



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0022761

(43) 공개일자 2016년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0735 (2010.01) C01B 31/04 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0606 (2013.01)

C01B 31/0438 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0093421

(22) 출원일자 2015년06월30일

심사청구일자 2015년06월30일

(30) 우선권주장

1020140107699 2014년08월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

김정범

경남 김해시 율하1로 64, 403동 1802호 (율하동, 율상마을푸르지오4단지)

박명래

대구 수성구 수성로 411, 101동 1311호 (수성동4가, 화성쌍용타운)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

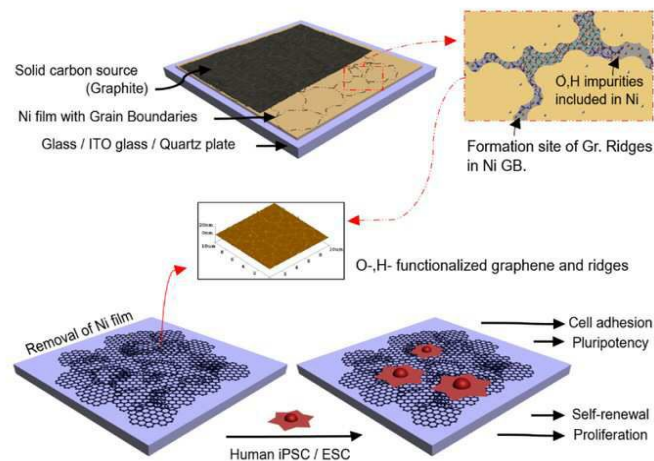
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 피더 비의존적 인간 전분화능줄기세포 배양방법

(57) 요약

본 발명은 생체재료적 특성을 갖는 그래핀 기관을 이용한 인간 전분화능줄기세포 배양방법에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명은 인간 전분화능줄기세포를 분화 없이 자가증식 및 전분화능 유지 가능한 패턴 또는 구조를 갖는 그래핀 기관을 개발하여 피더(feeder) 세포와의 공동배양 없이 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포의 전분화능 특성을 유지하며 장기간 배양할 수 있다. 따라서, 난치성질환 치료에 각광 받고 있는 줄기세포 활용을 극대화할 수 있으며, 줄기세포 배양 및 분화유도를 위한 지지체에 관한 기술수요 가능성 및 기술적 측면에서의 시장 진입이 비교적 높을 것으로 예상된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0696 (2013.01)

C12N 2533/10 (2013.01)

(72) 발명자

권순용

울산 울주군 범서읍 굴화1길 55, 102동 801호 (굴
화강변월드메르디앙)

최재경

울산 중구 병영1길 17-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711002001

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 직접교차분화를 이용한 환자 특이적 유도신경계세포치료제의 개발과 임상적용에 적합한 대
량 생산을 위한 고품격 스캐폴드용 그래핀 저온성장 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

그래핀 기판을 이용한 피더 비의존적(feeder-free) 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 그래핀 기판은 유리(glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 또는 석영(quartz) 기판 상에 그래핀 필름을 직접 합성하는 것을 특징으로 하는 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 그래핀 필름은 확산 기반 합성(diffusion-assisted synthesis; DAS) 공정을 통해 합성되는 것을 특징으로 하는 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 그래핀 기판은 그래핀 릿지(ridges) 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인간 전분화능줄기세포 배양방법은

- 1) 유리(glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 또는 석영(quartz) 기판 상에 다결정 Ni(polycrystalline Ni; poly-Ni) 필름을 올려놓는 단계;
- 2) 상온에서 전자-빔 증착(electron-beam evaporation)을 통해 상기 다결정 Ni 필름에 결정립 경계(grain boundaries; GB)를 형성시키는 단계;
- 3) 상기 GB가 형성된 Ni 필름 상에 흑연 분말을 올려놓고, DAS 방법을 통해 260℃에서 90분 동안 가열하여 그래핀 필름을 합성하는 단계;
- 4) 상기 그래핀 필름이 합성된 기판에서 흑연 분말 및 Ni 필름을 제거하는 단계; 및
- 5) 상기 4) 단계에서 제조된 그래핀 기판에 성장인자를 포함한 최적화된 배양액에서 인간 전분화능줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 전분화능줄기세포는 인간 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 또는 인간 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESC)인 것을 특징으로 하는 인간 전분화능줄기세포 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 생체재료적 특성을 갖는 그래핀 기판을 이용한 피더 비의존적(feeder-free) 인간 전분화능줄기세포 배양방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002]

줄기세포는 손상된 세포 또는 조직을 재생시키는 능력으로 인해, 재생의학, 약물 스크리닝, 조직공학 및 세포 치료 분야에서 각광받고 있다. 전분화능줄기세포는 배아생식세포(embryonic germ cells), 배아줄기세포

