



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0087889
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/24 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0007530

(22) 출원일자 2010년01월27일

심사청구일자 2010년01월27일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자

신관우

서울특별시 강남구 도곡2동 도곡렉슬아파트 401동 1403호

김현정

서울특별시 서대문구 홍은3동 현대아파트 202-5 103동 403호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

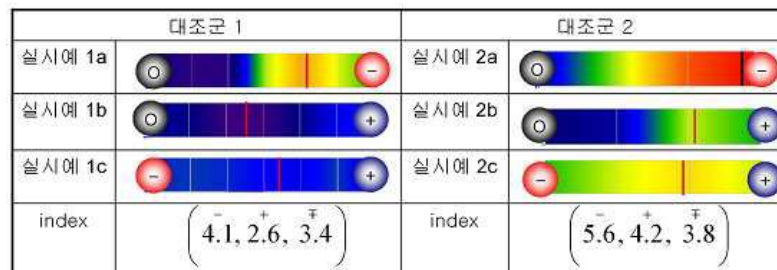
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질을 이용한 세포의 색인화 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 표면 특성의 구배(gradient)가 있는 배양 고상 기질 상에 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화를 평가하는 단계; 및 (c) 상기 평가된 착상, 성장 또는 분화를 상기 표면 특성을 변수로 하여 선형적(linear)으로 수치화 하여 세포를 색인화하는 단계를 포함하는 세포의 색인화(cellular indexing) 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 독립적으로 각각의 구배 기질을 활용하는 것은 단지 하나의 세포의 경향성을 제시하나, 가장 바람직하게는 3개 이상의 각기 다른 조건으로 제어된 기질이 표현될 수 있는 인덱싱은 대부분의 세포를 간단한 숫자로 표현되도록 하며, 종래 기술에서는 구현되지 않은 새로운 세포 인덱싱 또는 분류 방법을 제시한다. 본 발명에 따르면, 반복적인 여러 실험을 하지 않고서도 세포에 대한 특성을 예측할 수 있는 표준 정보를 제공한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

디비엔두 카투아

서울특별시 마포구 신수동 1 서강대학교 화학과

이원구

서울특별시 서초구 방배본동 754-1 롯데캐슬헤론
101-2602

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200931012(지원기관 과제번호 20090059600)

부처명 과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구사업/중견연구자지원사업/핵심연구사업

연구과제명 HIV바이러스 감염 경로를 이용한 새로운 약물전달체 연구

기여율

주관기관 한국과학재단

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 세포의 색인화(cellular indexing) 방법:

- (a) 표면 특성의 구배(gradient)가 있는 배양 고상 기질 상에 세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화를 평가하는 단계; 및
- (c) 상기 평가된 착상, 성장 또는 분화를 상기 표면 특성을 변수로 하여 선형적(linear)으로 수치화 하여 세포를 색인화하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 표면 특성은 상기 배양 고상 기질의 표면의 화학적 표면 특성 또는 물리적 표면 특성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 화학적 표면 특성은 친수성, 소수성 또는 화학 작용기성(chemical functionality)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 물리적 표면 특성은 접촉각, 표면거칠기, 표면장력, 양전하 밀도 또는 음전하 밀도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 배양 고상 기질은 2개 이상이며 각각의 배양 고상 기질은 서로 다른 표면 특성의 구배가 부여된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 배양 고상 기질은 3개 이상이며 각각의 배양 고상 기질은 서로 다른 표면 특성의 구배가 부여된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 수치화는 절대적 또는 상대적으로 수치화 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 배양 고상 기질은 1차원 기질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 바이러스, 원핵생물 또는 진핵생물의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 동물세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 수치화는 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화가 가장 최대로 이루어지는 상기 기질의 1차원적 위치를 수치화 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 수치화는 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상이 가장 최대로 이루어지는 상기 기질의 1차원적 위치를 수치화 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화의 평가는 상기 고상 기질 상에서의 세포 흡착의 면적 또는 세포의 개수를 측정하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질을 이용한 세포의 색인화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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.

[0003] 특히, 세포의 증식의 특성은, 줄기세포(stem cell)와 같이 외부 환경에 따라서, 다르게 분화되어, 인공장기 등에 필요한 조직을 배양하고 의학적으로 활용하기 위한 연구에 매우 중요한 특성으로 많은 연구가 되고 있다. 그 중에서도 동물 착생 세포는 기질 표면에 흡착된 후 분화가 일어나는 세포로서, 생체 밖(*in vitro*) 배양에 사용되는 기질의 특성에 의하여 세포의 분화, 증식, 이동, 접착, 신호전달, 유전자 발현 등의 다양한 세포활동에 직접적인 조절작용을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 기존에 발표된 논문을 살펴보면, 표면에너지에 따라서 달라지는 물에 대한 접촉각 분석에서 친수성에 대한 동물 세포의 흡착 및 성장의 영향은, 극도의 親水性(hydrophilic) 혹은 昭水性(hydrophobic) 보다는 친수성과 소수성 특성이 혼합된 적당한 특성의 기질을 선호한다고 알려져 있다(Biomaterials. 6, 403 (1985)). 상기한 바와 같이, 친수성뿐만 아니라 표면에 있는 화학적 작용기와 거칠기 등에 따라서도 세포의 흡착 및 성장, 분화에 다양한 효과를 보여주고 있다.

