

|                                                                                   |                                                                                                                                               |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                                            | (11) 공개번호 10-2019-0098334<br>(43) 공개일자 2019년08월22일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 5/074 (2010.01) C12N 11/08 (2006.01)                | (71) 출원인<br>(주)오스힐<br>서울특별시 구로구 가마산로 226 ,4층(구로동, 고려구로빌딩)<br>고려대학교 산학협력단<br>서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)                                  |                                                    |
| (52) CPC특허분류<br>C12N 5/0696 (2013.01)<br>C12N 11/08 (2013.01)                     | (72) 발명자<br>송해용<br>서울특별시 구로구 경인로 65길 16-15, 1102동 101호 (신도림동, 신도림4차e-편한세상)<br>김학준<br>서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)<br>(뒷면에 계속) |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2018-0018140<br>(22) 출원일자 2018년02월14일<br>심사청구일자 없음                   | (74) 대리인<br>특허법인충현                                                                                                                            |                                                    |
| 전체 청구항 수 : 총 5 항                                                                  |                                                                                                                                               |                                                    |
| (54) 발명의 명칭 다공성 마이크로스피어를 이용한 유도만능줄기세포 유도 방법                                       |                                                                                                                                               |                                                    |

**(57) 요약**

본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질을 탑재한 다공성 마이크로스피어 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자

**김성은**

서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동,  
대림아크로빌)

**이재용**

경기도 광주시 행정타운로 143-38, 105동 302호(회  
덕동, 상록파크타운)

**심규식**

경기도 광명시 연서로12번길 19, 201호(철산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9B3063640

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발

연구과제명 근골격계 질환 동물 모델 이용하여 줄기세포치료제 후보군 유효성 검증

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도물질을 다공성 마이크로스피어에 탑재하는 단계를 포함하는 다공성 마이크로스피어를 이용한 유도만능줄기세포의 유도방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것을 특징으로 하는 유도방법.

#### 청구항 3

크기가 5 내지 100  $\mu\text{m}$ 인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도물질;을 포함하는 유도만능줄기세포의 유도용 다공성 고분자 마이크로스피어.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포의 유도용 다공성 고분자 마이크로스피어.

#### 청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이트, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리엔하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포의 유도용 다공성 고분자 마이크로스피어.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질을 탑재한 다공성 마이크로스피어 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 유도방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 유도만능줄기세포는 특정한 유전자를 인위적으로 발현시켜 비만능세포인 성체체세포를 유도할 수 있는 만능줄기세포이다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 같은 자연적인 만능줄기세포와 많은 면이 비슷하다. 즉 특정한 줄기세포 유전자와 단백질의 발현, 염색질 메틸화 패턴, 배가시간, 배아유사세포덩어리 형성, 기형종 형성, 생존가능한 키메라 형성, 그리고 세포잠재력과 세포분화력이 비슷하다. 유도만능줄기세포는 쥐세포로부터 2006년에 처음 생산되었고 2007년에는 인간세포로부터 생산되었다.

- [0004] 논란의 여지가 되는 배아의 사용을 필요로 하지 않고 연구와 치료에 잠재적으로 사용될 수 있는 만능줄기세포를 얻을 수 있기 때문에 유도만능줄기세포는 줄기세포 연구에 중요한 발전으로 인용되어 왔다.
- [0005] 2008년 2월, 획기적인 발견이 과학잡지 Cell에 발표되었는데, 다능성을 유도시킨 후 종양유전자를 제거하는 기술이 연구되어 인간 질병에 유도만능줄기세포의 사용 가능성을 증가시켰다. 2009년 4월에는 캘리포니아 La Jolla의 Sheng Ding과 그의 동료들은 성체세포의 유전적 변화 없이 유도만능줄기세포 발생이 가능하다는 것을 보였다. 즉, 특정한 단백질을 폴리아르지닌 고정(poly-arginine anchors)을 통해 세포안으로 넣어 줌으로서 세포의 다능성(pluripotency)을 유도하였다.
- [0006] 상기 유도만능줄기세포를 보다 안정적 및 효율적으로 유도하고자 하는 다양한 시도들이 있어왔다. 하지만, 아직까지 상기 유도만능줄기세포의 유도에 생분해성 다공성 고분자 지지체를 이용하는 조직공학적 방법은 효과적인 성과를 나타내지 못하고 있는 실정이다.
- [0008] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 다공성 마이크로스피어를 이용한 유도만능줄기세포 효율적인 유도 방법을 찾고자 노력하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 유도만능줄기세포 유도물질을 다공성 마이크로스피어에 탑재하는 단계를 포함하는 다공성 마이크로스피어를 이용한 유도만능줄기세포의 유도방법을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 유도만능줄기세포 유도물질을 포함하는 유도만능줄기세포의 유도에 다공성 고분자 마이크로스피어를 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도물질을 다공성 마이크로스피어에 탑재하는 단계를 포함하는 다공성 마이크로스피어를 이용한 유도만능줄기세포의 유도방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 생분해성 고분자 지지체; 및 상기 생분해성 고분자 지지체의 그물구조 내에 포섭되는 유도만능줄기세포 유도물질을 포함하는 유도만능줄기세포의 유도에 다공성 고분자 마이크로스피어를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 생분해성 고분자 지지체는 크기가 5 내지 100  $\mu\text{m}$ 인 기공들이 서로 연결되어 있는 3차원 그물구조의 생분해성 고분자 지지체인 것이다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 생분해성 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이트, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하

