



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월21일

(11) 등록번호 10-2445059

(24) 등록일자 2022년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01) C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/50 (2013.01)

C12M 25/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0018998

(22) 출원일자 2022년02월14일

심사청구일자 2022년02월14일

(56) 선행기술조사문헌

KR101578936 B1

KR101860230 B1

KR1020130042854 A

Davey et al., Tissue Engineering: Part C,  
Vol. 21, No. 11, 2015, pp. 1188-1196.

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대  
학교)

주식회사 더도니

서울특별시 관악구 관악로 1, 18동 314호 (신림  
동)

(72) 발명자

안수정

서울특별시 동작구 매봉로 134, 9동 1106호(본동,  
신동아아파트)

송보아

서울특별시 동작구 사당로18길 13, 203호(사당동)  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이민영

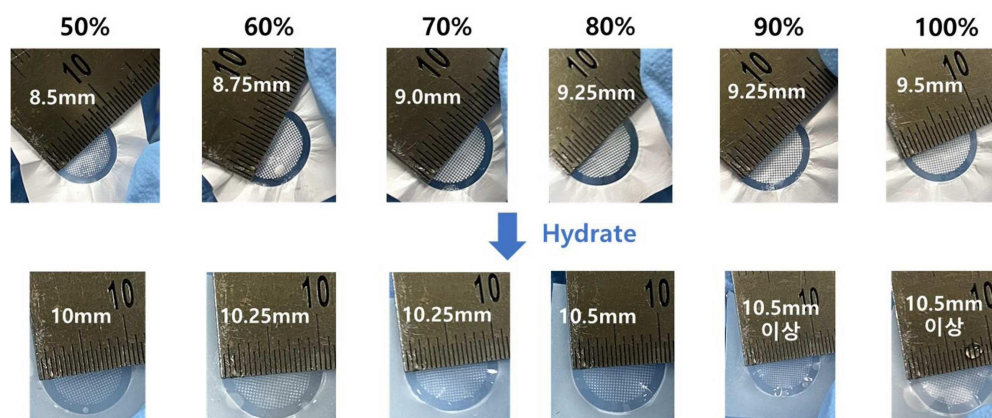
(54) 발명의 명칭 변형이 최소화되고 미세패턴된 나노섬유 스캐폴드

## (57) 요약

멤브레인으로 사용하는 스캐폴드 박막은 제조, 판매, 구입 및 사용 과정에서 건조 및 팽윤 상태를 거치게 된다. 그로인해 발생하는 주름 등의 변형에 의해 사용시 부정적인 영향을 줄 수 있다.

본 발명을 사용하면 상기 변형을 최소화할 수 있다. 이에 따라, 미세하게 생성되어 있는 마이크로 패턴의 손상이 잘 일어나지 않게 되고, 세포를 접종할 때 세포 손실이 적어져 세포 배양에 더욱 용이한 환경을 제공할 수 있다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0068** (2013.01)  
*C12N 2513/00* (2013.01)  
*C12N 2533/00* (2013.01)  
*C12N 2533/50* (2013.01)  
*C12N 2535/00* (2013.01)

(72) 발명자

**박민희**

인천광역시 계양구 서운로 34, 105동 2701호(서운동, 계양효성해링턴플레이스)

**고원건**

서울특별시 서초구 효령로 164, 6동 502호(방배동, 신동아아파트)

**이강원**

서울특별시 성동구 독서당로 191, 3동 105호(옥수동, 옥수동극동아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129207
과제번호	2021R1A2C2014268
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인연구사업_중견연구
연구과제명	환자 유래 스페로이드 기반 3D in vitro 류마티스 관절염 모델 개발 및 약물 평가
플랫폼 구축	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 더도니
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

스캐폴드 박막.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노섬유는 키토산, 엘라스틴, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐, 셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산)) (PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리다이옥산온(PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르우레탄) (PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐 알코올)] (PVOH), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리스티렌(PS) 및 폴리아닐린(PAN)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체적합성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물로 형성되는 것인,

스캐폴드 박막.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔의 전구용액은 상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA) 외에 추가적으로 폴리에틸렌글라이콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트(PHEMA), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리카프로락톤(PCL), 젤라틴, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드 및 무수말레인산/비닐에테르로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 친수성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것인,

스캐폴드 박막.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 내에 생체물질을 추가로 포함하는,

스캐폴드 박막.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 생체물질은 세포, 조직, 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산 및 이들의 하이브리드 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인,

스캐폴드 박막.

**청구항 6**

제5항에 있어서,  
상기 생체물질은 세포인,  
스캐폴드 박막.

**청구항 7**

제5항에 있어서,  
상기 생체물질은 단백질인,  
스캐폴드 박막.

**청구항 8**

제7항에 있어서,  
상기 단백질은 효소, 항원 또는 항체인,  
스캐폴드 박막.

**청구항 9**

제1항에 있어서,  
상기 하이드로겔이 스캐폴드 상에 웰 형태로 패터닝되어 있는,  
스캐폴드 박막.

**청구항 10**

생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드로 제조하는 단계; 및  
상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계를 포함하며,  
상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여  
제조되며,  
상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,  
스캐폴드 박막의 제조방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서,  
나노섬유로 형성된 스캐폴드에 산소 플라즈마 처리하는 과정을 추가로 포함하는,  
스캐폴드 박막의 제조방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서,  
상기 하이드로겔은 포토리소그래피 또는 소프트리소그래피를 이용하여 패터닝된 것인,  
스캐폴드 박막의 제조방법.

**청구항 13**

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 박막이 둘 이상 적층되  
어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,  
복층 스캐폴드 박막.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,  
각각의 박막 내에 세포가 포함되어 있는,  
복층 스캐폴드 박막.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,  
상기 복층 스캐폴드 박막은 세포의 생체 이식을 위해 사용되는 것인,  
복층 스캐폴드 박막.

#### 청구항 16

제13항에 있어서,  
상기 복층 스캐폴드 박막은 셀룰로오즈, 젤라틴, 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산)) (PLGA), 폴리다이옥산온 (PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)] 및 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)]로 구성되는 군으로부터 선택되는 생분해성 고분자로 형성되는 것인,  
복층 스캐폴드 박막.

#### 청구항 17

제13항의 복층 스캐폴드 박막의 각각의 박막 내에 동일하거나 상이한 세포를 배양하고,  
소정의 조건에서의 상기 세포 간의 상호작용을 분석하는 것을 포함하는,  
세포 분석 방법.

#### 청구항 18

제1항의 스캐폴드 박막을 하나 이상 포함하는,  
마이크로어레이.

#### 청구항 19

제1항의 스캐폴드 박막을 하나 이상 포함하는,  
바이오센서.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원의 생물학적 분석 시스템을 제공할 수 있는 미세패턴된 나노섬유 스캐폴드에 관한 것이다

### 배경 기술

[0002] 바이오센서의 제작이나 검진을 위한 생물학적 분석에서 생물분자의 적절한 배열은 필수적이며, 보다 효율적인 생물학적 분석을 가능하게 한다. 단백질이나 세포의 패턴 형성은 특정 위치에서의 단백질이나 세포의 반응을 관찰할 수 있으며, 다른 단백질이나 세포들과의 불필요한 교란 없이 실시간으로 관찰할 수 있는 장점을 갖는다.

