



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월02일  
(11) 등록번호 10-1302445  
(24) 등록일자 2013년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0020798

(22) 출원일자 2012년02월29일

심사청구일자 2012년02월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR101046882 B1

KR1020110112658 A

KR1020120005878 A

KR1020110115008 A

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

김근형

경기도 성남시 분당구 구미로 144번길 8, 902동 101호(구미동, 무지개마을)

전호준

광주광역시 남구 주월1동 덕산아파트 101동 1604호

진규현

광주광역시 북구 각화동 각화주공아파트 101동 1201호

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 12 항

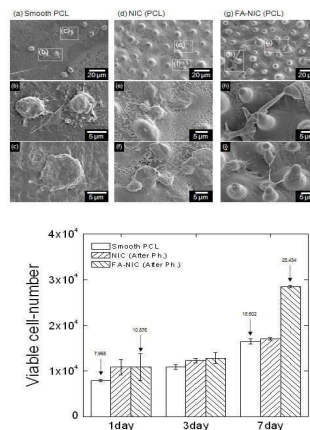
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법 및 이에 의하여 제조되는 마이크로 및 나노 표면구조를 갖는 3차원 세포담체

## (57) 요약

본 발명은 기존의 세포 지지체 제작방법들에 비해 공정이 비교적 간단하고, 고가의 장비가 필요 없으며, 용매를 사용하지 않는 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법 (Field-aided nano imprinting casting:FA-NIC)을 제안한다. 이 방법을 이용하여 본 발명자들은 연꽃잎의 표면과 유사한 마이크로/나노 돌기 구조를 갖는 PCL 필름을 제작하였으며, 제작된 필름은 주사전자현미경과 원자력 현미경 그리고 비접촉 표면거칠기 측정기 이미지를 통해 본 발명 방법의 효과를 입증하였고, 인비트로 세포실험을 수행하여 MTT 분석과 알리자드 레드 염색을 통해 세포의 초기 부착률과 배양특성, 뼈 분화능을 비교 분석하였다. 조골 유사세포 (Osteoblast-like-cells, MG63)를 이용한 세포배양실험을 수행한 결과, 본 발명의 방법으로 제작된 PCL 필름이 대조군인 NIC 기법으로 제작된 세포 지지체와 순수 PCL 필름보다 세포 증식이 잘 되는 것을 확인하였다. 그리고, 시료들에서 조골세포의 분화 정도를 측정하기 위해 골 미네랄화 (bone mineralization)를 실시한 결과, 본 발명의 FA-NIC 방법을 통해 제작된 PCL 필름에서 조골세포 유사세포 분화가 더 활발하게 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험을 통해서 본 발명 방법의 모사 가능성을 확인할 수 있었고, 연꽃 잎을 모사한 PCL 필름의 표면 구조와 거칠기는 세포의 증식과 분화에 영향을 주었음을 확인하였다.

## 대표도 - 도6



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 주형 주위에 전기장을 형성하고, 몰드 제작용 열경화성 재료를 주형 위에 일차 임프린팅한 후 열을 가하여 몰드를 제조하는 단계;
- b) 상기 제조된 몰드에 용융된 생체적합성 재료를 가하고 전기장 하에서 이차 임프린팅하여 필름을 형성하는 단계; 및
- c) 상기 필름을 냉각하는 단계;를 포함하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계 및 b) 단계에서 전기장은 0.25~3 kV/mm임을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계 및 b) 단계에서 전기장은 교차 전극에 교류 전기를 제공하여 형성되는 교류전기장임을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계의 몰드 제작용 열경화성 재료는 PDMS (Polydimethylsiloxane)임을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계의 생체적합성 재료는 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크, 폴리이미드 (polyimides), 폴리아믹산 (polyamix acid), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리에테르이미드 (polyetherimide), 나일론 (nylon), 폴리아라미드 (polyaramid), 폴리비닐알코올 (polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트 (poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드 (polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린 (polyaniline), 폴리아크릴로니트릴 (polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드 (polyethylene oxide), 폴리스티렌 (polystyrene), 셀룰로오스 (cellulose), 폴리아크릴레이트 (polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트 (polymethylmethacrylate), 폴리락산 (polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체 (PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트} (PEOT/PBT), 폴리포스포에스터 (polyphosphoester; PPE), 폴리포스포젠 (PPA), 폴리안하이드라이드 (Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터 {poly(ortho ester; POE), 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트 {poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트 {poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

## 청구항 6

청구항 1에 있어서,

a) 단계에서 주형으로 연꽃잎을 사용함을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

## 청구항 7

청구항 1에 있어서,

c) 단계 이후 필름에 친수성 물질을 코팅하는 단계;를 추가적으로 포함하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

## 청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 친수성 물질은 플로로탄닌임을 특징으로 하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법.

## 청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항의 방법으로 제조되며, 마이크로 구조 구역의 거칠기가 2~4  $\mu\text{m}$ , 나노 구조 구역의 거칠기가 0.4~0.8  $\mu\text{m}$ 임을 특징으로 하는 3차원 세포담체.

