

명세서

발명의 명칭: 하이드로젤을 사용하지 않는 유도만능줄기세포 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 하이드로젤을 사용하지 않는 유도만능줄기세포 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 3차원 세포배양 플레이트를 이용하여 하이드로젤을 이용하지 않아도 체세포로부터 유도만능줄기세포를 제조하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 분화가 끝난 체세포를 미분화 상태의 세포(예, 줄기세포)로 되돌리는 과정을 리프로그래밍(reprogramming)이라고 한다. 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)는 역분화 줄기세포, 역분화 만능줄기세포 등으로도 불리는데, 리프로그래밍 인자(Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc 등)를 이용하여 체세포를 줄기세포로 바꾸는 것이다(비특허문헌 1 및 2).
- [3] 유도만능줄기세포는 세포치료제, 생체조직공학, 신약개발, 독성학 그리고, 정밀의료에 이르기까지 그 응용 분야가 다양하다. 이러한 어플리케이션을 위해서는 많은 양의 고효율, 고품질의 유도만능줄기세포 및 배아줄기세포의 배양이 필요하며 균일한 사이즈의 동일한 효율의 줄기세포가 필요하지만, 사실상 이러한 대량생산 기술에 대한 연구는 미흡한 상황이다. 또한, 아직까지 만능유도줄기세포를 리프로그래밍 하는 효율 역시 매우 낮은 편이다. 최근 임상 적용을 위한 방법, 즉, 외래의 유전자가 내부로 삽입되지 않는 DNA integration 이 되지 않는 방법에 대해서 많은 연구가 되고 있으며, 이중에서 에피조멀 벡터(episomal vector)와 같은 방법으로 유도만능줄기세포를 생산하고자 하고 있는데, 이러한 일련의 제조 방법은 3차원 배양 방법의 효율 및 체세포의 리프로그래밍 효율 역시 낮다는 문제점이 있다.
- [4] 그리고 유도만능줄기세포 리프로그래밍을 위해, 2차원 세포배양 플레이트 바닥을 하이드로젤로 코팅하여 이용하고 있는데, 콜로니가 잘 만들어지지 않고, 세포의 리프로그래밍 이후에 콜로니가 생겨도 이를 분리하기 쉽지 않아 사실상 연구 목적뿐만 아니라, 사업화의 걸림돌로 작용하고 있다. 또한, 기존 방법의 경우 다수의 클론을 만드는 것이 거의 불가능하여, 기존 방법으로는 유도만능줄기세포로 리프로그래밍된 상태의 클론을 안정적으로 확보하기 어렵다. 또한 유도만능줄기세포를 손쉽게 스크리닝할 수 있는 플랫폼도 필요한 실정이다.
- [5] 한편, 대한민국 등록특허 제10-1756901호(특허문헌 1)에는 3차원의 조직세포를 배양 가능한 세포배양 칩에 대해서 개시되어 있다. 상기 특허문헌 1의 세포배양 칩은 제1 배양부, 제2 배양부 및 제3 배양부를 각각 층별로 형성하고, 각 층별로

세포의 성장 진행 정도를 확인할 수 있다. 그러나, 특허문헌 1의 세포배양칩은 스페로이드 및/또는 오가노이드를 고수율로 수득할 수 없는 문제점이 있다.

