



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월08일

(11) 등록번호 10-2224685

(24) 등록일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0068 (2013.01)

A61L 27/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0103242

(22) 출원일자 2018년08월31일

심사청구일자 2018년08월31일

(65) 공개번호 10-2020-0025616

(43) 공개일자 2020년03월10일

(56) 선행기술조사문헌

Allen, ACB. et al., Biomater Sci. (2017)
5(8):1661-1669*Tang, Z. & Okano, T. Regenerative
Biomaterials (2014) 91-102*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

고원건

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제1공학관 607호
(신촌동)

임재열

서울특별시 강남구 인주로63길 20, 의과대학 미래
의학연구센터 202호 (역삼동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 9 항

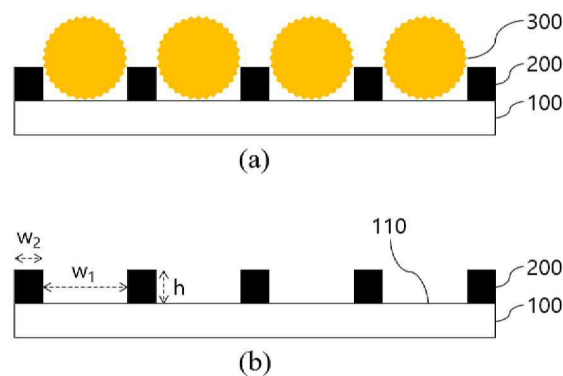
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 3차원 세포 배양 스캐폴드 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일 측면은, 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재, 상기 온도감응성 기재의 일 면에 형성된 격자형 패턴, 및 상기 격자형 패턴에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재의 일 면을 기저부로 포함하여 세포와 접촉하도록 형성된 세포 배양부를 포함하는 3차원 세포 배양 스캐폴드 및 그 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/3895 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

C12M 25/14 (2013.01)

C12N 5/0062 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

홍혜진

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제1공학관 333호
(신촌동)

김경주

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제1공학관 333호
(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345255109

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 심근조직 재생을 위한 다중 자극 유도형 전도성 하이드로젤 스캐폴드 개발(3/3)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711070300

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 [Ezbaro](3세부) 시각증진용 생체적합 파지메타소재 개발 (1/2단계)(2/3)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재,

상기 온도감응성 기재의 일 면에 형성된 격자형 패턴, 및

상기 격자형 패턴에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재의 일 면을 기저부로 포함하여 세포와 접촉하도록 형성된 세포 배양부를 포함하고,

상기 온도감응성 기재는 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함하고,

상기 격자형 패턴은 가교된 친수성 고분자로 이루어지고,

상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비는 각각 30~70 : 30~70이고,

상기 온도감응성 기재와 상기 격자형 패턴의 구성 성분이 상이하고,

소수성 스펜도이드의 배양을 위한, 3차원 세포 배양 스캐폴드.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리글리콜산, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리스티렌, 폴리(에틸렌-코-비닐알코올), 폴리카프로락톤, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시발레레이트)(PHBV), 폴리아크릴로니트릴, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리아크릴산, 아세트산셀룰로오스, 실크-라이크 폴리머, 콜라겐, 피브리노겐, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 키토산 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 3차원 세포 배양 스캐폴드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 온도감응성 고분자는 폴리(에틸렌옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌옥사이드(PEO)-프로필렌옥사이드(PP0)) 공중합체, PEO-PP0-PEO 트리블록 계면활성제, PLGA(poly(lactic acid-co-glycolic acid))-PEO 트리블록 공중합체, 알킬-PEO 블록 계면활성제, 폴리(비닐메틸에테르)(PVME), 하이드록시프로필아크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스; 폴리(비닐알코올), 폴리(N-치환 아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일피롤리딘), 폴리(N-아크릴로일피페리딘), 폴리(아크릴-L-아미노산아마이드), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm) 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 3차원 세포 배양 스캐폴드.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트인 3차원 세포 배양 스캐폴드.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 세포 배양부의 면적 및 깊이는 각각 $10,000 \sim 100,000 \mu\text{m}^2$ 및 $150 \sim 300 \mu\text{m}$ 이고, 상기 격자형 패턴의 폭은 $100 \sim 300 \mu\text{m}$ 인 3차원 세포 배양 스캐폴드.

