



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0042854
(43) 공개일자 2013년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/44 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0106973

(22) 출원일자 2011년10월19일

심사청구일자 2011년10월19일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)

(72) 발명자

고원건

서울특별시 관악구 봉천동 1703 동아아파트 105-502

이현중

서울특별시 금천구 시흥대로98길 17, 201호 (독산동)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 18 항

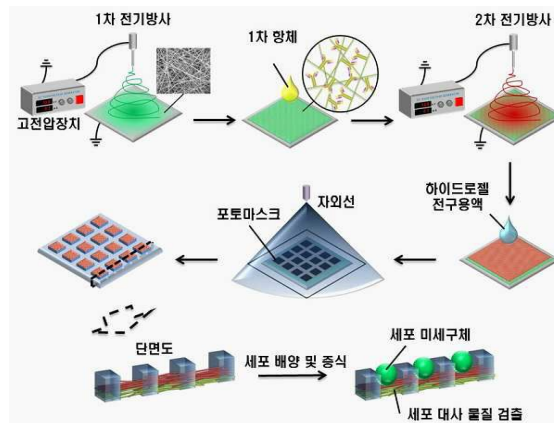
(54) 발명의 명칭 세포 패터닝과 대사산물 검출의 기능을 가진 미세패턴된 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드

(57) 요약

본 발명은 세포 패터닝과 대사산물 검출의 기능을 가진 미세패턴된 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포의 대사산물을 검출할 수 있도록 하는 제 1 나노섬유층과 3차원 구조에서 세포를 배양할 수 있는 제 2 나노섬유층으로 구성되며, 여기에 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에 관한 것이다.

본 발명에 따른 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드는 특정 세포에서는 일반적인 2차원적 배양에서 생성되지 않는 세포 미소 구조를 형성시키며, 동시에 그 세포가 분비하는 대사산물을 검출할 수 있도록 한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0022709
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원(기본연구)
연구과제명	마이크로패턴화 된 나노섬유를 이용한 다기능성 세포패턴닝 지지체 개발에 관한 연구
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	R11-2007-050-03002-0
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터-이공학분야(SRC/ERC)
연구과제명	ERC/3-2세부/패턴집적형 능동폴리머 소재센터
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0027726
부처명	교육과학기술부
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	나노프로브 기반 테라헤르쯔/광학 다중생체영상시스템개발(중개연구를 통한 나노조영제의 생체영상 기술적용 및 평가기술 개발)
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.08.01 ~ 2012.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

생체물질의 대사산물과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 고정화된 제 1 나노섬유층; 및
상기 제 1 나노섬유층 상에 형성되며, 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝된 제 2 나노섬유층
을 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 제 2 나노섬유층은 1층 이상인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 생체물질은 세포, 조직, 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산 및 이들의 하이브리드 분자로 이루어진 군으로부터
선택된 하나 이상인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 생체물질은 세포인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 대사산물은 아미노산, 단백질, 지질, 탄수화물, 당질, 핵산, 효소, 무기물, 호르몬, 항원, 혈당, 산소 및
이산화탄소로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
상기 대사산물과 특이적으로 결합할 수 있는 물질은 항체, 수용체, 핵산, 효소, 압타머, 펩타이드, 텍스트란,
지질, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 하이드로퀴논 및 하이드록시기를 지닌 화학 물질로 이루어진 군에서 선택
된 하나 이상인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 7

제 1 항에 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 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔은 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 혼합물로 형성되는 것인 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔이 스캐폴드 상에 웰 형태로 패터닝되어 있는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드.

청구항 10

제 1 나노섬유층을 형성하는 단계;

상기 제 1 나노섬유층에 생체물질의 대사산물과 반응하는 물질을 고정화시키는 단계;

상기 고정화된 제 1 나노섬유층 상에 제 2 나노섬유층을 형성하는 단계; 및

상기 제 2 나노섬유층 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계

를 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 나노섬유층은 전기방사법에 의해 형성하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 하이드로겔은 포토리소그래피 또는 소프트리소그래피를 하여 패터닝하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 제 1 나노섬유층에 산소 플라즈마 처리하는 단계를 추가로 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

조방법.

청구항 14

제 1 항의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에서 세포를 배양하여 이로부터 대사물질을 분비시키는 단계;
상기 대사물질을 측정이 용이한 신호로 변화해 줄 수 있는 탐지물질과 반응시키는 단계; 및
상기 탐지물질과 반응한 대사물질의 신호 세기를 측정하는 단계
를 포함하는 세포 대사물질의 검출방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,
상기 신호는 형광, 발광, 발색, 전기적 신호 또는 자기적 신호인 세포 대사물질의 검출방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서,
상기 탐지물질은 항체, 수용체, 핵산, 효소, 압타머, 펩타이드, 텍스트란, 지질, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 하이드로퀴논 및 하이드록시기를 지닌 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 세포 대사물질의 검출방법.

청구항 17

제 1 항의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 마이크로어레이.

청구항 18

제 1 항의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 바이오센서.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 패터닝과 대사산물 검출의 기능을 가진 미세패턴된 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에 관한 것이다.

배경기술

[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[비특허문헌 1]. 생체 응용범위에서 포토리소그래피에 주로 이용되

는 물질로는 친수성 고분자를 이용하는데, 친수성 고분자로 생성된 하이드로겔은 높은 수분함량과 생체적합성으로 인해 생물학적 응용되고 있다[비특허문헌 2]. 고분자 하이드로겔은 수분 함량이 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 쬔어주는 포토리소그래피의 간단한 과정을 통해서 하이드로겔을 만들어 낼 수 있으며, UV의 선택적으로 쬔어줄 수 있는 포토마스크의 모양을 통해, 우리가 원하는 형태로 제조가 가능하다는 장점을 가지고 있다[비특허문헌 3]. 또한, 하이드로겔 내부에 단백질을 세포를 고정하는 방법도 사용될 수 있다[특허문헌 1]. 하이드로겔 내부에 세포를 고정할 경우, 실제 몸에서와 비슷하게 3차원 배양이 가능하여, 세포로부터 보다 정확한 정보를 얻을 수 있으며, 효소를 고정할 경우는 환경적인 요인으로부터 효소의 변성을 방지하고 기질과의 반응을 증가시켜 강한 신호를 측정할 수 있다는 장점들을 가지고 있다[비특허문헌 4].

