

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 10월 17일 (17.10.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/154381 A1

- (51) 국제특허분류:
C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/42 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01) C07D 207/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/003079
- (22) 국제출원일: 2013년 4월 12일 (12.04.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0037954 2012년 4월 12일 (12.04.2012) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-743 서울시 서대문구 신촌동 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김은경 (KIM, Eun Kyoung); 140-884 서울시 용산구 한남동 258번지 현대 리버티하우스 1804호, Seoul (KR). 김현옥 (KIM, Hyun Ok); 463-858 경기도 성남시 분당구 정자동(한솔마을) 미켈란체르빌 C동 805호, Gyeonggi-do (KR). 유정목 (YOU, Jung Mok);

120-810 서울시 서대문구 북가좌2동 80-24, Seoul (KR). 김정훈 (KIM, Jeong Hun); 153-821 서울시 금천구 독산4동 919번지, Seoul (KR). 박태훈 (PARK, Tea Hoon); 120-830 서울시 서대문구 연희동 292-6 에이플러스리빙텔 406호, Seoul (KR). 김병관 (KIM, Byeong Gwan); 448-533 경기도 용인시 수지구 신봉동 LG자이 1차 112동 602호, Gyeonggi-do (KR). 허준석 (HEO, June Seok); 131-220 서울시 중랑구 상봉동 쌍용아파트 1304동 303호, Seoul (KR). 김한수 (KIM, Han Soo); 411-370 경기도 고양시 일산 서구 주엽동 강산 한신아파트 303동 1402호, Gyeonggi-do (KR).

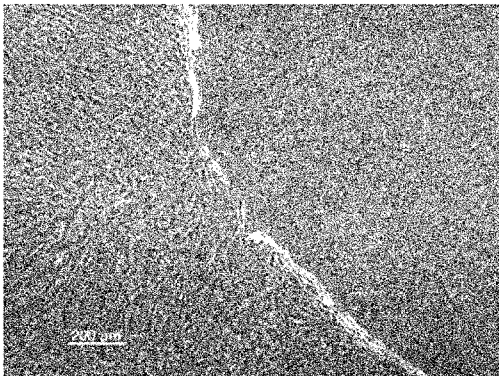
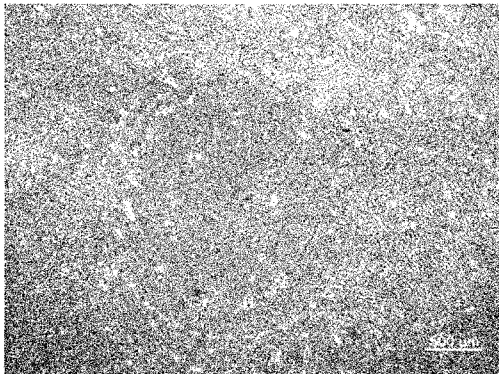
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-080 서울시 강남구 역삼동 648-1, BYC 빌딩 5층, Seoul (KR).

(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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SELECTIVE CELL ATTACHMENT/DETACHMENT, CELL PATTERNIZATION AND CELL HARVESTING BY MEANS OF NEAR INFRARED RAYS

(54) 발명의 명칭: 근적외선에 의한 세포의 선택적 탈착, 패턴 및 수확 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for selective cell attachment/detachment, cell patternization and cell harvesting by means of near infrared rays. More particularly, conducting polymers or metal oxides having exothermic characteristics upon irradiation of near infrared light is used as a cell culture scaffold, thus selectively attaching/detaching cells without an enzyme treatment. The scaffold has an effect of promoting proliferation or differentiation of stem cells, and therefore, can be used as a stem cell culture scaffold. The scaffold enables cell attachment/detachment without temporal or spatial restrictions, thus enabling cell patternization.

(57) 요약서: 본 발명은 근적외선에 의한 세포의 선택적 탈착, 패턴 및 수확 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 근적외선 조사 시 발열특성을 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물을 세포배양용 지지체로 사용하여 효소 처리 없이도 세포를 선택적으로 탈착시킬 수 있고, 상기 지지체는 줄기세포 증식 또는 분화를 촉진하는 효과가 있어 줄기세포 배양 지지체로 사용할 수 있으며, 시간적 공간적 제약 없이 세포 탈착이 가능하여 세포의 패턴화가 가능하다.



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 근적외선에 의한 세포의 선택적 탈착, 패턴 및 수확 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 배양 분야에서 사용할 수 있고, 트립신 처리 없이 세포를 탈착시킬 수 있는 근적외선에 의한 세포의 선택적 탈착, 패턴 및 수확 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- [3] 끊임없이 자기 복제 능력과 신체 내의 다른 조직으로 분화할 수 있는 이러한 줄기세포를 이용한 치료법은 최근 생명공학의 발달에 힘입어 폭넓게 사용되고 있다. 특히 인체의 장기 재생은 물론 난치병으로 알려진 파킨슨 병이나 암, 당뇨병 등의 치료에 사용되기 시작하였다(Miyahara Y. *et al.*, *Nature Medicine*, 12(4), 459-465, 2006; Kang, K. S. *et al.*, *Stem Cells*, 24(6), 1620-1626, 2006; Silva, G.V. *et al.*, *Circulation*, 18, 111, 2005). 현재 줄기세포를 이용한 다양한 치료법이 개발되고 있지만, 아직까지 줄기세포의 특성 자체에 대한 연구가 많이 부족하며, 또한 줄기세포의 증식과 분화의 한계로 줄기세포를 이용한 치료에도 많은 한계점이 있다.
- [4] 일반적으로 줄기세포는 세포 대 세포(cell to cell), 그리고 성장인자(Growth factors)들을 포함한 세포 대 세포외 기질(cell to extracellular matrix(ECM))에 의해 그 분화의 운명(fate)이 많이 좌우되는 것으로 알려져 있고, 또한 유익한(instructive) 환경에 의해서도 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다(Nakayama *et al.*, *Neurosci Res*, 46, 241-249, 2003). 최근 줄기세포의 환경과 줄기세포와의 상호 작용에 관한 연구로서 바이오엔지니어링(bioengineering) 분야가 대두되고 있다. 이는 세포의 기능을 연구하거나 유도함에 있어서 전통적으로 사용되는 방법인 세포 배양액에 포함되는 호르몬이나 성장 인자, 그리고 혈청(serum)의 조절이 아닌 세포가 부착되어 자라는 지지체와 세포와의 상호 작용을 통하여 세포의 특성인 부착(attachment)과 증식(proliferation), 그리고 분화(differentiation)와 세포외 기질(extracellular matrix) 분비 등을 조절하는 것을 의미한다(Bauer S. *et al.*, *Acta Biomaterialia*, 4, 1576-1582, 2008; Guo L. *et al.*, *Biomaterials*, 29, 23-32, 2008). 이를 위해서는 바이오 적합성(biocompatibility)을 가지는 물질의 개발과 표면의 특성을 변화시키는 기술(chemical surface modification)이 핵심적인 요소라 할 수 있다.

- [5] 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다.
- [6] 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.
- [7] 성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다. 이러한 성체 줄기세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 담당한다. 대표적인 성체 줄기세포에는 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)와 중간엽(간엽) 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)가 있다. 조혈모세포는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 주로 혈액내의 혈구세포로 분화하는 반면, 중간엽(간엽) 줄기세포는 골모세포(osteoblast), 연골모세포(chondroblast), 지방세포(adipocyte) 및 근육모세포(myoblast) 등의 중배엽성 조직의 세포로 분화하는 것으로 알려져 있다.
- [8] 줄기세포를 어떻게 분화하고 처리하는 것에 따라 다양한 세포로의 분화가 가능하다. 줄기세포의 분화능을 조절하기 위해서는 세포 대 세포(cell to cell), 그리고 성장인자(Growth factors)들을 포함한 세포 대 세포외 기질(cell to extracellular matrix(ECM))과의 상호 작용 연구와 조절이 중요하다.
- [9] 일반적으로 세포를 탈착시키는 종래 기술은 트립신이라는 효소를 가장 많이 사용하고 있다. 트립신은 세포 배양 용기에 부착된 세포를 화학적으로 결합을 손상시키기 때문에 줄기세포의 세포벽이나 세포벽에 존재하는 단백질을 손상시킨다는 문제점이 있다. 따라서, 트립신을 사용할 경우 줄기세포의 손상이 염려되며, 이를 통해 증식력 및 분화능 저하 문제가 발생할 수 있다. 또한 트립신은 배양 용기에 전체적으로 처리를 하기 때문에 부분적으로 원하는 세포를 취하기 어려운 부분도 있다.
- [10] 따라서 세포를 배양 용기에서 손쉽게 떼어낼 뿐만 아니라 이 과정에서 세포에 손상이 가지 않도록 하는, 그리고 원하는 부분에서만 세포를 탈착시켜 취할 수 있는 새로운 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 근적외선 흡수가 가능한 전도성 화합물 또는 금속산화물 필름 표면에서 세포를 배양하고, 근적외선 조사에 의한 전도성 화합물 또는 금속산화물의 광열 특성을 이용하여 세포의 손상 없이 손쉽게 선택적으로 세포를 탈착시키는 세포배양용기, 이를 포함하는 세포 배양용 키트 및 이를 이용하여 세포를 증식, 분화 또는 탈착시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 근적외선 조사에 의한 전도성 화합물 또는 금속산화물의 광열 특성을 이용하여 세포 탈착이 용이한 세포 배양용 패터화된 기판을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름이 형성된 세포 배양 영역을 포함하는 세포배양용기를 제공한다.
- [14] 본 발명은 또한 본 발명의 세포배양용기; 및 근적외선 광선을 조사하는 장치를 포함하는 세포 배양용 키트를 제공한다.
- [15] 본 발명은 또한 본 발명의 세포배양용기에서 성체 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 증식 또는 분화 방법을 제공한다.
- [16] 본 발명은 또한 본 발명의 세포배양용기에 근적외선 광선을 조사하여 배양중인 세포를 탈착시키는 방법을 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한 기재; 및 상기 기재 상에 형성되고, 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름을 함유하는 세포 배양 영역을 포함하는 세포 배양용 패터화된 기판을 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명은 산화, 환원 상태에 따라 근적외선 흡수 특성을 가지고 있어 근적외선 조사 시 광열 특성을 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물을 세포 부착용 지지체로 사용하여 시기적 또는 장소적 제약을 받지 않고 원하는 위치로부터 세포 특히 성체 줄기세포의 증식, 선택적 탈착, 패터닝에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명의 화학식 1a의 헤테로고리화합물의 흡수 스펙트럼이다.
- [20] 도 2는 본 발명의 화학식 1a의 헤테로고리화합물의 근적외선 흡수(808 nm)에 의한 광열 효과를 나타낸 것이다.
- [21] 도 3은 본 발명의 화학식 1d의 헤테로고리화합물로 제조된 산화, 환원(환원된 중성상태) 필름을 줄기세포의 지지체로 사용하여 확인한 줄기세포의 증식 속도를 나타낸 것이다.
- [22] 도 4는 본 발명의 화학식 1a의 헤테로고리화합물로 제조된 필름 상에서 배양된 줄기세포를 근적외선 조사에 의해 선택적 영역에서 탈착을 보여주는 현미경 사진도이다.
- [23] 도 5는 근적외선 조사 시간에 비례하는 줄기세포의 탈착 면적이다.

[24] 도 6은 본 발명의 화학식 1e의 헤테로고리화합물로 제조된 필름으로부터 근적외선 조사에 의해 탈착된 줄기세포를 새로운 세포배양용기에 이동하여 배양한 현미경 사진도이다.

[25] 도 7은 본 발명의 화학식 1e의 헤테로고리화합물로 제조된 필름으로부터 근적외선 조사에 의해 탈착된 줄기세포를 세포배양용기에 이동하여 16일 동안 (a) 골세포, (b) 지방세포, (c) 연골세포로 분화한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[27] 본 발명은 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름이 형성된 세포 배양 영역을 포함하는 세포배양용기에 관한 것이다.