[0005] 2008년 Benoit가 발표한 논문(Nature Materials, 7, 818, 2008)을 보면, 인간 줄기세포가 성장하는 환경을 폴리에틸렌글리콜(-CH₂CH₂O-), 아민(-NH₂), 부틸(CH₃CH₂CH₂CH₃), 포스페이트 또는 아크릴산 등으로 변화시켰을 때, 각각의 줄기 세포가 성장하고 분화되는 특성이 매우 달라지는 것을 확인 할 수 있었다.

[0006] 나아가 각각의 세포들이 표면의 친수성이나 표면 전하의 양에 따라서, 혹은, 표면전하가 증가할 수 록 잘 자라

는 한편 (Biomaterials 28, 2175, 2008, Colloids Surface A, 313, 562, 2008), 표면 전하가 낮아질수록 더 잘 성장한다는 보고 (Biomaterials, 26, 4956, 2005)등이 보고되는 등 상호간 상충되는 결과를 쉽게 확인할 수 있다.

[0007] 상기한 논문들의 대부분은 세포들의 기질에 대한 특성을 확인하기 위하여 각각의 다른 특성을 갖도록 제어된 표면을 이용하여 세포의 흡착 및 성장을 확인하거나, 본 특허와 비슷한 개념의 점진적으로 제어된 표면을 이용하여 보고하고 있다. 그러나 유사한 조건을 제공하는 전하밀도나 화학적인 표면 구조, pH, 온도 및 배양조건등의 복잡한 환경적 제약으로, 대부분의 결과가 서로간에 상충되는 결과 및 혼동되는 결과로서 제시되고 있을 뿐, 각 세포별 고유의 특성을 상업적으로나 절대치로 비교할 수 있는 방법은 제시하지 못하고 있다. 이는 의학이나 의공학에 이용될 수 있는 수 많은 세포들을 표준화된 환경에서 비교할 수 없었던 문제점과 함께, 결과를 수치화하여 비교할 수 있는 방법이 아직 확립되어 있지 않았던 문제가 있었다.

[0008] 아직까지, 하나의 세포의 이러한 흡착, 성장 및 분화의 특성을 제어하는 기질과의 상호작용을 수치화하여 비교하는 방법은 연구나 특허로 제시된 바 없다.

[0009] 따라서 본 연구자들은 세포의 취득을 위한 재배양(subculture)이나 특정 세포의 표면 흡착을 유도하기 위한 생체 밖에서(*in vitro*) 세포배양에 사용될 수 있는 배양용 기질을 사용함에 있어 화학반응이 잘 알려진 방법에 의하여 하나의 기질에 다양한 특성이 동시에 표면 될 수 있는 점진적 변화를 이용하였으며, 기질에 세포배양에 의하여 나타난 결과를 쉽게 재현할 수 있고 비교할 수 있는 1개 이상, 바람직하게는 3개 이상의 1차원 기질 스트립(strip)을 하나의 세포 배양에 이용한 후, 각 세포의 특성을 수치화함으로써, 직접적으로는 세포 성장과 흡착에 관계하는 배양 기질 표면에 특성을 숫자로 표현할 수 있는 방법을 발명하였다. 궁극적으로 대상 세포의 흡착, 성장 및 분화의 특성을 수치화하여 세포의 고유특성으로 활용할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

[0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌의 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

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 세포의 성장 및 분화를 위한 기질에서의 특성을 색인화(cellular indexing) 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 다양한 기질의 표면 위에서 나타나는 세포들의 착생, 성장 및 분화의 특성을 수치화하여 세포별로 갖고 있는 착생, 성장 및 분화의 특성을 기준이 될 수 있는 표준화된 기질의 상대적인 위치를 이용하여 고유의 숫자로 색인화(index)하여, 그 색인을 통하여 연구자들이 수 차례에 걸친 세포배양 실험을 통하지 않고 세포의 착생, 성장 및 분화의 특성을 사전에 비교 분석 및 예측할 수 있는 정보를 제공하는 기술을 제공한다.

[0014] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포의 색인화(cellular indexing) 방법을 제공한다:

[0015] (a) 표면 특성의 구배(gradient)가 있는 배양 고상 기질 상에 세포를 배양하는 단계;

[0016] (b) 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화를 평가하는 단계; 및

[0017] (c) 상기 평가된 착상, 성장 또는 분화를 상기 표면 특성을 변수로 하여 선형적(linear)으로 수치화 하여 세포를 색인화하는 단계.

