

명세서

발명의 명칭: 세포 배양용 영양물질을 포함하는 다층필름, 이의 제조방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 세포 배양용 영양물질을 포함하는 다층필름, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 배양육은 가축의 도축없이 세포의 대량 배양을 통해 제조되는 인공육으로서 가축의 사육과 도축 과정 및 항생제 사용이 요구되는 실제 육과 달리 윤리적이고 친환경적인 공정으로 생산된다. 배양육의 제조 공정은 다음과 같은 과정을 거친다. 먼저, 가축에서 근육위성세포를 추출하고 이를 분리한 후에, 분리한 세포를 생물반응기(Bioreactor)내의 아미노산, 비타민, 당, 무기 염과 미네랄 및 다양한 성장인자를 포함하는 배양액에서 대량 증식시킨다. 제조된 세포는 특정 지지체에 옮겨지거나 세포 간의 자기조립을 통해 분화 배양액 내에서 근조직으로 분화된다.
- [3] 전세계의 많은 기업들이 배양육 사업에 도전하고 있음에도 불구하고 복잡한 생산공정과 높은 생산비용으로 인해 제품화 및 상용화가 어려운 실정이다. 가축으로부터 추출된 근육세포의 대량 증식 과정에 사용되는 배양액의 비용은 배양육 총 생산비의 70% 이상을 차지하므로 이를 절감시키기 위한 연구는 필수불가결한 요소이다. 종래에 세포 증식에 사용되는 배양은 세포 성장에 필수적인 다양한 성장인자, 사이토카인 및 단백질 등이 함유된 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함한다. 그러나, 동물 유래 성분을 사용한다는 점은 배양육 본래의 취지에 적합하지 않으므로 현재 FBS를 대체하거나 절감시킬 수 있는 기술 개발이 요구되고 있다.
- [4] [선행기술문헌]
- [5] Molecular Pharmaceutics 2017, 14, 3322-3330.
- [6] 대한민국 공개특허 제10-2014-0100671호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 배양육 제조를 위한 세포배양시 동물유래 혈청을 대체하거나 저감할 수 있는 영양물질 전달 플랫폼을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 고분자 유래 물질로부터 기공을 갖는 다층필름을 제조하고, 제조된 다층필름의 기공에 영양물질을 함입시켜 이를 세포 배양액에 적용하면 영양물질의 방출을 통해 혈청사용 배양액 보다 우수한 세포 증식 효과가 달성될 수 있음을 실험적으로 증명하여 본 출원을 완성하였다.
- [8] 따라서, 본 출원의 목적은 세포배양시 영양물질 전달용 다층필름을 제공하는

것에 있다.

- [9] 또한, 본 출원의 다른 목적은 다층필름을 포함하는 세포배양용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [10] 또한, 본 출원의 다른 목적은 다층필름을 포함하는 세포배양용 장치를 제공하는 것에 있다.
- [11] 또한, 본 출원의 다른 목적은 다층필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 배양육의 제조 방법을 제공하는 것에 있다.
- [12] 또한, 본 출원의 다른 목적은 다층필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공하는 것에 있다.
- [13] 또한, 본 출원의 다른 목적은 세포배양 시 영양물질 전달용 다층필름의 제조방법을 제공하는 것에 있다.

과제 해결 수단

- [14] 상기의 목적을 달성하기 위하여,
- [15] 본 출원의 일 측면은 기관, 기관상에 형성된 다층 구조체를 포함하는 세포 배양용 다층필름을 제공한다.
- [16] 본 출원의 다른 측면은 상기 다층필름을 포함하는 세포배양용 조성물을 제공한다.
- [17] 본 출원의 다른 측면은 상기 다층필름을 포함하는 세포배양용 장치를 제공한다.
- [18] 본 출원의 다른 측면은 다층필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 배양육 제조방법을 제공한다.
- [19] 본 출원의 다른 측면은 다층필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [20] 본 출원의 다른 측면은 세포배양용 다층필름의 제조방법을 제공한다.
- [21]
- [22] 이하, 본 출원을 구체적으로 설명한다.
- [23] 일 측면에 따르면, 본 출원은 (a) 기관; (b) 상기 기관상에 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질 및 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질이 교대로 적층되어 형성되고, 상기 양이온성 물질과 음이온성 물질이 서로 가교되고, 기공을 포함하는 다층 구조체를 포함하는, 세포 배양용 다층필름을 제공한다.
- [24] 기관
- [25] 본 출원에서 사용될 수 있는 기관은 지지성을 갖는 동시에 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질 또는 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질이 결합하여 적층될 수 있다면 제한없이 사용될 수 있다.
- [26] 기관으로 사용될 수 있는 물질은 폴리머, 플라스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등), 금속, 금속산화물, 실리콘, 세라믹, Si/SiO₂

웨이퍼, 유리, 카본, 탄소나노튜브, 또는 생분해성 고분자물질일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[27] 상기 기관은 후술하는 양이온성 물질 또는 음이온성 물질과의 결합을 용이하게 하기 위해 표면처리될 수 있다.

