



등록특허 10-2663922



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월08일

(11) 등록번호 10-2663922

(24) 등록일자 2024년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12M 25/06 (2013.01)
C12N 5/0657 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0144041

(22) 출원일자 2021년10월26일

심사청구일자 2021년10월26일

(65) 공개번호 10-2023-0059649

(43) 공개일자 2023년05월03일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120031748 A*

KR1020140129841 A*

KR102261982 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

임성갑

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

정희태

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

공병욱

전체 청구항 수 : 총 4 항

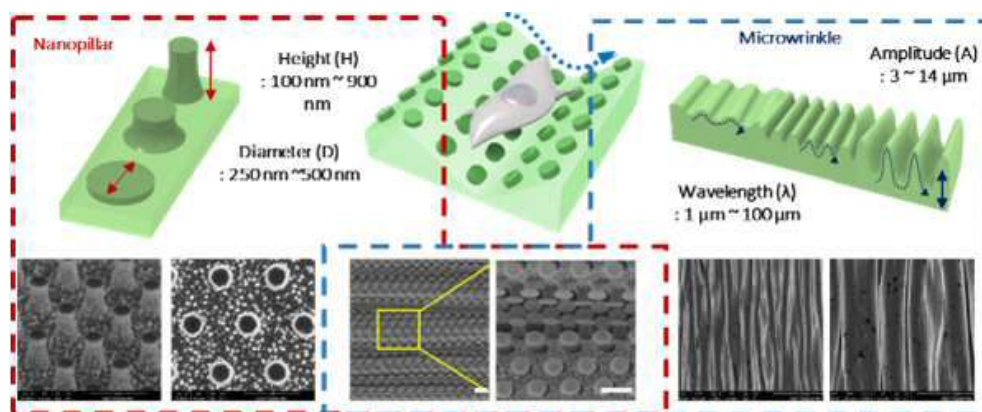
심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 마이크로-나노 스케일의 계층적 패턴 기반 세포 배양 및 성숙 유도 기관

(57) 요약

본 발명은 마이크로-나노 스케일의 계층적 구조를 가지는 배양 플랫폼을 제공한다. 본 발명에 따르면, 마이크로 주름의 파장 및 나노 필라의 직경, 높이 등을 다양하게 조절할 수 있어 생체 내 조직 구조의 모사가 용이하며, 이로써 세포에 물리적인 자극을 제공하여 기능이 향상된 세포를 제조할 수 있다. 세포 조직의 모사가 가능하다는 점에서, 범용적인 플랫폼 기술이 되어 세포의 기본 연구 및 약물 스크리닝 등의 질병 연구까지 넓은 범위에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이은정

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

윤근태

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

조영학

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

안현아

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415168619

과제번호 20008777

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오산업핵심기술개발사업

연구과제명 생체적합성 기능성 박막 기반 표면개질 기술을 통한 임상용 장질환 및 심장질환 줄기세포 치료제 생산 원천기술 개발

기 여 율 40/100

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2020.04.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711132180

과제번호 2021R1A2B5B03001416

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 이온성/극성 고분자 박막 기반 고성능 소재 개발 및 응용

기 여 율 30/100

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2021.03.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345320133

과제번호 2020R1I1A1A01066621

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 표면 흡착 단백질 특성 제어를 통한 암모델 제작 플랫폼 기술 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2020.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

규칙 또는 불규칙한 주름(wrinkle) 구조로 형성된 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로(hierarchical) 형성된 세포 배양용 기판에 있어서,

상기 마이크로 패턴의 주름 구조의 파장은 20 μm 내지 60 μm 이고,

상기 나노 패턴은 상기 마이크로 패턴 상에 형성된 것이며,

상기 나노 패턴은 가로 세로 방향으로 다열(multiseriate) 배열된 복수의 필라(pillar) 구조로 형성된 것이고,

상기 필라 구조의 직경은 400 nm 내지 500 nm이며,

상기 필라 구조의 높이는 150 nm 내지 300 nm인, 세포 배양용 기판.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 기판은 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 및 폴리다이메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 세포 배양용 기판.