- [6] 또한 세포 배양시 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 하는 경우가 있는데, 3차원 세포배양이 가능한 corning spheroid microplate의 경우, 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 빨리 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있다.
- [7] 매트릭젤(Matrigel, BD Bioscience사의 제품명)은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스의 육종세포에서 추출된 단백질 복합체로서, 라미닌(laminin), 콜라겐(collagen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)과 같은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 상피세포 성장인자(epiderma growth factor, EFG), 인슐린 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 형질전환 성장인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF- β), 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)와 같은 성장인자를 함유한다. 매트릭젤을 이루고 있는 복합체는 많은 조직에서 발견되는 복잡한 세포외 환경을 제공함으로써 세포 배양을 위한 기질로서 이용되고 있다.
- [8] 매트릭젤은 마우스 육종(sarcoma)에서 유래된 것이기 때문에 면역원이나 병원균을 옮길 위험이 크다. 또한, 매트릭젤은 세포 성장과 조직 형성을 위해 사용되고 있지만, 그만큼 복잡한 물질이기에 세포 재현성에 큰 문제가 있다는 비판도 있다. 매트릭젤이 단순히 단순히 성장하는 스페로이드에 물리적인 지지를 제공하는 수동적인 3D 스캐폴드로 작용하는지, 아니면 생물학적 필수 요소를 제공하여 스페로이드 형성에 적극적으로 영향을 미치는지의 여부도 불분명하다. 또한 매트릭젤은 그 가격도 매우 비싸다. 따라서, 매트릭젤은 세포 배양 기술분야의 발전에 기여한 물질이지만, 이 매트릭젤 때문에 이 기술분야의 발전이 저해되고 있는 것도 사실이다.
- [9] 이에 본 발명자들은 하이드로젤을 사용하지 않으면서 유도만능줄기세포의 리프로그래밍 효율을 증진시키는 기술에 대해 연구를 계속하여 본 발명을 완성하였다.
- [10] [선행기술문헌]
- [11] [특허문헌]
- [12] 1. 대한민국 등록특허 제10-1756901호
- [13] [비특허문헌]
- [14] 1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126:663-676.
- [15] 2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131:861-872.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 본 발명의 목적은 유도만능줄기세포 제조방법을 제공하기 위한 것이다.
- [17] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [18] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다음을 포함하는 유도만능줄기세포 제조방법을 제공한다:
- [19] 체세포를 배양하는 단계; 및
- [20] 상기 배양된 체세포를 하이드로젤이 포함되지 않은 3차원 세포배양플레이트에서 유도만능줄기세포로 리프로그래밍시키는 단계;
- [21] 를 포함하는 유도만능줄기세포 제조방법으로,
- [22] 상기 3차원 세포배양 플레이트는,
- [23] 복수개의 메인 웰(main well)과, 메인 웰의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well)을 포함하는 웰 플레이트(well plate); 및 웰 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,
- [24] 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단이 구비된 베이스와 웰 플레이트의 상부에 위치하여, 베이스와 결합되는 커버를 포함하고, 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(θ)을 갖는 세포배양 플레이트.
- [25] 상기 체세포는 섬유아세포일 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니며, 이 기술분야에 공지된 체세포라면 어느 것이나 사용가능하다.
- [26] 상기 체세포는 일반적인 2차원 웰 플레이트, 3차원 세포배양 플레이트 또는 본 발명에 따른 3차원 플레이트에서 배양할 수 있다.
- [27] 상기 하이드로젤은 세포외기질(extracellular matrix) 기반 하이드로젤일 수 있다.
- [28] 상기 세포외 기질 기반 하이드로젤은 매트리지(Matrigel, 제품명)일 수 있다.
- [29] 상기 리프로그래밍 단계 이후에, 상기 리프로그래밍된 유도만능줄기세포의 스페로이드(spheroid)를 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [30] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 서브 웰은 오목부를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성되고, 상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 mm 범위이고, 상기 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 mm 범위이며, 상기 서브 웰과 오목부의 경사면(θ_2)은 40 내지 50° 범위이고, 상기 서브 웰의 직경과 오목부의 직경에 대한 길이 비가 1:0.1 내지 0.5 범위일 수 있다.

- [31] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 상기 메인 웰의 개별 부피는 100 내지 300 μl 범위이며, 상기 오목부의 개별 부피는 20 내지 50 μl 범위이고, 상기 메인 웰과 오목부의 개별 부피비는 평균 1 : 0.1 내지 0.5일 수 있다.
- [32] 상기 메인 웰은, 단턱과 서브 웰 사이에 공간부를 포함하고, 상기 공간부의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 mm 범위이며, 상기 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 mm 범위이고, 상기 공간부와 서브 웰의 높이비(a_h:b_h)는 1:0.3 내지 1 범위일 수 있다.
- [33] 상기 체세포는 상기 세포배양 플레이트의 서브웰에 100 내지 1000 cells/well로 시딩될 수 있다.
- [34] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [35] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [36] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [37] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [38] 본 발명에서, “포함한다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [39] 일반적으로 세포, 스페로이드, 오가노이드 등을 배양할 때 세포외 기질의 역할을 제공하기 위해 하이드로젤을 사용한다. 유도만능줄기세포의 경우 2차원 플레이트에서 진행하는 방법이 일반적이며, 세포를 리프로그래밍하기 위해서는 세포외 기질 기반 하이드로젤(예, 매트릭젤)을 세포배양 플레이트에 코팅하여 사용한다.
- [40] 그러나 본 발명은 하이드로젤을 포함하지 않는 3차원 세포배양 플레이트를 이용하여 유도만능줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트에 대한 구체적인 설명은 다음과 같다.
- [41] 본 발명은 일 실시예에서 다음을 포함하는 3차원 세포배양 플레이트를 이용한다:
- [42] 복수개의 메인 웰(main well)과, 메인 웰의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well)을 포함하는 웰 플레이트(well plate); 및

