



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월05일  
(11) 등록번호 10-1541833  
(24) 등록일자 2015년07월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12M 1/16 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)  
C12M 3/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12M 1/16 (2013.01)  
C08B 37/0075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0050111(분할)
- (22) 출원일자 2015년04월09일  
심사청구일자 2015년04월09일
- (65) 공개번호 10-2015-0044024
- (43) 공개일자 2015년04월23일
- (62) 원출원 특허 10-2013-0046900  
원출원일자 2013년04월26일  
심사청구일자 2013년04월26일
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2006223106 A\*  
Haeshin Lee et al. "Enhancement of Blood Compatibility of Poly(urethane) Substrates by Mussel-inspired Adhesive Heparin Coating". Bioconjugate Chemistry. Bioconjugate Chem. Jan 16, 2011. V22. pp1264\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
한국과학기술원  
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
- (72) 발명자  
이해신  
대전 유성구 대학로 291  
이미현  
대전 유성구 문지로 193  
류지현  
대전 유성구 문지로 193
- (74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

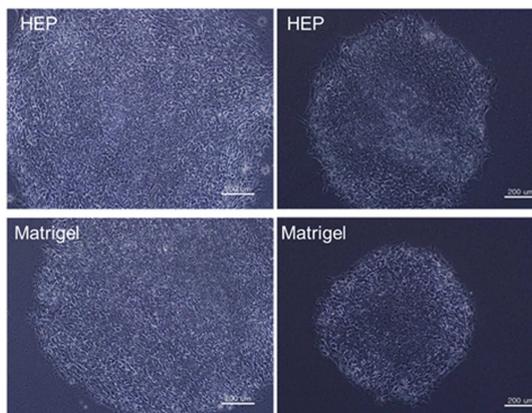
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 **접착성 헤파린을 이용한 줄기세포의 배양 방법**

(57) 요약

본 발명은 접착성 헤파린을 이용한 인간배아줄기세포 배양 방법에 대한 것으로, 구체적으로 접착성 헤파린으로서 헤파린-카테콜(Heparin-catechol) 고분자를 제조, 헤파린-카테콜 고분자의 표면 코팅법 및 이를 이용한 인간배아 줄기세포 배양 방법에 관한 것이며, 본 발명의 헤파린-카테콜은 기존의 매트리지엘 대비 저렴하고 다양한 표면에 안정적으로 코팅될 수 있으며, 정제된 천연고분자를 이용함으로써 구성성분이 명확하여 오염가능성이 훨씬 낮아지는 효과를 가짐으로써, 인간배아줄기세포를 안정적으로 대량배양하는 것에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

*C12M 21/00* (2013.01)

*C12M 3/00* (2013.01)

*C12M 37/00* (2013.01)

*C12N 5/0606* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A01002855

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 Bio-inspired 카테콜아민고분자의 인터페이스 특이적 화학현상 연구 및 이의 혁신적 이용

기여율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

1) 도파민(dopamine) 또는 폴리도파민(polydopamine)이 컨쥬게이션(conjugation)된 헤파린을 표면에 코팅시킨 인간배아줄기세포 배양용 플레이트를 UV 빛에 멸균한 후, 배아줄기세포 배양용 배지를 플레이트에 채워 인큐베이터에서 균질화시키는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 플레이트에 인간배아줄기세포를 지지세포(feeder cell)의 첨가 없이 배양하는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 표면은 폴리우레탄(polyurethane), 폴리다이메틸실록산(PDMS), 테플론(Teflon), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 실리콘(silicone), 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride), 폴리카보네이트(polycarbonate), 생분해성 지방족폴리에스테르계 고분자, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 인산칼슘(calcium phosphate), 산화알루미늄(aluminum oxide), 산화티타늄(titanium oxide), 산화실리콘(silicon oxide), 산화철(iron oxide), 유리(glass), 석영(quartz), 금(gold), 백금(platinum), 텅스텐(tungsten), 은(silver), 구리(copper), 스테리스 스틸(stainless steel), 코발트-크롬합금(cobalt-chromium alloy) 및 니티놀(nitinol)로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**청구항 3**

제 1항에 있어서, 상기 인간배아줄기세포 배양용 플레이트는 하기의 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법:

1) 헤파린에 도파민(dopamine) 또는 폴리도파민(polydopamine)을 컨쥬게이션하여 카테콜 기능이 도입된 헤파린을 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 헤파린을 플레이트 표면에 코팅시키는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 코팅된 플레이트 표면을 멸균하는 단계.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 단계 1)의 카테콜 기능이 도입된 헤파린은 헤파린 수용액에 도파민 염화수소산 염을 이용하여 제조한 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**청구항 5**

제 3항에 있어서, 상기 단계 2)의 코팅은 pH8.0 내지 pH9.0의 트리스 버퍼(Tris buffer)에서 산화제를 도입해 표면에 코팅하는 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**청구항 6**

제 3항에 있어서, 상기 단계 3)의 멸균은 헤파린으로 코팅된 플레이트 표면을 UV를 10분 내지 60분 동안 조사하

여 멸균시키는 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**청구항 7**

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)에서 배양된 인간배양줄기세포를 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 인간배아줄기세포의 배양방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 접착성 헤파린을 이용한 인간배아줄기세포의 배양 방법에 대한 것으로, 구체적으로 접착성 헤파린으로서 카테콜 기능기가 도입된 헤파린을 제조하고, 이를 표면에 코팅하여 인간배아줄기세포 배양하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 줄기세포는 무한히 증식하는 자가 생산능을 가지며, 특정 조건에서 다양한 세포로 분화 가능한 세포를 일컬으며, 특히 배아줄기세포는 이론적으로 체내의 모든 세포로 분화 가능한 것으로 알려져 있다. 이러한 분화능력을 이용하여 현재 의학으로 치료 불가능하거나 난치성인 질환을 치료할 수 있는 유일한 미래치료제로서 줄기세포 치료제가 각광받고 있다. 줄기세포 치료제는 환자에서 추출한 줄기세포를 체외에서 심혈관계, 신경계, 연골계, 피부 등 필요한 계열의 세포로 분화 및 증식하여 다시 환자에 주입하는 방식으로 면역거부반응 없이 손상된 세포 및 조직을 재생할 수 있다.

[0003] 이론적으로 인체의 모든 세포로 분화 가능한 유일한 줄기세포인 배아줄기세포를 실험실에서 배양하기 위해서는 다양한 영양을 공급하는 살아있는 지지세포(Feeder cell)가 필요한데, 일반적으로 증식 불가능하게 처리된 쥐 유래 섬유아세포가 사용된다. 그에 따라 지지세포 공급비용 발생, 지지세포 상태에 따른 줄기세포에의 영향, 지지세포로부터 병원균 오염, 대량 생산 불가능 등의 많은 제약이 있어 왔다. 이러한 지지세포의 대안으로서 현재 널리 쓰이고 있는 것이 쥐의 암조직으로부터 유래된 복합 세포외기질 성분인 매트리지젤(Matrigel)이다. 매트리지젤이 동물 세포 혈청과 함께 사용되는 경우 20회 이상 줄기세포를 증식시킬 수 있다. 하지만, 쥐에서 추출한 매트리지젤 역시 그 구성 성분이 명확하지 않고(Undefined) 병원균 오염 등의 문제를 여전히 갖고 있다. 뿐만 아니라, 매우 고가이기 때문에 줄기세포 치료제 비용 상승의 주원인 중 하나로 작용하고 있으며, 표면에 단순 흡착하여 사용하기 때문에, 줄기세포를 이용한 다양한 연구에 활용되기 어렵다.