청구항 9

제1항 또는 제8항의 세포 배양용 기판에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포는 심근세포, 근육세포, 줄기세포, 혈액세포, 면역세포, 골세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 상피세포 및 뇌세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 세포 배양 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 마이크로-나노 스케일의 계층적 패턴을 가지는 배양 플랫폼 및 이를 활용한 세포 배양/성숙법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 표면의 단단함, 탄성, 구조 등의 특징은 세포의 부착, 생존, 분화, 성숙 등의 규제, 조절에 중요한 역할을 한다. 특히 실제 세포의 환경을 모사하는 마이크로-, 나노- 스케일의 표면구조가 세포에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 활발히 진행되어왔다.

[0003] 실제 인체의 대부분 구조는 계층적 구조를 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 이에, 단일 스케일에서의 세포의 거동을 관찰하는 것을 뛰어넘어 계층적 구조에서의 세포의 세포역학신호변환(mechanotransduction)을 확인하는 연구에 대한 전세계적인 관심이 지대하다. 계층적 구조는 복잡한 다중 스케일의 체내 조직을 모사할 수 있고, 세포의 점층적/다층적인 세포역학신호변환을 통한 각 구조의 역할을 규명할 수 있다는 점에서 중요성을 가진다.

[0004] 따라서, 다양한 방향에서의 세포 자극이나 계층적 구조에서의 세포의 세포역학신호변환을 확인할 수 있는 배양 플랫폼을 연구, 개발하는 것이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0102159 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 세포의 부착 및 성숙 유도를 효과적으로 조절하기 위한 세포 배양 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 마이크로-나노 패턴의 구조적 최적화에 의한 계층적 구조를 확립하고 이에 따른 세포의 부착 및 성숙 유도를 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로(hierarchical) 형성된 세포 배양용 기판을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로 형성된 세포 배양용 기판에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 세포의 부착 및 성숙 유도를 효과적으로 조절하기 위한 세포 배양 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 마이크로-나노 패턴의 구조적 최적화에 의한 계층적 구조를 확립하고 이에 따른 세포의 부착 및 성숙 유도를 규명하였다.

[0010] 본 발명은 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로 형성된 세포 배양용 기판 및 이를 이용한 세포 배양 방법에 관한 것이다.

[0011] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로(hierarchical) 형성된 세포 배양용 기판을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 마이크로 패턴은 규칙 또는 불규칙한 주름(wrinkle) 구조로 형성된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명에서 "주름(wrinkle) 구조"는 마루(볼록)와 골(오목)이 주기적으로 반복되는 형태를 의미한다.

[0016] 본 발명의 주름 구조는 열수축 공정에 의해 마이크로 패턴화된 단위 구조(주름)의 집합이 기판 표면 상에 형성

되도록 제작될 수 있다.

