(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0055019
(43) 공개일자 2021년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C12N 2537/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0147155
(22) 출원일자 2020년11월05일
심사청구일자 2020년11월05일
(30) 우선권주장
1020190140792 2019년11월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
황창모
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 310동 3002호 (신천동, 파크리오)
홍소영
서울특별시 송파구 위례광장로 163, 2206동 1103호 (장지동, 위례22단지)
(74) 대리인
리앤목특허법인

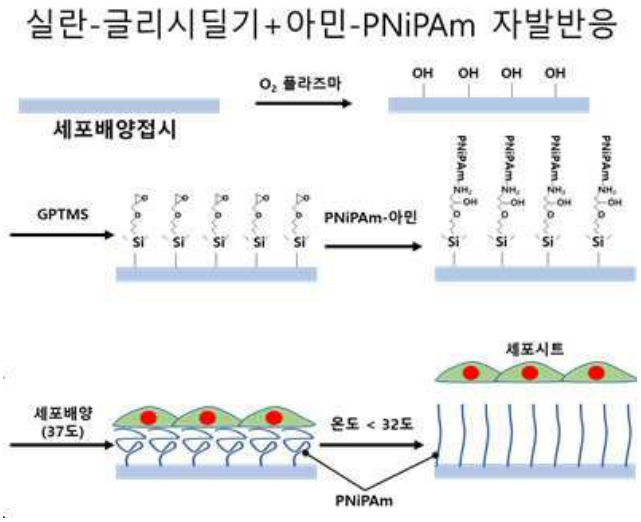
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **자발적 화학반응에 기반한 세포시트 제조용 표면 형성 방법**

(57) 요 약

자발적 화학반응에 기반한 세포시트 제조용 표면 형성 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 방법은 플라즈마 처리 및 자발적인 화학반응을 기반으로 하여, 경제적이고 친환경적인 공정으로 세포배양기재 표면에 온도감응성 물질인 폴리이소프로필아크릴아미드를 효과적으로 고정시킬 수 있다. 상기 방법으로 제조된 세포배양기재는 표면에 단계적으로 층상으로 공유결합된 분자들에 의해 폴리이소프로필아크릴아미드 작용기가 표면에 단일층을 이루어, 수화될 경우 수직방향으로 일직선으로 배열되는 구조를 가져 세포시트의 형성 및 수확이 용이하고, 자발적인 가교반응에 기반하므로 재현성이 크게 향상되어 재생 의료와 조직공학 분야에서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 2539/10 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 카르복실기 또는 글리시딜기를 고정하는 단계; 및

3) 상기 카르복실기 또는 글리시딜기가 고정된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법.

청구항 2

1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 아민기를 고정하는 단계; 및

3) 상기 아민기가 고정된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 단계 1)의 플라즈마 처리는 산소(O_2) 플라즈마를 10초 내지 10분간 처리하는 것인, 방법.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 단계 2)의 카르복시기, 글리시딜기 또는 아민기 고정은 세포배양기재 표면의 히드록시기와 실란 작용기 간 자발적인 가교반응으로 형성되는 것인, 방법.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 실란계 화합물은 알코올, 증류수 또는 이들의 혼합 용액에 용해된 형태로 처리되는 것인, 방법.

청구항 6

청구항 1 또는 2에 있어서, 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm) 용액은 0.001 내지 5%(w/v)의 농도인 것인, 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm) 코팅은 세포배양기재 표면의 카르복실기 또는 글리시딜기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 아민기 간 자발적인 가교반응으로 형성되는 것인, 방법.

청구항 8

청구항 2에 있어서, 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm) 코팅은 세포배양기재 표면의 아민기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 카르복실기 또는 글리시딜기 간 자발적인 가교반응으로 형성되는 것인, 방법.

청구항 9

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm)는 알코올, 증류수 또는 이들의 혼합 용액

에 용해된 형태로 처리되는 것인, 방법.

청구항 10

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 자발적인 가교반응은 20 내지 60℃에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

1) 청구항 1 또는 2의 방법으로 표면 형성된 세포배양기재에 세포를 배양하는 단계; 및

2) 상기 세포배양기재를 냉각하여 상기 세포배양기재의 표면에서 배양한 세포를 세포시트의 형태로 분리하는 단계를 포함하는 세포시트를 제조하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 단계 2)의 냉각은 22 내지 28℃에서 이루어지는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 자발적 화학반응에 기반한 세포시트 제조용 표면 형성 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조직공학(tissue engineering)이란 과학의 발달과 함께 등장한 새로운 분야의 하나로서 생명과학과 공학, 의학 등의 기본 개념과 과학기술을 통합 응용하는 다학제간 학문으로 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고 더 나아가 손상된 조직이나 장기를 정상적인 조직으로 대체하거나 재생시키기 위해 체내에 이식이 가능한 인공조직을 만들어 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용학문이다.

[0003] 대표적인 조직공학 기법은 우선, 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 후 분리된 세포를 배양을 통해 필요한 양만큼 증식시키고 이를 다공성 생분해성 고분자 지지체에 심어 일정기간 동안 체외 배양하여 얻어지는 하이브리드형 세포/고분자 구조물인 세포 시트를 다시 인체 내에 이식한다. 이식 후 세포들은 대부분의 조직이나 장기의 경우 신생 혈관이 형성될 때까지는 체액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받다가 인체 내에 혈관이 자라서 들어와 혈액의 공급이 이루어지면 세포들이 증식, 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 고분자 지지체는 그동안 분해되어 없어지게 되는 기법을 응용하는 것이다.

[0004] 종래에는 상기한 세포시트 제작을 위해 온도변화에 따른 친수성-소수성 변화하는 물질, 효소에 의해 분해되는 효소감응성 물질, 온도에 따라 팽창-수축기전을 보이는 소재 등을 사용하는 방법이 제시되어 왔는데, 이 경우 상기 물질들을 세포 배양 기재의 표면에 효과적으로 고정하기 위한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

[0007] 2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 카르복실기 또는 글리시딜기를 고정하는 단계; 및

[0008] 3) 상기 카르복실기 또는 글리시딜기가 고정된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

[0010] 2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 아민기를 고정하는 단계; 및

[0011] 3) 상기 아민기가 고정된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 1) 상기 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법으로 표면 형성된 세포배양기재에 세포를 배양하는 단계; 및

[0013] 2) 상기 세포배양기재를 냉각하여 상기 세포배양기재의 표면에서 배양한 세포를 세포시트의 형태로 분리하는 단계를 포함하는 세포시트를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0016] 일 양상은 1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

[0017] 2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 카르복실기 또는 글리시딜기를 고정하는 단계; 및

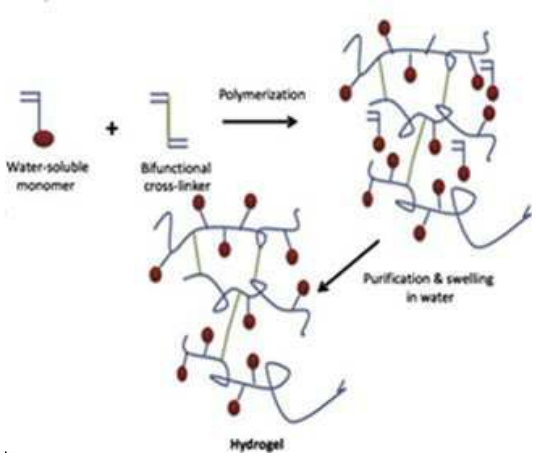
[0018] 3) 상기 카르복실기 또는 글리시딜기가 고정된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법을 제공한다.

