

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 6월 27일 (27.06.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/136461 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 13/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/021135

(22) 국제출원일:

2023년 12월 20일 (20.12.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0180753 2022년 12월 21일 (21.12.2022) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWH A UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR). 재단법인 한국탄소산업진흥원 (KOREA CARBON INDUSTRY PROMOTION AGENCY) [KR/KR]; 54853 전라북도 전주시 덕진구 방릉로 110-11, Jeollabuk-do (KR).

(72) 발명자: 조인호 (JO, In Ho); 05502 서울특별시 송파구 올림픽로 135, 203-2401, Seoul (KR). 황지영 (HWANG, Ji Young); 54852 전라북도 전주시 덕진구 비석달로

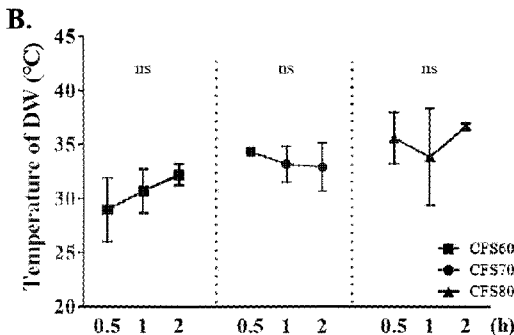
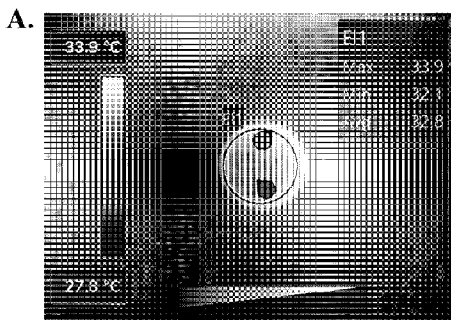
111, 301, Jeollabuk-do (KR). 오세영 (OH, Se Young); 07985 서울특별시 양천구 안양천로 1071, A-817, Seoul (KR). 최영민 (CHOI, Young Min); 08854 서울특별시 관악구 난곡로30길 7-3, 101, Seoul (KR). 김한수 (KIM, Han Su); 07985 서울특별시 양천구 안양천로 1071, Seoul (KR). 김하영 (KIM, Ha Young); 07804 서울특별시 강서구 마곡동로2길 25, B2, Seoul (KR). 박영수 (PARK, Young Soo); 55313 전라북도 완주군 봉동읍 봉비로 176, 110-1102, Jeollabuk-do (KR). 공다영 (KONG, Da Young); 55060 전라북도 전주시 완산구 봉곡2길 25, 205, Jeollabuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: METHOD FOR PROMOTING OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS BY USING FAR INFRARED RADIATION EMITTED FROM CARBON FIBER SHEET-BASED PLANAR HEATING DEVICE

(54) 발명의 명칭: 탄소섬유시트 기반의 면상발열체에서 방출되는 원적외선을 이용한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골분화 촉진 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for proliferating, differentiating, or promoting stem cells into osteogenic cells by using a planar heating element device made of a carbon fiber sheet. More specifically, when a planar heating element device made of a carbon fiber sheet is designed and used for proliferation or differentiation of stem cells into osteogenic cells, compared to a conventional ceramic lamp heating element, it is possible to maintain a temperature suitable for cell proliferation or differentiation for a long time by providing uniform heat and far infrared radiation throughout the heating area, thereby minimizing power consumption without causing damage to cells and tissues, as well as exhibiting excellent osteogenic cell proliferation and differentiation capabilities.

(57) 요약서: 본 발명은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 이용하여 줄기세포를 골형성 세포로 증식, 분화 또는 이들을 촉진시키는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고 이를 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식 또는 분화에 이용하는 경우 종래 세라믹 램프 발열체를 이용하는 경우에 비하여, 발열면적 전체에 걸쳐 균일한 열과 원적외선을 제공함으로써 세포 증식 또는 분화에 적절한 온도를 장시간 유지할 수 있어 세포 및 조직의 손상을 초래하지 않고 전력 소비를 최소화할 뿐만 아니라, 우수한 골형성 세포 증식능 및 분화능을 나타낼 수 있다.

[다음 쪽 계속]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 탄소섬유시트 기반의 면상발열체에서 방출되는 원적외선을 이용한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골분화 촉진 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 이용한 줄기세포의 골형성 세포로의 증식, 분화, 또는 이들의 촉진방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 골다공증은 50세 이상 여성 3명 중 1명, 남성 5명 중 1명에서 발생하는 흔한 뼈 관련 질환으로, 노화와 폐경에 따라 유병률이 증가한다. 많은 요인들이 골다공증을 유발할 수 있지만 칼슘 동화/이화 대사의 불균형은 골다공증을 일으키는 주요 요인 중 하나이다. 혈중 칼슘은 심장 근육, 신경 및 혈관뿐만 아니라 다른 중요한 생물학적 활동을 지원하는 데 중요하다. 혈중 칼슘 항상성을 유지하기 위해 뼈 조직은 지속적으로 흡수와 재흡수를 거치며, 칼슘 대사의 불균형으로 인해 골다공증이 발생한다. 뼈 교체율은 일반적으로 노화와 산화 스트레스에 따라 감소하며 지방 조직이 새로운 뼈 조직을 대신하여 뼈의 질량이 감소하고 결과적으로 뼈의 취약성과 골절이 증가하게 된다. 골다공증 치료에는 RANKL 억제제,비스포스포네이트 등 여러 약물이 사용되나 이들 중 많은 약물이 골통증, 혈소판감소증, 말초부종을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 안전한 골다공증 치료제가 여전히 필요하다.
- [3] 원적외선(far infrared radiation, FIR)은 국제조명위원회에 따라 설정된 파장 범위가 3~1000 μm 인 눈에 보이지 않는 전자기 복사이다. 일반적으로 FIR은 에너지를 순수한 열로 변환한 다음 피부 세포의 열수용체에 의해 복사열로 인식되는 것으로 알려져 있다. FIR 조사는 또한 물 분자의 거동을 조절하여 다양한 생물학적 구조와 세포 활동을 변경한다. 예를 들어, FIR 조사는 인간 제대 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)와 암세포인 쥐의 흑색종 세포의 증식을 억제한다. FIR 조사는 또한 내피 세포(endothelial cell, EC)의 산화질소(nitric oxide, NO) 생성을 증가시켜 혈관의 확장을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명자의 최근 연구에서는 FIR이 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 분화 잠재력을 조절한다는 것을 보여주었으며, 더불어 FIR이 TRP(transient receptor potential) 2 채널을 활성화함으로써 세포내 Ca^{2+} 를 증가시킴으로써 편도 유래 중간엽 줄기세포(tonsil MSC, TMSC)의 지방 생성을 조절한다는 것을 밝혔다. 그러나 FIR에 의한 골형성의 기전은 아직 규명되지 않았다.
- [4] 골수에 상주하는 중간엽 줄기세포는 골수에 상주하는 중간엽 줄기세포의 골형성 분화를 선호하는 기술에 초점을 맞추기 때문에 FIR 치료의 이상적인 표적이다. 그러나 골수유래 중간엽 줄기세포(bone marrow MSC, BM-MSC)는 일반적으

로 연구 또는 치료 용도로 많은 수를 확보하기 어렵고 증식 및 분화 가능성은 계대가 진행됨에 따라 크게 감소한다.

- [5] 한편, 종래 세포 배양(또는 분화)의 온도를 유지하기 위해 적용되는 발열체로 니크롬선 및 구리선을 이용한 선상의 세라믹램프 발열체가 사용되었다. 그러나 이러한 발열체는 발열면적 전체에 걸쳐 균일한 열을 제공하지 못하고, 발열체 자체의 온도가 500°C 이상의 고온으로 장시간 발열시에 열에 의한 세포 및 조직의 손상이 문제되며, 고온 발열을 위한 전력 소비가 크다는 문제가 존재하는 실정이다.
- [6] 반면, 상기의 선상발열체와 달리 탄소섬유시트 면상발열체는 면상 전체에서 고르게 발열이 발생하는 특징이 있으며, 선상발열체에 비해 발열체의 빠른 온도 조절이 용이하며 우수한 열확산 및 발산 특성으로 인해 에너지 소비 효율이 높다는 장점이 있다.
- [7] 이에, 본 발명의 발명자들은 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선이 줄기세포의 골형성을 유도할 수 있음에 착안하여, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고 이를 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식 또는 분화에 이용하는 경우 종래 세라믹램프 발열체를 이용하는 경우에 비하여, 발열면적 전체에 걸쳐 균일한 열과 원적외선을 제공함으로써 적정 온도를 장시간 유지할 수 있어 세포 및 조직의 손상을 초래하지 않고 전력 소비를 최소화할 뿐만 아니라, 우수한 골형성 세포 증식능 및 분화능을 나타낼 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 고려하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고, 상기 면상발열체 장치를 이용하여 줄기세포의 골형성 세포로의 증식, 분화 또는 이들의 촉진방법에 응용하고자 하는 것이다.
- [9] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포의 골형성 세포로의 증식, 분화 또는 이들의 촉진방법에 있어서, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 통하여 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [11] 상기 줄기세포에 인가되는 에너지는 상기 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선일 수 있다.
- [12] 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 온도는 30 내지 90 °C일 수 있다.

- [13] 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 시간은 10 분 내지 10 시간일 수 있다.
- [14] 상기 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포, 지방유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈유래 중간엽 줄기세포, 유도만능줄기세포 및 배아 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [15] 상기 골형성 세포는 골형성계(Osteogenic) 세포, 전골모세포(Pre-osteoblast), 골 모세포(Osteoblast) 및 골세포(Ostocyte)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [16] 상기 에너지를 인가받은 줄기세포를 배양 배지에서 배양하는 과정을 추가로 포함할 수 있다.
- [17] 상기 배양 배지는 골형성 유도 배지일 수 있다.
- [18] 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 상기 줄기세포가 배치되는 하부 플레이트; 상기 하부 플레이트의 상부 영역에 상기 하부 플레이트에 대해 이격되어 배치되는 상부 플레이트; 상기 상부 플레이트와 상기 하부 플레이트에 연결되는 가이드 샤프트; 상기 가이드 샤프트에 이동 가능하게 연결되며, 상기 배양용기에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이동되는 승강 스테이지유닛; 상기 상부 플레이트에 결합되고, 상기 승강 스테이지유닛에 연결되며, 상기 승강 스테이지유닛을 이동시키는 이동유닛; 및 상기 승강 스테이지유닛에 결합되며, 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 탄소섬유시트 면상발열체가 장착된 발열유닛을 포함하는 것일 수 있다.
- [19] 상기 발열유닛은, 상기 탄소섬유시트 면상발열체; 상기 승강 스테이지유닛의 하면에 결합되는 단열블록; 상기 단열블록의 하면에 결합되며, 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 상부에 배치되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 상면을 커버하는 제1소수성필름; 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 하부에 배치되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 하면을 커버하는 제2소수성필름; 및 상기 탄소섬유시트 면상발열체에 부착되는 금속전극을 포함하는 것일 수 있다.
- [20] 상기 단열블록에는, 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 온도를 측정하는 온도 측정기가 장착되는 것일 수 있다.
- [21] 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 상기 온도 측정기와 연결되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 발열온도를 제어하는 온도조절기가 추가로 장착되는 것일 수 있다.
- [22] 상기 승강 스테이지유닛은, 상기 이동유닛에 연결되는 승강 플레이트; 및 상기 승강 플레이트에 결합되며, 상기 가이드 샤프트의 외주면에 슬라이딩 이동 가능하게 연결되는 가이드 부시를 포함하는 것일 수 있다.
- [23] 상기 이동유닛은, 상기 상부 플레이트에 결합되는 고정 허브; 상기 고정 허브에 나사결합되며, 상기 승강 플레이트에 회전 가능하게 결합되는 스크류 샤프트; 및 상기 스크류 샤프트에 결합되며 상기 스크류 샤프트를 회전시키는 회전부재를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [24] 본 발명에 따르면, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고 이를 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식, 분화 또는 이들의 촉진에 이용함으로써, 종래 세라믹램프 발열체를 이용하는 경우에 비하여, 발열면적 전체에 걸쳐 균일한 열과 원적외선을 제공함으로써 세포 증식 또는 분화에 적절한 온도를 장시간 유지할 수 있어 세포 및 조직의 손상을 초래하지 않고 전력 소비를 최소화할 뿐만 아니라, 우수한 골형성 세포 증식능 및 분화능을 나타낼 수 있다.
- [25] 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