- [0018] 본 발명은 다양한 기질의 표면 상에서 나타나는 세포들의 착생, 성장 및 분화의 특성을 수치화하여 세포별로 색인화를 통하여 데이터베이스화 할 수 있는 기술이다.
- [0019] 본 발명은 다양한 종류의 세포들이 다양한 기질 상에서, 착생, 성장 및 분화에 적합한 표면조건을 찾고 그 결과를 수치화하여, 각 세포별로 고유의 숫자로 표현함으로써, 각각의 세포가 갖고 있는 최적의 배양 조건을 통한, 세포별 특성을 비교하고 나열할 수 있는 새로운 색인화 방법에 관한 것이다. 이와 같은 최적의 배양조건을 찾기 위하여, 점진적으로 변화하는 특성을 갖는 최소 1가지, 바람직하게는 최소 3가지의 1차원 점진적으로 개질된 표면을 이용하여 개질된 표면의 값을 수치화하는 방법을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 표면 특성의 구배(gradient)가 있는 배양 고상 기질 상에 세포를 배양한다.
- [0021] 본 발명에서 이용되는 배양 고상 기질(culture solid substrate)은 당업계에 공지된 다양한 기질을 포함한다. 기질 표면의 형상, 크기 및 화학적 조성은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 적합한 고상 기질은 예를 들어, 실리콘 웨이퍼, 유리, 석영, 융합 실리카, 금속(예컨대, 금, 금과 구리의 합금, 알루미늄), 금속 옥사이드, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌, 폴리 에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴아미드), 세파로스, 아가로스 및 콜로이드를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배양 고상 기질은 1차원 기질이다. 즉, 본 발명에서 이용되는 배양 고상 기질은 스트립과 같은 1차원 기질이며, 분석 대상의 세포는 고상 기질 상의 어느 위치에 있는 지를 1차원적으로 결정된다.
- [0023] 고상 기질에 표면특성 구배를 부여하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 농도구배 자기조립, 스핀코팅, 레이어-바이-레이어(Layer-by-Layer), 딥코팅, 랭뮤어-블라젯(Langmuir-Blodgett) 방법 또는 코로나방전처리 방법(대한민국 특허출원 제1990-0015981호) 등을 통하여 고상 기질에 표면 특성 구배를 부여할 수 있다.
- [0024] 표면 특성의 구배가 있는 배양 고상 기질 상에서 세포를 배양하는 것은, 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 일반적인 배지를 이용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 인텍싱 대상의 세포가 동물세포인 경우에는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 사용할 수 있으며, 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., *Nat. New Biol.* 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., *J. Exp. Med.* 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)), F12 (Ham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. *Exp. Cell Res.* 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., *Virology* 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., *In Vitro* 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다. 배지에 대한 설명은, R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York에 상세하게 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0025] 인텍싱 대상의 세포는 어떠한 세포도 포함하며, 예를 들어 바이러스, 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 포함한다. 바람직하게는, 인텍싱 대상의 세포는 진핵생물 세포이고, 보다 바람직하게는 동물 세포이고, 보다 더 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 소, 돼지, 말, 조류(avian), 양, 햄스터 또는 염소의 세포이고, 가장 바람직하게는 인간 세포이다.
- [0026] 인텍싱 대상의 세포는 생체 또는 조직으로부터 분리된 직후의 세포, 초기 배양 세포 및 구축된 세포주 (established cell line, 예컨대 종양 세포주)를 모두 포함한다.
- [0027] 특히, 바람직한 인텍싱 대상의 세포는 세포 치료제로 이용되는 인간 세포, 예컨대, 면역세포, 수지상세포 또는 줄기세포(성체줄기세포, 배아줄기세포, 유도된 전능성 줄기세포, 전능성 줄기세포, 다능성 줄기세포, 피부 줄기세포, 간엽줄기세포, 신경 줄기세포 등)이다. 본 발명에서의 색인화 즉 인텍싱 대상의 세포는 바람직하게는 착생 세포(adherent cell)이다.

