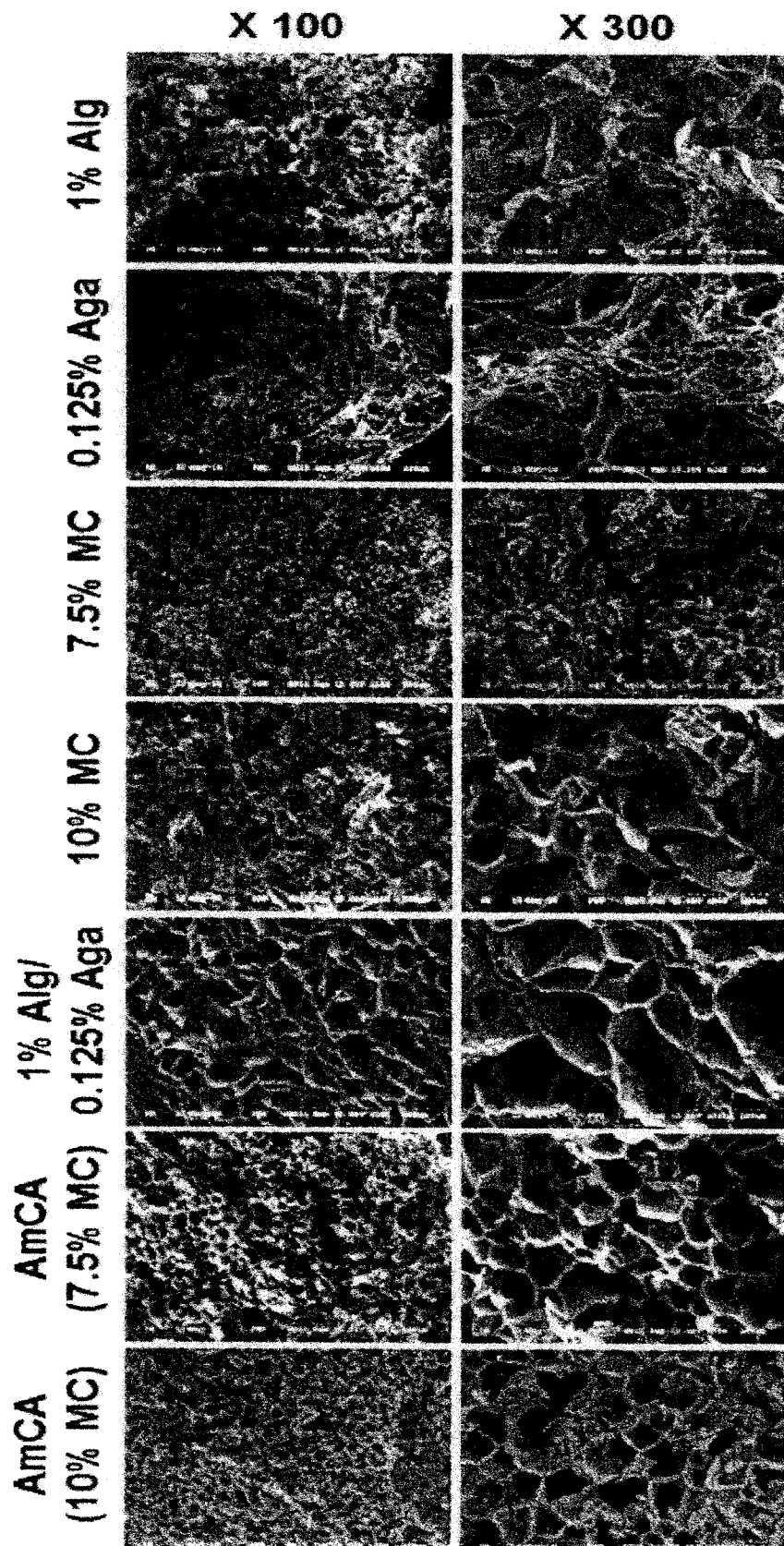
[Fig. 57]



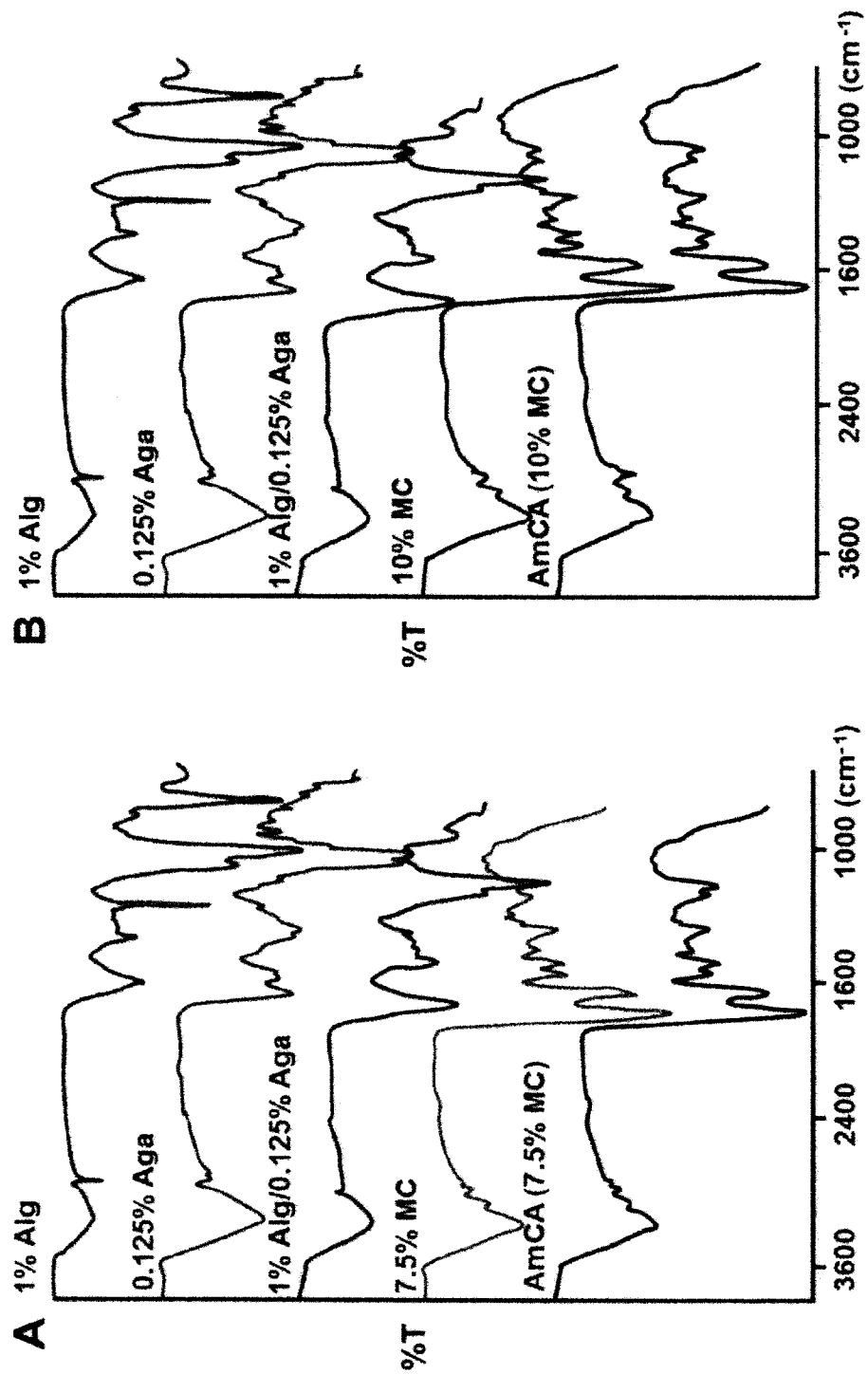
[Fig. 58]