(embryonic stem cells; ES cell), 배아암세포(embryonic carcinoma cells; EC cell) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 포함한다. 유도만능줄기세포는 자가재생능력 및 만능성을 가지는데, 이는 세 개의 배엽층을 포함하는 세포의 모든 형태로 분화할 수 있다는 의미이다. 2006년 Yamanaka 등은, 최종 분화된 체세포는 4개의 전사인자에 의해 유도만능줄기세포로 리프로그래밍될 수 있다고 발표하였다. 체세포에서 ESC와 동일한 특성을 발현하는 유도만능줄기세포로의 리프로그래밍은 줄기세포의 제한된 활용성을 극복하는 데 있어 큰 가능성을 보인다. 하지만, 만능성의 유지 및 iPSCs의 분화조절은 여전히 기술적 한계로 남아 있다. 특히, 임상 적용에 있어서, iPSCs 배양 과정 중 사용하는 피더(feeder)는 병원균 감염(pathogen contamination)의 문제가 발생할 수 있다.

[0003]

최근에 탄소 나노기술은 빠르게 개발되고 있고, 특히 그래핀 및 탄소 나노튜브는 이미 산업, 생물과학 및 기초 과학 분야에서 다양하게 적용되고 있다. 그래핀은 탄소 동소체(allotrope)이고, 흑연(graphite)의 얇은 층에 일정한 패턴으로 탄소 원자들이 정렬되어 있다. 산업 및 전자기기에서 탄소 동소체는 널리 사용되고 있으나, 암 치료나 줄기세포 연구에 있어서의 사용은 최근에 시작되었다. 탄소 기반의 나노물질들은 유익한 도구로서 사용될 수 있고, 이러한 나노기술 연구는 줄기세포에 있어서 세포 행동 조절 경로를 조절할 수 있다. 연구자들은 특정 세포 형태 및 목적에 따라 다양한 그래핀 표면을 디자인하였다. 최적화된 그래핀 표면 특성은 신경 줄기세포에서 아교세포(glial cell) 형태 보다는 신경으로의 분화를 촉진시키면서 세포 운명을 조절한다. 더구나, 중간엽 줄기세포, 조골세포(osteoblasts) 및 근원세포(myoblasts)와 같은 다능성 줄기세포의 분화는 그래핀-기반 시트에 의해 조절될 수 있다.

[0004]

본 발명에서는 인간 ES 세포 및 iPSCs 배양에 있어 최적 기관을 확인하고, 증식(expansion) 과정 중 만능성 상태를 유지하기 위한 그래핀 표면의 디자인에 초점을 맞추었다. 본 발명자들은 투명한 기관상에 최적화된 그래핀 필름이 피더를 사용하지 않고도 iPSCs의 미분화된 상태를 유지할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 더구나, 세포 성장 및 효율적인 분화를 촉진시키기 위하여, 줄기세포에 대한 특정 마이크로환경을 제공하기 위한 스캐폴드 디자인에 있어 그래핀 필름을 적용할 수도 있다. 따라서, 본 발명은 바이오-나노물질에 대한 최근 경향을 나타내고 있고, 줄기세포 연구에 있어 그래핀 기술에 대한 새로운 방향을 제시하고 있다.

[0005]

현재 조직 공학 연구 및 세포 치료에는 좋은 생체적합성(biocompatibility) 및 조직 특이적 유도능을 가진 여러 스캐폴드 재료가 조합되어 적용된다. 원하는 세포 형태로 분화를 유도시킬 수 있는 인공적인 스캐폴드는 기술적, 기능적으로 유사하거나 더 나은 조직을 대체함으로써 조직공학에 적용할 수 있다. 최근에, 폴리-비닐 알코올(Poly-Vinyl alcohol; PVA), 키토산, 저차원 탄소 구조(탄소 나노튜브, 그래핀, 그래핀 산화물)와 같은 대체 스캐폴드에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만, 폴리머성 스캐폴드는 대기 중에서 습도 불안정성을 갖고, 키토산 스캐폴드는 그의 생물학적 기원 또는 사용된 추출 과정에 따라 의존적이다. 상기와 같은 이유로 인해, 줄기세포 연구에 널리 활용하기에 스캐폴드는 한계가 있다. 또한, 생체적합성 및 이식가능한 플랫폼에 있어서 뛰어난 물리적 특성을 가진 부드러운 멤브레인 재료인 낮은 차원의 탄소 구조의 경우에도 높은 공정 가격, 고온 공정, 고순도 독성 가스 및 복잡한 사용과 같은 문제점을 가진다. 특히, 그래핀은 독성 화합물의 용도와 관련된 전통적인 전사법에 사용된다. 그리고 소수성 표면에 기능을 부착하는 것은 어렵고, 뼈와 같은 조직 공학에의 적용에도 한계가 있다. 본 발명자들은 그래핀을 추가적으로 개량하여 저온 공정을 가능하게 하였으며, 독성 화합물 사용을 축소하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