나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것이다.

### 발명의 효과

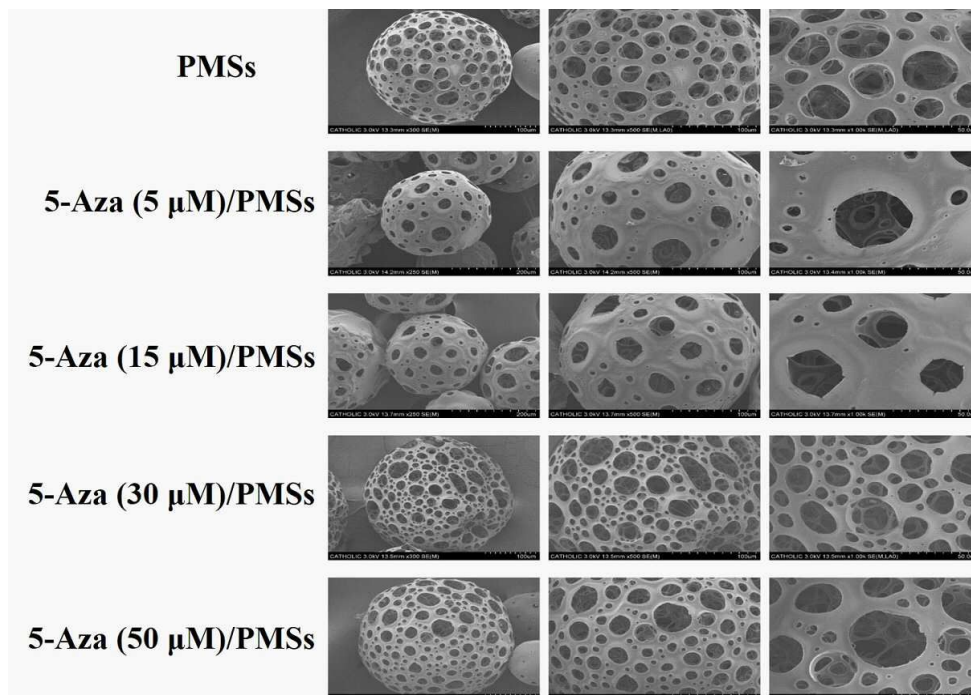
[0026] 본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질을 탑재한 다공성 마이크로스피어 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도방법을 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

### [0030] 1. 5-azacytidine (5-Aza)를 탑재한 다공성 마이크로스피어 제작방법

[0031] W/O/W 에멀전 방식을 이용하여 5-azacytidine (5-Aza)를 탑재한 다공성 PLGA 마이크로스피어를 제조하였다. 구체적으로는, DCM에 PLGA와 5-azacytidine (5-Aza)를 농도별 (5  $\mu$ M=8.5 ng, 15  $\mu$ M=25.5 ng, 30  $\mu$ M=51 ng, 50  $\mu$ M=85 ng)를 녹이고 증류수에 용해된 젤라틴을 7:3 (PLGA:gelatin) 비율로 하여 균질기를 사용하여 13,500 rpm, 1분 조건에서 균질화하여 상분리를 하였으며, 플루이딕 디바이스를 이용하여 PVA 용액을 첨가한 후, 증류수를 40℃ 온도 조건에서 안에 있던 젤라틴을 제거하고 동결 후 동결건조 하여 다양한 농도 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어가 만든 후, 전자현미경 사진을 이용하여 형태학 관찰하였다.