- [26] 도 1은 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS) 조사의 시간경과에 따른 온도변화 분석 결과로서, (A) 열화상 카메라 촬영 이미지 및 (B) 시간 경과에 따른 증류수의 온도를 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 2는 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)이 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 생존도 및 증식에 미치는 영향 분석한 결과로서, (A) MTT 분석 그래프, (B) Annexin V 세포 사멸 분석 결과 이미지와 이를 수치화 한 그래프, 및 (C) 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU) 세포 증식 분석 결과 그래프이다.
- [28] 도 3은 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)이 골형성 분화에 미치는 영향 분석한 결과로, (A) Alizarin red S 염색 분석 결과 이미지와 이를 수치화 한 그래프, 및 (B) 웨스턴 블롯 분석 결과 이미지와 이를 수치화 한 그래프이다.
- [29] 도 4는 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 나타낸 도면이다.
- [30] 도 5는 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 실제로 촬영한 이미지이다.
- [31] 도 6은 도 1에 도시된 발열유닛을 분해한 도면이다.
- [32] 도 7은 도 1에 도시된 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 배양용기가 놓인 상태를 나타낸 도면이다.
- [33] 도 8은 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 발열유닛의 측면도이다.
- [34] 도 9는 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 의해 60°C로 가열된 발열 유닛을 열화상카메라로 촬영한 영상 및 가열시간에 따른 온도변화를 나타낸 그래프(A. Heating to 60°C by the CF sheet)와, 60°C에서 가열된 하부 플레이트를 열화상 카메라로 촬영한 영상과 가열시간에 따른 온도변화를 나타낸 그래프(B. Cutting Mat at 60°C)를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면들을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 본 발명의 실시예는 여러 가지 형태로 변형할 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시예들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 도면에서의 요소의 형상은 보다 명확한 설명을 강조하기 위해 과장되었다.
- [36]
- [37] 줄기세포의 골형성 세포로의 증식, 분화 또는 이들의 촉진방법
- [38] 본 발명은 줄기세포의 골형성 세포로의 증식 또는 분화방법에 있어서, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 통하여 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 줄기세포의 골형성 세포로의 증식 또는 분화방법은, 줄기세포의 골형성 세포로의 증식 또는 분화를 유도하거나 또는 촉진하는 것을 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는 종래 세포 배양 또는 분화에 사용되던 세라믹 램프에 비하여 전기전도성 및 열전도성이 우수하여 전력소모를 최소화할 수 있고, 원적외선 방사율이 92% 이상(37 °C 기준)에 달하고, 방출 에너지는 354 W/m²(37 °C 기준)로 우수한 효율을 나타낼 수 있다. 더불어, 세라믹 램프에 비하여 온도 조절과 유지가 용이하며 발열면적 전체에 걸쳐 일정한 정도의 열을 고르게 방출할 수 있어, 세포의 배양 또는 분화가 안정적으로 수행될 수 있는 이점이 존재한다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 탄소섬유시트는 바인더가 분산용액에 분산된 바인더 분산용액과, 쉼 파이버(chopped carbon fiber) 형태의 탄소섬유가 포함된 탄소섬유 분산용액들을 각각 만든 후, 이들을 서로 혼합한 혼합물을 라미네이팅하여 제조된 것일 수 있다. 이때, 바인더 분산용액과 탄소섬유 분산용액의 혼합 비율 및/또는 라미네이팅 온도를 조절하여, 탄소섬유시트의 물성(탄소섬유 분산도, 탄소섬유시트 밀도, 탄소섬유시트 질량, 탄소섬유시트 기본중량, 탄소섬유시트 두께, 탄소섬유시트 표면저항, 탄소섬유시트 표면발열온도, 원적외선 방사율 등)을 따로 세밀하게 조절할 수 있다. 이 때, 상기 쉼 파이버 형태의 탄소섬유는 탄소섬유를 적당한 길이로 자른 것을 의미할 수 있다.
- [41] 상기 탄소섬유시트는 상기한 제조과정에 국한되지 않고, 원적외선의 방출 및 발열 기능을 갖는 탄소섬유시트를 제조하는 통상의 제조과정에 의해서 제조되는 것일 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포에 인가되는 에너지는 상기 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [43] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 온도는 30 내지 90 °C, 60 내지 80 °C 또는 60 내지 70 °C일 수 있다. 상기한 온도 범위 내에서는 줄기세포의 세포 생존능이 우수하고, 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식능 및 분화능이 향상되는 효과가 존재한다.

- [44] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 시간은 10 분 내지 10 시간, 30 분 내지 2 시간, 또는 30 분 내지 1 시간일 수 있다. 특히, 전술한 원적외선이 인가되는 온도 범위 및 상기 원적외선이 인가되는 시간 범위를 모두 만족하는 경우 줄기세포의 세포 생존능, 및 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식능과 분화능이 보다 현저히 향상되는 효과가 존재한다.
- [45] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포, 지방유래 중간엽 줄기세포, 골수유래 중간엽 줄기세포, 제대혈유래 중간엽 줄기세포, 유도만능줄기세포 및 배아줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다. 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 일반적으로 10 세 이하 소아의 구개 편도에 얻어지며, 다른 부위에서 유래하는 골수유래 혹은 지방유래 중간엽 줄기세포에 비하여 상대적으로 증식률이 높고 분화율의 유지가 잘 된다는 이점이 존재한다.
- [46] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 골형성 세포는 골로 분화될 수 있는 세포로, 골형성계(Osteogenic) 세포, 전골모세포(Pre-osteoblast), 골모세포(Osteoblast) 및 골세포(Ostocyte)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 골형성 세포는 골모세포 및 골세포일 수 있다.
- [47] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 에너지를 인가받은 줄기세포를 배양 배지에서 배양하는 과정을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 통하여 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 과정에서, 상기 줄기세포는 배양 배지(또는 배양액) 상에 담지된 상태일 수 있다. 이와 같이, 배양 배지(또는 배양액)에 담지된 줄기세포에 상기 탄소섬유시트로부터 방출되는 에너지를 인가한 이후, 후속적으로 배양 배지(또는 배양액)에 담지된 줄기세포를 1 내지 24 일, 5 내지 20 일, 10 내지 16 일 또는 13 내지 15 일 동안 추가로 배양할 수 있다. 이 경우 상기 배양 배지(또는 배양액)를 1 내지 4일 또는 3 내지 4일 마다 새로운 배양 배지(또는 배양액)로 교체하는 과정을 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 배양 배지(또는 배양액)는 골분화 배지 또는 골형성 유도 배지일 수 있다.
- [48]
- [49] 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치(이하, 면상발열체 장치라 함)
- [50] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 상기 줄기세포가 배치되는 하부 플레이트; 상기 하부 플레이트의 상부 영역에 상기 하부 플레이트에 대해 이격되어 배치되는 상부 플레이트; 상기 상부 플레이트와 상기 하부 플레이트에 연결되는 가이드 샤프트; 상기 가이드 샤프트에 이동 가능하게 연결되며, 상기 배양용기에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이동되는 승강 스테이지유닛; 상기 상부 플레이트에 결합되고, 상기 승강 스테이지유닛에 연결되며, 상기 승강 스테이지유닛을 이동시키는 이동유닛; 및 상기 승강

스테이지유닛에 결합되며, 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 탄소섬유시트 면상발열체가 장착된 발열유닛을 포함하는 것일 수 있다.

[51]

[52] 이하, 본 발명의 제1 실시예에 따른, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 자세히 설명한다.

[53]

도 4 및 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 하부 플레이트(110), 상부 플레이트(120), 가이드 샤프트(130), 승강 스테이지유닛(140), 이동유닛(150), 발열유닛(160), 및 온도조절기(170)로 구성된다.

[54]

[55] [하부 플레이트(110), 상부 플레이트(120), 가이드 샤프트(130)]

[56]

하부 플레이트(110)에는 줄기세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)가 놓인다. 배양용기(S)는 하나 이상이 하부 플레이트(110)에 놓을 수 있고, 배양용기(S)의 크기와 높이는 다양하게 형성될 수 있다. 일례로, 하부 플레이트(110)는 96-웰 플레이트(96-well plate)를 4개 정도 올려놓을 수 있는 크기로 제작되며, 예를 들어, 하부 플레이트(110)의 크기는 50x50 mm 내지 500x1000 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적인 예로, A4 사이즈 내에서 200x200mm 원적외선 조사가 가능하다.

[57]

하부 플레이트(110)의 상면에는 배양용기의 크기를 시각적으로 확인할 수 있는 눈금표시기가 형성된다. 눈금표시기는 격자무늬 눈금으로 형성될 수 있다. 본 실시예에서는 하부 플레이트(110)에 눈금표시기로 커팅 매트(cutting mat) 또는 눈금이 있는 플라스틱류(예를 들어, 눈금자)를 부착하여 배양용기(S)를 항상 동일한 위치 및 배열을 유지할 수 있다(도 5 참조). 상기 눈금표시기로써 부착되는 구성의 종류는 전술한 바에 한정되는 것은 아니다.

[58]

상부 플레이트(120)는 하부 플레이트(110)의 상부 영역에 하부 플레이트(110)에 대해 이격되어 배치된다.

[59]

본 실시예에서 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)는 동일한 크기의 사각판 형상으로 형성된다.

[60]

가이드 샤프트(130)는 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)에 연결된다. 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)는 가이드 샤프트(130)에 의해 서로 이격된다.

[61]

[62] [승강 스테이지유닛(140)]

[63]

승강 스테이지유닛(140)은 가이드 샤프트(130)에 이동 가능하게 연결되며, 하부 플레이트(110)에 놓인 배양용기(S)에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이동된다.

[64]

승강 스테이지유닛(140)은 승강 플레이트(141), 가이드 부시(142)로 구성된다.

