



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0028981

(43) 공개일자 2016년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/78 (2006.01) C12N 11/02 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/78 (2013.01)

C12N 11/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0124613

(22) 출원일자 2015년09월03일

심사청구일자 2015년09월03일

(30) 우선권주장

1020140116967 2014년09월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

신관우

서울특별시 강남구 선릉로 221 (도곡동, 도곡렉슬 아파트) 402동 1201호

안승국

서울특별시 서초구 방배본동 삼호아파트 3동 711호

케빈 파커

미국 02452 메사추세츠 월섬 스쿨스트리트 4

(74) 대리인

양부현

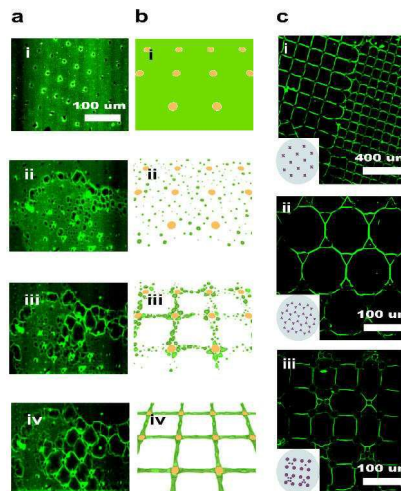
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법 및 용도

(57) 요약

본 발명은 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법에 관한 것으로, (a) 기판(substrate) 상에 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing)하여 상기 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 마이크로 패턴 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 섬유 네트워크를 유도하는 단계를 포함한다. 본 발명은 세포외기질 단백질 섬유의 생체 내의 형성 메커니즘과 다양성을 그대로 모사하고 있어, 생체 내의 다양한 조직의 생체외 개발은 물론, 개발된 단백질 조직을 활용해 다양한 세포의 흡착 및 분화를 연구할 수 있고, 생리학적 현상, 의료용 장비, 생체재료 등의 연구에 필수적인 다양한 조직과 세포의 배양과 역학 관계 이해에 핵심적 역할을 할 수 있는 방법과 성분물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 5/0652 (2013.01)

C12N 5/0658 (2013.01)

C12N 2533/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	201234021
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	도약연구과제
연구과제명	인공세포 구조 및 기능 모사 연구
기 여 율	50/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	201333030
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	서강-하버드 질병 바이오펜 연구 센터
기 여 율	25/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0031932
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원자력연구개발사업
연구과제명	냉중성자 표면 산란을 이용한 바이오/나노 계면 현상 연구
기 여 율	25/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.12.15 ~ 2012.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법:

- (a) 기판(substrate) 상에 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing)하여 상기 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 마이크로 패턴 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 섬유 네트워크를 유도하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포외기질 단백질은 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 인테그린(integrin) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 기판은 유리, 플라스틱 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 기판인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a) 이전에 상기 기판을 생체적합성 고분자로 코팅하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤[poly(caprolactone)], 폴리글리콜산[poly(glycolic acid)], 폴리락트산[poly(lactic acid)], 폴리 락타이드 글라이코라이드 공중합체[poly(lactide-co-glycolide)], 폴리에틸렌글리콜[poly(ethylene glycol)], 폴리오르소에스테르[poly(ortho ester)], 폴리카복시페녹시프로판세바신산[poly[(carboxyphenoxy)propanesebacic acid]], 폴리알킬 시아노아크릴레이트[poly(alkyl cyanoacrylate)], 데사미노티로실 옥틸 에스테르(desaminotyrosyl octyl ester), 폴리포스포에스테르(polyphosphoesters), 폴리에스터 아마이드(polyester amides), 폴리우레탄(polyurethanes), 키토산(chitosan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 생체적합성 고분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 음이온성 공중합체는 비이온성 단량체(non-ionic monomer) 및 음이온성 단량체(anionic monomer)가 공중합(copolymerization)된 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 비이온성 단량체는 폴리스타이렌, 아크릴아마이드, 메타크릴아마이드, 아세트산 비닐, 비닐 알코올, 아크릴에스터 또는 알릴 알코올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 음이온성 단량체는 폴리스타이렌 술포네이트(polystyrene sulfonate), 폴리에틸아크릴레이트(polyethylacrylate), 폴리글루탐산(Polyglutamic acid), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid), 알긴산(Alginate), 카라기난(Carrageenan), 히알루론산(Hyaluronic acid), 카복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose), 셀룰로오스황산염(Cellulose sulfate), 덱스트란황산염(Dextran sulfate), 헤파린(Heparin), 헤파린황산염(Heparin sulfate), 폴리메틸렌코구아니딘(Poly(methylene-co-guanidine)) 및 콘드로이틴황산염(Condroitin sulfate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 음이온성 단량체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 음이온성 공중합체는 아이오노머(ionomer)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 음이온성 공중합체는 10 몰% 내지 70 몰%의 음이온성 단량체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 마이크로 패턴은 10-100 μm 간격을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 섬유 네트워크는 단일 단백질 또는 둘 이상의 복합 단백질로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 하나 이상의 세포외기질 단백질을 동시에 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b) 이후에 추가적으로 세포외기질 단백질을 배양하는 단계 (c)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b) 이후에 상기 세포외기질 단백질 상에 세포를 배양하는 단계 (c)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

상기 제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크.

청구항 17

상기 제 16 항의 섬유 네트워크를 포함하는 세포 배양용 스캐폴드.

청구항 18

상기 제 16 항의 섬유 네트워크를 포함하는 조직 재생용 수복재.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 조직은 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 조직인 것을 특징으로 하는 조직 재생용 수복재.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

동물 세포나 조직의 배양은 광범위한 조직공학 및 세포치료 등의 상업적 연구에 매우 중요하다. 이식을 위한 의료 활동에 있어, 새로운 조직의 배양이나, 유전자의 해석, 또는 유용한 세포 단위 생물의 생산을 위한 생체반응기 및 새로운 약제의 영향 평가, 그리고 신속한 세포의 분리 및 대량 생산, 그리고 다양한 조건에 의한 세포의 활성화 실험을 위해서 생체 밖(*in vitro*) 세포질의 배양은 매우 중요하다. 특히, 다양한 세포연구를 위해서는 해당 세포들이 가장 잘 적응할 수 있는 조직 형판(template)이 필요하다. 각기 다른 세포는 각기 다른 종류로 구성되어 조직에서 최적화 되어 성장하고, 그 조직들은 서로 다른 단백질 네트워크들로 구성되어 있다. 따라서 여러 단백질들로 구성된 복합단백질 네트워크의 개발이 우선되어야 세포의 흡착, 분화, 증식, 이동, 접착, 신호전달, 유전자 발현 등의 다양한 세포활동에 대한 연구가 가능해진다.

[0004]

생체 내(*in vivo*)에서 세포외기질 단백질들은 크게 두 가지 메커니즘을 통해 네트워크를 만든다. 첫째로, 인테그린(integrin) 또는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)과 같이 세포 표면 혹은 세포 밖에 존재하는 음전하를 갖는 물질과 세포외기질 단백질이 결합하여 자가 조립(self assembly)을 통해 네트워크를 만드는 방식이 있다. 대표적인 예로, 파이브로넥틴(fibronectin)과 라미닌(laminin)이 위와 같은 방식으로 네트워크를 형성한다. 반대로, 단백질 분자들이 가교제(crosslinking reagent)을 통해 네트워크를 만들기도 한다. 이렇게 가교(crosslinking)를 통해 네트워크를 만드는 것은 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)이 대표적이다.

[0005]

현재까지 생체 밖에서 단백질 네트워크를 구현하는 방법으로는, 크게 물리적인 힘을 이용하는 방식과 음전하를 사용하는 방식이 있다. 먼저, 물리적인 힘을 이용하는 방식은 단백질분자들을 전단력(shear force)을 이용해 물리적으로 잡아당겨 섬유(fiber)를 만든다. 이러한 방식은 섬유의 모양이나 배열을 쉽고 간단히 조절할 수 있어 많은 연구들이 진행되어왔다. 하지만, 이러한 방식은 위에서 언급한 세포외기질 단백질들의 섬유형성 메커니즘과 일치하지 않는 비자연계적인 방법이다. 다른 한편으로, 음전하를 이용하는 방식은 주로 음전하를 갖는 고분자들을 사용하여 단백질 섬유를 만든다. 예를 들어, 폴리스타이렌술포네이트나 폴리에틸아크릴레이트와 같은 음전하를 띠는 작용기를 갖는 고분자를 표면에 처리하여 단백질들의 결합과 자가조립을 유도한다. 이 방식은 생체내의 메커니즘을 그대로 모사한 방법이지만, 현재까지 무작위적이고 비방향성의 섬유들만 형성이 가능하여 네트워크의 모양이나 배열의 조절이 불가능하였다.