[28] 본 명세서에서, "세포배양용기"는 통상의 세포배양에 사용되는 용기를 말하는 것으로, 세포배양에 적합한 물질, 예컨대, 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리에틸렌(polyethylene), 이들의 공중합체 또는 유리 중의 어느 하나로 형성된 것일 수 있다. 현미경 하에서 세포를 계수할 수 있는 투명한 재질이 좋으나 색을 띠는 재질도 가능하고, 표면이 균일하며 원형이나 사각형의 형태일 수 있으나, 이에 한정되지 않고 세포의 특이성이나 사용용도에 적합한 모양 및 기판상에 일정한 패턴을 삽입하는 등의 특수한 처리를 하여 제작한 것일 수도 있다. 세포배양용기는 원통형, 직육면체 또는 다면체 구조 등을 가질 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 세포배양용기는 세포가 부착되어 배양될 수 있는 세포 배양 영역을 포함하되, 플라스틱 형태, 페트리 디쉬 형태의 밀폐형 일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[29] 본 발명의 세포배양용기는 상술한 형태와 재질을 갖는 세포배양용기에서 세포가 배양되는 세포 배양 영역 상부에 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름이 형성되어 있는 것을 특징으로 한다.

[30] 상기 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름은 근적외선을 흡수하여 빛 에너지가 열에너지로 전환되어 열을 발생하는 전도성 고분자 또는 금속산화물의 광열 특성을 이용한 것으로, 상기 필름을 세포 지지체로 사용할 경우 근적외선 조사 시 열이 발생하는 부분에서 세포가 탈착되어 기존의 트립신 처리에 따른 세포벽 또는 세포벽 단백질의 손상 없이 세포를 쉽게 탈착시킬 수 있을 뿐만 아니라 근적외선 조사 후에도 필름의 손상이 없기 때문에 세포배양 및 탈착에 반복하여 재사용할 수 있는 장점을 갖는다.

[31] 또한, 일 구체예에 따르면, 상기 필름을 줄기세포 배양 지지체로 사용한 결과, 줄기세포의 증식 속도가 일반 세포배양용기에 비해 빠르며, 선택적으로 탈착된 줄기세포는 정상적으로 추가 배양 및 분화가 가능하다.

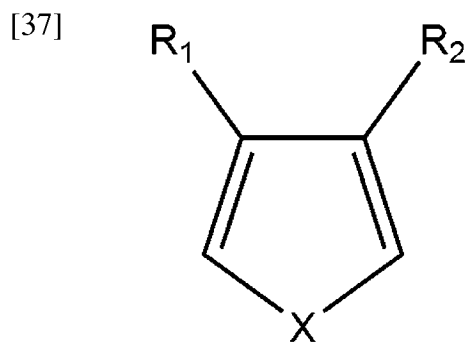
[32] 따라서, 상기 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름은 세포 증식 또는 분화용 지지체로도 사용할 수 있다.

[33] 상기 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름은 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 단량체의 중합체 또는 공중합체로 제조하거나, 금속산화물로 제조한 것일 수 있다.

[34] 본 명세서에서, 근적외선은 700 내지 2500 nm의 파장 범위에 해당하는 것으로, 본 발명의 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 단량체들 역시 상기 범위 내에서 흡광도를 가질 수 있다. 일 구체예에 따르면, 대략 808 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하면 300초까지 조사할 경우, 대략 25°C 정도의 발열 효과를 낼 수 있다.

[35] 상기 전도성 단량체는 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로고리화합물 및 아닐린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다:

[36] [화학식 1]

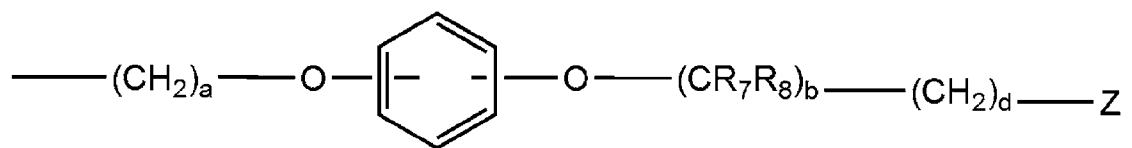


[38]

[39] 상기 식에서,

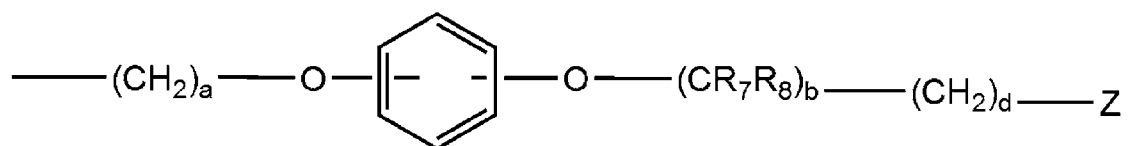
[40] X는 N, O, S, Se 또는 Te를 나타내고,

[41] R₁ 및 R₂는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소원자, -(CH₂)_ℓ-O-(CH₂)_m-(CF₂)_n-(CR₇R₈)_k-(CH₂)_d-Z,



, -O-CH(R₃)-CH(R₄)-O-, 또는 -O-CH₂-C(R₅)(R₆)-CH₂-O- 이며, 다만, R₁과 R₂가 동시에 수소인 경우는 제외하고;

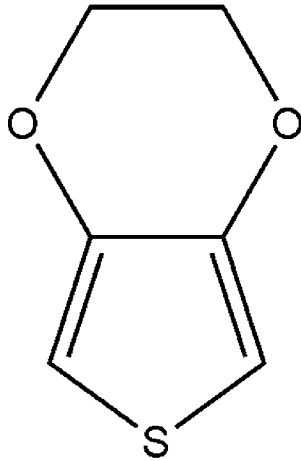
[42] 상기 R₃, R₄, R₅ 및 R₆는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소원자, -(CH₂)_d-Z, -(CH₂)_ℓ-O-(CH₂)_m-(CF₂)_n-(CR₇R₈)_k-(CH₂)_d-Z, 또는



이며, 다만, R₃와 R₄가 동시에 수소를 갖는 경우, 및 R₅와 R₆가 동시에 수소를 갖는 경우를 제외하며;

- [43] 상기 R_7 및 R_8 는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소, 탄소수 1 내지 5의 알킬기 또는 $-(CH_2)_d-Z$ 이고;
- [44] Z 는 메타아크릴레이트기 또는 아크릴레이트기이며;
- [45] ℓ 은 0 ~ 2 정수이고, m 은 0 ~ 3의 정수이며, n 은 0 ~ 5 정수이고, k 는 0 ~ 4 정수이며, a 는 0 ~ 2 정수이고, b 는 0 ~ 7 정수이며, d 는 0 ~ 2 정수이다.
- [46] 바람직하게는, 상기 화학식 1의 헤테로고리화합물은 하기 화학식 1a 내지 1k 중 어느 하나일 수 있다:
- [47] [화학식 1a]

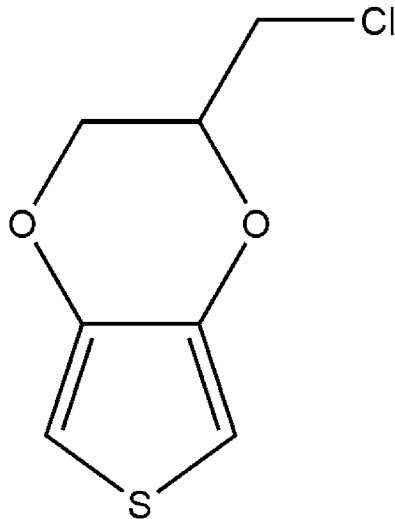
[48]



[49]

[화학식 1b]

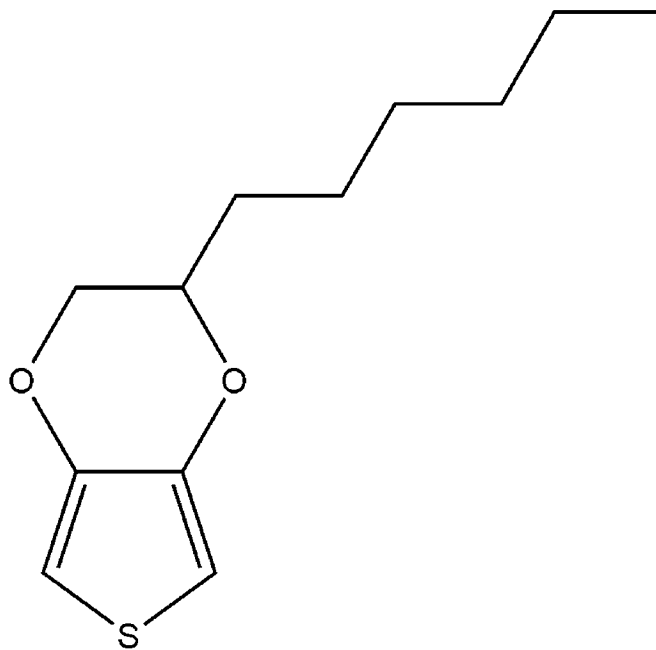
[50]



[51]

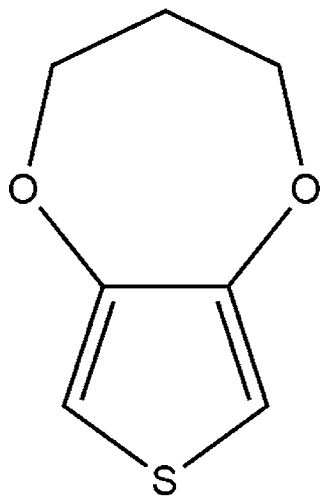
[화학식 1c]

[52]



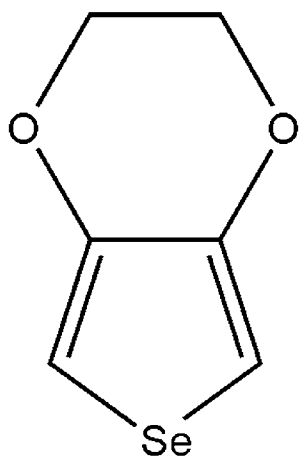
[53] [화학식 1d]

[54]



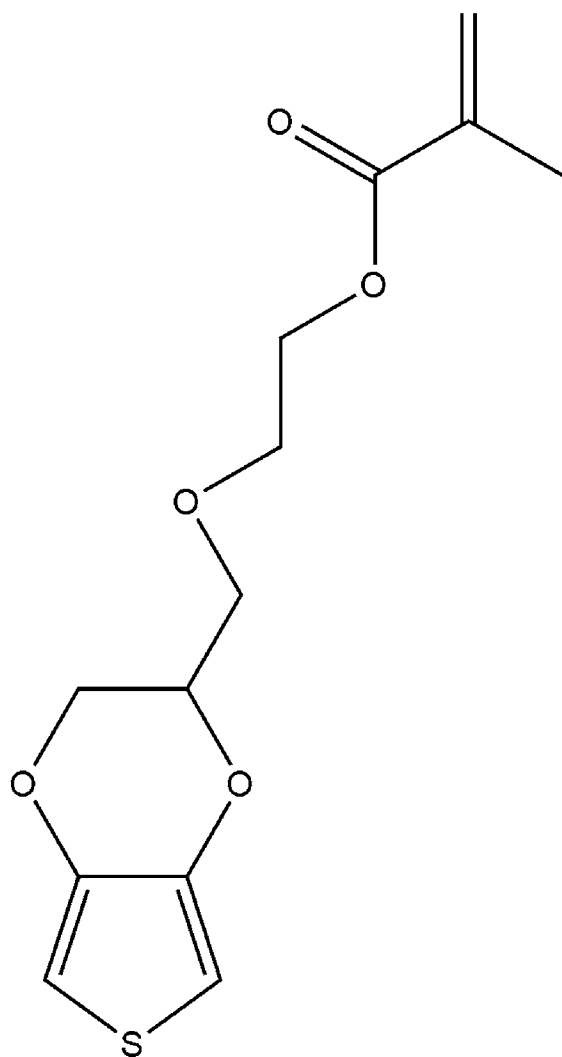
[55] [화학식 1e]

[56]



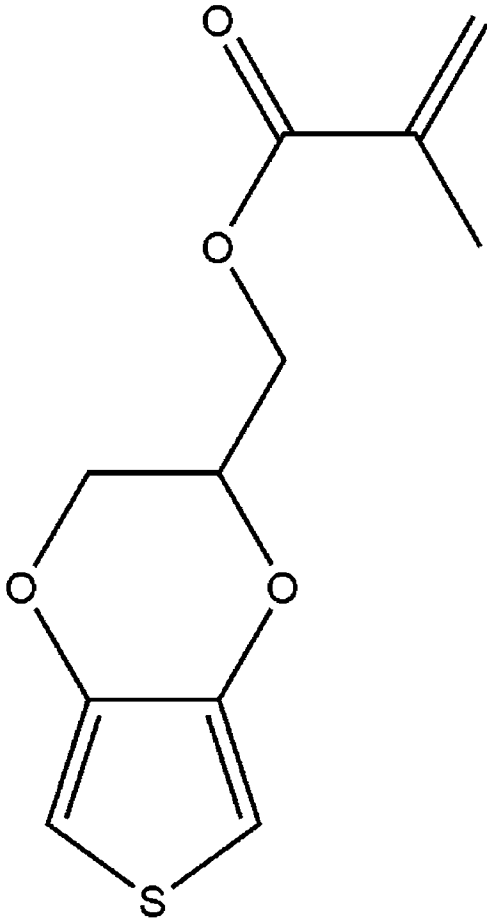
[57] [화학식 1f]