## 청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 세포 담체는 조직 재생용임을 특징으로 하는 3차원 세포담체.

## 청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 조직은 골조직임을 특징으로 하는 3차원 세포담체.

## 청구항 12

청구항 9의 세포 담체를 인공 세포지지체의 표면에 부착하여 사용함을 특징으로 하는 조직 재생방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 기존의 세포 지지체 제작방법들에 비해 공정방법이 비교적 간단하고, 고가의 장비가 필요 없으며, 용매를 사용하지 않는 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법 (Field-aided nano imprinting casting:FA-NIC) 및 이 방법으로 제조된 마이크로구조와 나노구조가 공존하는 필름형 세포담체에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 생체조직공학은 공학과 생명과학이 융합된 학문으로써, 뼈, 연골, 장기 등 생체 기관을 보완 또는 대체하는 부품을 제작하고 이식하여 인체의 항상성을 유지 또는 복원하는 것을 주요 목적으로 하며, 각 생체 기관에 해당하는 조직을 만들어 낼 수 있는 세포, 생체 기관의 형상을 구성하고 세포를 지지하는 지지체, 세포 성장에 필요한 성장 인자가 필수적이다. 인공 지지체는 몇 가지 중요한 특징을 나타내어야 하며 이 필수적 특징들은 다음과 같다. 지지체를 제작하는 고분자는 생체 적합성 및 생분해성의 특성을 나타내어야 하며, 지지체는 세포가 부착하여 잘 자랄 수 있도록 충분한 기공을 가져야 하며, 적절한 거칠기와 표면적을 갖는 표면 구조로 이루어져야 한다. 또한, 지지체는 충분한 기계적 강도를 유지함으로써 이식 후 그 형상이 변형되지 않아야 한다 [D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000), Li W. J. et al., *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 613-21(2002), Chen G. et al., *Macromol. Biosci.* **2**, 67-77, (2002), G Seebacher et al., *Biomaterials*, **25**, 5227-37, (2004), K. Rezwan et al., *Biomaterials*, **27**, 3413-3431, (2006)].
- [0003] 바이오 소재는 조직의 복원을 위해 다양하게 이용되며 그 효율성은 세포와 지지체의 상호작용 능력에 크게 기인한다 [Puleo D. A., Nancy A., *Biomaterials* **20**, 2311-2321. (1999), Marquis M. E. et al., *Front Biosci.* **14**, 1023-67, (2009)]. 이러한 이유로 생체와 비슷한 기계적 물성과 기하학적 형상을 가지는 고분자 지지체를 사용하는 것이 매우 중요하다. 최근 연구를 통해 세포의 거동을 사용되는 물질 이외에도 화학적 구조, 친수성, 소수성, 이온 그룹, 형태 및 지형 등 지지체 표면의 화학적 물리적 특성에 강하게 의존하는 것으로 나타났다 [Jiao Y. P. and Cui F. Z., *Biomed. Mater.* **2**, 24 (2007)]. 특히 몇몇 연구원들은 지지체의 표면지형과 세포 부착 증식과의 상관관계를 확인하기 위해 유리 석영 [Rajnicek A., Britland S., McCaig C., *J. Cell Sci.* **110**, 2905-13 (1997)], 금속 산화물 [Kawana A., Torimitsu K., *Dev Brain Res*, **51**, 128 (1990)], 실리콘 [Bayless S. C. et al., *Sensor Actuators A*, **74**, 139-42 (1999), Turner J. N. et al., *Exp Neurol* **156**, 33-49 (1999), Turner A. M. P. et al., *J Biomed Res* **51**, 4305 (2000), Craighead H. G. et al., *Curr Opin Sol State Mat Sci* **5**, 177 (2001), Fan Y. W. et al., *Surface Coating Technol* **131**, 355 (2000), Fan Y. W. et al., *J Neurosci Methods* **120**, 17-23 (2002)] 등의 다양한 특정 표면을 가공하여 관찰하였다.
- [0004] Miller et al.은 주조 기술을 사용하여 마이크로에서 나노미터에 이르는 다양한 기공 크기와 수정 보완된 표면을 갖는 PLGA {poly(lactic-co-glycolic acid)} 지지체를 제작하였다 [Miller D. C., Thapa A., Haberstroh K. M. and Webster T. J., *Biomaterials* **25**, 53 (2004)]. 수정 보완된 나노구조의 표면은 혈관 세포밀도를 크게 향상시키는 것으로 나타났으며, 이것은 나노구조의 표면 특성이 혈관 세포의 밀도를 높일 수 있으며 이러한 제조방법 역시 조직공학적 혈관이식에 유용하게 사용될 수 있음을 증명하였다. 또한, Barry et al. 은 표면 구조의 형태에 따라 다양하게 반응하는 세포의 거동을 관찰하였다 [Berry C.C., Campbell G., Spadicino. A., Robertson. M., Curtis. A., *Biomaterials* **25**, 5781 (2004)]. 이 결과에서는 표면이 수정된 3차원 지지체가 일 반적인 형태에 비해 세포의 부착력을 높여줌을 보여주었다. Wan et al.은 위상 분리 성형기법 (phase-separation and molding techniques)을 사용하여 마이크로 또는 나노 형태의 표면구조를 나타내는 지지체를 제작하였고, 수정된 표면은 조골세포의 증식에 더 효과적임을 입증하였다 [Wan Y. et al., *Biomaterials* **26**, 4453 (2005).]. 하지만, 이 방법은 2차원 상의 지지체에서만 구현이 가능하며 3차원 지지체에 적용하기에는 어려움이 있다. Schmidt et al.은 일정한 형상의 마이크로 구조를 가지는 지지체를 제작하기 위해 포토리소그래피 기법을 사용하였다. 그러나, 이 기술은 임의의 형상을 제작하는데 유용하지만 장비가 고가이면서 재료가 한정된다는 것이 단점이다 [Schmidt J. A. and Von Recum A. F., *Biomaterials* **12**, 385 (1991)].