[0007]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허

본 발명의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 다양한 조직 및 세포 배양을 위한 생체 내와 유사한 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 마이크로 패턴을 갖는 음이온성 공중합체 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 단일 또는 복합 세포외기질 단백질로 구성된 섬유 네트워크를 제조하고 상기 섬유 네트워크를 이용하여 세포 배양 스캐폴드 및 조직 재생용 수복재로 적용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 세포 배양용 스캐폴드를 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 조직 재생용 수복재를 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법을 제공한다:
- [0018] (a) 기판(substrate) 상에 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing)하여 상기 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 제조하는 단계; 및
- [0019] (b) 상기 마이크로 패턴 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 섬유 네트워크를 유도하는 단계.
- [0021] 본 발명자들은 다양한 조직 및 세포 배양을 위한 생체 내와 유사한 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 마이크로 패턴을 갖는 음이온성 공중합체 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 단일 또는 복합 세포외기질 단백질로 구성된 섬유 네트워크를 제조하고 상기 섬유 네트워크를 이용하여 세포 배양 스캐폴드 및 조직 재생용 수복재로 적용할 수 있음을 확인하였다.
- [0023] 본 발명은 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 사용해 세포외기질 단백질 섬유 네트워크를 제조하는 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 음이온성 공중합체를 사용해 자발적으로 다양한 세포외기질의 단일다중 단백질 네트워크를 얻은 것을 특징으로 한다. 이는 동물 착생 세포(adherent cell)의 배양에 사용 가능한 세포 및 조직 배양용 기질의 표면 처리에 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법을 단계별로 설명하고자 한다.
- [0027] 단계 (a): 음이온성 공중합체의 마이크로접촉 프린팅
- [0028] 본 발명의 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 제조하기 위해 기판(substrate) 상에 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing)하여 상기 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 제조한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 단백질은 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 콜라

젠(collagen), 엘라스틴(elastin), 인테그린(integrin) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질 단백질이다.

[0030] 본 발명의 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅하기 위한 기판은 세포가 배양할 수 있는 어떠한 물질도 포함된다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리, 플라스틱 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 기판이다. 예컨대, 상기 플라스틱은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄 등을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리 또는 플라스틱이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리이다.

[0032] 본 발명의 상기 음이온성 공중합체는 비이온성 단량체(non-ionic monomer) 및 음이온성 단량체(anionic monomer)가 공중합(copolymerization)된 형태이다.

[0033] 본 발명의 상기 음이온성 공중합체는 불규칙 공중합체(random copolymer) 또는 교대 공중합체(alternating copolymer)의 형태를 갖는다. 상기 불규칙 공중합체는 단량체가 2종류의 단량체가 불규칙적으로 배열된 형태를 의미하고, 상기 교대 공중합체는 2종류의 단량체가 단량체가 교대로 배열된 형태를 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 공중합체는 불규칙 공중합체이다.

[0034] 본 발명의 상기 음이온성 공중합체는 아이오노머(ionomer)이다. 본 명세서에서 용어 ‘아이오노머’는 전기적으로 중성(neutral)인 유닛(units)과 이온화된(ionized) 유닛이 반복적 유닛으로 구성된 중합체를 의미한다. 본 발명의 음이온성 공중합체는 중성인 유닛(상기 ‘비이온성 단량체’와 동일)과 음이온성 유닛(상기 ‘음이온성 단량체’와 동일)으로 구성된 중합체이다.

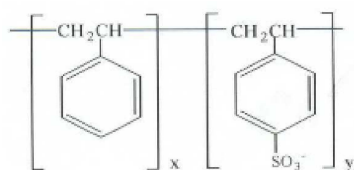
[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비이온성 단량체는 폴리스타이렌(polystyrene), 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드(methacrylamide), 아세트산 비닐(vinyl acetate), 비닐 알코올(vinyl alcohol), 아크릴에스터(acryl ester) 또는 알릴 알코올(allyl alcohol)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비이온성 단량체는 폴리스타이렌, 아크릴아마이드 및 메타크릴아마이드로 구성된 군으로부터 선택되는 비이온성 단량체이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 비이온성 단량체는 폴리스타이렌이다. 상기 명시된 비이온성 단량체 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비이온성 단량체이며 이에 한정되지 않고 다양한 생체 적합성 고분자에 적용가능하다.

[0036] 본 발명의 섬유 네트워크는 당업계의 통상의 기술자에게 자명된 술폰기(sulfone group)나 카복실기(carboxylic group)를 갖는 어떠한 음이온성 단량체도 이용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 단량체는 폴리스타이렌 술포네이트(polystyrene sulfonate), 폴리에틸아크릴레이트(polyethylacrylate), 폴리글루탐산(Polyglutamic acid), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid), 알긴산(Alginate), 카라기난(Carrageenan), 히알루론산(Hyaluronic acid), 카복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose), 셀룰로오스황산염(Cellulose sulfate), 덱스트란황산염(Dextran sulfate), 헤파린(Heparin), 헤파린황산염(Heparin sulfate), 폴리메틸렌코구아니딘(Poly(methylene-co-guanidine)) 및 콘드로이틴황산염(Chondroitin sulfate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 음이온성 단량체이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 음이온성 단량체는 폴리스타이렌 술포네이트, 폴리에틸아크릴레이트, 폴리글루탐산 및 폴리아크릴산으로 구성된 군으로부터 선택되는 음이온성 단량체이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 음이온성 단량체는 폴리스타이렌 술포네이트이다.

[0038] 본 발명의 음이온성 공중합체의 화학식은 다음과 같다:

[0039] [화학식 1]



[0040]

[0041] 본 발명의 상기 음이온성 공중합체는 섬유 네트워크를 형성하기 위한 적절한 몰%의 음이온성 단량체를 포함한다.

- [0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 공중합체는 10 몰% 내지 70 몰%의 음이온성 단량체를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 음이온성 공중합체는 20 몰% 내지 60 몰%의 음이온성 단량체를 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 음이온성 공중합체는 30 몰% 내지 50 몰%의 음이온성 단량체를 포함한다.
- [0043] 상기 음이온성 공중합체는 적정한 몰%의 음이온성 단량체를 포함하는 경우에, 격자모양의 네트워크를 형성한다.
- [0044] 본 발명의 음이온성 공중합체는 정교히 조절된 섬유 네트워크를 대면적(밀리미터 크기)으로 구현할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 마이크로 패턴은 세포외기질 단백질이 격자모양의 네트워크를 형성하기 위한 충분한 거리가 유지되어야 한다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 마이크로 패턴은 10-100 μm 간격을 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 마이크로 패턴은 10-80 μm 간격을 갖는다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 마이크로 패턴은 10-50 μm 간격을 갖는다.
- [0047] 본 발명은 음이온성 공중합체의 마이크로 패턴을 제조하기 위해, 기관 상에 음이온성 공중합체를 마이크로접촉 프린팅한다. 본 명세서에서, 용어 ‘마이크로접촉 프린팅’은 등각(等角) 접촉을 통해 기관의 표면 상에 잉크의 자기-조립 단일층(Self-assembly Monolayer; SAM)의 패턴을 형성하기 위한 마스터 PDMS(master polydimethylsiloxane) 스탬프 상의 패턴을 부조하는 리소그래피(lithography)의 한 형태이다. 과정을 간단히 설명하면, (i) 고형 패턴 표면 상에 포토레지스트(photoresist)를 적용하여 광마스크(photomask) 및 자외선에 의해 패터닝된 마스터를 제조하고; (ii) 중합제 및 경화제를 혼합한 용액을 상기 마스터에 붓고 이를 경화시켜 스탬프를 제조하여; (iii) 스탬프에 잉킹(inking)하고; (iv) 상기 스탬프를 기질에 적용하면 선택된 영역에 잉크가 전달되어 자기-조립 단일층을 형성한다.
- [0048] 본 발명의 섬유 네트워크를 인 비보 또는 엑스 비보로 적용하기 위해 기관 상에 고분자 필름을 코팅하고 섬유 네트워크를 제조할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a) 이전에 상기 기관을 생체적합성 고분자로 코팅하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0050] 본 명세서에서 용어 “생체적합성 고분자”는 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성(tissue compatibility) 및 항응혈성(blood compatibility)을 가지며, 세포에 대한 친화력을 가지는 고분자를 의미한다.
- [0051] 본 발명의 섬유 네트워크는 당업계의 통상의 기술자에게 자명한 어떠한 생체적합성 고분자도 이용할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 생체적합성 고분자의 예로는 폴리카프로락톤[poly(caprolactone)], 폴리글리콜산[poly(glycolic acid)], 폴리락트산[poly(lactic acid)], 폴리 락타이드 글라이코라이드 공중합체[poly(lactide-co-glycolide)], 폴리에틸렌글리콜[poly(ethylene glycol)], 폴리ortho소에스테르[poly(ortho ester)], 폴리카복시페녹시프로판세바신산[poly[(caboxyphenoxy)propanesebacic acid]], 폴리알킬 시아노아크릴레이트[poly(alkyl cyanoacrylate)], 데사미노티로실 옥틸 에스테르(desaminotyrosyl octyl ester), 폴리포스포에스테르(polyphosphoesters), 폴리에스터 아마이드(polyester amides), 폴리우레탄(polyurethanes), 키토산(chitosan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 생체적합성 고분자이며 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 생체적합성 고분자는 폴리카프로락톤이다.
- [0055] 단계 (b): 세포외기질 단백질의 배양
- [0056] 다음, 상기 마이크로 패턴 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 섬유 네트워크를 유도한다.
- [0057] 본 발명에서 음이온성 공중합체는 소수성기와 생리적 환경 하에서 음전하를 제공하는 10-70 몰%의 단량체가 불규칙적으로 표면에 분포되어 있어 세포의 흡착에 필요한 세포외기질 단백질을 효과적으로 표면에 흡착시킬 수 있으며, 그 영향으로 인하여 매우 우수한 세포 배양 조건을 제공할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 섬유 네트워크는 단일 단백질 또는 둘 이상의 복합 단백질로 구성된다.
- [0059] 생체 내 세포외기질 단백질은 두가지 기작을 통해 네트워크를 형성한다. 첫째, 인테그린이나 글리코사미노글