- [0003] 이러한 생물분자의 패턴은 여러 미세가공기술을 이용하여 형성하는데, 포토리소그래피와 소프트리소그래피가 주로 이용된다. 이러한 방법을 이용하면 비교적 간단하고 간편한 공정을 통해서 패턴을 얻을 수 있다. 포토리소그래피는 단백질과 세포를 패터닝 하는데 매우 널리 이용되고 있는 방법이다. 주로 UV를 이용하는 방법으로 빛에 반응하는 광 개시반응을 기본 원리로 빛에 노출된 영역은 광 개시반응이 일어나고, 빛에 노출되지 않은 영역은 광 개시반응이 일어나지 않는 것을 이용한다. (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4432) 생체 응용범위에서 포토리소그래피에 주로 이용되는 물질로는 친수성 고분자를 이용하는데, 친수성 고분자로 생성된 하이드로겔은 높은 수분함량과 생체적합성으로 인해 생물학적 응용되고 있다. (Adv. Mater. 2006, 18, 1345) 고분자 하이드로겔은 수분함량이 높으며 생체적합성이 뛰어나다는 점에서 효소나 세포 등의 바이오 물질들을 고정하는데 널리 사용되고 있다. 특히 폴리에틸렌글리콜 하이드로겔은 수중에 있을 때, 단백질과 같은 다른 물질이 부착하는 것을 막는 성질을 가지고 있기 때문에 단백질이나 세포 등의 물질의 부착을 막는 물질로 사용된다. 또한 친수성 고분자와 광중합개시제를 혼합한 용액을 UV로 쬌어주는 포토리소그래피의 간단한 과정을 통해서 하이드로겔을 만들어 낼 수 있으며, UV의 선택적으로 쬌어줄 수 있는 포토마스크의 모양을 통해, 우리가 원하는 형태로 제조가 가능하다는 장점을 가지고 있다. (Langmuir 2001, 17, 5440) 또한 하이드로겔 내부에 단백질이나 세포를 고정하는 방법도 사용될 수 있다(US2005/0169962). 하이드로겔 내부에 세포를 고정할 경우, 실제 몸에서와 비슷하게 3차원 배양이 가능하며, 세포로부터 보다 정확한 정보를 얻을 수 있으며, 효소를 고정할 경우는 환경적인 요인으로부터 효소의 변성을 방지하고 기질과의 반응을 증가시켜 강한 시그널을 측정할 수 있다는 장점들을 가지고 있다 (Langmuir 2004, 20, 270).
- [0004] 소프트리소그래피는 생화학과 생물분야에서 표면을 패터닝하는 방법으로 포토리소그래피의 대안으로 발전되었다. 패턴의 전사나 변형을 위해 탄성이 있는 물질을 이용하는 방법이다. 이 방법은 비교적 저렴하고, 공정이 간단하고, 평평한 표면이 아닌 표면에서도 사용이 가능하며, 정밀한 제어를 요구하지 않는 방법이다. (Biomaterials 1999, 20, 2363)
- [0005] 생물학적 분석에서 생물분자의 패턴 형성도 중요하지만 효율을 높이고, 보다 발전된 형태로 만들기 위해서는 3차원적 구조를 필요로 한다. 하지만, 포토리소그래피나 소프트리소그래피를 이용한 대부분의 생물분자 패터닝은 2차원의 기관 표면 위에 여러 생물분자들을 고정화 시키고 있다. 생물분자들이 실제 동물 신체 내에서는 2차원 표면이 아닌 단백질, 다당류 등을 포함한 세포외기질(extracellular matrix, ECM)로 구성된 3차원 구조의 하이드로겔 내부에 고정되어 있으므로, 2차원 시스템에 고정된 생물분자들은 실제와는 다른 부자연스러운 환경에 존재하게 된다. 따라서 2차원 시스템에 고정된 생물분자들의 신약과 같은 개체대상물질과의 반응은 실제 신체 내에 존재하는 단백질이나 세포들의 반응과는 크게 다를 수 있어 부정확한 정보를 제공해 주게 될 가능성이 매우 높아진다. 이와 같은 2차원 시스템의 단점을 보완하고자 최근 들어 많은 연구자들이 3차원 시스템을 개발하고 있다.
- [0006] 3차원 구조를 형성하는 방법 중 하나인 전기방사법은 간단하며 다목적으로 사용되는 방법으로 연속적인 섬유를 형성하는데 사용된다(Advanced Materials 2004, 16, 1151). 이 방법으로 생성된 나노섬유 스캐폴드는 부피당 넓은 표면적 비를 가지며, 인체 내의 세포외기질과 유사한 구조를 가지므로 인체의 조직을 대체하는데 적합하다 (Journal of Biomedical Materials Research 2002, 60, 613). 또한 이러한 구조는 세포간의 상호작용(Biomaterials 2006, 27, 3136)과 세포의 분화를 증진시키기도 한다(Biomaterials 2008, 29, 3357).
- [0007] 하지만 특정 단백질이나 세포를 분석하기 위해서는 여전히 특정 형태의 패턴닝은 필수적인 과제로 남아있었다. 이러한 문제점의 해결을 위해 등록번호 제10-1578936호는 나노섬유로 형성된 3차원 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝 된 스캐폴드 박막을 제공하였다.
- [0008] 본 발명자는 등록번호 제10-1578936호의 박막이 건조된 상태로 유통되고 사용 시 물을 넣어 팽윤한 상태에서 사용될 때 박막에 주름짐 또는 늘어남 등의 변형이 발생한다는 문제점을 발견했다. 이러한 박막의 변형은 실험 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 상기한 바와 같이 본 발명자는 멤브레인으로 사용하는 스캐폴드 박막이 건조 또는 팽윤 상태가 되며 일어나는 주름짐 또는 늘어남 등의 변형을 최소화하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위해 본원의 일 측면은,
- [0011] 나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있고, 상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,
- 상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%의 농도인 것인 스캐폴드 박막을 제공한다.
- [0013] 본원의 다른 일 측면은,
- [0014] 생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드로 제조하는 단계, 상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계를 포함하며,
- 상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,
- 상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,
- 스캐폴드 박막의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본원의 또 다른 일 측면은,
- [0017] 나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 박막이 둘 이상 적층되어 있고,
- 상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,
- 상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,
- 복층 스캐폴드 박막을 제공한다.
- [0019] 본 발명자는 스캐폴드 박막 변형은 하이드로겔 내 수분 함유량에 영향을 받고, 수분 함유량은 하이드로겔의 농도에 따라 달라지는 것을 확인했다. 본원에서 제시하는 하이드로겔의 농도를 적용한 스캐폴드 박막은, 유통 시 발생할 수 있는 변형을 최소화할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0020] 멤브레인으로 사용하는 스캐폴드 박막은 제조, 판매, 구입 및 사용 과정에서 건조 및 팽윤 상태를 거치게 된다. 그로인해 발생하는 주름 등의 변형에 의해 사용시 부정적인 영향을 줄 수 있다.
- [0021] 본 발명을 사용하면 상기 변형을 최소화할 수 있다. 이에 따라, 미세하게 생성되어 있는 마이크로 패턴의 손상이 잘 일어나지 않게 되고, 세포를 접종할 때 세포 손실이 적어져 세포 배양에 더욱 용이한 환경을 제공할 수 있다.
- [0022] 박막을 인서트와 같은 구조체에 용착 또는 접착하기 쉬워진다. 인서트와 같은 구조체에 용착 또는 접착하는 과정에 있어 수화된 박막은 용착이나 접착이 어려울 뿐만 아니라 접착 후에 누출이 생기기 쉽지만, 본 발명을 활용하면 건조 상태로 접착할 수 있게 됨으로써 상기 단점을 보완할 수 있다.
- [0023] 박막을 제품화 했을 때 유통의 편의성을 제공한다. 박막이 수화된 상태로 유통될 경우 박테리아 증식이 쉬워져 별도의 관리가 필요하다. 그러나 본 발명을 활용하면 건조와 재수화 시 큰 변형을 일으키지 않기 때문에 건조된 상태로 유통할 수 있어 상기 단점을 해결할 뿐만 아니라 박막의 유통기한도 길어진다.
- [0024] 본 발명에 따른 스캐폴드 박막은 안정적인 형태로 유통할 수 있으므로, 안정적인 세포를 배양하여 사용하는 조직공학, 초고속 다중 분석용 세포배양 기기에 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 일 실시예에 따라 PEGDA 함량 별 10mm 직경 포토마스크를 이용해 패터닝 한 하이드로겔의 건조 및 수화 시 직경 변화를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 미세패턴된 하이드로겔 스캐폴드의 제작 과정의 모식도이다.



도 3은 균일한 크기의 하이드로겔 단독 제작 과정의 모식도이다.

도 4는 나노섬유를 포함한 균일한 크기의 하이드로겔 제작 과정의 모식도이다.

도 5는 실시예 1의 스캐폴드 및 실시예 2의 하이드로겔에 대한 수분 흡수율을 측정한 실험의 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 실시예 3의 하이드로겔에 대한 수분 흡수율을 측정한 실험의 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 실시예 3의 하이드로겔의 건조 및 수화 상태를 나타낸 도면이다.