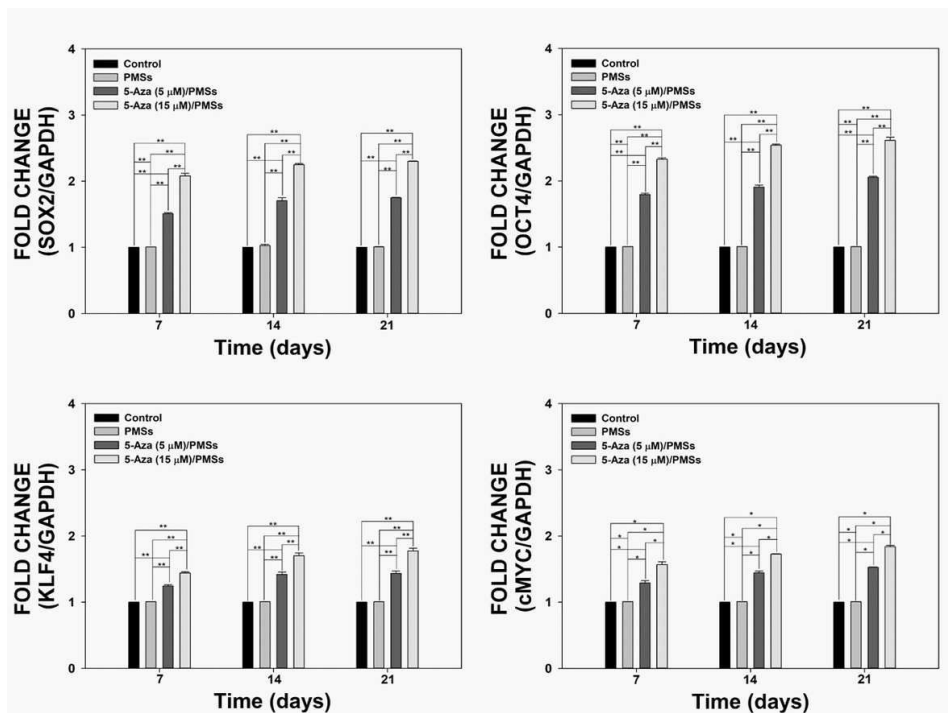


[0033] [도 1] 다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza) 농도 탑재 다공성 마이크로스피어 전자현미경 (scanning electron microscope, SEM) 사진

[0037] 위의 전자현미경 결과처럼 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어 모든 그룹에서 다공성을 유지하였다.

## [0039] 2. 유전자 발현을 통한 IPSCs 마커 확인

[0040] 다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza) 농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방유래줄기세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여 7, 14, 및 21 일에 실시간 연쇄중합반응(real-time PCR)으로 유도만능줄기세포 마커(SOX-2, OCT-4, KLF-4 및 cMYC) 발현량을 측정하여 유도만능줄기세포 유도 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다.