[28] 기관의 형태는 특별히 한정되지 않으나, 본 출원의 다층필름이 세포배양에 적용되는 점을 감안하면 배양기, 배양 접시, 플레이트, 플라스크, 챔버 슬라이드, 튜브, 셀 팩토리, 롤러 보틀, 스피너 플라스크, 중공 섬유(hollow fibers), 마이크로 캐리어, 비즈, 단편 등의 형태일 수 있다.

[29] 다층 구조체

[30] 본 출원에서 다층 구조체는 기관상에 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질과 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질이 교대로 적층되어 형성된다.

[31] 음이온성 물질은 양전하를 띤 기관의 표면에 부착될 수 있고, 양이온성 물질은 음전하를 띤 기관의 표면에 부착할 수 있다. 따라서, 기관이 음전하를 띤 경우 양이온성 물질이 제1층을 형성하고, 기관이 양전하를 띤 경우 음이온성 물질이 제1층을 형성할 수 있다.

[32] 본 출원에서 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질은 기관에 결합하여 제1 층을 형성할 수 있다.

[33] 일 구현예에서, 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질은 용액에 용해된 상태로 상기 기관의 표면과 접촉하여 제1 층을 형성할 수 있다. 상기 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 양이온성 물질의 이온화도, 즉, 양성자화된 정도를 조절할 수 있다. 상기 용액의 pH를 3-5의 범위로 조절하면, 양이온성 물질의 아민기의 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 양성자화될 수 있다. 상기 양성자화된 아민기($-NH_3^+$)는 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질의 탈양성자화된 카르복실기($-COO^-$)와 정전기적 인력에 의해 결합될 수 있다. 상기 양이온성 물질과 음이온성 물질간의 정전기적 인력에 의해 다층 구조체를 형성할 수 있다.

[34] 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질은 키토산(chitosan), 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 피브리노젠(fibrinogen), 실크피브로인(silk fibroin), 카세인(casein), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 폴리도파민(polydopamine), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine), 폴리-L-리신(poly-L-lysine), 폴리(비닐아민) 하이드로클로라이드(poly(vinylamine)hydrochloride), 및 폴리(아미노산)(poly(amino acid))으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[35] 본 출원에서 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질은 키토산일 수 있다.

[36] 본 출원에서 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 상기 제1 층상에 결합하여 제2 층을 형성할 수 있다.

[37] 일 구현예에서, 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 용액에 용해된

상태로 상기 양이온성 물질의 제1 층의 표면과 접촉하여 제2 층을 형성할 수 있다.

- [38] 상기 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 상기 음이온성 물질의 이온화도 즉, 탈양성자화된 정도를 조절할 수 있다. 상기 용액의 pH를 3-5의 범위로 조절하면, 상기 카르복실기 중 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 탈양성자화(-COO-)로 될 수 있다.
- [39] 앞서 설명된 바와 같이, 상기 음이온성 물질의 탈양성자화된 카르복실기(-COO-)는 상기 양이온성 물질의 양성자화된 아민기(-NH₃⁺)와 정전기적 인력에 의해 결합될 수 있고, 이러한 정전기적 인력에 의해 음이온성 물질의 층과 양이온성 물질의 층이 교대로 적층이 가능하다.
- [40] 상기 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 예를 들어 히알루론산(hyaluronic acid), 폴리-L-락틱산(poly-L-lactic acid), 알긴산(alginic acid), 덱스트란황산(dextran sulfate), 리그닌(lignin), 탄닌산(tannic acid), 콘드로이틴황산(chondroitin sulfate), 셀룰로오스(cellulose)류 고분자, 후코이단(fucoidan) 및 헤파린(heparin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 상기 셀룰로오스류 고분자는 카르복시메틸셀룰로오스일 수 있다.
- [41] 본 출원에서 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 카르복시메틸셀룰로오스일 수 있다.
- [42] 본 출원에서 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질이 키토산인 경우, 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 카르복시메틸셀룰로오스일 수 있다.
- [43] 양이온성 물질의 제1층 및 음이온성 물질의 제2층을 적층하는 공정을 한 사이클의 적층 공정으로 지칭하는 경우, 상기 한 사이클의 적층 공정을 2회 이상 반복하여 다층 구조체를 형성할 수 있다.
- [44] 한편, 기관이 양전하를 띤 경우에는 음이온성 물질을 기관에 제1층으로서 적층시킬 수 있고, 상기 제1층의 표면에 양이온성 물질을 코팅하여 제2층으로 적층시킬 수 있으며, 유사한 방식으로, 상기 음이온성 물질의 제1층 및 양이온성 물질의 제2층을 적층하는 공정을 한 사이클의 적층 공정으로 하면, 상기 한 사이클의 적층 공정을 2회 이상 반복하여 다층 구조체를 형성할 수 있다.
- [45] 본 출원에서 양이온성 물질의 제1층 및 음이온성 물질의 제2층을, 또는 음이온성 물질의 제1층 및 양이온성 물질의 제2층을 포함하는 층을 일 단위로서 "1 Bilayer(BL)"로 지칭할 수 있다.
- [46] 상기 1 BL 적층 공정의 반복 횟수를 조절하여 다층 구조체의 두께를 조절할 수 있으며, 통상의 기술자는 적층 공정의 반복 횟수를 다층 필름의 적용 상황에 맞게 적절하게 조절할 수 있다.
- [47] 본 출원에서 1 BL을 형성하는 한 사이클의 적층 공정을 예컨대 10 - 70회, 12 - 68회, 14 - 66회, 16 - 64회, 18 - 62회, 20 - 60회, 22 - 58회, 24 - 56회, 26 - 54회, 28 - 52회, 30 - 50회, 32 - 48회, 34 - 46회, 또는 36 - 44회의 범위에서 행할 수 있다.
- [48] 본 출원에서 다층 구조체의 두께는 상기 BL의 수로도 표현될 수 있으며,