- [43] 웰 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,
- [44] 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단이 구비된 베이스와 웰 플레이트의 상부에 위치하여, 베이스와 결합되는 커버를 포함하며,
- [45] 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(θ)을 갖는 세포배양 플레이트.
- [46] 종래의 96 웰 플레이트의 경우, 고수율의 약물 효능 평가를 위해서는 실험 및 분석을 수차례 이상 진행하여야 하므로, 시간 및 비용이 많이 소요되는 문제가 있었다. 아울러, 세포 배양시 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 수행하는 경우가 종종 있는데, 종래의 *corning spheroid microplate*의 경우에는 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있었다.
- [47] 따라서, 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 웰 플레이트 내에 형성된 복수개의 메인 웰 내에 복수개의 서브 웰을 포함시켜 고수율의 스페로이드/오가노이드 제작이 가능할 수 있으며, 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터를 포함시켜, 대용량의 고속이미지 촬영시 공차를 줄여 웰 플레이트 내의 이미지를 균일하게 촬영할 수 있는 세포배양 플레이트를 제공한다. 나아가, 메인 웰의 단턱에 의하여, 배양되는 세포는 미디어 교체시 피펫팅 작업에 의한 영향을 최소화할 수 있는 세포배양 플레이트를 제공한다.
- [48] 이하, 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하도록 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [49] 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [50] 도 1(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 정면도이며, 도 1(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 단면도이며, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).

- [51] 이하, 도 1 내지 도 3을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트를 상세히 설명한다.
- [52] 도 1 내지 3 도시된 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트(10)는 복수개의 메인 웰(main well, 110)과, 메인 웰(110)의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부(121)를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well, 120)을 포함하는 웰 플레이트(well plate, 100); 및 웰 플레이트(100)를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)를 포함하여 구성된다.
- [53] 먼저, 도 1과 도 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 웰 플레이트(100)를 상세히 설명하도록 한다.
- [54] 상기 웰 플레이트(100)는 몰드를 통해 플라스틱 사출 성형된 플레이트 형상으로 만들어 진다. 이와 같이 플라스틱 사출을 위한 몰드 제작을 위해 미세기계가공을 사용하여 생산단가를 낮추고, 쉽게 크기를 확대할 수 있도록 메인 웰(110)은 웰(well) 구조물로서 반복적인 패턴을 갖는다. 따라서, 세포의 대량 생산이 용이하며, 사용자의 요구에 맞추어 다양한 크기로 변형하여 사용이 가능하다.
- [55] 상기 메인 웰(110)은 웰 플레이트(100)에 복수개 형성되며, 각각의 메인 웰(110)은 단턱(101)을 포함한다. 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 소정부위에 형성되는 것으로, 보다 상세하게는 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 전체 길이의 1/3 내지 1/2 위치에 형성될 수 있으며, 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 하단으로부터 1/3 내지 1/2 위치에 형성될 수 있다.
- [56] 종래에 마이크로 플레이트에서 세포 배양시에는 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 하는 경우가 있는데, 이러한 경우, 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있었으나, 상기 단턱(101)은 이러한 문제를 방지하기 위함이다.
- [57] 상기 단턱(101)은 피펫이 적용되는 공간일 수 있으며, 구체적으로, 메인 웰(110)의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(θ)을 가질 수 있다. 또는, 20 내지 50° 범위의 경사각을 가질 수 있으며, 바람직하게는 30 내지 45° 범위의 경사각을 가질 수 있다. 만일, 상기 단턱(101)의 경사각이 10° 미만인 경우에는 메인 웰(110) 내에 경사각이 너무 작아 피펫을 적용할 수 있는 공간이 충분하지 않아, 메인 웰(110) 내의 배양액을 흡입할 때, 피펫이 서브 웰(120) 안쪽으로 미끄러져 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생할 수 있다. 아울러, 상기 경사각(θ)이 60°를 초과하는 경우에는 피펫을 적용할 수 있는 공간은 마련되나, 단턱(101)의 경사각이 너무 커서 배양액을 충분히 흡입하기 어려울 수 있으며, 서브 웰(120)에 세포를 시딩할 때, 세포가 모든 서브 웰(120)에 들어가지 않고, 단턱(101)에 시딩되는 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 상술한 범위의 경사각을 갖는 것이 바람직하다.