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 조직공학에서 세포와 세포담체의 표면과의 관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 선행 연구에서 개발된 세포담체는 전통적인 리소그래피 또는 임프린팅 방식으로 단순한 마이크로 또는 나노구조물을 가지는 세포담체를 제작하는 방법이었다. 그러나, 종래 방법들은 장비가 고가이면서 많은 공정 시간이 필요하며 재료가 한정된다는 단점이 있다.
- [0006] 본 발명은 종래 방법의 단점들을 극복하고 제조 공정이 비교적 간단하고, 고가의 장비가 필요 없으며, 용매를

사용하지 않는 임프린팅 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

## 과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명자들이 제안하는 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사 방법 (Field-aided nano imprinting casting: FA-NIC)은 위에서 설명한 기존의 제작 방법들과 달리 비교적 공정 방법이 간단하고, 고가의 장비가 필요 없으며 마이크로와 나노 구조가 혼합된 복합구조 형태의 모사가 가능하다. 이 과정 동안 사용되는 고분자 용액은 전기장 안에서 전기영동현상의 영향으로 유동성이 증가하고 이로 인해 마이크로 나노 구조에 잘 스며들게 하여 효과적인 임프린팅을 할 수 있는 장점이 있다 [Kim G. H. et al., *Macromol. Rapid Comm.* 30, 991-996 (2009), Jin G. H and Kim G. H., *Langmuir* 27(2), 828-834 (2011), Jin G. H and Jeon H. J., Kim G. H., *Soft Matter*, 7, 4723 (2011)].
- [0008] 본 발명에서는 대표적으로 많이 사용되는 생체고분자인 폴리카프로락톤 {poly( $\epsilon$ -caprolactone)}과 앞서 제안한 임프린팅 방법을 이용하여 박막 형태의 3차원 형상을 지닌 필름의 제작 방법을 살펴보고, 복합구조 형태의 표면 특성을 갖는 지지체가 세포의 배양과 활성화에 어떠한 영향을 끼치는지 살펴보았다. 복합구조 형태의 3차원 형상을 구현하기 위해 기본 주형 (Template)으로 표면이 일정하면서 복합구조 형태를 띠는 연꽃잎을 사용하였다. 또한 표면이 수정 보완된 PCL 필름의 대조군으로 편평한 표면을 갖는 필름 (Smooth PCL)과 일반적인 방식의 임프린팅 (Normal imprinting casting: NIC)으로 필름을 제작하였으며 서로 다른 친수의 정도를 보완하고자 감태에서 추출한 플로로탄닌 (Phlorotannin)으로 코팅하였다. 플로로탄닌은 친수성을 제공해줄 뿐만 아니라 콜라겐, 알칼라인 포스파타이즈 (ALP), 미네랄화 (mineralization)를 증가시킴으로써 조골세포 (osteoblast)의 분화를 향상시킨다고 보고되고 있다 [Ryu B. M. et al., *Chemico-Biological Interactions*, 179, 192-201 (2009)].
- [0009] 본 발명에서는 돌기 형태의 마이크로/나노 복합 구조물이 세포의 배양과 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 이론적, 실험적으로 규명하였다. 본 발명은 기존의 세포 지지체 제작방법들에 비해 공정방법이 비교적 간단하고, 고가의 장비가 필요 없으며, 용매를 사용하지 않는 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법 (Field-aided nano imprinting casting:FA-NIC)을 제안한다.
- [0010] 이 방법을 이용하여 본 발명자들은 연꽃잎의 표면과 유사한 마이크로/나노 돌기 구조를 갖는 PCL 필름을 제작하였으며, 제작된 필름은 주사전자현미경과 원자력 현미경 그리고 비접촉 표면거칠기 측정기 이미지를 통해 본 발명 방법의 효과를 입증하였고, 인비트로 세포실험을 수행하여 MTT 분석과 알리자드 레드 염색을 통해 세포의 초기 부착물과 배양특성, 뼈 분화능을 비교 분석하였다. 조골 유사세포 (Osteoblast-like-cells, MG63)를 이용한 세포배양실험을 수행한 결과, 본 발명의 방법으로 제작된 PCL 필름이 대조군인 NIC기법으로 제작된 세포 지지체와 순수 PCL 필름보다 세포 증식이 잘 되는 것을 확인하였다. 특히, 마이크로/나노의 복합구조를 가지는 필름의 경우, 요철 구조가 없거나 뚜렷하지 않은 필름에 비해 세포의 성장을 3차원적으로 잘 유도하였으며, 결과적으로 세포의 활동 전위가 증가됨을 확인하였다. 그리고 시료들에서 조골세포의 분화 정도를 측정하기 위해 골 미네랄화 (bone mineralization)를 실시한 결과, 본 발명의 FA-NIC 방법을 통해 제작된 PCL 필름에서 조골세포 유사세포 분화가 더 활발하게 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험을 통해서 본 발명 방법의 모사 가능성을 확인할 수 있었고, 연꽃 잎을 모사한 PCL 필름의 표면 구조와 거칠기는 세포의 증식과 분화에 영향을 주었음을 확인하였다.
- [0011] 본 발명은
- [0012] a) 주형 주위에 전기장을 형성하고, 몰드 제작용 열경화성 재료를 주형 위에 일차 임프린팅한 후 열을 가하여 몰드를 제조하는 단계;
- [0013] b) 상기 제조된 몰드에 용융된 생체적합성 재료를 가하고 전기장 하에서 이차 임프린팅하여 필름을 형성하는 단계; 및
- [0014] c) 상기 필름을 냉각하는 단계;를 포함하는 전기장을 이용한 마이크로구조 및 나노구조 임프린팅 모사방법을 제공한다.