[58]



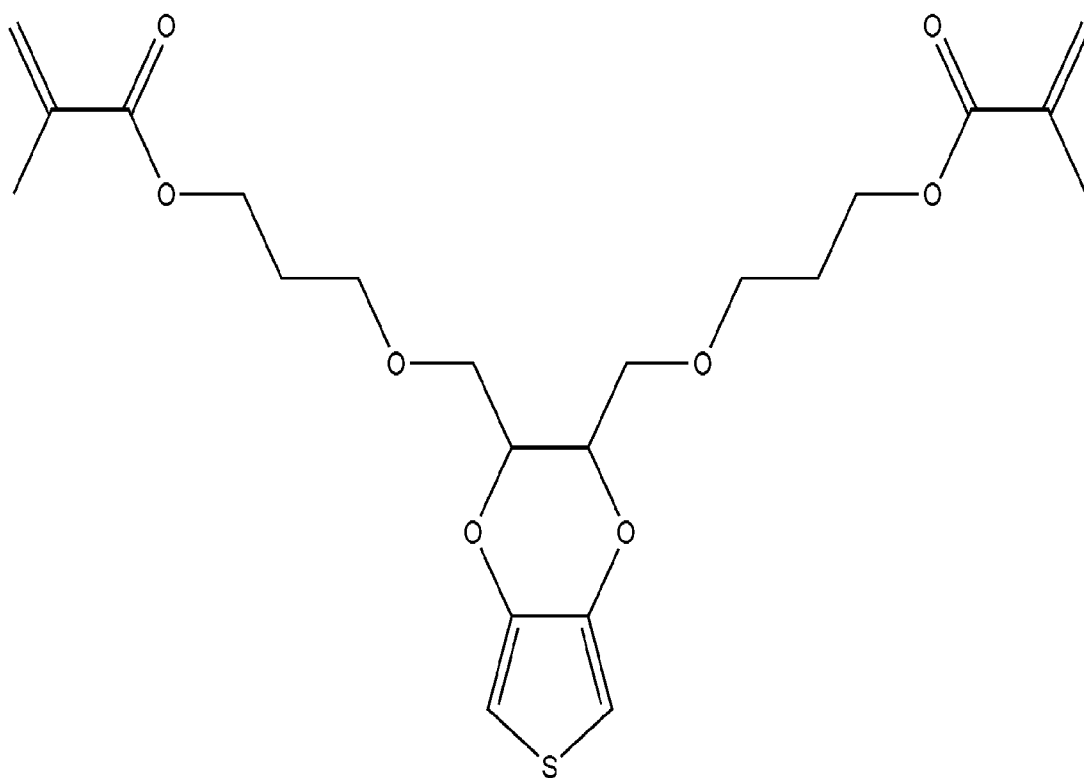
[59] [화학식 1g]

[60]



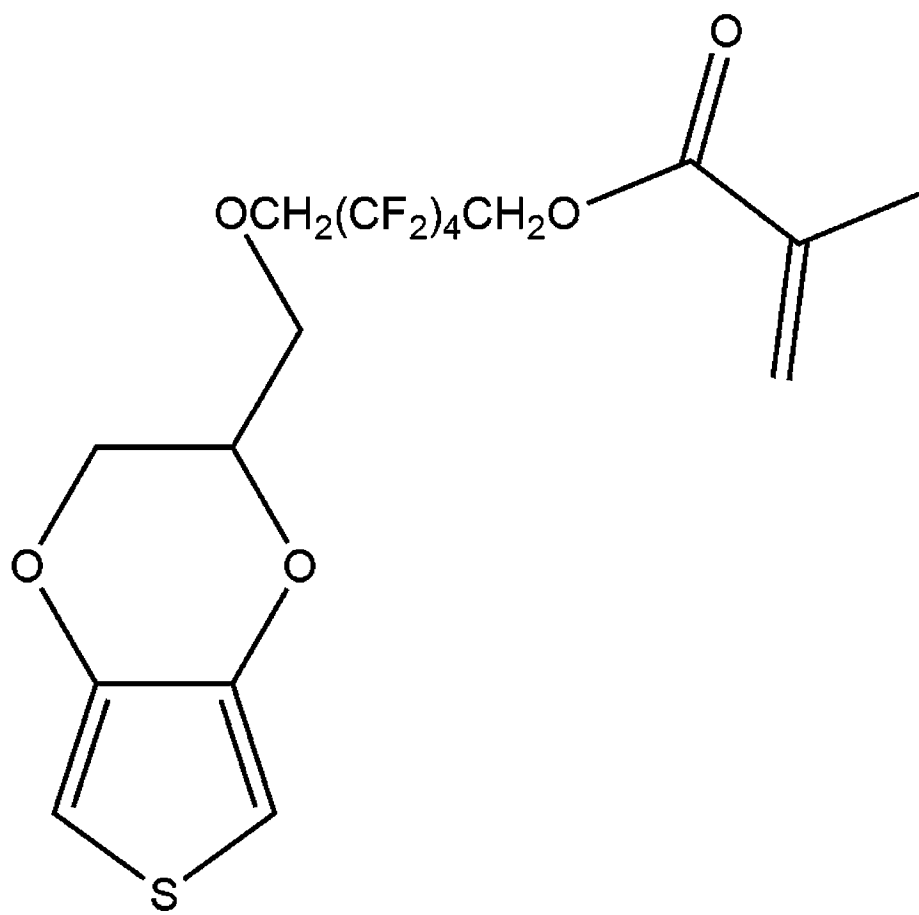
[61] [화학식 1h]

[62]



[63] [화학식 1i]

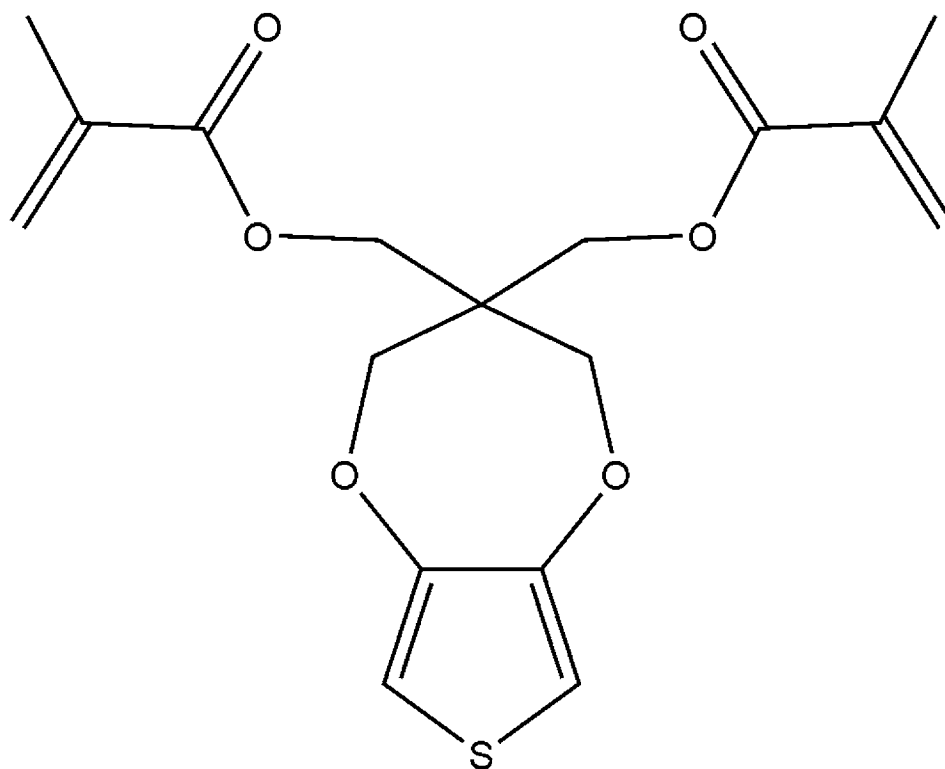
[64]



[65]

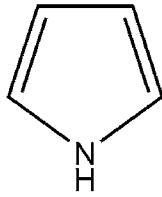
[화학식 1j]

[66]



[67] [화학식 1k]

[68]



[69]

[70] 상기 전도성 고분자는 1,000 내지 1,000,000Da의 중량평균 분자량을 갖는 것일 수 있다.

[71] 상기 전도성 고분자는 상술한 헤테로고리화합물 및/또는 아닐린의 중합반응을 통해 생성된 중합물을 의미하며, 전기적, 화학적, 열적, 광학적 또는 개시제 등을 이용하여 중합된 중합체 또는 공중합체인 것을 특징으로 한다.

[72] 상기 전도성 고분자는 헤테로고리화합물을 통상의 촉매를 이용하여 용액 중합법, 전기를 이용한 전기중합[Macromolecular Research, 17, 791-796, 2009], 증기 중합[Macromolecules, 43, 2322-2327, 2010], 용액 코팅 중합[Advanced Materials, 23, 4168-4173, 2011], 수상에서의 에멀전 중합 등을 통하여 제조가 가능하다. 본 발명에서 사용되는 전기중합, 증기 중합, 용액 코팅 중합, 입자제조를 위한 에멀전 중합 등은 본 발명의 헤테로고리화합물의 산화중합을 유도하는 것이며 통상 사용되는 촉매(산, 산화제 등) 등을 이용한 중합방법은 헤테로고리화합물뿐만 아니라 아닐린과 같은 단량체의 중합에서 사용되는 통상의 방법이다.

[73] 본 발명의 전도성 고분자 필름의 제조 방법에 있어서, 상기의 중합방법을 이용하여 직접 다양한 기재 위에 코팅이 가능할 수 있으며, 한편 용매에 녹는 전도성 고분자는 합성된 후에 스핀코팅, 프린팅 코팅 등의 다양한 코팅 방법을 이용하여 2차적으로 코팅될 수 있으며, 에멀전 방법으로 합성된 전도성 고분자 입자의 경우에는 용매에 분산 후 2차적으로 코팅하여 필름을 제조할 수 있다. 본 발명에서는 상기 코팅방법으로 본 발명을 제한하는 것은 아니며, 각 화합물 또는 공정, 적용, 응용 범위에 따라 적합하게 사용되는 다양한 코팅방법을 의미한다.

[74] 예컨대, 전도성 고분자 박막의 도핑 상태를 제어한 경우 상기와 같이 제조된 전도성 고분자 박막을 단량체가 없는 전해질 용액(용매)에 넣고 순환 전압법(cyclic voltammetry)을 이용하여 1V 에서 -1V 사이를 3 회 50 mV/s의 속도로 순환 시킨 후 원하는 도핑 상태의 전압(1V 에서 -1V 사이 전압)에서 수초간 정지한 후 전원을 제거하여 순수 용매로 세척, 건조하는 방법으로 제조한다.

[75] 상기 금속산화물은 산화마그네슘, 산화스트론튬, 산화아연, 산화알루미늄 또는 산화비소 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[76] 상기 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름은 10 nm 내지 1 mm 의 두께를 가질 수 있다. 상기 두께 범위가 10 nm 미만인 경우, 필름 형성이 용이하지 못하고,

필름에서 나타나는 광열현상 또한 그 효과가 낮으며, 필름의 두께가 1 mm 를 초과하는 경우, 마찬가지로 필름 형성에 어려움이 있고 물질 자체의 흡광도가 높은 경우 광열현상에 의한 열이 기관과 인접한 부분에서 유도되어 열이 전달되는 과정이 필요하고, 이 경우 셀을 떼어내기 위해 필요한 시간이 매우 길어질 수 있기 때문이다.. 또한, 본 발명의 세포배양용기는 통상의 세포 배양에 적용할 수 있어 세포의 종류를 특정하지는 않으며, 예컨대 성체 줄기세포 배양에 사용할 수 있다.