도 8은 PEGDA 함량 50%의 비교예 및 본원의 일 실시예에 따른 PEGDA 함량 80%의 스캐폴드를 인서트와 합쳐 세포 배양 실험을 진행한 사진을 나타낸 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서 사용하는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용하는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0031] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는 "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0033] 본 발명은 나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 스캐폴드 박막 및 상기 하이드로겔의 전구용액에 포함되는 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 적절한 농도 범위를 제공한다. 상기 농도의 단위는 v/v(volume/volume)% 이며, %v/v로도 표기할 수 있다. 본원 명세서 전체에서 '함량 %'등으로 하이드로겔의 농도를 표기한 것 또한 v/v%을 의미한다. 본원의 일 실시예에 따라 확인한 최적의 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA) 농도는 60 내지 85v/v%일 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 3차원적 스캐폴드는 나노섬유의 집합체가 3차원적 오픈 셀 매트릭스를 형성하고 있는 구조를 말한다. 상기 3차원적 오픈 셀 매트릭스는 다수의 포어를 형성하고 있으며, 이들 포어는 소정의 모양, 크기 및 부피를 갖고 있다.
- [0035] 포어의 크기나 부피는 나노섬유를 형성할 때, 나노섬유의 직경이나 밀도의 변화를 통해 조정할 수 있다. 예를 들어, 전기방사법을 이용한 나노섬유의 제조에서 직경은 고분자용액의 농도, 유속 그리고 사용되는 전압을 조절하여 조정할 수 있다. 밀도는 전기방사법에서 나노섬유가 적층되는 기관의 종류 변화에 따라서 조정가능하다. 전기가 잘 통하는 기관 위에서는 고밀도, 전기전도도가 비교적 낮은 기관 위에는 저밀도로 적층된다. 하기 실시예에서는, 나노섬유의 밀도를 비교적 높게 하기 위하여 스테인리스스틸 기관을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용가능한 기관은 금속, 합금, 유리, 실리콘, 종이 등으로 형성된 것일 수 있다.
- [0036] 이에 제한되는 것은 아니나, 포어의 크기는 약 25~100  $\mu\text{m}$ 정도로 조절이 가능하다. 대부분의 세포는 스캐폴드에 고정되어 형질변환이 일어나기 전에는 10~15  $\mu\text{m}$  정도의 크기로 존재하기 때문에 포어 내부로 들어가 스캐폴드 내부에 고정되어 성장과 분화가 일어나기에 적당하다.



- [0037] 이러한 3차원적 나노섬유 스캐폴드는 특히 세포가 나노섬유가 만들어진 오픈 셀의 공간에서, 즉, 세포외기질과 유사한 3차원적 환경에서 배양될 수 있으므로 보다 정확한 생물학적 분석이 가능해진다. 한편, 단백질과 같은 생체물질은 스캐폴드와 소수성 인력(hydrophobic interaction)을 통해 흡착될 수 있다. 또한 나노섬유를 변형(modification)하여 단백질의 아민기와 반응하는 특정 작용기를 달아주거나, 단백질 흡착 이후에 일반적으로 사용하는 글루타알데하이드를 이용하여 단백질간의 crosslinking을 시켜 나노섬유 스캐폴드에 고정할 수 있다. 단백질과 같은 생체물질의 경우 선택적으로 나노섬유에만 흡착되므로 패터닝이 가능하며, 나노섬유의 3차원적 적층구조로 인하여 활성을 같은 면적대비 더 높게 측정할 수 있는 장점을 갖는다.
- [0038] 상기 3차원적 스캐폴드는 전기방사법과 같은 공지의 방법에 의해 나노섬유를 이용하여 형성될 수 있다. 나노섬유를 제조하기 위해 사용되는 물질은 나노섬유를 생성될 수 있는 물질이면 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 나노섬유로 형성된 스캐폴드는 생체물질이 나노섬유에 잘 고정되도록 하기 위하여 추가적 변형(modification)을 거칠 수 있다. 예를 들어, 상기 추가적 변형에는 산소 플라즈마 처리, 라디에이션 그래프팅(Radiation grafting) 방법, 자기조립 단일층(Self-assembly monolayer, SAM) 방법이 이용될 수 있다. 산소 플라즈마 처리의 경우 소수성이 큰 나노섬유의 경우 친수성을 증가시키기 위해 사용된다. 라디에이션 그래프팅 방법으로 예를 들어 나노섬유 스캐폴드에 UV 조사로 벤조페논과 아자이드 물질을 사용하여 나노섬유의 표면을 원하는 물질로 변형시킬 수 있도록 반응성을 줄 수 있다. SAM 방법은 하이드록시 작용기가 존재하는 표면과 실란(Silane)의 자발적인 반응을 이용하여 실란과 결합된 부분을 표면에 고정시키는 방법이다. 라디에이션 그래프팅이나 SAM 방법에서는 일반적으로 단백질과 화학적 결합을 하는 물질인 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)를 결합시켜 사용하게 된다. 이러한 나노섬유로 형성된 스캐폴드에 대한 추가적 변형은 나노섬유 생성 물질의 종류에 상관없이 생체물질이 잘 고정될 수 있도록 해 주므로, 스캐폴드의 제조를 위해 사용될 수 있는 나노섬유 생성 물질의 종류에는 제한이 없다.
- [0039] 한 구체예에서, 나노섬유는 세포나 단백질과 같은 생체물질을 고정시킬 수 있는 생체 적합성 고분자를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 나노섬유는 이에 제한되는 것은 아니나, 키토산, 엘라스틴, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐, 셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락타산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산)) (PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리다이옥산온 (PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르 우레탄) (PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐 알코올)] (PVOH), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리스티렌(PS) 및 폴리아닐린 (PAN)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체적합성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 3차원적 스캐폴드는 하이드로겔에 의해 패터닝된다. 하이드로겔은 3차원적 스캐폴드의 구획을 나누어주는 역할을 한다. 이는 하이드로겔 내부에 세포나 단백질과 같은 생체물질을 고정시켜 패터닝시키던 종래의 기술(US2005/0169962)과는 달리, 포어를 통한 확산은 용이하게 하면서도 생체물질을 특정 위치에 관찰할 수 있는 패터닝을 가능하게 해 준다.
- [0041] 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔을 패터닝시키는 방법으로는 포토리소그래피 또는 소프트 리소그래피를 이용할 수 있다.
- [0042] 하이드로겔 합성은 통상의 포토리소그래피에 의한 고분자 중합법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어, 자외선 노광 하에서 포토마스크를 이용한 고분자의 라디칼 중합법을 통해 합성될 수 있다. 예컨대, 친수성 고분자와 광중합개시제를 혼합한 전구용액을 만든 후, 플라즈마 처리한 나노섬유 스캐폴드가 충분히 담기도록 전구용액을 떨어뜨리고, 원하는 형태의 포토마스크를 이용하여 그 위로 UV를 조사하여 하이드로겔 패터닝을 할 수 있다.
- [0043] 상기 자외선 노광은 10 내지 200 mW에서 0.5 내지 수십 초 동안 실시할 수 있다. 자외선 노광이 충분치 않을 경우 고분자간 가교 결합이 충분히 일어나지 않을 수 있으며 반대로 자외선 노광이 지나칠 경우 라디칼의 확산에 의해 마스크의 형상이 정확하게 하이드로겔의 외형에 반영되지 않을 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 하이드로겔 합성은 자외선 노광 하에서 포토마스크를 이용할 경우, 광량과 노광되는 면의 형태 조절이 가능하다. 상기 포토마스크의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 하이드로겔을 패터닝하고자 하는 형태에 따라 조절될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 하이드로겔은 스캐폴드 상에 웰 형태로 패터닝될 수 있다. 하이드로겔 상에 웰 형상이 형성되도록 패터닝하게 되면, 이렇게 형성된 웰 내에 생체물질을 가두어 생체 물질을 특정 위치에 패터닝하기에 용이하다. 다른 구체예에서, 상기 하이드로겔은 스캐폴드 상에 기둥 형태로 패터닝 될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 하이드로겔은 생체물질에 대해 생체적합한 친수성 고분자이면 어떠한 것이든 이용가능하다. 대부분

의 친수성 고분자는 세포나 단백질이 흡착이나 결합하지 않도록 해 주므로 생체물질의 구획화를 통한 패터닝을 가능하게 한다. 또한, 나노섬유만으로 구성된 스캐폴드는 쉽게 손상되어 취급하기 매우 까다로운데, 하이드로겔을 나노섬유 스캐폴드 상에 패터닝하게 되면 취급성이 우수해지는 효과를 거둘 수 있다.