- [0015] 본 발명은 상기 a) 단계 및 b) 단계에서 전기장이 0.25~3 kV/mm, 바람직하게는 1.8 kV/mm임을 특징으로 한다. 전기장 세기가 너무 약하면 제조된 필름의 표면이 매끄러워 세포 부착 및 증식에 적합하지 않고, 전기장 세기가 너무 강하면 제조공정이 안정적이지 못하다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계 및 b) 단계에서 전기장이 교차 전극에 교류 전기를 제공하여 형성되는 교류전기장임을 특징으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계의 몰드 제작용 열경화성 재료가 PDMS (Polydimethylsiloxane)임을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 b) 단계의 생체적합성 재료가 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리에테리미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE), 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 a) 단계에서 주형으로 연꽃잎을 사용함을 특징으로 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 c) 단계 이후 필름에 친수성 물질을 코팅하는 단계;를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 코팅에 사용하는 친수성 물질에는 특별한 제한이 없으나, 바람직하게는 플로로탄닌을 사용한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조되며, 세포 부착성 및 증식이 우수한 필름형 세포 담체를 제공한다. 상기 세포 담체는 골조직과 같은 조직 재생용임을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 필름형 세포 담체를 인공 세포지지체의 표면에 부착하여 사용함을 특징으로 하는 조직 재생방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0023] 본 발명에서는 임프린팅 장비와 가열 부재를 결합하여 임프린팅하는 시스템을 구축하였으며, 이렇게 구축된 FA-NIC 기법만으로 PCL 필름을 제작하였다. 기존방법에 비하여 세포 담체 표면에 마이크로/나노 돌기 구조가 공존하는 구조적 특성을 갖는 세포 담체 제작이 가능하며, 전기장의 세기 조절로 그 구조를 조절할 수 있어 세포의 초기 부착률 및 성장률을 극대화시킬 수 있다. 또한 생체적합성 재료는 용매를 사용하여 용해시키지 않고 가열 부재를 사용하여 용융시킴으로써 생체에 적합한 세포 담체의 제작을 가능하게 하였다.

### 도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 서로 맞물린 전극을 이용한 본 발명의 전기장 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법을 나타내는 개념도로서, (a)는 음각 PDMS (Polydimethylsiloxane)몰드를 얻기 위한 첫 번째 캐스팅 공정이고, (b)는 연꽃 잎과 유사한 PCL 표면을 얻기 위한 두 번째 캐스팅 공정이다.

도 2는 1.8 kV/mm 전기장 및 주파수 100 Hz 하에서 서로 맞물리는 전극 (interdigitated electrode)을 이용하여 제조한 음각 복제된 PDMS 및 양각 복제된 PCL 표면의 주사전자현미경 이미지이다. (a) 연꽃 잎, (b) 통상의 나노 임프린팅 캐스팅 방법으로 제조된 음각 복제물, (c) 본 발명 방법인 전기장 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법 (FA-NIC)으로 제조된 음각 복제물, (d)는 상기 (b)의 부분 확대 PDMS 표면 원자력 현미경 이미지, (e)는 상기 (c)의 부분 확대 PDMS 표면 원자력 현미경 이미지, (f)는 대조군인 편평한 PCL (양각 복제), (g)는 양각 복제 NIC PCL, (h)는 양각 복제 FA-NIC PCL이며, 삽입된 것은 확대된 이미지이다.

도 3은 (a) 편평한 PCL, (b) 통상의 NIC에 의해 복제된 PCL 표면, 및 (c) FA-NIC를 이용하여 복제된 PCL 표면, (d) 연꽃 잎의 표면 거칠기를 나타내는 3차원 지형도(topography), 그 아래는 각각 상기 (a), (b), (c), (d)의 부분 확대 3차원 지형도이다.

(e) 그래프는 복제된 PCL 표면 및 연꽃 잎 표면의 돌출된 부분의 평균 거칠기와 높이를 나타내는 것이고, (f) 그래프는 각 시료의 마이크로 및 나노구조의 거칠기를 나타내는 것이다.

(e)와 (f)에서 P/NIC 및 P/FA-NIC의 "P/"는 플로로탄닌 코팅을 의미한다.

도 4는 PCL 필름에 코팅된 플로로탄닌의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 5는 PCL과 플로로탄닌 코팅 이후의 PCL의 수분접촉각을 나타내는 사진과 그래프이다. (a) 편평한 PCL, (b) NIC(PCL), (c) FA-NIC(PCL). "Before Ph."와 "After Ph."는 각각 플로로탄닌 코팅 전과 후를 의미한다.

도 6은 7일간 (a)(b)(c) 편평한 PCL, (d)(e)(f) NIC (PCL), (g)(h)(i) FA-NIC (PCL)에서 배양하여 생존한 MG-63 세포 수를 비교한 사진 및 그래프이다. "After Ph."는 플로로탄닌 코팅 후를 의미한다.

도 7은 MG-63 세포 내에 알리자린 레드-S 염색하여 분석한 미네랄화 정도를 나타내는 그래프와 표이다.