- [77] 본 발명에서 사용하는 "성체 줄기세포"란 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미하며, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다.
- [78] 본 발명의 성체 줄기세포는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 또는 자궁 등에서 유래된 성체 줄기세포로부터 분리, 사용할 수 있다. 성체 줄기세포는 성체세포로 분화할 수 있는 신경줄기세포, 골수세포로 분화할 수 있는 조혈모 세포, 뼈, 연골, 지방, 근육 등으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포, 간세포로 분화할 수 있는 간줄기세포 등이 있다. 그 중에서도 중간엽 줄기세포는 골세포뿐만 아니라 연골세포, 지방세포, 근육세포, 섬유세포 등 여러 가지 근골격계 세포들로 분화할 수 있는 능력이 있는 세포이다.
- [79] 상기 중간엽 줄기세포는 제대혈(탯줄)과 골수 등에 존재하므로 세포 분리도 다른 성체조직보다 용이하며 중간엽 줄기세포를 이러한 근골격계 질환뿐 아니라 다른 질환의 치료에 이용하고자 하는 노력들이 행하여지고 있다. 그 이유는 다른 줄기세포와는 달리 골수에서 쉽게 배양 증폭되며, 기존에 알려져 왔던 바와는 달리 중간엽 유래 세포뿐만 아니라, 내배엽 혹은 외배엽 유래의 세포로 분화가 가능하며, 자가의 세포를 이용하므로 면역에 의한 거부 반응이 없으며, 배아줄기세포와 달리 원하는 방향으로 분화되지 않은 세포가 암을 유발할 가능성이 매우 희박하여 임상적으로 매우 중요한 장점이 있기 때문이다.
- [80] 본 발명에서 사용하는 "분화(differentiation)"라는 용어는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다.
- [81] 본 발명에서 사용하는 "증식(proliferation)"이라는 용어는 세포가 분열되어 동질의 것이 불어나는 것으로서 보통 다세포생물의 체내에서 세포수가 증가되어 가는 것을 말한다. 세포수가 증식되어 어느 시기에 이르면, 형질이 변화(분화)되어 가는 것과 동시에 제어되고 있는 것이 보통이다. 체내에서 세포가 증가되어 가는 것과, 또한 세포 내에서 세포질이 신생(新生)되어 가는 경우에는 생장으로 구별하는 경우가 많다. 그러나 생물학적으로 세포 수가 증가된다는 점에서 보면, 다세포생물의 발생기에서 분화가 일어나지 않는 시기는 증식으로 보는 것이 정당하다.

- [82] 본 발명의 세포배양용기는 환원된 중성상태의 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름 상에서 성체 줄기세포를 배양할 경우, 증식이 증가하고, 근적외선을 조사할 경우, 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름의 발열 효과에 의해 세포들이 별도의 손상 없이 탈착되며, 탈착된 줄기세포는 새로운 세포배양용기에 옮겨 배양 시 정상적인 증식 및 분화가 가능하다.
- [83]
- [84] 본 발명은 또한 본 발명의 세포배양용기; 및
- [85] 근적외선 광선을 조사하는 장치를 포함하는 세포 배양용 키트에 관한 것이다.
- [86] 본 발명의 키트는 고분자 필름을 세포 지지체로 사용하는 세포배양용기를 포함하고 있어, 세포배양 시 증식이 촉진되고, 근적외선 조사 시 조사 부위에서 세포의 탈착이 이루어지며, 탈착된 부분의 고분자 필름이 제거되지 않고 유지되어 세포배양 및 탈착에 반복 사용할 수 있는 특징이 있다. 특히, 줄기세포의 수확과 줄기세포를 개별적으로 분리하거나 줄기세포 하나의 특성을 연구하는데 있어서 효과적으로 사용될 수 있다.
- [87] 일반적으로 줄기세포의 수확 시 세포배양용기(tissue culture polystyrene)에 줄기세포를 탈착할 경우, 트립신 효소를 사용하여 용기에 증식중인 줄기세포를 전체적으로 탈착해야 한다. 본 발명에 따르면 전도성 고분자 필름 표면 위에서 줄기세포를 배양할 경우, 트립신을 사용하지 않고 세포에 무해한 근적외선을 조사하여 간단히 세포를 수확할 수 있으며, 원하는 크기와 부위의 줄기세포를 선택적으로 탈착할 수 있다. 즉 기존의 방법은 줄기세포를 개별적으로 분리하거나 줄기세포 하나의 특성을 연구함에 있어서 많은 어려움이 있지만 본 방법은 탈착 부위의 크기, 즉 수확되는 세포의 수를 조절할 수 있다는 점과 줄기세포를 개별적으로 하나씩 탈착할 수 있다는 특징이 있다.
- [88] 상기 세포 탈착을 위한 광선은 레이저 빔인 것이 좋으며, 광선 조사는 바람직하게는 $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 내지 $300 \text{ W}/\text{cm}^2$ 에서, 보다 구체적으로는 $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 내지 $250 \text{ W}/\text{cm}^2$ 에서 30 초 내지 10시간 동안 실시하는 것이 좋다.
- [89] 따라서, 본 발명은 상기 세포배양용기에 근적외선 광선을 조사하여 배양중인 세포를 탈착시키는 방법을 제공한다.
- [90] 또한 산화된 형태로 제작된 전도성 필름을 환원시켜 중성상태로 만든 전도성 고분자 필름을 이용할 경우 줄기세포 증식이 일반 세포배양용기에 비하여 증가한다는 점에서 줄기세포를 이용한 세포 치료에도 유용하게 이용할 수 있다.
- [91] 상기 전도성 필름을 이용하여 수확된 줄기세포는 정상적인 배양과 증식이 가능하여, 줄기세포를 배양하면서 분화하고자 하는 세포로 유도할 경우, 성체 줄기세포를 골세포, 지방세포, 연골 세포 등으로 분화가 효율적으로 이루어질 수 있다.
- [92] 또한, 상기 전도성 필름을 제작한 후 후술하는 실시예 19, 20 과 같이 도핑 정도를 제어할 수 있다. 예컨대, 실시예 19와 같이 산화된 형태로 제작된 전도성 필름을 환원시켜 중성상태로 도핑 정도를 조절한 경우, 도 3에 환원-PEDOT으로

나타난 것처럼 기존의 세포배양용기인 대조군 TCPS 대비 세포배양효율을 증진시킬 수 있다.

[93] 따라서, 본 발명은 본 발명의 세포배양용기에서 성체 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 증식 또는 분화 방법을 제공한다.

[94]

[95] 본 발명은 또한 기재; 및 상기 기재 상에 형성되고, 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름을 함유하는 세포 배양 영역을 포함하는 세포 배양용 패턴화된 기판에 관한 것이다.

[96] 상기 세포 배양용 패턴화된 기판은 조직 등을 형성할 수 있는 혈관 등의 세포의 배양에 이용되는 것으로, 효율적으로 세포를 규칙적으로 배열시킬 수 있는 특징이 있다.

[97] 상기 세포 배양용 패턴화된 기판은 상기 필름을 세포 지지체로 사용하고 있어 근적외선 조사 시 효소 처리 없이도 세포 탈착이 가능하며, 근적외선이 조사되지 않는 세포 배양 영역에는 여전히 세포가 배양될 수 있는 것을 특징으로 한다.

[98] 상기 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름은 세포부착율이 우수하여 세포 배양 영역에서 별도의 세포 접착 층을 형성하지 않아도 세포 부착이 가능하다.

[99] 상기 기재는 금속, 유리, 실리콘 또는 플라스틱 중 어느 하나의 부도체 기재일 수 있다.

[100] 상기 세포 배양용 패턴화된 기판은 세포 배양 영역과 세포 접착을 저해하는 층이 형성된 세포 비배양 영역이 패턴 타입으로 이루어진 것일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[101] 이하, 제조예와 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 제조예와 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[102] <제조예 1> 골수 중간엽 줄기세포 배양

[103] 인간 골수는 세브란스병원 임상시험심사위원회(IRB)에 의해 승인된 환자 동의 하에 정상 채취하여 얻었고, 이 실험은 세브란스병원 생명윤리심의위원회에 의해 승인되었다. 사람의 골수로부터 얻은 혈액을 Ficoll-paque:골수혈액 = 1:1.5의 비율로 피콜 상 분리를 실시하였다. 15mL의 피콜용액에 혈액 샘플을 천천히 흘려 층이 분리되도록 한 다음, 원심분리 한 후 튜브의 중간층에 얇은 버퍼 코트층(buffy coat layer)이 형성된 것을 확인하고, 분리해 새로운 튜브로 이동시켰다. 상기 튜브에 PBS(Phosphate Buffered Saline)를 첨가하여 총 50mL의 용액이 되게 한 다음, 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액은 버리고, 침전액에 50mL의 PBS를 첨가하여, 같은 방법으로 튜브를 흔들어 균일하게 섞어준 다음, 1500rpm에서 5분간 원심분리를 실시하여 상층액은 제거하고, 세포를 수득하였다. 배지[DMEM(low glucose)+1%P/S+10% FBS]에 세포를

부유시킨 후, 100mm 배양접시에 각각 1×10^7 의 세포가 들어가도록 배지에 희석시켰다(배양접시에 들어가는 배지의 양은 10mL로 하였다). CO_2 배양기에서 1일간 세포배양 후, 상층액을 새로운 배양접시에 이동시키고, 배양접시 바닥에 부착되어 있는 세포 위에는 최초 배양 시와 동일한 성분의 배양액을 채워놓았다. 7~10일 이후에, 트립신을 사용하여 세포를 이탈시켜 새로운 플라스크에 T75-플라스크 당 2×10^5 씩 씨딩(seeding)하여 유지시키는 방법으로, 성체 줄기세포를 배양 및 유지하였다.

[104]

[105] <실시에> 전도성 화합물을 이용한 필름 제작

[106] 본 발명의 전도성 고분자는 상술한 화학식 1a 내지 1k의 전도성 단량체를 하기 표 1에 표시한 대로 용액 코팅 중합, 증기중합, 전기중합, 화학중합 등의 방법을 통해 중합시켜 필름을 제작하였다. 상기 전기중합, 증기중합, 용액 코팅 중합, 입자제조를 위한 에멀전 중합 등은 앞서 설명한 본 발명의 전도성 단량체들의 산화중합을 유도하는 것이며 통상 사용되는 촉매(산, 산화제 등) 등을 이용한 중합방법은 헤테로고리화합물뿐만 아니라 아닐린과 같은 단량체의 중합에서 사용되는 통상의 방법이다.

[107] 전도성 고분자 필름을 제조함에 있어서, 상기의 중합방법을 이용하여 직접 다양한 기재 위에 코팅이 가능할 수 있으며, 한편 용매에 녹는 전도성 고분자는 합성된 후에 스핀코팅을 이용하여 2차적으로 코팅하며, 에멀전 방법으로 합성된 전도성 고분자 입자의 경우에는 용매에 분산 후 2차적으로 코팅하여 필름을 제조하였다.

[108] 하기 표 1에서 전기중합의 경우 용매는 전해질을 의미한다. 또한 전도성 고분자박막의 도핑 상태를 제어한 경우 상기와 같이 제조된 전도성 고분자 박막을 단량체가 없는 전해질 용액에 넣고 순환 전압법(cyclic voltammetry)를 이용하여 1V에서 -1V 사이를 3 회 50 mV/s의 속도로 순환 시킨 후 원하는 도핑 상태의 전압 (1V에서 -1V 사이 전압)에서 수초간 정지한 후 전원을 제거하여 순수 용매로 세척, 건조하는 방법으로 제조하였다. 에멀전 중합의 경우 중합체 두께에 명시된 수치는 입자의 직경을 의미한다. 하기의 세포탈착효율은 세포가 탈착된 부분 면적 대비 근적외선 조사 영역 면적 비율을 100으로 환산한 값이다.