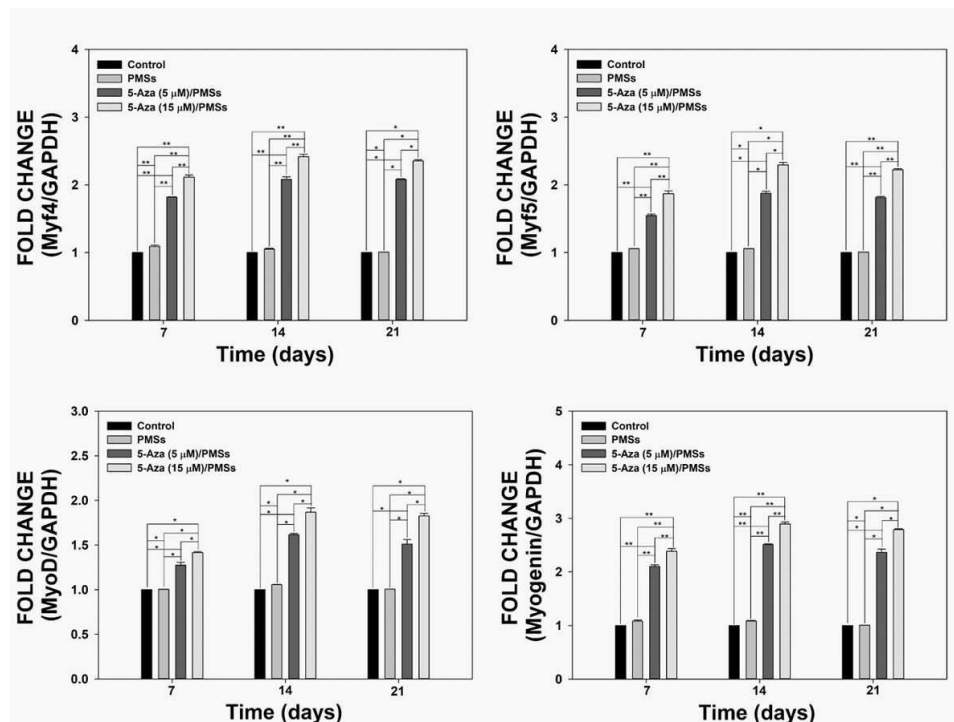
[0044] [도 2] 유도만능줄기세포 마커(SOX2, OCT4, KLF4 및 cMYC) 발현량을 7, 14, 및 21일 실시간 연쇄중합반응 결과

[0046] 분석 결과, IPSCs 마커인 SOX2, OCT4, KLF-4, 및 cMYC의 발현량은 5-Aza (15 μM)/PMSs에서 가장 높게 나타났다. 그러나, 5-Aza 없는 다공성 마이크로스피어는 발현되지 않았다.

## [0048] 3. 유전자 발현을 통한 근육(Myogenic) 분화 마커 확인

[0049] 5-azacytidine (5-Aza)는 유도만능줄기세포 촉진뿐만 아니라 근육 분화 촉진 마커임. 본 실험은 유도만능줄기

세포 유도 유지 및 근육 분화 촉진 되는지 확인하였다. 다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza) 농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여 7, 14, 및 21 일에 실시간 연쇄중합반응(real-time PCR)으로 근육분화 마커 (Myf4, Myf5, MyoD 및 Myogenin) 발현양을 확인하였다. 배양 7, 14, 및 21일에, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다.



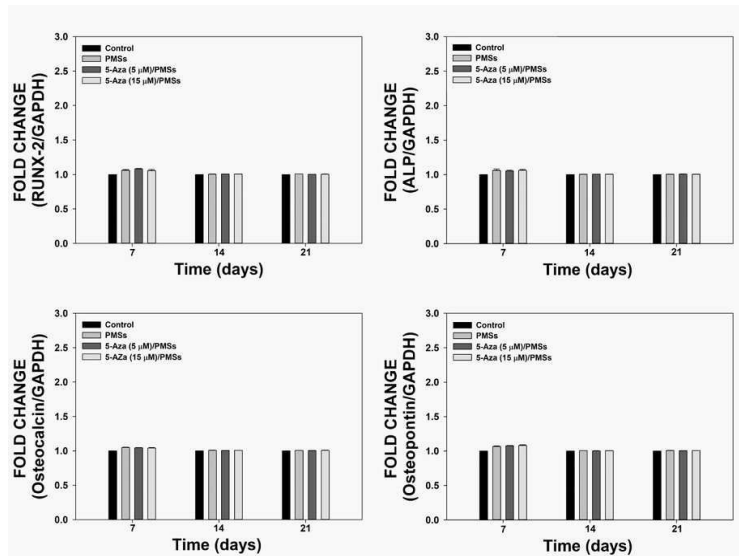
[도 3] 근육분화 마커(Myf4, Myf5, MyoD 및 Myogenin) 발현양을 7, 14, 및 21일 실시간 연쇄중합반응 결과

분석 결과 myogenic 분화 마커인 Myf4, myf5, myoD, 및 myogenin 발현양은 5-Aza (15 μM)/PMSs에서 가장 높게 나타났다. 그러나, 5-Aza 없는 다공성 마이크로스피어는 발현되지 않았다.