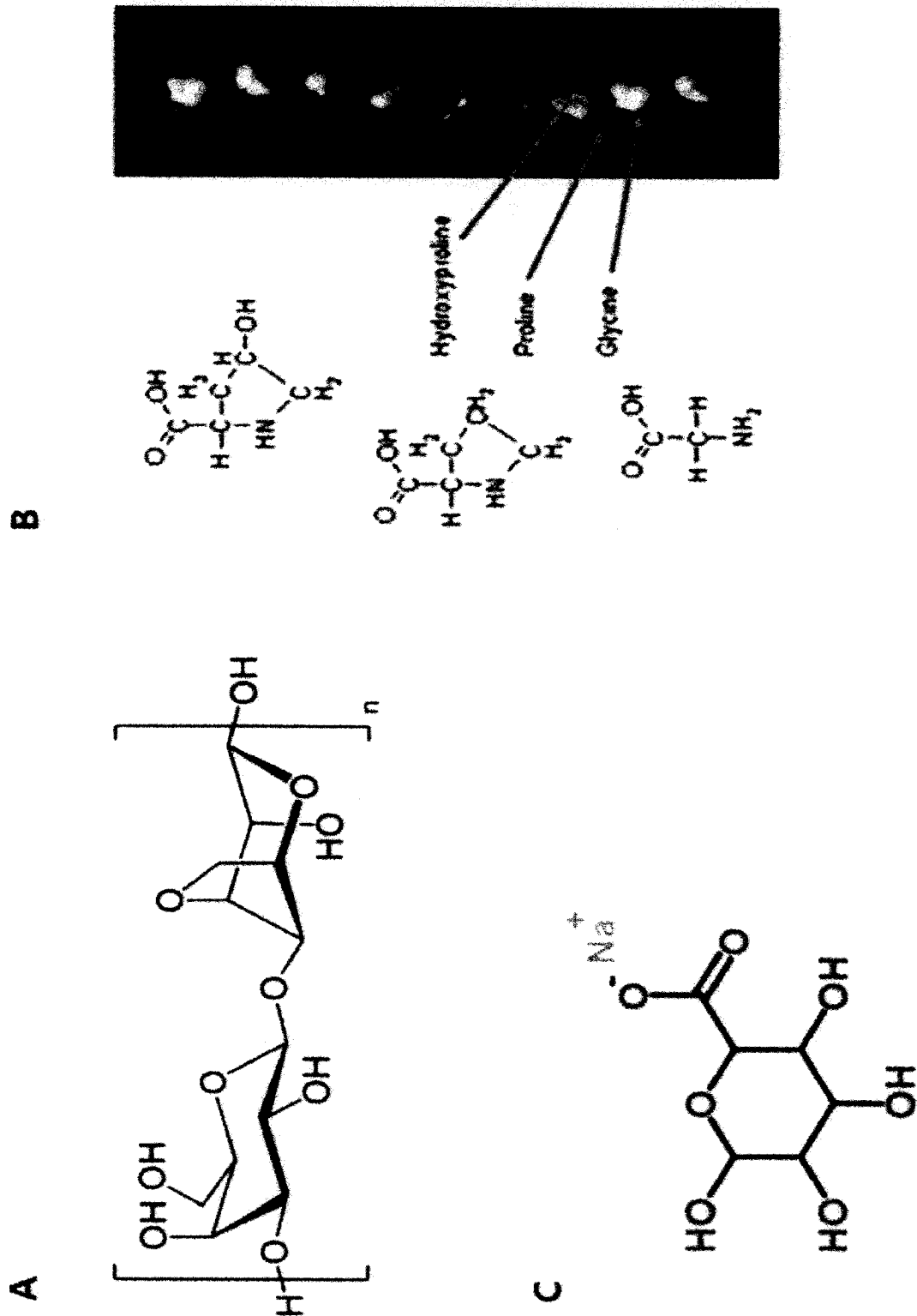
[Fig. 59]



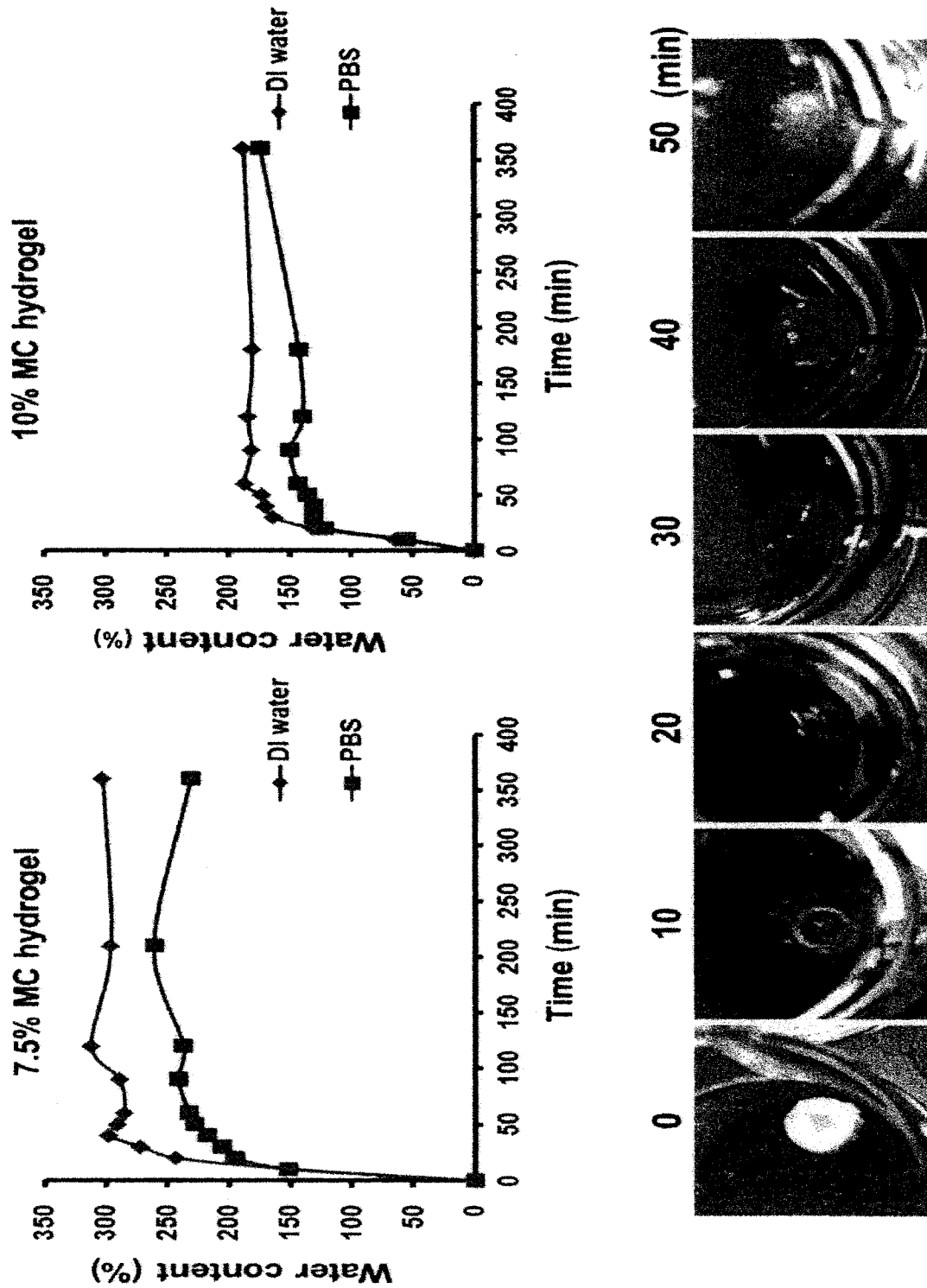
[Fig. 60]