- [0017] 본 발명의 주름 구조는 형성된 주름의 방향에 따라 세포가 배열될 수 있도록 가이드선(guidance) 역할을 하고, 이로 인해 세포의 길이가 길어지는 효과가 발휘될 수 있다.
- [0018] 상기 주름 구조의 파장(wavelength)은 1 μm 내지 100 μm , 5 μm 내지 100 μm , 10 μm 내지 100 μm , 20 μm 내지 100 μm , 30 μm 내지 100 μm , 40 μm 내지 100 μm , 50 μm 내지 100 μm , 60 μm 내지 100 μm , 70 μm 내지 100 μm , 80 μm 내지 100 μm , 90 μm 내지 100 μm , 1 μm 내지 90 μm , 1 μm 내지 80 μm , 1 μm 내지 70 μm , 1 μm 내지 60 μm , 5 μm 내지 60 μm , 10 μm 내지 60 μm , 15 μm 내지 60 μm , 20 μm 내지 60 μm , 25 μm 내지 60 μm , 30 μm 내지 60 μm , 35 μm 내지 60 μm , 40 μm 내지 60 μm , 45 μm 내지 60 μm , 50 μm 내지 60 μm , 55 μm 내지 60 μm , 1 μm 내지 55 μm , 1 μm 내지 50 μm , 1 μm 내지 45 μm , 1 μm 내지 40 μm , 1 μm 내지 35 μm , 1 μm 내지 30 μm , 1 μm 내지 25 μm , 1 μm 내지 20 μm , 1 μm 내지 15 μm , 1 μm 내지 10 μm , 1 μm 내지 5 μm , 5 μm 내지 10 μm , 10 μm 내지 15 μm , 15 μm 내지 20 μm , 20 μm 내지 25 μm , 25 μm 내지 30 μm , 30 μm 내지 35 μm , 35 μm 내지 40 μm , 40 μm 내지 45 μm , 45 μm 내지 50 μm , 50 μm 내지 55 μm , 55 μm 내지 60 μm , 60 μm 내지 65 μm , 65 μm 내지 70 μm , 70 μm 내지 75 μm , 75 μm 내지 80 μm , 80 μm 내지 85 μm , 85 μm 내지 90 μm , 90 μm 내지 95 μm , 또는 95 μm 내지 100 μm 일 수 있다. 상술한 파장 내에서 발명을 실시하는 경우, 세포 크기, 방향성 및 배열 양상을 마이크로 스케일 내 넓은 범위에서 체계적으로 통제 가능하다.
- [0019] 본 발명에서 상기 주름 구조는 열수축 시간을 조절함으로써, 상술한 범위에서 다양하게 형성될 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명에서 상기 주름 구조는 기판 표면에 코팅된 희생층(폴리비닐피롤리돈)의 두께를 조절함으로써, 상술한 범위에서 다양하게 형성될 수 있다.
- [0021] 상기 희생층의 두께는 폴리비닐피롤리돈의 농도에 의해 조절될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 주름 구조는 다양한 파장의 단위(주름) 구조가 동시에, 또는 없거나(즉, 단일 파장) 부분적으로 동시에 구현될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 나노 패턴은 가로 세로 방향으로 다열(multiseriate) 배열된 복수의 필라(pillar) 구조로 형성된 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 "필라(pillar) 구조"는 돌기 형태를 의미하며, 구체적으로는 원통형, 원뿔형, 원뿔대형, 반구형, 다각 기둥형 등의 형태를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 '원통형'은 밑면이 원인 기둥 형상의 돌기 형상이다.
- [0026] 본 발명에서 '원뿔대형'은 원뿔을 밑면에 평행한 평면으로 잘랐을 때, 잘린 면으로 나뉜 원뿔의 두 부분 중에서 원뿔의 꼭짓점을 포함하지 않는 아랫부분 및 잘린 면으로 이루어진 돌기 형상이다.
- [0027] 본 발명에서 '다각기둥형'은 밑면이 다각형인 기둥 모양의 형상으로서 예를 들면, 밑면이 삼각형이면 삼각 기둥형, 밑면이 사각형이면 사각기둥형이다.
- [0028] 상기 가로 세로 비율은 제작하는 세포 배양 기판 구조에 따라 달라질 수 있으며, 세포별로 동일하게 적용 가능하다.
- [0029] 본 발명의 필라 구조는 식각(etching), 구체적으로는 건식 식각(dry etching) 공정에 의해 나노 패턴화된 단위 구조(필라)의 집합이 기판 표면 상에 형성되도록 제작될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 필라 구조는 세포 배양용 기판의 표면적을 증가시켜 세포 부착성을 향상시키는 역할을 하고, 이로 인해 세포 성장 또는 분화를 촉진하는 효과가 발휘될 수 있다.
- [0031] 상기 필라 구조의 직경은 110 nm 내지 500 nm, 150 nm 내지 500 nm, 200 nm 내지 500 nm, 250 nm 내지 500 nm, 300 nm 내지 500 nm, 350 nm 내지 500 nm, 400 nm 내지 500 nm, 450 nm 내지 500 nm, 110 nm 내지 500 nm, 110 nm 내지 450 nm, 110 nm 내지 400 nm, 110 nm 내지 350 nm, 110 nm 내지 300 nm, 110 nm 내지 250 nm, 110 nm 내지 200 nm, 110 nm 내지 150 nm, 150 nm 내지 200 nm, 200 nm 내지 250 nm, 250 nm 내지 300 nm, 300 nm 내지 350 nm, 350 nm 내지 400 nm, 400 nm 내지 450 nm, 또는 450 nm 내지 500 nm일 수 있다. 상술한 직경 내에서 발명을 실시하는 경우, 세포 내부 국소 접촉(focal adhesion) 및 전체 세포 접촉 양상을 나노 스케일 내 넓은 범위에서 체계적으로 통제 가능하다.