- [65] 승강 플레이트(141)는 이동유닛(150)에 연결된다. 본 실시예에서 승강 플레이트(141)는 알루미늄 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며 아크릴 등 다양한 재질로 제작될 수 있다. 승강 플레이트(141)에는 이동유닛(150)의 후술할 스크류 샤프트(152)가 회전 가능하게 결합되는 지지홈(141a)이 형성된다.
- [66] 가이드 부시(142)는 승강 플레이트(141)에 결합되며, 가이드 샤프트(130)의 외주면에 슬라이딩 이동 가능하게 연결된다. 가이드 부시(142)에는 가이드 샤프트(130)가 관통하는 관통홀(미도시)이 형성된다.
- [67]
- [68] **[이동유닛(150)]**
- [69] 이동유닛(150)은 상부 플레이트(120)에 결합되고, 승강 스테이지유닛(140)에 연결되며, 승강 스테이지유닛(140)을 이동시킨다. 이동유닛(150)은 발열유닛(160)을 하부 플레이트(110)로부터 20mm~140mm 범위에서 높이 조절이 가능하다. 승강 스테이지유닛(140)의 높이를 확인하기 위한 자가 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110) 사이에 부착될 수 있다(도 5 참조).
- [70] 이동유닛(150)은 고정 허브(151), 스크류 샤프트(152), 회전부재(153)로 구성된다.
- [71] 고정 허브(151)는 상부 플레이트(120)의 중앙영역에 결합된다. 고정허브(151)에는 스크류 샤프트(152)의 외주면에 형성된 나선형의 스크류(미도시)가 연결되는 나사홈(미도시) 형성된다.
- [72] 스크류 샤프트(152)는 고정 허브(151)에 나사결합되며, 승강 플레이트(141)에 회전 가능하게 결합된다. 스크류 샤프트(152)의 하단부 영역은, 승강 플레이트(141)에 형성된 지지홈(141a)에 회전 가능하게 결합된다.
- [73] 회전부재(153)는 스크류 샤프트(152)의 상단부에 결합되며 스크류 샤프트(152)를 회전시킨다. 본 실시예에서 회전부재(153)로 회전용 손잡이가 사용된다. 회전부재(153)가 회전용 손잡이인 경우 스크류 샤프트(152)를 수동으로 회전시킨다. 이와 달리 회전부재(153)로 회전용 모터를 사용하여 스크류 샤프트(152)를 자동으로 회전시킬 수도 있다.
- [74]
- [75] **[발열유닛(160)]**
- [76] 발열유닛(160)은 승강 스테이지유닛(140)에 결합된다.
- [77] 도 6에 도시된 바와 같이, 발열유닛(160)은 탄소섬유시트 면상발열체(161), 단열블록(162), 제1소수성필름(163), 제2소수성필름(164), 금속전극(166)으로 구성된다.
- [78]
- [79] **<탄소섬유시트 면상발열체(161)>**
- [80] 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 줄기세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)를 가열하며, 줄기세포 및/또는 배양 배지로 원적외선을 방출한다.

- [81] 원적외선은 물리학적으로 $3\mu\text{m} \sim 1,000\mu\text{m}$ 파장대의 빛으로, 일반적으로 온열작용, 건조, 생체효과, 물의 활성화, 숙성 및 생육촉진, 침투작용, 복사작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 최근 이런 다양한 작용으로 인해, 원적외선이 항염증, 골다공증, 관절염, 뼈재생 등 인체에 유용한 효과가 있다고 알려지면서, 원적외선이 인체에 미치는 영향에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.
- [82] 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 고전도성 탄소섬유시트로 만들어진다. 이로 인해, 줄기세포 및/또는 배양 배지의 온도를 유지할 수 있을 뿐만 아니라 탄소섬유시트가 방출하는 원적외선을 이용하여 원적외원이 세포에 미치는 영향에 대해서도 동시에 테스트해 볼 수 있다.
- [83] 본 실시예에서 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 $200 \times 200\text{mm}$ 로 제작된다. 이렇게 제작된 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 예를 들어, $25^\circ\text{C} \sim 180^\circ\text{C}$ 의 온도 범위에서 발열이 가능하나, 상기한 온도 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [84] 본 실시예에서 제작된 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 특성은 하기 표 1 및 2와 같다. 하기 표 1에는 탄소섬유시트 면상발열체의 전기적 특성을 나타내었고, 표 2에는 탄소섬유시트 면상발열체의 원적외선 방출 특성을 나타내었다.

[85] [표 1]

[86]

Type	Thickness (mm) (n=6)	Tensile Strength (MPa) (n=6)	Young's Modulus (GPa) (n=6)	Surface Resistance (Ω/sq) (n=4)	Electrical Conductivity (S/cm) (n=4)	Thermal Conductivity ($\text{W/m}\cdot\text{K}$) / Hot Disk (n=3)
CF Sheets	0.205 ± 0.008	15.3 ± 5.8	2.09 ± 0.47	2.02 ± 0.09	14.1 ± 0.96	1.246 ± 0.010

[87] [표 2]

[88]

Laminated CF Sheets	Type (n = 2)	
	Emissivity ($5 \sim 20\mu\text{m}$)	Radiation energy ($\text{W/m}^2 \cdot \mu\text{m}$)
70°C	0.912	5.49×10^2

[89]

[90] <단열블록(162)>

[91] 단열블록(162)은 승강 스테이지유닛(140)의 승강 플레이트(141)의 하면에 결합된다. 단열블록(162)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)에서 발생한 열을 단열한다. 본 실시예에서 단열블록(162)은 코르크 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 유리면, 펠트, 난연플라스틱, 우레탄보드 등의 재질로 제작될 수 있다.

[92] 단열블록(162)에는 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 측정하는 온도 측정기가 장착될 수 있다. 이 경우, 단열블록(162)의 하면에는 온도 측정기가 장착되는 온도 측정기용 장착홈이 형성된다. 온도 측정기로는 써모커플(Thermocouple)이 장착될 수 있다.

[93]

[94] <제1소수성필름(163), 제2소수성필름(164)>

[95] 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 부착된다.

[96] 제1소수성필름(163)은 상면이 단열블록(162)의 하면에 결합된다. 제1소수성필름(163)의 하면은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상부에 배치되며, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상면을 커버한다. 제1소수성필름(163)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)보다 작게 형성되어, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 양단부에 배치된 금속전극(166)은 커버하지 않는다.

[97] 제2소수성필름(164)은 상면이 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하부에 배치되며, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하면의 일부분 즉, 중앙영역을 커버한다.

[98] 본 실시예에서 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 열가소성 폴리에탄(thermoplastic polyurethane, TPU) 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌초산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등의 필름으로 제작될 수 있다.

[99] 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 배양 배지 또는 배양액에서 증발된 수분이 탄소섬유시트 면상발열체(161)나 단열블록(162)에 맺히거나 내부로 스며드는 것을 방지한다.

[100]

[101] <금속전극(166)>

[102] 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 전원을 연결하기 위해, 금속전극(166)이 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 부착된다. 금속전극(166)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 양단부에 부착된다. 본 실시예에서 금속전극(166)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상면에 부착되었으나, 이와 달리 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하면에 부착되거나 상면과 하면 모두에 부착될 수 있다.

[103] 금속전극(166)은 구리, 알루미늄, 은, 니켈, 주석 등을 포함하는 금속 또는 이들의 합금으로 이루어지질 수 있다. 금속전극(166)은 리본 또는 선 형태일 수 있다. 본 실시예에서 금속전극(166)으로 구리가 사용된다. 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 양단부에 구리테이프를 붙이고 전원을 연결한다.

[104] 탄소섬유시트 면상발열체(161), 단열블록(162), 제1소수성필름(163), 제2소수성필름(164), 금속전극(166)으로 만들어진 발열유닛(160)의 네 측면은 절연필름으로 감싸진다. 절연필름으로는 폴리이미드(polyimide, PI), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌초산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등이 사용될 수 있다.

[105]

[106] **[온도조절기(170)]**

[107] 온도조절기(170)는 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 연결되는 전원을 조절하여 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 발열온도를 조절한다. 구체적으로, 상기 온도조절기(170)는 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 측정하는 온도 측정기와 연결되어, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도 및 시간을 제어할 수 있다.

[108]

[109] 이하, 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 발열체 장치의 작동을 자세히 설명한다.

[110] 상기 줄기세포가 담지되는 배양 배지(또는 배양액)의 온도는 약 35 내지 40°C이며 이 온도를 유지해야 한다. 따라서 상기 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)를 상기 면상발열체 장치에 배치하기 전에, 하부 플레이트(110)를 예열하는 과정이 필요하다.

[111] 본 실시예에서는 발열유닛(160)의 금속전극(166)에 전원을 연결하여 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 약 60°C로 가열한다. 가열온도는 줄기세포 및/또는 배양 배지를 37°C로 유지할 수 있도록, 발열유닛(160)의 높이와 배양용기(S)의 크기에 따라 60°C~80°C로 조절될 수 있다. 이동유닛(150)의 회전부재(153)를 작동시켜 승강 스테이지유닛(140)의 승강 플레이트(141)를 하부 플레이트(110)로 하강시킨다.

[112] 본 실시예에서는 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격이 약 40mm인 상태에서, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 약 60°C로 유지하고 약 1분이 지나면, 하부 플레이트(110)의 온도가 약 35°C~40°C(평균 37°C)가 된다(도 9 참조).

[113] 하부 플레이트(110)은 30분 정도의 예열과정이 필요하며, 예열과정이 끝나면 승강 플레이트(141)를 상승시켜 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격을 벌린 후, 줄기세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)를 하부 플레이트(110)의 중앙 영역에 배치시킨다.

[114] 도 7에 도시된 바와 같이, 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격이 약 1 내지 50 cm 또는 25 내지 35 cm가 될 때까지 승강 플레이트(141)를 하강시킨다. 줄기세포 및/또는 배양 배지를 적정 시간(약 30분 내지 24시간) 동안 배양시킨다.

[115]

[116] 이하, 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 자세히 설명한다. 도 4 및 도 8을 기본적으로 참조한다.

[117] 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 발열유닛(260)에서 제1구현예와 차이가 있다. 제2구현예에 따른 발열유닛(260)은 얇은 탄소섬유시트 면상발열체 복수 개를 구비한다. 얇은 탄소섬유시트 면상발열체를 복수 개 사용하면, 두꺼운 탄소섬유시트 면상발열체를 한 장 사용할 때 보

다, 탄소섬유시트 면상발열체에서 방출되는 열과 원적외선의 방출량을 보다 정밀하고 쉽게 조절할 수 있다. 따라서 온도 범위를 더 다양하게 구성할 수 있고, 원적외선의 방출량에 따른 세포에 미치는 영향을 다양한 조건 하에서 테스트해 볼 수 있다.

[118] 제2구현예에서는 발열유닛(260)이 두 개의 탄소섬유시트 면상발열체를 포함하고, 각 탄소섬유시트 면상발열체의 상면과 하면에 소수성필름이 부착된다. 그러나 이에 한정되지 않고, 탄소섬유시트 면상발열체의 개수는 이보다 더 많게 형성될 수 있고, 이에 상응하여 소수성필름도 증가될 수 있다.

[119] 나머지 구성은 제1구현예와 동일하므로, 동일한 구성에 대한 자세한 설명은 생략한다. 동일한 구성에 대해서는 동일한 부호를 사용한다.

[120]

[121] **[발열유닛(260)]**

[122] 발열유닛(260)은 승강 스테이지유닛(140)에 결합된다.

[123] 도 8에 도시된 바와 같이, 발열유닛(260)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b), 단열블록(262), 제1소수성필름(263), 제2소수성필름(264), 제3소수성필름(265), 금속전극(266)으로 구성된다. 제1구현예에 따른 발열유닛(160)과 동일한 내용은 자세한 설명을 생략하고, 구별되는 특징을 중심으로 설명하기로 한다.

[124]

[125] **<제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)>**

[126] 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)는 고전도성 탄소섬유시트로 만들어지며, 동일한 크기로 만들어진다. 본 실시예에서 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)는 200x200mm로 제작될 수 있다.

[127]

[128] **<단열블록(262)>**

[129] 단열블록(262)은 제1구현예의 발열유닛(160)의 단열블록(162)과 동일하다.

[130]

[131] **<제1소수성필름(263), 제2소수성필름(264), 제3소수성필름(265)>**

[132] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상면과 하면에 각각 부착되고, 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면과 하면에 각각 부착된다.

[133] 제1소수성필름(263)은 상면이 단열블록(262)의 하면에 결합된다. 제1소수성필름(263)의 하면은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상부에 배치되어, 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상면을 커버한다.

[134] 제2소수성필름(264)은 상면이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 하부에 배치되어, 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 하면을 커버한다. 제2소수성필름

(264)의 하면은 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상부에 배치되어, 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면을 커버한다.

[135] 제3소수성필름(265)은 상면이 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하부에 배치되어, 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하면을 커버한다.

[136] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)보다는 길이가 작게 형성되어 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 부착된 금속전극(266)은 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)에 의해 커버되지 않는다.

[137] 본 실시예에서 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 열가소성 폴리우레탄(thermoplastic polyurethane, TPU) 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌초산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등의 필름으로 제작될 수 있다.