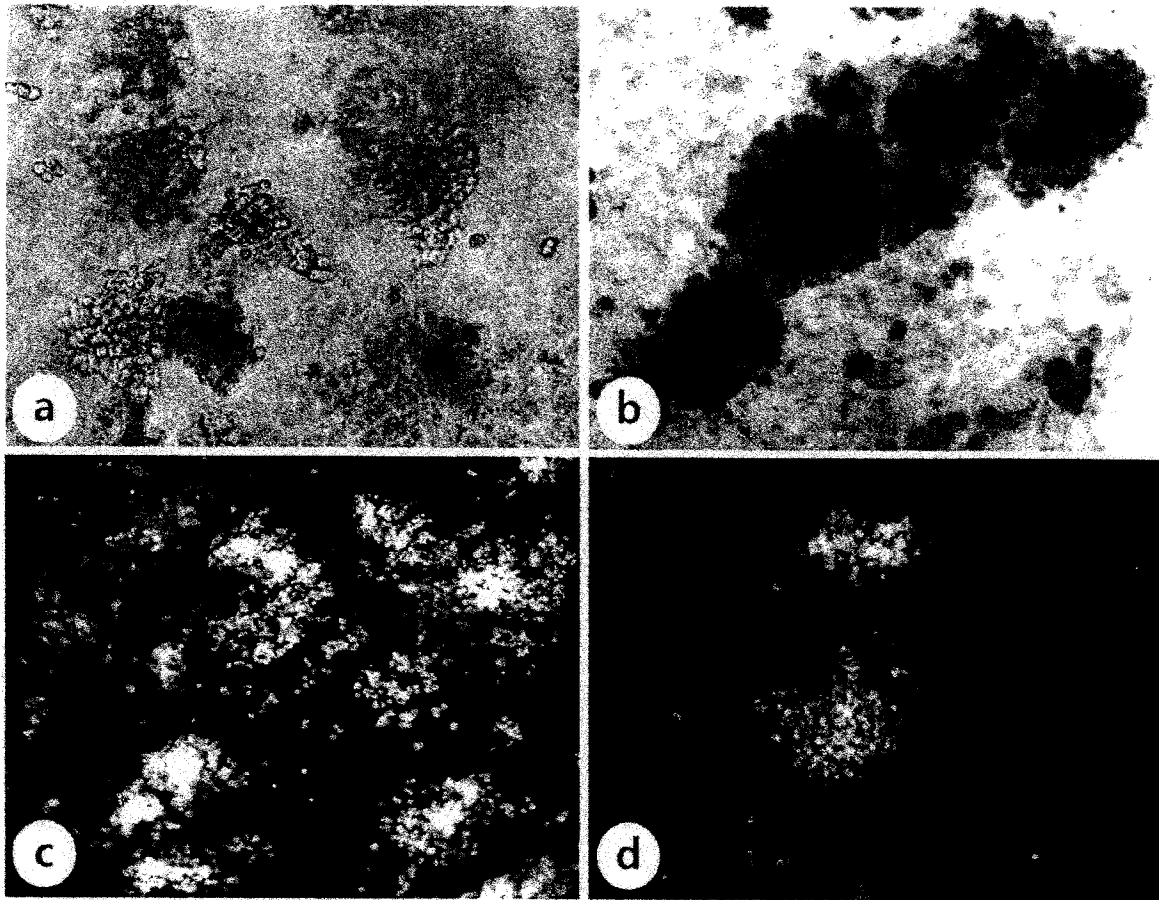
[Fig. 61]



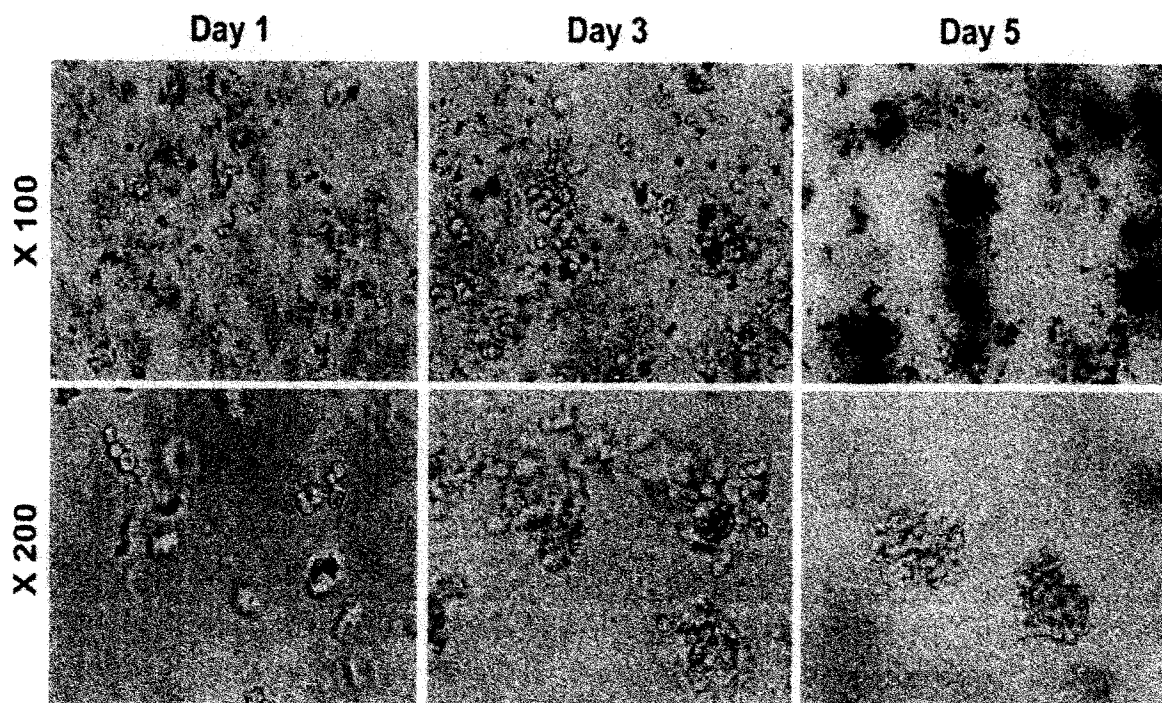
[Fig. 62]