[0004] 소프트리소그래피는 생화학 및 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[비특허문헌 5].

[0005] 생물학적 분석에서 생물분자의 패턴 형성도 중요하지만 효율을 높이고, 보다 발전된 형태로 만들기 위해서는 3차원적 구조를 필요로 한다. 하지만, 포토리소그래피나 소프트리소그래피를 이용한 대부분의 생물분자 패턴은 2차원의 기판 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[비특허문헌 6]. 이 방법으로 생성된 나노섬유 스캐폴드는 부피당 넓은 표면적 비를 가지며, 인체 내의 세포외기질과 유사한 구조를 가지므로 인체의 조직을 대체하는데 적당하다[비특허문헌 7]. 또한, 이러한 구조는 세포간의 상호작용[비특허문헌 8]과 세포의 분화를 증진시키기도 한다[비특허문헌 9].

[0007] 특정 단백질이나 세포를 분석하기 위해서는 특정 형태의 패턴은 필수적이며, 본 발명자들은 이를 해결하여 특허를 출원한 바 있다[특허문헌 2].

[0008] 세포 미세 구체를 형성하는 특허들을 살펴보면, 세포 회전 배양을 이용하여 세포 미세구체를 형성시킨 방법의 경우 회전속도에 따라 세포 미세 구체의 크기를 조절하는 방법을 이용한다[특허문헌 3]. 이 방법의 경우에는 스피너플라스크를 통해서 세포 미세 구체를 형성시켰는데, 세포 미세 구체의 크기의 범위가 100 ~ 350 μ m 정도로 균일하지 않은 단점을 가지고 있다. 균일한 크기의 구멍을 가지고 있는 다공성의 기판을 이용하여 비교적 균일한 세포 미세 구체를 형성시키는 방법도 존재한다[특허문헌 4]. 이 방법의 경우 일정한 크기의 구멍을 통해서 세포 미세 구체의 크기를 조절하였고, 다공성의 기판을 이용하여 세포 미세 구체의 형성을 유도하였다. 이 경우에는 한쪽이 막힌 기판을 이용하며, 세포 미세 구체의 크기가 구멍의 크기에 가까워질수록 물질전달이 저해되므로 쉽게 생존력이나 기능이 감소되기 쉬울 수 있다. 포토리소그래피를 이용하여 미세패턴을 제작하고, 세포 미세 구체를 형성시킨 특허도 존재한다[특허문헌 5]. 이 방법은 포토리소그래피를 이용하여 비교적 간단하게 기판은 만들 수 있다는 장점은 지니고 있지만, 완성된 세포 미세 구체의 형태가 구체보다는 반구체에 가깝고, 2차원 구조 위에서 형성된 세포 구체이므로 세포의 밀도도 매우 낮아 세포간 상호작용도 비교적 적은 단점을 가지고 있다.

[0009] 나노섬유 구조체를 검출에 사용한 특허들을 살펴보면, 나노섬유 구조체 자체의 높은 표면적을 이용하여, 검출에 보다 큰 도움이 될 수 있다는 것은 보였으나, 나노섬유 자체를 패터닝하거나 하는 등의 기술이 적용되지 않아, 나노 섬유 자체를 패터닝하는 기술 및 세포 미세 구체의 형성 기술은 개시된 바 없으므로 좀 더 실용적인 검출 시스템으로의 확장을 불가능하다고 보여진다[특허문헌 6].

- [0010] 특허, 상기와 같이 대사물질을 검출하기 위해서는 세포나 세포 배양액을 수거하여 분석하므로, 중간과정에서 세포가 손실되거나 손상될 수 있으므로 분석(검출) 효율이 떨어지거나 오차가 발생될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 미국 특허 공개 제2005/0169962호
(특허문헌 0002) 국내 특허 출원 제2009-0085914호
(특허문헌 0003) 미국 특허 공개 제2004/0091460호
(특허문헌 0004) 미국 특허 공개 제2008/0215073호
(특허문헌 0005) 미국 특허 공개 제2010/0099190호
(특허문헌 0006) 미국 특허 공개 제2006/0260707호

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4432
(비특허문헌 0002) Adv. Mater. 2006, 18, 1345
(비특허문헌 0003) Langmuir 2001, 17, 5440
(비특허문헌 0004) Langmuir 2004, 20, 270
(비특허문헌 0005) Biomaterials 1999, 20, 2363
(비특허문헌 0006) Advanced Materials 2004, 16, 1151
(비특허문헌 0007) Journal of Biomedical Materials Research 2002, 60, 613
(비특허문헌 0008) Biomaterials 2006, 27, 3136
(비특허문헌 0009) Biomaterials 2008, 29, 3357