도 8은 (a) 편평한 PCL (세포 없음), (b) 편평한 PCL, (c) NIC(PCL), (d) FA-NIC(PCL)에 11일간 배양한 후 알리자린 레드-S 염색으로 분석한 미네랄화의 광학적 이미지이다.

도 9는 본 발명의 장치를 촬영한 사진이다.

도 10은 본 발명의 장치 중 교차전극이 설치된 싱글 플레이트이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

#### <재료>

본 발명의 실시예에서 연꽃잎의 몰드 (Mold)로 사용된 PDMS (Polydimethylsiloxane, Dow corning, Midland, MI, USA)는 주제와 경화제를 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, 50 °C의 오븐에서 6시간 경화시켰다. 연꽃잎과 같은 표면을 가지는 필름의 주재료로 시그마 알드리치(Sigma Aldrich, Korea)에서 구입한 폴리카프로락톤 (PCL, Mn=40000, 녹는점=60 °C)을 75 °C 오븐에서 녹여 사용하였다. 또한 제작된 PCL 필름을 에탄올에 용해된 0.5wt% 플로로탄닌 (phlorotannin) 용액으로 코팅하였다.

#### <실시예 1: 전기장을 이용한 임프린팅 모사방법>

본 발명의 교차전극 형태의 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법은 도 1과 같이 개략도에 나타내었다. 이 방법은 두 단계로 구성되어 있는데 우선, 연꽃잎을 이용해 PDMS에 음각화한 후 경화시킨 PDMS를 몰드 (Mold)로 사용하여 두 번째 임프린팅 과정을 실행하면 연꽃잎과 유사한, 양각화된 PCL 필름을 얻게 된다. 이때 사용된 교차전극 형태의 전기장의 세기는 1.8kV/mm, 100Hz로써 본 연구팀의 이전 연구에서 효과적인 임프린팅을 함과 동시에 안정성에 적절한 전기장 세기임을 밝힌바 있다 [Jin G. H and Jeon H. J., Kim G. H., *Soft Matter*, **7**, 4723 (2011)]. 첫 번째 PDMS 음각화 과정과 두 번째 PCL 양각화 과정 모두 동일한 전기장 세기 (1.8kV/mm, 100Hz)를 부여하였다.

첫 번째 임프린팅에서 PDMS를 경화시키기 위해 전기장을 걸어주는 동시에 챔버 (Heating oven)에서 50 °C의 온도로 6시간 경화시켰다. 두 번째 임프린팅에서 PCL 역시 지속적으로 전기장을 가해주며 챔버 (Heating oven)에서 75 °C로 용융시켰으며, 30분 간격으로 10 °C씩 온도를 내리면서 서서히 경화시켰다. 전극 간에 커런트 (Current) 방지를 위해 50 μm의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 {poly(ethylene terephthalate)} 필름을 사용하였으며, 주형 (template)을 고정하기 위해 접착 테이프를 사용하였다.