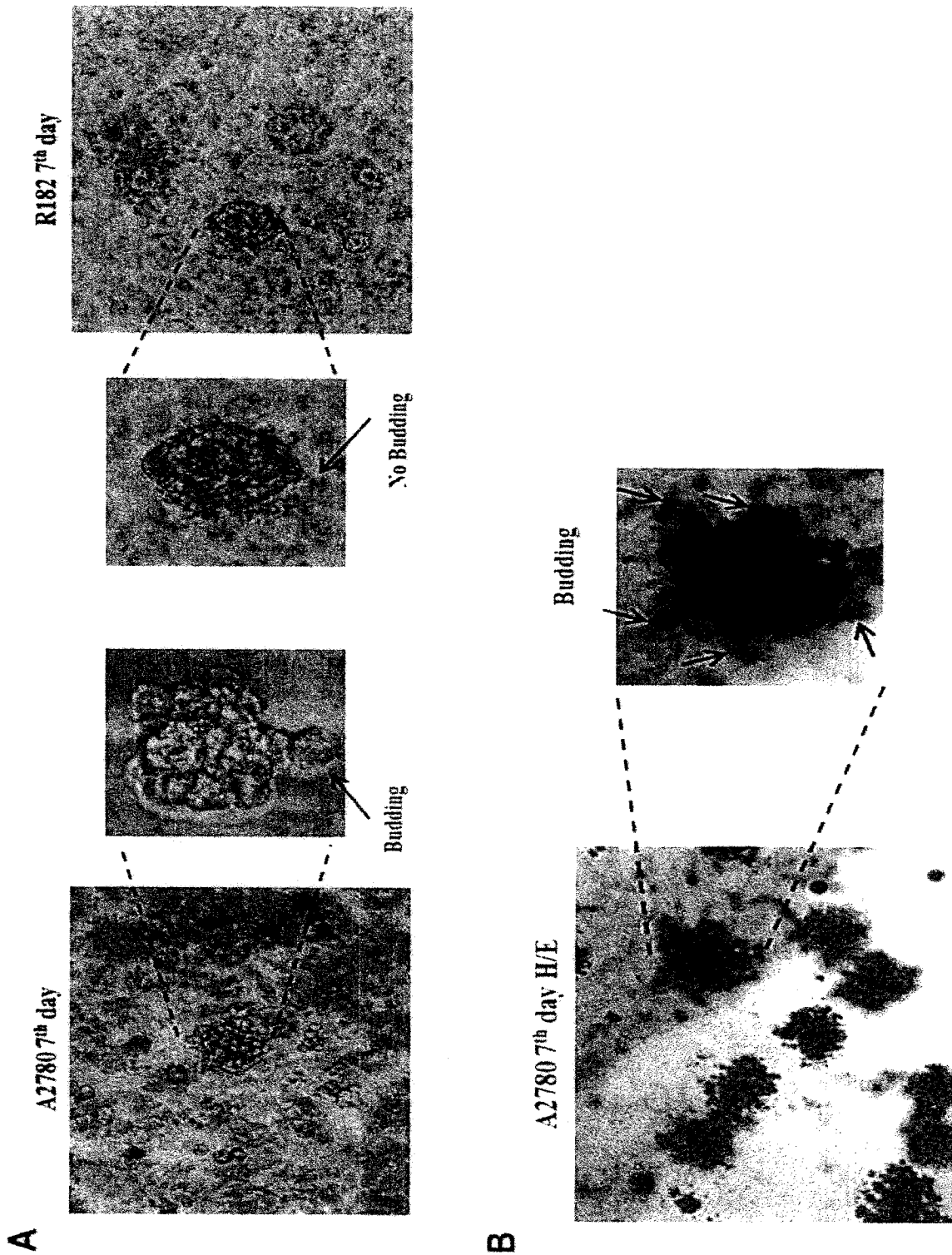
[Fig. 63]



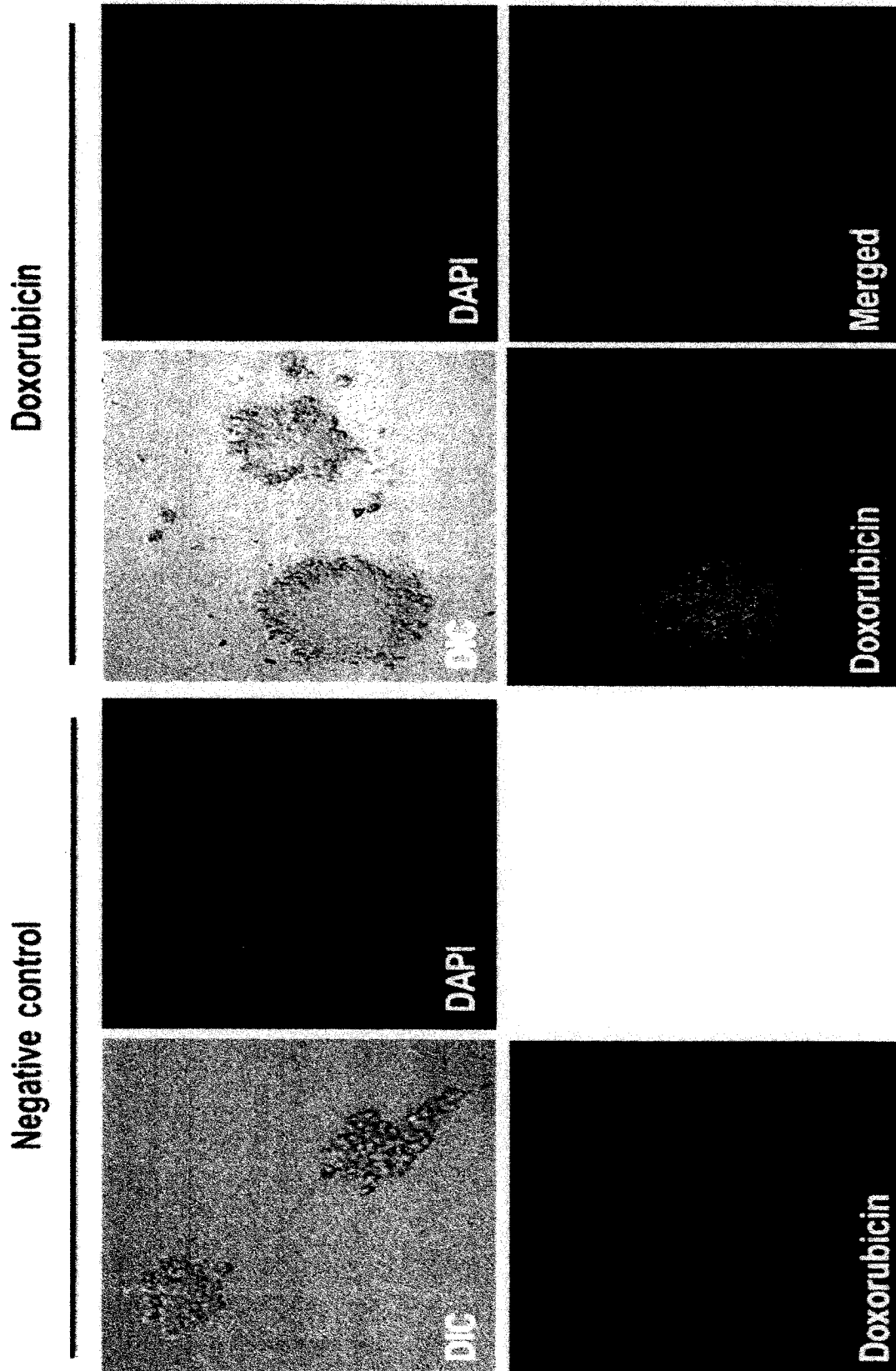
[Fig. 64]



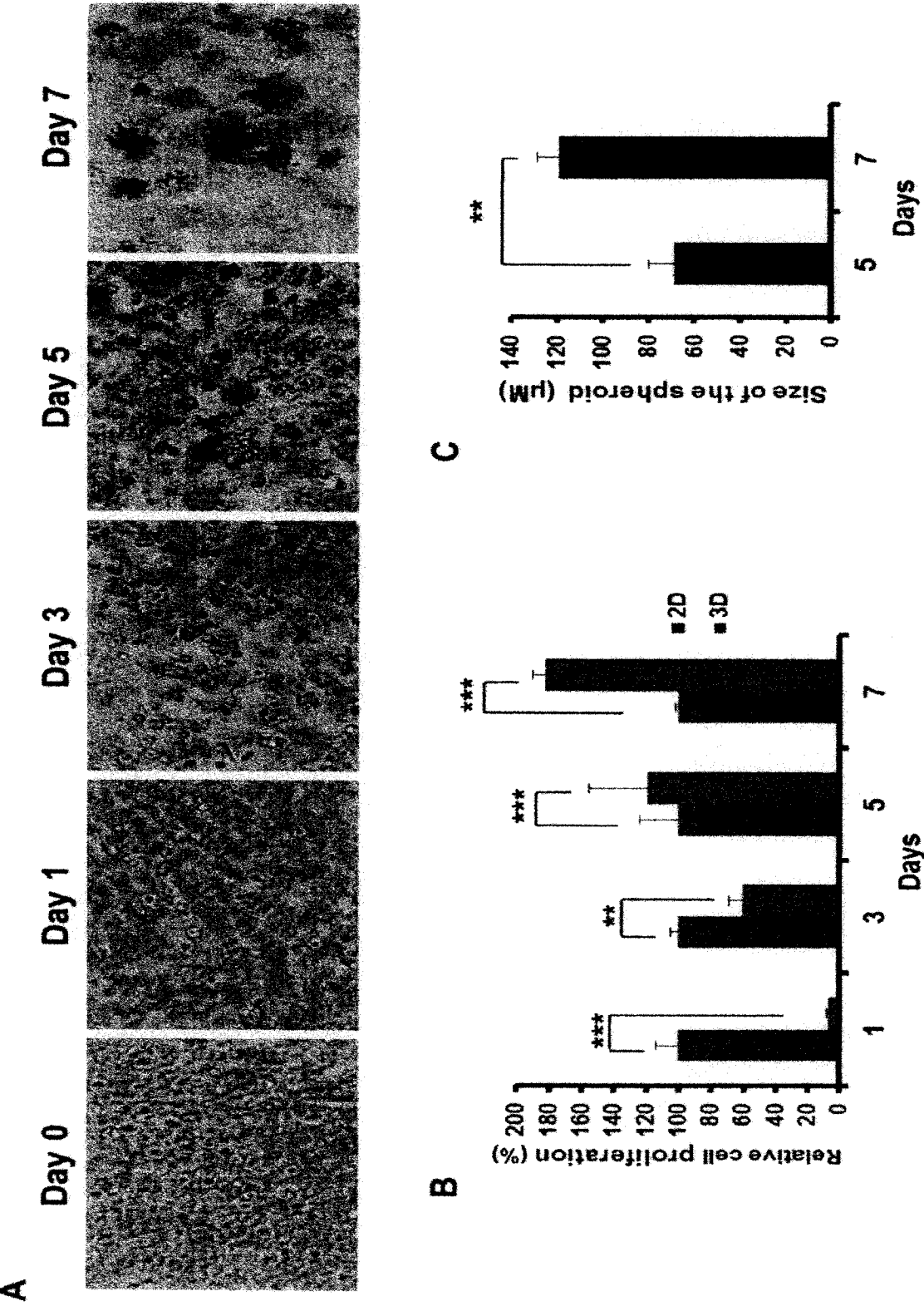
[Fig. 65]