- [58] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 메인 웰(110)은 단턱(101)과 후술하게 되는 서브 웰(120) 사이에 공간부(130)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 공간부(130)는 배양액이 주입되는 공간으로, 서브 웰(120) 내부의 세포들이 동일한 배양액을 공유할 수 있는 공간이다.
- [59] 보다 구체적으로, 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 mm 범위일 수 있으며, 또는 2.2 내지 2.8 mm 범위일 수 있으며, 또는 평균 2.3 내지 2.7 mm 범위일 수 있다. 아울러, 서브 웰(120)의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 mm 범위일 수 있으며, 또는 평균 1.2 내지 1.8 mm 범위일 수 있다.
- [60] 예를 들면, 상기 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.5 mm 이며, 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.5 mm 일 수 있다.
- [61] 이때, 상기 공간부와 서브 웰(120)의 높이비($a_h:b_h$)는 1:0.3 내지 1 범위일 수 있으며, 보다 상세하게 공간부와 서브 웰(120)의 높이비($a_h:b_h$)는 1:0.4 내지 0.9 또는 1:0.5 내지 0.8 일 수 있다. 만일, 서브 웰(120)의 높이가 공간부의 높이 대비 1:0.3 미만일 경우에는 서브 웰(120)의 미디어를 교환 시, 조금의 힘으로도 내부에서 배양 중인 세포들이 튀어나올 수 있으며, 서브 웰(120)의 높이가 공간부의 높이 대비 1:1을 초과하는 경우에는 세포에 필요한 배양액이 충분하게 변환되지 않아, 세포의 죽음을 유발할 수 있다. 따라서, 공간부(130)와 서브 웰(120)은 상술한 높이 범위와 높이비율을 갖는 것이 바람직하다.
- [62] 다음으로, 서브 웰(120)은 메인 웰(110)의 각각 하부에 형성되는 것으로, 바닥면에 오목부(121)를 포함한다. 특정 양태로서, 상기 서브 웰(120)은 메인 웰(110)의 하부에 복수개를 포함할 수 있다.
- [63] 메인 웰(110)의 하부에 포함되는 서브 웰(120)은 각각의 크기와 모양이 동일하고, 이에 따라 균일한 조건의 스페로이드 및 오가노이드를 생성할 수 있다.
- [64] 상기 서브 웰(120)은 오목부(121)를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성될 수 있다. 구체적으로, 상기 서브 웰(120)의 상단부는 수직 방향을 기준으로 하강할수록 수평 넓이가 줄어들 수 있다. 예를 들면, 상기 서브 웰(120)의 상단부는 역피라미드 형상으로 이루어질 수 있다. 도시된 실시예에서는 서브 웰(120)의 상단부가 피라미드 형상이나, 깔대기 형상과 같이, 수직 방향으로 하강할수록 수평의 넓이가 줄어드는 형상으로 구성될 수 있다.
- [65] 특히, 상기 서브 웰(120)은 크기와 모양이 동일하도록 복수개를 포함함으로써, 상기 세포배양 플레이트는 균일한 조건에서 대량의 스페로이드 또는 오가노이드를 생성할 수 있다.
- [66] 특정 양태로서, 하나의 메인 웰(110)에는 동일한 크기의 서브 웰(120)을 4 내지 25개 포함할 수 있으며, 전체 마이크로 플레이트(100)에는 96 내지 1,728 개의 서브 웰(120)을 포함할 수 있다. 이에 따라, 동일하고, 정밀하게 사이즈 컨트롤이 가능하다.
- [67] 아울러, 서브 웰(120)은 오목부(121)를 포함하며, 상기 오목부의 하단에는 상기