[0019] 다른 양상은 1) 세포배양기재의 표면을 플라즈마 처리하는 단계;

[0020] 2) 상기 플라즈마 처리된 세포배양기재에 아민기를 포함하는 실란(silane)계 화합물을 처리하여 세포배양기재 표면에 아민기를 고정하는 단계; 및

[0021] 3) 상기 아민기가 고정된 세포배양기재에 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 용액을 처리하여 세포배양기재 표면에 폴리이소프로필아크릴아미드를 코팅하는 단계를 포함하는 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법을 제공한다.

[0023] 기존 세포시트 제작을 위해 온도변화에 따라 친수성-소수성의 성질이 변화하는 물질, 효소에 의해 분해되는 효소감응성 물질, 온도에 따라 팽창-수축기전을 보이는 소재 등을 사용하는 방법이 제시되어 왔으며, 상기 물질들을 세포배양기재의 표면에 고정하는 방법으로는 전자빔(E-beam), UV 가교를 포함한 화학적 가교 방법 등이 사용된다. 그러나, 이와 같은 화학적 가교 방법은 세포배양기재의 표면 형성에 사용되는 분자들이 일정한 방향으로 배열되기 어려운 단점이 있으며, 가교 조건, 사용되는 분자들의 분자량, 촉매 등의 영향으로 가교 결과가 달라질 수 있어(예를 들어, 무작위적 배열) 세포시트 제작 시 재현성이 상대적으로 낮은 특징이 있다.

[0024] 

[0026] 폴리이소프로필아크릴아미드(poly(N-isopropylacrylamide), PNiPAm) 역시, 기존에 전자빔, UV 등에 따른 화학적 가교방법을 사용하면 가교 후 비정형 배열구조가 형성되어, 세포시트 제작 시 재현성이 높지 않다는 문제점이 있다(도 1).

[0028] 이에, 본 발명자들은 전자빔, UV 등을 사용하는 화학적 가교방법이 아닌, 플라즈마 표면개질 및 자발적인 화학반응에 기반하여 온도감응성 물질을 세포배양기재의 표면에 효율적으로 고정시키고, 나아가 상기 제조된 세포배양기재를 사용하여 높은 재현성으로 세포시트를 수득할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0030] 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법의 단계 1)은 세포배양기재를 플라즈마 처리하여 세포배양기재의 표면을 활성화시키는 것이다.

[0031] 상기 단계 1)의 플라즈마 처리는 산소(O_2) 플라즈마를 10초 내지 10분간 처리하는 것일 수 있고, 바람직하게는 10초 내지 5분간 처리하는 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 10초 내지 1분간 처리하는 것일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 10초 내지 30초간 처리하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 플라즈마 처리는 UV 가교용 촉매 등이 사용되지 않아 친환경적이며, 전자빔 가교방식에 비해 경제적이어서 제조장비에 의한 생산 비용을 낮출 수 있다는 이점이 있다.

[0033] 일 구체예에 있어서, 상기 단계 1)은 산소 플라즈마 장치 내부에 폴리머 재질의 조직 배양 폴리스티렌(Tissue culture polystyrene: TCPS) 접시를 넣고, 10^{-2}Torr(1 Torr=1 mmHg) 이하에 도달한 후, 분당 30입방센티미터의 산소를 공급하는 상태에서 산소(O_2) 플라즈마를 30초간 처리하여 세포배양기재의 표면에 히드록시기(-OH)의 표면 작용기가 발생하도록 유도하였다.

[0035] 상기 단계 2)의 카르복실기, 글리시딜기 또는 아민기 고정은 세포배양기재 표면의 히드록시기와 카르복실기, 글리시딜기 또는 아민기를 포함하는 실란(silane)계 화합물의 실란 작용기 간 자발적인 가교반응으로 형성될 수 있다.

[0036] 상기 실란계 화합물은 알코올, 증류수 또는 이들의 혼합 용액에 용해된 형태로 플라즈마 처리된 세포배양기재에 접촉시켜 반응을 진행할 수 있다. 또한, 상기 반응은 상온 내지 150℃에서 이루어질 수 있고, 바람직하게는 상온 내지 60℃에서 이루어질 수 있고, 보다 바람직하게는 상온에서 이루어질 수 있으며, 0 내지 24시간 동안 진행할 수 있고, 바람직하게는 0 내지 12시간 동안 진행할 수 있고, 보다 바람직하게는 0 내지 6시간 동안 진행할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 1 내지 3시간 동안 진행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 실란계 화합물은 카르복실기, 글리시딜기 또는 아민기를 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 실란계 화합물이 카르복실기를 포함하는 경우(예를 들어, APTMS) 및 글리시딜기를 포함하는 경우(예를 들어, GPTMS) 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계에서 아민기(-NH_2)를 포함하는 PNiPAm 용액을 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 상기 실란계 화합물이 아민기를 포함하는 경우(예를 들어, APTES), 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계에서 카르복실기 또는 글리시딜기를 포함하는 PNiPAm 용액을 사용할 수 있다.

[0040] 상기 단계 2)의 고정 단계를 통하여 실란-히드록시기 사이의 결합반응과 실란-실란 가교반응이 발생하여 세포배양기재의 표면층이 형성되며, 반응에 참여하지 않은 카르복실기, 글리시딜기 또는 아민기가 노출된 세포배양기재를 도출할 수 있다.