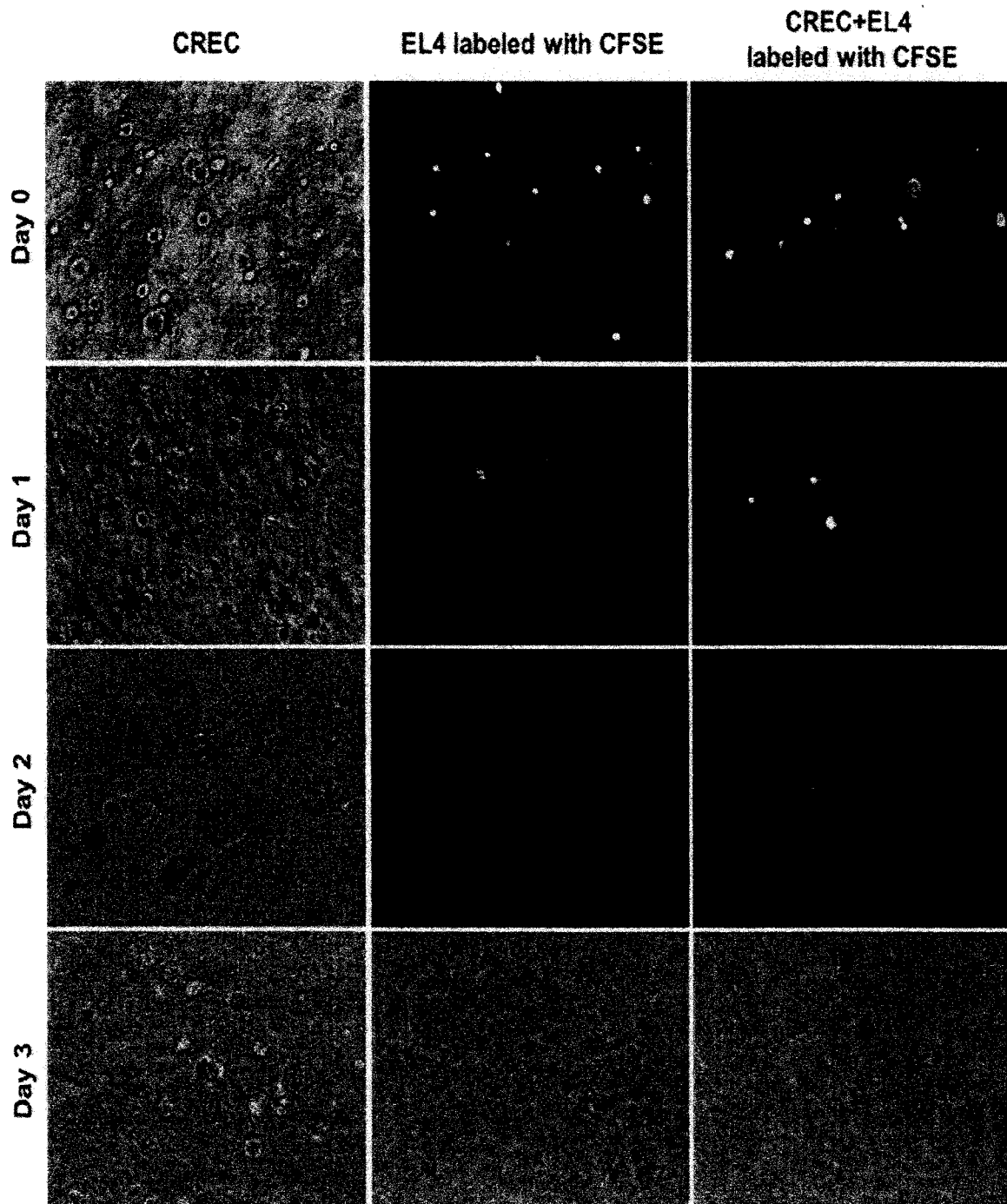
[Fig. 66]



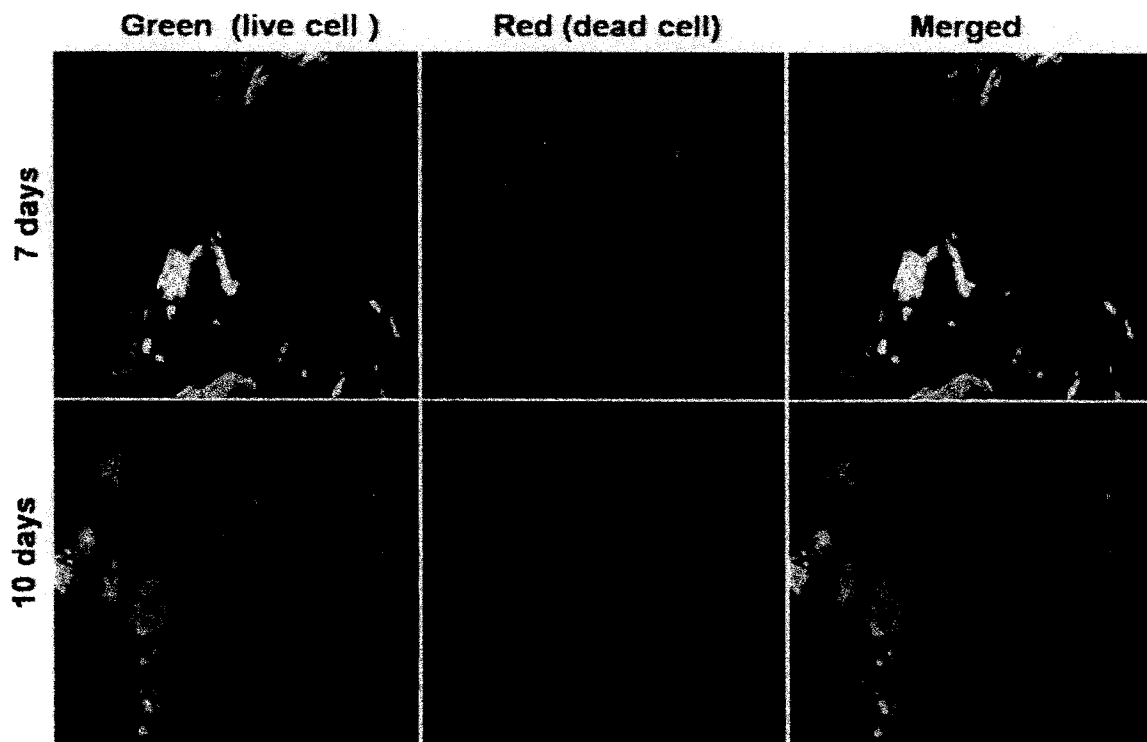
[Fig. 67]