- 예컨대, 적층공정을 10 - 70회 반복수행하는 경우, 10-70 BL 두께의 다층 구조체가 형성될 수 있다.
- [49] 일 구현예에서, 다층 구조체의 두께는 10 - 70BL, 12 - 68 BL, 14 - 66 BL, 16 - 64 BL, 18 - 62 BL, 20 - 60 BL, 22 - 58 BL, 24 - 56BL, 26 - 54BL, 28 - 52BL, 30 - 50BL, 32 - 48BL, 34 - 46BL, 또는 36 - 44BL 일 수 있다.
- [50] 본 출원에서 상기 양이온성 물질과 음이온성 물질은 서로 가교될 수 있다.
- [51] 본 출원에서 다층 구조체를 형성하는 양이온성 물질 및 음이온성 물질은 각각의 양성자화되지 않은 아민기(-NH₂) 및 탈양성자화되지 않은 유리 카르복실기(-COOH)가 서로 반응하여 아마이드 결합을 형성할 수 있고, 상기 아마이드 결합에 의해 양이온성 물질 층과 음이온성 물질 층은 가교될 수 있다.
- [52] 상기 가교는 가교제 존재하에 수행될 수 있으며, 예를 들어 1-에틸-3-(3-(다이메틸아미노)프로필)카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시설포석신이미드(NHS)를 포함하는 제1 가교제, 및 글루타르알데하이드를 포함하는 제2 가교제에 순차적으로 담지하여 수행될 수 있다.
- [53] 상기 가교에 의해 다층 구조체에 기공(pore)이 형성될 수 있다.
- [54] 상기 가교시 가교제의 농도 및 가교 반응의 반응 시간을 조절하여 다층 구조체에 형성되는 기공의 크기, 거칠기(roughness) 또는 공극률(porosity)를 조절할 수 있다.
- [55] 또한, 가교 반응 뿐만 아니라 다층 구조체의 두께를 조절하여 기공의 공극률을 조절할 수 있다.
- [56] 일 구현예에서 가교 후 다층 구조체의 공극률은 10-26%, 11-25%, 12-24%, 13-23%, 14-22%, 15-21%, 또는 16-20%의 범위일 수 있다. 일 구현예에서, 가교 후 다층 구조체의 가교도는 50-80%, 52-78%, 54-76%, 56-74%, 58-72%, 또는 60-70% 일 수 있다.
- [57] 일 구현예에서, 가교 후 다층 구조체의 생리학적 인공 타액 환경 내에서의 분해도는 10%이하일 수 있다. 이는 배양용 제조공정에서 장기간 다층 필름의 효과를 유지할 수 있게 할 수 있다.
- [58] 일 구현예에서, 다층 구조체의 기공 크기는 다층 구조체 표면의 기공 크기의 평균이 다층 구조체 내부의 기공 크기의 평균에 비해 클 수 있다.
- [59] 영양물질
- [60] 본 출원에서 세포배양을 위한 영양물질이 상기 다층 구조체의 기공에 함입될 수 있다. 따라서, 본 출원의 세포 배양용 다층 필름은 다층 구조체에 함입된 세포 배양용 영양물질을 더 포함할 수 있다.
- [61] 영양물질의 기공내부로 함입은 예컨대 영양물질을 포함하는 용액을 다층 구조체와 접촉시켜 행할 수 있다.
- [62] 세포배양용 영양물질은 다층 구조체의 기공에 함입되므로, 기공의 크기를 감안하여 30 kDa 이하의 분자량을 갖는 물질일 수 있다.