#### 4. 유전자 발현을 통한 골(osteogenic) 분화 마커 확인

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여 7, 14, 및 21 일에 실시간 연쇄중합반응(real-time PCR)으로 골분화 마커 (RUNX-2, ALP, Osteocalcin 및 Osteopontin) 발현양을 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합

성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다.

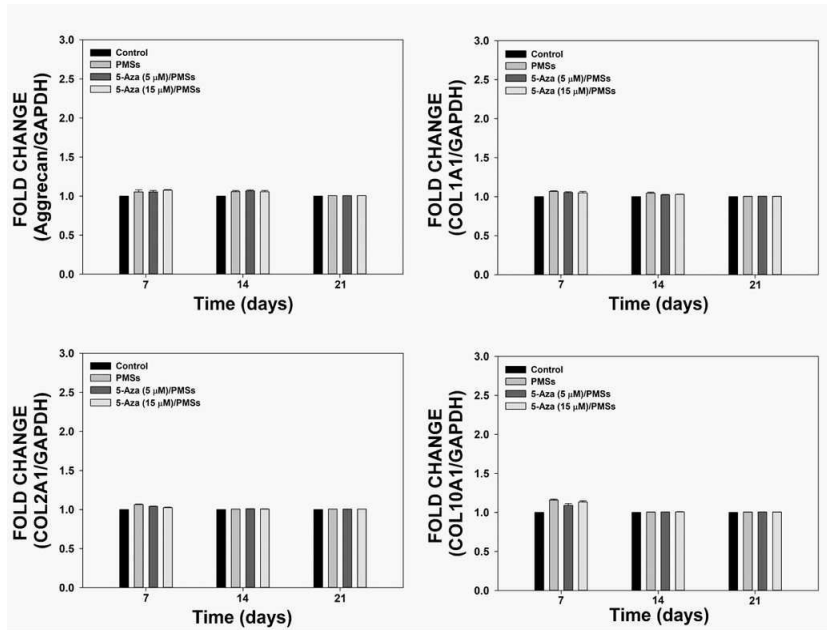


[도 4] 골분화 마커(RUNX-2, ALP, Osteocalcin 및 Osteopontin) 발현양을 7, 14, 및 21일 실시간 연쇄중합반응 결과

분석 결과, 초기 골(osteogenic) 분화 마커(RUNX-2 및 ALP), 후기 골(osteogenic) 분화 마커(osteocalcin 및 osteopontin)은 7, 14 및 21일 동안 증가가 없었으며 5-azacytidine (5-Aza)는 골 분화에 관여하지 않는다는 것을 확인하였다.

## 5. 유전자 발현을 통한 연골(chondrogenic) 분화 마커 확인

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여 7, 14, 및 21 일에 실시간 연쇄중합반응(real-time PCR)으로 연골 분화 마커 (Aggrecan, Collagen type I, Collagen type II 및 Collagen type X) 발현양을 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다.



[0069]

[0071]

[도 5] 연골 분화 마커(AggreCAN, Collagen type I, Collagen type II 및 Collagen type X) 발현량을 7, 14, 및 21일 실시간 연쇄중합반응 결과

[0073]

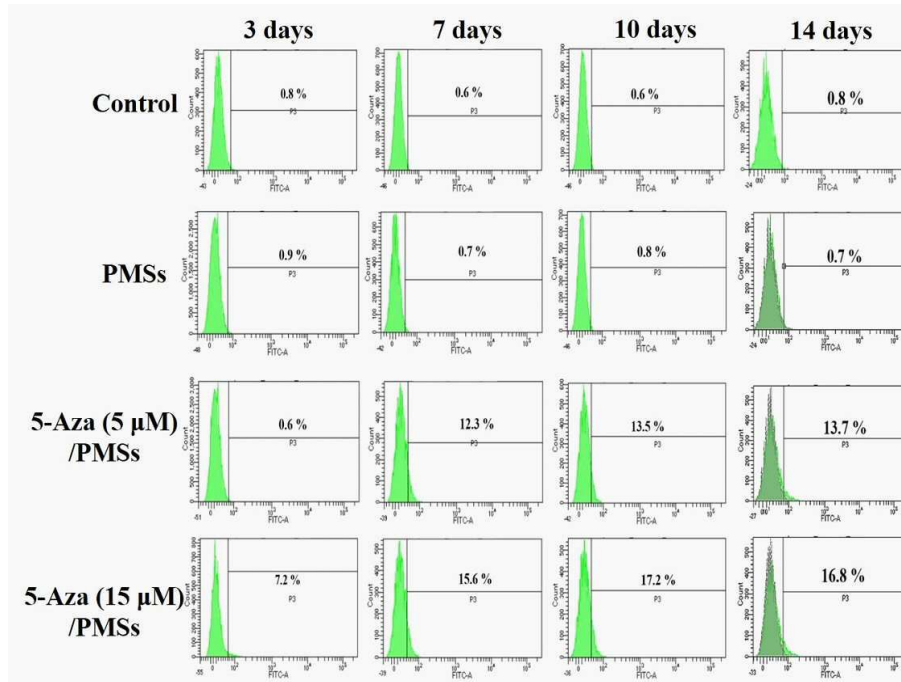
분석 결과, 연골 분화 마커(AggreCAN, Collagen type I, Collagen type II 및 Collagen type X) 발현량은 7, 14 및 21일 동안 증가되지 않아 5-azacytidine (5-Aza)는 연골 분화에 관여하지 않는다는 것을 확인하였다.