[138] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 줄기세포 및/또는 배양 배지에서 증발된 수분이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b) 또는 단열블록(262)에 맺히거나 내부로 스며드는 것을 방지한다.

[139]

[140] <금속전극(266)>

[141] 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 전원을 연결하기 위해, 금속전극(266)이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 각각 부착된다. 금속전극(266)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 부착된다. 본 실시예에서 금속전극(266)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면에 각각 부착되었으나, 이와 달리 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하면에 각각 부착되거나 상면과 하면 모두에 부착될 수도 있다.

[142] 본 실시예에서 금속전극(266)으로 구리가 사용된다. 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 구리테이프를 붙이고, 각 금속전극(266)에 전원을 연결한다.

[143]

[144] 이하, 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 작동을 자세히 설명한다. 도 4 및 도 8을 기본적으로 참조한다.

[145] 기본적으로는 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 작동과 동일하므로, 제1구현예와 구별되는 작동을 중심으로 설명하기로 한다.

- [146] 발열유닛(260)의 금속전극(266)에 전원을 연결할 때, 제1구현예와 같은 온도 범위와 원적외선의 방출량으로 시험하고자 할 때에는 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에만 전원을 공급한다.
- [147] 이와 달리, 제1구현예의 온도 범위와 원적외선의 방출량보다 더 큰 범위의 열을 방출하고자 할 때에는 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 전원을 공급한다.
- [148]
- [149] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 일 구현예를 이용하여 설명한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에서 설명된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이런 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [150]
- [151] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [152] <실시예>
- [153] 제조예
- [154] (1) 재료
- [155] 고포도당(4,500 mg/L)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; DMEM-HG) 및 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)은 Welgene Inc.(경산, 대한민국)에서 구입하였다. 소태아혈청(FBS) 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH; AbFrontier)에 대한 항체는 GW Vitek(서울, 대한민국)에서 구입하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), alizarin red S 분말, BCA(bicinchoninic acid solution), 황산구리(II) 용액은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 세포용 TrypLE™ (Gibc™; Life Technologies), 세포 배양 배지용 Antibiotic-Antimycotic(Gibco™ 및 골형성 분화 배지(StemPro Osteogenesis Differentiation Kit; Invitrogen)는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. BrdU Cell Proliferation Assay Kit는 Cell signaling technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 프로테아제 억제제 콕테일은 Roche(Nutley, NJ, USA)에서 구입하였다. 오스테오칼신(OCN), 알칼리성 포스파타제(ALP) 및 콜라겐 I(CoII)에 대한 항체는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였다. osteopontin (OPN)에 대한 항체는 Novus Biologicals (Centennial, CO, USA)에서 구입하였다. 화학 발광 시약(ECL)은 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

[156]

[157] (2) 세포 배양

[158] 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)는 종래 논문(에 보고된 바와 같이 분리하였다(Ryu, Kyung-Ha, et al. *Cytotherapy* 14.10 (2012): 1193-1202.). 요약하자면, TMSC는 고포도당(4,500 mg/L) 배양액(DMEM-HG; Welgene Inc., Gyeongsan, South Korea), 10% 소태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 및 0.25 µg/mL의 암포테리신 B를 가습 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂ 존재하에 유지하였으며, TMSC는 계대 6-9 사이의 세포를 사용하였다.

[159]

[160] 실시예 1. 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 이용한 줄기세포로의 골형성 세포로의 분화

[161] 원적외선(FIR) 조사는 FIR 복사를 방출하는 탄소섬유시트(CFS; Carbon fiber sheets)의 온도를 제어하는, 본 발명에 따른 면상발열체 장치를 사용하여 수행하였다. 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)는 FIR 조사 3-4일 전에 파종(seeding)하였고, 탄소섬유시트를 설정 온도(60, 70 또는 80 °C)에서 30분 동안 예열한 다음, TMSC가 담지된 배양용기(S)가 배치된 하부 플레이트(110)와 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 이격 거리가 3 cm가 되도록 하여 0, 0.5, 1 또는 2시간 동안, 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)을 조사하였다. FIR-CFS 조사 후, 세포를 각 실험 시도에 대해 지정된 시간에 CO₂ 인큐베이터에서 추가로 배양하였다.

[162]

[163] <실험예>

[164] 통계 분석

[165] 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 버전 7 (GraphPad 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌디에이고)을 사용하여 수행하였다. 데이터는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, n은 시행 횟수를 나타내며 모든 실험은 적어도 3회 반복하였다. 통계적 유의성은 일원 분산 분석(one-way ANOVA)과 Tukey's 테스트 또는 스튜던트 t-테스트를 사용하여 결정하였다. 통계적으로 유의한 값은 *,#p < 0.05, **,##p < 0.01 또는 ***,###p < 0.001로 표시하였다.

[166]

[167] 실험예 1. 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)의 시간경과에 따른 온도변화 분석

[168] 본 발명에 따른 면상발열체 장치에서 탄소섬유시트를 설정 온도(60, 70 또는 80 °C)에서 30분 동안 예열한 다음, 하부 플레이트에 증류수 담긴 60 mm 페트리접시가 배치하였다. 그런 다음, 탄소섬유시트와 하부 플레이트의 이격 거리가 3 cm가 되도록 하여 0, 0.5, 1 또는 2시간 동안, 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)을 증류수에 조사하였다(도 1A 참조). 시간경과에 따른 온도 변화는 열

화상 카메라를 이용하여 사진을 촬영한 다음 FLIR Thermal Studio 프로그램을 이용하여 분석하였으며(도 1A 참조), 그 결과를 도 1B에 나타내었다.

- [169] 종래 연구에서 사용했던 FIR 방사원은 500 °C 이상의 열을 방출하는 세라믹 적외선 램프로, 전구와 세포가 담긴 배양 접시 사이의 거리를 30 cm로 유지했을 때 원적외선을 조사하는 동안 배양 배지의 온도는 38 ± 1 °C 사이로 유지되었다. 도 1B를 참조하면, 탄소섬유시트의 온도가 증가함에 따라 증류수의 온도가 증가하는 경향성을 보였다. 증류수의 온도는 60 °C(CFS60), 70 °C(CFS70) 및 80 °C(CFS80)에서 각각 29-32, 32.5-34.5, 33.9-36.7 °C 사이였다. 그러나 각 그룹 내에서는 시간에 따른 유의한 차이가 없었다($n = 3$). 이러한 결과는 제시된 조건에서 CFS가 배양액의 온도를 증가시키기는 하나 세포가 생존할 수 있는 범위 내일 것임을 시사한다. 한편, 80 °C(CFS80)에서 2시간 동안 FIR을 조사하는 조건처럼 탄소섬유시트를 이용해 원적외선을 조사하는 시간이 길어질수록, 탄소섬유시트의 온도가 높아지면서 배양액이 증발할 수 있다. 결과적으로, 본 발명에서 설계된 탄소섬유시트(CFS)는 기존 세라믹 적외선 램프에 비해 훨씬 적은 열을 방출하며, 배양 배지의 온도를 세포가 생존할 수 있는 온도인 40 °C 이하로 유지할 수 있음을 확인하였다.

[170]

- [171] 실험예 2. 탄소섬유시트로부터 방출하는 원적외선(FIR-CFS)이 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 생존도 및 증식에 미치는 영향 분석

[172] (1) MTT 분석

- [173] 탄소섬유시트로부터 방출하는 원적외선(FIR-CFS)이 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 생존력에 미치는 독성을 평가하였다. 세포 생존율은 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하였다. 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 4-웰 배양 플레이트에 웰당 3.0×10^4 세포의 밀도로 파종한 후 3일 동안 배양하였다. 배양 3일 후, 탄소섬유시트의 각 설정 온도(60, 70 또는 80 °C)에서 다양한 시간(0, 0.5, 1 또는 2시간) 동안 TMSC에 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)을 조사한 후 48시간 동안 추가로 배양했다. 배지를 제거하고 0.5 mg/mL MTT 용액을 세포에 37 °C에서 2시간 동안 첨가하였다. 용액을 제거하고 세포에 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)를 처리하여 formazan을 녹였다. 최종 용액을 새로운 96-웰 플레이트로 옮기고 마이크로플레이트 판독기 INNO-M (LTEK, 성남, 한국)을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 판독하였으며, 그 결과를 도 2A에 나타내었다.

- [174] 도 2A를 참조하면, TMSC를 60 °C(CFS60)의 원적외선으로 조사할 경우, TMSC의 세포 생존도는 시간이 지남에 따라 증가하였으며, 그 효과는 1시간($p < 0.05$) 및 2시간($p < 0.001$)조건에서 유의하였다. 대조적으로, 70 °C(CFS70)와 80 °C(CFS80)의 원적외선으로 조사하는 경우 TMSC의 생존도를 증가시키지 않았다. 세포를 80 °C(CFS80)에서 원적외선으로 2시간 동안 조사할 경우, TMSC의 생존도는 급격히 감소함을 확인할 수 있다.

[175]

[176] (2) Annexin V 세포 사멸 분석

[177] 세포 사멸을 조사하기 위해 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 분석하였다. 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) (1.5×10^5 세포)를 60 mm 페트리 접시에 3 mL 배지와 함께 파종하고 3일 동안 배양하였다. 탄소섬유시트의 각 온도(60, 70 또는 80 °C)에서 다양한 시간 조건(0, 0.5, 1 또는 2시간)에 따라 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선을 조사한 후 TMSC를 48시간 동안 배양했다. 배지와 TrypLE (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 분리된 세포를 수집하고 결합 완충액(0.1M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂)에 재현탁시켰다. 세포를 annexin V-FITC 및/또는 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide; PI)로 15분 동안 실온의 암실에서 염색하였다. Apoptotic TMSC를 유세포 분석기, NovoCyte (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 세포사가 진행된 초기의 세포와 후기의 세포의 퍼센티지를 더해 세포사가 일어난 세포의 총합을 계산하였으며, 그 결과를 도 2B에 나타내었다.

[178] 도 2B를 참조하면, 60 °C (CFS60)의 원적외선으로 조사하는 경우 TMSC의 세포사를 유도하지 않았으며, 70 °C (CFS70)과 80 °C (CFS80)에 조사된 TMSC에서도 1시간까지만 유사한 결과가 관찰되었다. TMSC를 70 °C (CFS70)과 80 °C (CFS80)을 이용해 2시간 동안 원적외선을 조사하는 경우, CFS70과 CFS80의 경우 각각 15.7%에서 64.6%, 13.8%에서 72.4%로 세포사한 집단이 극적으로 증가했다($p < 0.001$). 따라서, 이 두 조건(CFS70, 2 시간 및 CFS80, 2 시간)은 세포 증식 분석에서 제외하였다.

[179]

[180] (3) 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU) 세포 증식 분석

[181] 급격히 감소한 세포 생존성을 보여주는 두 조건(CFS70, 2 시간 및 CFS80, 2 시간)을 제외하고 CFS가 세포 증식에 미치는 억제 효과를 조사하기 위해 BrdU 분석을 수행하였다. 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)는 상기 실험에 1의 MTT assay를 사용한 세포 생존을 분석 방법에 설명된 것과 동일한 조건에서, 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)을 조사 및 배양하였다. FIR-CFS가 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)를 사용하였다. TMSC를 다양한 조건에서 FIR-CFS에 조사한 후 48시간 배양했다. 배양 후 배지를 제거하고 BrdU 용액을 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 그런 다음 용액을 제거하고 고정/변성 용액을 TMSC에 첨가하고 어두운 곳에서 실온에서 30분 동안 배양했다. 용액을 제거하고 세포를 BrdU 검출 항체로 1시간 동안 처리한 후 키트에서 제공하는 세척 완충액으로 3회 세척하였다. TMSC는 HRP가 결합된 2차 항체와 함께 30분 동안 배양하였고, 세포는 wash buffer로 3회 세척하였으며, TMB와 함께 30분 동안 추가로 배양하였다. Stop solution용액을 첨가하여 TMB 기질 반응을 정지시키고

마이크로플레이트 판독기를 사용하여 30분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 2C에 나타내었다.