- 오목부(121)는 3D 스페로이드 또는 오가노이드가 배양될 수 있도록 공간이 형성된다. 구체적으로, 상기 오목부(121)는 'U'자 형태, 'V'자 형태 또는 'U'자 형태일 수 있으며, 예를 들면, 상기 오목부(121)는 'U'자 형태일 수 있다.
- [68] 상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 mm 범위일 수 있으며, 또는 3.5 내지 4.3 mm 일 수 있으며, 또는 평균 4 mm 일 수 있다. 아울러, 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 mm 일 수 있으며, 또는 0.5 내지 1.0 mm 또는 평균 0.5 mm 일 수 있다.
- [69] 아울러, 상기 서브 웰(120)의 직경과 오목부(121)의 직경에 대한 길이 비가 1:0.1 내지 0.5 범위일 수 있으며, 바람직하게는 상기 서브 웰(120)의 직경과 오목부(121)의 직경에 대한 길이 비는 1:0.12 일 수 있다.
- [70] 상기 오목부(121)의 상단 직경이 서브 웰(120)의 상단 직경(1) 대비 0.1 미만인 경우에 오목부(121)의 세포 배양 공간을 충분히 마련하지 못해 배양액 교체시에, 작은 힘으로도 세포들이 빠져 나오는 문제가 발생할 수 있으며, 오목부(121)의 상단 직경이 서브 웰(120)의 상단 직경(1) 대비 0.5을 초과하는 경우, 세포에게 필요한 충분한 배양액을 교체하지 못하여 안정적으로 배양하기 어려운 문제가 발생할 수 있다.
- [71] 한편, 메인 웰의 벽을 기준으로 서브 웰(120)과 오목부(121)의 경사면은 40 내지 50°의 경사각(θ_2)을 가질 수 있으며, 42 내지 48° 범위의 경사각(θ_2), 43 내지 47° 범위의 경사각(θ_2), 또는 평균 45°의 경사각(θ_2)을 가질 수 있다.
- [72] 상술한 서브 웰(120)은 100 내지 1000 cells/well 이하의 세포배양이 가능하며, 안정적으로 스페로이드 크기를 제어할 수 있는 이점이 있다.
- [73] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 메인 웰(110)의 개별 부피는 100 내지 300 μl 범위이며, 오목부(121)의 개별 부피는 20 내지 50 μl 범위이고, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)의 개별 부피비는 평균 1:0.07 내지 0.5 인 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 상기 일 실시예에 따른 메인 웰(110)의 개별 부피는 250 내지 300 μl 범위이며, 상기 오목부의 개별 부피는 25 내지 35 μl 범위일 수 있으며, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)의 개별 부피비는 평균 1:0.11 일 수 있다.
- [74] 구체적으로, 메인 웰(110)의 개별 부피가 100 μl 미만인 경우, 세포 배양시 충분한 배양액을 수용할 수 없는 문제가 발생할 수 있으며, 300 μl 를 초과하는 경우에는 배양 효율이 떨어질 수 있다.
- [75] 아울러, 오목부(121)는 실질적인 세포가 배양되는 공간으로, 그 부피가 20 μl 미만인 경우에는 세포 배양 공간이 충분하지 않아 세포들이 빠져 나오는 문제가 발생할 수 있으며, 50 μl 를 초과하는 경우 세포 등을 안정적으로 배양하기 어려운 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)는 상술한 범위의 부피를 갖는 것이 바람직하다.
- [76] 상기 언급한 본 발명의 세포배양 플레이트의 구성으로 인해, 하이드로젤을 포함하지 않아도, 즉 하이드로젤을 세포배양 플레이트에 코팅하지 않아도 세포가 스페로이드 형태로 유지되며, 유도만능줄기세포로의 리프로그래밍이

고효율로 일어나고 리프로그래밍 이후에 지속적으로 그 형태와 기능이 유지된다.