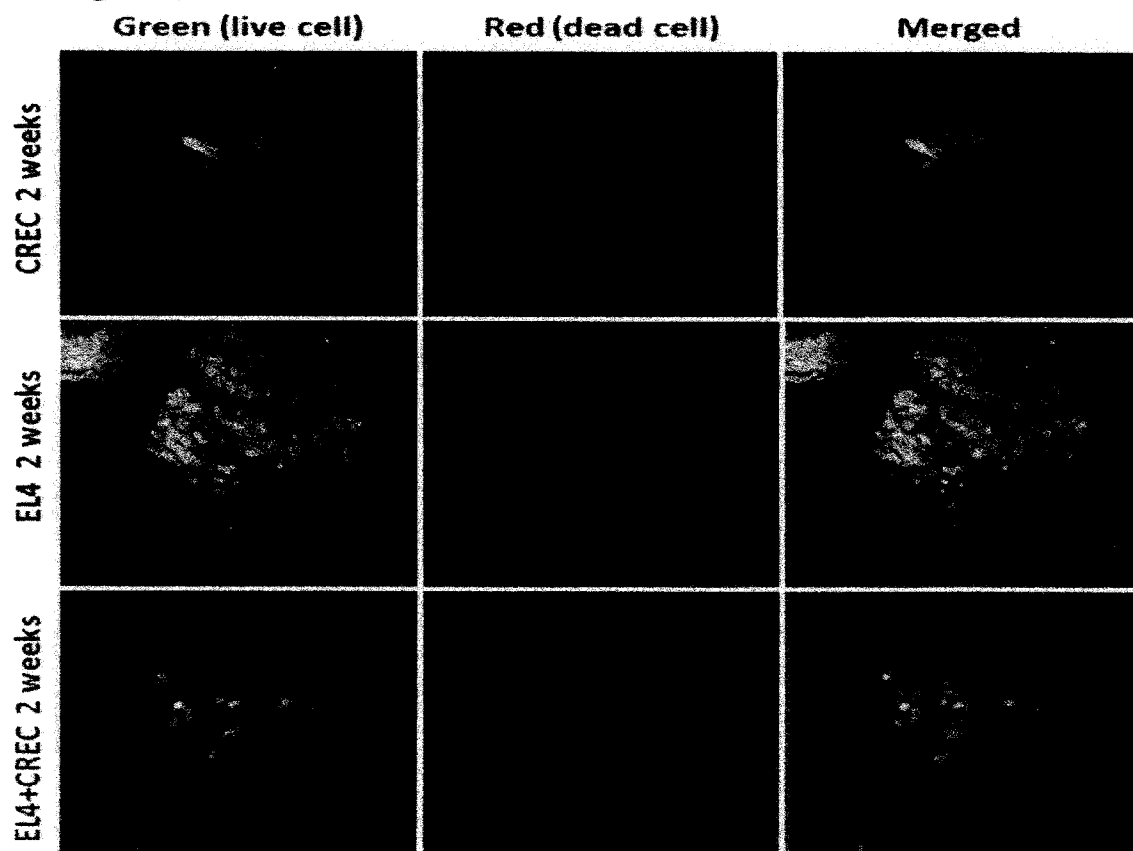
[Fig. 68]



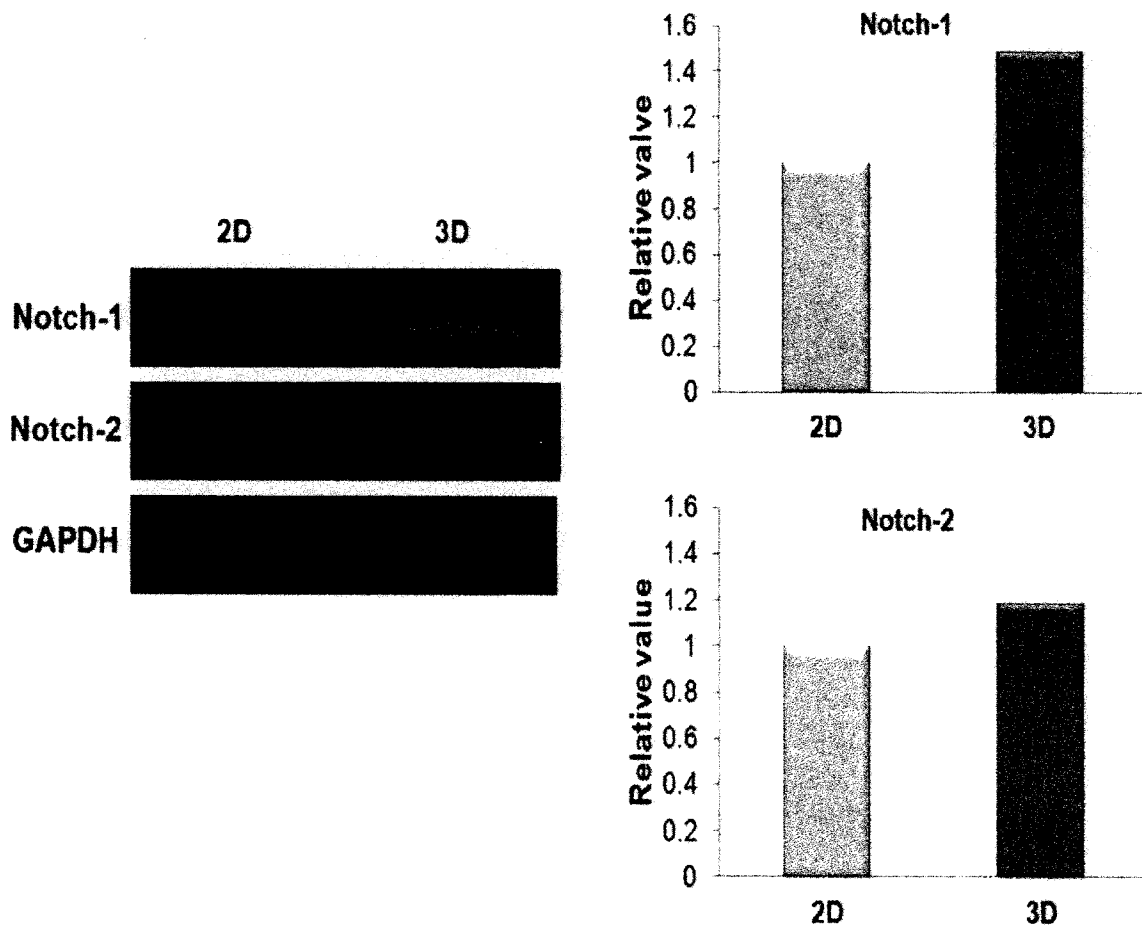
[Fig. 69]