[0004] 헤파린(heparin)은 항응고작용을 가진 다당류로서 현재 항응고제로서 의약품으로 널리 쓰이고 있을 뿐 아니라, 구조상 황산염(Sulfate) 작용기가 풍부하여 다양한 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 그 자체로서 어떤 표면에도 접착성을 갖지 않기 때문에 바이오분야에서 다양하게 활용되기에 한계가 있다.

[0005] 폴리도파민(polydopamine)은 홍합의 접착 성질을 모방한 저렴한 접착성 고분자이다. 폴리도파민은 물에 녹아 금속, 반도체, 합성고분자 및 세라믹 등 거의 모든 기질에 코팅되어 고분자 필름을 형성한다. 뿐만 아니라 폴리도파민의 단량체인 도파민을 고분자에 킨주게이션하는 경우 비접착성 고분자에 접착성을 부여할 수 있는 성질을 갖기 때문에 이를 이용하여 표면 폐길화(PEGylation), 히알루론산(Hyaluronic acid), 단백질 등을 고정화하여 바이오칩, 표면 향균 처리, 나노 입자 표면 개질 등 많은 분야에 응용되고 있다.

[0006] 따라서, 최근 지지세포, 매트리지젤을 대신하여 안정적으로 줄기세포를 배양할 수 있는 시스템 개발이 활발히 연구되고 있으나, 아직 뚜렷한 대체제는 개발되지 못하였다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 인간배아줄기세포를 미분화 상태로 배양 가능하며 가격이 저렴하고 안정적인 줄기세포 배양 표면에 대하여 연구하던 중, 카테콜 기능기가 도입된 헤파린, 즉, 헤파린-카테콜이 지지세포 및 매트리지젤을 대신하여 다양한 표면에 안정적으로 코팅될 수 있으며, 정제된 천연고분자를 이용함으로써 구성성분이 명확하여 오염가능성이 훨씬 낮아지는 효과를 가짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**비특허문헌**

- [0008] (비특허문헌 0001) Zhensheng Li et al., "Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds". Biomaterials. 2010. V31. 404-412.
- (비특허문헌 0002) Sharon Gerecht et al., "Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells". PNAS. July 3, 2007 . V 104. pp11298-11303.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명의 목적은 헤파린-카테콜(Heparin-catechol)을 이용한 인간배아줄기세포의 미분화 증식 및 배양 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카테콜(catechol) 기능이 컨쥬게이션(conjugation)된 헤파린을 표면에 코팅시킨 인간배아줄기세포 배양용 플레이트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은
- [0012] 1) 헤파린에 카테콜 기능을 컨쥬게이션하여 헤파린-카테콜을 제조하는 단계;
- [0013] 2) 상기 단계 1)의 헤파린-카테콜을 플레이트 표면에 코팅시키는 단계; 및
- [0014] 3) 상기 단계 2)의 헤파린-카테콜을 코팅한 표면을 멸균하는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포 배양용 플레이트 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은
- [0016] 1) 헤파린에 카테콜 기능을 컨쥬게이션하여 헤파린-카테콜을 제조하는 단계;
- [0017] 2) 상기 단계 1)의 헤파린-카테콜을 pH8.0 내지 pH9.0의 트리스 버퍼(Tris buffer)에 녹인 용액에 플레이트 표면을 담그는 단계;
- [0018] 3) 상기 단계 2)의 플레이트가 담긴 용액에 산화제를 첨가한 후 교반하는 단계; 및
- [0019] 4) 상기 단계 3)의 교반된 용액에서 플레이트를 회수한 후, 세척한 다음 건조시키는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포 배양용 플레이트 표면에 헤파린-카테콜의 코팅 방법을 제공한다.
- [0020] 아울러, 본 발명은
- [0021] 1) 제 1항의 인간배아줄기세포 배양용 플레이트를 전처리하는 단계; 및
- [0022] 2) 상기 단계 1)의 전처리된 플레이트에 인간배아줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포의 배양방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0023] 본 발명의 헤파린-카테콜(Heparin-catechol)은 기존의 매트릭젤 대비 저렴하고 다양한 표면에 안정적으로 코팅될 수 있으며, 정제된 천연고분자를 이용함으로써 구성성분이 명확하여 오염가능성이 훨씬 낮아지는 효과를 가짐으로써, 인간배아줄기세포를 안정적으로 대량배양하는 것에 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0024]

도 1은 헤파린-카테콜(Heparin-catechol)의 <sup>1</sup>H NMR 분석 스펙트럼 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 헤파린-카테콜이 코팅된 금 표면의 코팅 전, 후의 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS) 분석 스펙트럼 결과를 Au4f(금 4f 오비탈), N1s(질소 1s 오비탈) 및 S2p(황 2p 오비탈)에 대해 나타낸 도이다.

도 3은 매트리지젤(Matrigel)과 헤파린-카테콜(HEP) 코팅 표면에서 인간배아줄기세포를 배양한지 3일째에 줄기세포 콜로니의 이미지를 나타낸 도이다.

도 4는 헤파린-카테콜 코팅 표면에서 배양된 인간배아줄기세포의 줄기세포 마커 단백질을 면역 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 매트리지젤(H9\_MG) 및 헤파린-카테콜(H9\_HEP) 코팅 표면에서 배양된 인간배아줄기세포의 줄기세포 마커 유전자를 정량분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6는 매트리지젤(H9\_MG) 및 헤파린-카테콜(H9\_HEP) 코팅 표면에서 배양된 인간배아줄기세포의 분화 마커 유전자를 정량분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 헤파린-카테콜 코팅 표면에서 배양된 인간배아줄기세포로 배상체(Embryoid body)를 형성하여 분화유도하여 분화능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 헤파린-카테콜과 세포외기질 단백질인 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 라미닌(laminin)과의 상호작용을 플라즈마 공명 분석법(surface plasma resonance; SPR) 분석법으로 분석한 결과인 센소그램(Sensogram)을 나타낸 도이다.

도 9는 헤파린-카테콜 코팅에 부착된 세 종류의 세포외기질 단백질의 두께를 타원계측법(Elipsometry)로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0025]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0026]

본 발명은 카테콜(catechol) 기능이 컨쥬게이션(conjugation)된 헤파린을 표면에 코팅시킨 인간배아줄기세포 배양용 플레이트를 제공한다.

[0027]

본 발명에서 헤파린-카테콜(Heparin-catechol)이란 카테콜 기능이 도입된 헤파린 고분자 물질을 의미한다.