청구항 9

- (a) 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함하는 수지 조성물을 전기방사하여 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재를 제조하는 단계;
- (b) 상기 온도감응성 기재의 일 면에 가교제 및 친수성 고분자를 포함하는 하이드로젤 용액을 도포하는 단계;
- (c) 도포된 상기 하이드로젤 용액 중 적어도 일부에 포토마스크를 덮은 후, UV를 조사하여 상기 친수성 고분자를 가교시켜 격자형 패턴을 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 포토마스크를 제거하고, 상기 하이드로젤 용액 중 가교되지 않은 부분을 제거하는 단계;를 포함하고, 상기 수지 조성물 중 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비는 각각 30~70 : 30~70이고, 소수성 스페로이드의 배양을 위한, 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 폴락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리글리콜산, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리스티렌, 폴리(에틸렌-코-비닐알코올), 폴리카프로락톤, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시발레레이트)(PHBV), 폴리아크릴로니트릴, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리아크릴산, 아세트산셀룰로오스, 실크-라이크 폴리머, 콜라겐, 피브리노겐, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 키토산 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 온도감응성 고분자는 폴리(에틸렌옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌옥사이드(PEO)-프로필렌옥사이드(PP0)) 공중합체, PEO-PP0-PEO 트리블록 계면활성제, PLGA(poly(lactic acid-co-glycolic acid))-PEO 트리블록 공중합체, 알킬-PEO 블록 계면활성제, 폴리(비닐메틸에테르)(PVME), 하이드록시프로필아크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스; 폴리(비닐알코올), 폴리(N-치환 아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일피롤리딘), 폴리(N-아크릴로일피페리딘), 폴리(아크릴-L-아미노산아마이드), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm) 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트인 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 세포 배양 스캐폴드 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직공학에서 3차원 세포 배양기술의 중요성은 날로 증가하고 있다. 이는 2차원 세포 배양보다 3차원 환경에서 세포를 배양하게 되면 실제 체내 환경을 유사하게 모방할 수 있으므로 조직공학적 연구에 크게 기여할 수 있다는 장점이 있기 때문이다.

[0003] 3차원 세포 배양기술을 이용하여 3차원의 세포 응집체, 즉, 스펜로이드로 세포 배양이 이루어진 것은 1650년대부터 이루어져 왔으며, 이러한 스펜로이드는 2차원으로 배양된 세포 보다 실제 조직과의 유사성이 더 높으므로 약물 등에 대한 조직 반응을 연구하는데 유리하다.

[0004] 이러한 스펜로이드를 배양하기 위해 Hanging Drop법, 특수 플레이트의 이용, suspension 세포 배양, 미세유체 칩 등의 방법이 사용되어 왔다. 한편, 고분자 기반의 스캐폴드에 부착되어 배양된 스펜로이드를 회수하려면 단백질 분해효소를 사용하여 스펜로이드와 스캐폴드의 결합을 약화 및 제거하는 방법을 사용하는데, 이러한 방법은 스펜로이드 간의 결합력에도 악영향을 미치는 문제가 있다. 이에 대해, 최근 온도감응성 소재를 이용하여 일정 크기의 스펜로이드를 제조, 회수하는 기술이 부각되고 있다.

[0005] 한국공개특허 제10-2009-0120665호는 온도응답성 고분자를 이용한 세포 배양/회수용 매트릭스 및 그 제조방법을 개시하나, 온도응답성 고분자가 생체적합성 고분자로 이루어진 나노섬유 부직포의 전 영역에 걸쳐 랜덤하게 그 라프트되므로 배양 및 회수되는 스펜로이드의 크기와 수를 필요한 범위로 조절할 수 없는 문제가 있다.

[0006] 한국공개특허 제10-2018-0049998호 및 제10-2017-0029237호는 온도감응성 하이드로젤을 이용한 스펜로이드의 제조방법을 개시한다. 이 경우, 일정 형태로 패터닝된 매트릭스 상에서 스펜로이드를 배양하여 용이하게 회수할 수 있으나, 기재 상에 "돌출된" 매트릭스 상에서 스펜로이드를 배양함에 따라 스펜로이드의 크기를 필요한 범위로 제한, 조절할 수 없는 문제가 있다. 특히, 한국공개특허 제10-2017-0029237호의 제조방법에 따르면, 스펜로이드가 온도감응성 물질과 직접 접촉하여 배양되는 것이 아니라 온도감응성 물질 상에 위치한 폴리카테콜 패턴 상에서 배양되므로 주변 온도의 제어만으로 세포를 용이하게 회수하기 어려운 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 스펜로이드의 크기와 수를 필요한 범위로 배양할 수 있고, 배양된 스펜로이드를 주변 온도의 제어만으로 용이하게 회수할 수 있는 3차원 세포 배양 스캐폴드 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 측면은, 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재, 상기 온도감응성 기재의 일 면에 형성된 격자형 패턴, 및 상기 격자형 패턴에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재의 일 면을 기저부로 포함하여 세포와 접촉하도록 형성된 세포 배양부를 포함하는 3차원 세포 배양 스캐폴드를 제공한다.