- [63] 세포배양용 영양물질은 호르몬, 성장인자, 아미노산 또는 비타민을 포함하며, 예를 들어 C-피코시아닌(C-phyococyanin); IGF-1, BMP-2 및 FGF-1으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [64] 상기 영양물질은 다층 구조체의 표면의 기공 뿐만 아니라 내부의 기공에 까지 충분히 함입될 수 있다.
- [65] 캡핑층(Capping layer)
- [66] 일 구현예에서, 상술한 다층 구조체 상에 캡핑층이 더 형성될 수 있다. 상기 캡핑층은 다층 구조체의 가장 바깥쪽 층상에 형성될 수 있다.
- [67] 캡핑층의 형성은 예컨대 캡핑층을 구성할 수 있는 물질을 포함하는 용액을 영양물질이 함입된 다층 구조체와 접촉시켜 행할 수 있다.
- [68] 상기 캡핑층은 기공에 함입된 세포배양용 영양물질을 안정화시키고, 분해를 억제하며, 급격한 방출을 저해한다.
- [69] 상기 캡핑층은 다당류로 이루어질 수 있으며, 예를 들어 아가로스, 카라기난(carageenan), 후코이단(fucoidan), 라미나란(laminaran), 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 및 리그난으로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [70] 본 출원에서 세포배양용 영양물질이 C-피코시아닌인 경우, 캡핑층은 아가로스의 캡핑층일 수 있다.
- [71] 본 출원에서 다층필름의 두께는 0.1 μm - 10 μm , 보다 구체적으로 0.2 μm - 9 μm , 0.3 μm - 8.5 μm , 0.5 μm - 8.5 μm , 0.8 μm - 8.5 μm , 1.0 μm - 8.0 μm , 1.2 μm - 8.0 μm , 2.0 μm - 8.0 μm , 2.5 μm - 7.5 μm , 2.5 μm - 7.0 μm , 2.5 μm - 6.5 μm , 2.7 μm - 6.0 μm , 또는 3.0 μm - 6.0 μm 일 수 있다.
- [72] 일 구현예에서, 본 출원의 다층 필름은 세포 배양 용도로 사용될 수 있다.
- [73] 다른 측면에 따르면, 본 출원은 상술한 다층 필름 및 혈청 성분을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공한다.
- [74] 일 구현예에서, 혈청 성분의 함유량은 세포 배양용 조성물에서 10중량% 미만일 수 있으며, 구체적으로 9중량% 미만, 8중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 또는 4중량% 미만일 수 있다.
- [75] 상기 혈청 성분의 함유량의 하한은 세포 배양용 조성물에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 세포 배양용 조성물은 예를 들어 상술한 다층 필름이 포함된 세포 배양용 배지일 수 있다.
- [76] 일 구현예에서, 상기 혈청 성분의 함유량은 세포 배양용 배지의 10중량% 미만, 보다 구체적으로 9중량% 미만, 8 중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 또는 4 중량% 미만일 수 있다.
- [77] 상기 혈청 성분의 함유량의 하한은 세포 배양용 배지에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다.
- [78] 다른 구현예에서, 상기 혈청 성분은 소태아혈청일 수 있고, 상기 소태아혈청의 함유량은 세포 배양용 배지의 10중량% 미만, 보다 구체적으로 9중량% 미만,

8중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 4중량% 미만일 수 있으며, 상기 소태아혈청의 함유량의 하한은 세포 배양용 배지에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다.

- [79] 본 출원의 조성물이, 통상적인 세포 배양 배지에 포함되는 혈청 성분(예를 들어 소태아혈청)의 함량인 10중량% 보다 더 낮은 함량의 혈청 성분을 포함하더라도, 본 출원의 상술한 다층 필름을 포함하는 경우 세포 증식, 보다 구체적으로 근육 세포 증식에 있어서 동등하거나 더 높은 수준의 증식이 가능하다.
- [80] 다른 구현예에서, 상기 세포는 배양육 제조를 위한 세포일 수 있으며, 구체적으로는 동물 유래 근육세포일 수 있으며, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [81] 다른 측면에 따르면, 본 출원은 상술한 다층필름을 포함하는 세포 배양용 장치를 제공한다.
- [82] 일 구현예에서, 상기 세포 배양용 장치는 다층 필름이 구비된 세포배양용 접시, 세포배양 플레이트, 세포배양 용기 또는 세포배양기일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 배양육 제조를 위한 세포일 수 있으며, 구체적으로는 동물 유래 근육세포일 수 있으며, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [83] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 상술한 다층필름을, 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 배양육 제조 방법을 제공한다.
- [84] 일 구현예에서, 상기 세포는 배양육 제조를 위한 세포일 수 있으며, 구체적으로는 동물 유래 근육세포일 수 있으며, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [85] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 상술한 다층필름을, 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [86] 일 구현예에서, 상기 혈청 성분은 소태아혈청일 수 있다.
- [87] 일 구현예에서, 상기 혈청 성분은 세포 배양액에서 10중량% 미만, 보다 구체적으로 9중량% 미만, 8 중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 또는 4 중량% 미만일 수 있다.
- [88] 상기 혈청 성분의 함유량의 하한은 세포 배양액에서 0.001 중량%, 0.01중량%, 또는 0.1 중량% 일 수 있다. 본 출원의 조성물이, 통상적인 세포 배양액에 포함되는 혈청 성분(예를 들어 소태아혈청)의 함량인 10중량% 보다 더 낮은

함량의 혈청 성분을 포함하더라도, 본 출원의 상술한 다층 필름을 포함하는 경우 세포 증식, 보다 구체적으로 근육 세포 증식에 있어서 동등하거나 더 높은 수준의 증식이 가능하다.