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 이에, 본 발명자들은 기존의 기술들의 단점을 보완하는 동시에 세포 패터닝을 통한 세포 미세 구체의 형성 및 세포 대사 산물을 검출할 수 있는 기능을 융합한 다층구조의 나노섬유 스캐폴드를 개발함으로써 본 발명은 완성하게 되었다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 생체물질의 대사산물과 검출할 수 있는 제 1 나노섬유층; 및 세포 패터닝을 통한 세포 미세 구체의 형성되는 제 2 나노섬유층을 포함하는 다기능성의 나노섬유 스캐폴드 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 이용한 세포 대사물질의 검출방법을 제공하는데 다른 목적이 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 마이크로어레이 또는 바이오센서를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은
- [0018] 생체물질의 대사산물과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 고정화된 제 1 나노섬유층; 및
- [0019] 상기 제 1 나노섬유층 상에 형성되며, 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝된 제 2 나노섬유층
- [0020] 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 제공한다.
- [0021] 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은
- [0022] 제 1 나노섬유층을 형성하는 단계;
- [0023] 상기 제 1 나노섬유층에 생체물질의 대사산물과 반응하는 물질을 고정화시키는 단계;
- [0024] 상기 고정화된 제 1 나노섬유층 상에 제 2 나노섬유층을 형성하는 단계; 및
- [0025] 상기 제 2 나노섬유층 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계
- [0026] 를 포함하는 스캐폴드 박막의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은
- [0028] 제 1 항의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에서 세포를 배양하여 이로부터 대사물질을 분비시키는 단계;
- [0029] 상기 대사물질을 측정이 용이한 신호로 변화해 줄 수 있는 탐지물질과 반응시키는 단계; 및
- [0030] 상기 탐지물질과 반응한 대사물질의 신호 세기를 측정하는 단계
- [0031] 를 포함하는 세포 대사물질의 검출방법을 제공한다.
- [0032] 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은
- [0033] 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 마이크로어레이 또는 바이오센서를 제공한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드는 세포의 대사산물을 검출할 수 있도록 하는 제 1 나노섬유층과 3차원 구조에서 세포를 배양할 수 있는 제 2 나노섬유층으로 구성되어 있어, 세포 미소 구조를 형성시키며, 동시에 그 세포가 분비하는 대사산물을 검출할 수 있도록 한다.
- [0035] 따라서, 본 발명은 세포 패터닝을 통해 기존에 균일한 크기로의 형성이 어려웠던 세포 미소 구조를 크기가 균일한 효율적으로 형성시킬 수 있으며, 동시에 세포의 대사 산물을 검출하여 세포의 생존력과 활성화 등을 확인할 수 있는 스캐폴드의 형태를 갖추고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본 발명에 따른 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법을 예시적으로 도시한 공정도이다.
- 도 2는 두 번의 전기방사를 통한 이층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 예시적으로 도시한 공정도와, 각 층에 다른 형광물질을 삽입하여 공초점 현미경을 이용한 단면을 본 이미지이다[위층은 적색 형광을 띄는 로다민을 함유한 나노섬유를 전기방사법을 이용하여 얻었고, 아래층은 녹색의 형광을 띄는 물질인 FITC(Fluorescein isothiocyanate)를 함유한 나노섬유를 전기방사법으로 이용하여 얻음, 두 개의 층의 나노섬유 형태를 얻는 것이

가능함을 보임].

도 3은 평면의 배양 플라스크와 나노섬유 스캐폴드에서 자란 세포의 활성도를 비교한 그래프로, 나노섬유 스캐폴드에서 배양을 했을 때 보다 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

도 4는 세포에 형광을 표지하여 1, 3, 5, 7일마다 세포의 성장 형태를 나타낸 이미지이다.

도 5는 패터화된 나노섬유 스캐폴드에서 생성된 세포 미세 구조를 전자현미경을 통해 관찰한 것이다.

도 6은 제 1 나노섬유층에서 검출 능력을 시험한 도면과 그래프이다. 하이드로겔로 쌓이지 않아 밖으로 노출된 부분만 형광을 나타내는 것을 알 수 있고, 일정한 관계를 보이는 것을 그래프를 통해 확인할 수 있다.

도 7은 실시예 1의 스캐폴드에서 직접 세포를 배양시켜 세포 미세 구조를 형성시킨 이후에 1, 3, 5, 7일에 방출된 대사물질을 형광으로 측정하여 농도로 변환한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명은 생체물질의 대사산물을 검출할 수 있는 제 1 나노섬유층; 및 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝되어 있는 세포 배양용 제2 나노섬유층을 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에 관한 것이다.

[0038] 구체적으로, 본 발명은 생체물질의 대사산물과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 고정화된 제 1 나노섬유층; 및

[0039] 상기 제 1 나노섬유층 상에 형성되며, 하이드로겔이 소정의 형태로 패터닝된 제 2 나노섬유층

[0040] 을 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 특징으로 한다.

[0041] 본 발명에 따른 나노섬유 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. 포어의 크기나 부피는 나노섬유를 형성할 때, 나노섬유의 직경이나 밀도의 변화를 통해 조절할 수 있다. 예를 들어, 전기방사법을 이용한 나노섬유의 제조에서 직경은 고분자용액의 농도, 유속 그리고 사용되는 전압을 조절하여 조절할 수 있다. 밀도는 전기방사법에서 나노섬유가 적층되는 기관의 종류 변화에 따라서 조절 가능하다. 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 사용 가능한 기관은 금속, 합금, 유리, 실리콘, 종이 등으로 형성된 것일 수 있다.

[0042] 이에 제한되는 것은 아니나, 포어의 크기는 약 25~100 μm 정도로 조절이 가능하다. 대부분의 세포는 스캐폴드에 고정되어 형질변환이 일어나기 전에는 10~15 μm 정도의 크기로 존재하기 때문에 포어 내부로 들어가 스캐폴드 내부에 고정되어 성장과 분화가 일어나기에 적당하다.

[0043] 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 그라프팅(Radiation grafting) 방법, 자기조립 단일층(Selfassembly monolayer, SAM) 방법이 이용될 수 있다. 산소 플라즈마 처리의 경우 소수성이 큰 나노섬유의 경우 친수성을 증가시키기 위해 사용된다. 라디에이션 그라프팅 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 그라프팅이나 SAM 방법에서는 일반적으로 단백질과 화학적 결합을 하는 물질인 N-하이드록시숙시나이드(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.

[0044] 한 구체예에서, 나노섬유는 세포와 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), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락트-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-(비닐알코올)](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.