[0009] 일 실시예에 있어서, 상기 온도감응성 기재는 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함할 수 있다.

[0010] 일 실시예에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비는 각각 30~70 : 30~70일 수 있다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리글리콜산, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리스티렌, 폴리(에틸렌-코-비닐알코올), 폴리카프로락톤, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시발레레이트)(PHBV), 폴리아크릴로니트릴, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리아크릴산, 아세트산셀룰로오스, 실크-라이크 폴리머, 콜라겐, 피브리노젠, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 키토산 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 온도감응성 고분자는 폴리(에틸렌옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌옥사이드(PEO)-프로필렌옥사이드(PPO)) 공중합체, PEO-PPO-PEO 트리블록 계면활성제, PLGA(poly(lactic acid-co-glycolic acid))-PEO 트리블록 공중합체, 알킬-PEO 블록 계면활성제, 폴리(비닐메틸에테르)(PVME), 하이드록시프로필아크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스,

메틸셀룰로오스; 폴리(비닐알코올), 폴리(N-치환 아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일피롤리딘), 폴리(N-아크릴로일피페리딘), 폴리(아크릴-L-아미노산 아마이드), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm) 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 격자형 패턴은 가교된 친수성 고분자로 이루어질 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 세포 배양부의 면적 및 깊이는 각각 $10,000 \sim 100,000 \mu\text{m}^2$ 및 $150 \sim 300 \mu\text{m}$ 이고, 상기 격자형 패턴의 폭은 $100 \sim 300 \mu\text{m}$ 일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일 측면은, (a) 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함하는 수지 조성물을 전기방사하여 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재를 제조하는 단계; (b) 상기 온도감응성 기재의 일 면에 가교제 및 친수성 고분자를 포함하는 하이드로젤 용액을 도포하는 단계; (c) 도포된 상기 하이드로젤 용액 중 적어도 일부에 포토마스크를 덮은 후, UV를 조사하여 상기 친수성 고분자를 가교시켜 격자형 패턴을 제조하는 단계; 및 (d) 상기 포토마스크를 제거하고, 상기 하이드로젤 용액 중 가교되지 않은 부분을 제거하는 단계;를 포함하는 3차원 세포 배양 스케폴드의 제조방법을 제공한다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 수지 조성물 중 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비는 각각 30~70 : 30~70일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리글리콜산, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리스티렌, 폴리(에틸렌-코-비닐알코올), 폴리카프로락톤, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시발레레이트)(PHBV), 폴리아크릴로니트릴, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리아크릴산, 아세트산셀룰로오스, 실크-라이크 폴리머, 콜라겐, 피브리노겐, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 키토산 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 온도감응성 고분자는 폴리(에틸렌옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌옥사이드(PEO)-프로필렌옥사이드(PPO)) 공중합체, PEO-PPO-PEO 트리블록 계면활성제, PLGA(poly(lactic acid-co-glycolic acid))-PEO 트리블록 공중합체, 알킬-PEO 블록 계면활성제, 폴리(비닐메틸에테르)(PVME), 하이드록시프로필아크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스; 폴리(비닐알코올), 폴리(N-치환 아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일피롤리딘), 폴리(N-아크릴로일피페리딘), 폴리(아크릴-L-아미노산 아마이드), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm) 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스케폴드는 세포가 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재와 직접 접촉하여 실제 체내 환경과 유사한 조건에서 배양되도록 하고, 격자형 패턴에 의해 세포를 필요한 크기로 개별적, 독립적으로 배양할 수 있다. 또한, 상기 스케폴드로부터 배양된 세포를 분리 및 회수하는 경우, 단백질 분해효소를 사용하지 않으므로 상기 단백질 분해효소가 3차원 배양된 세포, 즉, 스펀지에 미칠 수 있는 부정적인 영향을 배제할 수 있고, 주변 온도를 일정 범위로 조절함으로써 배양된 세포를 효과적으로 분리, 회수할 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스케폴드의 제조방법은 포토마스크 및 UV를 이용하여 탑-다운(top-down) 방식으로 필요한 부분에 대해 선택적으로 격자형 패턴 및 세포 배양부를 형성할 수 있다.