[0075]

## 6. 유세포 분석기(FACS)를 이용한 유도만능줄기세포(IPSCs) 분석 I

[0076]

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $5 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여, 3, 7, 10, 14 일에 유세포분석기(FACS)를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 세포에 유도만능 줄기세포(IPSCs) 마커인 TRA-1-60 마커를 5  $\mu$ l 넣고 상온에서 5분간 반응을 한다. 반응 후 magnetic 나노입자를 첨가하여 상온에서 10분간 반응을 한다. 반응 후 특수 자석을 이용하여 유도만능줄기세포 확인 마커(TRA-1-60) 표지된 세포만을 얻어서 FACS 기기를 이용하여 분석하였다.



[0078]

[0080]

[도 6] 유세포분석기(FACS)를 이용하여 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어 지방줄기세포 3, 7, 10, 및 14일간 배양하여 유도만능줄기세포 확인마커(TRA-1-60) 이용하여 유도만능줄기세포(IPSCs) 유도 확인

[0082]

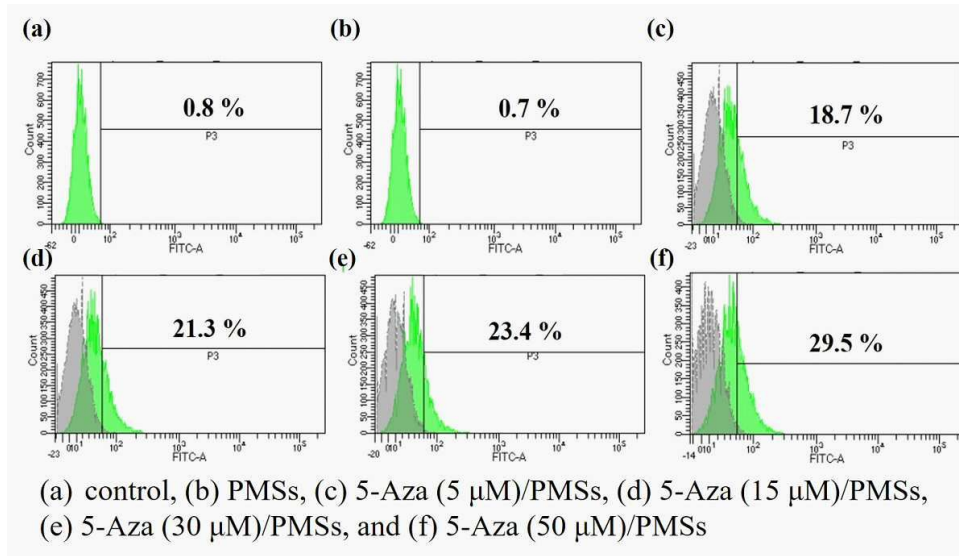
분석 결과 Control과 PMS는 측정 시간이 지남에 따라 유도만능줄기세포 유도되지 못한 반면 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어에 분주된 지방줄기세포는 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커(TRA-1-60) 가 반응을 하였으며 또한 5-azacytidine (5-Aza)농도가 많이 탑재된 다공성 마이크로스피어 분주된 지방줄기세포는 시간이 지날수록 유도만능줄기세포 마커(TRA-1-60) 수치가 증가하였다. 이 결과로 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어는 지방줄기세포를 유도만능줄기세포 유도하는 것으로 확인되었다.