- [182] 도 2C를 참조하면, TMSC의 증식은 60 °C (CFS60)에 2시간 동안, 80 °C (CFS80)에 1시간 동안 조사한 두 그룹에서 감소하였다. 70 °C (CFS70)에서 1시간 동안 조사한 그룹은 증식을 약간 감소시켰지만 그 효과는 통계적으로 유의미하지 않았다. 특이하게도, CFS60 0.5시간과 1시간 동안 조사된 TMSC의 증식이 약간 증가하였으나 이 또한 통계적으로 유의미하지 않았다.

[183]

- [184] 종합하면, 탄소섬유시트를 사용한 원적외선 조사는 일반적으로 탄소섬유시트의 낮은 온도에서 TMSC의 세포 생존성이나 증식을 1시간까지 변화시키지 않았다. 그러나 70 °C 이상의 탄소섬유시트의 온도에서 2시간 이상의 원적외선 조사는 TMSC의 세포사를 유도할 수 있고, CFS60 2시간과 CFS80 1시간 조건에서 원적외선 조사는 세포 증식을 억제할 수 있다. 따라서 세포 생존력과 증식에 모두 영향을 미치지 않는 조건들을 FIR-CFS가 세포 분화에 미치는 영향을 평가하는데 사용하였다.

[185]

- [186] 실험예 3. 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)이 골형성 분화에 미치는 영향 분석

[187] (1) Alizarin red S 염색

- [188] 탄소섬유시트로부터 방출된 원적외선(FIR-CFS)이 세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세포 생존 능력과 증식을 변화시키지 않는 조건들을 사용하여 TMSC에 원적외선을 조사하였다. 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)는 DMEM-HG에서 3-4일 동안 배양하여 80-90% confluency를 만들었다. 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS) 조사 1시간 전에 배지를 골형성 분화 배지(Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 교체하였다. 세포는 CFS의 각 온도(60 또는 70 °C)에서 다양한 시간 조건(0, 0.5 또는 1시간) 동안 FIR-CFS로 조사되었고 14일 동안 배양되었다. 배양 배지는 3~4일마다 갈아주었다. 분화 후, TMSC는 예열된 DPBS로 1회 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 20-30분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 DPBS로 2회 세척한 다음 2% alizarin red S (Sigma) 용액으로 20-30분 동안 실온의 어두운 곳에서 염색하였다. 과량의 용액은 DPBS로 세척하여 제거하고, 종래 연구에서 설명한 대로 광물화를 현미경으로 시각화하고 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다(Kim, Ha Yeong, et al. *Stem Cell Research* 53 (2021): 102291.). Alizarin red S 염색 결과는 도 3A에 나타내었다.

- [189] 도 3A를 참조하면, 60 °C (CFS60) 및 70 °C (CFS70) 그룹에서 TMSC의 골형성은 시간 의존적인 방식으로 유도되었으며, 이는 Alizarin red S로 염색된 더 높은 칼슘 미네랄화에 의해 입증되었다. 조사된 TMSC의 칼슘 미네랄화는 비조사 대조군 TMSC에 비해 CFS60 1시간 동안 11.42배($p < 0.001$), CFS70 0.5와 1시간 동안 25.76배($p < 0.05$), 33.10배($p < 0.01$) 증가했다. 대조적으로, 80°C(CFS80)에서 방출

된 원적외선에 0.5 시간과 1시간 동안 조사된 세포들은 조사되지 않은 대조군에 비해 칼슘 미네랄화의 6.2배와 4.64배($p > 0.05$)($p > 0.05 \leq$ 유의하지 않음)의 약간의 유도만 보여 골형성 유도는 탄소섬유시트의 원적외선이 방출하는 열과 무관함을 시사하였다.

[190]

[191] (2) 웨스턴 블롯 분석

[192] CFS60과 CFS70을 사용하여 원적외선이 1시간 동안 조사되는 조건에서 칼슘 미네랄화의 최고 유도를 이끌어냈기 때문에, 우리는 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 골형성 마커의 단백질 수준을 비교함으로써, 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)의 골형성 유도성을 추가로 검증하였다. 구체적으로, 전체 단백질 용해물은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)로부터, pH 7.4의 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 및 프로테아제 억제제 콕테일(Roche, Nutley, 미국 뉴저지)을 포함하는 완충액을 사용하여 추출하였다. BCA (bicinchoninic acid) 단백질 분석(Sigma)을 사용하여 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 샘플을 100 °C에서 5분 동안 가열하여 변성시키고 SDS 겔에 동량의 20 µg을 로드하여 분리하고, 0.2 µm 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮긴 다음 멤브레인을 5% 탈지유에 1시간 동안 담겼다. 그런 다음, 오스테오칼신(OCN, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK), 알칼리 포스파타제(ALP; Abcam, 1:1000), 오스테오폰틴(OPN, 1:2000; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), 콜라겐 I(Coll, 1:1000; Abcam) 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH, 1:4000; AbFrontier, Seoul, South Korea)에 대한 1차 항체로 블롯을 하룻밤 동안 4 °C에서 처리한 다음 실온에서 1시간 동안 상응하는 2차 항체(1:5000)에 붙였다. 최종적으로 향상된 화학발광 시약(ECL; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 블롯을 제작하고 Image Lab 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 정량화하였다. GAPDH는 표적 단백질을 정상화하기 위한 loading control로 사용하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과는 도 3B에 나타내었다.

[193] 도 3B를 참조하면, 조사되지 않은 대조군(0시간)과 비교했을 때, TMSC에서 오스테오칼신(OCN) 단백질의 단백질 발현수준은 CFS60과 CFS70의 1시간 조건에서 각각 12.5배, 12.6배 증가했다. 알칼리성 포스파타아제(ALP)의 단백질 발현도 TMSC에서 1시간 동안 2배, 2.1배 유의미하게 증가하였다. 그러나, 오스테오폰틴(OPN)과 콜라겐 I(Coll)의 수치가 오히려 CFS60 1시간 동안 0.4배, FIR-CFS70 1시간 동안 0.3배 감소하였다. 이러한 결과는, 증가된 칼슘 미네랄화 및 골형성 마커에 의해 입증된 바와 같이, *in vitro*에서 60°C 또는 70°C, 및 1시간의 FIR-CFS 조사 조건이 TMSC의 골형성을 유도하는 최적의 조사 조건임을 보여준다.

[194]

[195] 위 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따라 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고 이를 줄기세포로부터 골형성 세포로의 증식 또는 분화에 이용하는 경우 종래 세라믹 램프 발열체를 이용하는 경우에 비하여, 발열면적 전체에 걸쳐

균일한 열과 원적외선을 제공함으로써 세포 증식 또는 분화에 적절한 온도를 장시간 유지할 수 있어 세포 및 조직의 손상을 초래하지 않고 전력 소비를 최소화할 뿐만 아니라, 우수한 골형성 세포 증식능 및 분화능을 나타냄을 확인할 수 있다.

[196]

[197] 이상의 상세한 설명은 본 발명을 예시하는 것이다. 또한 기술한 내용은 본 발명의 바람직한 실시 형태를 나타내어 설명하는 것이며, 본 발명은 다양한 다른 조합, 변경 및 환경에서 사용할 수 있다. 즉 본 명세서에 개시된 발명의 개념의 범위, 저술한 개시 내용과 균등한 범위 및/또는 당업계의 기술 또는 지식의 범위 내에서 변경 또는 수정이 가능하다. 저술한 실시예는 본 발명의 기술적 사상을 구현하기 위한 최선의 상태를 설명하는 것이며, 본 발명의 구체적인 적용 분야 및 용도에서 요구되는 다양한 변경도 가능하다. 따라서 이상의 발명의 상세한 설명은 개시된 실시 상태로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 또한 첨부된 청구 범위는 다른 실시 상태도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[198]

[199] [부호의 설명]

[200] 110: 하부 플레이트 120: 상부 플레이트

[201] 130: 가이드 샤프트 140: 승강 스테이지유닛

[202] 141: 승강 플레이트 141a: 지지홈

[203] 142: 가이드 부시 150: 이동유닛

[204] 151: 고정 허브 152: 스크류 샤프트

[205] 153: 회전부재 160, 260: 발열유닛

[206] 161: 탄소섬유시트 면상발열체 162, 262: 단열블록

[207] 163, 263: 제1소수성필름 164, 264: 제2소수성필름

[208] 265: 제3소수성필름 166, 266: 금속전극

[209] 170: 온도조절기 261a: 제1탄소섬유시트 면상발열체

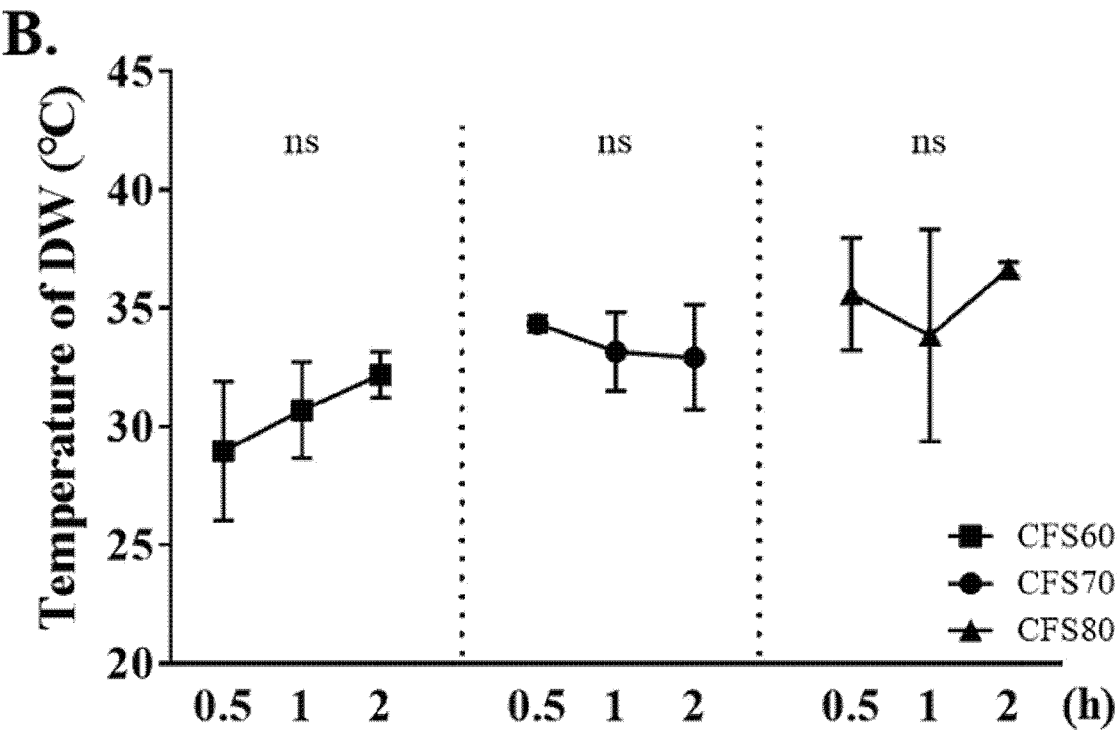
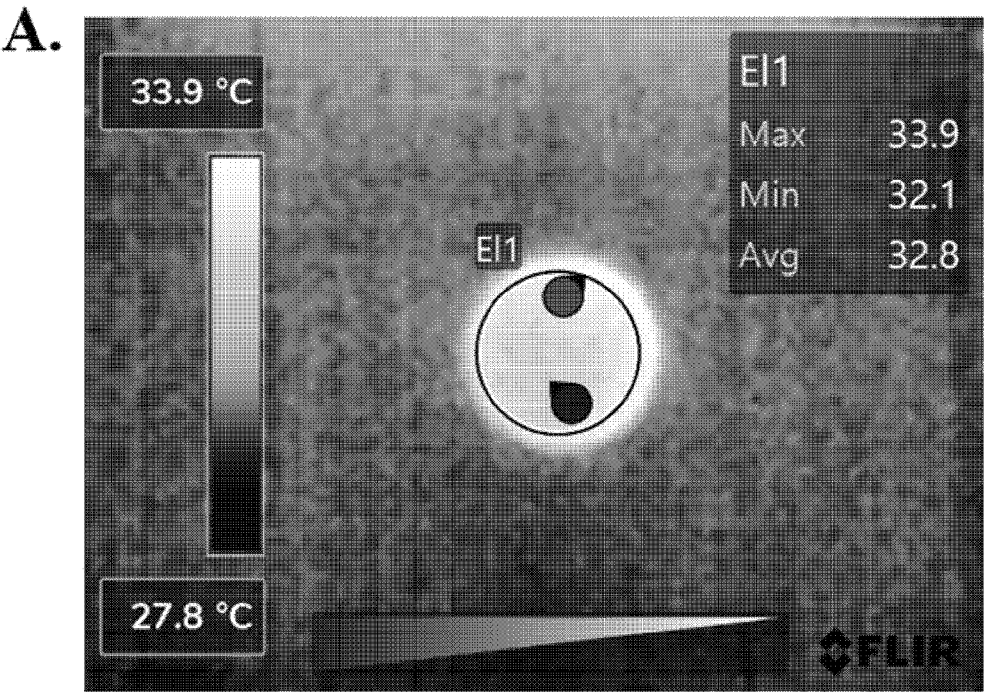
[210] 261b: 제2탄소섬유시트 면상발열체 S: 배양용기