(특허문헌 0001) 미국공개특허 US2013/0095083A1(2013.04.18 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 목적은 그래핀 기관을 이용한 피더 비의존적(feeder-free) 인간 전분화능줄기세포 배양방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유리(glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 또는 석영(quartz) 기판 상에 그래핀 필름을 직접 합성하여 제조된 그래핀 기판을 이용하여 피더(feeder) 세포와의 공동 배양 없이 인간 전분화능줄기세포 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 생체재료적 특성을 갖는 그래핀 기판을 이용한 인간 전분화능줄기세포 배양방법에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명은 인간 전분화능줄기세포를 분화 없이 증식이 가능한 패턴 또는 구조를 갖는 그래핀 기판을 개발하여 피더(feeder) 세포와의 공동배양 없이 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포의 전분화능 특성을 유지하며 배양할 수 있다. 따라서, 난치성질환 치료에 각광 받고 있는 줄기세포 활용을 극대화할 수 있으며, 줄기세포 배양 및 분화유도를 위한 지지체에 관한 기술수요 가능성 및 기술적 측면에서의 시장 진입이 비교적 높을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 DAS 공정을 이용하여 원하는 기판상에 넓은 범위의 그래핀을 직접 합성하여 피더(feeder) 없이 인간 전분화능세포를 배양하는 모식도이다.

도 2는 유리(A), ITO(B), 석영(C) 기판 상에 직접 합성된 다층 그래핀 및 기존 CVD 공정으로 합성된 후 기판(D)을 보여주는 AFM 이미지를 나타낸다. 또한, DAS 공정을 이용하여 260℃에서 90분 동안 각 기판에 코팅된 그래핀의 라만 스펙트럼(E) 및 투과도(F)를 나타냈다.

도 3은 DAS 그래핀 필름상의 인간 iPSC 배양 결과이다. (A) 3일 동안 그래핀 필름 상에서 배양된 인간 전분화능 줄기세포의 위상차 이미지를 나타낸다. (B) 14일 동안 그래핀 필름 상에서 배양된 인간 전분화능줄기세포의 위상차 이미지를 나타낸다. (C) 그래핀 상에서 인간 iPSC는 미분화 형태를 유지하며, 10 계대 이상 확장될 수 있다는 것을 나타낸다.

도 4는 DAS-그래핀 기판 상의 인간 iPSC 배양이 만능성을 유지시킬 수 있다는 것을 나타낸다. (A) 면역염색법 분석을 통해 그래핀 상의 인간 전분화능줄기세포에서 만능성 마커 (OCT4, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-81)의 발현을 확인하였다. 세포의 핵은 DAPI로 대비염색 되었다 (B) 배아줄기세포체(embryonic body) 형성을 통한 분화를 유도한 후, 전분화능줄기세포의 세 개 배양층 마커를 검출하기 위해서, 면역염색법 분석을 수행하였다. 세포들은 *Tuj1* (외배엽), α -SMA (중배엽) 및 AFP (내배엽)으로 염색되었다. 핵은 DAPI로 염색되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 최근에 본 발명자들은 이전의 약점을 극복하기 위해서, 낮은 온도에서 확산 기반 합성(diffusion-assisted synthesis; DAS) 공정을 통해 원하는 기판 상에서 그래핀 필름의 무전사 성장(transfer-free growth)을 확인하였다. 본 발명자들은 낮은 온도($\leq 260^\circ\text{C}$)에서 유리, 석영, 인듐 주석 산화물(indium tin oxide) 및 가변 폴리머(flexible polymer)와 같이 원하는 기판 상에 그래핀 필름을 직접 합성하기 위한 DAS 방법을 도 1(A)에 나타냈다. 우선, 다결정 Ni 필름을 투명한 유리-유사 기판 상에 올려놓았다. 상온에서 올려놓은 얇은 Ni 필름의 경우, 평균 그래인(grain) 사이즈가 약 50nm였다. 고밀도 그래핀 릿지(ridges) 구조를 얻기 위해서, 올려놓은 Ni 필름은 더 이상 열처리하지 않았다. 이는 Ni 필름 상에 산소, 수소의 원자 불순물을 남게 하였다. 다음으로, 고체 탄소원으로서 흑연 분말을 Ni 필름 상에 뿌렸다. 그 후, ~1MPa로 압력을 가한 C-Ni/기판 확산 커플은 260℃에서 90분 동안 가열한 후 대기 중 아르곤 가스의 유입 하에서 결합되었다. 고체 탄소원을 제거한 다음, 샘플들은 초음파에 의해 몇 초동안 처리되었고, Ni 필름은 기판으로부터 예칭되었다. 최종 Ni 필름은 다결정 결정립 경계(grain boundaries; GB)를 갖고, 이는 C-원자 확산에서 GB로 릿지(ridges)가 형성된다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 이러한 릿지(ridges)구조는 피더를 대체 할 수 있는 입체구조를 세포에 제공한다.