리칸과 같이 세포 표면 혹은 세포 밖에 존재하는 음전하를 갖는 물질과 세포외기질 단백질이 결합하여 자가 조립(self assembly)을 통해 네트워크를 형성한다. 둘째로, 단백질 분자들이 가교제(crosslinking agent)를 통해 네트워크를 형성한다.

[0060] 본 발명의 섬유 네트워크는 상기 음이온성 공중합체를 이용하여 세포외기질 단백질을 결합시킨다. 즉, 음전하를 갖는 공중합체를 처리하여 세포외기질 단백질과 자가조립을 유도한다. 이는 생체 내의 기작을 모사한 방법이다. 종래에는 이러한 섬유 네트워크의 형성이 무작위적이고 비방향성의 섬유들만 형성 가능하여 네트워크의 모양이나 배열의 조절이 불가능하였다.

[0061] 본 발명은 음이온성 공중합체로 구성된 마이크로 패턴 상에 세포외기질 단백질을 배양하여 규칙적인 네트워크 구조를 제조한다.

[0062] 본 발명의 섬유 네트워크는 단일 세포외기질 단백질 또는 둘 이상의 세포외기질 복합 단백질로 구성된다.

[0063] 본 발명의 섬유 네트워크가 단일 세포외기질 단백질로 구성되는 경우, 상기 세포외기질 단백질은 파이프록네티ن 또는 라미닌이다.

[0064] 상기 파이프록네티 및 라미닌은 생체 내에서 선택적으로 음전하를 다량 포함하고 있는 인테그린 수용체나 헤파란산(heparan sulfate)에 결합하여 용해되지 않는 섬유를 만드는 것으로 알려져있다. 따라서, 음이온성 공중합체가 음전하를 제공하면 음전하 주변에 소섬유가 생성되고 세포외기질이 소섬유들과 결합하면서 연속적인 자가조립으로 네트워크를 형성하게 된다.

[0065] 본 발명의 섬유 네트워크가 둘 이상의 복합 세포외기질 단백질로 구성되는 경우, 상기 음이온성 공중합체로 구성된 마이크로 패턴 상에 1차 세포외기질 단백질을 배양하고 2차 세포외기질 단백질을 배양하는 경우, 및 상기 1차 및 2차 세포외기질 단백질을 동시에 배양하는 경우에 복합 단백질로 구성된 섬유 네트워크를 제조할 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 하나 이상의 세포외기질 단백질을 동시에 배양한다.

[0067] 예컨대, 파이프록네티 및 라미닌을 동시 배양하는 경우 및 파이프록네티 및 콜라겐을 동시 배양하는 경우, 두 종류의 세포외기질 단백질이 혼재된 복합 단백질의 섬유 네트워크를 형성한다.

[0068] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 이후에 추가적으로 세포외기질 단백질을 배양하는 단계 (c)를 추가적으로 포함한다.

[0069] 예컨대, 1차 세포외기질 단백질로 파이프록네티 및 2차 세포외기질 단백질로 라미닌을 배양하는 경우, 1차 세포외기질 단백질로 라미닌 및 2차 세포외기질 단백질로 파이프록네티를 배양하는 경우 및 1차 세포외기질 단백질로 파이프록네티 및 2차 세포외기질 단백질로 콜라겐을 배양하는 경우, 두 종류의 세포외기질 단백질이 혼재된 복합 단백질의 섬유 네트워크를 형성한다.

[0071] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 방법에 의해 제조된 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 제공한다.

[0072] 본 발명의 섬유 네트워크는 상기 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법에 의해 제조된 섬유 네트워크이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0074] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 상기 섬유 네트워크를 포함하는 세포 배양용 스캐폴드를 제공한다.

[0075] 본 명세서에서 용어 “세포배양용 스캐폴드”는 조직 또는 세포를 배양할 수 있는 인공 구조체이다.

[0076] 본 발명은 상기 섬유 네트워크 상에 어떠한 세포도 배양할 수 있다. 본 발명의 일 구현예의 마우스 일차 배양(rat primary culture)을 통한 심장과 뇌세포 뿐만 아니라, 어떠한 세포, 예컨대, 인간으로부터 분리한 세포도 배양할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따르면, 세포들이 배양된 상기 섬유 네트워크는 인간의 손상된 장기 어느 부위에도 쉽게 부착할 수 있다(Ref: Choi, Ji Suk, Kam W. Leong, and Hyuk Sang Yoo. "In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF)." Biomaterials 29.5 (2008): 587-596.).

- [0079] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 섬유 네트워크를 포함하는 조직 재생용 수복재를 제공한다.
- [0080] 본 명세서에서 용어 “조직 재생용 수복재”는 손상된 조직의 재생을 복원(restoration)하기 위한 제재로, 면역 반응을 유발하지 않고, 세포의 증식 및 조직의 재구성을 수반한다.
- [0081] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조직은 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 조직이다.
- [0082] 본 발명의 섬유 네트워크 상에 세포를 배양하여 세포 또는 조직의 재생을 위해 적용할 수 있다.
- [0083] 본 발명의 섬유 네트워크는 네트워크 사이의 충분한 공간을 제공하여 신생혈관생성(angiogenesis)에 유리하다.
- [0084] 본 발명의 섬유 네트워크를 생체적합성 고분자가 코팅된 기판 상에 제조하는 경우, 인 비보 또는 엑스 비보 적용이 가능한 세포배양용 스캐폴드를 제공한다. 상기 세포배양용 스캐폴드 상에 세포를 배양하고 세포 배양된 스캐폴드를 손상된 세포를 갖는 객체에 처리할 수 있다.
- [0086] 본 발명은 생체 내의 다양한 조직의 생체외 개발은 물론, 개발된 복합 단백질 조직을 활용해 다양한 세포의 흡착 및 분화를 연구할 수 있다. 따라서 본 발명은 생리학적 현상, 의료용 장비, 생체재료 등의 연구에 필수적인 다양한 조직과 세포의 배양과 역학 관계 이해에 핵심적 역할을 할 수 있는 방법과 성분물을 제공한다.

발명의 효과

- [0088] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0089] (a) 본 발명은 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 세포외기질 단백질의 섬유 네트워크를 포함하는 세포 배양용 스캐폴드 및 조직 재생용 수복재를 제공한다.
- [0090] (b) 본 발명은 세포외기질 단백질 섬유의 생체 내의 형성 메커니즘과 다양성을 그대로 모사하고 있어, 생체 내의 다양한 조직의 생체외 개발은 물론, 개발된 단백질 조직을 활용해 다양한 세포의 흡착 및 분화를 연구할 수 있다.
- [0091] (c) 본 발명은 생리학적 현상, 의료용 장비, 생체재료 등의 연구에 필수적인 다양한 조직과 세포의 배양과 역학 관계 이해에 핵심적 역할을 할 수 있는 방법과 성분물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0093] 도 1a는 음이온 불규칙 공중합체 패턴 위에서 배양된 단백질이 네트워크를 형성하는 메커니즘에 대한 *in situ* 이미지를 보여주는 공초점 현미경 사진이다. 도 1b는 도 1a에서 얻은 이미지를 바탕으로 네트워크 형성 메커니즘을 모식화한 이미지이다. 도 1c는 고분자 마이크론 패턴의 모양과 배열에 따라서 다양한 네트워크의 형성이 가능함을 보여주는 공초점 현미경 사진이다.
- 도 2는 도 1a와 도 1c에서 보이는 마이크론 패턴을 서로 다른 술포네이트 몰 %를 갖는 16 몰%(도 2a), 25 몰%(도 2b), 44 몰%(도 2c) 폴리스타이렌 술포네이트(polystyrene sulfonate)를 사용하여 음이온 양에 따른 단백질 네트워크 형성 유무를 보여주는 공초점 현미경 사진이다.
- 도 3은 33 몰% 폴리스타이렌술포네이트 마이크론 패턴과 패턴 사이의 간격을 다르게 하여 거리가 네트워크 형성에 미치는 영향을 보여주기 위한 것으로, 패턴 간격을 20 μm (도 3a), 40 μm (도 3b), 60 μm (도 3c) 및 80 μm (도 3d)로 제조하고 파이브로넥틴을 배양한 후 측정된 공초점 현미경 사진이다.
- 도 4a는 마이크론패턴과 단일 단백질 네트워크 형성에 대한 모식도로 아도비 일러스트로 제작된 이미지이다. 상기 도 4a 방식으로 배양된 각 단백질에 대해 측정이 이루어졌고 파이브로넥틴(도 4b), 라미닌(도 4c), 콜라겐(도 4d) 및 엘라스틴(도 4e)을 배양한 샘플에 대한 공초점 현미경 사진이다.
- 도 5는 마이크론패턴과 복합 단백질 섬유 형성에 대한 모식도로 아도비 일러스트로 제작된 이미지이다.