- [0028] 상기 고상 기질 표면에 부여된 표면 특성은, 바람직하게는 화학적 표면 특성 또는 물리적 표면 특성이다.
- [0029] 화학적 표면 특성의 바람직한 예는 친수성, 소수성 또는 화학 작용기성(chemical functionality)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 물리적 표면 특성의 바람직한 예는 접촉각, 표면거칠기, 표면장력, 양전하도 또는 음전하도를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배양 고상 기질은 2개 이상, 보다 바람직하게는 3개 이상이며 각각의 배양 고상 기질은 서로 다른 표면 특성의 구배가 부여된 것이다. 부여 되는 표면 특성의 개수, 즉 이용되는 배양 고상 기질의 표면 종류의 상한선(upper limit)은 없으며, 표면 특성의 종류가 많을수록 인덱싱 대상의 세포를 보다 더 정밀하게 특징화(characterization)할 수 있다. 만일, 상한선을 한정한다면 표면 특성의 종류는 최대 100이다.
- [0031] 표면특성은 1개의 기질에 1개의 특성을 부여할 수 있고 또한 1개의 기질에 2개 이상의 특성을 부여할 수도 있다. 예를 들어, 양전하도 및 음전하도는 1개의 기질에 동시에 구배를 부여할 수 있다.
- [0032] 배양 후, 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화를 평가(분석 또는 측정)한다.
- [0033] 기질 상에서 세포의 착상, 성장 또는 분화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 분화의 측정의 경우 인덱싱 대상의 세포가 특정 세포로 분화 하는 것은 분화되어 생성된 세포에 대한 특정 바이오마커를 이용하여 분석할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화의 평가는 고상 기질 상에서의 세포 흡착의 면적 또는 세포의 개수를 측정하여 실시된다.
- [0035] 한편, 본 발명에서 세포 성장의 평가는 세포 모양의 변화, 세포 착상 또는 흡착의 변화, 세포 이동 변화, 세포 증식 변화, 세포사멸의 변화, 마이크로튜브 구조의 변화 및 마이크로필라멘트 구조의 변화 등과 같은 세포의 다양한 성장 또는 증식 패턴의 변화를 평가하는 것을 포괄한다.
- [0036] 상기 고상 기질 상의 세포에 대한 착상, 성장 또는 분화에 대한 평가를 한 다음, 상기 표면 특성을 변수로 하여 상기 평가 결과를 선형적(linear)으로 수치화 하여 세포를 색인화 즉 인덱싱 한다.
- [0037] 세포의 착상 정도, 성장 정도 또는 분화 정도에 대한 수치화 작업은 절대적 또는 상대적으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수치화는 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상, 성장 또는 분화가 가장 최대로 이루어지는 상기 기질의 1차원적 위치를 수치화 하여 실시된다.
- [0039] 보다 바람직하게는, 상기 수치화는 상기 표면 특성의 구배가 있는 배양 기질 상에서 상기 세포의 착상이 가장 최대로 이루어지는 상기 기질의 1차원적 위치를 수치화 하여 실시된다.
- [0040] 이렇게 하여 얻어진 수치들은 세포의 특성, 특히 세포의 배양 특성을 결정하는 인덱스로 이용될 수 있으며, 이러한 인덱스는 세포 배양을 하기 위하여 배양 조건, 배지 조건 및 배양 용기 조건들을 결정하는 데 있어서 중요한 자료로 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따라 본 발명을 설명하면 다음과 같다: 종래의 방법에 따라 친수-소수성 구배 기질 즉 칩, 음이온 구배 칩 그리고 양이온 구배 칩의 특성을 접촉각 측정방법과 같은 방법으로 특성을 확인한 후, 특성을 알고 싶은 세포배양을 통하여 구배 칩의 위치별 세포의 초기 흡착 면적과 시간(바람직하게는, 세포가 2배로 증식되는 시간 단위)으로 세포가 흡착되어 성장 또는 분화된 세포의 면적을 현미경으로 사진을 촬영하여 동일한 사진면적에 흡착되어 있는 세포의 전체 면적을 분석하여 기록 할 수 있다.
- [0042] 인덱싱 하는 구체적인 일 실시예는 다음과 같다: 1 cm x 4 cm 스트립 기질 상에서 세포의 착상, 성장 및 분화에 적합한 위치를 5개의 단위(0, 1, 2, 3, 4)로 상대적으로 표면하면, 최소 50개 지점으로 구분할 수 있다. 이러한 점진적으로 제어된(즉, 표면특성의 구배가 형성되도록 제작된) 다른 종류의 기질을 활용하게 되면, 50 x 50 = 2500 가지의 분류 가능성이 있으며, 세 가지 다른 종류의 기질을 활용하는 경우에는 50 x 50 x 50 = 125,000의 각각의 다른 조건으로 분류할 수 있다. 네 가지 다른 종류의 기질을 활용하는 경우에는 50 x 50 x 50 x 50 = 6,250,000의 경우의 수가 나올 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면 배양이 가능한 모든 세포를 각각의 기질에 따른 착상, 성장 및 분화의 특성에 따라서 고유의 좌표(coordinate)를 제시할 수 있다.
- [0043] 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, 인덱싱의 방법으로 친수성-소수성 표면 특성이 구배된 1D(one

dimensional) 칩을 이용하는 경우, 소수성 표면을 만들기 위하여 사용한 OTS(octadecyltrichlorosilane) 분자가 완전히 표면을 커버되었을 때 물에 의한 접촉각이 110° 정도 되고, OTS가 거의 없는 표면은 30° 정도 되므로, 그 중간 값을 선형 스케일로 구분한 후, 0.5 cm 단위로 세포의 배양에 따른 세포의 개수나 세포가 차지하고 있는 면적을 계산 한 후, 그 세포 흡착의 분포를 숫자로 표현할 수 있으며 또한 연속적인 컬러로 표현할 수 있다. 이러한 방법으로, 음전하 밀도에 의한 구배 칩과 양전하 밀도에 따른 구배 칩 등을 반복하여 순서대로 표현 한 후 이때 가장 많은 세포가 붙어있는 위치를 숫자로 표현할 수 있으며 또한 연속적인 컬러로 표현할 수 있다. 이렇게 하여, 세포의 색인화 즉 인텍싱 과정을 실시한다.

[0044] 상기한 과정을 통하여 얻은 세포의 특성에 대한 수치 및 인텍싱은 도면(예컨대, 그래프 또는 1차원 연속 컬러 스펙트럼), 표 또는 도면과 표로 정리될 수 있으며, 이렇게 정리된 도표는 다른 세포와의 비교, 분석 대상의 세포의 배양 예측 등에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0046] (a) 본 발명은 표면 특성의 구배가 있는 배양 고상 기질 상에서 세포의 착상, 성장 또는 분화를 측정하여 이 결과를 수치화 하고 이 수치로 세포를 색인화 하는 발명이다.