[0045] 본 발명에서, 상기 다층구조의 3차원적 스캐폴드는 하이드로겔에 의해 패턴화된다. 하이드로겔은 3차원적 스캐폴드의 구획을 나누어주어 검출의 역할을 할 수 있도록 만드는 동시에 세포 미세구조체의 크기를 균일하게 만들 수 있도록 하는 역할을 한다. 이는 하이드로겔 내부에 세포나 단백질과 같은 생체물질을 고정시켜 패턴화시키던 종래의 기술(US 2005/0169962)과는 달리, 포어를 통한 확산은 용이하게 하면서도 생체물질을 특정 위치에 관찰할 수 있는 패턴링을 가능하게 해 준다.

[0046] 본 발명에서 하이드로겔은 생체물질에 대해 생체적합한 친수성 고분자이면 어떠한 것이든 이용 가능하다. 대부분의 친수성 고분자는 세포나 단백질이 흡착이나 결합하지 않도록 해 주므로 생체물질의 구획화를 통한 패턴링을 가능하게 한다. 또한, 나노섬유만으로 구성된 스캐폴드는 쉽게 손상되어 취급하기 매우 까다로운데, 하이드로겔을 나노섬유 스캐폴드 상에 패턴링하게 되면 취급성이 우수해지는 효과를 거둘 수 있다.

[0047] 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 상기 하이드로겔은 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 혼합물로 형성되는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 패턴링된 스캐폴드는 기관 위에 고정되어 있는 형태로 존재하거나, 기관에서 분리하여 스캐폴드 자체로 사용될 수 있다. 본 발명의 패턴링된 스캐폴드를 물에 넣어두면 하이드로겔이 기본적으로 물에 있으면 팽윤하는 성질을 가지고 있기 때문에 자연스럽게 기관에서 떨어지게 되므로 스캐폴드의 손상 없이 분리가 가능하다. 팽윤하는 정도는 사용하는 친수성 고분자의 분자량에 따라 조절이 가능하다. 스캐폴드 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 대사 활동을 할 수 있도록 도움을 준다.

[0049] 특히, 본 발명은 나노섬유층을 크게 제 1 나노섬유층과 제 2 나노섬유층의 두 개 영역으로 나누어, 제 1 나노섬유층에서는 생체물질의 대사물질을 검출 가능하도록 생체물질의 대사물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 고정화시키고, 제 2 나노섬유층에서는 소정의 형태로 하이드로겔의 패턴화를 통해 세포 배양으로 균일한 크기의 세포 미세 구조체를 형성시킬 수 있다.

[0050] 상기 생체물질은 세포, 조직, 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산 및 이들의 하이브리드 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 세포 또는 단백질이며, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 대사산물은 아미노산, 단백질, 지질, 탄수화물, 당질, 핵산, 효소, 무기물, 호르몬, 항원, 혈당, 산소 및 이산화탄소로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 대사산물과 특이적으로 결합할 수 있는 물질은 항체, 수용체, 핵산, 효소, 압타머, 펩타이드, 텍스트란, 지질, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 하이드로퀴논 및 하이드록시기를 지닌 화학물질으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 상기 제 2 나노섬유층의 경우에는 1층 이상의 나노섬유층을 포함할 수 있다. 또한, 패턴링된 스캐폴드 박막을 둘 이상 적층하는 것이 가능해 여러 종류의 세포들을 생체물질을 층으로 구분되는 형태로 배양이 가능해지는 장점이 존재한다.

[0054] 본 발명은

- [0055] 제 1 나노섬유층을 형성하는 단계;
- [0056] 상기 제 1 나노섬유층에 생체물질의 대사산물과 반응하는 물질을 고정화시키는 단계;
- [0057] 상기 고정화된 제 1 나노섬유층 상에 제 2 나노섬유층을 형성하는 단계; 및
- [0058] 상기 제 2 나노섬유층 상에 하이드로겔을 소정의 형태로 패터닝하는 단계
- [0059] 를 포함하는 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드의 제조방법에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 다단계의 전기방사법을 이용하는데 있어서, 기존의 전기방사법을 이용한 나노섬유 단일층을 사용하였던 방법에서, 얻어진 나노섬유 단일층을 그대로 사용하거나, 표면처리 등의 물리적 및 화학적 처리를 가한 후, 그 위에 전기방사법을 다시 하여 다층의 나노섬유층을 만드는 방법을 이용한다. 다층의 나노섬유층을 만들어 사용하면, 각각의 나노섬유층에 각각의 역할에 맞는 기능성을 부여할 수 있으며, 보다 효율적인 기능성을 발휘할 수 있도록 한다.
- [0061] 특히, 본 발명에서는 제 1 나노섬유층 형성 후, 제 1 나노섬유층에 생체물질의 대사산물과 반응하는 물질을 고정화시키는 단계를 추가하여 생체물질의 대사물질을 검출할 수 있도록 한다.
- [0062] 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.
- [0063] 상기 친수성 고분자는 전구용액 100 중량부에 대하여 20 내지 80 중량부로 포함될 수 있다. 친수성 고분자의 함량이 상기 범위 내일 때 본 발명의 하이드로겔의 수분함유량이 50 내지 97%이 될 수 있어 만일 추가적인 생체물질을 하이드로겔 내부에 고정시키는 경우 생체물질의 구조 및 활성을 유지시킬 수 있다.
- [0064] 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 하이드로 겔의 외형에 반영되지 않을 수 있다.
- [0065] 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.
- [0066] 본 발명에서 하이드로겔을 웰 형태의 패턴으로 제작할 때, 웰의 크기를 조절하여 세포 미세 구체의 크기를 제어할 수 있다. 웰 내부에서 세포 미세 구체가 성장하기 때문에, 웰의 크기 이상으로 세포 미세 구체가 커지는 것은 쉽지 않다. 따라서 세포 미세 구체의 적정 크기인 200 ~ 300 μm 이내의 크기로 균일하게 생성시킬 수 있다.
- [0067] 본 발명은 또한,
- [0068] 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에서 세포를 배양하여 이로부터 대사물질을 분비시키는 단계;
- [0069] 상기 대사물질을 측정이 용이한 신호로 변화해 줄 수 있는 탐지물질과 반응시키는 단계; 및
- [0070] 상기 탐지물질과 반응한 대사물질의 신호 세기를 측정하는 단계
- [0071] 를 포함하는 세포 대사물질의 검출방법에 관한 것이다.
- [0072] 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에서 세포 배양 후 형성된 세포 미세 구체에서 생성된 대사물질을 확인하기 위하여 제 1 나노섬유층에 고정화된 물질이 대사물질과 결합하고, 이의 결합을 신호로서 탐지하는 탐지물질이 대사물질과 결합하여 발생되는 신호 세기를 측정함으로써 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드에서 배양된 세포 내 대사물질을 검출할 수 있다. 기존의 대사물질 검출(분석)방법은 세포를 배양 후 이를 수거하여 대사물질 검출(분석) 시스템에 적용하였으나, 본 발명은 별도의 세포 배양 작업 없이 직접 세포 배양 및 대사물질 검출이 하나의 시스템으로 가능하다는 점에서 유용성이 크리라 기대된다.
- [0073] 상기 신호는 형광, 발광, 발색, 전기적 신호 또는 자기적 신호일 수 있으며, 이러한 신호를 발생시키는 표지물