[0012] 본 발명은 그래핀 기판을 이용한 피더 비의존적(feeder-free) 인간 전분화능줄기세포 배양방법을 제공한다.

[0013] 상세하게는, 상기 그래핀 기판은 유리(glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 또는 석영(quartz) 기판 상에 그래핀 필름을 직접 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 상기 그래핀 필름은 확산 기반 합성(diffusion-assisted synthesis; DAS) 공정을 통해 합성될 수 있다.

- [0014] 상세하게는, 상기 그래핀 기판은 그래핀 릿지(ridges) 구조를 갖는다.
- [0015] 상세하게는, 상기 인간 전분화능줄기세포 배양방법은 1) 유리(glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 또는 석영(quartz) 기판 상에 다결정 Ni(polycrystalline Ni; poly-Ni) 필름을 올려놓는 단계; 2) 상온에서 전자-빔 증착(electron-beam evaporation)을 통해 상기 다결정 Ni 필름에 결정립 경계(grain boundaries; GB)를 형성시키는 단계; 3) 상기 GB가 형성된 Ni 필름 상에 흑연 분말을 올려놓고, DAS 방법을 통해 260℃에서 90분 동안 가열하여 그래핀 필름을 합성하는 단계; 4) 상기 그래핀 필름이 합성된 기판에서 흑연 분말 및 Ni 필름을 제거하는 단계; 및 5) 상기 4) 단계에서 제조된 그래핀 기판에 성장인자를 포함한 최적화된 배양액에서 인간 전분화능줄기세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 인간 전분화능줄기세포는 인간 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 또는 인간 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESC)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 명세서에 있어서, '그래핀'은 탄소원자가 육각형 형태의 벌집 모양으로 연결된 한 층으로 구성된 인공 나노 물질로서 강철보다 200배 이상 강하고 구리보다 100배 이상 전기가 잘 통하는 등의 우수한 물리적, 전기적 특성을 가져 주목받는 꿈의 신소재이다.
- [0018] 본 명세서에 있어서, '확산 기반 합성(diffusion-assisted synthesis; DAS) 공정'은 니켈 박막을 이용해 상온에 가까운 저온(약 200℃)에서 실리콘이나 유리, 플라스틱 등 원하는 기판에 그래핀을 직접 합성하는 방법이다.
- [0019] 기존의 화학기상증착법(Chemical Vapor Deposition; CVD)에 의해 그래핀을 합성하기 위해서는 1000℃에서 금속 기판 위에 그래핀을 합성한 후 원하는 기판으로 전사하는 복잡한 공정이 필요했으나, DAS 공정은 훨씬 더 낮은 온도에서 그래핀을 원하는 기판에 직접 합성할 수 있다.
- [0020] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0021] <실험예>
- [0022] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0023] 1. 세포 배양
- [0024] 인간 전분화능줄기세포는 20% knockout serum replacement (GIBCO-10828), 1mM L-glutamine, 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)(PAA-P11-010), 1% MEM-non essential amino acid(PAA-M11-003), 0.1mM β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol), 5ng/ml human basic fibroblast growth factor 및 100ng/ml Activin A가 첨가된 knockout DMEM (GIBCO-10829)이 포함된 인간 배아줄기세포 배지에서 배양하였다. 상기 세포들은 미토마이신 C(mitomycin-C)-처리된 마우스 배아 섬유아세포인, CF1 피더(feeder)에서 배양하였다. 미분화된 콜로니들만 골라내어 2차 배양하였다.
- [0025] 2. 정량 실시간 PCR
- [0026] DNA-free total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen)을 사용하여 추출하였다. 반응 당 500ng의 총 RNA를 사용하여, SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen)에 의해 cDNAs 합성을 수행하였다. 합성된 cDNA는 PCRquick-spin (iNtRON)을 사용하여 정제하였고, LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)를 이용하여 총 20ul의 부피로 25ng의 정제된 cDNA가 주형으로 사용되었다. 실험은 3번 반복하여 수행하였고, 하우스키핑

(housekeeping) 유전자 *GAPDH*로 표준화하였다. 유전자 발현은 Ct 계산법에 의해 측정하였다.