[0023] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스케폴드의 구조를 도식화한 것이고;

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스케폴드의 제조방법을 도식화한 것이고;

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 온도감응성 기재의 SEM 이미지이고;

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 온도감응성 기재의 온도 변화에 따른 접착각을 측정한 결과이고;

도 6는 본 발명의 일 실시예에 따른 온도감응성 기재의 XPS 분석 결과이고;

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드의 SEM 이미지이고;

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드의 세포 독성 실험 결과이고;

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드로부터 분리된 스펜로이드의 광학현미경 이미지이고;

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드로부터 분리된 스펜로이드의 생존/사멸 상태 확인을 위한 정성분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0026] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0027] 3차원 세포 배양 스캐폴드
- [0028] 도 1은 본 발명의 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드의 구조를 도식화한 것이다.
- [0029] 도 1을 참고하면, 본 발명의 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드는, 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재(100), 상기 온도감응성 기재의 일 면에 형성된 격자형 패턴(200), 및 상기 격자형 패턴에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재의 일 면을 기저부(110)로 포함하여 세포(300)와 접촉하도록 형성된 세포 배양부를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 명세서에 사용된 용어, "3차원 망상 구조"는 수지 조성물로 이루어진 섬유 및 이를 제외한 공극을 포함하는 부직포(non-woven)를 의미할 수 있고, 상기 공극은 인접한 것끼리 상호 연통되어 개방된 구조를 가질 수 있다. 상기 3차원 망상 구조는 세포가 직접 접촉하여 배양되는 기재(substrate)로 작용하고, 이 때, 상기 세포는 실제 체내 환경과 유사한 조건에서 스펜로이드로 3차원 배양될 수 있다.
- [0031] 상기 온도 감응성 기재(100)는 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함할 수 있다. 상기 생체적합성 고분자는 세포 독성을 저감하여 세포가 원활히 배양되도록 할 수 있고, 상기 온도감응성 고분자는 주변 온도의 변화에 따라 그 성질이 친수성 및 소수성으로 전환될 수 있으므로, 3차원 배양된 세포, 즉, 스펜로이드가 용이하게 분리, 회수되도록 할 수 있다.
- [0032] 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비는 각각 30~70 : 30~70, 바람직하게는, 40~60 : 40~60일 수 있다. 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 중량비가 상기 범위를 벗어나면 세포 독성 및 스펜로이드의 회수 용이성을 균형적으로 구현할 수 없다.
- [0033] 상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리글리콜산, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리스티렌, 폴리(에틸렌-코-비닐알코올), 폴리카프로락톤, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시발레레이트)(PHBV), 폴리아크릴로니트릴, 폴리우레탄, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리아크릴산, 아세트산셀룰로오스, 실크-라이크 폴리머, 콜라겐, 피브리노겐, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 키토산 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있고, 바람직하게는, 폴리카프로락톤일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 온도감응성 고분자는 폴리(에틸렌옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌옥사이드(PEO)-프로필렌옥사이드(PO)) 공중합체, PEO-PO-PEO 트리블록 계면활성제, PLGA(poly(lactic acid-co-glycolic acid))-PEO 트리블록 공중합체, 알킬-PEO 블록 계면활성제, 폴리(비닐메틸에테르)(PVME), 하이드록시프로필아크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스; 폴리(비닐알코올), 폴리

(N-치환 아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일피롤리딘), 폴리(N-아크릴로일피페리딘), 폴리(아크릴-L-아미노산 아마이드), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm) 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있고, 바람직하게는, 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)(pNIPAAm)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] pNIPAAm은 LCST(lower critical solution temperature)인 32℃를 기준으로 그 초과 온도에서는 소수성을 나타내고 그 이하 온도에서는 친수성을 나타낸다. 세포 배양온도인 37℃에서는 pNIPAAm이 소수성을 나타내므로 상기 온도감응성 기재에 소수성인 세포가 부착될 수 있고, 부착된 세포는 스페로이드로 배양된 후 저온 처리에 의해 친수화된 상기 온도감응성 기재로부터 분리될 수 있다.

[0036] 이러한 온도감응성 고분자를 이용한 세포의 배양 및 회수방법은, 종래 트립신(trypsin)과 같은 단백질을 분해효소를 이용한 세포의 회수방법과 달리 세포 기능의 손상없이 세포가 회수될 수 있다.

[0037] 상기 격자형 패턴(200)은 가교된 친수성 고분자로 이루어질 수 있다. 상기 격자형 패턴이 친수성 고분자로 이루어지면, 주변 온도 강하 시 배양된 세포가 상기 온도감응성 기재뿐만 아니라 상기 격자형 패턴에서도 용이하게 분리될 수 있다. 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 친수성 고분자는 임의의 가교제에 의해 가교될 수 있고, 예를 들어, 상기 가교제는 2-하이드록시-2-메틸프로피오펜(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 가교제의 함량은 상기 친수성 고분자 100중량부에 대해 1~10중량부일 수 있다.