[0028]

또한, 상기 헤파린은 분자 결합지로 하이드록시기를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 카테콜 기능기는 도파(dopa), 도파민(dopamine), 노르에피네프린(norepinephrine), 리토스퍼믹산(lithospermic acid), 카페인산(caffeic acid), 로즈마리산(rosmarinic acid), 살비아놀산(salvianolic acid) 및 갈산(gallic acid)인 것이 바람직하고, 폴리도파민(polydopamine)이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029]

또한, 상기 컨쥬게이션은 하이드록시기와 아민기의 접합에 의해 카바메이트 결합(carbamate bond)이 생성되는 반응이고, 상기 헤파린-카테콜의 치환도는 5 내지 50%이고, 특히 10 내지 30%인 것이 바람직하다.

[0030]

또한, 단계 2)의 상기 표면은 폴리우레탄(polyurethane), 폴리다이메틸실록산(PDMS), 테플론(Teflon), 폴리메틸 메타크릴레이트(PMMA), 실리콘(silicone), 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride), 폴리카보네이트(polycarbonate), 생분해성 지방족 폴리에스테르계 고분자, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 인산칼슘(calcium phosphate), 산화알루미늄(aluminum oxide), 산화티타늄(titanium oxide), 산화실리콘(silicon oxide), 산화철(iron oxide), 유리(glass), 석영(quartz), 금(gold), 백금(platinum), 텅스텐(tungsten), 은(silver), 구리(copper), 스테리스 스틸(stainless steel), 코발트-크롬합금(cobalt-chromium alloy) 및 니티놀(nitinol)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0031]

또한, 본 발명은 헤파린에 컨쥬게이션된 카테콜 기능이 다양한 소재의 표면에 안정적으로 코팅되는 능력을 가

짐을 이용하여, 표면에 헤파린-카테콜 코팅을 도입하는 과정을 포함한다. 상기 표면은 카테콜 기능이 코팅될 수 있는 소재면 제한 없이 포함될 수 있다.

- [0032] 또한, 본 발명은
- [0033] 1) 헤파린에 카테콜 기능을 컨쥬게이션하여 헤파린-카테콜을 제조하는 단계;
- [0034] 2) 상기 단계 1)의 헤파린-카테콜을 플레이트 표면에 코팅시키는 단계; 및
- [0035] 3) 상기 단계 2)의 헤파린-카테콜을 코팅한 표면을 멸균하는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포 배양용 플레이트 제조방법을 제공한다.
- [0036] 상기 단계 1)의 헤파린-카테콜은 헤파린 수용액에 도파민 염화수소산 염을 이용하여 카테콜 기능을 도입하여 제조하는 것이 바람직하고, 상기 단계 2)의 코팅은 pH8.0 내지 pH9.0의 트리스 버퍼(Tris buffer)에서 산화제를 도입해 표면에 코팅하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 단계 3)의 멸균은 헤파린-카테콜 코팅된 표면을 UV를 10 분 내지 60분 동안 조사하여 멸균하는 것이 바람직하다.
- [0037] 또한, 본 발명은
- [0038] 1) 헤파린에 카테콜 기능을 컨쥬게이션하여 헤파린-카테콜을 제조하는 단계;
- [0039] 2) 상기 단계 1)의 헤파린-카테콜을 pH8.0 내지 pH9.0의 트리스 버퍼(Tris buffer)에 녹인 용액에 플레이트 표면을 담그는 단계;
- [0040] 3) 상기 단계 2)의 플레이트가 담긴 용액에 산화제를 첨가한 후 교반하는 단계; 및
- [0041] 4) 상기 단계 3)의 교반된 용액에서 플레이트를 회수한 후, 세척한 다음 건조시키는 단계를 포함하는 인간배아 줄기세포 배양용 플레이트 표면에 헤파린-카테콜의 코팅 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 단계 3)의 산화제는 과산화수소 및 이의 염, 차아염소산염(hypochlorite), 과황산염(persulfate), 과산화 유기산(peroxyorganic acid), 과망간산 염(permanganate salt), 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite), 과탄산나트륨(sodium percarbonate), 염소산염(chlorate), 질산(nitric acid) 및 이의 염, 과옥소산염(periodate), 과브로산염(perbromate), 요오드산염(iodate), 과염소산염(perchlorate), 브로산염(bromate)이 바람직하고, 과옥소산염 나트륨(Sodium periodate)이 가장 바람직하다. 또한, 상기 단계 3)의 교반은 70 내지 90 rpm으로 12시간 내지 24시간 교반시키는 것이 바람직하다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 헤파린-카테콜을 제조하기 위하여 먼저, 3차 증류수에 헤파린을 용해시킨 용액에 도파민 염화수소산 염을 용해시킨 용액을 더한 뒤, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC)를 용해시킨 용액을 첨가하였다. pH4 ~ pH4.5 범위를 유지하면서 5시간 동안 교반하였고, 잉여의 반응물을 제거하기 위하여 상기 반응 혼합 용액을 에탄올로 침전시킨 뒤, 침전물을 분자량한계(Molecular Weight Cut-Off; MWCO) 3500 막을 이용하여 pH3 내지 pH4 의 증류수에서 1 내지 3일간 투석하였다. 끝으로, 상기 물질을 동결 건조하여 제조된 헤파린-카테콜의 UV 빛 흡광도 분석 결과 15% 내지 25%의 카테콜 기능을 갖는 헤파린-카테콜이 형성되었음을 확인하였다.
- [0044] 또한, 상기 헤파린-카테콜을 표면에 코팅을 위하여 pH8 내지 pH9 의 트리스 버퍼에 헤파린을 2 mg 내지 4 mg 농도로 녹인 용액에 표면을 담근 뒤, 산화제로서 과옥소산염 나트륨(Sodium periodate, NaIO<sub>4</sub>) 용액을 가한 뒤, 75 rpm에서 12시간 내지 15시간 동안 교반하였으며, 그 후에 고온 멸균한 3차 증류수로 표면을 행군 뒤 질소 가스로 건조하였다.
- [0045] 또한, 본 발명의 헤파린-카테콜이 표면에 코팅되는지 여부를 확인하기 위하여 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)을 사용하여 분석을 실시한 결과, 12시간 코팅한 표면에서 헤파린 고유원소인 황(S)이 검출되었고, 또한, 상기 방법으로 제조된 헤파린-카테콜을 12시간 코팅한 금(Au) 표면의 코팅 두께를 측정된 결과 3 nm 두께로 헤파린 카테콜이 코팅되었음을 확인하였다(도 2 참조).