도 6은 다중분자로 구성된 단일 소섬유(single fibers with multi-molecular components)로 총 네 가지 조합에 의해 유도된다: (도 6a 및 6e) 파이브로넥틴 네트워크를 먼저 형성한 후 라미닌을 추가로 배양한 경우; (도 6b 및 6f) 라미닌 네트워크를 먼저 형성한 후 파이브로넥틴을 추가로 배양한 경우, (도 6c 및 6g) 파이브로넥틴과 라미닌을 동시에 배양한 경우; (도 6d 및 6h) 콜라겐 섬유를 먼저 형성한 후 파이브로넥틴을 추가한 경우. 각 공초점 현미경 사진은 z-stack으로 측정되었으면 z축으로 잘린 사진(a-d)와 xy축으로 잘린 사진(e-h)으로 분석되었다.

도 7은 파이브로넥틴에 의해 유도된 콜라겐 섬유로, 파이브로넥틴과 콜라겐을 동시에 배양하는 경우에 생성된다. 도 7a는 z-stack으로 측정된 후 z축으로 잘린 사진이고 도 7b는 xy축으로 잘린 사진이다.

도 8은 콜라겐으로 외부가 코팅된 파이브로넥틴 섬유로, 먼저 파이브로넥틴 네트워크를 형성한 후 콜라겐을 추가로 배양하는 경우에 생성된다. 도 8a는 z-stack으로 측정된 후 z축으로 잘린 사진이고 도 8b는 xy축으로 잘린 사진이다.

도 9는 대조군으로 먼저 파이브로넥틴 네트워크를 형성한 후 엘라스틴을 추가로 배양한 것으로, 두 번째로 배양되는 엘라스틴이 음전하에 의해 섬유를 형성하지도 않고 기존에 존재하는 파이브로넥틴과도 결합이 없어서 각기 독립적으로 존재하는 것을 보여준다. 도 9a는 z-stack으로 측정된 후 z축으로 잘린 사진이고 도 9b는 xy축으로 잘린 사진이다.

도 10은 본 발명의 섬유 네트워크 상에 세포를 배양한 이미지이다. 도 1a 및 1b는 심장 세포를 도 1c 및 1d는 신경세포를 나타낸다.

도 11은 기관 상에 폴리스타이렌 필름을 코팅하고 그 위에 섬유 네트워크를 형성 시키고 그 위에 세포를 배양하는 과정을 모식도로 나타낸다.

도 12a 내지 도 12c는 상기 도 11의 과정으로 제작된 폴리스타이렌 필름 상에 제조된 섬유 네트워크를 보여준다. 도 12a는 섬유 네트워크를 절단한 이미지이고, 도 12b는 절단 후에도 섬유 네트워크가 유지되는 것을 현미경으로 관찰한 결과이며, 도 12c는 이를 전달할 수 있음을 보여주는 이미지이다.

도 13은 생체적합성 물질인 폴리카프로락톤을 기관 상에 코팅하고 섬유 네트워크를 형성시키는 과정을 모식도로 나타낸다.

도 14a 및 14b는 생체적합성 물질인 폴리카프로락톤을 기관 상에 코팅하고 파이브로넥틴 섬유 네트워크를 유도(a)하여 세포를 배양(b)한 이미지이다.

도 15는 생체적합성 고분자 필름위에 유도한 섬유 네트워크를 동물의 손상된 장기에 스티커형식으로 붙여 치료할 수 있음을 보여주는 과정을 모식도로 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094]

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

[0096]

실시예

[0098]

폴리스타이렌술포네이트 패턴의 제조

[0099]

마이크로접촉 프린팅(microcontact printing) 방식을 통해 유리 커버슬립(glass coverslip) 위에 폴리스타이렌술포네이트(polystyrene sulfonate) 패턴을 만든다. 마이크로접촉 프린팅을 위해서 먼저 L-Edit(Tanner ED A)라는 소프트웨어로 포토리소그래피 마스크(photolithographic mask)의 패턴을 제작한다. 실리콘 웨이퍼는 SU-8 2002 감광액(photoresist)로 스핀코팅 된다. 패턴을 포함하는 포토리소그래피 마스크를 감광액이 코팅된 실리콘 웨이퍼 위에 올려놓고 마스크 얼라이너를 이용해 자외선에 노출시킨다. 마스크된 영역을 제거하기 위해, 프로필렌 글리콜 메틸 에테르 아세트산염에 웨이퍼를 담갔다 뺀다. 폴리디메틸 시레인(Polydimethylsilane, PDMS) 스탬프는 폴리디메틸 시레인 합성 중합체와 경화제를 섞어서 만든 혼합용액을 위에서 만든 패턴된 웨이퍼(wafer)에 붓고 65℃에서 4시간 경화를 시킨 후 웨이퍼에서 분리시키면 얻을 수 있다.

20 mg 폴리스타이렌술포네이트(16 몰%, 25 몰%, 33 몰% 및 44 몰%)는 1 ml의 50% DMF/50% PBS(phosphate buffered silane) 용매에 분산시킨 다음, 위에서 제작한 폴리디메틸 시레인 도장에 1시간 동안 잉킹(inking) 시킨 후 N₂ 가스로 용액을 제거 한 후 폴리디메틸 시레인 도장을 에탄올로 세척된 유리 커버슬립에 접촉시킴으로서 마이크로 패턴을 얻는다.

[0101]

세포외기질 단백질의 배양

[0102]

상기 방식으로 준비된 폴리스타이렌술포네이트 마이크로 패턴에 세포외기질 단백질 용액(파이버로넥틴 및 라미닌은 invitrogen에서 구입, type-1 콜라겐 및 엘라스틴은 시그마알드리치에서 구입. 모든 단백질은 PBS 상에서 66 µg/ml 농도로 조제)을 PBS 상에 준비한 후 6시간 동안 37°C에서 배양한 후, PBS에 용해된 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)용액으로 다시 이를 동안 배양하면 단백질 네트워크를 얻을 수 있다. 폴리비닐알코올 용액은 디웨팅(dewetting) 용액으로 폴리비닐알코올 용액으로 인큐베이션 시 표면의 표면장력이 변화하여 표면에 존재하는 단백질 물질들이 자유롭게 움직일 수 있도록 해준다.

[0103]

먼저, 도 2에서 네트워크를 형성할 수 있는 최적화 된 고분자를 찾기 위해서 다양한 비율의 음전하를 갖는 16%, 25%, 33% 및 44% 폴리스타이렌술포네이트를 사용해 갖은 조건(패턴 모양과 단백질 배양방식) 하에서 파이버로넥틴을 배양해 보았다. 그 결과 16%(도 2a) 및 25%(도 2b) 폴리스타이렌술포네이트 패턴 상에서는 네트워크가 형성되지 않고, 33%(도 1a 및 1c) 및 44%(도 2c) 폴리스타이렌술포네이트 패턴 위에서는 패턴과 패턴 사이에 배열을 따라 격자모양의 네트워크가 형성되었다. 음전하가 상대적으로 부족한 25% 폴리스타이렌술포네이트 이하의 경우 파이버로넥틴과 결합하여 단백질 중첩폴딩(protein unfolding)을 시키는 정전기적 힘이 약하기 때문이다. 따라서 33% 폴리스타이렌술포네이트가 단백질 네트워크를 유도하기에 최적화된 경우로, 아래의 네트워크 연구들은 모두 33% 폴리스타이렌술포네이트 패턴을 사용하였다.