[0084]

## 7. 유세포 분석기(FACS)를 이용한 유도만능줄기세포(IPSCs) 분석 II

[0085]

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $5 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여, 21 일에 유세포분석기(FACS)를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 세포에 IPSCs 확인 마커인 SOX-2를 1:200의 농도를 주입하고 상온에서 30분간 반응을 한다. 반응 후 유세포분석기(FACS)기기를 이용하여 분석하였다.

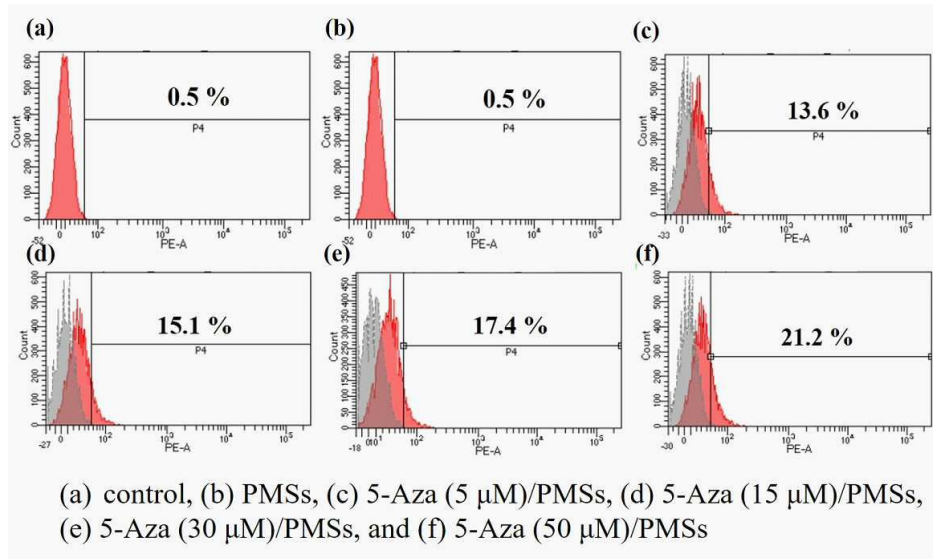


[도 7] 유세포분석기(FACS)를 이용하여 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어 지방줄기세포 21일간 배양하여 유도만능줄기세포 확인마커(SOX-2) 이용하여 유도만능줄기세포(IPSCs) 유도 확인

분석 결과 Control과 PMS는 측정 시간이 지남에 따라 유도만능줄기세포 유도되지 못한 반면 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어에 분주된 지방줄기세포는 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커(SOX 2)가 반응을 하였으며 또한 5-azacytidine (5-Aza)농도가 많이 탑재된 다공성 마이크로스피어 분주된 지방줄기세포는 유도만능줄기세포 마커(SOX 2) 수치가 증가하였다. 이 결과로 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어는 지방줄기세포를 유도만능줄기세포 유도하는 것으로 확인되었다.

### 8. 유세포 분석기(FACS)를 이용한 유도만능줄기세포(IPSCs) 분석 III

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $5 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여, 21 일에 유세포분석기(FACS)를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 PMS로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 세포에 IPSCs 확인 마커인 SSEA 1를 1:200의 농도를 주입하고 상온에서 30분간 반응을 한다. 반응 후 유세포분석기(FACS)기기를 이용하여 분석하였다.