- [89] 일 구현예에서, 상기 세포는 배양육 제조를 위한 세포일 수 있으며, 구체적으로는 동물 유래 근육세포일 수 있으며, 상기 근육세포는 근아세포(myoblast), 근위성세포(muscle satellite cell), 근관세포(myotube cell), 근관(myotube), 근섬유(myofiber), 또는 성숙 근섬유(mature myofiber)를 포함할 수 있다.
- [90] 세포 배양용 조성물, 세포 배양용 장치, 배양육 제조 방법 및 혈청성분을 감소시키는 방법에서 다층필름에 관한 내용은 본 출원의 다른 일 측면인 다층필름에서 설명된 바와 동일하므로, 중복하여 설명하지 않는다.
- [91] 또 다른 측면에 따르면, 본 출원은 다음의 단계를 포함하는 세포배양용 다층필름의 제조방법을 제공한다:
- [92] (a) 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질을 포함하는 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 제1 용액을 제조하고, 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질을 포함하는 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 제2 용액을 제조하는 단계;
- [93] (b) 기판상에 상기 제1 용액 및 제2 용액을 교대로 접촉시켜 양이온성 물질의 층 및 음이온성 물질의 층을 교대로 적층하여 다층 구조체를 형성하는 단계; 및
- [94] (c) 다층 구조체의 양이온성 물질과 음이온성 물질을 가교시키는 단계.
- [95] 일 구현예에서, 상기 단계 (c) 이후에, (d) 가교에 의해 형성된 기공에 세포배양용 영양물질을 함입시키는 단계를 더 포함할 수 있다..
- [96] 일 구현예에서, 상기 제1 용액 및 제2 용액의 pH는 3 - 5일 수 있다.
- [97] 다른 구현예에서, 상기 단계 (d) 이후에, (e) 다층 구조체상에 캡핑층(capping layer)을 형성하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [98] 본 출원의 세포 배양용 다층필름의 제조방법에서 다층필름에 관한 내용은 본 출원의 다른 일 측면인 다층필름에서 설명된 바와 동일하므로, 중복하여 설명하지 않는다.

발명의 효과

- [99] 본 출원의 다층 필름에 의하면 세포 배양시 필요한 영양물질을 안정적으로 전달할 수 있다.
- [100] 본 출원의 다층 필름에 의하면 동물유래 혈청을 대체할 수 있는 영양물질을 사용할 수 있으므로 윤리성, 고비용 및 질병 유발의 문제점을 해결할 수 있다.
- [101] 본 출원의 다층 필름의 다층 구조체 내의 기공의 크기, 거칠기 또는 공극률을 용이하게 조절할 수 있어, 영양물질의 함입량, 방출량 및 방출속도의 제어가 가능하다.
- [102] 본 출원의 다층 필름의 다층 구조체의 가장 바깥쪽 층상에 캡핑층을

구비시킴으로써 함입된 영양물질의 초기 급격한 방출을 제어할 수 있고, 영양물질의 안정화를 향상시킬 수 있다.

- [103] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [104] 도 1은 층상자기조립법(Layer-by-layer assembly, LbL assembly)에 의해 키토산(CHI) 및 카르복시메틸셀룰로오스(CMC) 기반의 다층 필름을 제조하는 과정을 보여준다.
- [105] 도 2는 층상자기조립법에서 CHI/CMC Bilayer의 적층 횟수에 따른 다층필름의 두께가 증가하는 것을 보여주는 그래프이다.
- [106] 도 3은 생리학적 타액 환경 내 노출 시간에 따른 다층 박막의 두께 감소 그래프이다.
- [107] 도 4은 다층필름의 두께에 따라 C-PC의 방출량 및 방출거동에 차이가 발생하는 결과를 보여준다.
- [108] 도 5는 가교 전의 다층필름[(CHI/CMC)₄₀], 가교후의 다층필름(X-linked) 및 C-PC 함입 후의 다층필름(C-PC Loaded) 샘플의 SEM 관찰 이미지이다.
- [109] 도 6는 가교된 다층필름내 C-PC 함입 후 박막내 공극율의 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [110] 도 7은 가교된 다층필름에 캡핑층 형성 전과 캡핑층 형성 후의 필름의 C-PC 방출 거동을 분석한 결과 그래프이다.
- [111] 도 8은 OHP 필름에 코팅된 C-PC 함입 다층필름 샘플의 사진이다.
- [112] 도 9은 C-PC 전달용 다층필름에 의한 C2C12 세포의 증식 향상(좌측 그래프) Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 분석법에 의한 세포 수 측정 결과(우측 그래프)를 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

- [113] 이하, 본 출원을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 출원의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [114] 실시예
- [115] 실시예 1: 다당류 기반 다층필름의 제조
- [116] 다당류 기반 다층필름은 층을 구성하는 물질간의 상호인력을 이용한 층상자기조립법(Layer-by-layer assembly, LbL assembly)을 통해 제조하였다(도 1).
- [117] 먼저, 1 mg/mL 농도의 키토산(CHI, Sigma-Aldrich) 수용액 및 1 mg/mL 농도의 카르복시메틸셀룰로오스(CMC, Sigma-Aldrich) 수용액을 제조하고, 1M NaOH 및 1M HCl을 사용하여 상기 수용액들의 pH를 4로 조절하였다(단계 1). pH 4의