[0042] 본 명세서에서, 상기 카르복실기를 포함하는 실란은 예를 들어 3-아크릴아미도프로필트리메속시실란(3-ACRYLAMIDOPROPYLTRIMETHOXYSILANE), N-(3-아크릴옥시-2-히드록시프로필)-3-아미노프로필트리에톡시실란(N-(3-ACRYLOXY-2-HYDROXYPROPYL)-3-AMINOPROPYLTRIETHOXYSILANE), 아크릴옥시메틸트리메톡시실란

(ACRYLOXYMETHYLTRIMETHOXYSILANE), (아크릴옥시메틸)펜에틸트리메톡시실란((ACRYLOXYMETHYL)PHENETHYLTRIMETHOXYSILANE), (3-아크릴옥시프로필)트리메톡시실란((3-ACRYLOXYPROPYL)TRIMETHOXYSILANE), (3-메타크릴아미도프로필)트리에톡시실란((3-METHACRYLAMIDOPROPYL)TRIETHOXYSILANE), 메타크릴옥시메틸트리에톡시실란(METHACRYLOXYMETHYLTRIETHOXYSILANE), 메타크릴옥시메틸트리메톡시실란(METHACRYLOXYMETHYLTRIMETHOXYSILANE), 메타크릴옥시프로필트리에톡시실란(METHACRYLOXYPROPYLTRIETHOXYSILANE), 메타크릴옥시프로필트리이소프롭옥시실란(METHACRYLOXYPROPYLTRIISOPROPOXYSILANE), 메타크릴옥시프로필드리메톡시실란(METHACRYLOXYPROPYLTRIMETHOXYSILANE), (3-아크릴옥시프로필)메틸디에톡시실란((3-ACRYLOXYPROPYL)METHYLDIETHOXYSILANE), (3-아크릴옥시프로필)메틸디메톡시실란((3-ACRYLOXYPROPYL)METHYLDIMETHOXYSILANE), (메타크릴옥시메틸)메틸디에톡시실란(METHACRYLOXYMETHYL)METHYLDIETHOXYSILANE) 및 (메타크릴옥시메틸)메틸디메톡시실란((METHACRYLOXYMETHYL)METHYLDIMETHOXYSILANE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 카르복실기를 포함하는 실란은 (3-아크릴옥시프로필)프리메톡시실란((3-ACRYLOXYPROPYL)TRIMETHOXYSILANE): APTMS)일 수 있다.

[0043] 상기 글리시딜기(에폭시기)를 포함하는 실란은 예를 들어 3-글리시드옥시프로필디메톡시메틸실란(3-Glycidoxypropyldimethoxymethylsilane), (3-글리시드옥시프로필)디메틸톡시실란((3-GLYCIDOXYPROPYL)DIMETHYLETHOXYSILANE), (3-글리시드옥시프로필)트리에톡시실란((3-GLYCIDOXYPROPYL)TRIETHOXYSILANE), (3-글리시드옥시프로필)트리메톡시실란((3-GLYCIDOXYPROPYL)TRIMETHOXYSILANE), (2-(3,4-에폭시시클로헥실)에틸트리에톡시실란(2-(3,4-EPOXYCYCLOHEXYL)ETHYLTRIETHOXYSILANE), 2-(3,4-에폭시시클로헥실)에틸드리메톡시실란(2-(3,4-EPOXYCYCLOHEXYL)ETHYLTRIMETHOXYSILANE), 5,6-에폭시헥실트리에톡시실란(5,6-EPOXYHEXYLTRIETHOXYSILANE), 2-(3,4-에속시시클로헥실)에틸메틸디에톡시실란(2-(3,4-EPOXYCYCLOHEXYL)ETHYLMETHYLDIETHOXYSILANE), (3-글리시드옥시프로필)메틸디에톡시실란((3-GLYCIDOXYPROPYL)METHYLDIETHOXYSILANE) 및 (3-글리시드옥시프로필)메딜디메톡시실란((3-GLYCIDOXYPROPYL)METHYLDIMETHOXYSILANE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 글리시딜기를 포함하는 실란은 3-글리시도옥시프로필트리메톡시실란(3-glycidoxyhpropyltrimethoxysilane: GPTMS)일 수 있다.

[0044] 상기 아민기를 포함하는 실란은 예를 들어 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-Aminopropyl)triethoxysilane: APTES)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 일 구체예에 있어서, 상기 단계 2)는 플라즈마 표면처리된 세포배양접시에 GPTMS를 0%, 0.6%, 1% 녹인 메탄올 및 증류수를 메탄올:증류수 = 9:1의 비율(v/v)로 혼합한 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 히드록시기에 GPTMS의 실란 작용기가 자발반응으로 표면에 공유결합되고(실란-히드록시기 자발반응), 실란-실란 가교반응이 발생하여 세포배양기재의 표면층이 형성되며, 반응에 참여하지 않은 에폭시기가 세포배양기재 표면에 노출되어 이후 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅에 사용될 수 있다.

[0046] 다른 구체예에 있어서, 상기 단계 2)는 플라즈마 표면처리된 고분자 세포배양접시에 APTES를 1% 녹인 메탄올 및 증류수를 메탄올:증류수 = 9:1의 비율(v/v)로 혼합한 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 히드록시기에 APTES의 실란 작용기가 자발반응으로 표면에 공유결합되고(실란-히드록시기 자발반응), 실란-실란 가교반응이 발생하여 세포배양기재의 표면층이 형성되며, 반응에 참여하지 않은 아민기가 세포배양기재 표면에 노출되어 이후 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅에 사용될 수 있다.

[0048] 상기 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm)는 알코올, 증류수 또는 이들의 혼합 용액에 용해된 형태로 사용될 수 있으며, 상기 용액은 0.01 내지 5%(w/v)의 농도일 수 있다. 상기 폴리이소프로필아크릴아미드 용액의 농도가 0.01%(w/v) 미만인 경우 세포시트 형성에 시간이 많이 소요되고, 세포시트가 형성되더라도 형성 정도가 불안정해 세포배양기재로부터 세포시트의 분리가 불완전하다는 문제점이 있다. 또한, 상기 폴리이소프로필아크릴아미드 용액의 농도가 5% (w/v)를 초과하는 경우 세포배양기재에 대한 세포 부착능이 현저히 감소되며, 세포시트가 완전히 형성되기 전, 세포 배양 도중 세포가 탈착되는 현상이 나타나는 문제점이 있다.

[0049] 상기 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm)는 대표적인 온도감응성 고분자로, 수용액상에서 32℃이하에서는 친수성을 가지나 32℃이상에서는 소수성 특성을 가지며, 고분자내의 N-이소프로필아미노(N-isopropylamino) 치환기

가 온도에 따라 그 배향이 변화함으로써 고분자의 친수성/소수성 균형이 변화하게 된다. 이 물질은 온도의 상승에 따라 최저임계용액온도(lower critical solution temperature: LCST) 부근에서 급격히 부피가 줄어들게 되며, 이러한 온도감응 특성을 이용하여 세포시트 제조에 사용될 수 있다.

[0050] 일 구체예에 있어서, 상기 단계 3)은 에폭시기(글리시딜기)가 표면에 노출된 세포배양기재에 아민기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm-NH_2)를 에탄올에 녹인 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 에폭시 작용기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 아민기 간 자발적 가교반응이 진행되어 공유결합이 형성되고, 최종적으로 표면에 이소프로필아크릴아미드가 형성된 세포배양기재가 제조되었다. 이때, 상기 폴리이소프로필아크릴아미드 용액의 농도를 0.01 내지 5%(w/v)로 하여 처리하는 경우, 세포배양 후 세포배양기재를 냉각하는 경우 배양한 세포가 세포시트의 형태로 세포배양접시 바닥으로부터 분리되며, 0.01%(w/v) 미만 또는 5%(w/v)를 초과하는 농도로 처리하는 경우 세포시트가 일부 형성 및 분리가 불완전함을 확인하였다.