[0038] 상기 세포 배양부는 상기 격자형 패턴(200)에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재(100)의 일 면을 기저부(110)로 포함하여 세포(300)와 접촉하도록 형성될 수 있다. 상기 격자형 패턴(200)은 인접한 세포 배양부를 상호 분리, 이격시켜 복수의 세포가 개별적, 독립적으로 배양되도록 하며, 상기 세포 배양부의 크기와 그에 따른 스페로이드의 크기를 조절, 제한할 수 있다. 상기 스캐폴드에서 세포는 "요입된" 부분에서 3차원 배양되므로, 세포가 성장하여 상기 격자형 패턴(200)과 접촉하면 더 이상의 성장이 일어나지 않을 수 있다.

[0039] 예를 들어, 도 1(b)를 참고하면, 상기 세포 배양부의 면적($w_1 \times w_1$) 및 깊이(h)는 각각 10,000~100,000 μm^2 및 150~300 μm 이고, 상기 격자형 패턴의 폭 또는 두께(w_2)은 100~300 μm 일 수 있다.

[0040] 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법

[0041] 도 2는 본 발명의 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법을 도식화한 것이다.

[0042] 도 2를 참고하면, 본 발명의 다른 일 측면에 따른 3차원 세포 배양 스캐폴드의 제조방법은, (a) 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함하는 수지 조성물을 전기방사하여 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재를 제조하는 단계; (b) 상기 온도감응성 기재의 일 면에 가교제 및 친수성 고분자를 포함하는 하이드로젤 용액을 도포하는 단계; (c) 도포된 상기 하이드로젤 용액 중 적어도 일부에 포토마스크를 덮은 후, UV를 조사하여 상기 친수성 고분자를 가교시켜 격자형 패턴을 제조하는 단계; 및 (d) 상기 포토마스크를 제거하고, 상기 하이드로젤 용액 중 가교되지 않은 부분을 제거하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0043] 상기 (a) 단계에서, 생체적합성 고분자 및 온도감응성 고분자를 포함하는 수지 조성물을 전기방사하여 3차원 망상 구조를 가지는 온도감응성 기재, 즉, 온도감응성 부직포 기재를 제조할 수 있다.

[0044] 전기방사는 고분자 용액 또는 용융체에 정전기적인 힘을 걸어줌으로써 충전된 고분자와 접지된 집전판 사이의 큰 전위차에 의해 방사되어 수 nm 내지 수 μm 의 섬유를 제조하는 기술로서, 설비 및 장비가 저렴하고 단순하며, 방사 속도가 빠르고 적은 양으로도 방사가 가능하며, 방사와 동시에 부직포(non-woven) 형태를 얻을 수 있고, 첨가제 투입이 용이한 방법이다. 전기방사에 이용되는 재료 형태는 고분자 용액(solution)과 용융체(melt) 모두 가능하지만 일반적으로 용액(solution) 형태가 직경이 보다 가는 섬유를 형성하는 것으로 알려져 있다. 전기방사 시 사용되는 고분자 용액 특성은 섬유 형성에 많은 영향을 주는데, 이러한 용액의 특성에는 고분자 용액의 농도, 점도, 표면장력, 전도성, 유전성질, 휘발성 등이 있다. 고분자 용액의 점도는 농도와 밀접한 관계에 있고, 고분자 사슬의 얽힘 정도와 유동성을 나타내는 척도이기 때문에, 전기방사 시 제조되는 섬유의 형태, 직경 및 분사되는 속도에 영향을 주는 중요한 인자가 된다.

[0045] 전기방사는, 바람직하게는, 전압 5~100kV, 방사거리 5~100cm 및 고분자 용액의 방출속도(flow rate) 0.1~50ml/h의 조건에서 수행될 수 있다. 상기 수지 조성물을 전기방사시켜 얻어진 나노섬유의 평균 직경은 1nm~10 μm 일 수 있다. 상기 전기방사에 의해 얻어진 나노섬유는 일반적으로 위사와 경사에 의해 직조되지 않은 랜덤하

게 섬유 가닥이 중첩된 부직포의 형태를 가질 수 있다.