[0027]

3. 면역세포화학 염색

[0028]

인간 전분화능줄기세포는 4% 파라-포름알데히드(para-formaldehyde)로 10분 동안 고정시켰고, 0.1% Triton X-100으로 10분 동안 투과시켰다. 세포는 4% FBS 차단 용액(blocking solution)으로 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 차단용액에 희석된 1차 항체로 1시간 동안 반응시켰다: OCT3/4(Santa Cruz, 1:200), SSEA-4(Millipore, 1:200), TRA-1-60(Millipore, 1:200), TRA-1-81(Millipore, 1:200), Tuji (Millipore, 1:200), α -Smooth Muscle actin (Abcam, 1:250), AFP (DAKO, 1:200). 2차 항체는 1시간 동안 반응시켰고, PBS에 다음의 농도로 희석하였다: Alexa Fluor 488/568 anti-mouse IgG1, IgG2A, IgG3, IgM, anti-goat IgG(Invitrogen, 1:1000). 모든 단계는 상온에서 수행되었다.

[0029]

4. 시험관 내 분화

[0030]

시험관 내에서 세 개의 배엽층 발달을 확인하기 위해서, 배아줄기세포체(embryonic body; EB) 형성 실험을 수행하였다. 수확된 세포는 분화 배지(hFGF 없는 hESC 배지)로 옮겼고, 현탁법(hanging-drop method)을 수행하였다. 현탁 배양은 배양 플레이트의 뚜껑에 세포가 포함된 20 μ l drop을 올려놓음으로써 수행하였다. 증착을 위해 플레이트를 PBS로 채웠다. 배양 1주일 후, 세포 매스를 젤라틴-코팅된 플레이트로 옮기고, EBs가 플레이트에 단단히 부착될 때까지 배양하였다.

[0031]

5. DAS-그래핀 제조

[0032]

다결정 Ni(polycrystalline Ni; poly-Ni)의 50-nm-두께 필름은 ~25 $^{\circ}$ C로 낮은 온도에서 전자-빔 증착(electron-beam evaporation)을 통해 실리카-글라스(silica-glass), 인듐 주석 산화물(indium tin oxide; ITO) 및 석영 기판 상에 놓았다. 투명한 유리 기판은 받자마자 사용하였다. 다음으로, Ni 필름/글라스는 몰리브덴(molybdenum) 홀더 상에 놓았고, Ni 필름/글라스는 흑연 분말(Aldrich, product number 496596)로 코팅한 후, 상기 흑연 분말을 Ni 표면에 압축하였다. 그래핀은 확산 기반 합성(diffusion-assisted synthesis; DAS) 방법에 의해 합성되었다. 260 $^{\circ}$ C에서 90분 동안, 약 4nm-두께의 다층 그래핀을 합성하였다(아르곤 가스). 그래핀의 합성 전에, 본 발명자들은 동일한 합성 온도 260 $^{\circ}$ C에서 아르곤 가스로 온도를 포화시켰다.

[0033]

6. 기존 화학기상증착법(Cheical Vapor Deposition; CVD) 그래핀 제조

[0034]

Pt 필름 기판으로 전이 금속을 사용하여 CVD를 합성하는 방법을 수행하였다. 투명한 기판으로의 전달 공정 전에, SiO₂/Si 상에 Pt 필름(80nm-두께, The G-Mek corp.)을 사용하여 SLG를 합성하였다. Pt 기판을 석영 튜브에 로딩한 후, 샘플들은 975 $^{\circ}$ C 온도로 가열하였고, CH₄/H₂ 가스 혼합물 하에서 10분 동안 유지하였다(각각 5 및 50sccm). 용광로는 자연 냉각물로 상온으로 식혔다. 그래핀을 투명 기판으로 전달하기 위해서, 전달 방법으로는 폴리(메틸 메타크릴레이트)(Poly(methyl methacrylate); PMMA)를 사용하였다. 지지체로서 작용하기 위한 그래핀 상에 PMMA 층을 스핀 코팅하였다. PMMA/그래핀이 유리, ITO, 석영 및 SiO₂/Si 기판으로 전달된 후, PMMA/그래핀 및 Pt 필름 사이를 분리하기 위해서 NaOH 거품 전달 방법을 사용하였다. 그 후, PMMA를 제거하기 위해서 아세톤을 사용하였다. 하지만, PMMA로 인해 약간의 잔여물이 포함된 연속 그래핀이 만들어졌다.