[109] 표 1

[Table 1]

실시예	화합물	제조방법 및 조건(용매, 온도 (°C))	중합체 두께 (nm)	근적외선흡광도(파장: 808nm)	근적외선 조사시간(분)	세포 탈착 효율 (%)
1	1a	용액코팅중합(부탄올, 50)	150	0.72	5	100
2	1a	용액코팅중합(아이소프로판올, 50)	50	0.48	10	110
3	1a	증기중합(아이소프로판올, 70)	160	0.75	3	100
4	1a	전기중합(n-Bu ₂ NCl O ₄ (0.1M))	250	0.88	2	90
5	1b	용액코팅중합(부탄올, 아이소프로판올, 70)	130	0.65	5	80
6	1b	증기중합(아이소프로판올, 80)	150	0.7	6	100
7	1c	용액코팅중합(부탄올, 80)	150	0.68	10	110
8	1d	용액코팅중합(부탄올, 아이소프로판올, 60)	150	0.7	20	110
9	1e	용액코팅중합(에탄올, 40)	150	0.75	30	105
10	1e	전기중합(n-Bu ₂ NCl O ₄ (0.1M))	140	0.7	10	93
11	1f	용액코팅중합(부탄올, 80)	350	0.9	15	108
12	1g	용액코팅중합(부탄올, 아이소프로판올, 60)	160	0.62	10	90

13	lh	용액코팅중합(부탄올, 90)	150	0.58	10	87
14	li	용액코팅중합(부탄올, 아이소프로판올, 70)	500	0.85	5	90
15	lj	용액코팅중합(부탄올, 80)	160	0.6	25	89
16	아닐린	용액코팅중합(아이소프로판올, 50)	250	0.78	40	115
17	아닐린	화학중합 후 스핀코팅(메틸렌클로라이드)	170	0.66	5	90
18	lk	에멀전중합	150	0.72	5	95
19	la	용액코팅중합 후 환원 (-0.2 V, 30 초)(아이소프로판올, 50)	110	0.28	30	70
20	lb	증기중합 후 부분 도핑 (0.4 V)(아이소프로판올, 80)	120	0.55	10	100

[110]

[111] <실험예 1> 전도성 화합물을 이용한 필름의 근적외선 흡광도 실험

[112] 상기 실시예 1(또는 2)에서 준비된 전도성 고분자 필름은 UV-Visible 스펙트럼을 측정하여 200~3300nm영역에서의 흡광도를 구하였다. 이 영역 중에서 상기 표 1에는 근적외선 레이저의 파장에 해당하는 808nm에서의 흡광도를 나타내었다.

[113]

[114] <실험예 2> 전도성 화합물을 이용한 필름의 근적외선을 통한 광열효과 측정

[115] 상기 실시예 3(또는 4)에서 준비된 전도성 고분자 필름을 하단에서 근적외선이 조사되도록 준비된 받침대에 놓고 광열효과를 측정하였다. 808nm의 근적외선 레이저는 230mW의 에너지를 출력하도록 고정되었고, 이를 준비된 전도성 고분자 필름의 아랫면으로 조사하였다. 광열효과는 전도성 고분자 필름 상단의 온도를 T형 열전대를 통하여 측정하여 확인하였다. 해당 과정에서 전도성

고분자 필름의 광열효과를 근적외선 레이저 조사시간에 따른 측정된 온도 값으로도 2와 같이 나타낼 수 있다.

[116] 도 2에 나타난 바와 같이 근적외선 조사 시 25 °C 이상 온도가 증가함을 알 수 있었다.

[117]

[118] <실험예 3> 전도성 화합물을 이용한 필름 위에서 줄기세포 배양 및 선택적 탈착 방법

[119] 상기 실시예 8에서 준비된 전도성 고분자 필름을 약 2분 동안 약한 자외선을 이용하여 살균한 후, 줄기세포의 배양에 있어서 지지체로 사용되었다. 골수 유래 중간엽 줄기세포를 전도성 고분자 필름이 들어 있는 6 웰(well)에 넣어 줄기세포를 배양한 후, 선택적 탈착을 위하여 230mW의 NIR를 6웰 밑에서 조사하였다.

[120] 도 3에 환원-PEDOT으로 나타난 바와 같이, 환원된 중성상태의 전도성 필름을 지지체로 하여 줄기세포를 배양한 결과, 줄기세포의 증식 속도가 일반 세포배양용기에 비해 빨라 줄기세포를 이용한 세포치료에 효과적일 수 있음을 알 수 있다.

[121] 또한, 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, 세포의 탈착 면적 및 세포 수는 근적외선 조사 시간에 의해 조절이 가능하다.

[122]

[123] <실험예 4> 줄기세포 분화 확인

[124] 상기 실시예 9(또는 10)에서 준비된 전도성 고분자 필름을 약 2분 동안 약한 자외선을 이용하여 살균한 후, 줄기세포의 배양에 있어서 지지체로 사용되었다. 골수 유래 중간엽 줄기세포를 전도성 고분자 필름이 들어 있는 6 웰(well)에 넣어 줄기세포를 배양한 후, 230mW의 NIR를 6웰 밑에서 조사하여 선택적으로 탈착하였다. 도 6은 탈착된 줄기세포를 세포용기에 이동하여 배양한 현미경 사진도이다. 이후 골세포, 지방세포, 연골세포 분화 조건을 통해 16일 동안 분화를 유도하였다. 이때 전도성 필름이 없이 TCPS에서 배양한 줄기세포를 이용하여 분화를 유도한 것을 대조군으로 하였다.

[125] 골세포 분화를 확인하기 위해, 배양 16일 후 대조군부터 배지를 제거한 후 PBS 분주 후 세척하고 제거하였다. 제거 후 증류수를 분주 후 제거하였으며, 이를 세 번 반복하였다. 필터페이퍼로 걸러 낸 3% 실버나이트레이트(silver nitrate) 용액을 분주하여 호일에 싸서 실온에서 30분간 방치하였다. 30분 후에 호일을 벗겨내고 분주된 용액을 모두 제거한 후 형광등에 노출시켜 색의 변화를 유도한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

[126] 지방세포 분화를 확인하기 위해, 배양 16일 후 대조군부터 배지를 제거하고 PBS를 분주한 후 세척하여 제거하였다. 여기에 10% 포르말린(formalin)을 분주한 후 실온에서 30분간 방치하였다. 이 후 포르말린을 제거하고 증류수로 세척하였다. 제거 후 60% 이소프로판올(isopropanol)을 분주하고 실온에서 5분간

방치하였다. 이소프로판올을 제거하고 필터페이퍼를 통해 걸러 낸 오일 레드 오(Oil red-O) 용액을 분주한 후 10분간 방치하였다. 10분 후 물이 깨끗해질 때까지 수돗물로 세척하여 광학현미경하에서 염색의 정도를 관찰하였다.

- [127] 연골세포 분화를 확인하기 위해, 배양 16일 후 대조군부터 배지를 제거하고 PBS를 분주한 후 세척하여 제거하였다. 필터페이퍼로 걸러 낸 1% 사프란닌오(Safranin-O) 용액을 분주한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후 1% 아세트산(acetic acid)으로 3~4회 세척 후 제거하였다. 광학현미경에서 염색의 정도를 관찰하였다.

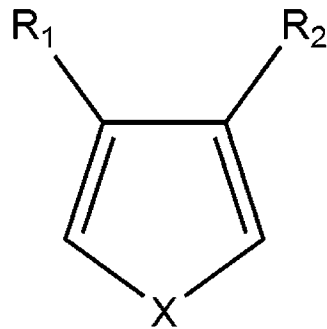
- [128] 도 7에 나타난 바와 같이, 근적외선 조사에 의해 탈착된 줄기세포는 16일 동안 분화를 유도를 통해 16일 후 각각 대조군과 동일한 골세포, 지방세포, 연골세포로 분화됨을 확인하였다.

산업상 이용가능성

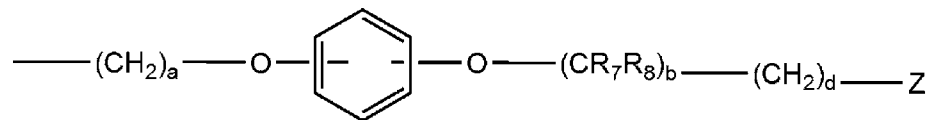
- [129] 본 발명은 세포배양 분야에서 사용할 수 있다.

청구범위

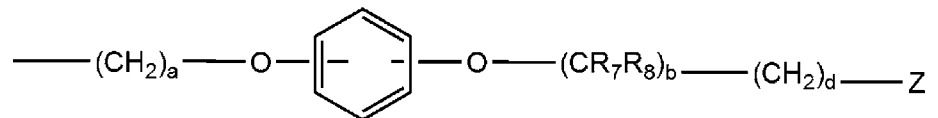
- [청구항 1] 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름이 형성된 세포 배양 영역을 포함하는 세포배양용기.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
세포 배양 영역은 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리에틸렌(polyethylene), 이들의 공중합체 또는 유리 중의 어느 하나로 형성된 것인 세포배양용기.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
전도성 고분자는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 아닐린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단량체의 중합체 또는 공중합체인 세포배양용기:
- [화학식 1]



상기 식에서,
X는 N, O, S, Se 또는 Te를 나타내고,
 R_1 및 R_2 는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소원자, $-(CH_2)_l-O-(CH_2)_m-(CF_2)_n-(CR_7R_8)_k-(CH_2)_d-Z$,



, $-O-CH(R_3)-CH(R_4)-O-$, 또는 $-O-CH_2-C(R_5)(R_6)-CH_2-O-$ 이며, 다만, R_1 과 R_2 가 동시에 수소인 경우는 제외하고;
상기 R_3, R_4, R_5 및 R_6 는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소원자, $-(CH_2)_d-Z$, $-(CH_2)_l-O-(CH_2)_m-(CF_2)_n-(CR_7R_8)_k-(CH_2)_d-Z$, 또는



이며, 다만, R_3 와 R_4 가 동시에 수소를 갖는 경우, 및 R_5 와 R_6 가 동시에 수소를 갖는 경우를 제외하며;
상기 R_7 및 R_8 는 서로 같거나 다른 것으로서, 수소, 탄소수 1 내지

5의 알킬기 또는 $-(CH_2)_d-Z$ 이고;

Z는 메타아크릴레이트기 또는 아크릴레이트기이며;

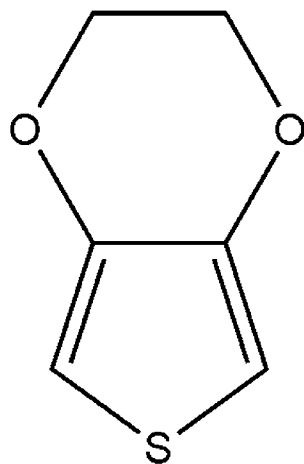
ℓ 은 0 ~ 2 정수이고, m은 0 ~ 3의 정수이며, n은 0 ~ 5 정수이고, k는 0 ~ 4 정수이며, a는 0 ~ 2 정수이고, b는 0 ~ 7 정수이며, d는 0 ~ 2 정수이다.

[청구항 4]

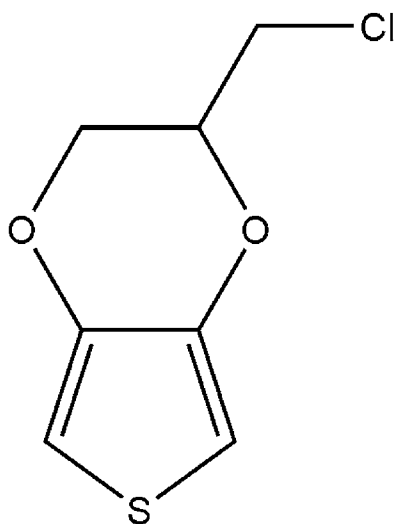
제3항에 있어서,

화학식 1의 화합물은 하기 화학식 1a 내지 1k 중 어느 하나인
세포배양용기:

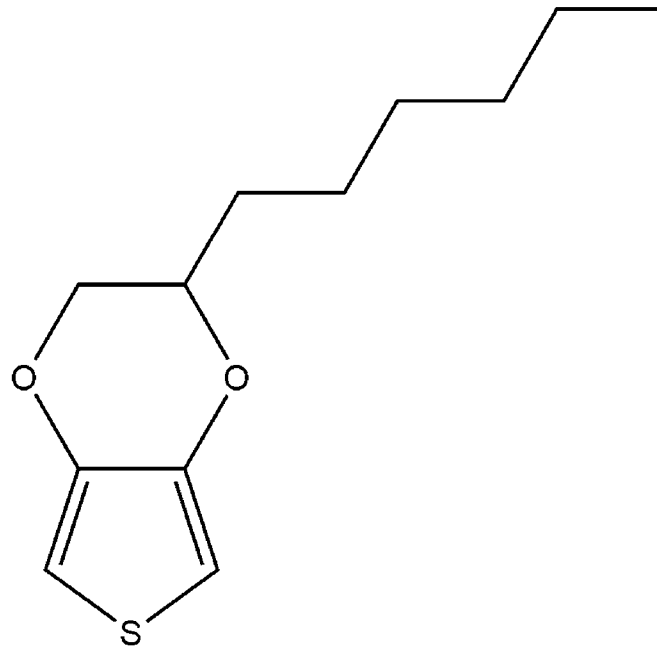
[화학식 1a]