수용액에서 키토산 및 카르복시메틸셀룰로오스는 80% 이상이 이온화되어 존재한다. 이어서, 산소 플라즈마 처리된 기판(Si-wafer)을 준비하고, 이를 양전하를 띠는 키토산의 수용액에 15분간 담지한 후, 3차 증류수에서 두 차례의 세척을 행하였다(단계 2). 이어서, 상기 기판을 음전하를 띠는 카르복시메틸셀룰로오스의 수용액에 10분간 담지한 후 3차 증류수에서 두 차례 세척을 행하였다(단계 3).

- [118] 상기한 단계 2 및 3의 과정에서 키토산과 카르복시메틸셀룰로오스 사이의 정전기적 인력에 의해 CHI/CMC 층이 형성되었고, 상기 단계 2 및 3의 과정을 반복하여 CHI/CMC의 다층필름을 제조하였다. 상기 단계 2 및 3의 과정을 한 사이클 반복하여 제조된 필름을 1 BL(bilayer) 필름이라 지칭하고, 반복 사이클 수를 증가시킬수록 더 높은 BL의 수를 갖는 필름이 형성되었다(도 2). 도 2에서 보여지는 바와 같이, 3BL 부터 19BL 까지 필름의 두께의 증가를 확인하였고, 적층 횟수와 다층박막의 두께 사이에 비교적 선형(linear)적인 성장 패턴이 관찰되었으며, 19BL의 두께는 약 1.8 μm 로 측정되었다.
- [119]
- [120] **실시예 2: 다당류 기반 다층필름의 가교 및 C-PC 함입**
- [121] 제조된 다층필름에 영양물질인 C-피코시아닌(C-phyococyanin, C-PC)의 함입을 위해 다층필름에 가교를 도입하여 다공성을 부여하였다. 다층필름이 코팅된 기판을 0.05M의 2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid (MES) 완충액에 0.2M의 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) 및 5 mM의 N-hydroxysuccinimide (NHS)가 포함된 가교 용액에 30분간 방치하여 1차 가교를 수행하고, 1X PBS로 세척하였다(단계 4). 이어서, 1차 가교된 다층필름을 추가적으로 증류수에 행구고 건조 과정 없이, 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) 용액에 45 분간 방치하여 2차 가교를 진행하였다(단계 5). 2 mg/mL C-PC (Sigma-Aldrich) 수용액에 가교된 다층필름을 넣은 후, 12시간 동안 어두운 환경에서 인큐베이션(incubation)하여 다공성의 다층필름 내로 C-PC의 함입(incorporation)을 유도하였다(단계 6).
- [122]
- [123] **실시예 3: 다당류 기반 다층필름의 캡핑층 형성**
- [124] C-PC의 함입 후, 초기의 급격한 C-PC 방출을 방지하기 위해 다층필름 표면에 아가로스(agarose, 0.25 w/v %) 용액을 도포하여 캡핑층(capping layer)를 형성하였다(단계 7).
- [125]
- [126] **실시예 4: 다층필름의 특성 분석**
- [127] 다층필름의 특성 분석은 다음과 같이 행하였다. Quartz crystal microbalance (QCM)을 이용하여 코팅 기판으로 QCM용 전극을 사용하여 코팅이 제조되는 과정에서 QCM 기기의 주파수 변화를 측정함으로써 단위 면적당 질량 변화를 측정하였고, 이로부터 다층필름을 형성하는 각 물질의 총 질량을 계산하여

얻었다. Profilometer를 이용하여 다층필름의 두께를 측정하였으며, Porosimeter를 이용하여 다층필름의 기공률, 기공 크기 및 부피를 분석하였다. SEM을 이용하여 다층필름의 거칠기 및 다공성의 미세한 형태를 관찰하였다. 영양물질 방출 분석은 Photoluminescence spectroscopy (PL)으로 다층필름에서 방출되는 C-PC를 탐지하여 시간에 따른 방출량을 정량하고 방출 거동을 분석하였다. Micro reader을 통해 다층필름에서 방출되는 C-PC를 탐지하여 시간에 따른 방출량을 정량하고 방출 거동을 분석하였다.

[128]

[129] **1. 다층필름의 가교에 의한 분해 저해 효과 측정**

[130] 다층필름에서 가교로 인한 다층필름의 분해 억제 효과를 두께 감소를 측정하여 통해 확인하였다. 생리학적 인공 타액 환경내에서 가교를 행하지 않은 다층필름의 분해 정도는 30% 이하이었으나, 가교를 행한 다층필름의 경우 10% 이하로 나타나, 가교에 의해 다층필름의 분해가 감소되었다(도 3). 이는 특히 배양육 제조 공정동안 다층 필름의 효과가 장기간 유지될 수 있음을 의미할 수 있다.