- [0032] 상기 필라 구조의 직경은 금 원형 패턴의 식각 시간을 조절함으로써, 상술한 범위에서 다양하게 형성될 수 있다.
- [0033] 상기 필라 구조의 높이는 150 nm 내지 900 nm, 200 nm 내지 900 nm, 250 nm 내지 900 nm, 300 nm 내지 900 nm, 350 nm 내지 900 nm, 400 nm 내지 900 nm, 450 nm 내지 900 nm, 500 nm 내지 900 nm, 550 nm 내지 900 nm, 600 nm 내지 900 nm, 650 nm 내지 900 nm, 700 nm 내지 900 nm, 750 nm 내지 900 nm, 800 nm 내지 900 nm, 850 nm 내지 900 nm, 150 nm 내지 750 nm, 200 nm 내지 750 nm, 250 nm 내지 750 nm, 300 nm 내지 750 nm, 350 nm 내지 750 nm, 400 nm 내지 750 nm, 450 nm 내지 750 nm, 500 nm 내지 750 nm, 550 nm 내지 750 nm, 600 nm 내지 750 nm, 650 nm 내지 750 nm, 700 nm 내지 750 nm, 150 nm 내지 850 nm, 150 nm 내지 800 nm, 150 nm 내지 700 nm, 150 nm 내지 650 nm, 150 nm 내지 600 nm, 150 nm 내지 550 nm, 150 nm 내지 500 nm, 150 nm 내지 450 nm, 150 nm 내지 400 nm, 150 nm 내지 350 nm, 150 nm 내지 300 nm, 150 nm 내지 250 nm, 150 nm 내지 200 nm, 200 nm 내지 250 nm, 250 nm 내지 300 nm, 300 nm 내지 350 nm, 350 nm 내지 400 nm, 400 nm 내지 450 nm, 450 nm 내지 500 nm, 500 nm 내지 550 nm, 550 nm 내지 600 nm, 600 nm 내지 650 nm, 650 nm 내지 700 nm, 700 nm 내지 750 nm, 750 nm 내지 800 nm, 800 nm 내지 850 nm, 또는 850 nm 내지 900 nm 일 수 있다. 상술한 높이 내에서 발명을 실시하는 경우, 세포 내부 국소 접촉(focal adhesion) 및 전체 세포 접촉 양상을 나노 스케일 내 넓은 범위에서 체계적으로 통제 가능하다.
- [0034] 상기 필라 구조의 높이는 필라 식각 시간을 조절함으로써, 상술한 범위에서 다양하게 형성될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 상기 필라 구조는 다양한 직경 및 높이의 단위(필라) 구조가 동시에, 또는 없거나(즉, 단일 직경 및 높이) 부분적으로 동시에 구현될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 상기 나노 패턴은 상기 마이크로 패턴 상에 형성된 것일 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포 배양용 기판은 마이크로 패턴 상에 나노 패턴이 계층적으로 형성된 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로 형성된 세포 배양용 기판을 이용하여 세포들을 배양함으로써 세포들의 분화, 성장 및/또는 유도를 촉진할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 세포가 성장하는 환경의 지형학적 요소를 제어함으로써 세포의 분화, 성장, 유도를 촉진시키는 원리를 이용하고, 특히 마이크로-나노 패턴을 사용하는 경우 표면적이 넓어질 뿐만 아니라 전방위적인 자극에 노출될 수 있기 때문에 세포의 분화, 성장 및 유도를 보다 촉진시킬 수 있다.
- [0039] 따라서, 본 발명의 세포 배양용 기판을 사용함으로써 발휘되는 효과는 특정 세포를 선택함으로써 발휘되는 효과는 아니며, 본 발명의 세포 배양용 기판을 사용할 수 있는 세포의 종류는 크게 제한되지 않는다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명의 세포 배양용 기판을 사용할 수 있는 세포의 종류를 예를 들면, 근육세포, 줄기세포, 혈액세포, 면역세포, 골세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 뇌세포 및/또는 상피세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 보다 구체적으로, 상기 근육세포는 예를 들어, 골격근 세포, 심근 세포 및/또는 민무늬근 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 상기 줄기세포는 예를 들어, 신경 줄기세포(neural stem cell; NSC), 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ESC), 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC), 조혈 모세포(haematopoietic stem cell; HSC), 조혈 전구세포(haemopoietic precursor cell; HPC), 림프 선조세포(lymphoid progenitor cell) 및/또는 흉선 선조세포(thymic progenitor cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명의 세포 배양용 기판은 폴리(Poly) 계열 플라스틱 및/또는 폴리다이메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS) 재질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본래의 세포, 조직 또는 기관 등에 유의한 염증 반응, 면역원성 또는 세포 독성을 유도하지 않는 기능을 가지는 당업계에서 공지된 어떠한 물질도 사용 가능하다.
- [0044] 상기 폴리 계열 플라스틱은 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리에틸렌(Polyethylene) 및/또는 폴리프로필렌(Polypropylene)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 마이크로 패턴 및 나노 패턴이 계층적으로(hierarchical) 형성된 세포 배양용 기판에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 근육세포의 배양방법은 근육세포를 배양액이 포함