#### <실시예 2: PCL 필름의 특성 규명>

- [0032] 모사된 시료들의 마이크로/나노 병합구조의 표면 형상을 관찰하고자 sputter coater (E-1030, Hitachi)로 60mA에서 3분 동안 5nm의 백금코팅을 하였으며, 주사전자현미경 (SEM, S-4800, Hitachi)을 이용하여 5KV의 빔으로 배율을 조절하여 관찰하였다. 또한, 표면 거칠기를 측정하기 위하여 원자력 현미경 (Atomic Force Microscope, Nanowizard AFM, JPK)과 비접촉 표면 거칠기 측정기 (Nanoview-m4151p, Korea)로 각각 15곳을 측정 분석하였다.
- [0033] PCL은 인 비보 (In vivo)와 인 비트로 (in vitro)에서 친수성의 특성을 가짐으로써 세포 친화성 및 세포의 초기 부착률을 증가시키고 조직 재생을 증진시킨다고 알려져 있다 [Rezwan K., Chen Q. Z., Blaker J. J and Boccaccini A. R., *Biomaterials*, **26**, 3413 (2006)]. 그래서 제작된 PCL 필름을 친수화시키기 위해 플로로탄닌으로 코팅한 다음, 코팅 전과 코팅 후의 표면 성질 변화를 관찰하기 위해 수분 접촉각(Water contact angle)을 측정하였다. 측정 방법은 제작된 필름 위에 접촉각 측정기를 통하여 10  $\mu$ l의 물방울을 접촉시킨 후 시간의 변화에 따라 물방울의 접촉각을 측정하였다.
- [0034] 그리고, 제작 후 플로로탄닌으로 코팅된 필름의 플로로탄닌 함유량을 알아보기 위해 FT-IR (Fourier-transform infrared) (model 6700;Nicolet, West Point, PA, U.S.A.) 테스트를 실시하였다.
- [0035] <실시예 3: 세포 배양>
- [0036] 본 발명에서 제안한 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 임프린팅 모사방법을 통해 제작된 PCL 필름의 세포활성 및 배양 특성을 알아보기 위해 조골-유사세포 (osteoblast-like-cells, MG-63)를  $1 \times 10^5$  Cell/Scaffold의 밀도로 시딩하여 인비트로 실험을 하였다. 세포의 생육배지로는 F-12K (ATCC)를, 10% 우태혈청 (FBS)과 1% 페니실린/스트렙타비딘 (penicilin/streptiavidin)을 첨가하여 사용하였으며, 제작된 PCL 필름을 절개하여 6x6x0.5 mm<sup>3</sup>에 세포를 각각 시딩하였다.
- [0037] 세포의 성장률은 MTT 분석을 이용하여 1, 3, 7일에 각각 측정하였으며, 배양 7일차의 시료들은 주사전자현미경 (SEM)을 통하여 세포의 성장 형태를 관찰하였다.
- [0038] 또한, 시간이 지남에 따라 조골-유사세포의 뼈 분화능을 확인하기 위하여 알리자린 레드(Alizarin Red, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)로 시료들을 염색하여 각각 7일차, 14일차에 관찰하였다.
- [0039] <결과 1: 음각 복제된 PDMS 표면>
- [0040] 도 2는 첫 번째 임프린팅 과정을 통해 제작된 음각화된 PDMS를 주사전자 현미경으로 다양한 배율에서 관찰한 결과이다. 연꽃잎의 돌출된 일정한 형상들이 경화된 PDMS 표면에 음각화되었음을 확인하였다. 특히, 도 2(b)의 기존 NIC (Normal Imprinting Casting) 방식으로 제작된 시료에 비해 도 2(c)처럼 FA-NIC (Field-Aided Micro/Nano Imprinting Casting)(1.8kV/mm, 100Hz) 방법으로 제작된 시료에서는 나노 크기의 구조까지도 세밀하게 모사되었음을 확인하였다. 전기장을 이용한 모사기법의 효과를 좀더 관찰하기 위해 원자력 현미경 (Atomic Force Microscopy)을 통해 표면 거칠기를 측정하였다. 도 2의 (d)와 (e)를 관찰하였을 때 전통적인 방식의 임프린팅에 비해 전기장을 가해진 임프린팅 기법으로 제조한 것이 더 세밀하게 모사되었음을 확인할 수 있었다.
- [0041] <결과 2: PDMS 몰드를 이용하여 양각 복제된 PCL 필름 표면>
- [0042] PCL을 사용하여 연꽃 잎의 표면을 모사한 필름을 제작하기 위해 첫 번째 임프린팅 과정에서 본 발명의 FA-NIC 방법을 통해 제작된 PDMS를 몰드로 사용하여 두 번째 임프린팅 과정을 수행하였다. 두 번째 임프린팅 과정 역시 첫 번째 임프린팅과 동일한 전기장 (1.8kV/mm, 100Hz)을 가해주었고, 이와 비교하기 위한 대조군으로 순수한 PCL 필름과 NIC 기법을 이용한 PCL 필름을 제작하였다.
- [0043] 도 2 (a)는 연꽃 잎의 표면을 관찰한 주사전자현미경 사진으로서, 수 마이크로에서 수 나노까지의 일관되고 복합적인 구조로 이루어져 있음을 확인하였다. 도 2 (f)는 대조군으로 제작된 순수 PCL 필름으로, 편평하게 제작되어 있음을 확인하였다. 도 2 (g)는 NIC로 제작된 필름의 표면 사진이고, 도 2 (e)는 본 발명의 FA-NIC로 제작된 필름의 표면 사진으로, 일반적인 방법으로 제작된 시료에 비해 본 발명의 FA-NIC 방법으로 제작된 시료가 연꽃 잎의 표면 형상에 더 유사하며 세밀하게 모사되었음을 확인하였다.

[0044] 본 발명의 FA-NIC 공정을 통해 제작된 PCL 필름의 모사된 정도를 판단하기 위해서 사진 관독만으로는 미흡하여 모사된 시료들의 표면 거칠기와 높이에 대한 수치 해석이 필요하였다. 도 3은 비접촉 표면 거칠기 측정기 (Nanoview-m4151p, Korea)를 통해 촬영한 연꽃 잎과 제작된 시료들의 3차원 사진이고, 그래프는 사진을 분석하여 얻어진 표면 거칠기와 높이 값을 산술 평균하여 도시한 그래프이다. 도 3 (e)는 연꽃 잎과 공정 조건에 따라 제작된 시료들의 표면의 평균 거칠기(Ra)와 모사된 높이(Rt)를 비교한 그래프이고, 도 3 (f)는 모사된 거칠기를 마이크로 구조와 나노 구조 부분으로 나누어 평균 거칠기를 비교한 그래프이다. 실제 연꽃 잎의 수치에는 미치지 못하였으나 공정 조건에 따른 차이는 뚜렷함을 확인할 수 있었으며 마이크로 구조와 나노 구조를 나누어 평균 거칠기 값을 산출하여 도시한 그래프 역시 비슷한 성향을 보임을 확인하였다.

[0045] <결과 3: FT-IR 결과>

[0046] 도 4는 플로로탄닌의 함량을 알아보기 위하여 FTIR (Fourier transform infrared) 분광기를 이용하여 측정하였다. 플로로탄닌은 주로 방향족 구조 ( $1700\text{ cm}^{-1} \sim 1500\text{ cm}^{-1}$ )로 이루어져 있다고 알려져 있다. 순수 플로로탄닌과 PCL을 비교했을 때 적외선 그래프에서 플로로탄닌은 방향족 이중결합 강도 범위인  $1612\text{ cm}^{-1}$  부근에서 피크가 관찰되었지만 PCL에서는  $1612\text{ cm}^{-1}$  부근의 피크가 관찰되지 않았다. 플로로탄닌으로 코팅된 PCL 필름의 적외선 그래프를 통하여  $1612\text{ cm}^{-1}$  피크가 관찰되므로, 코팅된 PCL 필름은 플로로탄닌을 함유하고 있다고 판단된다.