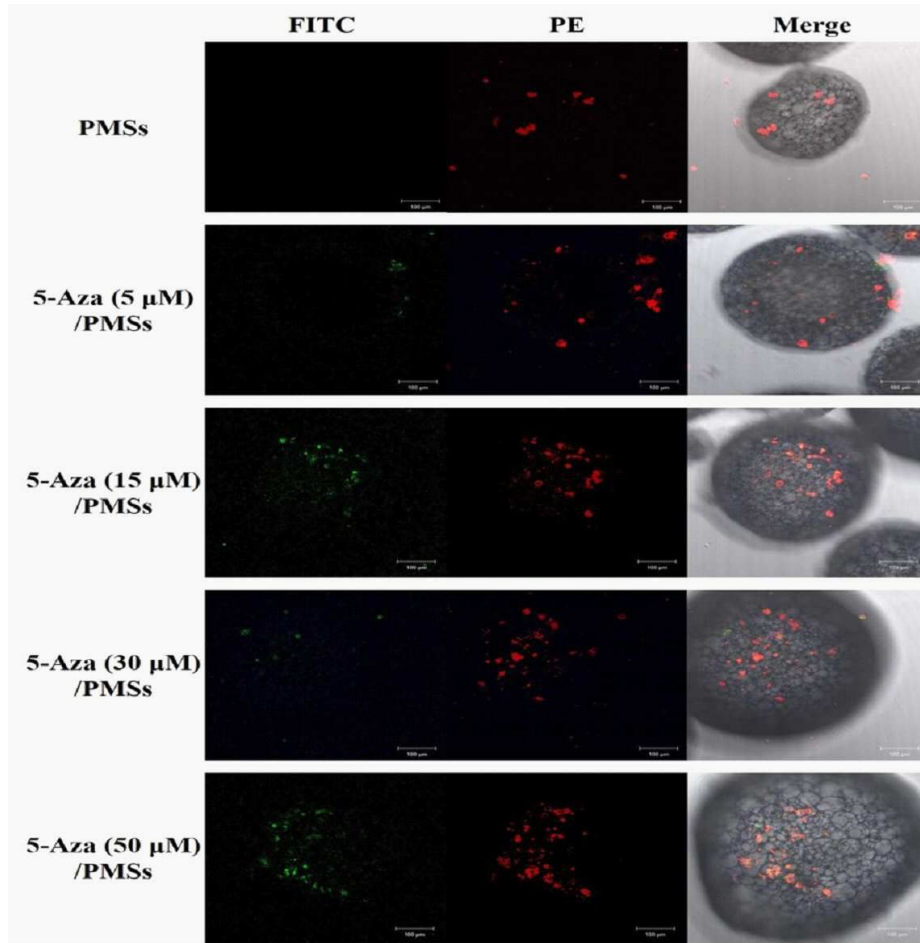


[도 8] 유세포분석기(FACS)를 이용하여 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어 지방줄기세포 21일간 배양하여 유도만능줄기세포 확인마커 (SSEA 1) 이용하여 유도만능줄기세포(IPSCs) 유도 확인

분석 결과 Control과 PMS는 측정 시간이 지남에 따라 유도만능줄기세포 유도되지 못한 반면 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어에 분주된 지방줄기세포는 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커(SSEA 1) 가 반응을 하였으며 또한 5-azacytidine (5-Aza)농도가 많이 탑재된 다공성 마이크로스피어 분주된 지방줄기세포는 유도만능줄기세포 마커(SSEA 1) 수치가 증가하였다. 이 결과로 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어는 지방줄기세포를 유도만능줄기세포 유도하는 것으로 확인되었다.

## 9. 면역세포화학(immunocytochemistry)검사를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인

다공성 마이크로스피어 및 다양한 5-azacytidine (5-Aza)농도 탑재 다공성 마이크로스피어 각 각 10 mg을 24-웰 플레이트에 지방줄기세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 배양하여, 7 일에 면역세포화학(Immunocytochemistry)를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인하였다. 배양 7일 후, 배지를 이용하여 세척을 하고 배지에 유도만능줄기세포 양성 표지자인 TRA-1-60 FITC (녹색 형광)와 음성표지자인 Anti-CD13 PE(빨간색 형광)를 1:200으로 분주하고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 30 분 동안 배양한다. 배양 후, 배지를 이용하여 세척을 하고 다시 배지를 넣어서 공초점현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 유도만능줄기세포(iPSCs) 유도를 확인하였다.



[도 9] 다공성 마이크로스피어 및 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어에 지방줄기세포를 분주하여, 배양 7일에 면역화학검사를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인을 공초점 현미경 확인

확인 결과 위 그림과 같이 PMSs를 제외한 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어에분주된 지방줄기세포가 유도만능줄기세포(IPSCs) 유도 마커(Anti-TRA-1-60 FITC, 녹색)가 발현을 하였으며, 또한 5-azacytidine (5-Aza) 높은 농도가 탑재 다공성 마이크로스피어에서 유도 마커가 진하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 5-azacytidine (5-Aza) 탑재 다공성 마이크로스피어가 유도만능줄기세포 유도하는 것을 확인하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.