된 배지에서 배양하는 단계; 근육세포를 세포 배양용 기판에 씨딩(seeding)하는 단계; 및 근육세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0048] 상기 배양액은 당업계에서 세포의 배양 및/또는 분화에 사용 가능한 배양액이라면 어떠한 배양액도 포함할 수 있으며, 상기 배양액에 포함되는 성분 또는 인자의 종류 및/또는 농도는 배양되는 세포에 따라 통상의 기술자가 용이하게 조절할 수 있다.

[0049] 상기 세포 배양 방법은 상술한 세포 배양용 기판을 사용하므로, 세포 배양용 기판의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

[0050] 본 발명은 마이크로-나노 스케일의 계층적 구조를 가지는 배양 플랫폼을 제공한다. 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0051] (a) 마이크로/나노 패턴이 계층적으로 형성된 구조를 통해, 예를 들어 종래의 방법에 비해 심근의 성숙화 효율을 매우 효과적으로 향상시켜 심근세포의 기능성을 향상시킬 수 있다.

[0052] (b) 마이크로 주름의 파장 및 나노 필라의 직경, 높이 등을 다양하게 조절할 수 있어 생체 내 조직 구조의 모사가 용이하며, 이로써 세포에 물리적인 자극을 제공하여 기능이 향상된 세포를 제조할 수 있다.

[0053] (c) 세포 조직의 모사가 가능하다는 점에서, 범용적인 플랫폼 기술이 되어 세포의 기본 연구 및 약물 스크리닝 등의 질병 연구까지 넓은 범위에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 본 발명의 배양 플랫폼 제작 과정을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서, 다양한 범위의 직경을 갖는 나노 필라 구조(a) 및 다양한 범위의 파장을 갖는 마이크로 주름 구조(b)를 확인한 전자 현미경(SEM) 사진이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서 배양된 심근세포의 크기를 마이크로 주름 구조의 파장(wavelength)에 따라 비교한 도이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서 배양된 심근세포의 크기를 나노 필라 구조의 높이(height)와 직경(diameter)에 따라 비교한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서, 직경 500 nm, 높이 150 nm의 나노 필라 구조(a), 파장 42 μm 의 마이크로 주름 구조(b) 및 상기 나노 필라 구조와 마이크로 주름 구조의 계층적 구조(c)에서 배양된 심근세포를 확인한 전자 현미경(SEM) 사진이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서, 직경 500 nm, 높이 150 nm의 나노 필라 구조 및 파장 42 μm 의 마이크로 주름 구조의 계층적 구조에서 배양된 심근세포를 확인한 심근 트로포닌 T 면역 염색 사진이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 플랫폼에서, 직경 500 nm, 높이 150 nm의 나노 필라 구조 및 파장 42 μm 의 마이크로 주름 구조의 계층적 구조에서 배양된 심근세포의 분율 및 크기를 정량화하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0057] **제조예. 본 발명의 계층적 구조의 형성**

[0058] 모세관력 리소그래피(Capillary force lithography) 방식을 통해 약 40 nm 두께의 원형 금 패턴을 제작하였다. 이때, 직경은 건식 식각(dry etching) 시간을 조절하여 약 250 nm 부터 500 nm까지 다양하게 제작 가능하다.