[0046] 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 상기 하이드로겔의 전구용액은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA) 외에 추가적으로 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트(PHEMA), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산(PGA) 및 폴리카프로락톤 (PCL), 젤라틴, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드, 무수말레인산/비닐에테르로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 친수성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0047] 나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 및 상기 스캐폴드 상에 소정의 형태로 패터닝된 하이드로겔을 포함하는 패터닝된 스캐폴드 박막은 세포나 단백질과 같은 생체물질을 생체 외에서 생체 내의 환경과 유사한 3차원 구조의 특정 위치로 패터닝할 수 있게 한다.

[0048] 따라서 본 발명은 상기 스캐폴드 내에 생체물질을 추가로 포함하는 패터닝된 스캐폴드 박막을 제공한다.

[0050] 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막은 3차원적 환경을 제공하면서도 다른 구역에 있는 단백질이나 세포간의 직접적인 접촉이나 영향에 의한 교란을 없앨 수 있으며, 패터닝을 통해 지속적으로 같은 위치의 관찰이 가능해지기 때문에, 실시간 관찰이 가능해지므로 보다 효율적인 생물학적 분석을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 패터닝된 스캐폴드에 생체물질로서 단백질과 같은 생체물질을 고정시키는 경우, 평평한 표면에서의 단백질 흡착보다 단위면적당 흡착되는 단백질의 양이 크게 증가하기 때문에 보다 뛰어난 활성을 얻을 수 있다.

[0052] 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막은 기관 위에 고정되어 있는 형태로 존재하거나, 기관에서 분리하여 스캐폴드 박막 자체로 사용될 수 있다. 본 발명의 패터닝된 스캐폴드를 물에 넣어두면 하이드로겔이 기본적으로 물에 있으면 팽윤하는 성질을 가지고 있기 때문에 자연스럽게 기관에서 떨어지게 되므로 스캐폴드의 손상 없이 박막의 분리가 가능하다. 팽윤하는 정도는 사용하는 친수성 고분자의 분자량에 따라 조절이 가능하다. 스캐폴드 박막 자체로 분리하여 사용하는 경우에는 양쪽 면이 모두 개방되어 있어, 활발한 확산이 일어난다. 특히 고분자 하이드로겔 내부에서 자체적으로 확산이 일어나기 때문에 기존의 다른 구조들에 비해 뛰어난 확산을 보여, 단백질이나 세포가 활발한 대사활동을 할 수 있도록 도움을 준다. 또한 이 경우 패터닝된 스캐폴드 박막을 둘 이상 적층하는 것이 가능해 여러 종류의 단백질이나 세포와 같은 생체물질을 층으로 구분되는 형태로 배양이 가능해지는 장점이 존재한다.

[0054] 한편, 본 발명에 있어서, '생체물질'이란 분석대상물질을 선택적으로 인식하여 생물학적 상호작용 및 인식반응을 일으켜 신호를 발생시키는 역할을 하는 생물유래성 물질을 의미한다. 한 구체예에서, 생체분자는 이에 제한되는 것은 아니나, 세포, 조직, 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산 및 이들의 하이브리드 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0056] 상기 생체분자의 하나로 예시한 단백질은 분석대상물질과 반응할 수 있는 것이라면 어떠한 것이든 제한되지 아니하나, 분석대상물질의 종류에 따라 달라질 수 있다.

[0058] 한 구체예에서, 상기 단백질은 효소, 항원 또는 항체일 수 있다. 예를 들어 분석대상물질이 당이나 지질인 경우 상기 단백질은 이들과 반응할 수 있는 효소일 수 있으며, 분석대상물질이 항체 또는 항원인 경우 상기 단백질은 이들과 결합할 수 있는 항원 또는 항체일 수 있다.

[0060] 본 발명은 또한 상기 패터닝된 스캐폴드 박막의 제조방법을 제공한다. 구체적으로, 생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드로 제조하고; 상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 것을 포함하며, 상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되고,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인 패터닝된 스캐폴드 박막의 제조방법을 제공한다. 전기방사법은 나노섬유로 스캐폴드를 형성하기 위해 사용하는 기술로 당업계에 잘 알려져 있다(Advanced Materials 2004, 16, 1151). 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드를 제조하는 단계에 대해 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 스캐폴드를 구성하는 나노섬유의 재료, 즉, 생체적합성 고분자를 적당한 용매에 녹여 주사기에 넣고, 주사기 내의 용액을 일정하게 배출시키는 주입기에 장착시킨다. 용액은 고전압이 걸리는 금속으로 된 가느다란 원통형 바늘로 주입되어 접지된 바닥으로 전기적 힘에 의해 용액이 잡아당겨지면

서 용매는 증발하고 나노섬유가 바닥에 쌓이게 된다. 일정량이 쌓이게 되면 나노섬유의 잔류 용매를 제거하기 위해 진공상태에 두어 최종적으로 나노섬유 스캐폴드를 얻게 된다.

[0062] 한 구체예에서, 상기 패터닝된 스캐폴드 박막의 제조방법은 상기 생성된 나노섬유로 형성된 스캐폴드에 산소 플라즈마 처리하는 과정을 추가로 포함할 수 있다. 상기 스캐폴드에 산소 플라즈마 처리를 하게 되면 나노섬유의 친수성을 증가시킬 수 있다. 나노섬유 스캐폴드의 친수성을 증가시키면 물의 침투성이 증가하고, 단백질이나 세포의 흡착이 플라즈마 처리를 하기 전보다 증가한다.

[0064] 상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계는 앞서 설명한 바와 같이, 포토리소그래피 또는 소프트리소그래피를 이용하여 하이드로겔을 패터닝할 수 있다. 예를 들어, 포토리소그래피를 이용하는 경우, 친수성 고분자와 광중합개시제를 혼합한 전구용액을 만든 후, 플라즈마 처리한 나노섬유 스캐폴드가 충분히 담기도록 전구용액을 떨어뜨리고, 원하는 형태의 포토마스크를 이용하여 그 위로 적당한 파장의 UV를 조사하여 하이드로겔 패터닝을 한다.

[0066] 하이드로겔로 패터닝 된 스캐폴드는 최종적으로 멸균 시키기 위해 알코올에 일정 시간 담가둔 후 남아있는 알코올을 제거하기 위해 적당한 버퍼로 세척하는 과정을 거쳐 세포나 생체물질을 위한 스캐폴드로서 사용하게 된다.

[0067] 위와 같은 방법으로 제조된 패터닝된 스캐폴드는 세포나 생체물질을 특정위치에 고정시킨 채 생물학적 분석을 하는 것을 가능하게 해 준다. 하기 실시예에서는 세포가 스캐폴드 상의 특정위치에 붙는지 관찰하기 위하여 패터닝된 스캐폴드에 세포가 포함된 용액을 가해주고, 세포가 자랄 수 있는 배지를 채워 배양한 후, 형광물질 부착을 이용한 생존확인 분석방법을 사용하여 세포가 스캐폴드의 특정 위치에 고정되어 자라는 것을 확인하였다. 또한, 단백질이 특정위치에 흡착되는지 알아보기 위해서 형광이 부착된 단백질인 Bovine serum albumin conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC-BSA)를 물에 녹여 하루정도 담가둔 후에 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, 단백질이 패터닝된 스캐폴드의 특정 위치에 고정됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 패터닝된 스캐폴드를 이용하면, 특정 위치에 고정된 세포나 생체물질에 대해 각기 다른 분석대상물질을 처리하고 그들간의 반응 여부를 상기 위치에서의 형광이나 발색과 같은 신호를 분석함으로써 쉽게 알아 낼 수 있게 된다. 즉, 2차원적인 마이크로어레이에서의 분석이 생체 환경과 유사한 3차원적인 공간에서 실현되게 되므로, 세포나 생체물질에 대한 보다 효율적이면서도 정확한 분석이 가능하게 된다.