질로는 형광체, 발광체, 효소, 금속입자, 플라스틱 입자, 자성입자, 나노입자 등이 있다.

[0074] 상기 탐지물질은 항체, 수용체, 핵산, 효소, 압타머, 펩타이드, 텍스트란, 지질, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 하이드로퀸 및 하이드록시기를 지닌 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 대사물질과 결합하는 물질과 대사물질이 결합된 결합에 의해 발생하는 신호를 탐지하는 물질로서, 측정이 용이한 신호로 변경될 수 있도록 표지물질과 결합 사용할 수 있다.

[0075] 본 발명의 검출방법은 기본적으로 많이 사용하는 방법인 샌드위치 방식으로 1차 고정물질(대사물질과 결합하는 물질)을 고정시키고, 검출물질이 1차 고정물질과 결합이 되면, 역시 1차 고정물질과 같은 물질 역시 검출물질(대사물질)과 결합을 할 수 있기 때문에, 형광이나 발광, 발색, 전기적 및 자기적 신호를 낼 수 있는 물질을 결합시킨 2차 고정물질(탐지물질)을 이용한다.

[0076] 본 발명은 또한, 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 마이크로어레이를 제공한다.

[0077] 본 발명에서 마이크로어레이라 함은 고속 스크리닝 방법을 이용하여 다량의 생물학적 물질을 분석해 내는 복합적인 랩온어칩(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 이용 가능하다. 상기 마이크로어레이에는 다양한 생체물질이 고정되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 마이크로어레이는 세포 마이크로어레이, 조직 마이크로어레이, 단백질 마이크로어레이, 항체 마이크로어레이, 탄수화물 마이크로어레이, DNA 마이크로어레이 등을 모두 포함한다.

[0078] 본 발명은 또한 상기 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드를 포함하는 바이오센서를 제공한다.

[0079] 바이오센서는 특정한 물질, 즉 분석대상물질에 대해 반응할 수 있는 생체물질과 생리화학적 탐지물질이 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 생체물질 뿐만 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 탐지물질을 추가로 포함할 수 있다. 여기에서 탐지물질은 예를 들어, 상기 분석대상물질과 생체분자 간의 반응 산물과 반응하여 형광의 방출 또는 발색을 유도하거나 전기적, 자기적 신호를 나타낼 수 있는 물질일 수 있다.

[0080] 일반적으로 바이오센서를 이용한 정밀 분석을 위해서는 외부 환경과의 차단이 중요하다. 그러나 일반적인 배양에서는 세포에 영양을 공급해 주기 위해서는 외부 환경과의 접촉이 될 수밖에 없다. 그러나 영양물질이 지속적으로 방출되면, 외부 환경과의 접촉 없이 세포 배양을 진행하여 외부 환경과의 접촉이 없으므로 결과의 정확도를 증대시킬 수 있다.

[0081] 따라서, 본 발명의 다층 구조의 나노섬유 스캐폴드는 3차원적 환경을 제공하면서도 다른 구역에 있는 세포간의 직접적인 접촉이나 영향에 의한 교란을 없앨 수 있으며, 특히 3차원적 환경을 제공하는 층과 분리된 검출을 위한 나노섬유층에서는 항체 등을 고정시킨 후 세포의 대사물질을 검출해 낼 수 있는 바이오센서의 능력을 가지고 있을 뿐만 아니라, 패터닝을 통해 지속적으로 같은 위치의 관찰이 가능해지기 때문에, 실시간 관찰이 가능해지므로 보다 효율적인 생물학적 분석을 가능하게 한다.

[0082] [실시예]

[0083] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나,

본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0084] 실시예 1: 이중 구조의 나노섬유 스캐폴드 제작

[0085] 1) 전기방사법을 이용한 제 1 나노섬유층의 형성

[0086] 폴리스타이렌(PS, Aldrich) 3 g을 테트라하이드로푸란(THF, Sigma-Aldrich) 5 ml와 디메틸포름아마이드(DMF, Sigma-Aldrich) 5 ml에 혼합한 후 80 °C에서 12시간 두어 폴리스타이렌을 완전히 녹였다. 이 용액을 상온에서 식힌 후, 전기방사법을 이용하기 위해 제조된 고분자 혼합 용액을 10 ml 주사기에 넣고 0.5 ml/hr의 일정한 속력으로 관을 지나 금속으로 이루어진 원통형 바늘로 흘려주었다. 금속으로 이루어진 원통형 바늘에 고전압 장치를 이용하여 10 kV의 전압을 흘려주었다. 전압 차이로 인해 접지된 스테인리스스틸 기관으로 용액이 잡아당겨지면서 나노섬유를 형성하였다. 생성된 나노섬유는 잔여 용매를 제거하기 위해서 50 °C, 진공 상태에서 24시간 정도 두었다.