- [0046] 또한, 본 발명은
- [0047] 1) 제 1항의 인간배아줄기세포 배양용 플레이트를 전처리하는 단계; 및
- [0048] 2) 상기 단계 1)의 전처리된 플레이트에 인간배아줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 인간배아줄기세포의 배양방법을 제공한다.
- [0049] 상기 단계 1)의 전처리는 UV 빛에 5 내지 30 분 동안 노출시켜 멸균한 후, MEF-Conditioned 배지를 플레이트에 채운 다음, 12시간 내지 24시간 동안 인큐베이터에서 보관하는 것이 바람직하고, 상기 단계 2)의 배양은 것이 바람직하다. 특히, 상기 단계 2)의 배양은 지지세포(feeder cell)의 첨가 없이 배양하는 것이 바람직하고, 일반적으로 상기 지지세포는 이중의 세포를 사용하는 데 이들의 증식을 억제하기 위해서, 마이토마이신 C(mitomycin C)를 처리하거나, 방사선 조사를 하는 추가적인 처리를 해야하는 번거로움이 있고, 대다수의 연구자들은 인간배아줄기세포와 이중의 세포를 동시에 키우는 것으로 발생할 수 있는 문제점들 때문에 상기 동시배양을 꺼리고 있어, 본 발명의 배양방법은 간단하고 우수한 인간배아줄기세포의 배양이 가능한 장점이 있다.
- [0050] 또한, 상기 단계 2)에서 배양된 인간배양줄기세포를 회수하는 단계를 추가적으로 포함한다. 상기 헤파린-카테콜층으로부터 인간 배아 줄기 세포를 회수하는 단계는 바람직하게는 기계적 분리방법, 예를 들어 유리봉 등을 사용하여 헤파린-카테콜층으로부터 인간 배아 줄기 세포를 긁어냄으로써 수행할 수 있다. 즉, 기계적 분리방법을 사용함으로써 별도의 효소 처리를 배제할 수 있어, 효소에 의한 오염 문제를 회피할 수 있다. 특히, 상기 헤파린-카테콜층은 배양된 세포를 기계적으로 긁어낼 수 있을 정도의 충분한 강도를 지니고 있으므로, 간단하게 인간 배아 줄기 세포를 회수할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 헤파린-카테콜 코팅된 표면을 줄기세포 배양에 사용하기 위하여, 먼저 상기 표면을 UV 빛에 10분 내지 30분 조사하여 멸균하였다. 이후, 줄기세포 배양 세럼이 포함된 배양 배지에 표면을 넣어 24시간 내지 48시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터(incubator)에서 전처리한 뒤 줄기세포 배양에 사용하였다. 상기 전처리된 표면에서 인간배아줄기세포를 배양한 결과, 78% 이상의 줄기세포 콜로니(Colony) 부착률을 보였으며, 장기간 배양 후에도 줄기세포의 특성을 잃지 않고 증식하는 것을 확인하였다(도 3 내지 도 8 참조).
- [0052] 따라서, 본 발명의 헤파린-카테콜은 기존의 매트릭셀 대비 저렴하고 다양한 표면에 안정적으로 코팅될 수 있으며, 정제된 천연고분자를 이용함으로써 구성성분이 명확하여 오염가능성이 훨씬 낮아지는 효과를 가짐으로써, 인간배아줄기세포를 안정적으로 대량배양하는 것에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0053] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0054] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] **<실시예 1> 헤파린-카테콜의 합성**
- [0056] 헤파린-카테콜을 다음과 같은 방법으로 합성하였다. 헤파린 나트륨 염(Heparin sodium, Wako, 일본)을 3차 증류수에 5 mg/ml로 녹인 용액 및 도파민 염화수소산염(Dopamine hydrochloride, Sigma Aldrich, 미국)을 3차 증류수에 16 mg/ml로 녹인 용액을 제조하여, 상기 두 용액을 섞어준 뒤 pH4.5로 유지하였다. 상기 혼합용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC)(Sigma Aldrich, 미국)를 16 mg/ml로 녹인 용액을 더한 뒤 5시간 동안 pH4 내지 pH4.5를 유지하며 교반하였다. 5 시간 후, 에탄올을 이용하여 2회 침전한 뒤 침전물을 투석방법으로 1 내지 3 일간 정제한 후 동결건조하였다.
- [0057] 상기 방법으로 합성된 헤파린-카테콜 합성물에서 카테콜 기능이 헤파린에 도입되었는지 여부와 치환 정도를 알아보기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR 분석(Bruker Avance 400 MHz, Bruker)을 진행하였다.
- [0058] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 도면에서 7.0 ppm, 7.2 ppm은 카테콜기에서, 5.2 ppm, 5.4 ppm은 헤파린의 아노머릭 양성자(anomeric proton)에서 기인한 화학적 이동(Chemical shift)으로서, 카테콜기가 헤파린에 도입되었음을 확인하였고, 두 화학적 이동의 적분값을 비교한 결과 위의 방법으로 제조된 헤파린-카테콜의 카테콜 치환 정도가 15 내지 25% 사이인 것을 확인하였다(도 1).

- [0059] **<실시예 2> 헤파린-카테콜의 코팅**
- [0060] 헤파린-카테콜의 코팅은 다음과 같은 방법으로 코팅하였다. 헤파린-카테콜을 2 내지 4 mg/ml 농도로 고온 멸균한 트리스 버퍼 pH8.5에 녹인 용액 및 과옥소산염 나트륨(Sodium periodate, NaIO<sub>4</sub>)을 동일 버퍼에 20 mg/ml로 녹인 용액을 각각 제조하였다. 상기 헤파린-카테콜 용액을 세포배양 플레이트가 잠기도록 채워준 뒤 과옥소산염 나트륨 용액을 헤파린-카테콜 용액의 1/10 양 만큼(부피비) 첨가하였다. 상기 플레이트를 75 rpm으로 교반기에서 15시간 동안 교반한 후, 고온 멸균한 3차 증류수를 이용하여 표면을 3 내지 4회 세척한 다음, 질소 가스로 건조하였다.
- [0061] 상기 방법으로 헤파린이 표면에 도입되었는지 여부를 확인하고자, 코팅 전과 후의 표면을 X선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)(Sigma Probe, Thermo VG Scientific)으로 분석하였다.
- [0062] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 코팅 전에는 기질인 금 4f오비탈(Au4f)의 피크만 나타난 반면, 코팅 후 헤파린에 존재하는 황 2p 오비탈(S2p) 피크 및 도파민의 질소 1s 오비탈(N1s) 피크가 검출된 것으로 금 표면에 헤파린-카테콜이 도입되었음을 확인하였다(도 2).
- [0063] **<실시예 3> 헤파린-카테콜 코팅을 이용한 인간배아줄기세포 배양**
- [0064] 헤파린-카테콜 코팅이 도입된 배양 플레이트를 이용하여 다음과 같은 방법으로 인간배아줄기세포를 배양하였다. 구체적으로, 세척 및 건조된 플레이트 표면을 클린벤치의 UV 빛에 10분간 노출시켜 멸균한 후, MEF-Conditioned 배지를 플레이트에 채운 다음 24시간 동안 인큐베이터에서 보관하였다. 이후, 플레이트의 배지를 버린 후, 새로운 배지를 채운 다음 줄기세포 클럼프(clump)를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 상기 배양된 인간줄기세포를 일반 현미경으로 관찰하고 표면부착률은 다음과 같이, (표면부착률)=(부착된 클럼프의 수)/(총 클럼프의 수)를 계산하여 확인하였다.
- [0065] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 배양된 인간배아줄기세포는 매트리지와 유사한 형태를 나타내며 자라는 것이 관찰되었으며, 78%의 표면 부착률을 확인하였다(도 3).
- [0066] **<비교예 1> 매트리젤을 이용한 인간배아줄기세포 배양**
- [0067] 매트리지로 코팅한 배양 플레이트를 이용하여 상기 <실시예 3>과 같이 동일한 조건으로 인간줄기세포를 배양하였다.
- [0068] **<실험예 1> 헤파린-카테콜을 이용하여 배양된 인간배아줄기세포 특성 확인**
- [0069] **<1-1> 배아줄기세포 마커 단백질의 분석**
- [0070] 상기 <실시예 3>에서 배양된 인간배아줄기세포가 줄기세포로서의 특성을 유지하는지 여부를 확인하기 위하여 줄기세포 마커 단백질을 면역 염색법을 사용하여 확인하였다. 구체적으로, 4% 포름알데히드(Formaldehyde, HT5011, Sigma-Aldrich)에 세포를 30분간 담가 고정화한 후, 0.1% Triton X-100(T8787, Sigma-Aldrich) 용액에서 30분간 유화(Permeabilization) 시킨 후에 5% 일반 당나귀 혈청(rnal donkey serum)(017-000-010, Jackson ImmunoResearch)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 다음의 1차 항체로 각각 처리하였다: goat anti-OCT4(sc-8629, Santa cruz), rabbit anti-SOX2(3579s, Cell Signaling). PBS로 헹군 뒤 Alexa Fluor 488-donkey secondary antibodies(Invitrogen) 또는 Alexa Fluor 594-donkey 2차 항체(Invitrogen)에 1시간 처리한 뒤, 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0071] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 줄기세포 마커들이 이상 없이 발현하는 것을 확인하였다(도 4).
- [0072] 또한, 이에 대한 정량적인 유전체 분석을 실시하였다. 먼저 세포에서 총 RNA를 RiboEx(GeneA11)을 이용하여 추출한 뒤, M-MLV 역전사 효소(Enzynomics)를 이용하여 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. iCycler iQ5 Real-time 검출 시스템(Bio-Rad)을 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였으며, 사용한 프라이머는 하기 [표 1]에