청구범위

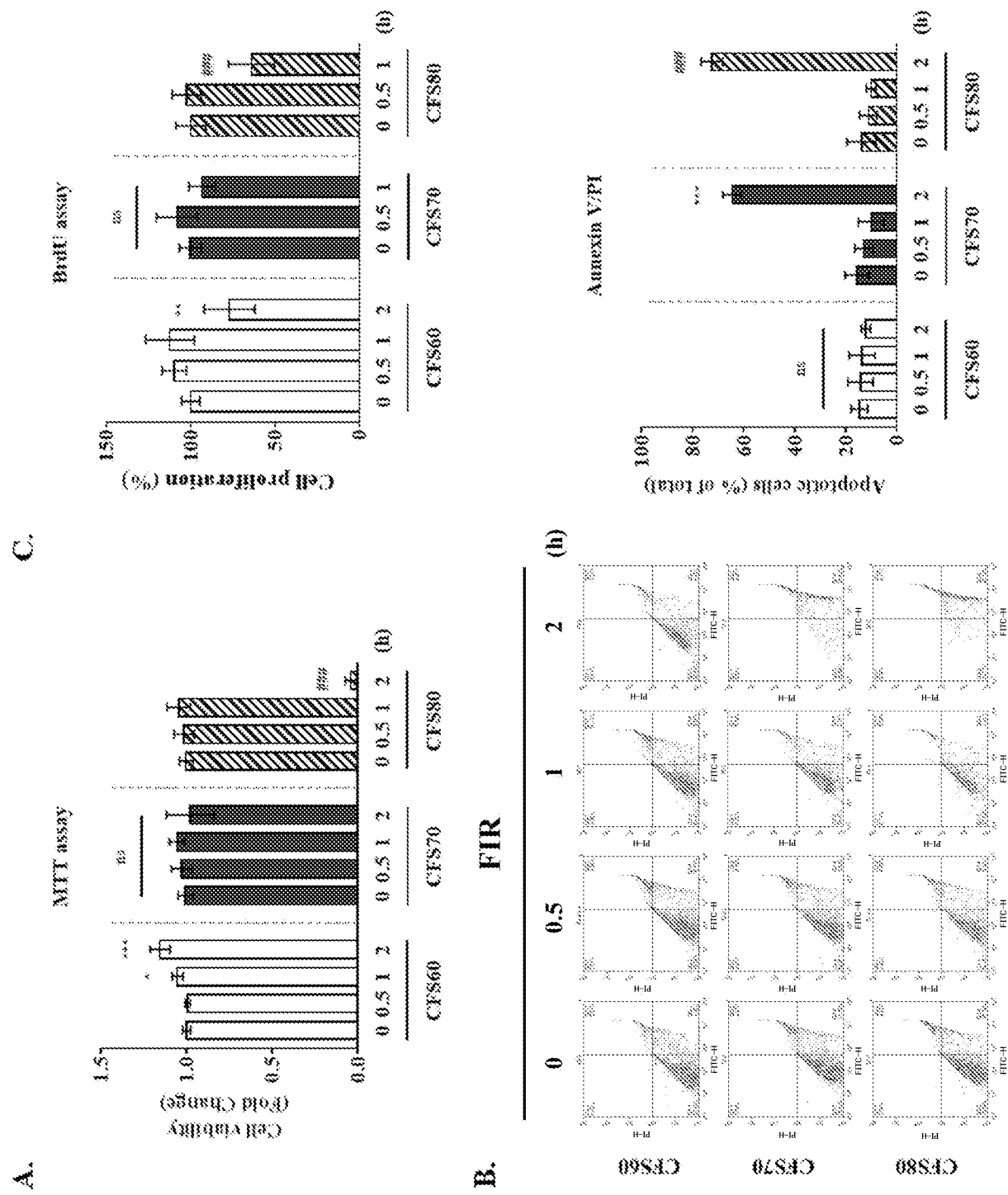
- [청구항 1] 줄기세포의 골형성 세포로의 증식, 분화 또는 이들의 촉진방법에 있어서, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 통하여 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포에 인가되는 에너지는 상기 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선인, 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 온도는 30 내지 90 °C인, 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 줄기세포에 원적외선이 인가되는 시간은 10 분 내지 10 시간인, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포, 지방유래 중간엽 줄기세포, 골수유래 중간엽 줄기세포, 제대혈유래 중간엽 줄기세포, 유도만능줄기세포 및 배아줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 골형성 세포는 골형성계(Osteogenic) 세포, 전골모세포(Pre-osteoblast), 골모세포(Osteoblast) 및 골세포(Ostocyte)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 에너지를 인가받은 줄기세포를 배양 배지에서 배양하는 과정을 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 배양 배지는 골형성 유도 배지인, 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 상기 줄기세포가 배치되는 하부 플레이트; 상기 하부 플레이트의 상부 영역에 상기 하부 플레이트에 대해 이격되어 배치되는 상부 플레이트; 상기 상부 플레이트와 상기 하부 플레이트에 연결되는 가이드 샤프트; 상기 가이드 샤프트에 이동 가능하게 연결되며, 상기 배양용기에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이동되는 승강 스테이지유닛; 상기 상부 플레이트에 결합되고, 상기 승강 스테이지유닛에 연결되며, 상기 승강 스테이지유닛을 이동시키는 이동유닛; 및

- [청구항 10] 상기 승강 스테이지유닛에 결합되며, 상기 줄기세포에 에너지를 인가하는 탄소섬유시트 면상발열체가 장착된 발열유닛을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 발열유닛은,
상기 탄소섬유시트 면상발열체;
상기 승강 스테이지유닛의 하면에 결합되는 단열블록;
상기 단열블록의 하면에 결합되며, 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 상부에 배치되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 상면을 커버하는 제1소수성필름;
상기 탄소섬유시트 면상발열체의 하부에 배치되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 하면을 커버하는 제2소수성필름; 및
상기 탄소섬유시트 면상발열체에 부착되는 금속전극을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 단열블록에는,
상기 탄소섬유시트 면상발열체의 온도를 측정하는 온도 측정기가 장착되는 것인, 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는,
상기 온도 측정기와 연결되어 상기 탄소섬유시트 면상발열체의 발열온도를 제어하는 온도조절기가 추가로 장착되는 것인, 방법.
- [청구항 13] 제9항에 있어서,
상기 승강 스테이지유닛은,
상기 이동유닛에 연결되는 승강 플레이트; 및
상기 승강 플레이트에 결합되며, 상기 가이드 샤프트의 외주면에 슬라이딩 이동 가능하게 연결되는 가이드 부시를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 이동유닛은,
상기 상부 플레이트에 결합되는 고정 허브;
상기 고정 허브에 나사결합되며, 상기 승강 플레이트에 회전 가능하게 결합되는 스크류 샤프트; 및
상기 스크류 샤프트에 결합되며 상기 스크류 샤프트를 회전시키는 회전부재를 포함하는 것인, 방법.

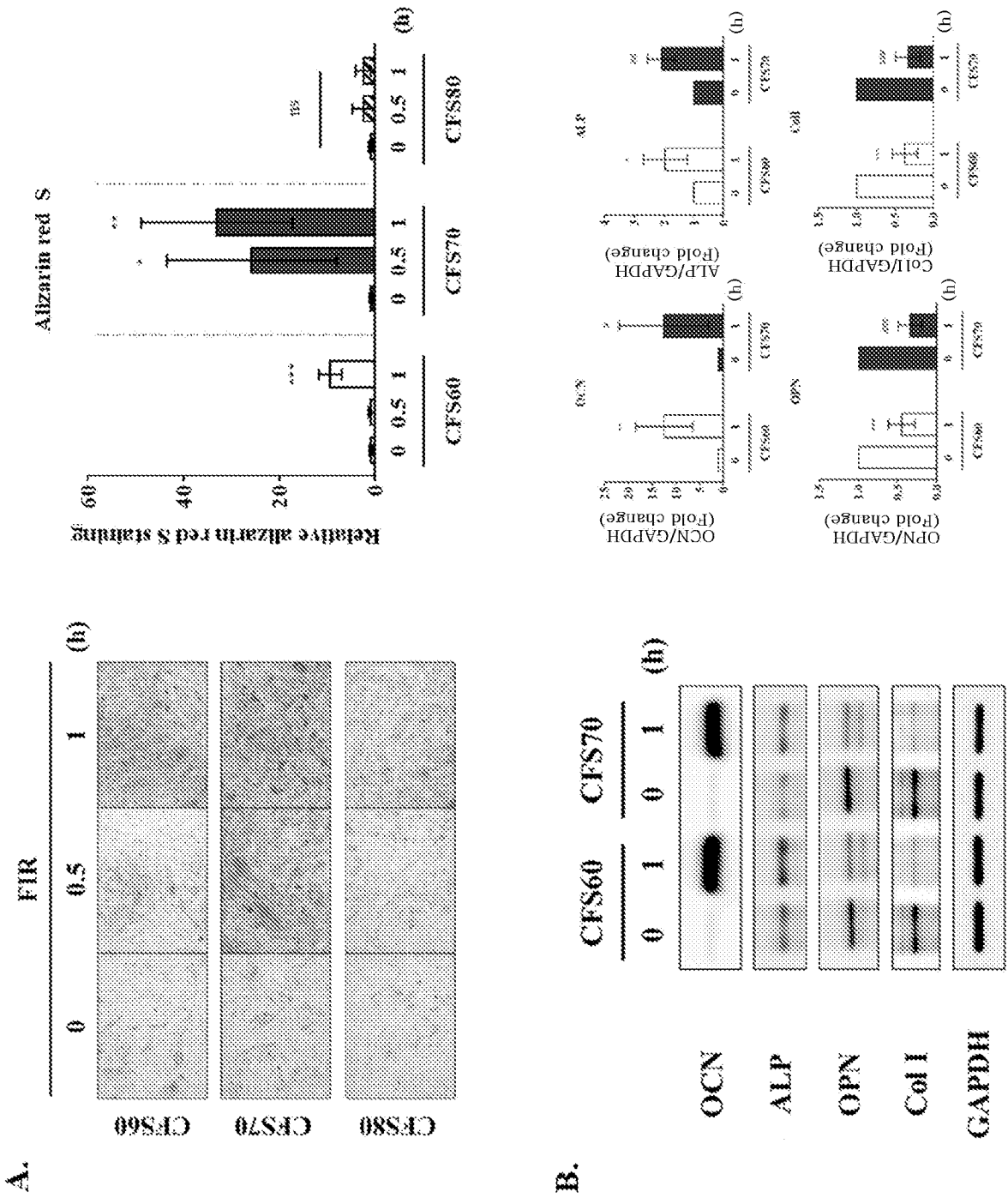
[도1]