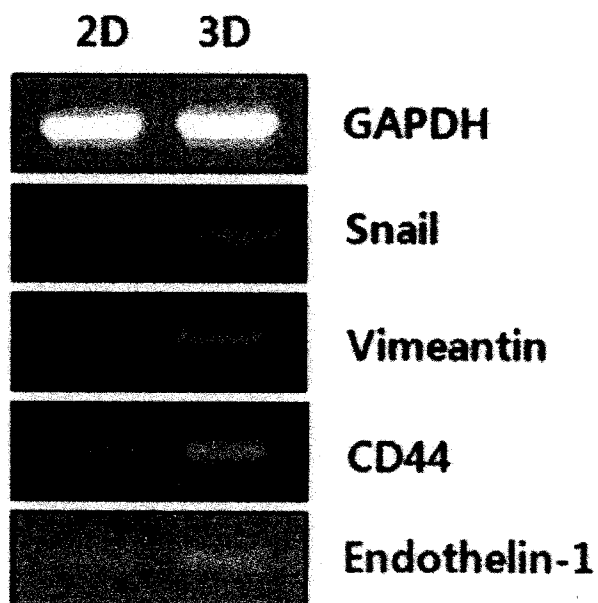
[Fig. 70]



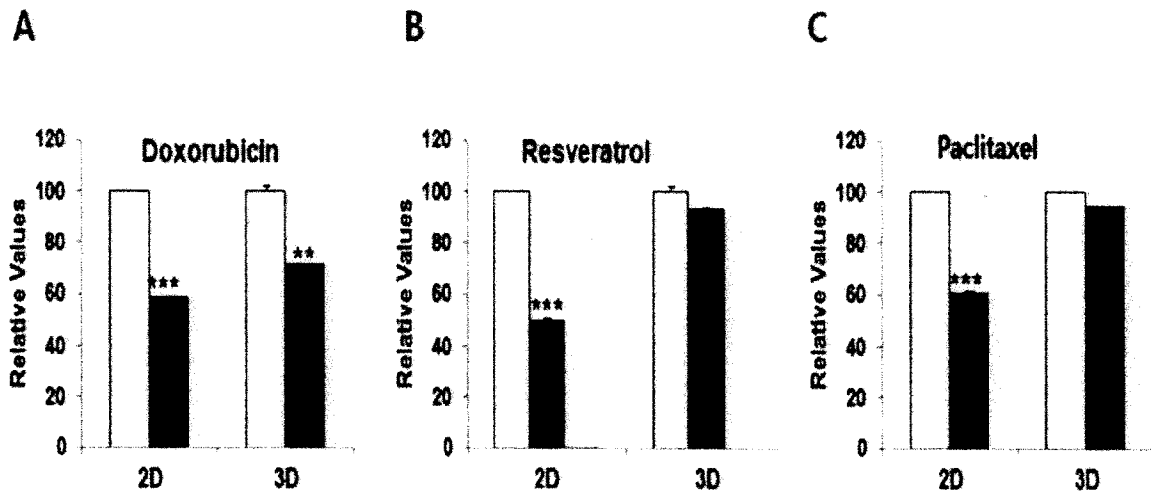
[Fig. 71]



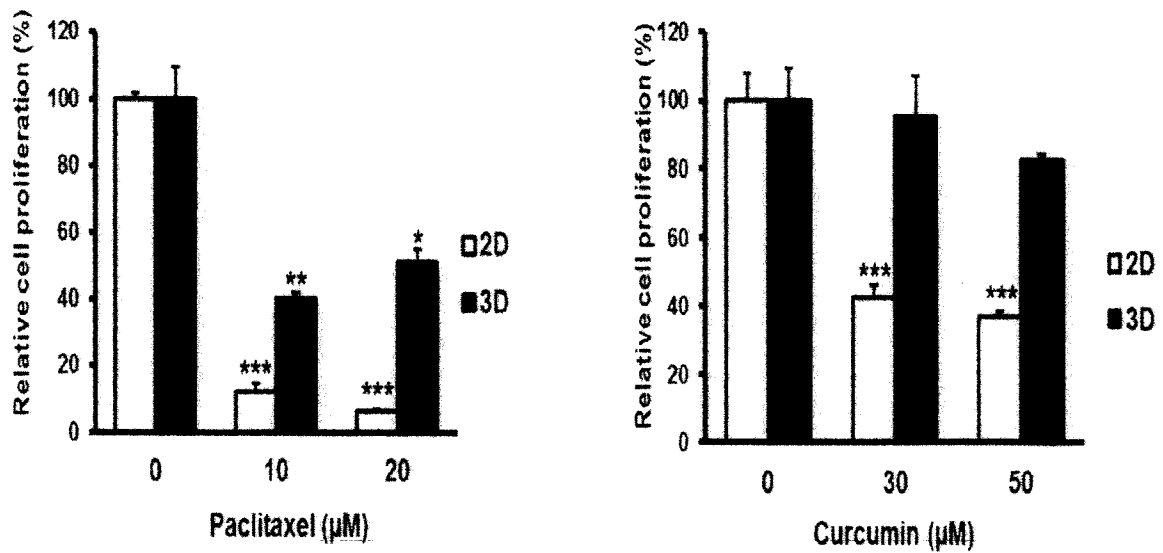
[Fig. 72]



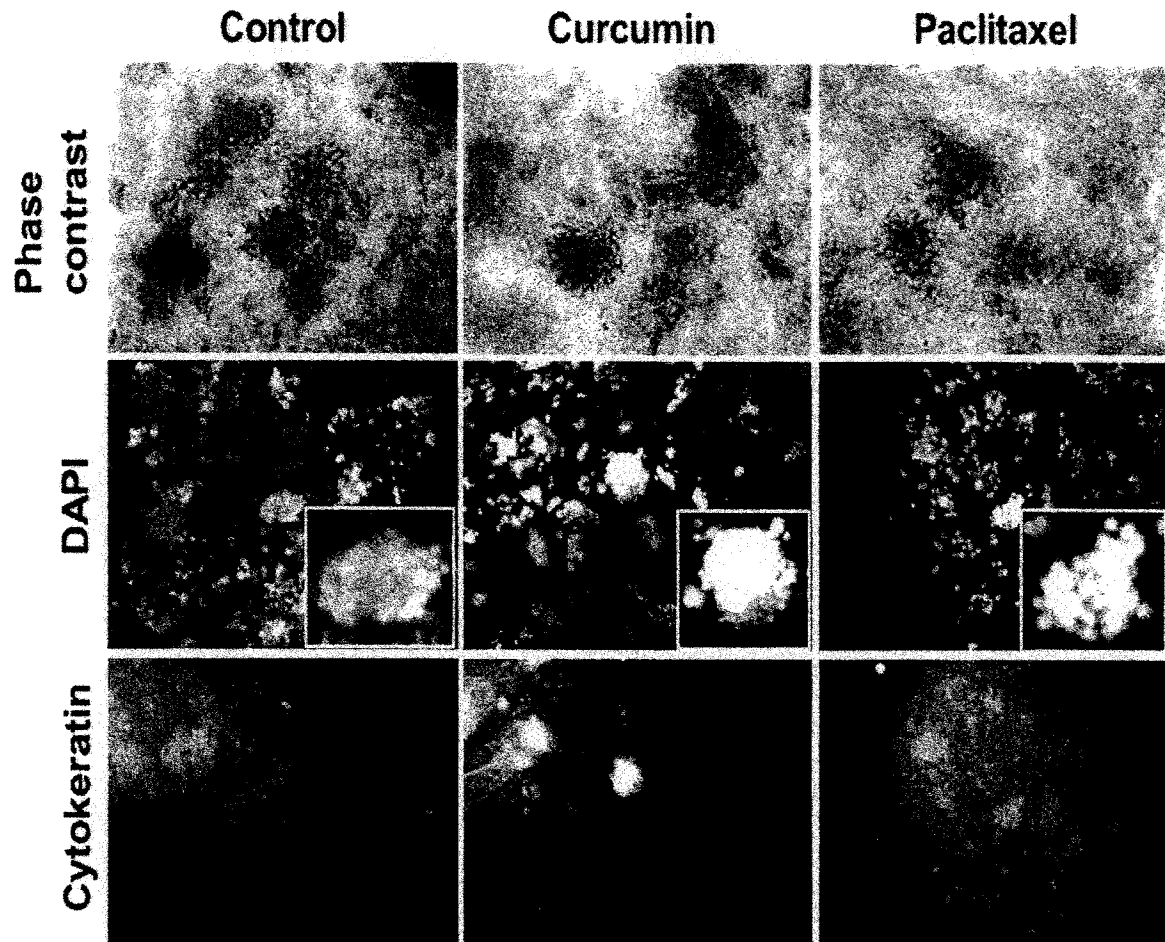
[Fig. 73]