- [77] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트(10)는 웰 플레이트(100)를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)를 포함한다. 여기서, 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)라 함은 HCS(High contents screening) 시스템에 안착되는 커넥터(200)를 의미하는 것으로, 구체적으로, 상기 커넥터(200)는 본 발명에서는 베이스(210)와 커버(220)를 의미할 수 있다.
- [78] 보다 구체적으로, 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트(100)의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단(140, 240)이 구비된 베이스(210)와 웰 플레이트(100)의 상부에 위치하여, 베이스(210)와 결합되는 커버(220)를 포함한다. 그리고, 상기 베이스(210)의 상단 및 웰 플레이트(100)의 하단은 서로 착탈 가능하도록 고정 가능한 고정수단(140, 240)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [79] 이때, 상기 베이스는, 웰 플레이트(100)를 지지하기 위한 철부(240)를 포함하며, 상기 웰 플레이트(100)는 베이스(210)의 철부(240)에 대향되는 요부(140)를 포함할 수 있다. 상기 고정수단에 의해서 웰 플레이트(100)가 고정되어 스크리닝시 이미지가 균일하게 촬영될 수 있다.
- [80] 상기 베이스는, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리아미드, 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 폴리염화비닐리덴, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리에테르에테르케톤 또는 폴리에테르이미드 소재로 이루어질 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.
- [81] 상기 웰 플레이트는, 폴리디메틸실리콘, 고지방 변성 실리콘, 메틸클로로페닐 실리콘, 알킬변성실리콘, 메틸페닐실리콘, 실리콘폴리에스터, 또는 아미노변성실리콘 소재로 이루어질 수 있으나 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.
- [82] 한편, 본 발명의 세포배양 플레이트(100)에서 유도만능줄기세포를 형성할 때 매트리젤을 사용할 필요가 없다.
- [83] 도 4는, 매트리젤을 사용하는 2차원 세포배양 플레이트 및 본 발명에 따라 매트리젤이 필요 없는 3차원 세포배양 플레이트를 이용한 유도만능줄기세포 제조방법을 비교하여 나타낸 것이다. 체세포(섬유아세포)를 배양한 다음, 에피조멸 백터를 전기천공법으로 섬유아세포에 트랜스펙션시켜서 리프로그래밍을 유도하여 유도만능줄기세포를 제조한다. 2차원 매트리젤 배양의 경우, 유도만능줄기세포 콜로니를 뜯어내는 과정이 번거롭고, 수율이 낮다. 그러나 본 발명의 3차원 배양 플레이트를 이용하면 매트리젤이 없으므로, 유도만능줄기세포로 리프로그래밍된 다수의 단일세포들이 모여서 3차원 구 형태의 세포집합체인 스페로이드(spheroid)를 형성한다. 이 스페로이드는 3차원

세포배양 플레이트에 쉽게 분리할 수 있고 계대배양이 가능하다(도 7d). 즉, 리프로그래밍 효율이 매우 높다.

- [84] 또한, 앞서 설명한 것과 같이, 본 발명에서 이용하는 3차원 세포배양 플레이트는 하나의 메인 웰(110)에 동일한 크기의 서브 웰(120)을 4 내지 25개 포함할 수 있으며, 전체 마이크로 플레이트(100)에는 96 내지 1,728 개의 서브 웰(120)을 포함할 수 있다. 이에 따라, 동일하고, 정밀하게 사이즈 컨트롤이 가능한 유도만능줄기세포 및 그 스펜로이드를 대량 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [85] 본 발명의 제조방법을 따르면, 하이드로젤이 필요하지 않고 리프로그래밍 효율이 증진된 유도만능줄기세포를 대량 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [86] 도 1(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 정면도이며, 도 1(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 단면도이다.
- [87] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이다.
- [88] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).
- [89] 도 4(a)는 본 발명의 일 실시예와 비교예에 따른 유도만능줄기세포 제조 과정을 모식적으로 나타낸 것이고, (b)는 본 발명의 일 실시예와 비교예에 따른 유도만능줄기세포 발생을 보여주는 이미지이다(도4 이하의 도면 모두에서, 설명의 편의를 위해, 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트를 정확하게 표시하지 않고 편의상 U자형으로 표시하였다.)
- [90] 도 5는 본 발명의 일 실시예 (3D iPSC)와 비교예(2D iPSC) 이미지이다.
- [91] 도 6은 본 발명의 일 실시예 (3D sph-iPSC)와 비교예(2D Matrigel)의 AP(Alkaline Phosphatase)염색 이미지이다.
- [92] 도 7(a)는 시간 경과에 따른 AP 이미지(D4, D9, D15, D21)이고, (b)는 콜로니 개수를 비교한 것이고, (c)는 E-cadherin 발현 결과이고, (d)는 iPSCs의 스펜로이드 형성 과정을 나타낸 것이다.
- [93] 도 8(a)는 종래의 3차원 배양과 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 결과 스펜로이드(콜로니) 크기 분포를 보여주는 결과이고, (b)는 리프로그래밍인자(전분화능마커) 발현 결과이다.
- [94] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 iPSCs의 전분화능 마커 발현 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [95] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며,