- [0046] 상기 수지 조성물 중 상기 생체적합성 고분자 및 상기 온도감응성 고분자의 비율, 각각의 종류 및 작용효과에 대해서는 전술한 것과 같다.
- [0047] 상기 (b) 단계에서, 상기 온도감응성 기재의 일 면에 가교제 및 친수성 고분자를 포함하는 하이드로젤 용액을 도포할 수 있다. 상기 하이드로젤 용액은 가교제, 친수성 고분자 및 물을 포함할 수 있고, 이들의 조성, 종류 및 작용효과에 대해서는 전술한 것과 같다. 상기 도포는 적가(dropping), 딥핑(dipping), 롤 코팅, 바 코팅, 스프레이 코팅과 같은 방법에 의해 이루어질 수 있고, 상기 온도감응성 기재, 격자형 패턴, 세포 배양부, 및 이들을 포함하는 스캐폴드의 전체적인 크기, 규격을 고려하여 적절한 방법이 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 도포는, 필요한 스캐폴드의 크기가 작은 경우 상기 하이드로젤 용액을 적가한 후 모세관 효과를 이용하는 방법으로 이루어질 수 있고, 필요한 스캐폴드의 크기가 큰 경우 딥핑, 롤 코팅, 스프레이 코팅과 같은 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0048] 상기 (c) 단계에서, 상기 온도감응성 기재의 일 면에 도포된 상기 하이드로젤 용액 중 적어도 일부에 포토마스크를 덮은 후, UV를 조사하여 상기 친수성 고분자를 가교시켜 격자형 패턴을 제조할 수 있다. 상기 포토마스크 및 UV를 이용하여 탑-다운(top-down) 방식으로 필요한 부분에 대해 선택적으로 격자형 패턴 및 세포 배양부를 형성할 수 있으므로, 종래 마이크로 패턴을 형성한 다음 이를 (온도감응성) 기재 상으로 이전시키는 바텀-업(bottom-up) 방식에 비해 단순한 공정을 통해 3차원 세포 배양 스캐폴드를 제조할 수 있다.
- [0049] 상기 (d) 단계에서, 상기 포토마스크를 제거하고, 상기 하이드로젤 용액 중 가교되지 않은 부분을 제거하여 상기기와 같은 구조의 3차원 세포 배양 스캐폴드를 얻을 수 있다. 상기 (b) 단계에서 상기 온도감응성 기재의 일 면에 도포된 상기 하이드로젤 용액 중 가교되지 않은 부분, 즉, 상기 (c) 단계에서 포토마스크로 덮여 있었던 부분은 전자선 처리, 열처리, 건조, 세척 등의 다양한 물리적, 화학적 방법에 의해 완전히 제거될 수 있고, 이에 따라, 상기 세포 배양부가 도 1에 도시된 것과 같이 상기 격자형 패턴(200)에 의해 구분되고 상기 온도감응성 기재(100)의 일 면을 기저부(110)로 포함하여 세포(300)와 접촉하도록 형성될 수 있다.
- [0050] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0051] 실시예 1
- [0052] 중량평균분자량 20,000~40,000 g/mol의 폴리나이팜(poly(N-isopropylacrylamide), pNIPAAm) 1.5g과 분자량 80,000 g/mol의 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL) 1.5g을 3mL의 메탄올과 9mL의 클로로포름에 용해시켜 20중량% 농도의 용액을 제조한 다음, 상기 용액을 약 30분 간 전기방사하여 나노섬유 부직포 시트를 제조하였다. 도 3은 실시예 1에서 제조된 나노섬유 부직포 시트의 SEM 이미지이다.
- [0053] 실험예 1
- [0054] 상기 실시예 1에서 제조된 나노섬유 부직포 시트의 온도 변화에 따른 접촉각 변화를 확인하였고, 이를 도 4에 나타내었다. 도 4를 참고하면, 상기 나노섬유 부직포 시트의 접촉각은 32℃ 초과의 온도에서 약 80°로 측정된 반면에, 32℃ 이하의 온도에서는 약 35°로 측정되어 주변 온도가 32℃ 이하인 경우 상기 나노섬유 부직포 시트의 친수성이 현저히 강화되었다.
- [0055] 또한, 상기 실시예 1에서 제조된 나노섬유 부직포 시트의 XPS 분석 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5를 참고하면, 상기 나노섬유 부직포 시트의 XPS에서 폴리나이팜에 상응하는 피크가 관찰되었고, 이를 통해 상기 나노섬유 부직포 시트가 일정량의 폴리나이팜을 포함함을 알 수 있다.
- [0056] 실시예 2
- [0057] 상기 실시예 1에서 제조된 나노섬유 부직포 시트의 일 면을 하이드로젤 용액으로 패턴링하여 마이크로미터(μm) 크기의 웰(well)을 형성함으로써, 3차원 세포 배양을 위한 스캐폴드를 제조하였다.
- [0058] 상기 나노섬유 부직포 시트의 일 면에 하이드로젤 용액을 적가하고(dropping), 200 μm 크기의 포토마스크를 덮은 다음 UV를 조사하여 하이드로젤의 가교를 진행하였다. 이 때, 상기 하이드로젤의 전구체로는 중량평균분자량 575g/mol의 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트(PEG-DA)와 증류수를 약 1 : 1의 중량비로 혼합한 후 가교제인 2-하이드록시-2-메틸프로피오펜(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP)을 2중량%의 농도로 첨가한 용액을 사용하였다.
- [0059] 도 6은 상기 실시예 2를 통해 제조된 3차원 세포 배양을 위한 스캐폴드의 SEM 이미지이다. 도 6을 참고하면,