[131]

[132] **2. 다층필름 두께에 따른 C-PC 방출량 측정**

[133] 다층박막의 두께가 증가함에 따라 C-PC가 함입될 수 있는 부분이 증가할 뿐만 아니라 가교에 의해 다층박막 내 작은 크기의 기공의 형성이 촉진되어 C-PC의 최종 방출량을 증가시킬 수 있다. 필름 두께의 증가는 필름 내 작은 기공의 형성을 촉진하기 때문에 두께 증가율에 비해 방출 증가율이 더 높게 측정되었다. 다층필름의 전구층/코어층/외곽층(Precursor layer/Core layer/Out-layer)에 따른 C-PC의 방출 경향의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 즉, C-PC의 방출 거동을 관찰한 결과, 초기에는 표면으로부터 C-PC의 확산에 의한 급격한 방출이 나타났고, 이어서 필름 표면의 기공 크기보다 작은, 필름 내부의 작은 기공으로부터 C-PC 확산에 의한 방출이 발생하였다. 40 BL 필름에서 100 µg/mL 이상의 C-PC가 방출되었는데, 이 정도의 방출량이 C2C12 세포의 장기간 증식 및 분화에 가장 유효한 농도로 확인하였다(도 4).

[134]

[135] **3. C-PC 함입에 따른 가교 다당류 기반 다층필름의 형태 분석**

[136] 가교로 인한 사슬 재조립(chain reassembly)에 의해 다층필름의 내부의 형태는 다공도가 증가하였고, 거친(rough) 특성을 보였으며, 이로 인해 다층필름 내부에 C-PC를 함입할 수 있는 면적이 증가되어 로딩량을 증가시킬 수 있었다. 가교된 다층필름에 C-PC를 로딩한 후 필름 내부의 기공이 C-PC에 의해 커버링(covering)된 것이 관찰되었다(도 5). 가교된 (CMC/CHI)₄₀ 필름의 경우, 기공 구조가 뚜렷하게 형성되어 전체에 대해 약 18% 정도의 공극율(porosity)를 가졌고, 기공(pore)에 C-PC를 로딩한 후에는 전체적인 공극률이 5.8% 정도로 감소되었다(도 6 및 표 1). 입자 내부 공극률(intra-particle porosity)%의 급격한

감소는 필름 내부까지 C-PC가 함입되었음을 나타낸다.

[137] [표1]

	총 입자간 공극률(total interparticle porosity)(%)	총 입자 내부 공극률(total intraparticle porosity)(%)	총 공극률(%)
(CMC/CHI) 필름	8.6018	8.4423	18.0442
(CMC/CHI) 필름/CPC	5.5061	1.3827	5.887

[138]

[139] **4. 다층박막 표면에 캡핑층 제조에 따른 C-PC 방출량 측정.**

[140] 캡핑층에 의해 C-PC의 급속한 방출이 저해되었으며, 96시간 까지 지속적인 C-PC 방출이 발생됨을 확인할 수 있었다(도 7). 따라서, 초기에 발생하는 급격한 방출(burst release)를 방지하기 위해서는 캡핑층을 사용하여 물리적으로 방출을 저해하는 방법이 효과적일 것이 시사되었다.

[141]

[142] **5. C-PC 함입된 가교 다당류 기반 다층필름의 세포 증식 평가**

[143] C-PC 함입된 다층필름의 세포배양에 적용하여 세포증식 효과를 평가하였다. C-PC 함입 다층필름 샘플은 실시예 1에 기재된 방법에 따라, OHP 필름을 기관으로 하여 40BL 다층필름을 제조한 후, C-PC를 함입하였다. 파란색을 띄는 C-PC의 함입에 의해 필름의 색 또한 파란색을 띄는 것이 관찰되었다(도 8).

[144] C-PC 전달용 다층필름에 의한 C2C12 근아세포(myoblast)의 증식 향상 효과를 확인하기 위해, 각각 대조군과 실험군에서 C2C12 세포를 7일 간 장기 배양하였다. C2C12 근아세포(Passage 6)를 24웰-플레이트의 각 웰(well)에 3.5×10^3 개씩 접종하였다. 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® Life Technologies)에 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제(Gibco® Life Technologies)와 10% 또는 5% FBS (WELGENE)가 포함된 배양액을 사용하여 행하였다.

[145] 대조군 1은 10% FBS가 포함된 배양액(FBS 10%)을 사용하여 배양하였고, 대조군 2는 5% FBS가 포함된 배양액(FBS 5%)을 사용하여 배양하였으며, 실험군 1은 5% FBS가 포함된 배양액에 C-PC가 함입된 다층필름을 첨가하여 제조한 배양액(Film_CPC)을 사용하여 배양하였으며, 실험군 2는 C-PC가 함입되고 아가로스 캡핑층이 도포된 다층필름을 5% FBS가 포함된 배양액에 첨가하여 제조된 배양액(Capping_CPC)을 사용하여 배양하였고, 실험군 3은 C-PC를 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 5% FBS 배양액에 첨가한 배양액(Exo_CPC)을 사용하여 배양하였다. 실험 결과, Film_CPC 그룹은 FBS 10%와 거의 유사한 세포 증식 정도를 보여주었으며, 아가로스 캡핑층이 적용된 Capping_CPC 그룹에서는 FBS

10% 그룹보다 더 높은 세포 증식 정도가 관찰되었다(도 9). 이를 통하여 본 출원에 다층 필름에 의하여 FBS를 절감할 수 있음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 당류 성분인 아가로스가 C-PC의 열적 안정성을 향상시킨 동시에 다층필름으로부터 급격한 방출(burst release)을 저해한 결과라고 판단된다.