본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

- [96] **[실시예]**
- [97] **실시예 1. 실험 방법**
- [98] **1-1: 섬유아세포 배양 및 유도만능줄기세포 제조**
- [99] 인간 섬유아세포주인 F134(the german federal authorities / RKI: AZ 1710-79-1-4-41 E01)를 10% FBS (fetal bovine serum, Invitrogen, 미국) 및 1 mM L-글루타민 (Invitrogen, 미국)을 포함하는 DMEM에서 35 mm 또는 100 mm 일반 디쉬에 배양하였다. 배양된 섬유아세포에 Episomal iPSC 리프로그래밍 벡터(EP5TM kit: Cat. No. A16960. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 전기천공법(electroporation)으로 트랜스펙션시켜서(NeonTM transfection system) 리프로그래밍하였다. 전기 천공법은 1,650 V, 10 ms, 3 pulses 조건에서 수행하였다.
- [100] 도 4a에 나타난 바와 같이, 트랜스펙션된 섬유아세포를 본 발명의 3차원 세포배양플레이트(매트리젤 없음, 실시예)와 2차원의 12-웰 플레이트(매트리젤 코팅, 비교예 1) 및 상용화 제품인 Addgene(비교예 2, 매트리젤 코팅, 도 4a에 미도시)에 접종하고 N2B27 배지(bFGF 포함)에서 배양하였다. 15일 동안 배양한 다음 Essential 8TM 배지로 교체하였다. 15일 이후에 실시예(3차원 세포배양 플레이트)의 3D iPSC를 2차원 플레이트인 12-웰 플레이트에 플레이팅하여, 실시예와 비교예의 콜로니 수를 확인하였다.
- [101] **1-2: 섬유아세포의 리프로그래밍 효율 분석**
- [102] Alkaline Phosphatase Staining kit 매뉴얼에 따라 (System Biosciences, USA), 리프로그래밍된 세포를 PBS로 2회 세척하고, 4% paraformaldehyde로 고정된 후, Blue-color AP 용액으로 염색하고 PBS로 2회 세척한 후 콜로니 염색 여부를 광학현미경 아래서 관찰하였다. 염색된 콜로니 개수를 세어 정량화하였다.
- [103] 실시예와 비교예에서 배양한 세포를 촬영하였으며, 세포구의 크기를 비교하였다. 스페로이드를 자동화 플레이트 기기에서 이미징을 진행하며, 이때 자동으로 기기가 초점을 잡아 진행하도록 하였다. 이미지의 크기 분석은 imageJ라는 프로그램의 매크로 프로그램을 이용하여 진행하였다(도 5, 6 및 7 관련).
- [104] **1-3: 만능유도줄기세포의 3차원 배양 방법의 최적화**
- [105] 실시예와 비교예에서 배양한 3차원 만능유도줄기세포를 촬영하였으며, 이에 따라 세포구의 사이즈를 각각 비교하여 측정하였다(도 8(a)). 이미지에 대한 결과에 대한 테스트를 위해 외부 검사업체(세포 바이오 CEFO, 한국)에 의뢰하였으며, 이 테스트는 블라인드 테스트로 진행되었다.
- [106] **1-4: 면역염색**
- [107] 리프로그래밍된 세포들을 4% paraformaldehyde로 상온에서 20 min 동안

고정하였다. 고정된 세포를 1% BSA 및 0.5% Triton X-100인 함유된 PBS로 상온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 일차 항체들 Oct4 (1:100, SantaCruz, CA, USA), Sox2 (1:100, Cell Signalling, Danvers, MA, USA), Nanog (1:200, Cosmo Bio, Koto-Ku, Japan), E-cadherin(1:200, abcam) 처리하고, FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG (1:100, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이차항체로 반응하였다. 형광이미지는 형광현미경 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. DAPI를 핵 염색 용액으로 사용하였다.

[108] **1-5: qPCR**

[109] 섬유아세포와 리프로그래밍 세포에서 RNA minikit (Qiagen, Inc.)를 이용해 total RNA를 추출한 다음 Accupower RT mix reagent (Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 사용해 cDNA로 만들었다. 실시간 PCR (Real-time PCR) FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 수행하였다. 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 표 1과 같다.