[0051] 다른 구체예에 있어서, 상기 단계 3)은 아민기가 표면에 노출된 세포배양기재에 카르복실기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm-COOH)를 에탄올에 녹인 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 아민 작용기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 카르복실기 간 자발적 가교반응이 진행되어 아마이드 결합이 형성되고, 최종적으로 표면에 이소프로필아크릴아미드가 형성된 세포배양기재가 제조되었다.

[0053] 상기 단계 3)의 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm) 코팅은 15 내지 65℃, 바람직하게는 20 내지 60℃ 의 온도에서 수행될 수 있다. 상기 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm) 코팅은 전 단계에 사용된 실란계 화합물이 갖는 작용기의 종류에 따라, 세포배양기재 표면의 글리시딜기와 PNiPAm의 아민 작용기 간 자발적인 가교반응, 세포배양기재 표면의 카르복실기와 PNiPAm의 아민 작용기 간 자발적인 가교반응, 세포배양기재 표면의 아민기와 PNiPAm의 카르복실 작용기 간 자발적인 가교반응, 세포배양기재 표면의 아민기와 PNiPAm의 글리시딜기 간 자발적인 가교반응으로 형성될 수 있다.

[0054] 구체적으로, 세포배양기재 표면의 아민기와 PNiPAm의 카르복실 작용기 간 자발적인 가교반응이 진행되면 아마이드 반응(COOH + NH_2 -> -CONH + H_2O)이 발생하여, 최종적으로 표면에 이소프로필아크릴아미드가 형성된 세포배양기재의 표면을 형성할 수 있다. 이때, 아민기가 표면에 노출된 세포배양접시에 카르복실기를 가진 N-이소프로필아크릴아미드를 pH 3.0 내지 pH 6.5의 에틸렌디아민카보디아미드 등의 촉매를 포함한 정제수에 녹인 상태에서 아민-카르복실 공유결합반응을 유도할 수 있다.

[0055] 상기 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면 형성 방법에 따라 폴리이소프로필아크릴아미드가 코팅된 세포배양기재는, 플라즈마 처리 및 자발적인 화학반응을 기반으로 하여 경제적이고 친환경적인 공정으로 세포배양기재 표면에 온도감응성 물질(폴리이소프로필아크릴아미드)이 효과적으로 고정되고, 표면에 작용기가 수직방향으로 일직선으로 배열되는 구조를 가져 세포시트의 형성 및 수확이 용이하고, 자발적인 가교반응에 기반하므로 재현성이 크게 향상된다는 이점이 있다.

[0057] 다른 양상은 1) 상기 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법으로 표면 형성된 세포배양기재에 세포를 배양하는 단계; 및

[0058] 2) 상기 세포배양기재를 냉각하여 상기 세포배양기재의 표면에서 배양한 세포를 세포시트의 형태로 분리하는 단계를 포함하는 세포시트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0059] 일 양상에 따른 방법으로 표면 형성된 세포배양기재는, 상기 세포배양기재의 표면에 세포를 배양한 후 세포배양접시의 온도 변화로 세포시트를 형성할 수 있다.

[0060] 본 명세서에서, 용어 "세포"는 세포 집단을 의미하며, 상기 세포는 야생형이거나 재조합 될 수 있다. 용어 "세포 배양"은 세포의 생존 및/또는 성장에 적합한 방법 및 조건에서 이루어지는 것을 의미한다.

[0061] 상기 세포배양기재 상에 배양할 수 있는 세포의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 시트(sheet) 형태로 제조가 가능한 세포 및 불가능한 세포 모두가 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 일 양상에 따른 방법으로 표면 형성된 세포배양기재는 섬유아세포, 평활근세포, 심근세포, 혈관내피세포, 각막세포, 구강 점막세포, 연골세포, 간세포, 간질세포, 소장표피세포, 표피각질세포, 골아세포, 골수간엽세포, 배아줄기세포, 성체줄기세포, 신경줄기세포,

신경세포, 신경교세포, 종양세포 등이 단독 또는 2종류 이상이 혼합되어 배양에 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본 명세서에서, 상기 세포배양기재는 배지(medium)를 포함할 수 있다. 배지는 균, 세포 또는 식물체 등의 배양에 필요한 영양소를 충분히 공급하고, 배양에 적당한 삼투압, pH 등을 조절하여 줌으로써 세포 배양을 더욱 증진시킬 수 있다. 배지의 종류는 배양되는 세포 등에 따라 상이할 수 있으므로, 본 명세서에서 배지는 특정 배지에 제한되지 않으며, 상업적으로 판매하는 배지를 사용할 수도 있고, 직접 제조하여 사용할 수도 있다.

[0063] 또한, 상기 세포배양기재는 세포 및 이의 배양을 위한 배지를 함유할 수 있도록 격벽을 갖는 용기 안에 배치되거나, 기재 자체가 용기 형태인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 표면 상에서 세포를 배양할 수 있다면 어느 형태로든 존재할 수 있고, 크기, 모양, 재질, 용적 등에 특별히 제한되지 않는다.

[0064] 상기 단계 1)의 배양은 바람직하게는 37℃에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배양 온도가 38℃ 이상인 경우에는 세포의 생존력(viability)이 급격히 떨어지고, 36℃ 이하인 경우 세포가 충분한 수로 자라지 않아 세포시트 생산율이 떨어진다는 문제점이 있다.

[0065] 상기 단계 2)의 냉각은 0 내지 32℃에서 이루어지는 것일 수 있고, 바람직하게는 15 내지 28℃, 보다 바람직하게는 22 내지 28℃에서 이루어지는 것일 수 있다.

[0066] 일 구체예에 있어서, 일 양상에 따른 방법으로 표면 형성된 세포배양기재에 인간 중간엽 줄기세포를 파종하여 배양기 내(37℃)에서 24시간 동안 배양 후, 세포배양접시의 온도를 22~28℃로 낮추는 경우, 배양한 인간 중간엽 줄기세포를 세포시트의 형태로 얻을 수 있음을 확인하였다.

[0068] 상기 일 양상에 따른 세포시트를 제조하는 방법은 플라즈마 표면개질 단계, 실란에 의한 카르복실기, 글리시딜기 또는 아민기 고정 단계 및 온도감응성 물질인 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계를 포함하며, 자발적인 가교반응에 기반하여 고품질의 세포시트를 재현성 있고 신속하게 확보할 수 있다(도 2 내지 5).