[0087] 2) 제 1 나노섬유층의 산소 플라즈마 처리

[0088] 나노섬유 스캐폴드의 친수성을 증가시키기 위해 나노섬유 스캐폴드에 플라즈마 장치를 이용하여 산소 플라즈마를 처리하였다. 무선전파출력은 40W, 압력은 1×10^{-1} mmHg으로 40초 동안 처리해 주었다. 친수성의 증가는 물이나 하이드로겔 전구용액의 침투성을 증가시키기도 하고, 세포의 흡착이 용이하도록 하였다.

[0089] 3) 제 1 나노섬유층에 항체 부착

[0090] 상기 제 1 나노섬유층에 알부민 항체를 부착시키기 위해 10 µg/ml의 농도로 50 mM의 카보네이트-비카보네이트 버퍼(carbonate-bicarbonate buffer)의 알부민 항체 용액에 5시간 동안 37 °C에서 담귀두었다. 그 후 잔여 알부민 항체를 제거하기 위해 워싱 버퍼(0.05% Tween 20)로 가볍게 헹궈주었다. 비특이적 결합을 막기 위해서 블로킹(blocking) 용액(1.0 wt%의 BSA가 포함된 PBS용액)에 2시간 동안 담귀두었다. 잔여 BSA를 제거하기 위해 워싱 버퍼로 가볍게 헹궈주었다.

[0091] 4) 제 2 나노섬유층의 형성

[0092] 알부민 항체가 부착되어 있는 제 1 나노섬유층 위에 제 1 나노섬유층을 위한 전기방사법과 동일한 방법으로 다시 제 2 나노섬유층을 생성시켰다. 두 번째 층의 역할을 세포가 지지해서 성장할 수 있는 3차원적 구조를 제공하는 역할을 하며, 검출의 역할을 하는 제 1 나노섬유층과는 붙어있지만 분리되어 있어 보다 효율적인 관계를 유지할 수 있다.

[0093] 도 2에 나타낸 바와 같이, 두 번의 전기방사를 통한 이중 구조의 나노섬유 스캐폴드를 제작할 수 있다. 각 층에 다른 형광물질을 삽입하고 공초점 현미경을 이용해 단면을 본 이미지처럼 두 개의 층의 나노섬유 형태를 얻는 것이 가능하다. 이러한 층의 분리가 각 역할을 하며 효율을 증대시킬 수 있다.

[0094] 5) PEG 하이드로겔을 이용한 나노섬유 스캐폴드의 패터닝과 멸균

[0095] 하이드로겔 구조체는 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(PEGDA, 분자량 575, Aldrich)를 이용하여 만들어지는데, 전구용액은 광중합개시제인 2-하이드록시-2-메틸프로피오펜온(2-hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP, Aldrich) 20 µl와 1 ml의 PEGDA 용액의 혼합을 통해 제조하였다. 하이드로겔 패터를 형성하기 위해서 전구용액을 스캐폴드가 충분히 담기도록 가해주고 빛을 통과시키는 부분과 통과시키지 않는 부분으로 이루어진 포토마스크를 스캐폴드 위에 두고 그 위에 365 nm 파장을 가진 UV광을 18 W/cm^2 의 출력으로 0.5초 동안 조사하였다. UV에 조사된 전구용액 부분은 가교결합이 일어나 물과 같은 용매에 녹지 않게 되고, UV에 조사되지 않은 부분은 물에 씻겨 나갔다. 패터닝된 스캐폴드는 멸균시키기 위해 70% 에탄올에 30분간 담가두어 멸균시키고, 잔여 에탄올을 제거하기 위해 Phosphate buffered saline(PBS, Gibco) 용액으로 5번 세척해주었다.

[0096] 실시예 2: 패터닝된 스캐폴드에서의 세포 배양실험

[0097] 세포(HepG2)를 배양하기 위한 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma)에 10%의 FBS(fetal bovine serum, Sigma)와 1%의 antibiotic/antimycotic solution(Sigma)을 혼합한 용액을 사용하였다. 1×10^5 cells/ml의 비율로 세포가 포함된 용액 $50 \mu\text{l}$ (5×10^3 cells)를 상기 실시예 1에서 제작된 패터닝된 스캐폴드 위쪽에 가하였다. 온도는 37°C , 95%의 대기와 5%의 이산화탄소로 이루어진 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[0098] 도 3에 나타난 바와 같이, 단순히 평면 배양 플라스크와 나노섬유 스캐폴드에서 세포의 성장 및 활성도를 MTT 분석을 통해 비교해 보았을 때, 평면 배양 플라스크보다 나노섬유 스캐폴드에서 세포의 성장 및 활성도가 좋을 수 있다. 특히 나노섬유 스캐폴드에서 평면 배양 플라스크보다 더 오랫동안 세포의 성장이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 구조적으로도 세포에게 더 좋은 환경을 제공한다는 것을 알 수 있다.

[0099] 실시예 3: 세포 미세 구체의 형성 및 알부민 검출

[0100] 사용한 HepG2 세포는 간에서 유래된 세포로 알부민을 생성하는 기능을 갖는 세포이다. 일반적으로 이 세포는 세포 미세 구체를 형성하였을 때 보다 활발한 기능성을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 이 세포를 약 3~5일 동안 스캐폴드에서 배양시키면 균일한 크기의 세포 미세 구체를 형성하게 된다.

[0101] 도 4는 세포에 형광을 표지하여 1, 3, 5, 7일 마다 세포의 성장 형태를 나타낸 이미지로, 약 5일 이후부터 세포 미세 구체의 형태를 가짐을 관찰할 수 있었다.

[0102] 도 5는 패터닝된 나노섬유 스캐폴드에서 생성된 세포 미세 구체를 전자현미경을 통해 관찰한 이미지로, 균일한 크기로 만들어져 있고, 단면을 보았을 때에도 뚜렷한 세포 미세 구체의 형태를 하고 있는 것을 관찰할 수 있었다.