[0047] <결과 4: 복제된 PCL 필름 표면의 수분 접촉각>

[0048] 제작된 PCL 필름의 마이크로/나노 복합 구조물에 대한 접촉각을 측정하고, 시험군으로 제작된 순수 PCL 필름과 일반적인 임프린팅 방식으로 제작된 필름의 접촉각을 비교 분석하였다. 아울러 플로로탄닌의 코팅 전·후 표면 특성의 변화를 관찰하기 위해  $10\text{ }\mu\text{L}$ 의 물방울을 접촉시킨 후 2분까지의 접촉각을 관찰하였다. 도 5 (c)에서 보듯이 모사가 잘 된 마이크로/나노 복합구조의 시료에서 측정된 최대 접촉각은  $118^\circ$  로서, NIT로 제작된 (b)의 마이크로 단일 구조물에 비하여 접촉각이 최대  $16^\circ$ , 평균  $9.5^\circ$  증가하였으며 하단은 측정된 값을 평균하여 도시한 그래프이다. 플로로탄닌 코팅 전·후의 접촉각을 비교해 보았을 때 모든 샘플에서 플로로탄닌 코팅 후 친수의 성향을 보였고, 이는 코팅된 플로로탄닌의 수분흡수성에 기인함을 확인하였으며, (b)와 (c)의 접촉각이 (a)의 순수 PCL 필름에 비해 조금 더 큰 이유는 코팅 후에도 물방울이 표면 구조의 특성에 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다.

[0049] <결과 5: PCL 필름의 세포 상호작용>

[0050] 도 6은 전기장을 이용한 마이크로/나노구조 모사 기법(FA-NIC)을 통해 제작된 PCL 필름의 세포 배양 특성을 알아보기 위하여 조골-유사세포 MG63를 필름에 키운 결과이다. 도 6 (d)의 MTT 분석 7일차 결과를 통하여 대조군인 순수 PCL 필름과 전통적인 임프린팅 방법(NIC)으로 제작된 PCL 필름에 비해 FA-NIC기법으로 제작된 PCL 필름의 세포 증식이 향상되었으며, 특히 순수 PCL에 비해 세포의 증식률이 약 58% 정도 향상되었다.

[0051] 그리고, 본 발명자들은 시간이 지남에 따라 세포가 빠르게 분화되는 정도를 관찰하기 위해 알리자린 레드 (Alizarin red)로 시료들을 염색시켜 각각 7일차, 14일차에 관찰하였다. 도 7과 같이 골 미네랄화 (bone mineralization) 결과 역시 본 발명의 FA-NIC를 통해 제작된 PCL 필름에서 조골세포 분화가 더 많이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 조골세포를 시료에 접촉하고 그로부터 7일 후 각각의 표면에 붙은 세포의 형상을 주사 전자현미경을 통해 관찰하면 도 6과 같다. 도 6 (a)에서 보듯이 편평한 보통의 PCL 필름에서 세포를 키우면 납작하게 성장하면서 2차원적인 네트워크를 형성함을 관찰할 수 있다. 그리고 기존 NIC 기법으로 제작된 PCL 필름의 경우 세포가 약간 불룩한 형태로 자라며 세포 간의 네트워크에서는 순수 PCL 필름과 큰 차이를 보이지 않았다 {도 6 (d)}. 이에 비하여 FA-NIC 기법으로 제작된 마이크로/나노 구조가 있는 PCL 필름의 경우 세포가 3차원 구조를 중심으로 세포 간의 네트워크를 형성하며 성장 증식하였고, 눈에 띌 정도의 거동을 관찰하였다 {도 6 (g)}.