[0069] 따라서, 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법 및 세포시트를 제조하는 방법은 플라즈마 처리 및 자발적인 화학반응을 기반으로 하여, 세포배양기재 표면에 온도감응성 물질인 폴리이소프로필아크릴아미드를 효과적으로 고정시킬 수 있으며, layer-by-layer 반응으로 세포배양접시의 표면에 작용기가 수직방향으로 일직선으로 배열되는 구조를 가져 세포시트의 형성 및 수확이 용이하고, 자발적인 가교반응에 기반하므로 재현성이 크게 향상되어 재생 의료와 조직공학 분야에서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

발명의 효과

[0071] 일 양상에 따른 방법은 플라즈마 처리 및 자발적인 화학반응을 기반으로 하여, 경제적이고 친환경적인 공정으로 세포배양기재 표면에 온도감응성 물질인 폴리이소프로필아크릴아미드를 효과적으로 고정시킬 수 있다. 상기 방법으로 제조된 세포배양기재는 표면에 단계적으로 층상으로 공유결합된 분자들에 의해 폴리이소프로필아크릴아미드 작용기가 표면에 단일층을 이루어, 수화될 경우 수직방향으로 일직선으로 배열되는 구조를 가져 세포시트의 형성 및 수확이 용이하고, 자발적인 가교반응에 기반하므로 재현성이 크게 향상되어 재생 의료와 조직공학 분야에서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 종래의 PNiPAm 가교방법에 대한 개요를 나타낸 것으로, N-이소프로필아크릴아미드 단량체를 자외선 또는 전자빔을 이용하여 가교 후 세포배양접시의 표면에 부정형 분자배열 구조를 가지는 것을 도시한 것이다.

도 2는 플라즈마 표면개질 단계, 실란에 의한 글리시딜기 고정 단계 및 온도감응성 물질인 아민-폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계를 포함하는 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법과 세포시트를 수득하는 과정의 개요를 나타낸 도이다.

도 3은 플라즈마 표면개질 단계, 실란에 의한 아민기 고정 단계 및 온도감응성 물질인 글리시딜기-폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계를 포함하는 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법과 세포시트를 수득

하는 과정의 개요를 나타낸 도이다.

도 4는 플라즈마 표면개질 단계, 실란에 의한 카르복실기 고정 단계 및 온도감응성 물질인 아민기-폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계를 포함하는 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법과 세포시트를 수득하는 과정의 개요를 나타낸 도이다.

도 5는 플라즈마 표면개질 단계, 실란에 의한 아민기 고정 단계 및 온도감응성 물질인 글리시딜기-폴리이소프로필아크릴아미드 코팅 단계를 포함하는 일 양상에 따른 세포배양기재의 표면을 형성하는 방법과 세포시트를 수득하는 과정의 개요를 나타낸 도이다.

도 6은 일 양상에 따른 방법으로 제조된 세포배양기재 표면의 물리화학적 분석(FTIR) 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 일 양상에 따른 방법으로 제조된 세포배양기재 표면의 물리화학적 분석(ESCA) 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 일 양상에 따른 방법으로 제조된 세포배양기재를 이용하여 세포 배양 후, 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 일 양상에 따른 방법으로 제조된 세포배양기재를 이용하여 세포 배양 후, Live/DEAD 생존력 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 서로 다른 농도의 폴리이소프로필아크릴아미드 용액을 이용하여 코팅한 세포배양기재를 이용하여 세포 배양 후, 세포시트의 형성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0075] 따라서, 본 명세서에 기재된 제조예, 실시예 및 도면에 기재된 구성은 가장 바람직한 제조예 또는 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0077] 이하의 실시예에서, 제1, 제2 등의 용어는 한정적인 의미가 아니라 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하는 목적으로 사용되었다.

[0078] 이하의 실시예에서, 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0079] 이하의 실시예에서, 포함하다 또는 가지다 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 또는 구성요소가 존재함을 의미하는 것이고, 하나 이상의 다른 특징들 또는 구성요소가 부가될 가능성을 미리 배제하는 것은 아니다.

[0080] 이하의 실시예에서, 막, 영역, 구성 요소 등의 부분이 다른 부분 위에 또는 상에 있다고 할 때, 다른 부분의 바로 위에 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 막, 영역, 구성 요소 등이 개재되어 있는 경우도 포함한다.

[0081] 도면에서는 설명의 편의를 위하여 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다. 예컨대, 도면에서 나타난 각 구성의 크기 및 두께는 설명의 편의를 위해 임의로 나타내었으므로, 본 발명이 반드시 도시된 바에 한정되지 않는다.

[0082] 어떤 실시예가 달리 구현 가능한 경우에 특정한 공정 순서는 설명되는 순서와 다르게 수행될 수도 있다. 예를 들어, 연속하여 설명되는 두 공정이 실질적으로 동시에 수행될 수도 있고, 설명되는 순서와 반대의 순서로 진행될 수 있다.

[0083] 이하의 실시예에서, 막, 영역, 구성 요소 등이 연결되었다고 할 때, 막, 영역, 구성 요소들이 직접적으로 연결된 경우뿐만 아니라 막, 영역, 구성요소들 중간에 다른 막, 영역, 구성 요소들이 개재되어 간접적으로 연결된 경우도 포함한다. 예컨대, 본 명세서에서 막, 영역, 구성 요소 등이 전기적으로 연결되었다고 할 때, 막, 영역, 구성 요소 등이 직접 전기적으로 연결된 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 막, 영역, 구성 요소 등이 개재되어 간접적으로 전기적 연결된 경우도 포함한다.

[0085] **제조예 1. 세포배양기재 표면에 글리시딜기-아민반응으로 폴리이소프로필아크릴아미드 표면작용기를 형성하는 방법**

[0086] 제조예 1에 따른 세포배양기재의 표면 형성 방법의 개요를 도 1에 나타내었으며, 하기에서 자세히 기술한다.

[0088] **1-1. 플라즈마 표면처리**

[0089] 세포배양기재로서 폴리머 재질의 조직 배양 폴리스티렌(Tissue culture polystyrene: TCPS)의 표면에 산소(O_2) 플라즈마를 처리하여 작용기를 생성시켰다. 구체적으로, 산소 플라즈마 장치의 내부에 세포배양접시를 넣고, 10^{-2}Torr(1 Torr=1 mmHg) 이하에 도달한 후, 분당 30입방센티미터의 산소를 공급하는 상태에서 산소 플라즈마를 30초간 처리하여 세포배양기재의 표면에 산소($-O^-$) 또는 히드록시기(-OH) 등의 표면 작용기가 발생하도록 유도하였다.

[0091] **1-2. 실란에 의한 글리시딜기 고정**

[0092] 다음으로, 세포배양기재의 표면에 글리시딜기를 형성하기 위해 글리시딜 작용기를 갖는 실란(예를 들어, 3-글리시도옥시프로필트리메톡시실란(3-glycidoxyhpropyltrimethoxysilane: GPTMS))을 화학적으로 고정하였다. 구체적으로, 플라즈마 표면처리된 고분자 세포배양접시에 상기 GPTMS를 0%, 0.001, 0,01, 0.1, 0.5%, 1, 5% 녹인 메탄올 90%, 증류수 10% 혼합용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 방치하여 자발반응을 유도하였다. 상기 반응을 통하여, 히드록시기에 GPTMS의 실란 작용기가 자발반응으로 표면에 공유결합되고(실란-히드록시기 자발반응), 실란-실란 가교반응이 발생하여 세포배양기재의 표면층이 형성되며, GPTMS의 실란분자에 연결되어 있는, 반응에 참여하지 않는 글리시딜기가 세포배양기재 표면에 형성되었다.