[110] [표1]

유전자	프라이머 서열 (5'-3')	
hCOL1A1	forward	ATGACTATGAGTATGGGGAAGCA
	reverse	TGGGTCCCTCTGTTACACTTT
hOCT4	forward	AATTTGTTCCCTGCAGTGCCC
	reverse	AGACCCAGCAGCCTCAAAAT
hNANOG	forward	GGATCCAGCTTGTCCCCAAA
	reverse	TGCGACACTCTTCTCTGCAG
hSOX2	forward	CGGAAAACCAAGACGCTCAT
	reverse	GTTTCATGTGCGCGTAACTGT
hLIN28	forward	TTCGGCTTCCTGTCCATGAC
	reverse	CCGCCTCTCACTCCCAATAC

[111] 실시예 2. 리프로그래밍 효율 확인

[112] 도 4b를 보면, 2차원 배양의 경우, D15가 되어서야 콜로니가 조금 형성되기 시작함을 알 수 있다. D15까지 iPSC 리프로그래밍 유도 후 3D iPSC를 2차원 플레이트에 플레이팅하여 비교예 1과 실시예 1의 콜로니 수를 비교하였더니, 형성되는 콜로니 수 차이가 컸다. iPSC로 잘 분화된 세포가 콜로니를 이루기 때문에 실시예의 iPSC 리프로그래밍 수율이 높음을 알 수 있다. 도 5 및 도 7b를 보면, 2차원 배양(비교예 1)과 3차원 배양시(실시예), 콜로니의 개수 차이가 매우 큼을 알 수 있다. 도 6을 보면, AP (Alkaline phosphatase) 염색 결과 3D iPSC 스페로이드(실시예, 3D sph-iPCSs)에서 리프로그래밍 효율이 매우 높음을 알 수 있다. 또한, 도 6 및 도 7a를 보면, 2D Matrigel(비교예 1)과 3D iPSC

스페로이드(실시예, 3D sph-iPCSs)를 비교하였을 때, 이미지가 균일하고 선명하게 나오는데, 이는 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트가 대량 이미지 분석이 가능함을 보여주는 것이다.

- [113] 도 7c를 보면, 3차원 세포배양 플레이트에서 리프로그래밍 효율이 매우 좋음을 알 수 있다. 또한 7d를 보면, 본 발명은 매트릭셀을 사용하지 않으므로, iPCSs로 리프로그래밍된 다수의 단일세포들이 모여서 3차원 구 형태의 세포집합체인 스페로이드(spheroid)를 형성하고, 이 스페로이드를 3차원 세포배양 플레이트에서 쉽게 분리하여 재플레이팅할 수 있음을 알 수 있다. 즉, 리프로그래밍 효율이 매우 높다.
- [114] 도 8은 비교예 2의 종래의 3차원 배양과 본 발명 실시예의 3차원 배양(도 8 b의 SpheroidFilm)을 비교한 것이다. 종래의 3차원 배양은 사이즈가 균일하지 않고 oct4 발현량이 상대적으로 낮다. 그러나 본 발명은 사이즈가 매우 균일하고(99.45%) 리프로그래밍 인자 발현율이 매우 높다. 즉, 종래의 3차원 배양과 비교하였을 때에도 본 발명은 줄기세포 배양에 있어서 효과적이며 체세포를 유도만능줄기세포로 리프로그래밍 할 수 있는 효율을 높게 만들어 줄 수 있다. 또한 사이즈가 균일하다는 것은 표준화된 유도만능줄기세포 및 줄기세포를 스페로이드 형태로 3차원 대량으로 제조할 수 있음을 의미한다.
- [115] 실시예 3. 유도만능줄기세포 특성 분석
- [116] 도 9를 보면, 본 발명에 따라 제조된 iPSCs는 전분화능 마커의 발현이 매우 높은 것을 알 수 있다.
- [117] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 이 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [118] [부호의 설명]
- [119] 100: 웰 플레이트
- [120] 101: 단턱
- [121] 110: 메인 웰
- [122] 120: 서브 웰
- [123] 121: 오목부
- [124] 130: 공간부
- [125] 140: 요부
- [126] 200: 대용량의 고속 HCS용 커넥터
- [127] 210: 베이스
- [128] 220: 커버
- [129] 240: 철부