[0103] 또한, 이 상태에서 세포들이 분비한 누적된 알부민의 양을 측정하기 위해 세포 배양액을 모두 제거한 후, 형광이 표지된 2차 알부민 항체용액에 1시간 동안 담갔다. 워싱 버퍼로 세척 후 형광 현미경을 이용하여 형광의 강도를 측정하면, 분비된 알부민의 양을 측정할 수 있다.

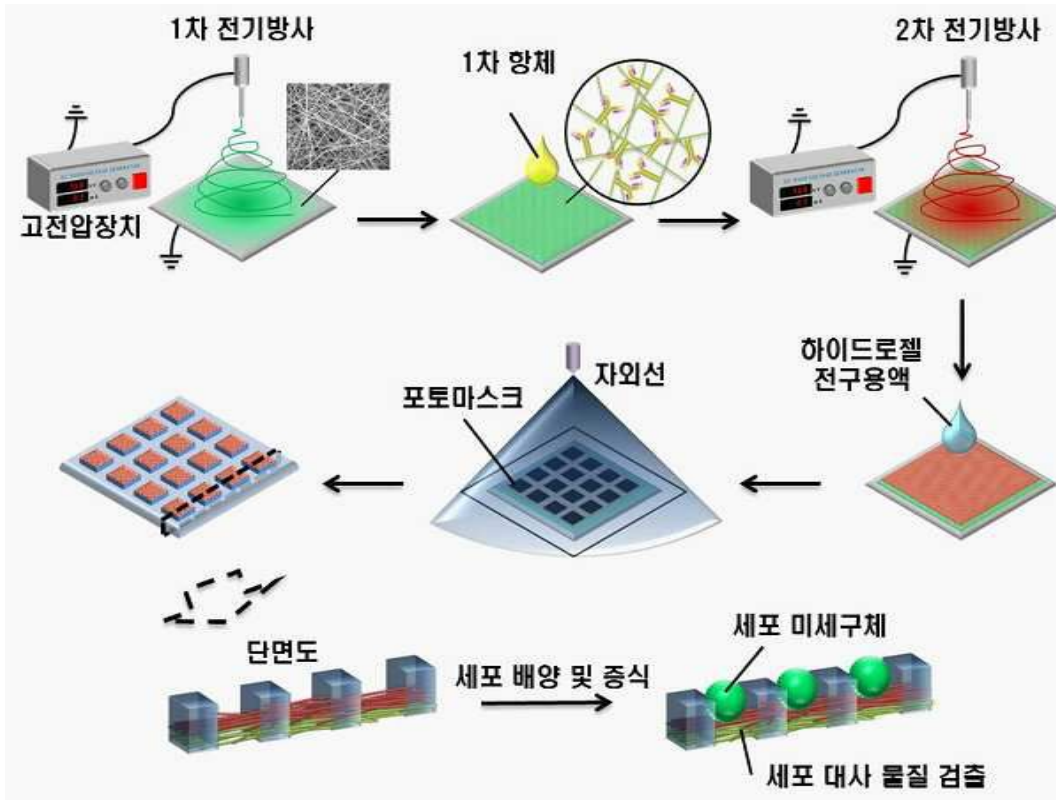
[0104] 원리는 다음과 같다.

[0105] 스캐폴드 제작 시 제 1 나노섬유층에 부착해 두었던 알부민 항체에 세포가 분비한 알부민이 특이적 결합을 통해 알부민 항체에 붙게 된다. 이때, 많은 양의 알부민이 분비될수록 알부민 항체와 알부민의 결합이 발생하게 된다. 그 후 형광이 표지된 2차 알부민 항체는 결합된 알부민에 가서 다시 붙게 된다. 1차 알부민 항체와 2차 알부민 항체를 결합을 못하기 때문에, 알부민이 부착되어 있는 곳에서 특이적 결합이 발생한다. 즉, 알부민의 생성이 많으면 강한 형광을 나타나게 된다[도 7].

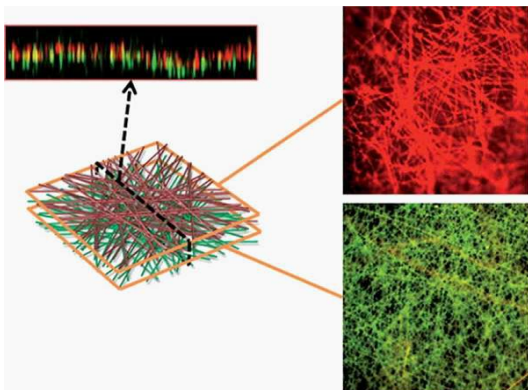
[0106] 결과적으로는 2차원 배양보다 3차원의 세포 미세 구체를 형성했을 때 활성이 좋을 수 있었고, 알부민의 분비량도 측정할 수 있었다.