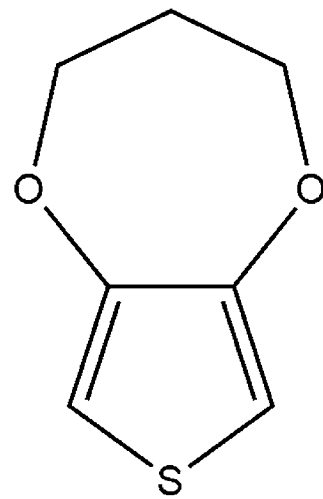
[화학식 1b]



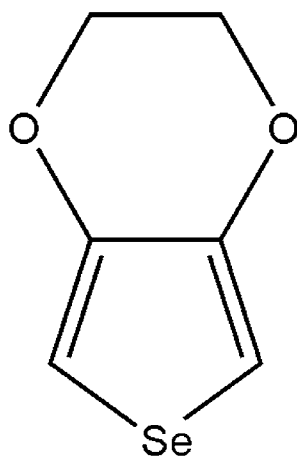
[화학식 1c]



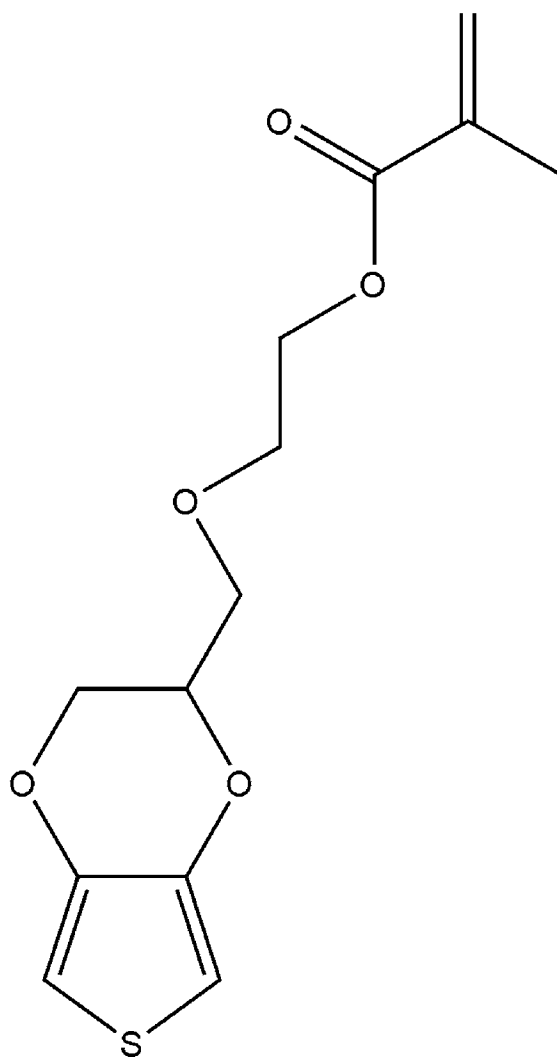
[화학식 1d]



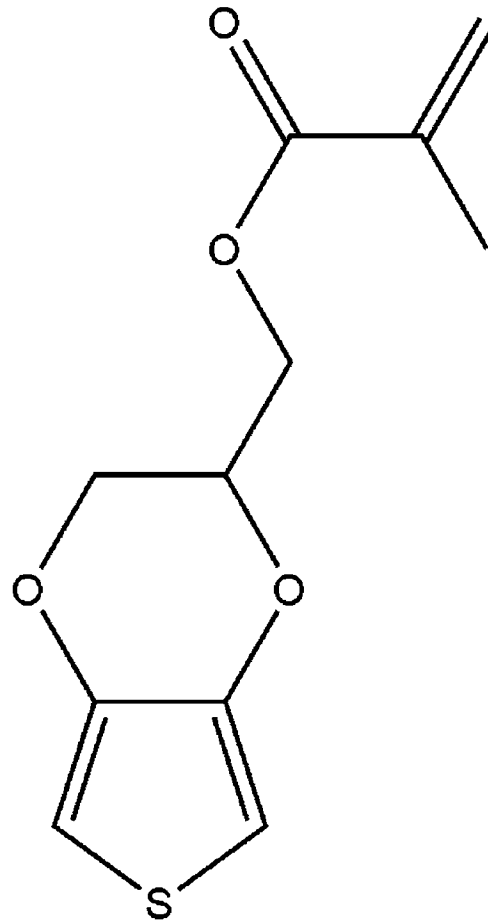
[화학식 1e]



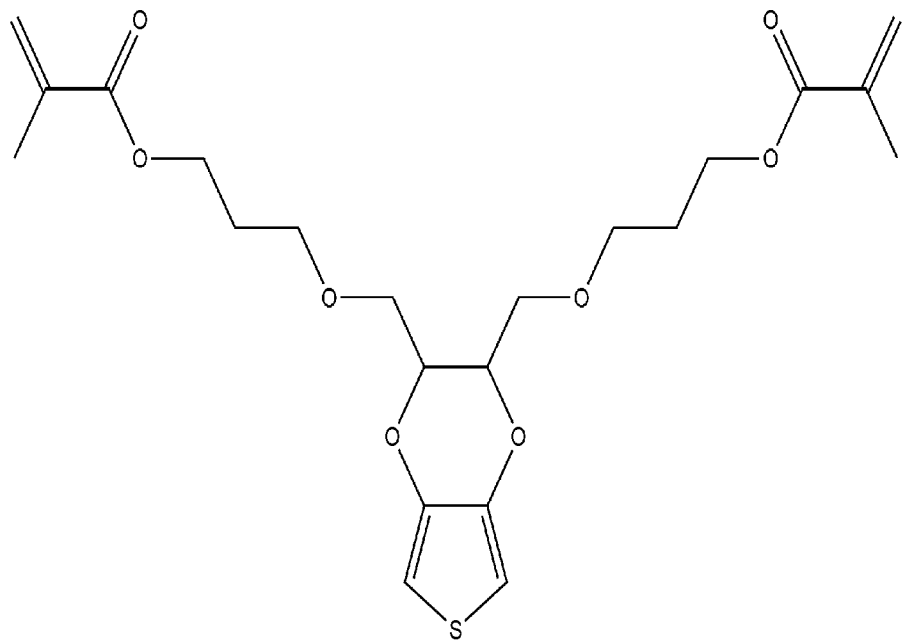
[화학식 1f]



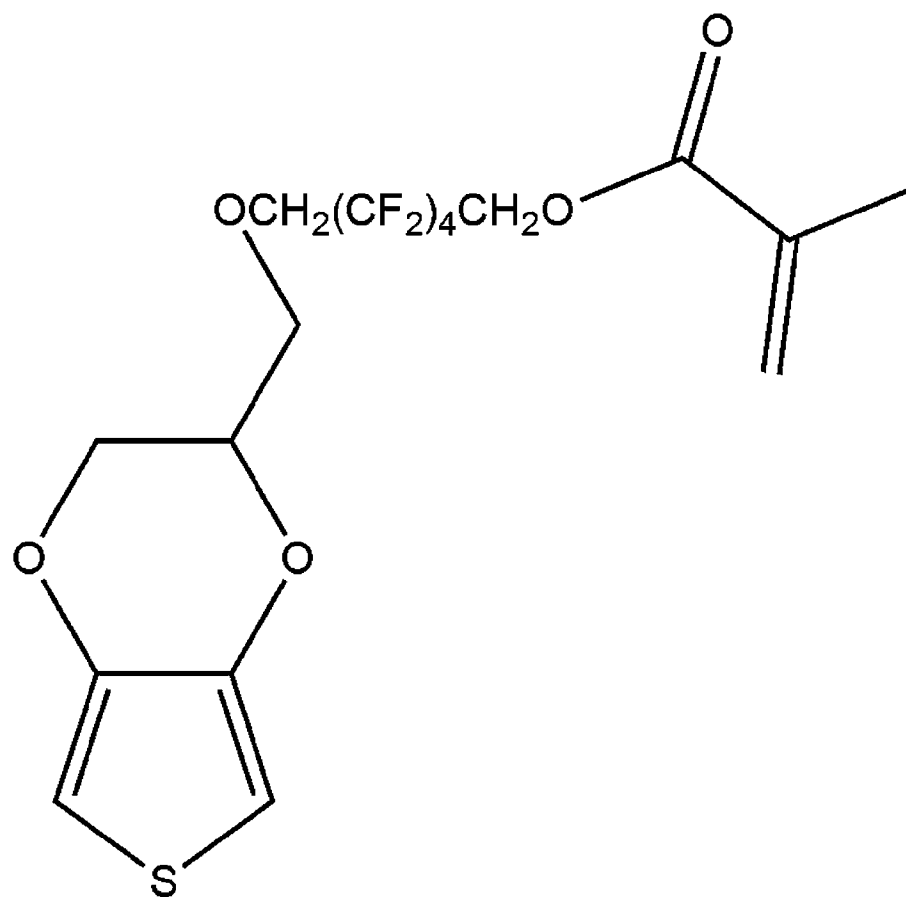
[화학식 1g]



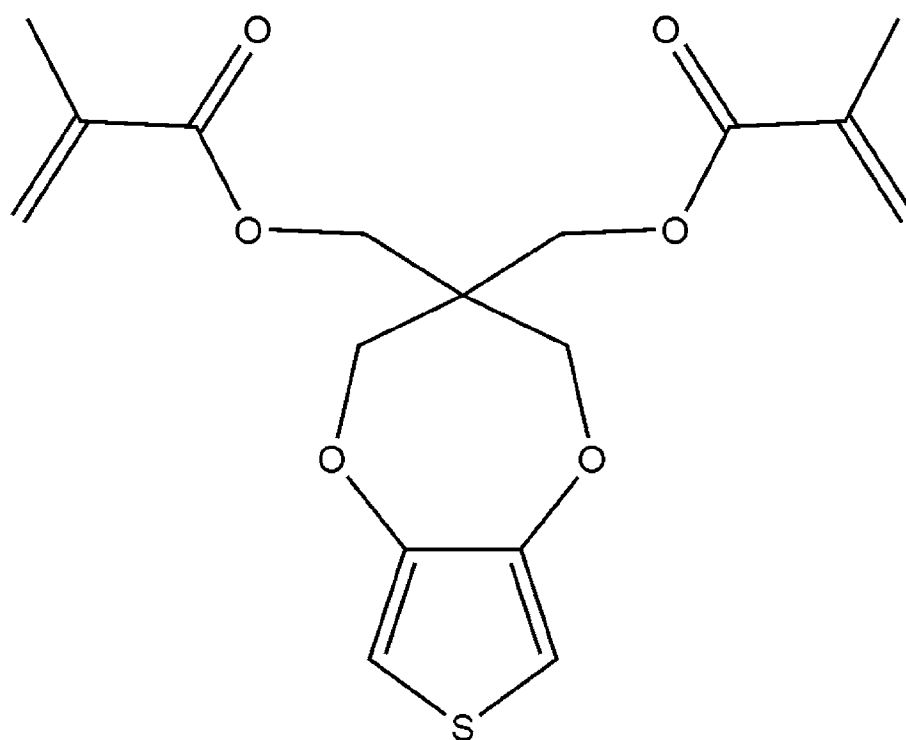
[화학식 1h]



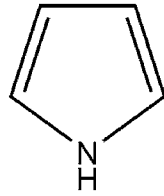
[화학식 1i]



[화학식 1j]