[0094] **1-3. 아민작용기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드 코팅**

[0095] 글리시딜기가 표면에 노출된 세포배양기재에 아민기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm-NH_2)를 에탄올에 녹인 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 에폭시 작용기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 아민기 간 자발적 가교반응이 진행되어 공유결합이 형성되고, 최종적으로 표면에 이소프로필아크릴아미드가 형성된 세포배양기재가 제조되었다. 제조한 세포배양기재는 증류수로 세척 및 건조하여 이후 세포시트 제조에 사용하였다. 한편, 상기 아민기-글리시딜기의 반응용액은 알코올, 증류수 등의 용매 및 혼합용액을 사용해도 결과에 큰 차이가 없으며, 반응온도는 예를 들어 150℃ 등과 같이 높을수록 촉진되나, 상온 내지 60℃ 조건으로 실험하여도 세포배양기재의 변형 등이 없이 반응시간 단축이 가능함을 확인하였다.

[0097] **제조예 2. 세포배양기재 표면에 카르복실기-아민반응으로 폴리이소프로필아크릴아미드 표면작용기를 형성하는 방법**

[0098] **2-1. 플라즈마 표면처리**

[0099] 세포배양기재로서 폴리머 재질의 조직 배양 폴리스티렌(Tissue culture polystyrene: TCPS)의 표면에 산소(O_2) 플라즈마를 처리하여 작용기를 생성시켰다. 구체적으로, 산소 플라즈마 장치의 내부에 세포배양접시를 넣고, 10^{-2}Torr(1 Torr=1 mmHg) 이하에 도달한 후, 분당 30입방센티미터의 산소를 공급하는 상태에서 산소 플라즈마를 30초간 처리하여 세포배양기재의 표면에 산소($-O^-$) 또는 히드록시기(-OH) 등의 표면 작용기가 발생하도록 유도하였다.

[0101] **2-2. 실란에 의한 아민기 고정**

[0102] 다음으로, 세포배양기재의 표면에 아민기를 형성하기 위해 아민기를 갖는 실란(예를 들어, 3-아미노프로필트리

에톡시실란(3-Aminopropyl)triethoxysilane: APTES))을 화학적으로 고정하였다. 구체적으로, 플라즈마 표면처리된 고분자 세포배양접시에 상기 APTES를 1% 녹인 메탄올 용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 히드록시기에 APTES의 실란 작용기가 자발반응으로 표면에 공유결합되고(실란-히드록시기 자발반응), 실란-실란 가교반응이 발생하여 세포배양기재의 표면층이 형성되며, 반응에 참여하지 않은 아민기가 세포배양기재 표면에 노출되었다.

[0104] **2-3. 카르복실 작용기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드 공유결합**

[0105] 아민기가 표면에 노출된 세포배양기재에 카르복실기를 갖는 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm-COOH)를 증류수에 녹인 용액을(pH3.0~6.5) 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 상기 반응을 통하여, 아민 작용기와 폴리이소프로필아크릴아미드의 카르복실기 간 자발적 가교반응이 진행되어 아마이드 결합이 형성되고, 최종적으로 표면에 이소프로필아크릴아미드가 형성된 세포배양기재가 제조되었다. 제조한 세포배양기재는 증류수로 세척 및 건조하여 이후 세포시트 제조에 사용하였다.

[0107] 한편, 상기 제조예 2에 따른 세포배양기재 표면에 실란 가교에 의한 아민기 형성 후 PNiPAm-글리시딜기 분자와의 반응은 아민-글리시딜기의 자발반응에 의한 것이므로, 제조예 1에 따른 세포배양기재 표면에 실란 가교에 의한 글리시딜기 형성 후 PNiPAm-아민기 분자와 자발반응을 통하여 PNiPAm형성된 세포배양기재를 형성하는 것과 자발반응의 원리상 동등하다고 해석할 수 있다. 마찬가지로, 세포배양기재 표면에 실란 가교에 의한 카르복실기 형성 후 PNiPAm-아민기 분자와의 반응은 아민-카르복실기의 공유결합반응에 의한 것이므로, 세포배양기재 표면에 실란 가교에 의한 아민기 형성 후 PNiPAm-카르복실기 분자와 자발반응을 통하여 PNiPAm형성된 세포배양기재를 형성하는 것은 자발반응의 원리상 동등하다고 해석할 수 있다.

[0109] **실시예 1. 온도감응형 작용기를 갖는 세포배양기재의 물리화학적 분석**

[0110] 제조예 1에서 제조한 온도감응형 작용기를 갖는 세포배양기재 표면의 가교형태를 이화학적으로 분석하기 위하여 전반사 측정 푸리에 변환 적외선분광분석(Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR) 및 화학분석용 광전자분광법(Electron spectroscopy of chemical analysis: ESCA)을 실시하였다. FTIR 및 ESCA는 하기 4개 군에 대하여 실시하였고, 그 결과를 도 6 및 도 7에 각각 나타내었다.

[0111] a. 아무런 처리도 하지 않은 대조군(Control)

[0112] b. GPTMS를 사용하여 실란 고정으로 글리시딜기가 노출된 실험군(GPTMS)

[0113] c. 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하되, GPTMS 가교반응 없이 PNiPAm-NH_2을 단순 코팅 후 건조시킨 양성 대조군(PNiPAm positive)

[0114] d. 상기 제조예 1(PNiPAm)

[0116] **1-1. FTIR 분석**

[0117] 도 6은 산소 플라즈마 처리를 통한 표면개질 및 자발적 화학반응에 기반한 폴리이소프로필아크릴아미드 고정에 따른 세포배양기재 표면의 화학적 구조 변화를 FTIR을 이용하여 측정한 결과로서, 실험군(b, GPTMS)에서는 세포배양기재의 히드록시기에 GPTMS 공유결합 후 생성된 Si-O 결합(~1,124 cm^{-1} peak)을 확인할 수 있었으며, 제조예 1(d, PNiPAm)에서는 PNiPAm에만 존재하는 N-H 결합(1,533, 1,543, ~3,300 cm^{-1} peak)을 확인함으로써, PNiPAm 코팅 반응을 확인할 수 있었다.

[0119] **1-2. ESCA 분석**

[0120] 도 7은 산소 플라즈마 처리를 통한 표면개질 및 자발적 화학반응에 기반한 폴리이소프로필아크릴아미드 고정에 따른 세포배양기재 표면의 화학적 구조 변화를 ESCA를 이용하여 측정한 결과로서, 질소 피크(N)에서 질소는

PNiPAm 군과, PNiPAm positive 군에 공통적으로 존재하며, PNiPAm 군에 PNiPAm이 공유결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 실란 피크(Si)에서는 실란이 GPTMS 가교반응을 수행한 GPTMS 군에서 검출됨을 확인할 수 있었다. 기질에 포함된 산소(O) 및 조직 배양 폴리스티렌의 주성분인 탄소(C)는 모든 군에서 검출되었다.