정리하였다. 반응 조건은 95℃ 10분-95℃ 30초 40 사이클 (cycle)-60℃ 30초-72℃ 30초-72℃ 5분으로 하였다. 타겟 유전자 발현량은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)인 글리세라알데하이드-3-포스파테이트 디하드로게나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)의 발현량에 대해 정규화(normalization)하였다.

표 1

표적 유전자	Forward	Reverse	크기(bp)
Oct4	tccgggtggagagcaact (서열번호 1)	Gggtgatcctcttctgcttc (서열번호 2)	177
Sox2	accagctcgcagacctacat (서열번호 3)	tggagtgggaggaaggta (서열번호 4)	154
Nanog	tgatttgtggcctgaaga (서열번호 5)	Gttgtttgcctttgggactg (서열번호 6)	150
E-cad	cttgtctgagtaagtgtgttc (서열번호 7)	Tcatagtccgctctgtct (서열번호 8)	116
N-cad	gatatgcttcaacacgcttt (서열번호 9)	Ccaagataataaaatcgctccat (서열번호 10)	93
Nestin	aagaaataaatcagggggca (서열번호 11)	Caggttctcttctcttcca (서열번호 12)	212
Mixl1	ctgctggagctcgtcttcc (서열번호 13)	cgctgttctggaaccatac (서열번호 14)	116

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대표적 마커인 OCT4, SOX2의 경우 매트릭셀 대비 60% - 80% 수준으로 나타난 반면, NANOG, E-Cadherin의 경우 같거나 더 높게 발현되는 것을 확인하였다(도 5).

**<1-2> 배아줄기세포 마커 유전자의 유전체 분석**

상기 <실시예 3>에서 배양된 인간배아줄기세포가 분화가 잘 억제되었는지 대표적인 분화 마커 유전자를 상기 실험에 <1-1>에 기재된 방법을 사용하여 유전체 분석으로 정량하였다.

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 내배엽 마커인 SOX17, 외배엽 마커인 NESTIN, 중배엽 마커인 MIXL1가 모두 매트릭셀보다 헤파린-카테콜에서 배양한 경우 훨씬 더 낮게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 헤파린-카테콜 코팅 표면에서 줄기세포의 분화가 유의적으로 억제되는 효과를 갖는 것으로 해석된다(도 6).

**<1-3> 배아줄기세포의 분화능 확인**

상기 <실시예 3>에서 배양된 인간배아줄기세포가 특정 환경에서 모든 세포로 분화가능한 분화능을 유지하는지 확인하였다. 구체적으로, 헤파린-카테콜 코팅 위에서 자란 인간배아줄기세포 콜로니로부터 형성된 클럼프를 미코팅된 배양플레이트에 배양하여 배양체(Embryoid body)를 형성한 뒤, 이 배양체를 다시 매트릭셀 코팅된 배양플레이트에 콜로니 형태로 배양한다. 형성된 콜로니를 상기 실험에 <1-1>에 기재된 방법의 배아줄기세포 마커 단백질 염색법과 동일한 방법으로 처리하되, 다음의 1차 항체를 사용하였다: mouse anti-GATA4(sc-25310, Santa Cruz), rabbit anti-GATA2(sc-9008, Santa Cruz) 및 goat anti-NESTIN(sc-4248, Santa Cruz).

그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 헤파린-카테콜 코팅 위에서 콜로니 형태로 자란 인간배아줄기세포를 표면에서 떼어내 배양체(Embryoid body)를 형성하고 분화를 유도한 결과 내배엽, 외배엽, 중배엽으로 각각 분화가 원활히 진행되는 것을 확인하였다(도 7).

**<1-4> 헤파린-카테콜과 배아줄기세포의 상호작용 확인**

상기 실험에 <1-1> 내지 <1-3>의 결과가 무엇에서 기인하는지 확인하고자 헤파린-카테콜과 대표적인 세포외기질 단백질인 피브로넥틴(Fibronectin), 비트로넥틴(Vitronectin) 및 라미닌(Laminin)과의 상호작용을 표면 플라즈마 공명 분석법(Surface plasma resonance, SPR)(Biacore3000, BIACORE)으로 확인하였다. 구체적으로, SPR 금칩(Au chip)에 헤파린-카테콜을 12시간 코팅한 뒤, 기기에 장착하고 각 단백질 용액 (5 µg/ml)을 5분간 30 µl/min의 유속으로 흘려주었다. 모든 SPR 분석에 있어 HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 버퍼를 사용하였다.