[0059] 제작된 금 패턴을 폴리스티렌(Polystyrene) 기판에 전사 후, 이를 에칭(etching) 마스크로 활용해 건식 식각 공정으로 기둥(필라) 구조를 식각하였다. 이때, 기둥(필라) 높이는 식각 시간을 조절하여 최대 1 μm 까지 다양하게 제작하였다. 또한, 기둥 직경은 상기 원형 금 패턴의 직경에 따라 결정된다.

[0060] 끝으로, 나노 패터닝(필라)된 폴리스티렌 기판을 열수축하여 마이크로 주름 구조를 형성하였다. 이때, 주름 파장은 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone, PVP)의 농도(희생층 두께 조절용) 및/또는 열수축 시간(변형도(Strain) 조절용)를 조절하여 다양하게 제작하였다.

[0061] 각 단계에서 제작된 나노 필라 구조 및 마이크로 주름 구조는 Magellan400(FEI company)을 통해 확인하였으며, 결과는 도 2에 나타내었다.

[0063] 실시예 1. 심근세포의 배양

[0064] H9C2 세포(CRL-1446, ATCC)를 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum)(Welgene, Korea), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco, USA)이 포함된 high-serum DMEM(Gibco, USA) 배양액으로 37 °C에서 하루 동안 배양한 다음, 상기 제조예의 각 단계에서 제작된 (a) 나노 필라 구조, (b) 마이크로 주름 구조 및 각 구조가 적용된 (c) 계층적 구조 기판 위에 올리고(seeding) 10% 소 태아 혈청(Welgene), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco), 100 nM Retinoic acid(Merck, USA)이 포함된 배양액으로 37 °C에서 7 일 동안 배양하였다.

[0065] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 패턴 사이즈에 따라 세포의 배양 및 부착 형태가 다르게 관찰되었다.

[0067] 실시예 2. 심근세포의 성숙도 확인

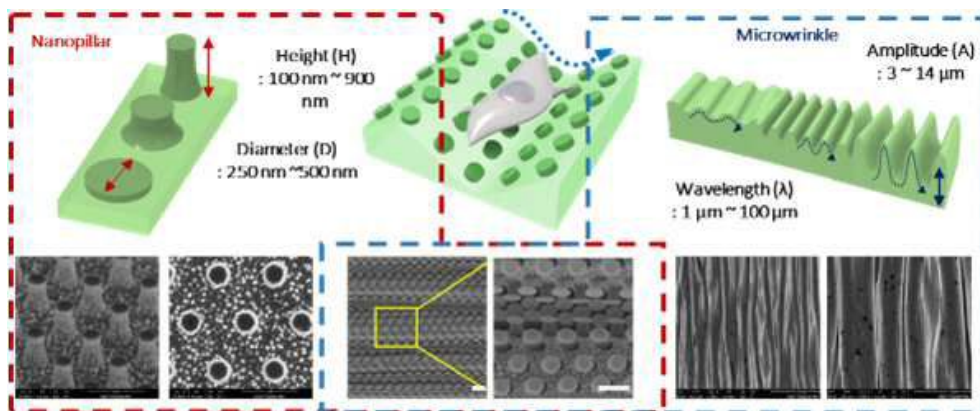
[0068] 상기 실시예 1의 결과를 기초로, 심근세포의 성숙도는 심근 트로포닌 T를 면역 염색하여 확인하였다.

[0069] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 배양된 H9C2 세포를 4% 파라포름알데하이드(Sigma)로 고정하고, DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)(Welgene) 상에서 0.1% 트리톤 X-100을 이용하여 투과(Permeabilize)시켰다. 세포고정 후, 세포는 4 °C에서 하루 동안 1% 소 태아 혈청과 DPBS 용액 상에서 트로포닌 T(Thermo) 1차 항체와 함께 배양하였다. 형광 염색에는 안티-마우스 Alexa Flour 488(abcam)을 사용하였다. 핵(nuclei)은 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)(Sigma)을 사용하여 대조 염색하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Nikon Ti)을 사용하여 시각화하였다.