[0121] 상기 결과를 통해, 제조예 1에서 제조한 온도감응형 작용기를 갖는 세포배양기재는 layer-by-layer 반응으로 세포배양접시의 표면에 GPTMS 가교반응, PNiPAm 공유결합이 안정적으로 형성됨을 확인하였다.

[0123] **실시예 2. 온도감응형 작용기를 갖는 세포배양기재를 이용한 세포시트의 제조**

[0124] 전술한 본 발명의 제조예들에 따른 자발적 화학반응에 기반한 세포시트 제조용 표면 형성 방법은 상기한 방법에 의해 형성된 세포배양기재의 표면에 세포를 배양한 후 세포배양접시의 온도변화로 세포시트를 형성할 수 있다.

[0125] 제조예 1에서 제조한 온도감응형 작용기를 갖는 세포배양기재를 이용하여 세포시트를 제조하였다. 이 때, 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하되, 폴리이소프로필아크릴아미드(PNiPAm-NH_2) 처리 시, PNiPAm 용액의 농도를 0~5%(w/v)로 하여 코팅한 세포배양접시를 사용하였다.

[0127] **2-1. 세포 배양**

[0128] 상기 다양한 농도 조건의 PNiPAm 용액을 처리하여 준비한 세포배양기재에 인간 중간엽 줄기세포를 배양하고 1일차, 2일차, 4일차에 광학현미경으로 관찰하였다. 또한, Live/DEAD 생존력 분석 키트를 사용하여 세포 상태(Viability)를 관찰하였다. 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0129] 도 8에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 결과는 PNiPAm 표면처리의 영향을 거의 받지 않음을 확인하였다. 한편, Live/DEAD 생존력 분석 키트를 사용할 경우 배양 후 세포에 Calcein-AM, EthD-1(Ethidium homodimer-1) 용액을 혼합해 주면 살아 있는 세포는 녹색, 죽은 세포는 붉은색 형광을 띠는데, 도 9에 나타낸 바와 같이, 배양된 세포는 PNiPAm 표면처리 여부와 관계 없이 세포 생존 및 세포 형태에 차이가 없어 표면처리에 따른 세포독성이 없음을 확인하였다.

[0131] **2-2. 중간엽 줄기세포 세포시트의 제조**

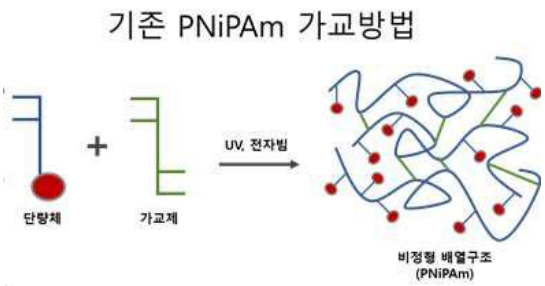
[0132] 탯줄의 와튼 젤리(Wharton's jelly)로부터 유래된 인간 중간엽 줄기세포(hMSC)를 배양하여 중간엽 줄기세포 세포시트를 제조하였다. 구체적으로, 세포배양접시에 인간 중간엽 줄기세포를 시딩하여 배양기 내(37℃)에서 3일 이상 배양 후 현미경으로 관찰하여 세포가 배양접시를 모두 덮고 있는 것을 확인 한 후, 세포배양접시에 있던 기존 배지를 제거한 후, 상온으로 보관되어 있던 배지를 넣어 접시의 온도를 22~28℃로 낮추어 세포배양접시로부터 세포층이 분리되는지 관찰하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0133] 도 10에 나타낸 바와 같이, 0% 음성 대조군의 경우 PNiPAm 코팅층이 없어서 세포시트가 형성되지 않고, 0.1~5% 실험군의 경우 세포배양접시 표면에 PNiPAm이 코팅됨에 따라 세포시트가 형성되어 세포배양접시 바닥으로부터 분리됨을 확인하였다. 한편, 0.001~0.01% 실험군의 경우 세포시트가 일부 형성되나, 세포시트 형성에 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 세포시트의 분리가 불완전함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, PNiPAm 코팅 시 PNiPAm 용액의 농도를 0.001~5%(w/v)로 하여 사용하는 경우, 배양한 세포를 시트의 형태로 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

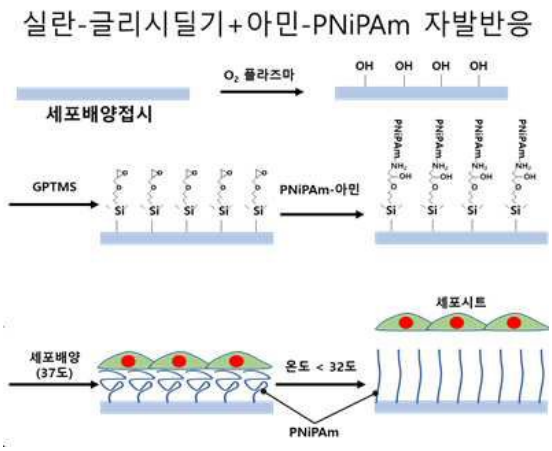
[0135] 전술한 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 제조예 및 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