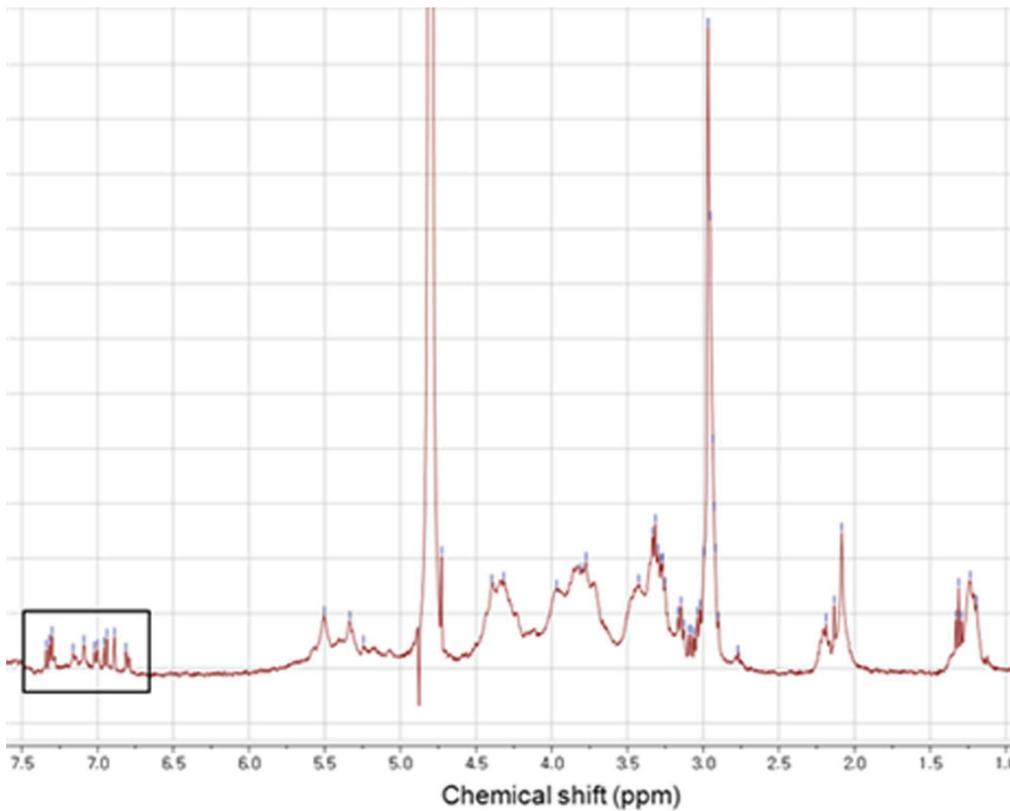
그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 세 가지 단백질 중 비트로넥틴이 헤파린-카테콜과 상호작용이 압도적으로 높은 것으로 나타났으며, 이 상호작용은 안정적으로 오랫동안 지속되는 것을 확인하였다(도 8).

[0084] 또한, 타원분광기(Ellipsometer, GAERTNER Scientific)를 이용하여 헤파린-카테콜에 부착되는 세 종류 단백질의 두께를 측정하였다.

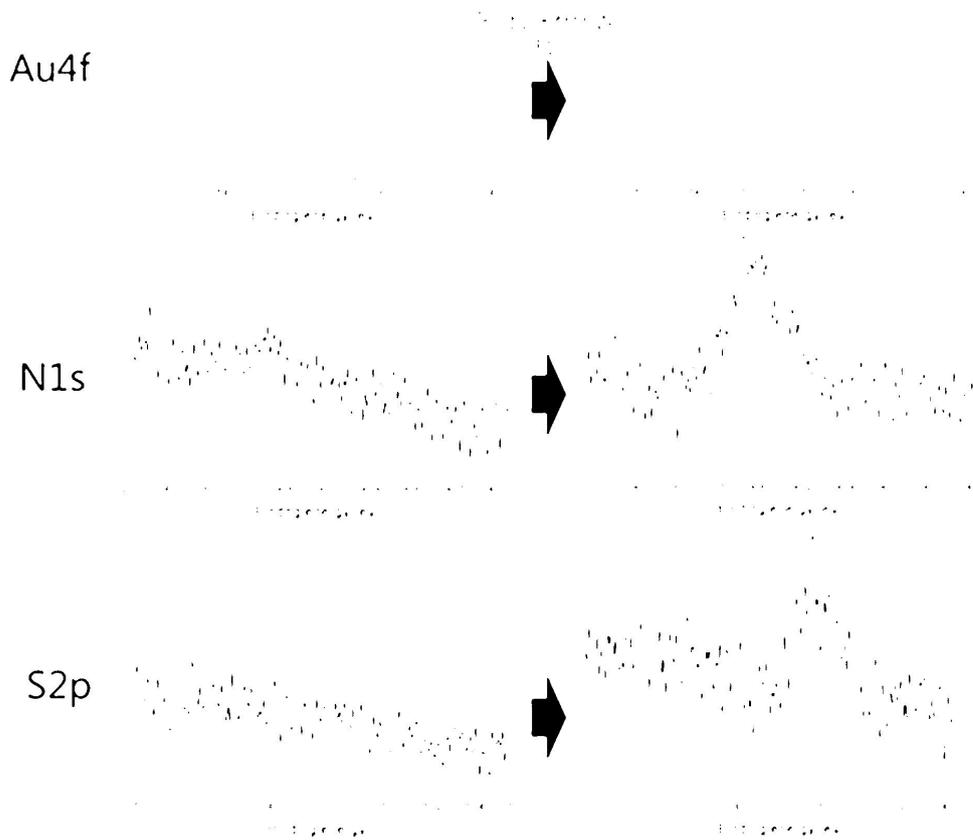
[0085] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, SPR 분석 결과와 상응하는 결과가 관찰되었으며, 상기 SPR 분석에서 피브로넥틴은 헤파린-카테콜 코팅에 처음부터 잘 흡착되지 않는 반면, 비트로넥틴은 빠르게 부착되어 안정적으로 고정되고 라미닌은 빠르게 흡착된 후 빠르게 탈착되는 것을 확인하였다. 비트로넥틴과 라미닌의 흡착 두께가 두껍게 측정이 된 것은 이러한 SPR 결과를 뒷받침해주는 결과이다(도 9).