상기 스캐폴드에서 웰의 크기는 가로 및 세로가 각각 약 $200\mu\text{m}$ 이고, 깊이는 약 $150\sim 300\mu\text{m}$ 이며, 각각의 웰을 구분하는 격자의 폭 또는 두께, 즉, 인접한 웰 사이의 간격은 약 $100\sim 300\mu\text{m}$ 이다.

[0060] 실험예 2

[0061] 상기 실시예 2에서 제조된 스캐폴드를 증류수로 10분 간 세척한 다음 2시간 동안 UV를 조사하여 소독하였다. 소독 후 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 10분 간 세척한 다음 침샘 줄기세포(salivary gland stem cell)를 $15,500\text{cells}/\text{cm}^2$ 의 밀도로 도포하였다. 약 2시간 후 세포 배양액을 상기 스캐폴드가 잠길 정도로 충분히 주입하였다. 이후 1일, 3일, 5일 및 7일 경과 후 세포 독성 실험(MTT assay)을 통해 세포의 증식율을 확인함으로써 세포 독성을 확인하였다. 상기 스캐폴드가 침지된 세포 배양액에 10중량% 농도의 MTT((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)) 용액을 첨가한 후 1시간 후에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 포르마잔염(formazan salt)을 용해시켜 540nm 에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7을 참고하면, 상기 스캐폴드에 세포 배양액을 주입한 후 시간이 경과할수록 세포가 원활하게 증식하였다.

[0062] 실험예 3

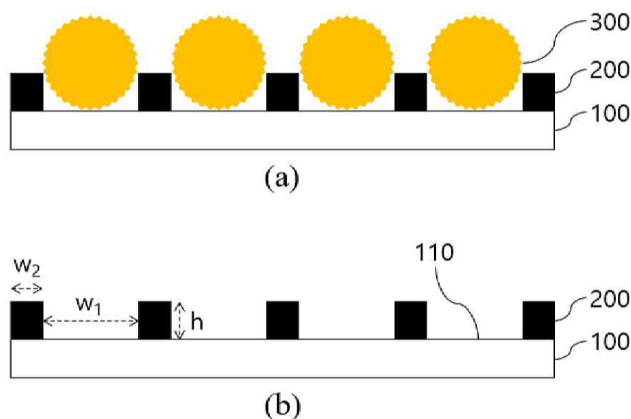
[0063] 상기 실험예 2에서와 같이 상기 스캐폴드의 웰에 세포를 부착한 후 7일 간 배양함으로써 약 $200\mu\text{m}$ 크기의 스페로이드를 형성하였다. 이후, 상기 스캐폴드의 온도를 낮추기 위해 4°C 의 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 상기 스캐폴드를 세척하였다. DPBS에 상기 스캐폴드가 침지된 상태에서 교반 플레이트(stirring plate)에서 30분 간 교반하였고, 그 결과, 도 8을 통해 상기 스캐폴드에서 스페로이드가 분리되었음을 알 수 있다. 또한, 상기 스캐폴드에서 분리된 스페로이드의 생존 여부를 확인하기 위해 칼세인-AM(calcein-AM)으로 스페로이드를 염색하여 확인하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0064] 전술한 본 발명의 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 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