[0069] 본 발명은 또한 나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 및 상기 스캐폴드 상에 소정의 형태로 패터닝된 하이드로겔을 포함하는 패터닝된 스캐폴드 박막이 둘 이상 적층되어 있고 상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인 복층 스캐폴드 박막을 제공한다. 각각의 박막 내에는 세포 또는 단백질과 같은 생체물질이 포함되어 있을 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 복층 스캐폴드 박막의 각각의 박막 내에는 세포가 포함되어 있을 수 있다. 이러한 복층 스캐폴드는 세포의 생체 이식을 위해 사용될 수 있다. 세포가 함유되어 있는 복층 스캐폴드 박막은 조직의 복구를 위한 생체 이식에 매우 유용하게 사용될 수 있다. 이 경우 나노섬유 스캐폴드와 하이드로겔을 형성하는 고분자로서 생분해성 고분자를 사용하게 되면 체내에서 세포들 스스로가 스캐폴드를 형성할 시기가 될 때 생분해성 고분자는 분해되어 사라지고 세포들만이 남게 된다. 따라서 한 구체예에서, 상기 복층 스캐폴드 박막은 이에 제한되는 것은 아니나, 셀룰로오스, 젤라틴, 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산)) (PLGA), 폴리다이옥산온 (PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)] 및 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)]로 구성되는 군으로부터 선택되는 생분해성 고분자로 형성되는 것일 수 있다.

[0071] 앞서 설명한 바와 같이 기존의 나노섬유 스캐폴드는 쉽게 손상될 수 있기 때문에 조작이 매우 어렵다. 반면, 본 발명의 스캐폴드 박막은 하이드로겔 패터닝을 통해 조작이 용이해 조직공학적 측면에서 우수한 특성을 갖는다. 또한, 하이드로겔 패터닝을 통해 원하는 형태로 세포를 패터닝할 수 있으므로 이식하려는 특정 부분에서 요구되는 특정한 형태를 갖출 수 있다. 뿐만 아니라, 몸 속의 대부분의 조직들이 층상 구조를 이루고 있다는 점에서 각각의 박막에 세포를 함유하고 있는 본 발명의 복층 스캐폴드 박막은 실제 조직과 유사한 형태의 재생 조직을 생체에 이식하는 것을 가능하게 해 준다.

[0073] 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막은 기관 위에 고정되어 있는 형태로 존재하거나, 기관에서 분리하여 스캐폴드 박막 자체로 사용될 수 있다. 따라서, 스캐폴드 박막 자체로 분리하여 사용하는 경우에는 양쪽 면이 모두 개방되어 있어, 활발한 확산이 일어나므로 세포나 생체물질이 활발한 대사활동을 할 수 있도록 도움을 준다. 따라서 패터닝된 스캐폴드 박막을 둘 이상 적층하는 것이 가능해져 동일하거나 상이한 종류의 세포나 단백질을 각각의



층에 고정시키고 이들간의 상호작용을 분석할 수 있게 된다.

[0074] 따라서 본 발명은 상기 복층 스캐폴드 박막의 각각의 박막 내에 동일하거나 상이한 세포를 배양하고, 소정의 조건에서의 상기 세포 간의 상호작용을 분석하는 것을 포함하는 세포 분석 방법을 또한 제공한다.

[0076] 본 발명은 또한 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막을 하나 이상 포함하는 마이크로어레이를 제공한다. 본 발명에서 마이크로어레이라 함은 고속 스크리닝 방법을 이용하여 다량의 생물학적 물질을 분석해 내는 복합적인 랩 온어칩(lab-on-a-chip)을 의미한다. 일반적으로 마이크로어레이는 유리 기판 또는 실리콘 기판과 같은 고체 기판 상에 생체물질이 고정되어 있는 형태를 의미하나, 본 발명에서는 별도의 기판이 존재하지 않고 패터닝된 스캐폴드 박막만으로 구성된 경우도 포함한다. 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막이 기판 상에 형성되는 경우, 기판으로는 유리 기판이나 실리콘 기판뿐만 아니라 유연성을 갖는 플라스틱 기판 또한 이용가능하다. 상기 마이크로어레이에는 다양한 생체물질이 고정되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 마이크로어레이는 세포 마이크로어레이, 조직 마이크로어레이, 단백질마이크로어레이, 항체 마이크로어레이, 탄수화물 마이크로어레이, DNA 마이크로어레이 등을 모두 포함한다.

[0078] 본 발명은 또한 본 발명의 패터닝된 스캐폴드 박막을 하나 이상 포함하는 바이오센서를 제공한다.

[0079] 바이오센서는 특정한 물질, 즉 분석대상물질에 대해 반응할 수 있는 생체물질과 생리화학적 탐지 물질이 결합하여 검체 내에 검색대상물질이 존재하는 경우 발생하는 생물학적 상호작용 또는 인식반응을 측정이나 정량이 보다 용이한 신호, 예컨대 전기적, 광학적, 자기적 신호 등으로 변환시킴으로써 검체 내의 분석대상물질의 존재나 양, 또는 활성을 탐지할 수 있는 장치를 의미한다. 여기에서 분석대상물질은 항원, 혈당, DNA와 같은 생체물질뿐만 아니라 신약후보물질과 같은 일반적인 화학물질을 포함한다. 본 발명의 바이오센서에서는 이러한 분석대상물질에 대해 반응할 수 있는 세포, 조직, 단백질, DNA 등의 생체물질이 3차원의 패터닝된 스캐폴드 박막 상의 특정 위치에 고정되어 있으므로, 특정 위치에서의 전기적 또는 광학적 신호를 탐지함으로써 생체 환경과 유사한 환경에서의 분석대상물질의 존재나 양, 또는 활성을 손쉽게 분석해 낼 수 있게 된다. 본 발명의 바이오센서는 바이오칩 또는 미세유체장치 등의 형태를 취할 수 있으며, 그에 따라 기판이나 미세유체채널 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 분석대상물질과 생체물질 간의 상호작용을 측정이 용이한 신호로 변화해 줄 수 있는 탐지 물질을 추가로 포함할 수 있다. 여기에서 탐지물질은 예를 들어, 상기 분석대상물질과 생체분자 간의 반응 산물과 반응하여 형광의 방출 또는 발색을 유도하거나 전기적 신호를 나타낼 수 있는 물질일 수 있다. 예를 들어, 분석대상물질의 독성을 탐지하고자 하는 경우 본 발명의 패터닝된 스캐폴드에 생체물질로서 여러 종류의 세포들을 고정하고, 특정 위치마다 분석대상물질을 처리한 후, 세포의 생존 여부를 살아있는 세포에만 부착되는 녹색형광을 띠는 DiOC18(3)과 죽은 세포에만 선택적으로 부착되는 붉은 형광을 띠는 프로피디움 아이오다이드를 탐지물질로 사용하여 특정 위치에서의 발색 현상을 분석함으로써 분석대상물질의 특정 세포에 대한 독성을 손쉽게 탐지할 수 있다. 유사한 방법으로, 분석대상물질에 대한 각기 다른 세포의 반응성을 탐지할 수 있게 된다.

[0081] 본 발명의 스캐폴드 박막에 사용되는 하이드로겔의 전구용액에 포함된 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 함량은 60 내지 85v/v%일 수 있다. 본원 발명은 등록번호 제10-1578936호의 스캐폴드 박막을 사용하는 과정에서 기존 사용하는 하이드로겔 함량 50%의 스캐폴드 박막을 사용할 때 생기는 박막 변형을 최소화하기 위한 하이드로겔 함량 범위를 제시한다. 이를 확인하기 위한 일 실시예로 PEGDA 함량 별 건조 및 수화 시 박막의 지름 변화를 관찰하였다. (도 1 참조) 10mm 직경 포토마스크를 이용해 패터닝 한 하이드로겔을 이용하여 확인한 결과 60 내지 85v/v%에서 직경이 10mm에서 크게 벗어나지 않음을 확인했으며, 실시예 1 내지 5의 실험을 통해 위 결과의 타당성을 확인했다.

[0083] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.