[0104]

음전하의 양 뿐만 아니라 패턴 사이의 거리도 네트워크 형성에 중요한 요인으로 작용한다. 도 3에서 보듯이 20 µm 크기의 별모양 패턴이 20/40/60/80 µm 거리를 두고 사각형 배열을 이루는 구조로 준비되었고, 파이버로넥틴이 이양되었다. 패턴사이의 거리가 40 µm 이하(도 3a 및 3b)에는 33% 폴리스타이렌술포네이트의 음전하에 의해 형성된 소섬유(fibril)들이 서로 연결되어 패턴사이에 균일한 네트워크를 형성한다. 반면, 패턴사이의 거리가 60 µm 이상(도 3c 및 3d)인 경우에는 패턴 사이의 거리가 멀어서 소섬유들이 그 사이에서 연결되지 못하고 독립적으로 존재하는 것을 알 수 있다. 따라서, 적합한 음전하에 의해 소섬유가 유도되더라도 소섬유들이 뭉쳐서 연결될 수 있는 충분한 거리(40 µm 이하)가 유지되어야만 네트워크 형성이 가능하다.

[0105]

상기 두 가지 조건(음전하 양 및 패턴 사이의 거리)만 충족하면 네트워크가 형성된다는 것을 확인하기 위해서, 다른 모양과 배열의 패턴도 사용되었다. 먼저, 삼각형 모양이 정육각형 배열로 준비되었고, 도 1cii에서 볼 수 있듯이 패턴 사이를 따라 벌집모양의 네트워크를 형성하는 것을 볼 수 있다. 뿐만 아니라, 원 모양이 정사각형 배열로 있고, 각 정사각형 배열 가운데에 원모양 패턴을 1-4개까지 넣어서 패턴을 제조하였다. 도 1ciii에서 보면 정사각형 배열 중심에 존재하는 각 원모양 패턴들에 개수에 관계없이 가장 근거리로 일직선의 네트워크를 형성하는 것을 볼 수 있다.

[0106]

상기 실험들을 통해 파이버로넥틴 네트워크 유도를 위한 패턴을 찾아내었고, 파이버로넥틴 뿐만 아니라 다른 세포외기질 단백질들도 폴리스타이렌술포네이트 패턴으로 네트워크 형성이 가능한지 테스트하였다. 모델 단백질로 파이버로넥틴, 라미닌, 콜라겐 및 엘라스틴이 선별되었다. 단백질을 도 4a에서 보이는 모식도에서와 같이 패턴위에서 배양하였고, 파이버로넥틴(도 4b) 및 라미닌(도 4c)은 정교히 조절된 네트워크를 형성한 반면, 콜라겐(도 4d) 및 엘라스틴(도 4e)은 패턴과 무관하게 흡착되었다. 이 결과는 생체 내에서 각 단백질의 섬유형성 메커니즘과 관련되어 있다. 파이버로넥틴 및 라미닌의 경우 생체 내에서 선택적으로 음전하를 다량포함하고 있는 인테그린 수용체나 헤파란황산(heparan sulfate)에 결합하여 용해되지 않는 섬유를 만드는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 폴리스타이렌술포네이트 패턴으로 음전하를 제공해 주었을 때 음전하 주변에서 먼저 소섬유들이 많이 생성되고 폴리비닐알코올을 넣고 배양하였을 때 자유롭게 움직일 수 있게 된 단백질 물질들이 패턴주변에 형성되 소섬유들과 결합하면서 연속적인 자가조립으로 네트워크를 형성하게 된다. 반면, 콜라겐과 엘라스틴의 경우는 생체 내에서 음전하를 띤 수용체들과 결합에 의해서 소섬유를 형성하는 것이 아니라 가교제에 의해서 단백질 물질들이 자가조립하여 소섬유를 만들게 된다. 그러므로 폴리스타이렌술포네이트 패턴으로 음전하를 제공해주어도 아무런 영향을 받지 않는다. 결론적으로, 생체 내의 수용체를 모사한 음전하 패턴을 이용해 파이버로넥틴과 라미닌의 단일 네트워크를 유도할 수 있다.

[0108] 복합 단백질의 배양

[0109] 상기와 같이 음전하를 이용해 매우 정교하게 조절된 단일 단백질 네트워크를 만든 것도 큰 의미를 갖는다. 그러나 더 자세히 생체 내 단백질 섬유들의 구조를 보면 하나가 아닌 여러 단백질들이 각 조직마다 다르게 융합하여 존재한다. 그러므로 최종적으로 여러 조합을 갖는 복합 단백질 네트워크를 만드는 것이 실제 조직과 세포의 활동을 연구하는데 궁극적인 목표가 된다. 이러한 융합구조 모사를 위한 차선택으로 두 가지 단백질을 함유하는 복합단백질 섬유를 만드는 것이 본 발명에 가장 큰 의미를 둘 수 있다. 도 5에서 볼 수 있듯이 33% 폴리스타이렌술포네이트 마이크론 패턴을 만들고 첫 번째로 한 단백질을 배양한 후, 두 번째로 다른 단백질을 동일하게 배양하였다. 첫 번째 단백질 배양과 두 번째 단백질 배양의 배양시간 및 배양조건 모두 동일하고 중간에 처리과정은 없으며, 첫 번째 배양 용액을 제거한 후 바로 두 번째 배양 용액을 넣어주었다. 더불어, 폴리스타이렌술포네이트 패턴에 두 가지 단백질(파이버로넥틴과 라미닌 또는 파이버로넥틴과 콜라겐)을 동시에 배양한 방법도 사용하였다. 배양된 단백질은 각기 다른 형광물질로 염색되어 있고, 형광이미지는 공초점형광현미경에 의해 z-stacked 이미지로 측정되었다. 이미지는 xy 절편 뿐만 아니라 z축으로 분석되어서, 평면과 z축을 모두 포함하는 3차원적인 분석이 시행되었다. 그 결과, 두 가지의 세포외기질로 구성된 세 종류의 복합단백질 섬유를 만들었다. 그 종류로는 다중분자로 구성된 단일 소섬유(single fibers with multi-molecular components), 파이버로넥틴에 의해 유도된 콜라겐 섬유(fibronectin-induced collagen fibers) 및 콜라겐 코팅된 파이버로넥틴 섬유(collagen-coated fibronectin fibers)가 있다.

[0110] 첫 번째로 다중분자로 구성된 단일 소섬유는 총 네 가지 조합에 의해 유도된다. 먼저, 파이버로넥틴 또는 라미닌을 폴리스타이렌술포네이트 패턴 위에 배양하여 각 단일 단백질 네트워크를 만든 후, 두 번째로 라미닌(도 6a 및 6e) 또는 파이버로넥틴(도 6b 및 6f)을 배양하였다. 그러면 이미 만들어진 단일 단백질 네트워크 상에 두 번째로 배양된 단백질이 무작위로 끼어들어가면서 한 섬유에 두 종류의 단백질이 공존하게 된다. 또한 파이버로넥틴과 라미닌을 동시에 주입하여서 배양한 경우도 두 물질이 섞이면서 네트워크를 형성하게 된다(도 6c 및 6g). 이러한 파이버로넥틴과 라미닌의 복합 단백질 섬유가 형성될 수 있는 이유는 두 가지 단백질 모두 음전하에 의해서 섬유를 형성하기 때문에 각각 따로 배양되든 동시에 배양되든 음전하 패턴에 의해 각 단백질의 섬유를 무작위로 형성하게 되기 때문이다. 더불어, 콜라겐을 먼저 배양한 후 2차로 파이버로넥틴을 배양한 경우도 두 단백질이 혼합되어 존재하는 섬유가 만들어진다. 콜라겐을 먼저 배양하는 경우는 도 4d에서 보듯 격자모양의 네트워크가 아닌 무방향성의 섬유가 형성된다. 그 위에 파이버로넥틴을 배양하면 파이버로넥틴 물질 내부에 존재하는 콜라겐결합부위(collagen-binding site)에 의해서 두 단백질이 강력하게 결합하기 때문에 혼합된 섬유가 형성된다(도 6d 및 6h). 이처럼 총 두 단백질로 구성된 네 가지 조합을 통해 분자레벨에서 두 단백질이 혼합된 단일 섬유를 얻을 수 있다.

[0111] 둘째로 파이버로넥틴과 콜라겐을 동시에 배양하는 경우 파이버로넥틴에 의해 유도된 콜라겐 섬유가 만들어진(도 7). 콜라겐만 폴리스타이렌술포네이트 패턴에 배양되는 경우는 도 4d처럼 균일한 네트워크가 아닌 무방향성의 콜라겐 섬유들이 생기게 된다. 하지만, 파이버로넥틴과 콜라겐이 섞여서 배양되는 경우, 앞에서 언급한 바와 같이 파이버로넥틴 물질 내 도메인에 존재하는 콜라겐 결합부위에 의해서 콜라겐과 강한 결합을 하게 된다. 또한, 파이버로넥틴은 음전하를 갖는 수용체에 의해서 섬유가 유도되고 도 4a에서 보듯 폴리스타이렌술포네이트 패턴 위에서 정교한 네트워크를 형성한다. 따라서, 콜라겐은 서로 결합하며 공존하고 있는 파이버로넥틴에 의해서 동시에 패턴 사이에 조절된 섬유를 형성하게 된다.