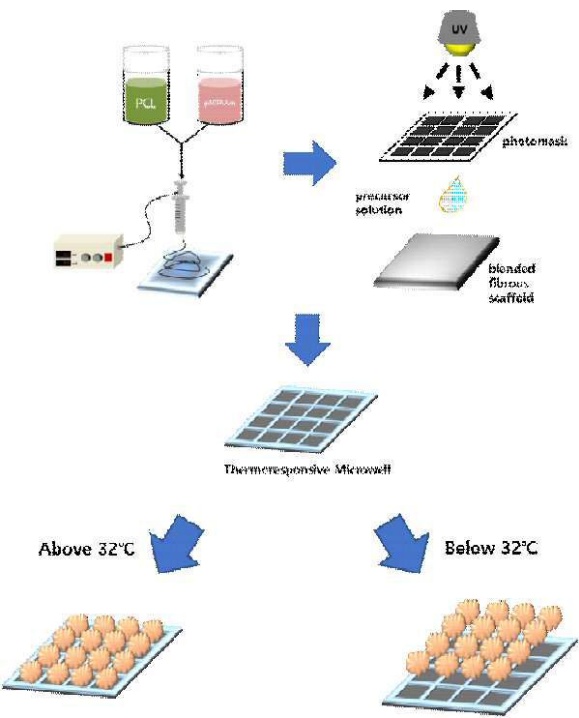
[0065] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

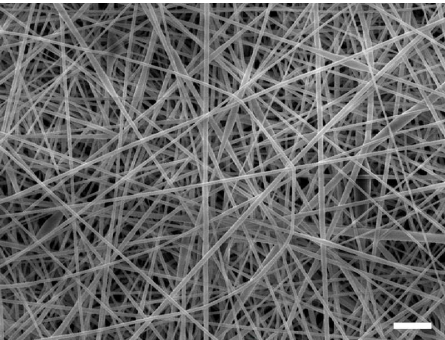
도면1



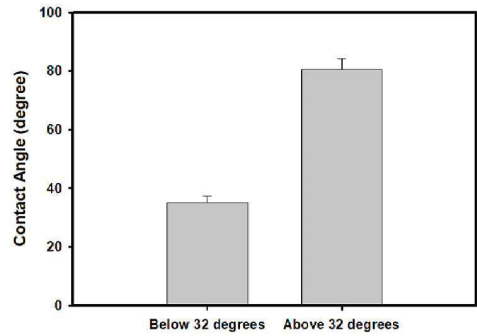
도면2



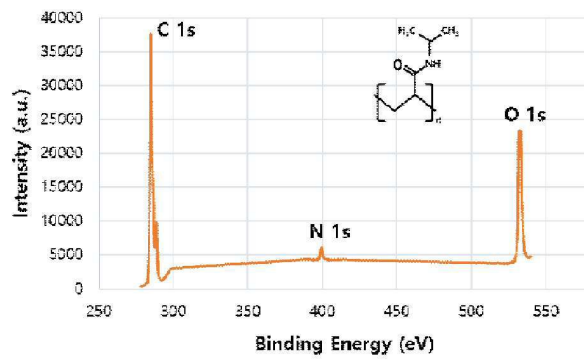
도면3



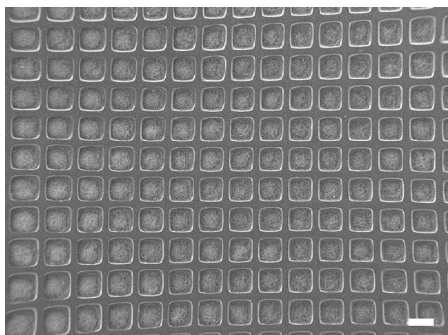
도면4



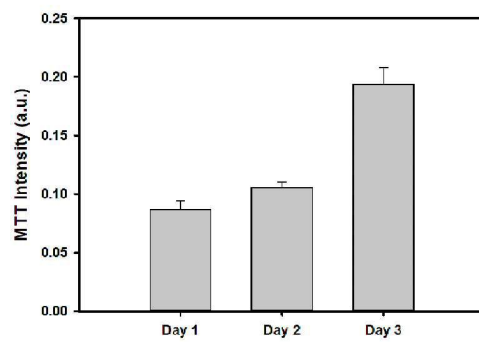
도면5



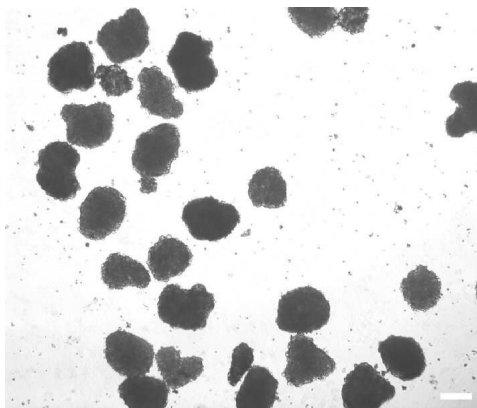
도면6



도면7



도면8



도면9