[0035]

[0036]

<실시예 1> DAS 방법을 통한 투명 기판상 그래핀의 직접 합성

[0037]

본 발명자들은 낮은 온도($\leq 260^{\circ}$ C)에서 유리, 석영, 인듐 주석 산화물 및 가변 폴리머(flexible polymer)와 같은 원하는 기판상에 그래핀 필름을 직접 합성하기 위한 DAS 방법을 도 1에 나타냈다. 우선, 다결정 Ni 필름을 투명한 유리-유사 기판상에 올려놓았다. 상온에서 얇은 Ni 필름을 올려놓을 경우, 평균 그래인(grain) 사이즈는 약 50nm였다. 고밀도 그래핀 릿지(ridges) 구조를 얻기 위해서, 올려놓은 Ni 필름은 더 이상 열처리하지 않았다. 이는 Ni 필름 상에 산소, 수소의 원자 불순물을 남게 하였다. 다음으로, 고체 탄소원으로서 흑연 분말을 Ni 필름상에 뿌렸다. 그 후, ~1MPa로 압력을 가한 C-Ni/기판 확산 커플은 260 $^{\circ}$ C에서 90분 동안 가열한 후 대

기 중 아르곤 가스의 유입 하에서 결합되었다. 고체 탄소원을 제거한 다음, 샘플들은 초음파에 의해 몇 초 동안 처리되었고, Ni 필름은 기관으로부터 에칭되었다. 최종 Ni 필름은 다결정 결정립 경계(grain boundaries; GB)를 갖고, 이는 C-원자 확산에서 GB로 릿지(ridges)가 형성된다는 것을 확인하였다. 본 발명자들은 실리카-글라스, 인듐 주석 산화물(Indium-Tin-Oxide; ITO) 및 석영 기관 상에 그래핀을 제조하여 본 발명의 적용가능성을 살펴 보았다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 4nm-두께의 다결정 그래핀 층은 유리 상에 잘 합성되었고, 인근 그래핀 릿지 사이의 간격은 2 μ m이었다. 그래핀 릿지의 두께는 AFM 프로파일에 의해 측정되었는데, 이는 그래핀 바닥의 거의 2배인 7nm였다. 릿지 및 바닥의 비율은 석영 플레이트와 매우 유사했는데(도 2C), 이는 조직 공학에 적용하기에 3차원 구조가 더 좋다는 것을 의미한다. 하지만, ITO 상의 그래핀은 그 형태를 따로 언급하기 어려운데, 이는 150nm-두께의 ITO 필름은 도 2B에 나타난 바와 같이 거칠기 때문이다. 다결정 그래핀의 합성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 모든 기관의 표면을 라만 분광법(Raman spectroscopy)을 사용하여 확인하였다. 이들은 3가지의 1차적 특성을 나타냈다: D 밴드는 $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$, G 밴드는 $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ 및 2D 밴드는 $\sim 2680\text{ cm}^{-1}$ 이고, 모두 그래핀의 피크 위치로 예상되었다(도 2E). 이러한 DAS 그래핀의 특성은 CVD 그래핀과 패턴이 확연히 다른 점을 확인할 수 있었다. 그래핀 합성이 O-H 불순물, 다결정 구조 및 기관 배경에 대한 원하지 않는 스캐터링에 의해 도핑된 것인지 확인하기 위해서 2D 결과를 얻었다. 도 2F에 나타난 바와 같이, 모든 기관에서 260°C, 90분 동안 합성된 그래핀층의 경우, 550nm의 빛 파장에서 90%의 빛 투과도를 보였다. 이는 투명한 유리-유사 기관이 형광 바이오 이미징 및 값비싼 공정에 있어서 결정적인 역할 수행이 가능한 투과도이다. 어떤 형태의 기관인지와 무관하게, 연속 그래핀으로 커버된 다층 그래핀 릿지 부분은 GB에 의해 형성되었다. 결국, 본 발명의 그래핀 형태는 기관보다는 올려진 Ni 필름의 구조 형태에 따라 더 두꺼워졌다. 이는 도 2D에 나타난 기존의 CVD 그래핀의 평면 형태와는 달리, 본 발명의 그래핀은 세포 형태를 기반으로 한 바이오스캐폴드에 있어 여러 장점을 제공한다. 상기 다층 그래핀 릿지는 줄기 세포의 성장, 부착 및 최종 운명에 영향을 미칠 수 있다.

[0038]