[0112] 다음으로, 이미 형성된 파이버로넥틴 네트워크에 콜라겐을 배양하는 경우 미리 존재하고 있던 파이버로넥틴 네트워크의 외부에 콜라겐이 감싸는 모양의 섬유가 만들어진(도 8). 이는 콜라겐이 음전하 수용체에 의해서 섬유를 형성하지는 않지만, 파이버로넥틴과 콜라겐 간의 강한 결합에 의해서 이미 존재하고 있는 파이버로넥틴 네트워크의 외부에 결합하면서 야기된다.

[0113] 마지막으로 이미 존재하는 파이버로넥틴 네트워크에 엘라스틴을 추가로 배양하는 경우는 두 단백질이 공존하지 않고 따로 존재하게 된다(도 9). 이것은 엘라스틴의 섬유가 음전하 유도체에 의해서 유도되지 않을 뿐만 아니라, 엘라스틴과 파이버로넥틴 사이에 어떠한 결합도 존재하지 않기 때문이다. 따라서, 이 경우는 단지 새로운 단백질을 넣는 것이 아니라 단백질 간에 결합성이 있거나 음전하에 의해 섬유가 유도되는 경우만이 복합단백질을 만들 수 있다는 것을 설명해주는 케이스 통계 샘플로 분류된다.

[0114] 상기와 같이 본 발명에 따른 복합단백질섬유는 다양한 구조와 성분을 포함하고 있어 생체 내 다양한 조직을 잘 모사하고 있으며 매우 효과적인 세포 배양의 기질의 제작에 이용할 수 있다. 본 발명에 따른 음전하 고분자의

패턴 과정에서 복잡한 화학적 반응이나 기질의 표면 특성에 상관없이 표면처리를 할 수 있으므로 복잡한 기관이나 비자연계적 메커니즘에 한정되었던 기존 단백질 섬유형성 연구의 문제점을 극복할 수 있다. 또한 음이온성 불규칙 공중합체를 세포부착용 막으로 활용하는 것은 여러가지 점에서 매우 유리하다. 자연계의 단백질 네트워크 형성 메커니즘을 정확히 모사했을 뿐만 아니라 추가적인 물리적 자극없이 자발적인 섬유형성이 가능하다. 더 나아가, 상기 발명에서 언급된 세포외기질 단백질들뿐만 아니라 비슷한 성질을 갖는 혹은 서로 간에 결합을 갖는 생체 내에 존재하는 많은 단백질들 또한 음전하 고분자 패턴위에서 복합 단백질 섬유를 형성할 수 있을 것으로 기대된다. 이렇게 만들어진 다양한 구성성분과 구조의 복합단백질구조는 여러 종류의 세포연구 및 치료용으로 다방면 활용되어 산업적으로 그리고 학문적으로 큰 효과를 창출할 것으로 기대된다.

[0116]

세포배양용 스캐폴드의 적용

[0117]

파이브로넥틴은 세포 부착, 성장, 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 상기 방식으로 준비된 균일한 파이브로넥틴 네트워크의 생체 적합성을 확인하기 위해 세포들과 배양하였다.

[0118]

배양된 세포는 이틀동안 자란 실험용 쥐(Sprague-Dawley rats)를 사용하였으며, 세포 추출시 하버드대학교 Animal Use and Care Committee에서 승인받은 프로토콜을 사용하였다. 쥐로부터 세포를 분리한 후, 각 시료당 심장세포는 10만개씩 3일 동안 또는 뇌세포는 1만개씩 7일 동안 배양하였다. 세포배양 후에는 형광이미지를 찍기 위해 면역염료를 사용하여 염색하였다. 먼저, 4% 파라포름알데히드 (Para-formaldehyde) 및 triton-X 100을 사용하여 세포를 고정시켰다. 심장세포의 경우에는 세포를 고정시킨 후에, 단일클론 항-사코메트릭 α-악티닌(monoclonal antisarcomeric α-actinin) 용액에 2시간 동안 배양시킨다. 그리고 다시 2시간 동안 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)와 고트 항-마우스 IgG(H+L) 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine)으로 핵과 α-악티닌을 각각 염색하였다. 뇌세포의 경우에는 세포를 고정시킨 후에, 4% BSA(bovine serum albumin)을 30분 동안 배양시켜 비특정결합 방지하였다. 그리고 0.5% BSA 용액에 1:200 비율로 녹인 β3-튜블린과 DAPI를 하룻밤 동안 배양시켰다. 다음날 0.5% BSA 용액에 1:200 비율로 고트 항-래빗 IgG(H+L) 테트라메틸로다민과 DAPI를 45분 동안 배양해 뇌신경 네트워크와 핵을 각각 염색하였다. 이렇게 각기 다른 방식으로 염색된 파이브로넥틴 네트워크 위에 자란 심장세포와 뇌세포는 공초점현미경을 사용해 형광 이미지를 얻었다.

[0119]

도 10에서 볼 수 있듯이, 심장 세포(도 10a 및 10b) 및 신경 세포(도 10c 및 10d)가 파이브로넥틴 네트워크가 존재하는 곳에서만 선택적으로 성장하는 것이 확인되었다. 이는 파이브로넥틴 존재 하에 세포가 잘 성장할 수 있음을 보여준다. 따라서, 상기 방식으로 준비된 파이브로넥틴 네트워크가 존재하는 부분에 선택적인 생체 적합성을 보임을 확인하였다.

[0120]

폴리스타이렌술포네이트 패턴은 상기에서 사용한 유리 커버 슬립뿐만 아니라, 깔유리(glass slide)에 코팅된 다양한 고분자 필름 위에 형성 할 수 있다. 이렇게 고분자 필름 위에 형성된 파이브로넥틴 네트워크는 고분자 필름을 깔유리 표면에서 분리하여 자유로이 새로운 부분으로 전달이 가능하다. 따라서, 이러한 전달 가능한 파이브로넥틴 네트워크를 손상된 피부나 장기에 상처 치유 스티커로 적용이 가능하다.

[0121]

먼저, 도 11에서 보듯이 깔유리 위에 폴리스타이렌 필름이 스펠 코팅으로 형성되고, 그 필름 위에 폴리스타이렌술포네이트 패턴이 형성된다. 그리고, 파이브로넥틴과 폴리비닐 알코올을 순차적으로 배양하면 도 12b에서 볼 수 있듯이 대면적의 파이브로넥틴 네트워크를 형성할 수 있다.

[0122]

네트워크 형성 후 폴리스타이렌 필름의 양끝면을 면도칼로 절단한 뒤 도 12a에서 보듯이 용액에 필름을 담그면 파이브로넥틴을 포함하는 폴리스타이렌 필름을 전달할 수 있다. 용액에 전달한 후에도 도 12b에서 보듯이 파이브로넥틴 네트워크가 손상없이 유지되는 것을 확인하였다.

[0123]

폴리스타이렌 뿐만 아니라 다양한 고분자 필름을 폴리스타이렌 대신에 사용할 수 있다. 특히, 도 13에서 제시한 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)은 생체적합성을 지닌 고분자로 인간을 포함한 동물실험에 사용될 수 있다. 따라서, 도 13에서 기술하였듯이, 상기 기술을 상처 치유 스티커로 사용하기 위해서 세포 적합성이 없는 폴리스타이렌 대신 폴리카프로락톤 필름을 사용하여, 도 14a에서 볼 수 있듯이 자유자재로 전달 가능한 파이브로넥틴 네트워크를 만들 수 있다.

[0124]

상기 폴리카프로락톤 필름 상에 폴리스타이렌술포네이트를 패터닝하고 세포를 배양하였다.

[0125]

PCL 파우더를 질량비 6%의 헥사플로로아이소프로판올 (hexafluoroisopropanol, HFIP)의 용액에 녹여, 25000

rpm으로 1분 동안 스피코팅한 박막을 사용하였다. PCL은 생체적합용 생분해성 고분자로 미국 FDA승인 물질이다. PCL이 사용가능한 것은, 유사한 화학적 구조를 갖고 있는 Poly(Lactide-co-Glycolide, PLGA)나 Polylactic acid (PLA)등의 단일고분자나 2개 이상의 공중합체도 모두 가능한 것을 보여주는 일 레이다. 형성된 박막에 앞서서 폴리스틸렌에서 보여준것과 같이 동일한 방법으로 PSS를 패터닝하고, 파이브로넥틴을 동일한 조건에서 배양한 결과를 도 13에서 보여준다.