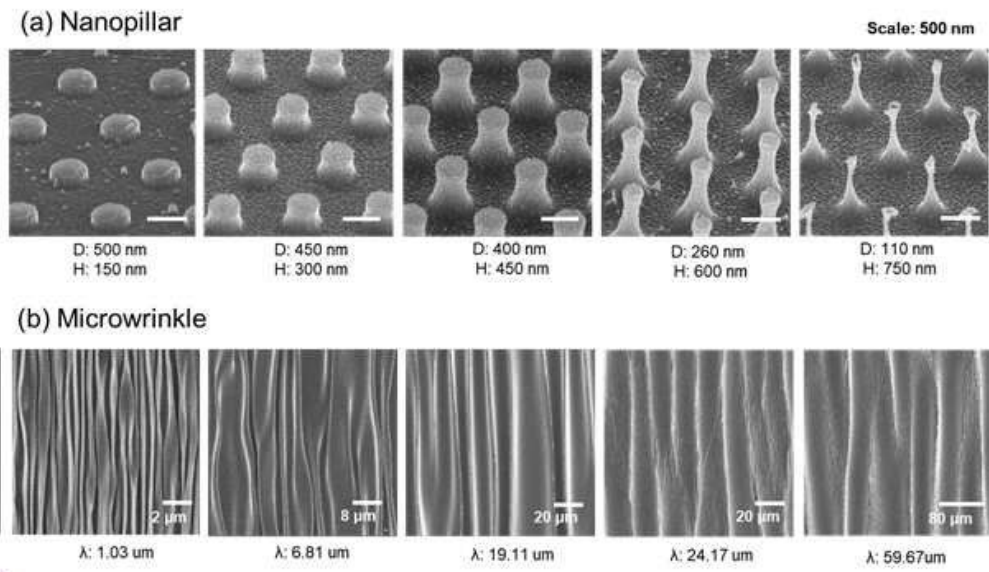
[0070] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 직경 500 nm, 높이 150 nm의 나노 필라 구조, 파장 42 μm의 마이크로 주름 구조 및 이를 반영한 계층적 구조에서 가장 높게 확인되었다.