<실시예 2> 피더 없이 DAS-그래핀 기관 상에서 자가재생 및 만능성을 유지할 수 있는 인간 전분화능줄기세포

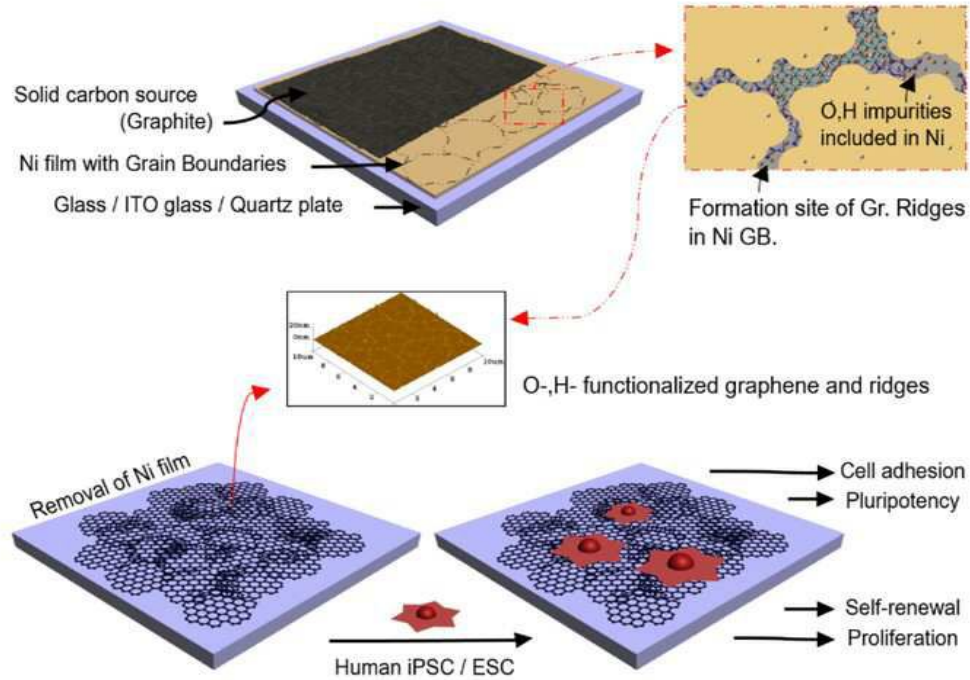
[0039]

인간 ESC 또는 iPSC 배양을 위한 피더 비의존적(feeder-free) 조건을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 그래핀 코팅된 유리, ITO 글라스 및 석영 기관 상에서 iPSC 배양을 수행하였다(도 3A). 1일 후, 상기 세포는 그래핀 상에 부착하였다. 상기 세포는 14일간의 배양기간 동안 자가재생능력 및 만능성을 유지하면서 더 큰 콜로니로 증식되고 확장되었다(도 3B). 그래핀 상에 배양된 iPCS는 피더 세포 상에서 배양된 iPCS와 유사한 형태를 나타냈다. 반면, CVD 그래핀 상에서 배양된 iPCS는 낮은 부착율을 보이며, 미분화상태를 유지하지 못하고 분화되는 것을 확인하였다. 본 발명자들은 그래핀 상에서 10 계대 이상 배양을 하였을 시에도 iPSC의 미분화상태를 유지할 수 있었다(도 3C). 그래핀이 인간 전분화능줄기세포의 만능성 유지를 뒷받침하는지 확인하기 위해서, 그래핀 상 인간 H9 ESC 및 iPSC를 OCT4, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-81과 같은 만능성 특이적 단백질 마커로 면역염색하였다(도 4A). 이는 세 개의 배엽층에 대한 만능성 및 분화능력을 뒷받침하는 결과이다. 또한, 만능성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 그래핀 상의 인간 ESC 및 iPSC의 시험관 내 분화를 유도하였다. 그래핀 표면으로부터 인간 전분화능줄기세포를 모았고, 시험관 내 분화 분석을 수행하였다. 상기 세포들은 배아줄기세포체(embryonic body)를 성공적으로 형성하였고, 모두 세 개의 배엽층, 외배엽(TUJ1), 중배엽(α -SMA) 및 내배엽(AFP)으로 분화하였다(도 4B).