도면

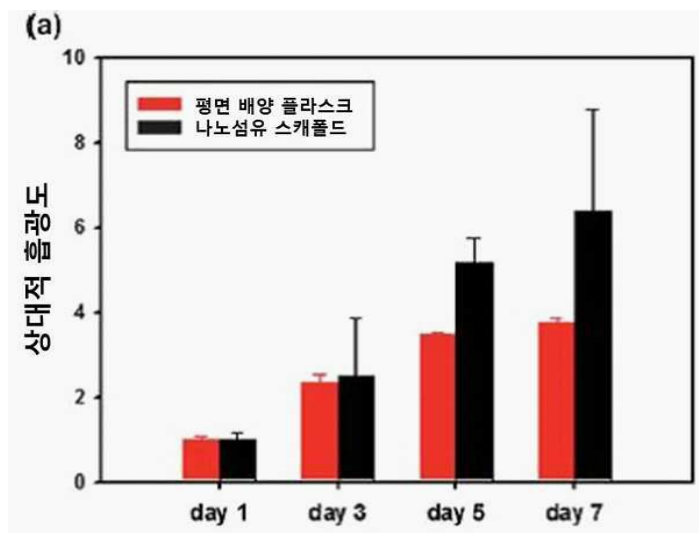
도면1



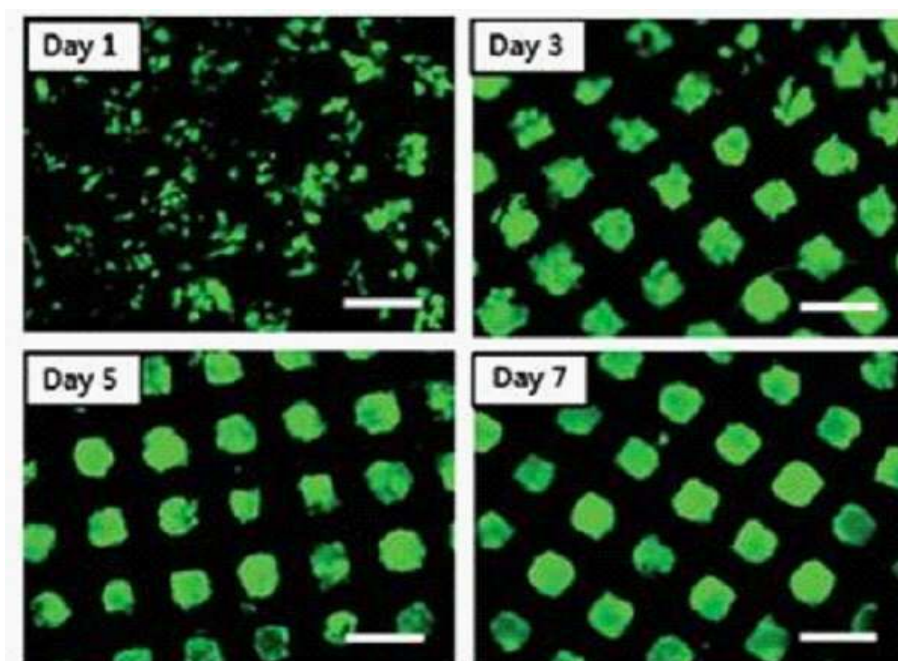
도면2



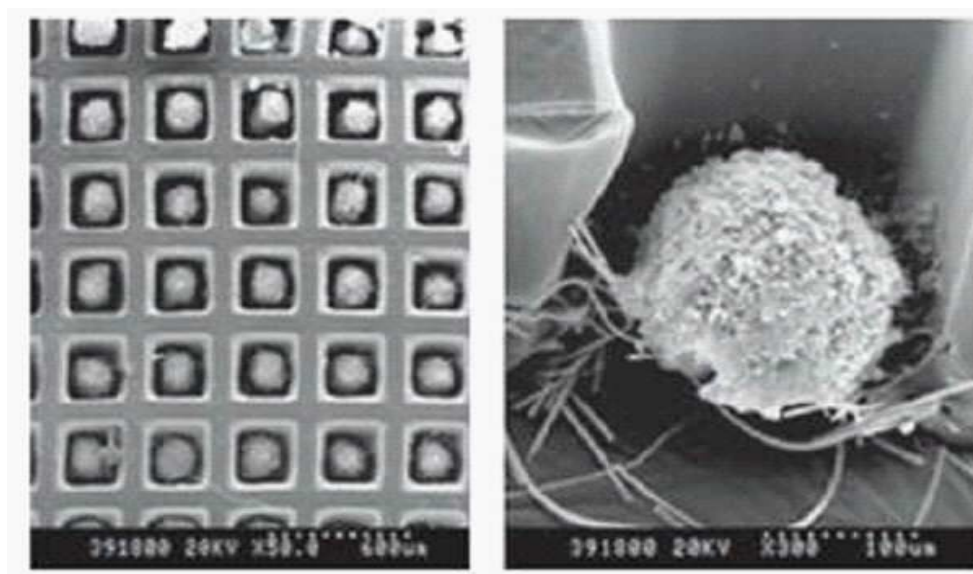
도면3



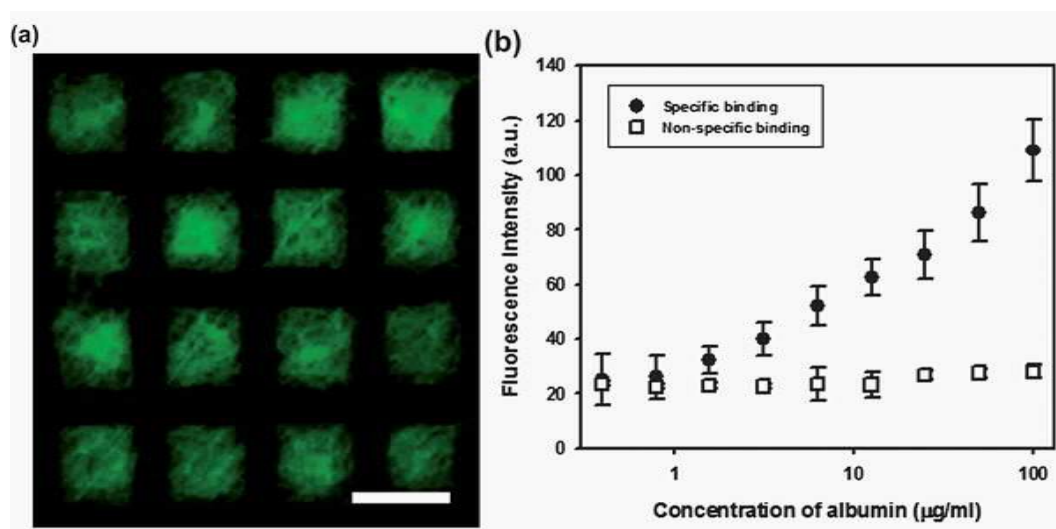
도면4



도면5



도면6



도면7