[0047] (b) 본 발명에 따르면 독립적으로 각각의 구배 기질을 활용하는 것은 단지 하나의 세포의 경향성을 제시하나, 가장 바람직하게는 3개 이상의 각기 다른 조건으로 제어된 기질이 표현될 수 있는 인텍싱은 대부분의 세포를 간단한 숫자로 표현되도록 하며, 종래 기술에서는 구현되지 않은 새로운 세포 인텍싱 또는 분류 방법을 제시한다.

[0048] (c) 본 발명에 따르면, 반복적인 여러 실험을 하지 않고서도 세포에 대한 특성을 예측할 수 있는 표준 정보를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 제작예에서 제작된 OTS와 COOH가 농도 구배된 기질(실시에 1a), OTS와 NH_2 가 농도 구배된 기질(실시에 1b) 및 COOH와 NH_2 가 농도 구배된 기질(실시에 1c)의 칩에 대하여, 접촉각 분석을 실시한 결과이다.

도 2는 HMEC(Human Mammary Epithelial Cell) 세포의 기질 표면특성에 대한 선호도 분석 결과이다. 이 결과는 수치화 되어, HMEC 세포의 색인화에 이용된다.

도 3은 MCF-7 세포의 기질 표면특성에 대한 선호도 분석 결과이다. 이 결과는 수치화 되어, MCF-7 세포의 색인화에 이용된다.

도 4는 도 2 및 도 3의 결과를 수치로 색인화 한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예

[0052] 제작예 1: 소수성 농도구배를 가지는 실리콘 웨이퍼의 제작

[0053] 실리콘 웨이퍼를 4 cm x 1 cm로 절단한 후, 표면을 UVO 클리너, 황산, 질산 또는 과산화수소수를 혼합한 실리콘 웨이퍼 세척 용액으로 세척하여 실리콘 옥사이드(silicon oxide)를 형성시켰다. 실리콘 옥사이드는 친수성을 띠며, 이와 같이 개질된 웨이퍼의 표면을 길이 방향으로 소수성 농도구배를 만들기 위해서 톨루엔이 담긴 바이알에 상기 개질된 표면을 가지는 실리콘 웨이퍼를 함침시켰다. 소수성 알킬기를 가진 OTS(octadecyltrichlorosilane, SIGMA-ALDRICH INC.)가 트리클로로에틸렌(Junsei Chemical Co.Ltd.)에 용해된 OST 2 mM 용액을 웨이퍼와 톨루엔이 담긴 바이알의 아래쪽에서부터 천천히 주입하였다. 용매인 톨루엔과 트리클로로에틸렌은 서로 섞일 수 있기 때문에 시간이 지남에 따라서 밀도가 큰 아래쪽의 트리클로로에틸렌 용액이 톨루엔 분자와의 확산작용에 의하여 위쪽으로 확산되어간다. 확산으로 소수성 표면을 만드는 OTS가 웨이퍼 표

면의 산소와 화학결합을 하여 친수성이었던 웨이퍼 표면에 소수성 농도구배를 형성하였다. 이러한 화학적 농도구배를 만들기 위한 확산방법은 용액뿐만 아니라 기체상으로도 널리 알려져 있다.

[0054] 제작예 2: 음이온 또는 양이온 밀도구배를 가지는 1D 구배 칩의 제작

[0055] 음이온 밀도 또는 양이온 밀도를 점진적으로 변화시킨 1D 구배 칩을 제작하는 방법은 다음과 같다.

[0056] 실시예 1에서 설명한 소수성 농도구배를 만드는 확산 방법과 같이, OTS의 결합에 의하여 구배 처리가 된 실리콘 웨이퍼의 친수성 말단을 OTS 구배에서 한 것과 유사한 방법으로 톨루엔 용액에 함침시키고 아래쪽에서부터 10-운데세닐트리클로로실란(10-undecenyltrichlorosilane, GELEST, INC.) 0.5 mM 용액을 주입한 뒤, 톨루엔과 트리클로로에틸렌이 혼합되며 발생하는 10-운데세닐트리클로로에틸렌 분자의 확산을 통해 농도구배를 만들었다. 이 후에 말단의 작용기가 이중 결합인 10-운데세닐트리클로로실란을 산화용액(0.5 mM KMnO_4 , 19.5 mM NaIO_4 , 1.8 mM K_2CO_3 혼합용액)으로 산화시켜 카르복실산 농도구배를 형성하였다. 이 경우 OTS가 밀집된 말단부터 카르복실산이 밀집된 다른 말단까지 음이온의 농도구배를 갖는 1D 구배 칩이 제작되었다.

[0057] 양이온 농도구배는 음이온 농도구배 칩과 유사한 방법으로 말단기가 아민기인 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, SIGMA-ALDRICH INC.)을 이미 소수성 농도구배가 이루어진 시편에 확산시켜 양이온 농도구배를 형성시켰다.