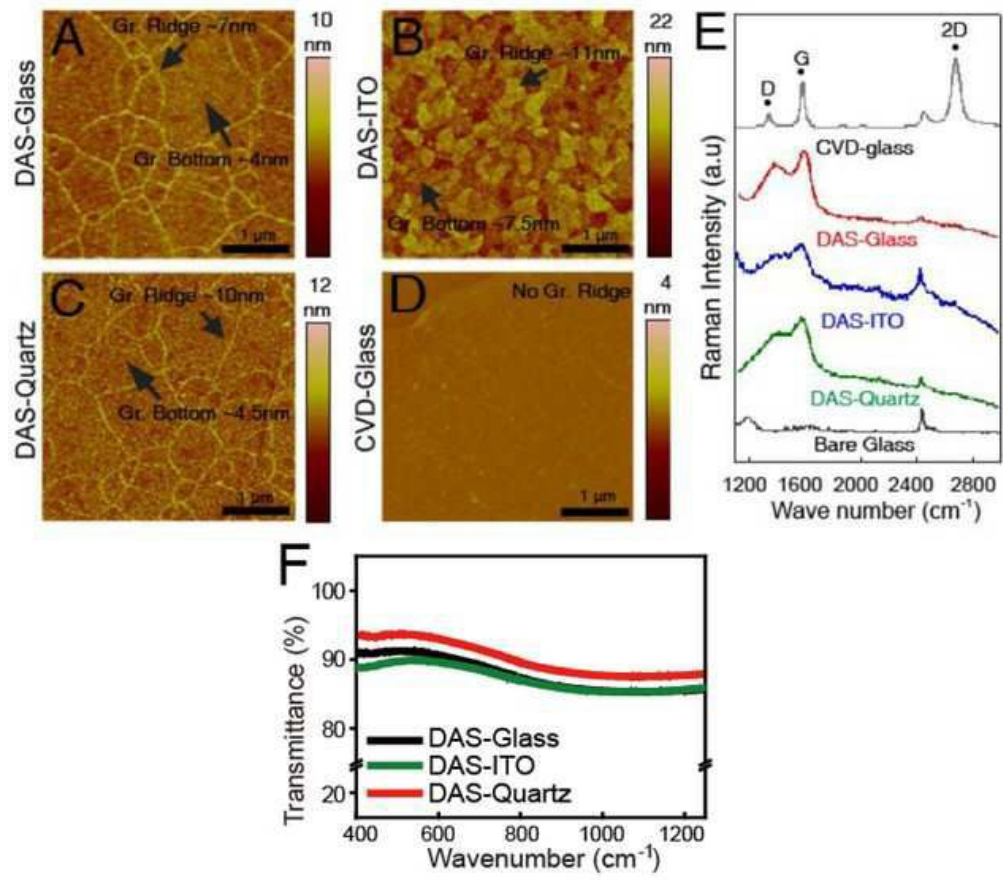
[0040]

도면

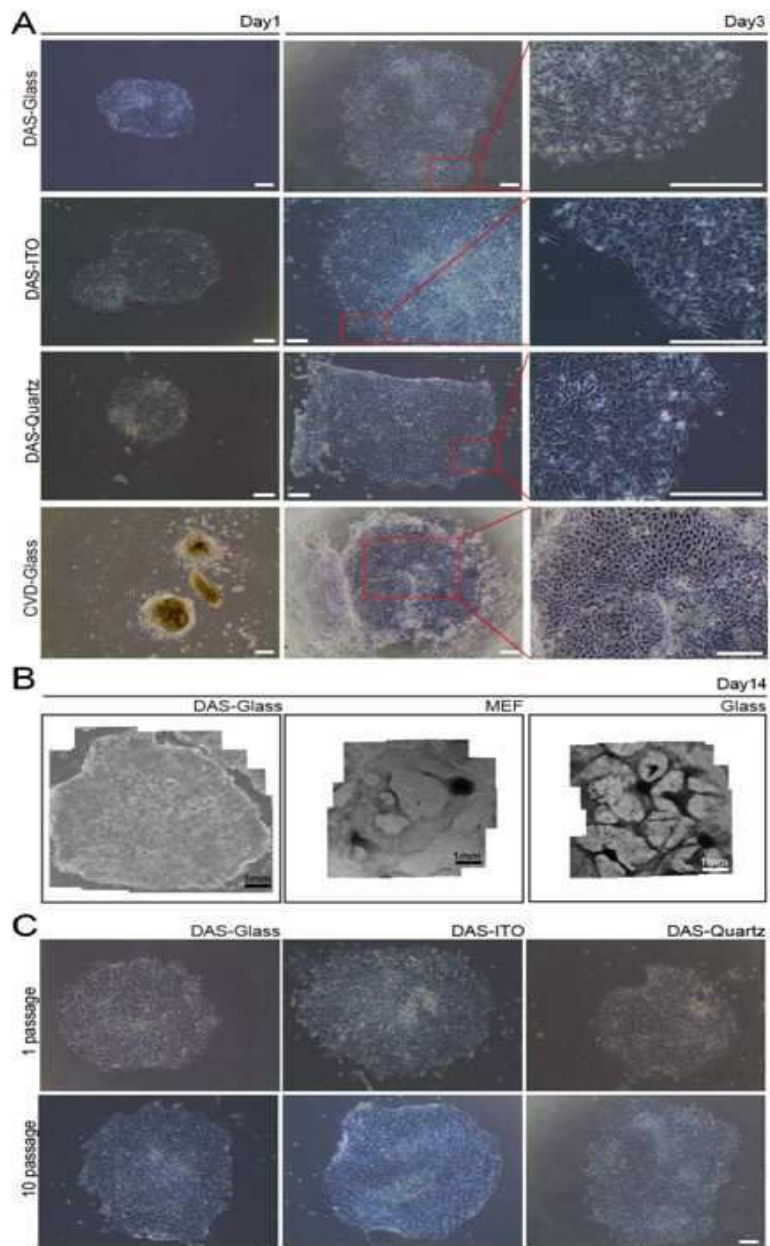
도면1



도면2



도면3



도면4