[146]

[147] 상기에서는 본 출원의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] (a) 기관; 및
(b) 상기 기관상에 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질 및 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질이 교대로 적층되어 형성되고, 상기 양이온성 물질과 음이온성 물질이 서로 가교되고, 기공을 포함하는 다층 구조체; 을 포함하는, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 다층 구조체의 기공에 함입된 세포 배양용 영양물질을 더 포함하는, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질은 키토산(chitosan), 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 피브리노젠(fibrinogen), 실크피브로인(silk fibroin), 카세인(casein), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 폴리도파민(polydopamine), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine), 폴리-L-리신(poly-L-lysine), 폴리(비닐아민) 하이드로클로라이드(poly(vinylamine)hydrochloride), 및 폴리(아미노산)(poly(amino acid))으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질은 히알루론산(hyaluronic acid), 폴리-L-락틱산(poly-L-lactic acid), 알긴산(alginic acid), 덱스트란황산(dextran sulfate), 리그닌(lignin), 탄닌산(tannic acid), 콘드로이틴황산(chondroitin sulfate), 셀룰로오스(cellulose)류 고분자, 후코이단(fucoidan) 및 헤파린(heparin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 다층 구조체상에 형성된 캡핑층(capping layer)을 더 포함하는 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 캡핑층은 다당류로 제조되는 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 다당류는 아가로스, 카라기난(carageenan), 후코이단(fucoidan), 라미나란(laminaran), 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 및 리그난으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 8] 청구항 2에 있어서,
상기 세포배양용 영양물질은 C-피코시아닌(C-phyocyanin); IGF-1, BMP-2 및 FGF-1으로 이루어지는 군에서 선택되는 성장인자; 아미노산; 또는 아스코르브산인 것인, 세포 배양용 다층 필름.

- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
다층필름의 두께는 $0.1\ \mu\text{m}$ - $10\ \mu\text{m}$ 인 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서,
상기 다층 구조체는 양이온성 물질의 층 및 음이온성 물질의 층으로 이루어지는 적층 단위 BL(bilayer)이 10 - 70 BL의 범위인 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서, 다층 구조체의 공극률은 10% - 26%인 것인, 세포 배양용 다층 필름.
- [청구항 12] 청구항 1에 있어서, 다층 구조체의 가교도는 50-80%인 것인, 세포 배양용 다층필름.
- [청구항 13] (i) 청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항의 다층 필름; 및 (ii) 혈청 성분을 포함하는 세포 배양용 조성물.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 혈청 성분의 함유량은 세포 배양용 조성물에서 10중량% 미만인 것인, 세포 배양용 조성물.
- [청구항 15] 청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항의 다층 필름을 포함하는 세포 배양용 장치.
- [청구항 16] 청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항의 다층 필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는 배양육 제조 방법.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 세포는 동물유래 근육 세포인 것인, 배양육 제조 방법.
- [청구항 18] 청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항의 다층 필름을 세포를 포함하는 세포 배양액과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 배양액에서 혈청 성분을 감소시키는 방법.
- [청구항 19] 다음의 단계를 포함하는 세포배양용 다층 필름의 제조방법:
(a) 측쇄에 아민기를 갖는 양이온성 물질을 포함하는 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 제1 용액을 제조하고, 측쇄에 카르복실기를 갖는 음이온성 물질을 포함하는 용액의 pH를 미리 정해진 범위로 조절하여 제2 용액을 준비하는 단계;
(b) 기판상에 상기 제1 용액 및 제2 용액을 교대로 접촉시켜 양이온성 물질의 층 및 음이온성 물질의 층을 교대로 적층하여 다층 구조체를 형성하는 단계; 및
(c) 다층 구조체의 양이온성 물질과 음이온성 물질을 가교시키는 단계.
- [청구항 20] 청구항 19에 있어서,
(c) 단계 이후에, (d) 상기 가교에 의해 형성된 기공에 세포 배양용 영양물질을 함입시키는 단계;를 더 포함하는, 세포 배양용 다층 필름의 제조방법.
- [청구항 21] 청구항 19에 있어서,
상기 제1 용액 및 제2 용액의 pH는 3 - 5인 것인, 세포 배양용 다층 필름의

제조방법.
[청구항 22] 청구항 20에 있어서,
상기 단계 (d) 이후에, (e) 다층 구조체상에 캡핑층(capping layer)을
형성하는 단계;를 더 포함하는, 세포 배양용 다층 필름의 제조방법.