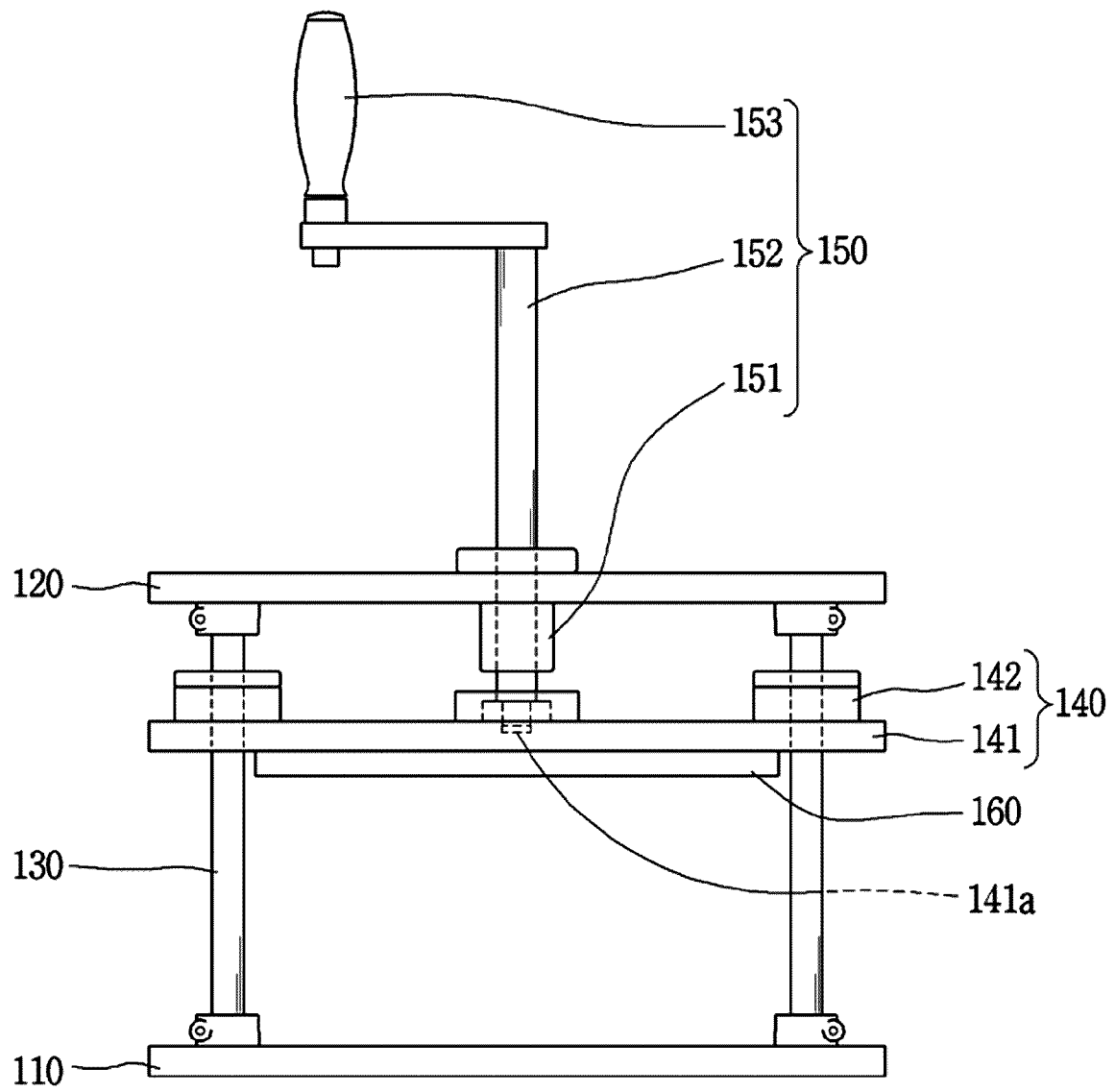
[도 2]



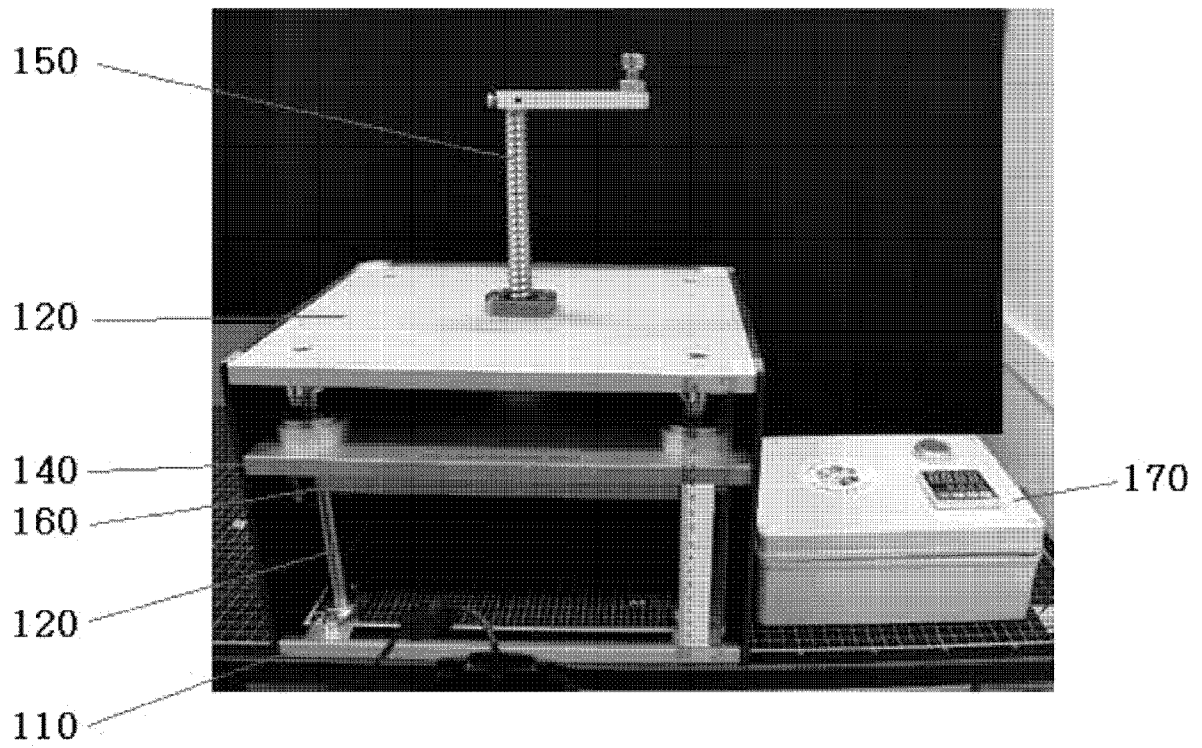
[도 3]



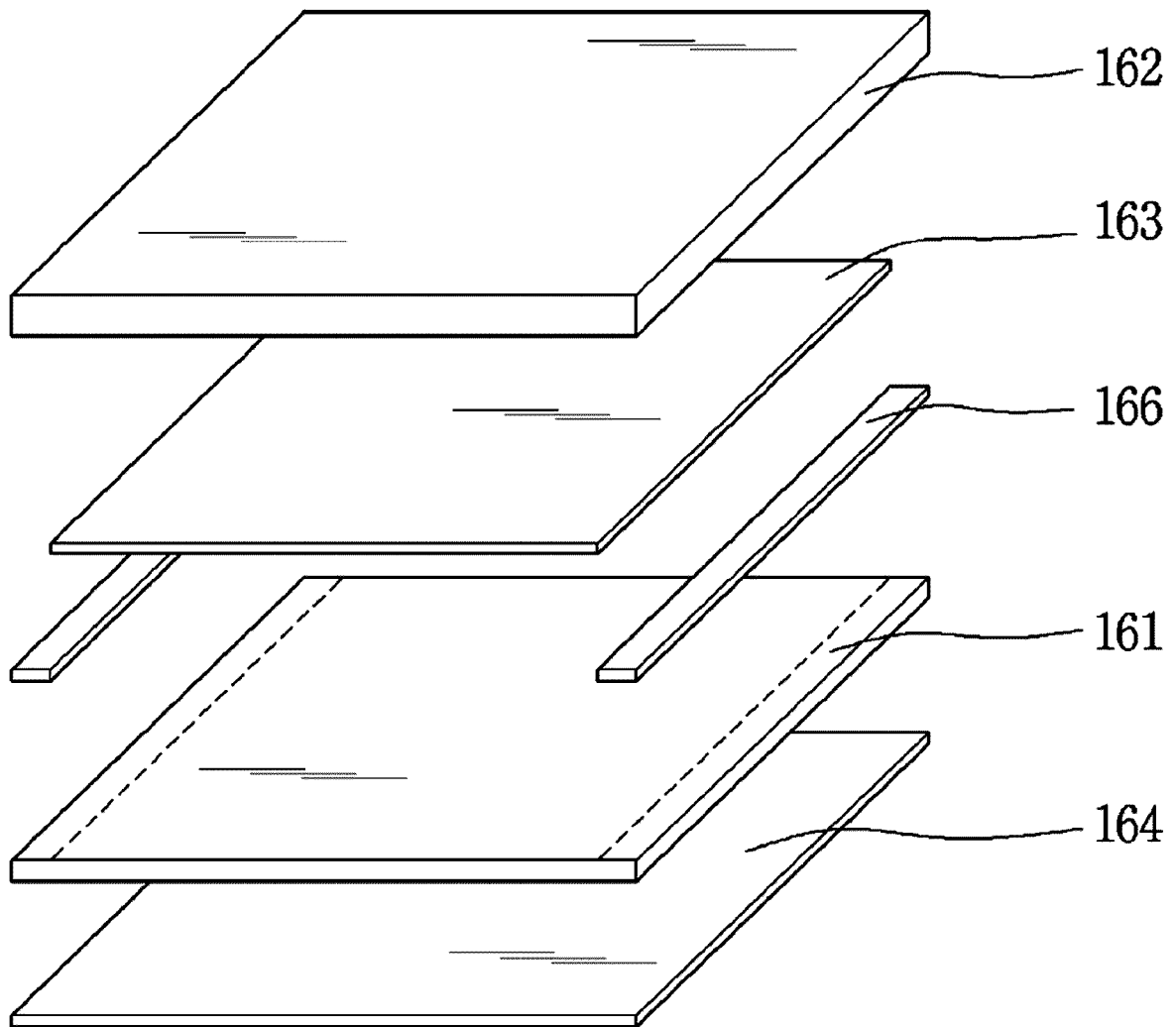
[도4]