[0058] 제작예 3: 음이온과 양이온의 밀도구배를 동시에 가지는 1D 구배 칩의 제작

[0059] 음이온과 양이온의 밀도를 양방향에서 각각 점진적으로 변화시킨 1D 구배 칩을 제작하는 방법은 다음과 같다.

[0060] 실시예 1에서 설명한 소수성 농도구배를 만드는 확산 방법과 같이, 4 cm x 1 cm로 절단된 실리콘 웨이퍼 표면을 UVO 클리너, 황산, 과산화수소를 혼합한 실리콘 웨이퍼 세척 용액으로 세척하여 친수성인 실리콘 옥사이드(silicon oxide)를 형성시킨다. 실리콘 웨이퍼의 친수성 말단을 OTS 구배에서 한 것과 유사한 방법으로 톨루엔 용액에 함침시키고 아래쪽에서부터 10-운데세닐트리클로로실란(10-undecenyltrichlorosilane, GELEST, INC.) 0.5 mM 용액을 주입한 뒤, 톨루엔과 트리클로로에틸렌이 혼합되며 발생하는 10-운데세닐트리클로로에틸렌 분자의 확산을 통해 농도구배를 만들었다. 이 후에 말단기가 아민기인 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, SIGMA-ALDRICH INC.) 1 % (v/v) 용액에 담가서 이중결합 작용기의 농도구배가 이루어진 시편에 아민 양이온 농도구배를 형성시켰다. 10-운데세닐트리클로로실란 말단의 이중결합을 산화시키기 위해서 산화용액(0.5 mM KMnO_4 , 19.5 mM NaIO_4 , 1.8 mM K_2CO_3 혼합용액)에 담가 카르복실산 농도구배를 형성하였다. 이렇게 한 쪽 말단부터 카르복실산의 음이온 농도구배와 그 반대 방향으로 양이온 농도구배를 갖는 음이온과 양이온 동시의 1D 구배 칩이 제작되었다.

[0061] 실험예 1: 표면특성 구배의 확인

[0062] 상기 제작예에서 제작된 실시예 1a(OTS와 COOH 가 농도 구배된 기질), 1b(OTS와 NH_2 가 농도 구배된 기질) 및 1c(COOH 와 NH_2 가 농도 구배된 기질)의 칩에 대하여, 하나의 기질에 다양한 표면 전하의 처리가 되었는지 여부를 확인하기 위하여 물에 의한 접촉각 분석을 실시하였다. 접촉각 분석은 Phoenix 300 기기(Phoenix 300, S.E.O. Co. Ltd)를 이용하여 실시하였다.

[0063] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 실시예 a1은 OTS가 밀집된 부분은 접촉각이 약 110° 에서 COOH 가 밀집된 40° 까지 거리에 따라서 순차적으로 변화하였다. 실시예 a2는 OTS가 밀집된 부분은 접촉각이 약 110° 에서 NH_2 가 밀집된 위치의 40° 까지 거리에 따라서 순차적으로 변화하였다. 실시예 a3의 경우는 COOH 에서 NH_2 까지 농도구배법에 의하여 처리하였으며, 음전하를 띄는 COOH 와 양전하를 띄는 NH_2 가 모두 표면에 순차적으로 흡착되어, 약 40° 에서 50° 에서 큰 차이 없는 접촉각을 나타내었다.

[0064] **실험예 2: HMEC 세포의 선호 특성 분석**

[0065] 접촉각에 의하여 표면의 구배된 결과가 확인된 실시예 a1, a2 및 a3의 3개의 칩을 오토클레이브(120℃)에서 고압 처리하거나 75%의 에틸알코올로 멸균시킨 후, 추가로 수분을 건조시킨 다음, 상기 칩 상에 HMEC(Human Mammary Epithelial Cell, Lonza) 세포를 접종하고 37℃에서 배양하였다. 이 때 사용되는 배지는 RPMI 이다. HMEC는 유방암을 일으키는 것으로 알려진 조직에서 추출된 세포이다.

[0066] 도 2-1, 도 2-2 및 도 2-3은 각각 HMEC 세포를 처음 배양을 시작한 후 1시간 후에 측정된 초기 사진으로부터 얻은 세포의 면적(After seeding)과 24시간 후에 성장 및 분화한 후에 얻어진 세포의 기질 표면에 붙은 면적(24h incubation)을 OTS-COOH (도 2-1), OTS-NH₂ (도 2-2) 및 COOH-NH₂ (도 2-3)의 구배 칩에서 측정하여 0.5 cm의 스텝으로 한쪽의 거리에 따라서 표현한 그래프이다. 실험예 2에 의한 실험군을 대조군 1이라 하였다.