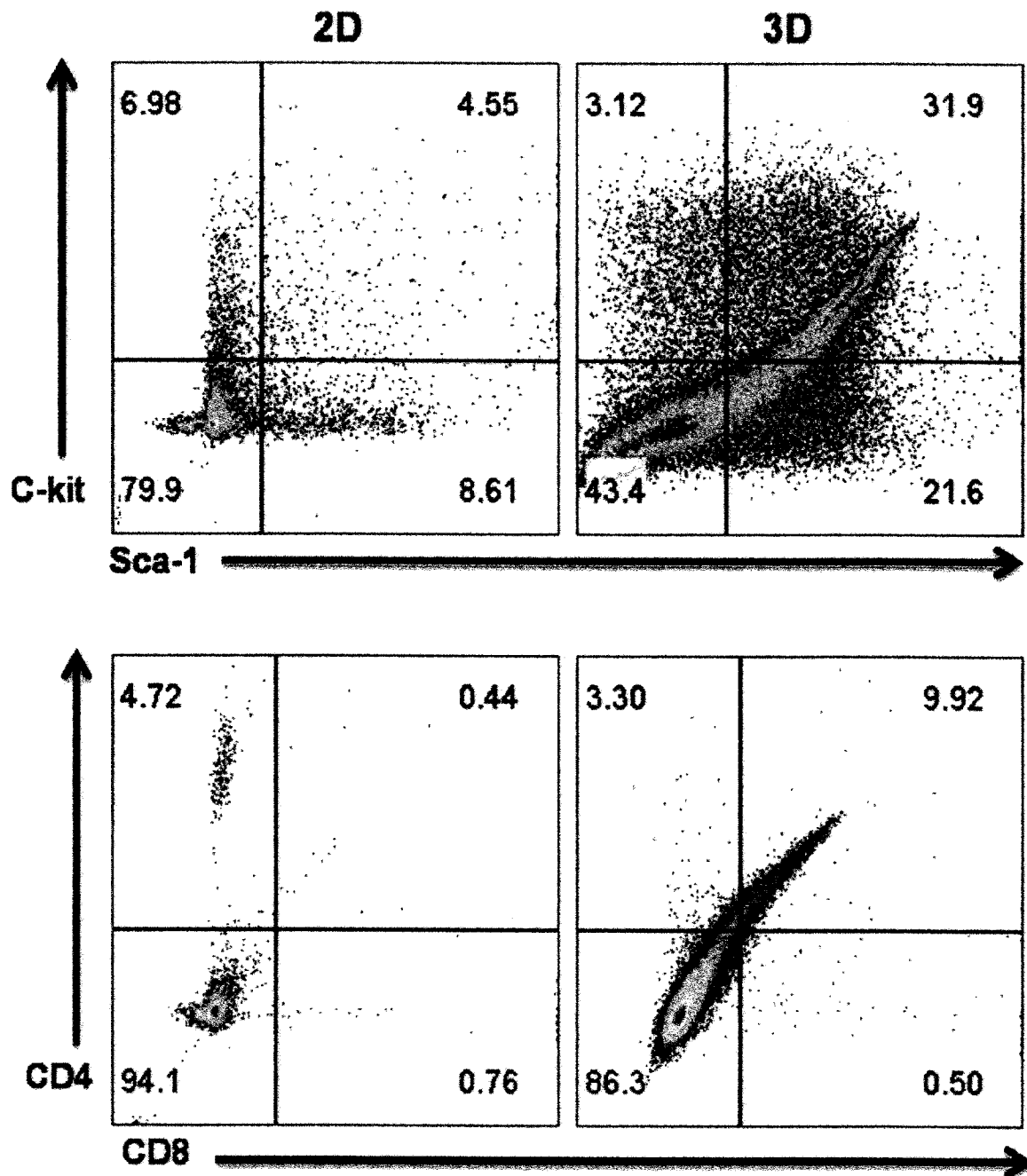
[Fig. 74]



[Fig. 75]



[Fig. 76]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007394**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C12M 3/00(2006.01)i, D04H 1/728(2012.01)i, C12N 5/07(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 33/50(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; C12N 5/06; A61L 27/14; A61K 47/30; A61K 35/32; A61L 27/40; D04H 1/728; C12N 5/07; C12N 5/09; C12Q 1/02; G01N 33/50

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: alginate, collagen, agarose, fish collagen, electro-spinning, nanofiber support

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0024092 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 02 March 2007 See the entire document.	1-20
A	ZHOU, G. et al., "Research on the Structure of Fish Collagen Nanofibers Influenced Cell Growth", Journal of Nanomaterials, no. 2013 Thesis(Article) ID 764239, page 6. See the entire document.	1-20
A	JP 2004-033135 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) 05 February 2004 See the entire document.	1-20
A	KR 10-2010-0051294 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 17 May 2010 See the entire document.	1-20



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

28 OCTOBER 2015 (28.10.2015)

Date of mailing of the international search report

29 OCTOBER 2015 (29.10.2015)

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/KR2015/007394

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2007-0024092 A	02/03/2007	CA 2621206 A1	01/03/2007
		CA 2621206 C	22/11/2011
		CN 101272814 A	24/09/2008
		EP 1917048 A1	07/05/2008
		JP 2009-507530 A	26/02/2009
		US 2008-0233162 A1	25/09/2008
		WO 2007-024125 A1	01/03/2007
		WO 2007-024125 A9	01/03/2007
JP 2004-033135 A	05/02/2004	JP 04-030368 B2	09/01/2008
		JP 2004-033136 A	05/02/2004
		US 2004-0072338 A1	15/04/2004
		US 7267982 B2	11/09/2007
KR 10-2010-0051294 A	17/05/2010	US 2010-0120149 A1	13/05/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 3/00(2006.01)i, D04H 1/728(2012.01)i, C12N 5/07(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 3/00; C12N 5/06; A61L 27/14; A61K 47/30; A61K 35/32; A61L 27/40; D04H 1/728; C12N 5/07; C12N 5/09; C12Q 1/02; G01N 33/50

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:알지네이트, 콜라겐, 아가로스, 피쉬콜라겐, 전기방사, 나노섬유 지지체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2007-0024092 A (이화여자대학교 산학협력단) 2007.03.02. 전문 참조.	1-20
A	ZHOU, G. et al., 'Research on the Structure of Fish Collagen Nanofibers Influenced Cell Growth', Journal of Nanomaterials, 2013호, 논문(Article) ID 764239, 6면. 전문 참조.	1-20
A	JP 2004-033135 A (후지 포토 필름 CO LTD) 2004.02.05. 전문 참조.	1-20
A	KR 10-2010-0051294 A (한국과학기술연구원) 2010.05.17. 전문 참조.	1-20

☐ 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 신구성 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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 28일 (28.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 29일 (29.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이효진

전화번호 +82-42-481-8743



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2007-0024092 A	2007/03/02	CA 2621206 A1	2007/03/01
		CA 2621206 C	2011/11/22
		CN 101272814 A	2008/09/24
		EP 1917048 A1	2008/05/07
		JP 2009-507530 A	2009/02/26
		US 2008-0233162 A1	2008/09/25
		WO 2007-024125 A1	2007/03/01
		WO 2007-024125 A9	2007/03/01
JP 2004-033135 A	2004/02/05	JP 04-030368 B2	2008/01/09
		JP 2004-033136 A	2004/02/05
		US 2004-0072338 A1	2004/04/15
		US 7267982 B2	2007/09/11
KR 10-2010-0051294 A	2010/05/17	US 2010-0120149 A1	2010/05/13