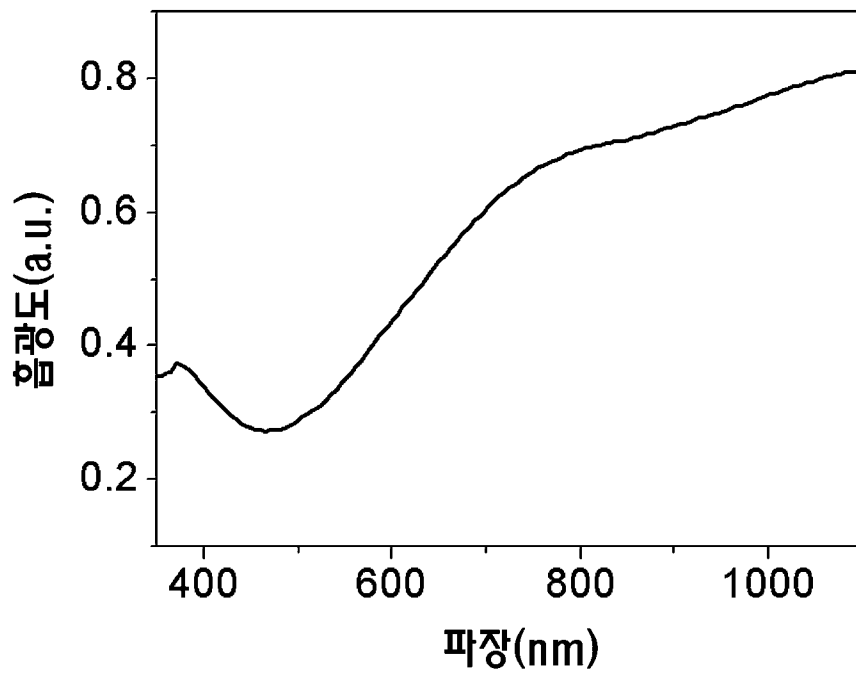


[화학식 1k]

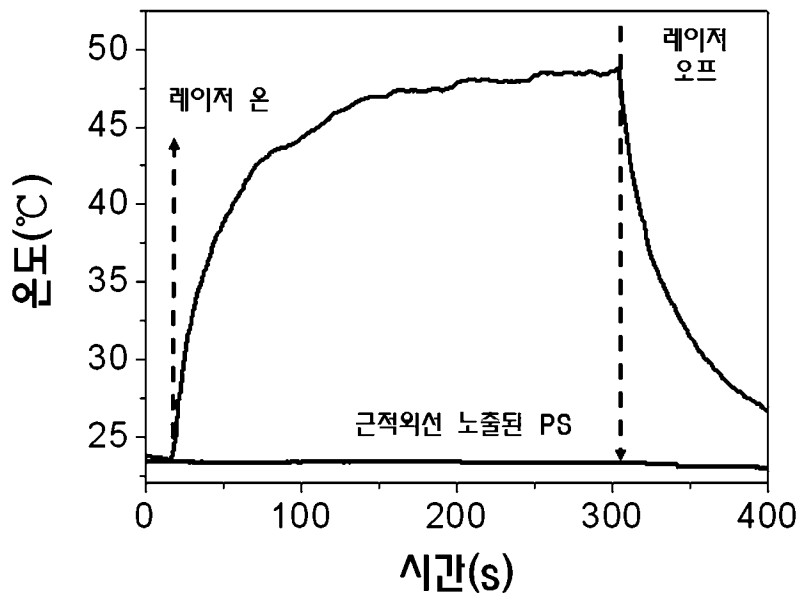


- [청구항 5] 제3항에 있어서,
전도성 고분자는 1,000 내지 1,000,000Da의 중량평균 분자량을 갖는 것인 세포배양용기.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
금속산화물은 산화마그네슘, 산화스트론튬, 산화아연, 산화알루미늄 및 산화비소로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 세포배양용기.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
필름의 두께는 10 nm 내지 1 mm 인 세포배양용기.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
세포는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간, 피부, 위장관, 태반 또는 자궁에서 유래된 성체 줄기세포를 포함하는 세포배양용기.
- [청구항 9] 제1항의 세포배양용기; 및
근적외선 광선을 조사하는 장치를 포함하는 세포 배양용 키트.
- [청구항 10] 제1항의 세포배양용기에서 성체 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 증식 또는 분화 방법.
- [청구항 11] 제1항의 세포배양용기에 근적외선 광선을 조사하여 배양중인 세포를 탈착시키는 방법.
- [청구항 12] 기재; 및
상기 기재 상에 형성되고, 근적외선 영역에서 흡광도를 갖는 전도성 고분자 또는 금속산화물 필름을 함유하는 세포 배양 영역을 포함하는 세포 배양용 패터화된 기판.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
기재는 금속, 유리, 실리콘 또는 플라스틱 중 어느 하나의 부도체 기재인 세포 배양용 패터화된 기판.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
세포 배양 영역과 세포 접착을 저해하는 층이 형성된 세포 배양 영역이 패터 타입으로 이루어진 세포 배양용 패터화된 기판.

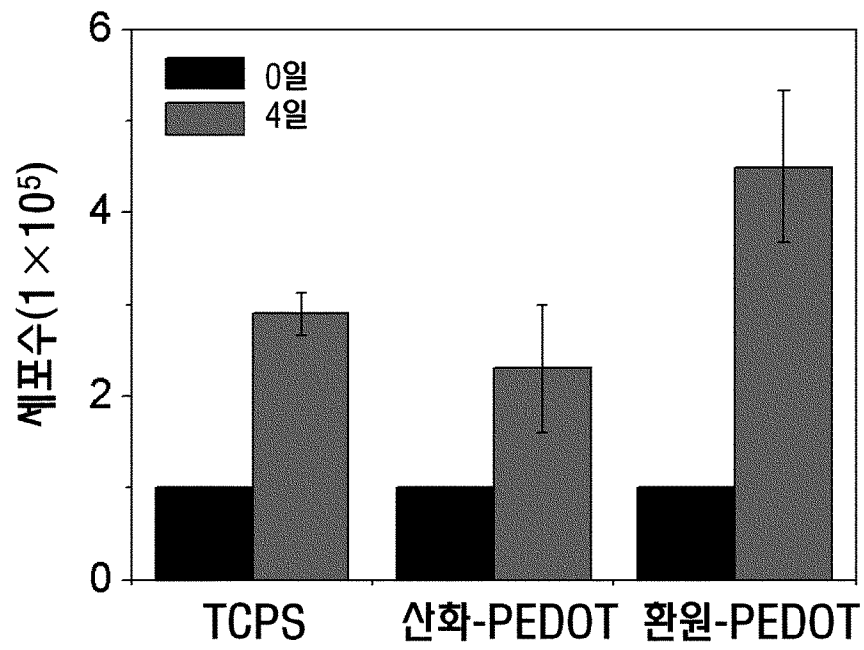
[Fig. 1]



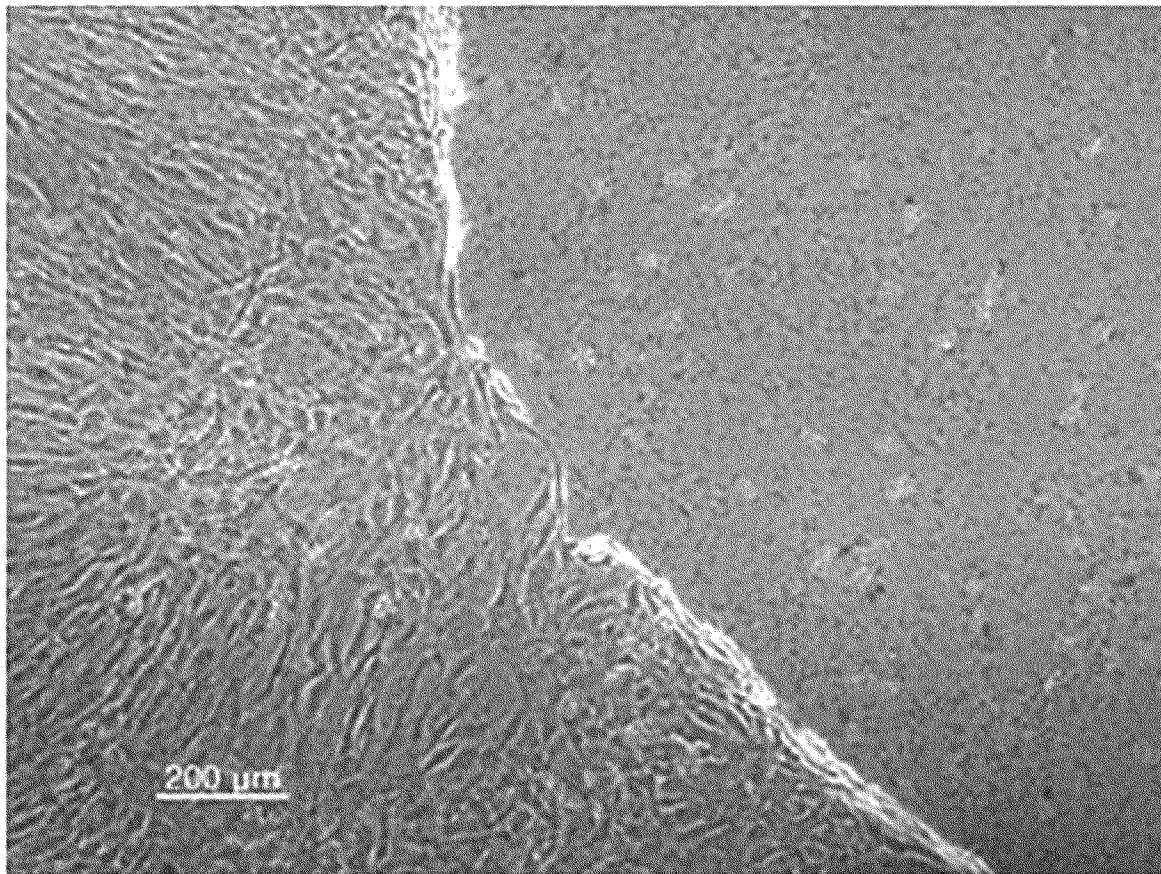
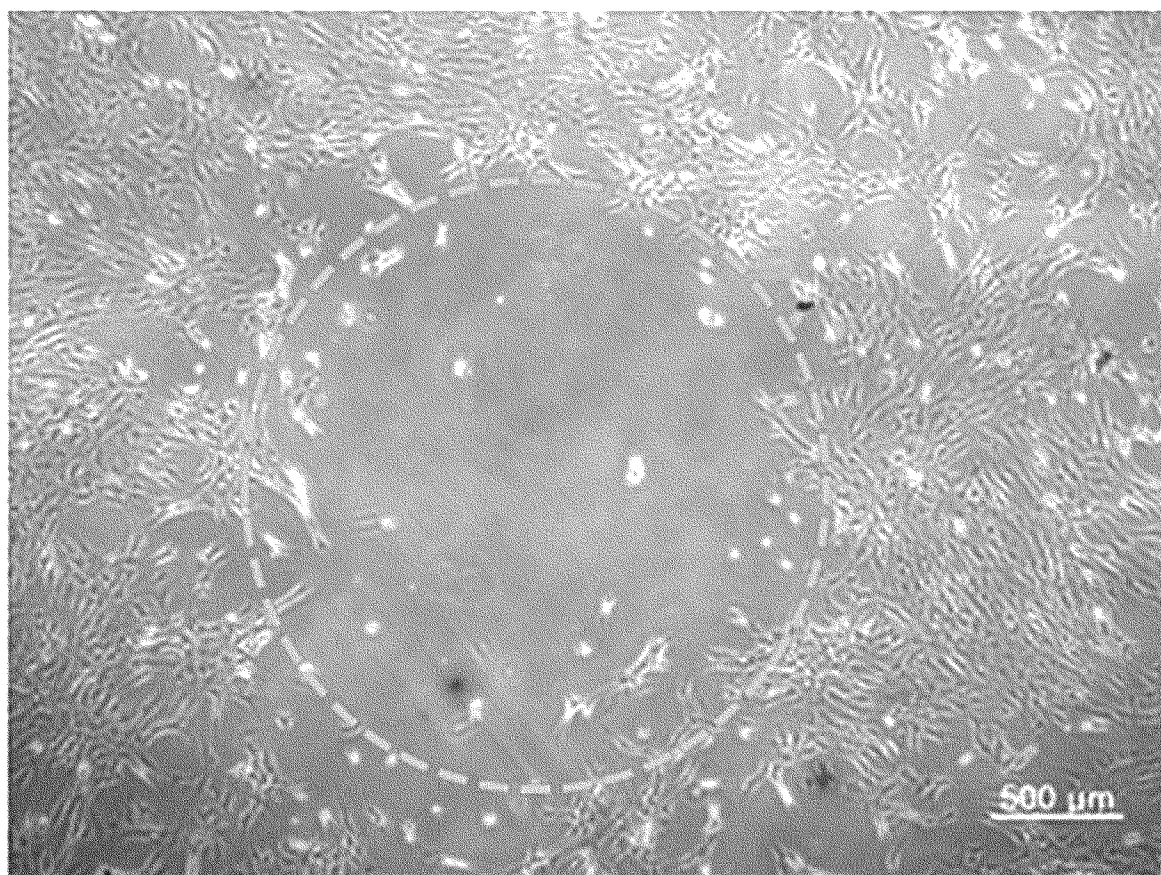
[Fig. 2]