도면

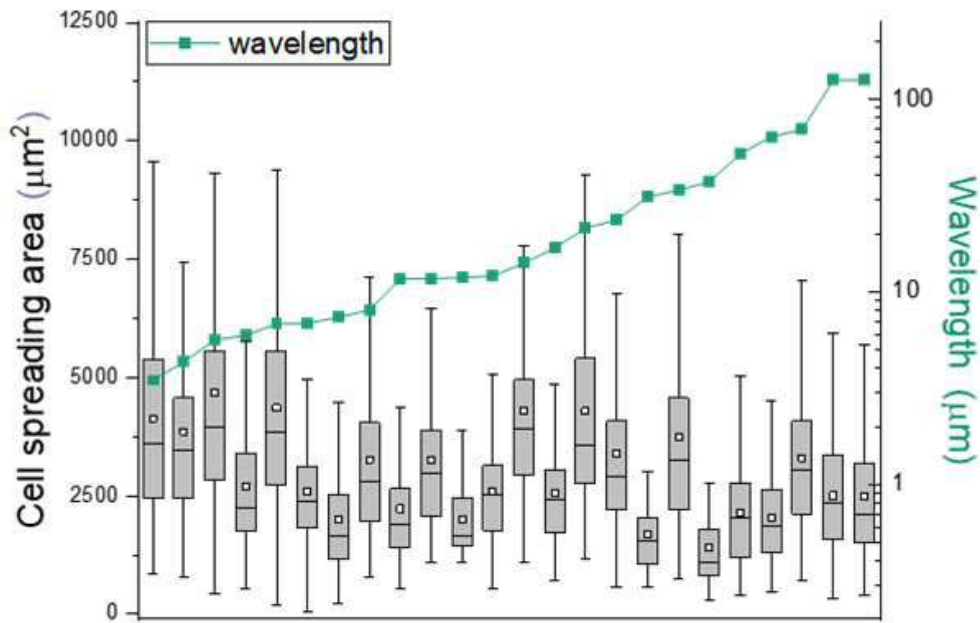
도면1



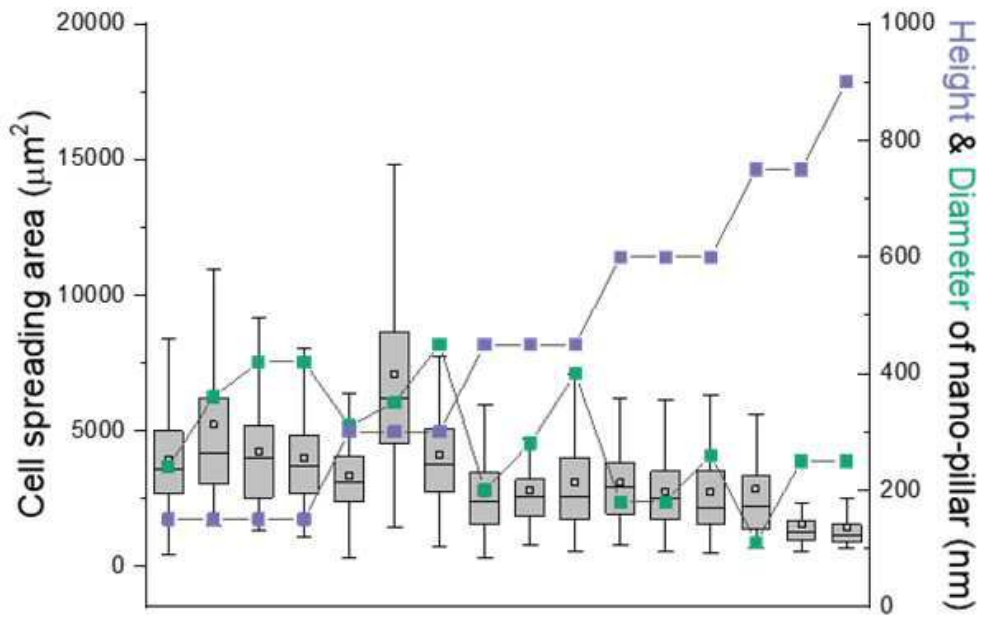
도면2



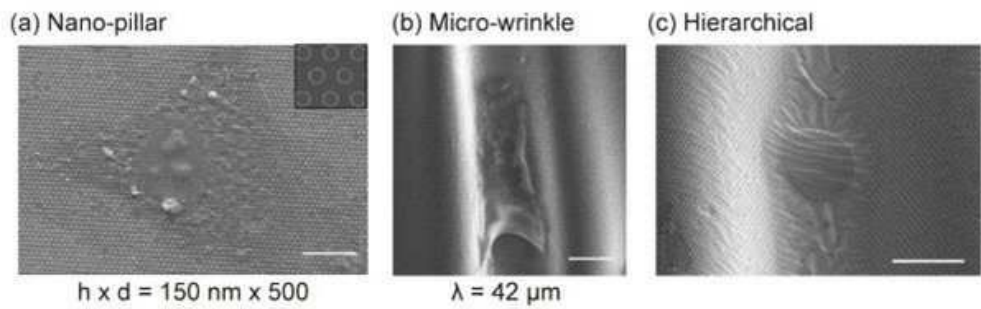
도면3a



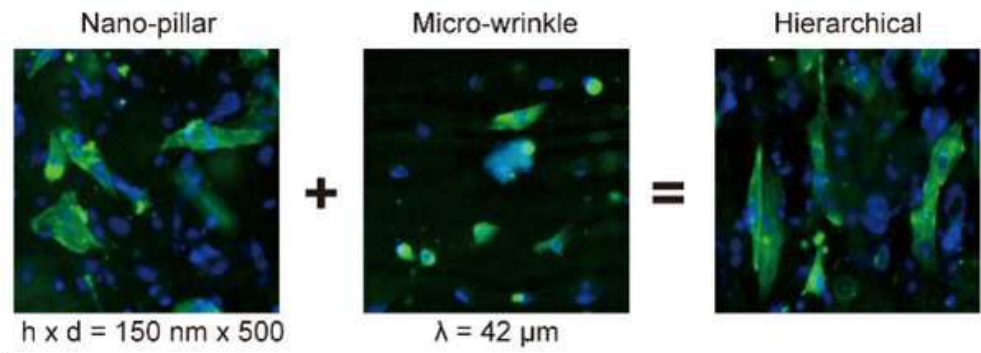
도면3b



도면4



도면5a



도면5b