[0085] **실시예 1: 미세패턴된 하이드로겔 스캐폴드의 제작**

[0086] 폴리카프로락톤(분자량 80000, Aldrich)을 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE)에 혼합한 후, 80℃ 컨벡션 오븐으로 12시간 동안 완전히 녹여 15w/v% 용액을 제조하였다. 전기방사법을 이용하기 위해 제조된 폴리카프로락톤 용액을 10mL 주사기에 넣고 1mL/hr의 일정한 속력으로 stainless steel 소재의 원통형 바늘로 흘려주었다. 상기 원통형 바늘에 고전압 장치를 이용하여 10kV의 전압을 흘려주었다. 전압 차이로 인해 접지된 stainless steel 기판 위에 놓인 알루미늄 호일로 감싼 커버글라스 위로 폴리카프로락톤용액이 연신되면서 나노섬유를 형성하였다.

[0087] 하이드로겔 미세패턴은 전기방사된 나노섬유 위에 포토리소그래피 방법을 이용하여 제작하였다. 하이드로겔 전구용액은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA, 분자량 575, Aldrich)를 증류수와 혼합한 후 광중합개시제인

2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(2-hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP, Aldrich)을 PEGDA 혼합 용액에 2v/v%의 농도로 혼합하여 제조하였다. PEGDA와 증류수의 혼합 용액 제조 시 PEGDA의 농도를 다르게 하여 각각 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 및 100v/v%의 비율로 총 9종류의 하이드로겔 전구용액을 제조하였다.

[0088] 하이드로겔 미세패턴을 형성하기 위해서 18mm\*18mm크기의 나노섬유 위에 전구용액을 고르게 도포한 후, 빛을 통과시키는 부분과 통과시키지 않는 부분으로 이루어진 포토마스크를 위에 두고 그 위에 365nm파장을 가진  $300\text{mW}/\text{cm}^2$  세기의 UV광으로 1초동안 조사하였다. 이 때 전구용액의 농도 별 점도 차이로 인해 전구용액의 도포 용량을 농도 별로 다르게 해야 정교한 미세패턴의 형성이 가능하다. 이에 따라 전구용액을 하기 표와 같은 용량으로 나노섬유 위에 도포하였다.

표 1

[0089]	농도(v/v%)	50	60	65	70	75	80	85	90	100
	용량( $\mu\text{l}$ )	150	150	150	145	145	140	140	135	130

[0090] 빛이 통과하여 UV에 조사된 부분만 전구용액의 가교결합이 일어나 하이드로겔이 형성되었고, 가교가 일어나지 않은 부분의 용액을 세척해주기 위해 증류수에 1시간 동안 담가 두었다.(도 2 참조)

[0092] 실시예 2: 균일한 크기의 하이드로겔 단독 제작 방법

[0093] 상기 실시예 1과 동일한 하이드로겔 전구용액을 제조했다. 그 후 균일한 크기의 하이드로겔을 단독으로 제작하기 위해 18mm\*18mm 크기의 커버글라스 위에 전구용액을 PEGDA 농도와 상관없이  $150\mu\text{l}$  도포했다. 그 위에 동일한 크기의 커버글라스를 두고 365nm파장을 가진  $300\text{mW}/\text{cm}^2$  세기의 UV광으로 1초동안 조사하였다. 모든 전구용액에 UV가 조사되어 가교결합이 일어나 18mm\*18mm의 면적과 동일한 높이를 지닌 균일한 크기의 하이드로겔이 형성되었고, 가교가 일어나지 않은 용액을 세척해주기 위해 증류수에 1시간 동안 담가 두었다.(도 3 참조)

[0095] 실시예 3: 나노섬유를 포함한 균일한 크기의 하이드로겔 제작 방법

[0096] 실시예 1에서 스캐폴드 밖으로 드러나는 나노섬유로 인해 수분 흡수량에 영향이 있을 수 있어 나노섬유를 하이드로겔이 모두 포함하도록 하이드로겔을 제작했다.

[0097] 실시예 1과 동일하게 나노섬유 및 하이드로겔 전구용액을 제조하되, 균일한 크기의 나노섬유를 포함한 하이드로겔을 제작하기 위해 18mm\*18mm 크기의 나노섬유 위에 전구용액의 PEGDA 농도에 무관하게  $150\mu\text{l}$  용량의 용액을 고르게 도포한 후 그 위에 동일한 크기의 커버글라스를 두고 365nm파장을 가진  $300\text{mW}/\text{cm}^2$  세기의 UV광으로 1초동안 조사하였다. 모든 전구용액에 UV가 조사되어 가교결합이 일어나 18mm\*18mm의 면적과 동일한 높이를 지닌 균일한 크기의 나노섬유를 포함한 하이드로겔이 형성되었고, 가교가 일어나지 않은 용액을 세척해주기 위해 증류수에 1시간 동안 담가 두었다.(도 4 참조)

[0099] 실시예 4: 제작된 스캐폴드 및 하이드로겔 샘플의 수분 함유량 비교 실험

[0100] 상기 실시예 1, 2, 3에서 제작된 상이한 PEGDA 농도를 함유한 샘플의 수분 함유량 비교를 위해 건조 및 수화하여 샘플의 무게를 측정하였다. 제작된 샘플들은  $25^\circ\text{C}$  상태의 공기중에 두어 수분을 모두 제거하여 건조시켰다. 건조된 샘플들은 전자저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 그 후 샘플들이 충분히 수화되어 수분을 함유할 수 있도록 증류수에 3시간 동안 담가 두고, 이후 수화된 샘플들을 전자저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 측정된 무게를 이용하여 수분 함유량을 계산한 후 비교하였다. 또 기존의 스캐폴드에서 사용하는 PEGDA의 함량은 주로 50%이므로 이를 비교예로 삼았다.

[0101] 수분 함유량의 계산식은 다음과 같다.

[0102] 함유량(Water uptake; %) =  $(W_s - W_d) / W_d * 100$

[0103] ( $W_s$ : Weight on swelling,  $W_d$ : Weight on drying )

[0105] 도 5는 실시예 1 및 2를 이용한 실험 결과를 나타내며 자세한 수치는 표 2와 같다.

표 2

PEGDA concentration (v/v%)	50	60	65	70	75	80	85	90	100
Scaffold Water Uptake(%)	348.2	326.9	342.1	228.5	261.4	291.6	584.0	260.9	X
Hydrogel Water Uptake(%)	133.6	109.2	91.4	80.2	75.6	55.8	88.3	62.5	X

실시에 1 및 2를 이용한 실험결과, PEGDA 함량 60 내지 70% 및 80 내지 90%에서 수분 흡수율의 급격한 변화를 확인할 수 있었다. PEGDA 함량 50%일 때와 비교해도 수분 흡수율이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다. 다만 실시예 2를 이용한 실험은 하이드로겔의 건조 및 수화 과정에서 하이드로겔이 갈라지거나 부셔서 온전한 겔에 의한 효과를 확인할 수 없었다. (도 5 참조)

도 6는 실시예 3을 이용한 실험 결과를 나타내며 자세한 수치는 표 3과 같다. 도 7은 해당 실험에서 건조된 상태 및 수화된 상태의 겔을 나타낸 도면이다.

표 3

PEGDA concentration (v/v%)	50	60	65	70	75	80	85	90	100
Water Uptake(%) 1 <sup>st</sup> trial	134.47	85.74	76.74	85.86	74.71	73.25	77.14	76.68	126.24
Water Uptake(%) 2 <sup>nd</sup> trial	109.6	87.88	73.77	87.00	78.15	75.49	83.92	82.36	121.95

실시에 3을 이용한 실험은, 실시예 1을 이용한 실험이 스캐폴드 주변 나노섬유의 영향으로 인해 수분 함유량의 차이가 발생할 수 있음을 고려하여, 해당 요인을 배제한 실험이다.

실시에 1 및 2를 이용한 실험과 마찬가지로 PEGDA 함량 60 내지 70% 및 80 내지 90% 일 때 수분 흡수율의 급격한 변화를 확인할 수 있었다. PEGDA 함량 50%일 때와 비교해도 수분 흡수율이 현저히 낮은 것도 확인할 수 있었다. (도 6 참조)

건조 및 수화된 겔을 육안으로 확인했을 때도 PEGDA 함량 60 내지 85%일 때 멤브레인의 형태가 크게 변하지 않고 어느 정도 유지되는 것을 확인할 수 있었다. (도 7 참조) 구체적으로,

(1) 50 내지 60%의 건조된 상태에서 수축으로 인해 주름지는 현상이 뚜렷하게 나타났다.