[0067] 기존의 연구가 이러한 전하나 친수성 등의 구배에 따라서, 경향성을 보여주고 있다고 가정하고 이와 같은 특성을 보여주는 것에 그쳤던 것에 비하여, 본 발명에서는 이러한 결과를 인덱싱하는 데 특징이 있으며 방법은 다음과 같다. 도 2-1과 도 2-2를 비교할 때 각각 세포가 잘 착상된 조건이 있으나, 절대값으로 비교할 때는 도 2-1의 조건인 OTS-COOH가 혼합된 표면이 가장 잘 성장하는 조건임을 알 수 있다. 이러한 결과는 세포가 COOH와 적당한 OTS의 말단기인 CH₃가 적절히 혼합된 조건이 가장 좋은 것임을 나타낸다. 이 경우 거의 모든 세포들이 비슷한 조건이므로, 세포별 특성을 부여하는 것이 어렵다. 그러나, OTS-NH₂ 혹은 COOH-NH₂의 말단기가 혼재된 경우는 해당 세포가 갖고 있는 고유의 특성이 세밀하게 구분될 수 있다.

[0068] **실험예 3: MCF-7 세포의 선호 특성 분석**

[0069] 실시예 a1, a2 및 a3의 3개의 칩 및 유방암세포에서 추출한 MCF-7 세포(ATCC, USA)를 이용하여 칩의 기질 상에 세포를 37℃에서 착상, 분화 및 성장시켰다. 이 때 사용되는 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)이다. 실험예 3에 의한 실험군을 대조군 2라 하였다.

[0070] 도 3에서 실시예 2a, 2b 및 2c는 각각 실시예 a1, a2 및 a3의 칩에 해당하는 것이다. 대조군 1 (도 2-1)과 대조군 2 (도 3-1)를 비교할 때 모두 OTS가 많이 있는 부분 보다는 COOH가 많은 부분에 더 착생, 성장한 세포의 면적이 넓은 것을 알 수 있다. 그러나, OTS-NH₂와 COOH-NH₂의 경우는 대조군 1과 비교하여 크게 차이가 있는 것을 확인 할 수 있다. 이러한 결과들은 각각의 세포가 갖고 있는 표면 전하, 구조 그리고 특성에 따라서 기질이 제공하는 다양한 환경에 따라 미세하게 달라진다는 것을 보여준다. 즉, 하나의 특성으로 세포의 특성을 모두 표현하는 것이 매우 어렵다.

[0071] 이와 같은 결과들을 바탕으로 대조군 1과 대조군 2의 표면에 따른 특성을 1D 스펙트럼(spectrum)으로 표현한 결과가 도 4에 나타나 있다. 이때 가장 세포의 면적이 많이 차지하고 있는 위치를 0-6까지의 상대적 위치를 수치화 하여, 대조군 1과 대조군 2의 세포의 착상, 분화, 성장 특성을 - (실시예 1a, 2a), + (실시예 1b, 2b), (실시예 1c, 2c)로 나타내고 있다. 도 4에서, HMEC 세포는 -4.1, +2.6 및 3.4로 수치화 되고 인덱싱 되며, MCF-7 세포는 -5.6, +4.2 및 3.8로 수치화 되고 인덱싱 된다.

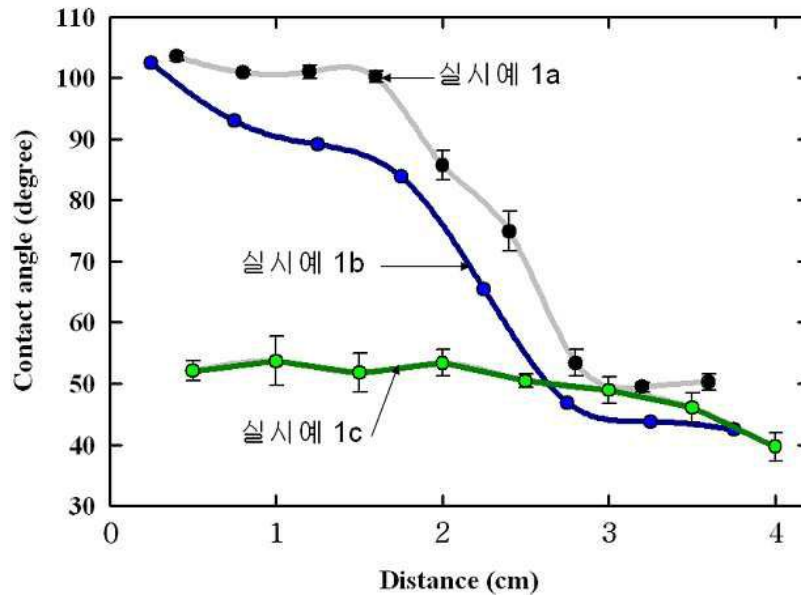
[0072] 이와 같은 방법을 통하여 각각의 세포의 특성을 수치화된 숫자로 표현하고 이러한 숫자를 표준화되어 있는 표면 전하 밀도, 표면 장력 및 기타 표면 특성에 대비된 테이블과 비교할 경우, 반복적인 여러 실험을 하지 않고서도 그 세포에 대한 특성을 예측할 수 있는 표준 정보로서 활용 될 수 있다. 이러한 인덱싱 방법은 전하 특성에 한정되지 않으며, 표면의 거칠기나 다른 작용기의 점진적 변화를 준 모든 특성에 적용이 가능하다.