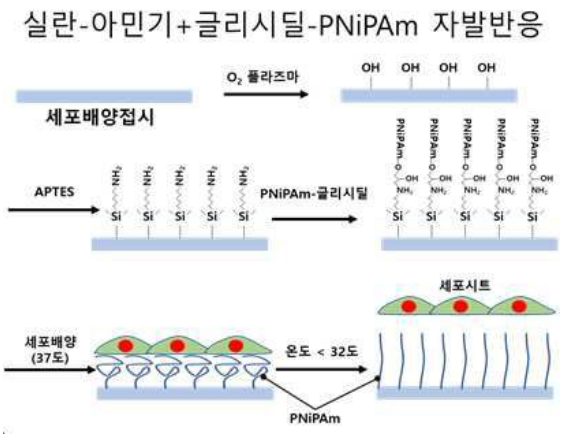
도면1



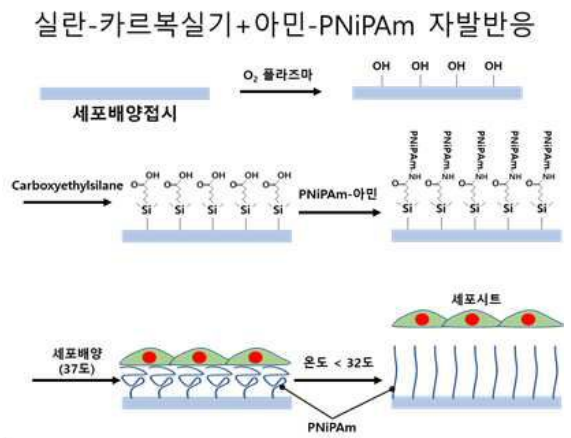
도면2



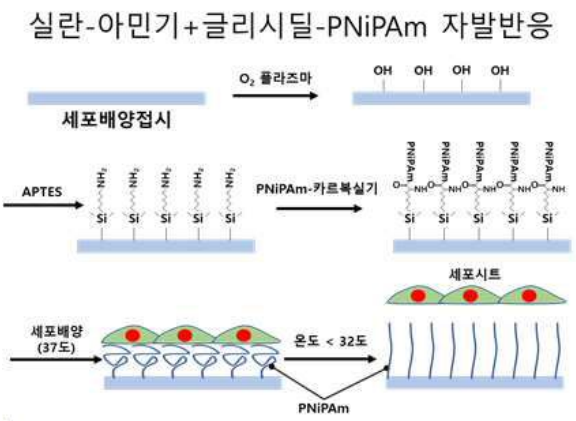
도면3



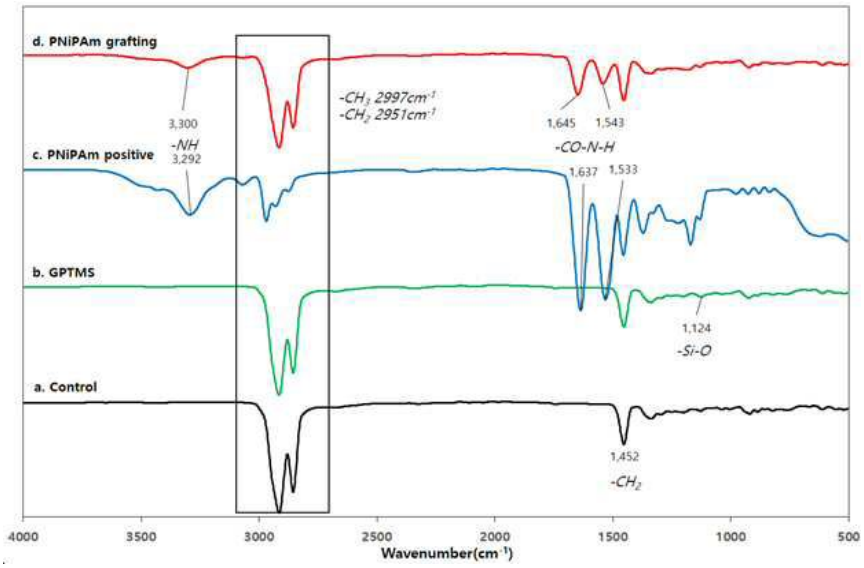
도면4


실란-카르복실기+아민-PNiPAm 자발반응
O2 플라즈마
OH OH OH OH
세포배양접시
Carboxyethylsilane
PNiPAm-아민
세포시트
세포배양
(37도)
온도 < 32도
PNiPAm

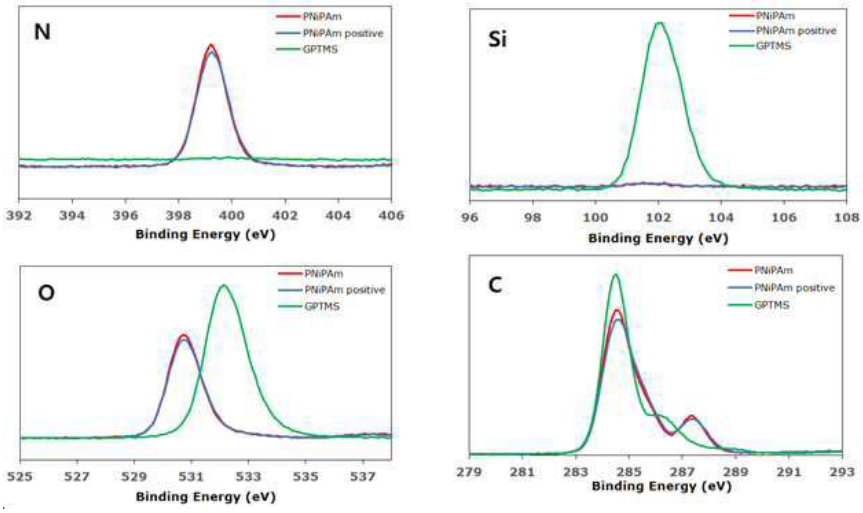
도면5


실란-아민기+글리시딜-PNiPAm 자발반응
O2 플라즈마
OH OH OH OH
세포배양접시
APTES
PNiPAm-카르복실기
세포시트
세포배양
(37도)
온도 < 32도
PNiPAm

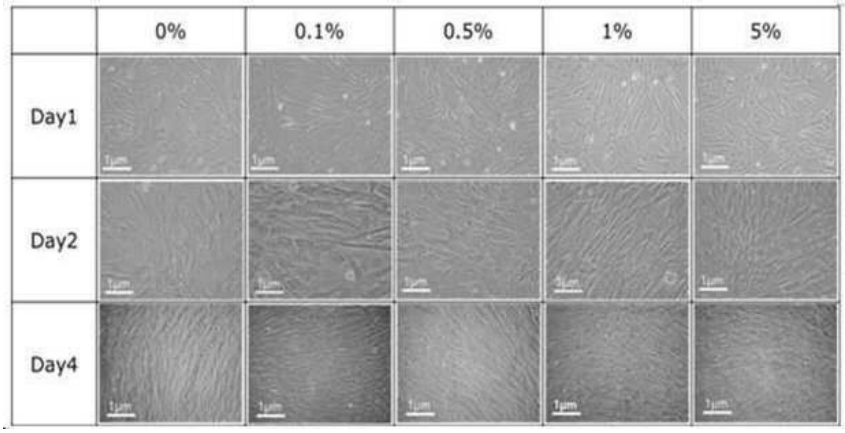
도면6


d. PNiPAm grafting
c. PNiPAm positive
b. GPTMS
a. Control
3,300
-NH
3,292
-CH3 2997cm-1
-CH2 2951cm-1
1,645
1,543
-CO-N-H
1,637
1,533
1,124
-Si-O
1,452
-CH2
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber(cm-1)

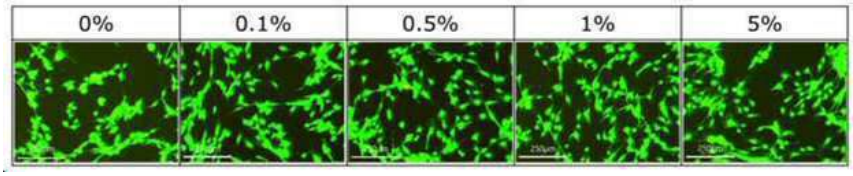
도면7



도면8



도면9



도면10