(2) 85 내지 90%의 건조된 상태에서 수축으로 인해 멤브레인이 말리는 현상이 뚜렷하게 나타났다.

(3) 100%의 경우에는 건조 및 수화된 상태에서 모두 주름지거나 말리는 현상이 관찰되었다.

따라서 실시예 1 및 실시예 3을 이용한 실험을 종합했을 때, 본원 발명에 따라 PEGDA 농도 60 내지 85v/v% 범위를 함유하는 스캐폴드에서, 기존 사용하는 스캐폴드에 비해 수분 흡수율이 적어짐을 확인했다. 또한 해당 범위에서 스캐폴드가 유통되면서 건조 및 수화 과정을 거칠 때 멤브레인 변형이 가장 적게 일어나게 된다.

#### 실시에 5: 인서트 통합형의 미세패턴된 하이드로겔 스캐폴드에서의 세포 배양 실험

실시에 1에서 제작된 PEGDA 농도 50, 80%의 전구용액으로 미세패턴된 스캐폴드 두 종류를 이용하여 실험을 진행하였다. 24well 사이즈의 인서트(CellCrown)는 멸균시키기 위해 70% 에탄올에 24시간 동안 담가두고, 그 후 클린벤치 내부에서 UV를 30분간 조사하여 에탄올을 건조시키며 멸균하였다. 미세패턴된 스캐폴드 두 종류는 70% 에탄올에 30분간 담가두어 멸균시켰다. 멸균된 스캐폴드는 인서트에 위치를 맞추어 체결한 후 24 well plate 내에 고정시킨 이후, 잔여 에탄올을 제거하기 위해 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)으로 2번 세척해주었다.

세포를 배양하기 위한 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10%의 fetal bovine serum (FBS)

와 1%의 penicillin/streptomycin (p/s)을 혼합한 용액을 사용하였다.  $7 \times 10^5$  cells/mL의 비율로 세포가 포함된 용액  $100 \mu\text{l}$  ( $7 \times 10^4$  cells)을 미세패턴된 스캐폴드 위쪽에 가한다. 온도는  $37^\circ\text{C}$ , 95%의 대기와 5%의 이산화탄소로 이루어진 배양기에서 5일 동안 배양하였다.

[0123] 살아있는 세포에 부착되는 녹색 형광을 띠는 칼세인과 죽은 세포에만 선택적으로 부착되는 붉은 형광을 띠는 에티뉼 호모다이머를 이용하여, 본 발명의 미세패턴된 스캐폴드에서 배양된 세포의 생존 및 시딩 효율을 측정하였다. 형광으로 라벨링 하고자 하는 세포가 배양되어 있는 스캐폴드를 DPBS로 2번 세척한 후, 칼세인 4mM, 에티뉼 호모다이머 2mM 용액을 상온에서 30분간 배양하였다. 이렇게 처리된 세포를 형광현미경으로 확인하여 스캐폴드 위에서 배양된 세포를 관찰하였다. (도 8 참조)

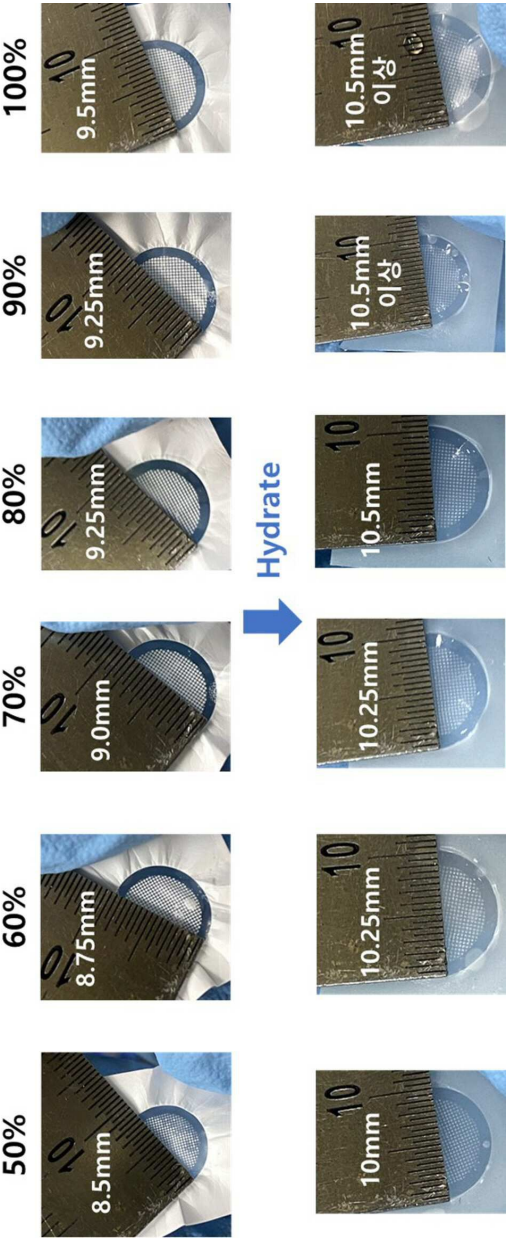
[0124] 칼세인 및 에티뉼 호모다이머 형광 사진에서 초록색 형광이 PEGDA 함량 50%보다 PEGDA 함량 80%가 더 뚜렷하게 보인다. 이는 곧 PEGDA 함량 50%는 인서트 체결 이후 건조 과정에서 하이드로겔의 수축으로 인해 변형된 스캐폴드 사이로 세포가 빠져나가 시딩이 제대로 이루어지지 않았으나 PEGDA 함량 80%는 하이드로겔의 변형이 적어져 세포가 고르게 시딩되었음을 의미한다.

[0125] 따라서 본원 발명에 따른 스캐폴드를 사용하면 스캐폴드 건조 및 수화 과정에서 변형이 적게 일어나게 되고, 이에 따라 스캐폴드를 세포 멤브레인으로 사용하여 세포를 배양할 때, 배양이 고르게 이루어질 수 있게 된다.