도면

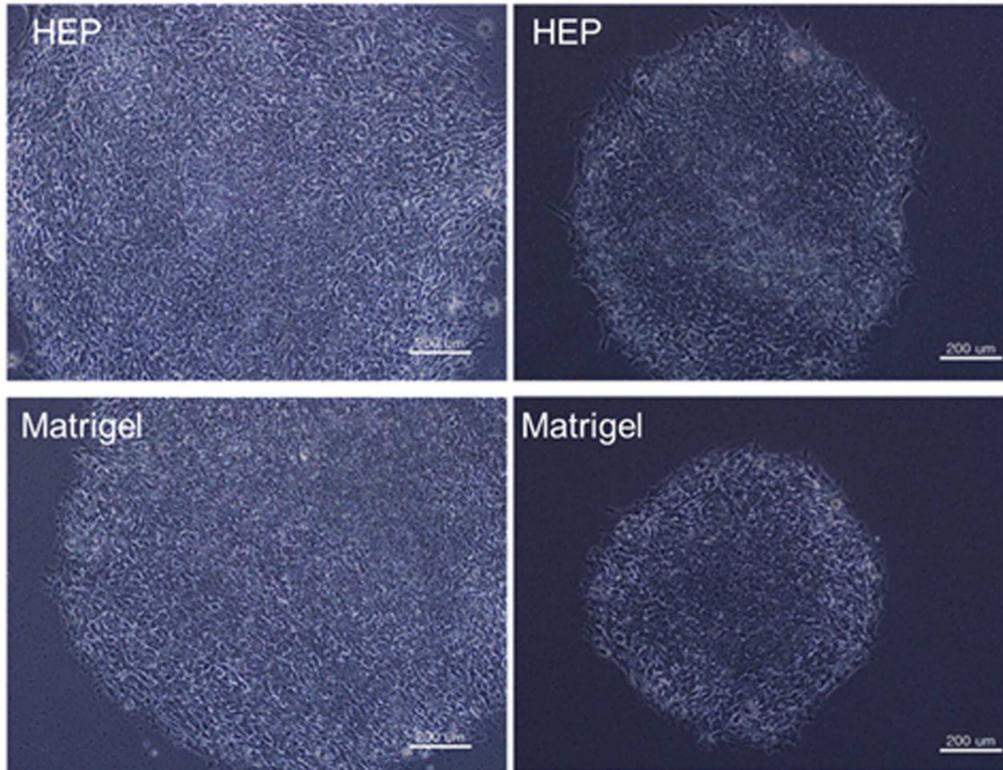
도면1



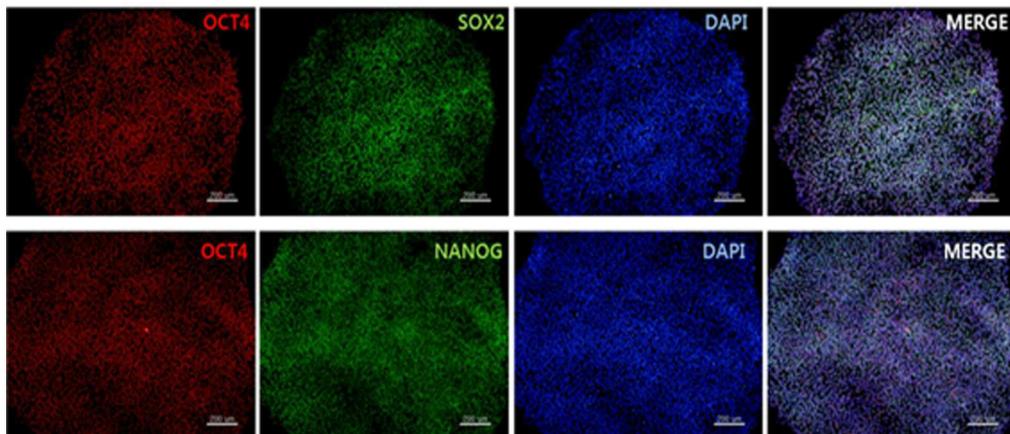
도면2



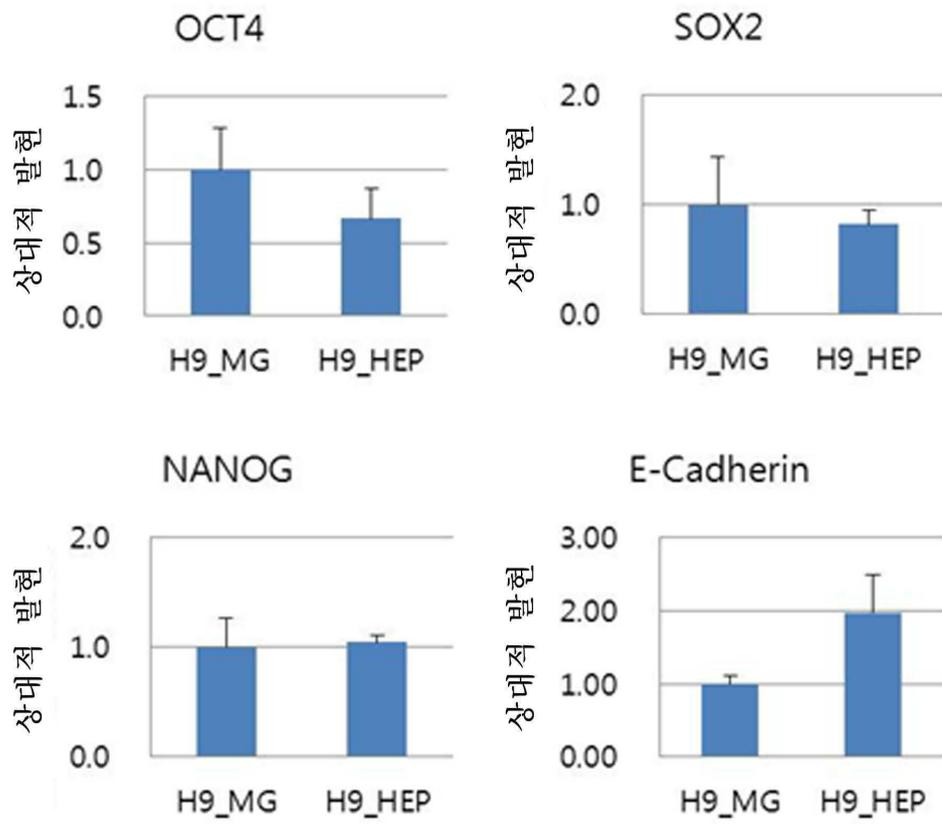
도면3



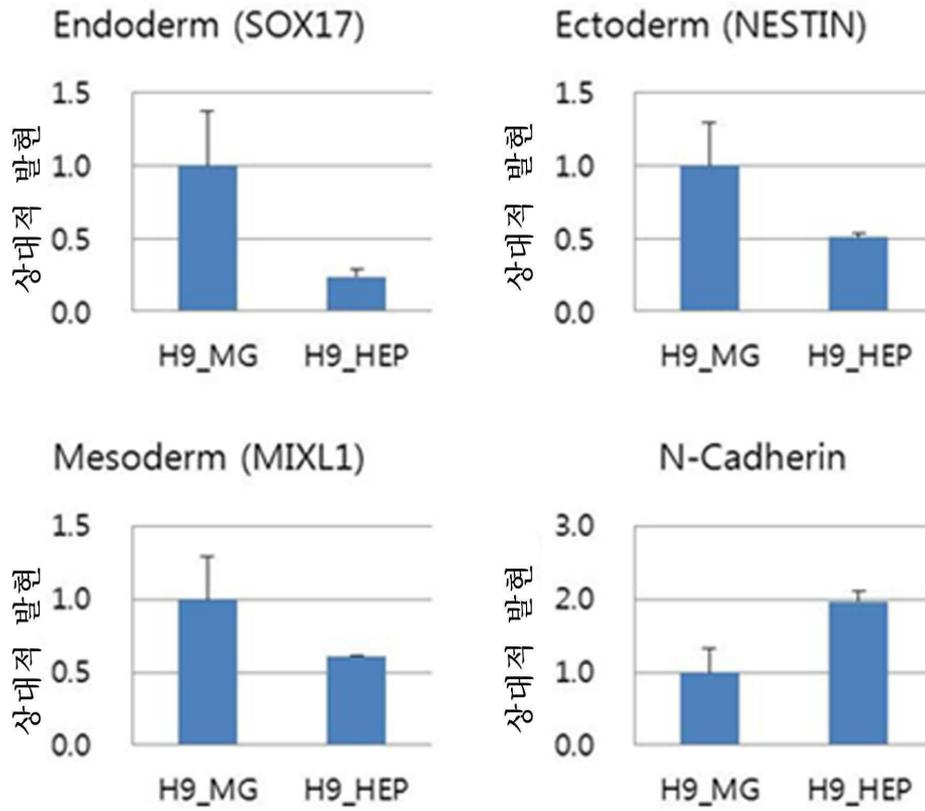
도면4



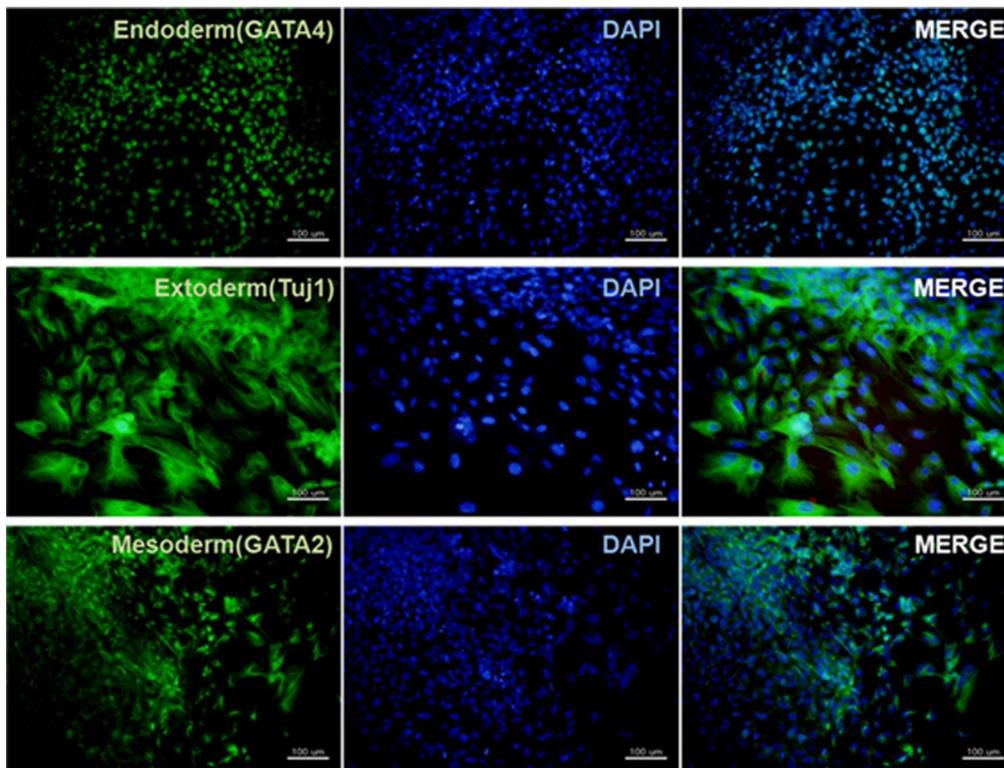
도면5



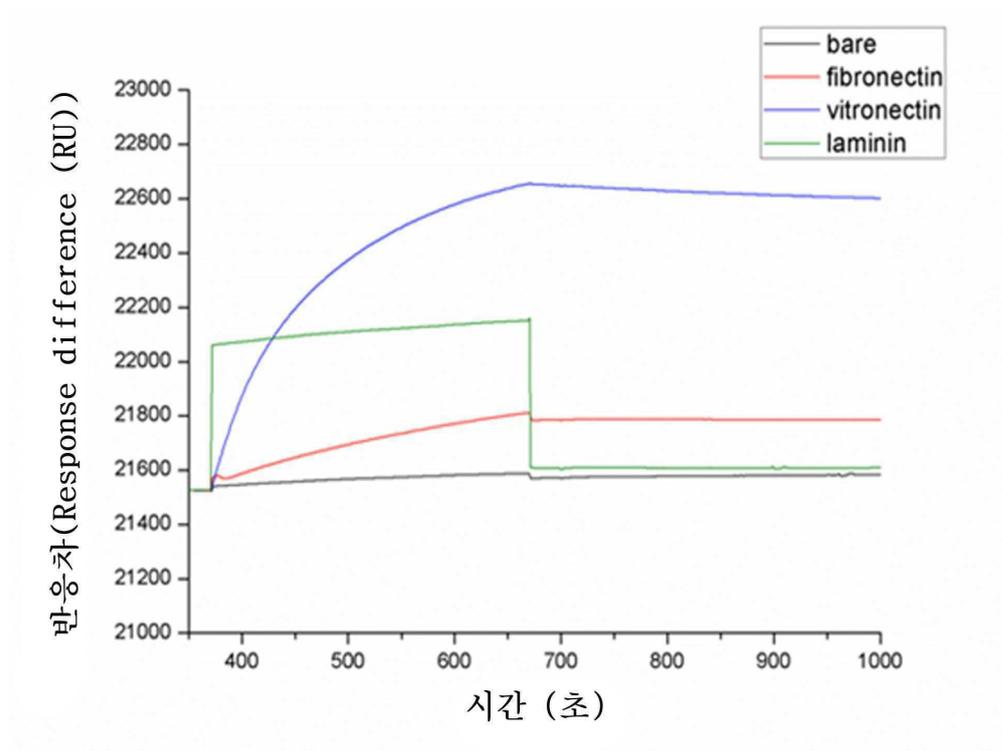
도면6



도면7



도면8



도면9

	Fibronectin	Vitronectin	Laminin
흡착 두께 (A)	5.01	33.66	41.21

서열목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> Method for culture of human embryonic stem cells using adhesive heparins
- <130> 15P-04-012
- <160> 14
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223>	Oct4 Forward Primer	
<400>	1	
	tcggggtgga gagcaact	18
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oct4 Reverse Primer	
<400>	2	
	gggtgatcct cttctgcttc	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sox2 Forward Primer	
<400>	3	
	accagctcgc agacctacat	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sox2 Reverse Primer	
<400>	4	
	tggagtggga ggaagaggta	20
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nanog Forward Primer	
<400>	5	
	tgatttggg gcctgaaga	19
<210>	6	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nanog Reverse Primer	
<400>	6	
	gttgtttgcc tttgggactg	20
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	E-cad Forward Primer	
<400>	7	
	cttgctgag taagtgtgtt c	21
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	E-cad Reverse Primer	
<400>	8	
	tcatagttcc gctctgtct	19
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N-cad Forward Primer	
<400>	9	
	gatatgcttc aacagcgttt	20
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N-cad Reverse Primer	
<400>	10	
	ccaagataat aaaatcgctc cat	23

<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nestin Forward Primer	
<400>	11	
aagaataaaa tcaggggca		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nestin Reverse Primer	
<400>	12	
caggttctct tcctttcca		20
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mix11 Forward Primer	
<400>	13	
ctgctggagc tcgtcttc		19
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mix11 Reverse Primer	
<400>	14	
cgctgttct ggaaccatac		20