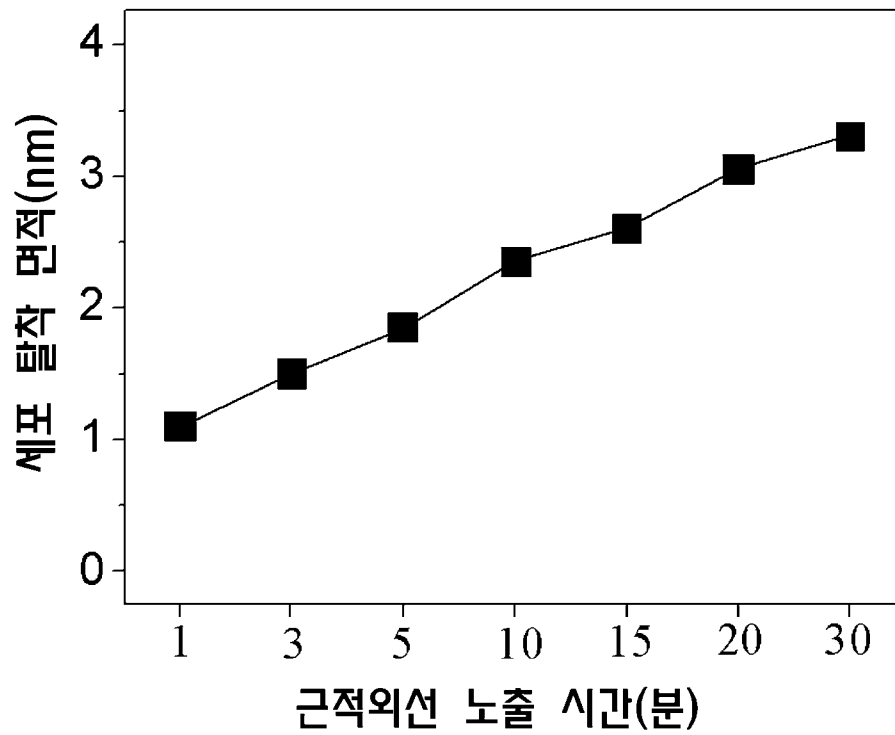
[Fig. 3]



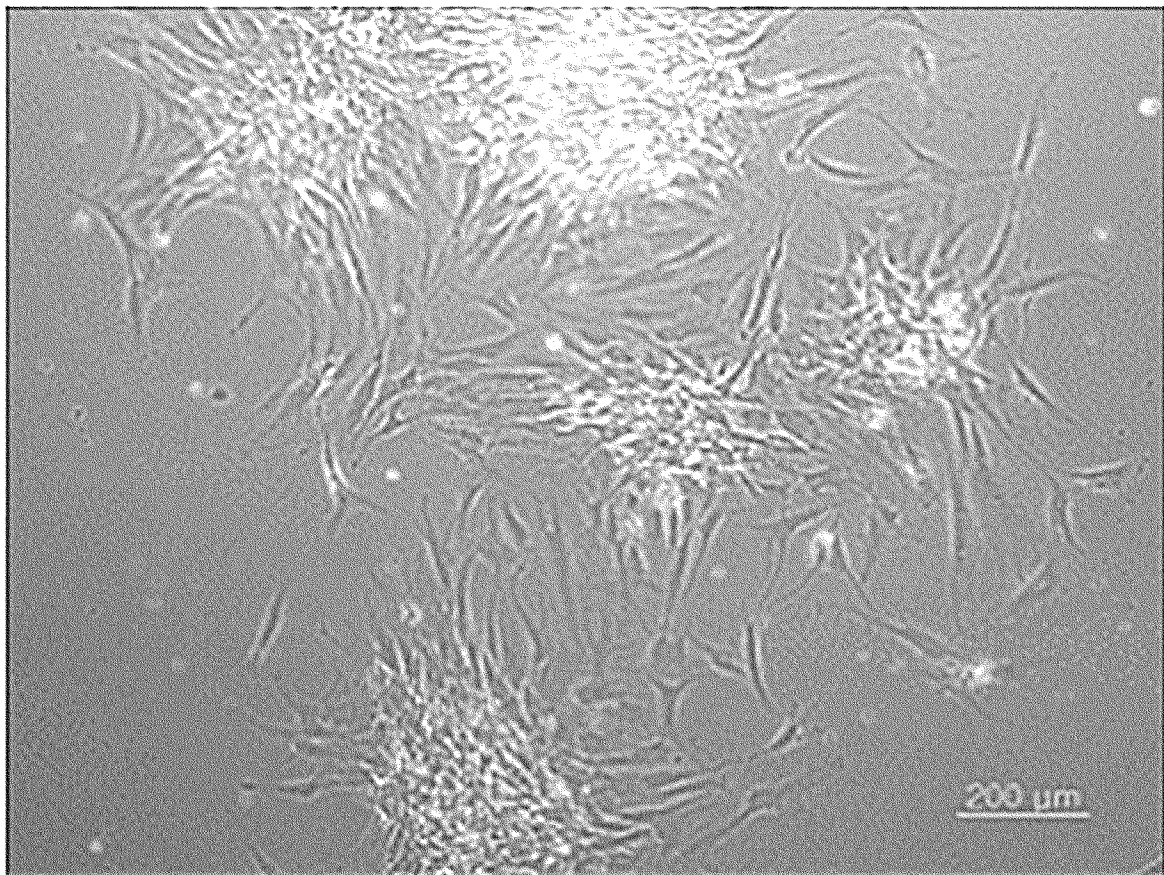
[Fig. 4]



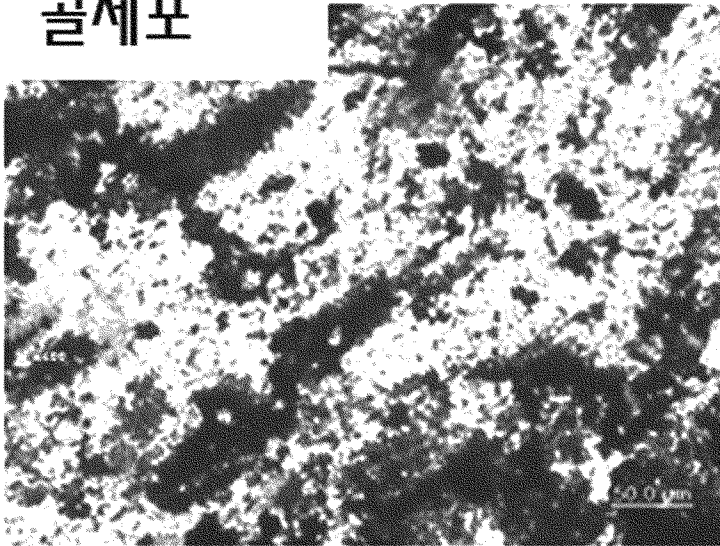
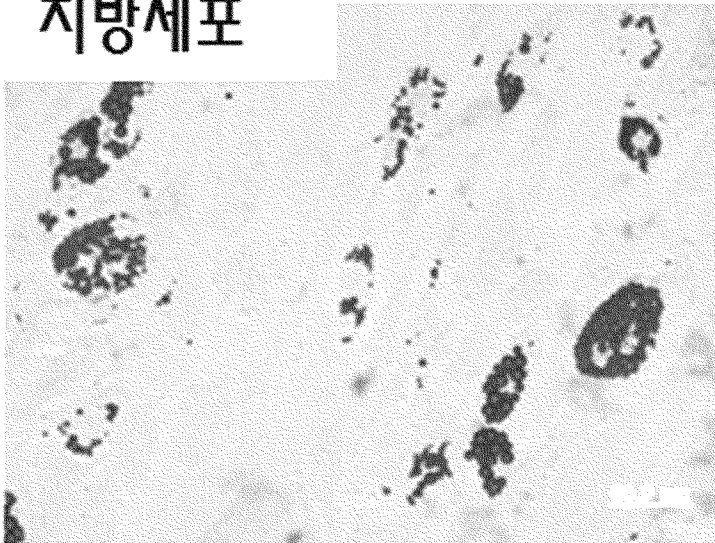
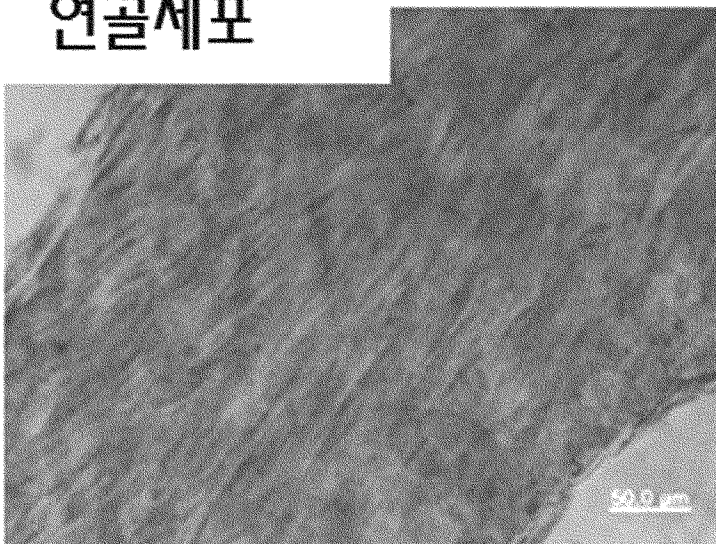
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

골세포**지방세포****연골세포**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/003079**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12M 3/00(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12M 1/42(2006.01)i, C07D 207/00(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; C12M 1/00; C12M 1/22; C12M 1/34; C12M 1/42; C12N 5/074; C07D 207/00

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: cell culture, conductive polymer, metal oxide, film, membrane, near infrared ray, adult stem cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-228585 A (CANON INC.) 02 October 2008 See claims 1 and 2; paragraphs 15, 20, 21 and 39.	1-5,7-14
A		6
Y	PATIL, A. O. et al. "Optical properties of conducting polymers", Chemical Reviews, 1988, vol. 88, no. 1, pp. 183-200 See page 187.	1-5,7-14
A		6
Y	JP 06-335381 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 06 December 1994 See the entire document.	3-5
A	WOONG, Joyce Y. et al. "Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells", Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, vol. 91, pp. 3201-3204 See the entire document.	1-14
A	JP 2007-075034 A (NIPPON SHEET GLASS CO., LTD. et al.) 29 March 2007 See the entire document.	1-14

☐ 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

"T" 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

17 JULY 2013 (17.07.2013)

Date of mailing of the international search report

18 JULY 2013 (18.07.2013)

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/KR2013/003079

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2008-228585 A	02/10/2008	US 2008-0227191 A1	18/09/2008
JP 06-335381 A	06/12/1994	NONE	
JP 2007-075034 A	29/03/2007	WO 2007-032208 A1	22/03/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 3/00(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12M 1/42(2006.01)i, C07D 207/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류 기재)

C12M 3/00; C12M 1/00; C12M 1/22; C12M 1/34; C12M 1/42; C12N 5/074; C07D 207/00

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: 세포배양, 전도성고분자, 금속 산화물, 필름, 막, 근적외선, 성체줄기세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	JP 2008-228585 A (CANON INC.) 2008.10.02 청구항 1 및 2; 단락 15, 20, 21 및 39 참조.	1-5, 7-14
A		6
Y	PATIL, A. O. 외 2명, 'Optical properties of conducting polymers', Chemical Reviews, 1988, Vol.88, No.1, pp.183-200 페이지 187 참조.	1-5, 7-14
A		6
Y	JP 06-335381 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 1994.12.06 전체 문헌 참조.	3-5
A	WOONG, JOYCE Y. 외 2명, 'Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells', Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, Vol.91, pp.3201-3204 전체 문헌 참조.	1-14
A	JP 2007-075034 A (NIPPON SHEET GLASS CO., LTD. 외 1명) 2007.03.29 전체 문헌 참조.	1-14

☐ 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 신규성 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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 07월 17일 (17.07.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 07월 18일 (18.07.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2008-228585 A	2008/10/02	US 2008-0227191 A1	2008/09/18
JP 06-335381 A	1994/12/06	없음	
JP 2007-075034 A	2007/03/29	WO 2007-032208 A1	2007/03/22