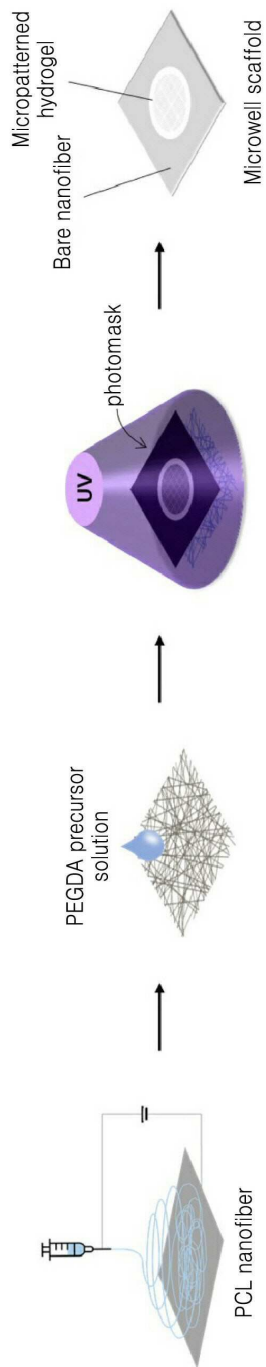


도면

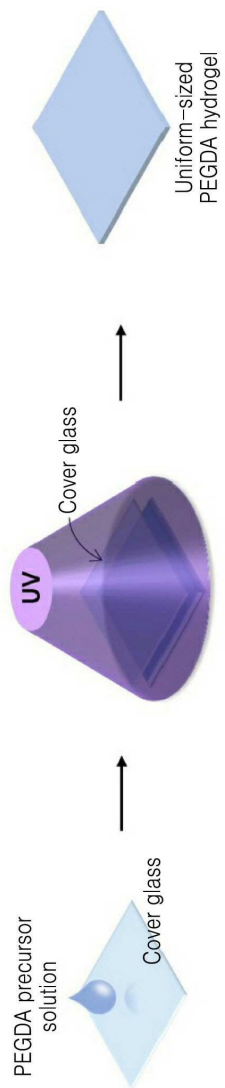
도면1



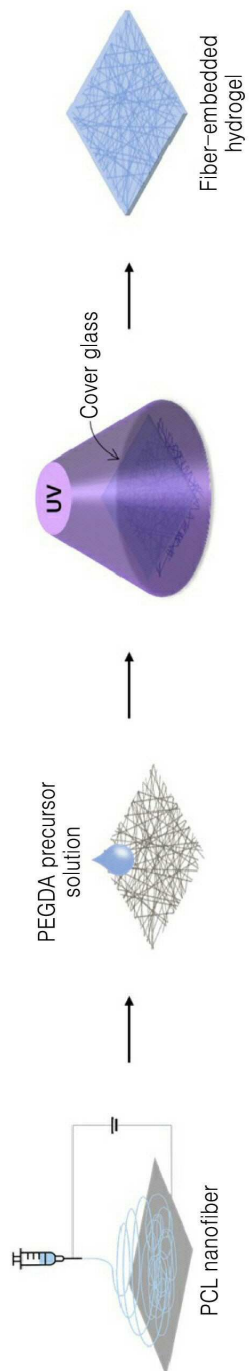
도면2



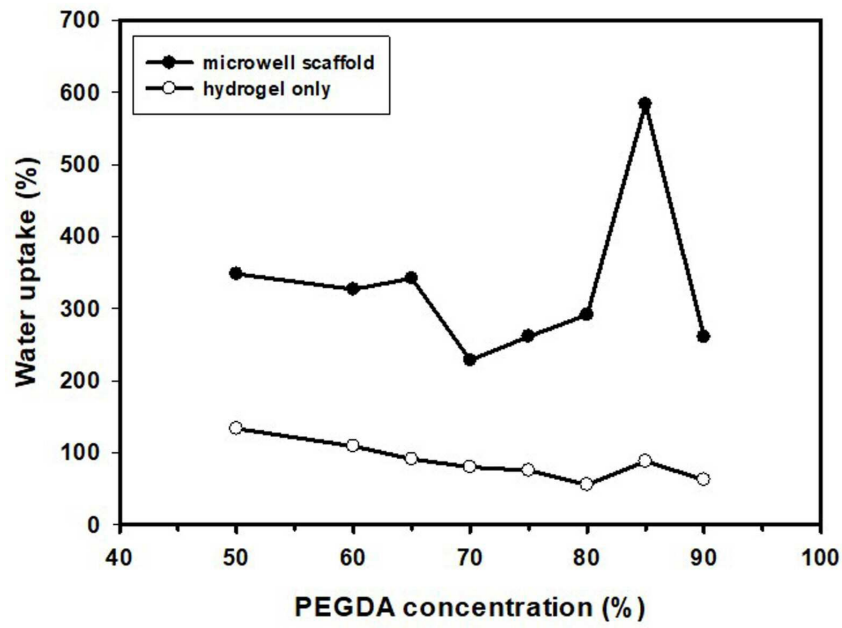
도면3



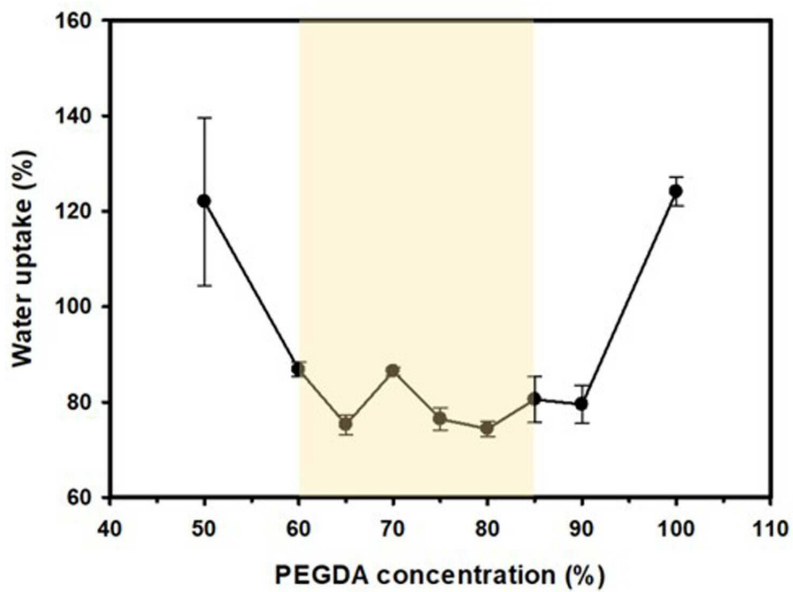
도면4



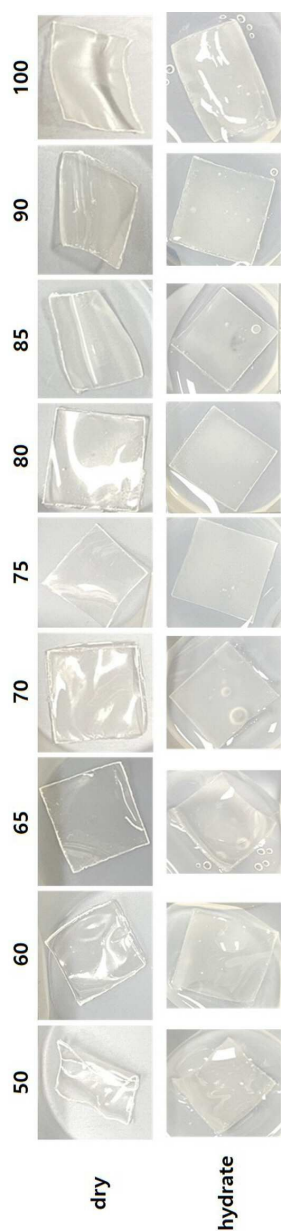
도면5



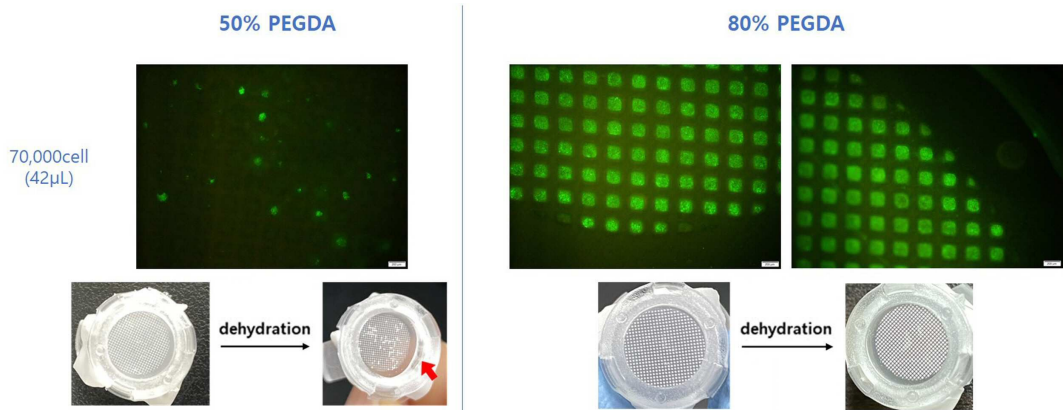
도면6



도면7



도면8



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

스캐폴드 박막.

【변경후】

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

스캐폴드 박막.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드로 제조하는 단계; 및

상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계를 포함하며,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

스캐폴드 박막의 제조방법.

【변경후】

생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 나노섬유로 형성된 스캐폴드로 제조하는 단계; 및

상기 스캐폴드 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계를 포함하며,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

스캐폴드 박막의 제조방법.

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13

【변경전】

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 박막이 둘 이상 적층되어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,



상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

복층 스캐폴드 박막.

【변경후】

나노섬유로 형성된 3차원적 스캐폴드 상에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 박막이 둘 이상 적층되어 있고,

상기 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)가 포함된 하이드로겔 전구용액을 사용하여 제조되며,

상기 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA)의 농도는 60 내지 85v/v%인 것인,

복층 스캐폴드 박막.