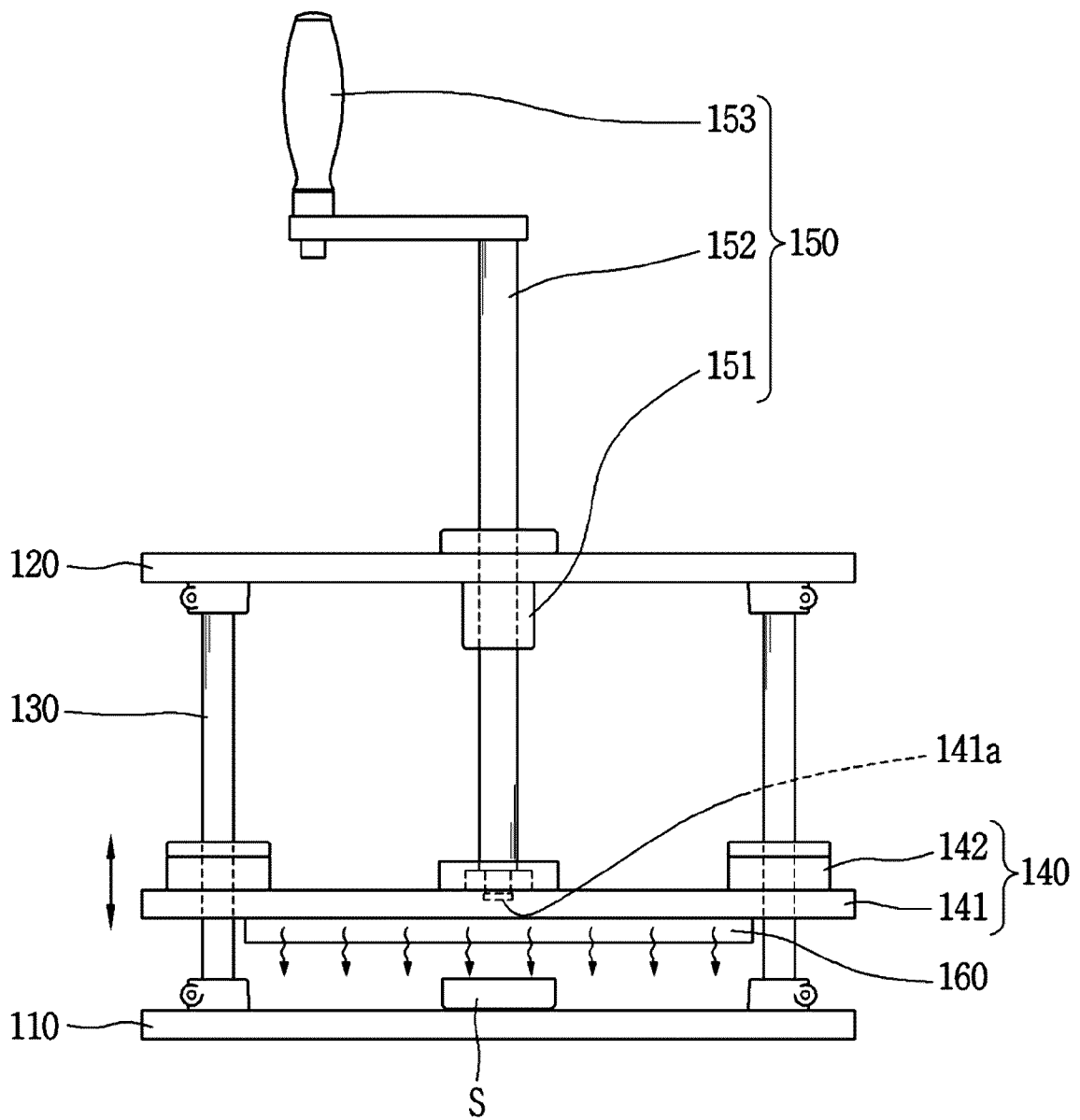
[도5]



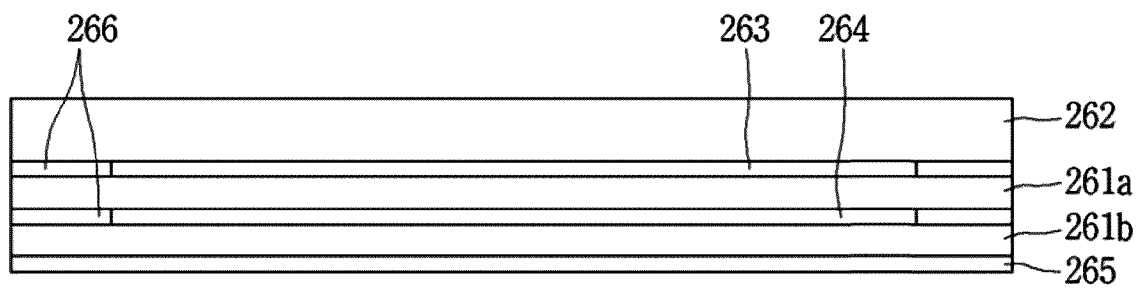
[도6]

160

[도7]

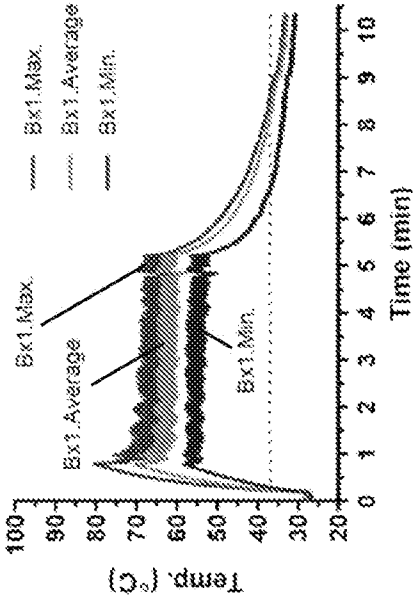
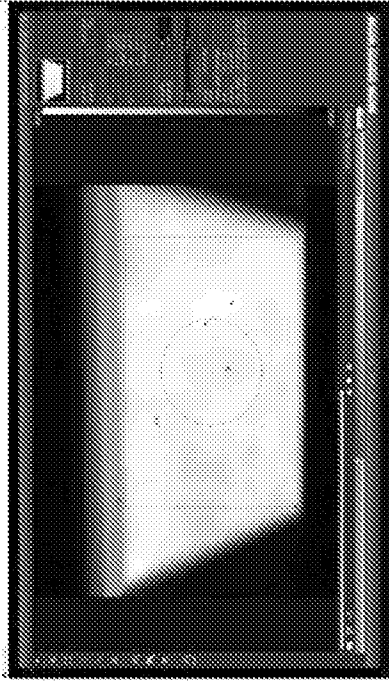


[도8]

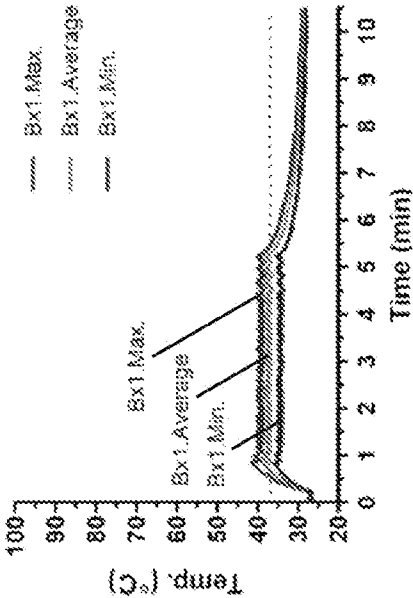
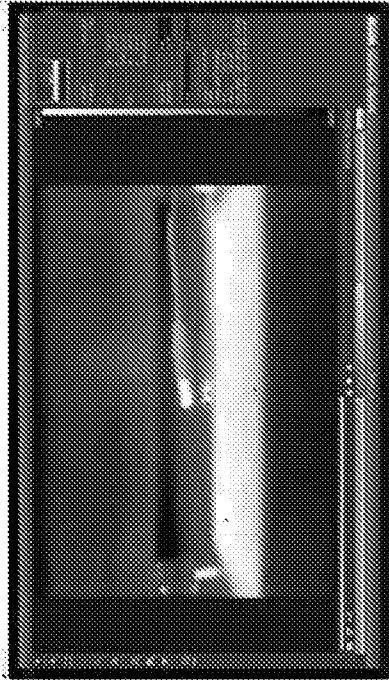
260

[도 9]

A. Heating to 60°C by the CF sheet



B. Cutting Mat at 60°C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/021135

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 13/00(2006.01)i; C12N 5/077(2010.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12M 1/26(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 13/00(2006.01); A45D 31/00(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 5/06(2006.01);
H05B 3/14(2006.01); H05B 3/34(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 줄기세포(stem cell), 골형성 세포(osteogenic cells), 분화(differentiation), 증식(proliferation), 탄소섬유시트(carbon fiber sheet), 면상발열체(planar heating element), 원적외선(far infrared ray), 승강장치(lifting device)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-305137 A (ISHIKAWA, Tomoyasu et al.) 04 November 2004 (2004-11-04) See paragraphs [0010], [0012], [0015], [0016], [0019]-[0023] and [0027]; and figures 2-4.	1-14
Y	KIM, Ha Yeong et al. Far-infrared irradiation inhibits adipogenic differentiation and stimulates osteogenic differentiation of human tonsil-derived mesenchymal stem cells: Role of protein phosphatase 2B. Cellular Physiology and Biochemistry. 28 February 2019 (Online), vol. 52, pp. 240-253. See abstract; and pages 242 and 245.	1-14
Y	KR 10-2014-0132505 A (KOREA INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY) 18 November 2014 (2014-11-18) See paragraphs [0050], [0051] and [0062]-[0065]; and figure 1.	9-14
A	JP 2002-010778 A (MISATO KK) 15 January 2002 (2002-01-15) See entire document.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 April 2024

Date of mailing of the international search report

01 April 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/021135

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0039370 A (AUTOCONNECTOR CO., LTD.) 25 April 2012 (2012-04-25) See entire document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/021135

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2004-305137	A	04 November 2004	EP	1619240	A1	25 January 2006
				JP	4564720	B2	20 October 2010
				US	2006-0057712	A1	16 March 2006
				WO	2004-090092	A1	21 October 2004
KR	10-2014-0132505	A	18 November 2014	KR	10-1480776	B1	09 January 2015
JP	2002-010778	A	15 January 2002	None			
KR	10-2012-0039370	A	25 April 2012	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 13/00(2006.01)i; C12N 5/077(2010.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12M 1/26(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 13/00(2006.01); A45D 31/00(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 5/06(2006.01); H05B 3/14(2006.01); H05B 3/34(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 줄기세포(stem cell), 골형성 세포(osteogenic cells), 분화(differentiation), 증식(proliferation), 탄소섬유시트(carbon fiber sheet), 면상발열체(planar heating element), 원적외선(far infrared ray), 승강장치(lifting device)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	JP 2004-305137 A (ISHIKAWA, TOMOYASU 등) 2004.11.04 단락 [0010], [0012], [0015], [0016], [0019]-[0023], [0027]; 및 도면 2-4 참조.	1-14
Y	KIM, HA YEONG 등, "Far-infrared irradiation inhibits adipogenic differentiation and stimulates osteogenic differentiation of human tonsil-derived mesenchymal stem cells: Role of protein phosphatase 2B", Cellular Physiology and Biochemistry, 2019.02.28(Online), 52권, 페이지 240-253 요약; 및 페이지 242, 245 참조.	1-14
Y	KR 10-2014-0132505 A (한국생산기술연구원) 2014.11.18 단락 [0050], [0051], [0062]-[0065]; 및 도면 1 참조.	9-14
A	JP 2002-010778 A (MISATO KK) 2002.01.15 전체 문헌 참조.	1-14
A	KR 10-2012-0039370 A (오토커넥터주식회사) 2012.04.25 전체 문헌 참조.	1-14
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년04월01일(01.04.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년04월01일(01.04.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2004-305137 A	2004/11/04	EP 1619240 A1	2006/01/25
		JP 4564720 B2	2010/10/20
		US 2006-0057712 A1	2006/03/16
		WO 2004-090092 A1	2004/10/21
KR 10-2014-0132505 A	2014/11/18	KR 10-1480776 B1	2015/01/09
JP 2002-010778 A	2002/01/15	없음	
KR 10-2012-0039370 A	2012/04/25	없음	