[0073] 또한, 점진적 표면을 준비하여 수치로 인덱싱 하는 방법은 상기 실시예에서 본 발명의 개념을 설명하고자 상세하게 기술되었지만 다른 인덱싱 방법들과 함께 변경 및 대체되어서 활용하는 것은, 본 발명의 범위 및 정신에 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해할 수 있다. 또한 본 발명의 범위는 명세서에 기술된 공정, 조건, 방법 예에 제한되는 것이 아니라 본 발명의 절차가 구현됨에 있어, 통상의 지식을 가진 자가 실질적으로 같은 결과를 달성하는, 현존하거나 후에 개발되는 공정, 조건, 방법 등에 있어 활용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구 범위는 그 범위 내에 그러한 공정, 조건, 방법을 포함하는 것으로 의도되어야 한다.

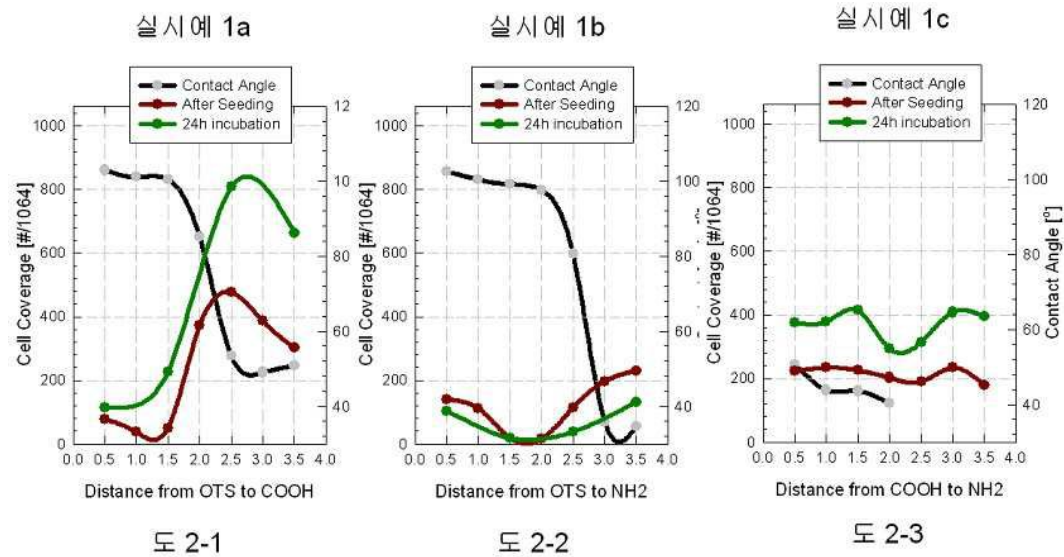
도면

도면1

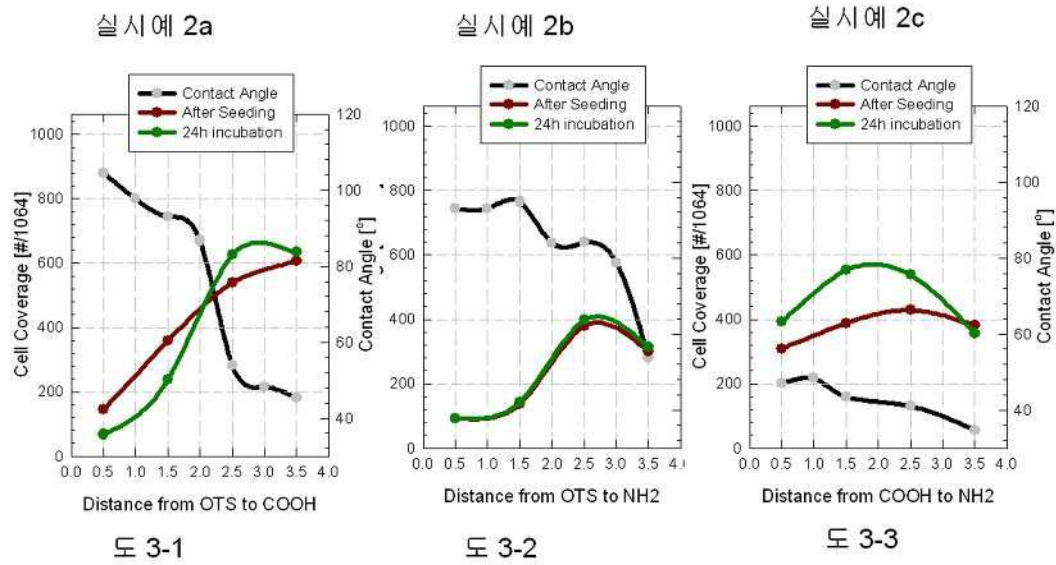
대조군 1의 표면처리된 구배 칩의 접촉각 결과



도면2



도면3



도면4

대조군 1		대조군 2	
실시예 1a		실시예 2a	
실시예 1b		실시예 2b	
실시예 1c		실시예 2c	
index	$\begin{pmatrix} - & + & \overline{+} \\ 4.1, 2.6, 3.4 \end{pmatrix}$	index	$\begin{pmatrix} - & + & \overline{+} \\ 5.6, 4.2, 3.8 \end{pmatrix}$