[0126]

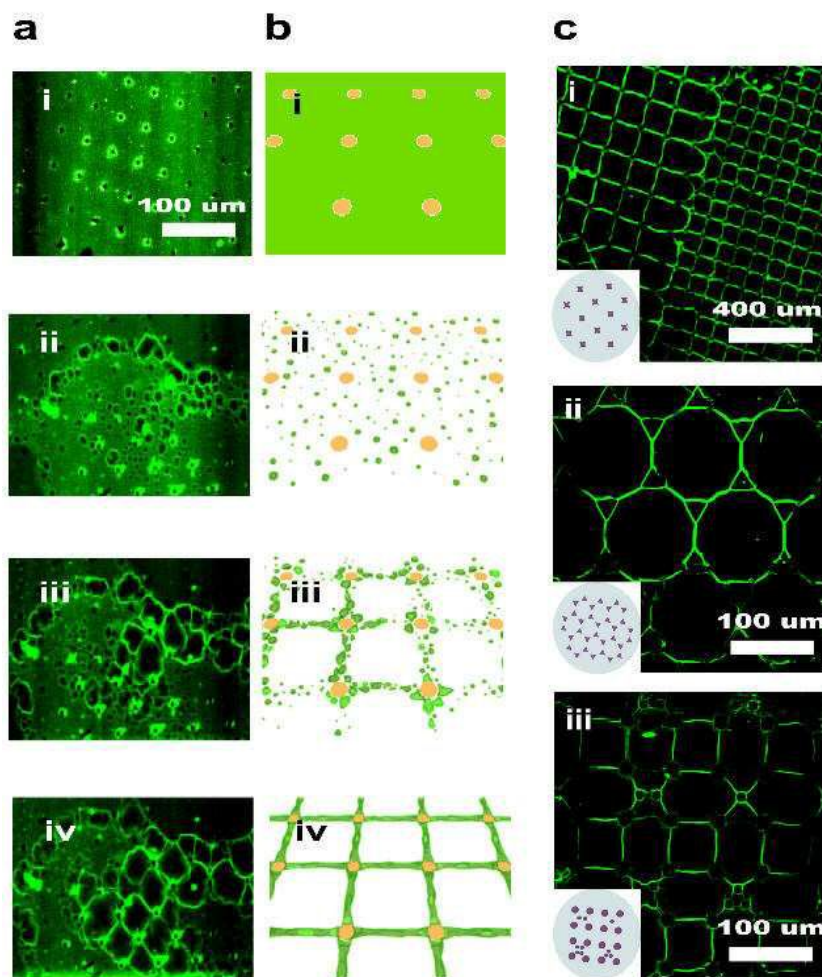
도 14a 및 14b에서 제시한 생체적합성 고분자 필름위에 자발적으로 형성된 파이브로넥틴 네트워크 상에 세포를 배양하여 도 15의 손상된 동물 혹은 인체 장기에 세포스티커형식으로 붙여 다양한 기관의 상처 치유와 조직재생에 사용될 수 있다. 본 세포배양에 사용된 세포는 유방암 세포인 MCF7 세포를 활용하였다. 세포는 단백질 네트워크에 배양하기 위하여, 다른 기질에서 배양된 MCF7세포를 PBS 완충액을 이용하여 세척한 후, 37도에서 배양할 준비를 한 후, 트립신을 이용하여 세포를 떼어내어, 떨어진 세포를 단백질 네트워크에 배양하였다.

[0128]

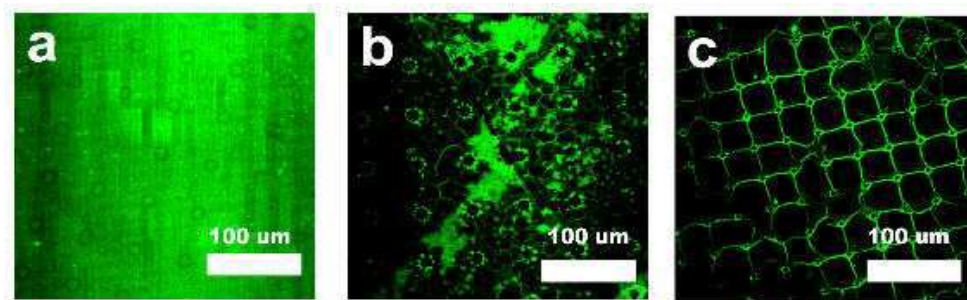
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

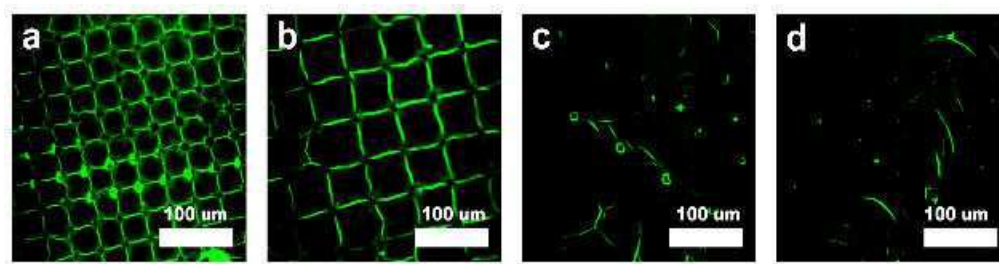
도면1



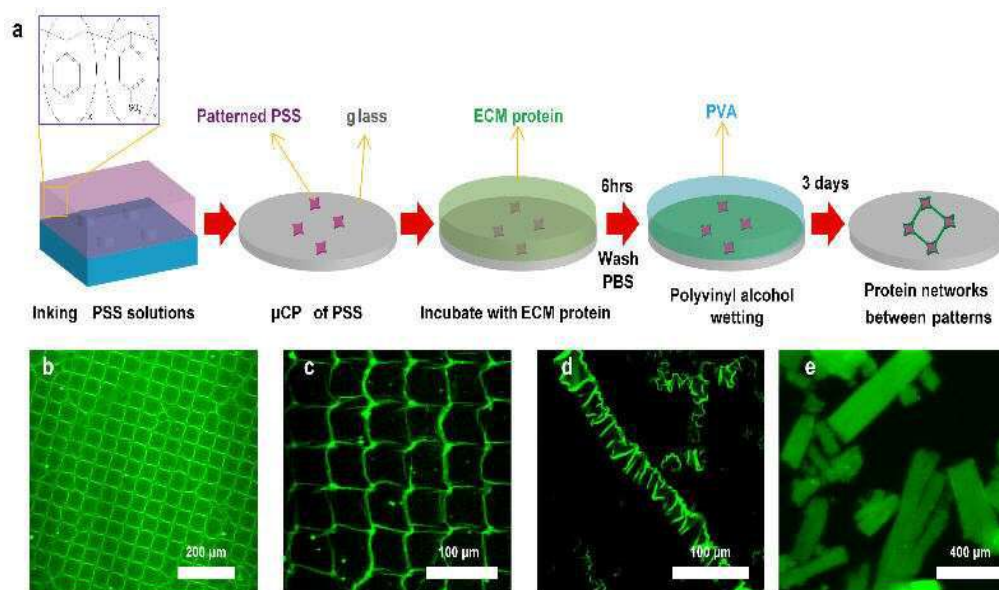
도면2



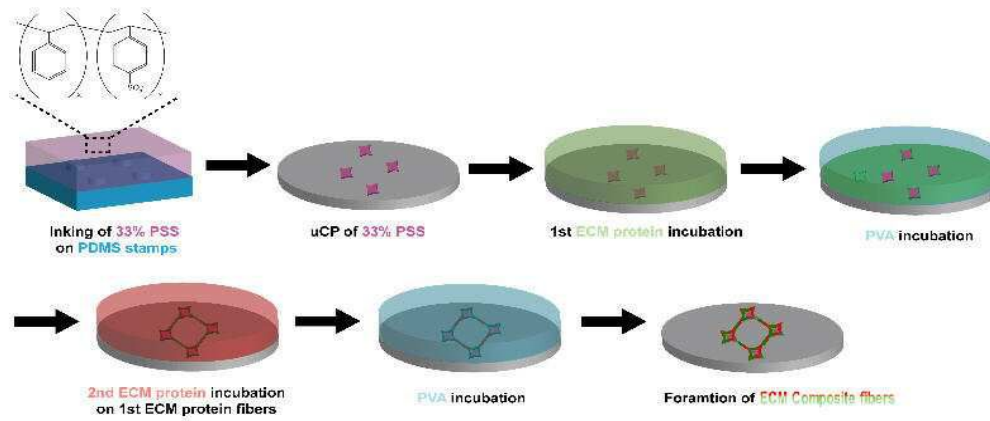
도면3



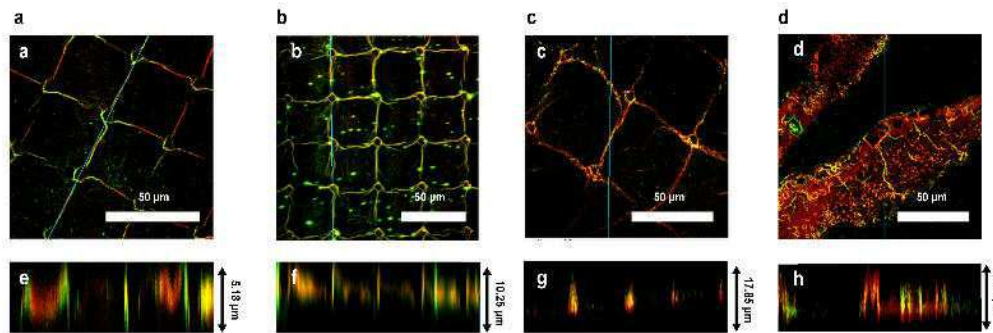
도면4



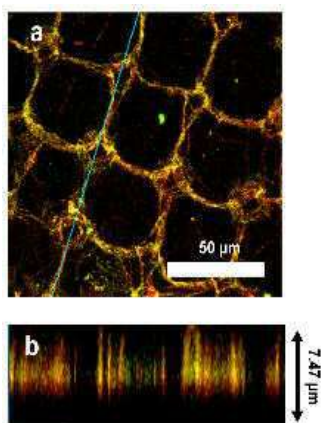
도면5



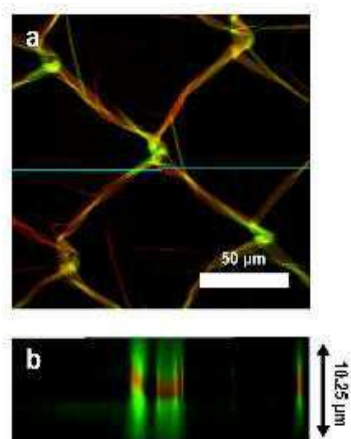
도면6



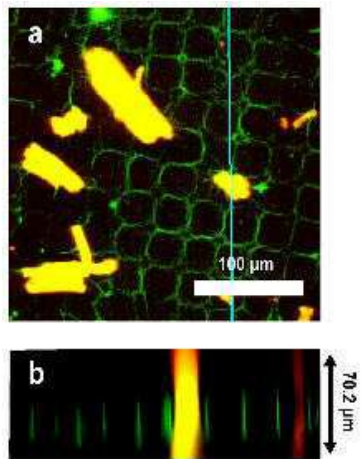
도면7



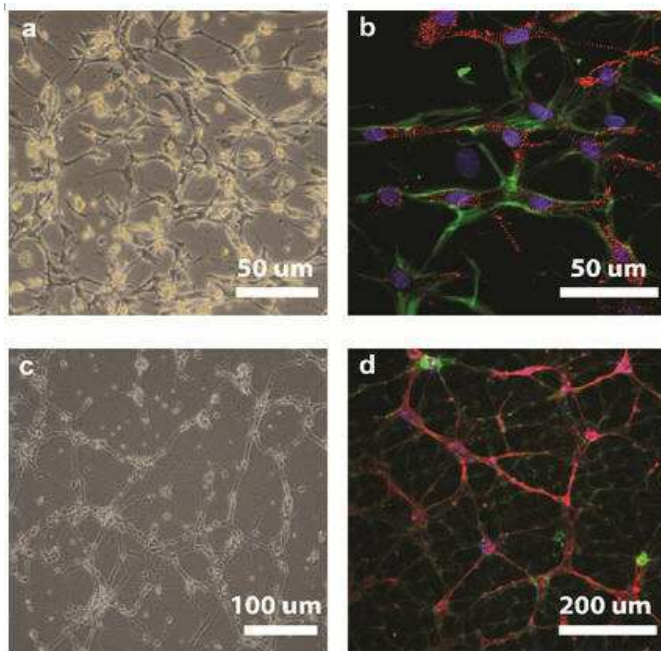
도면8



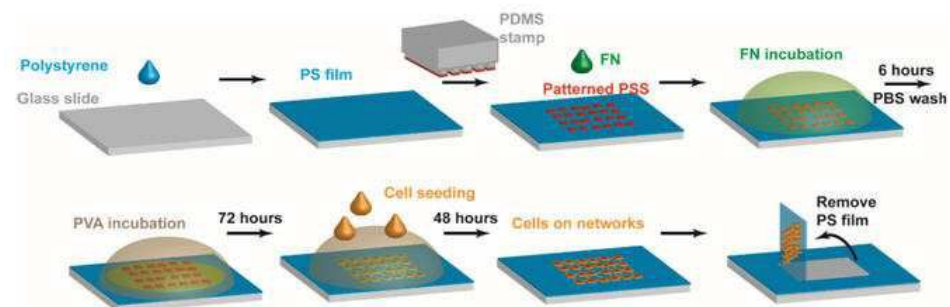
도면9



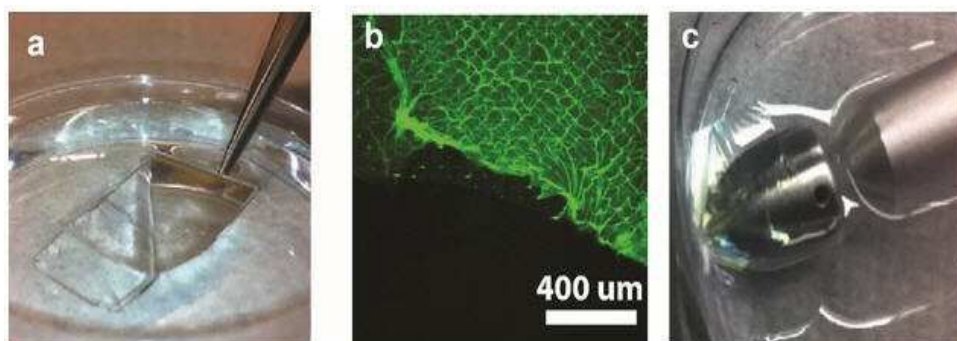
도면10



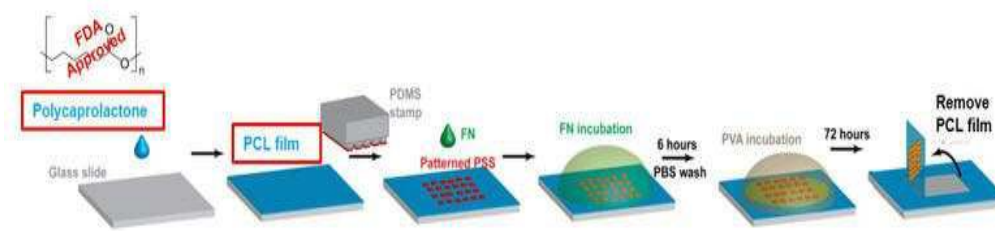
도면11



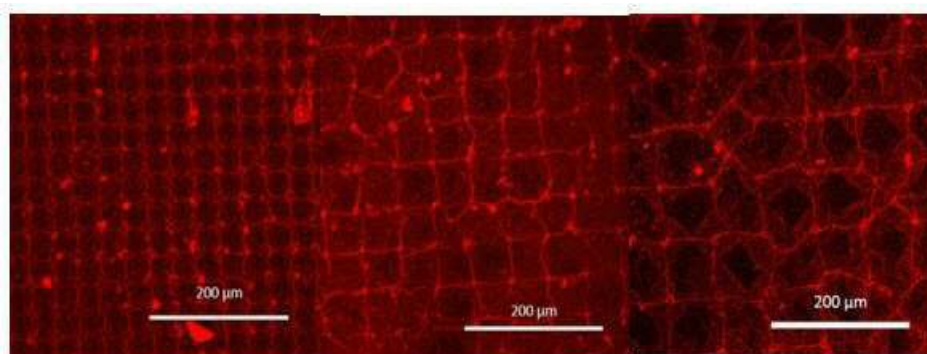
도면12



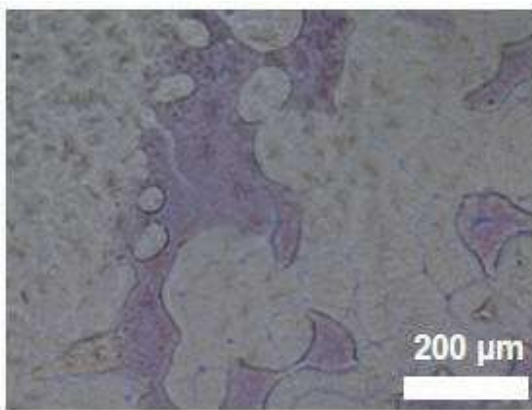
도면13



도면14a



도면14b



도면15