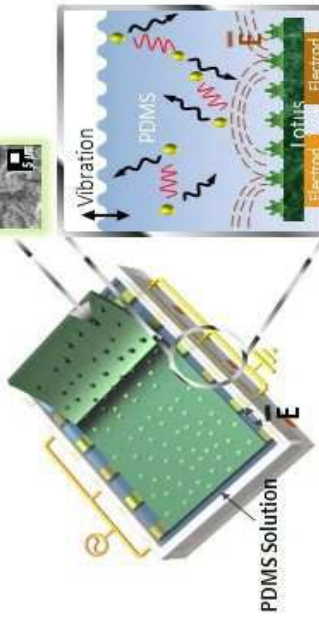
도면

도면1

(a) 1<sup>st</sup> casting

Temp : 50°C

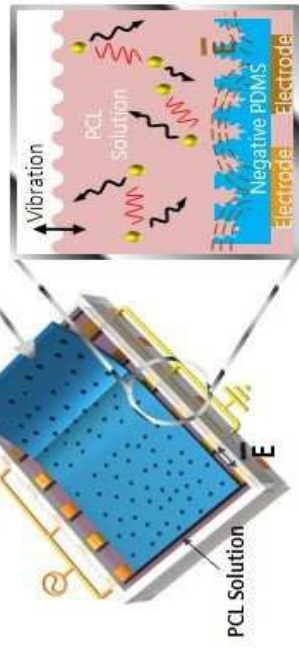
Replicated  
leaf



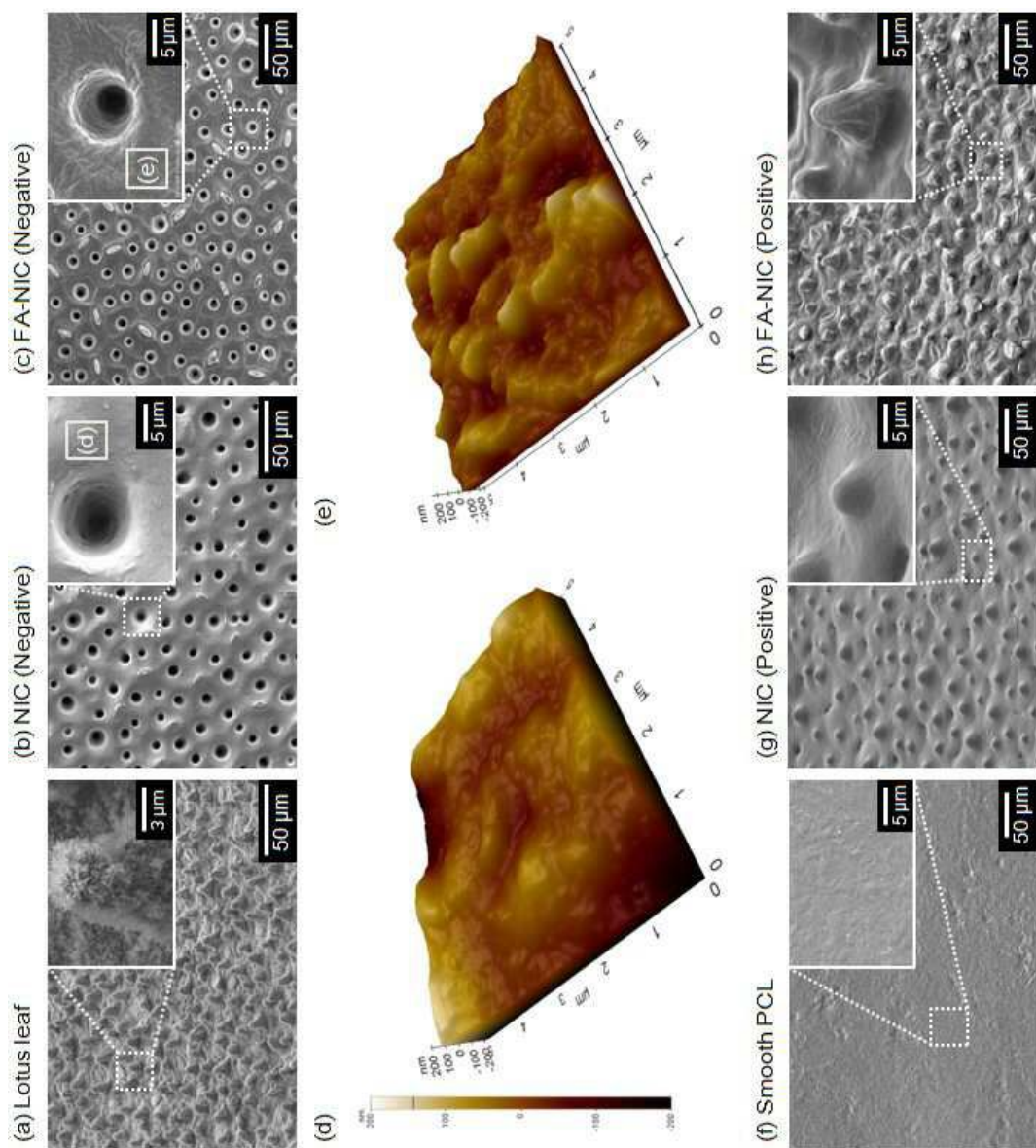
(b) 2<sup>nd</sup> casting

Temp : 75°C

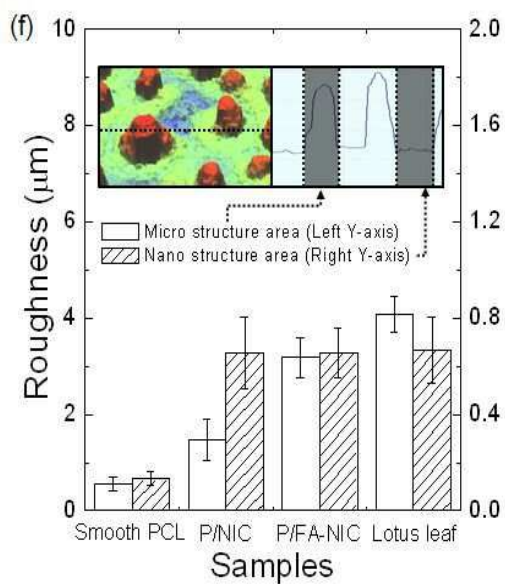
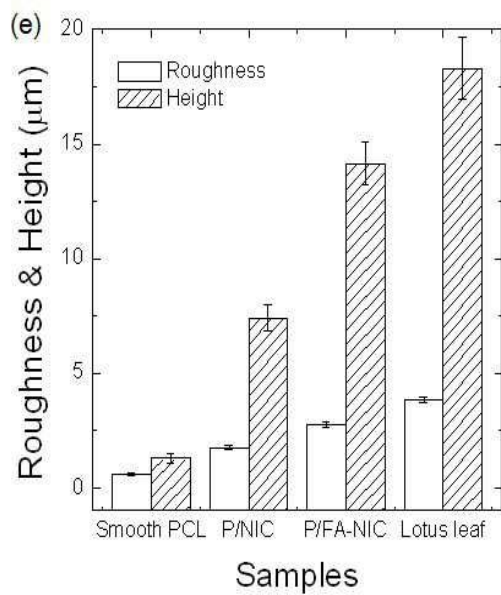
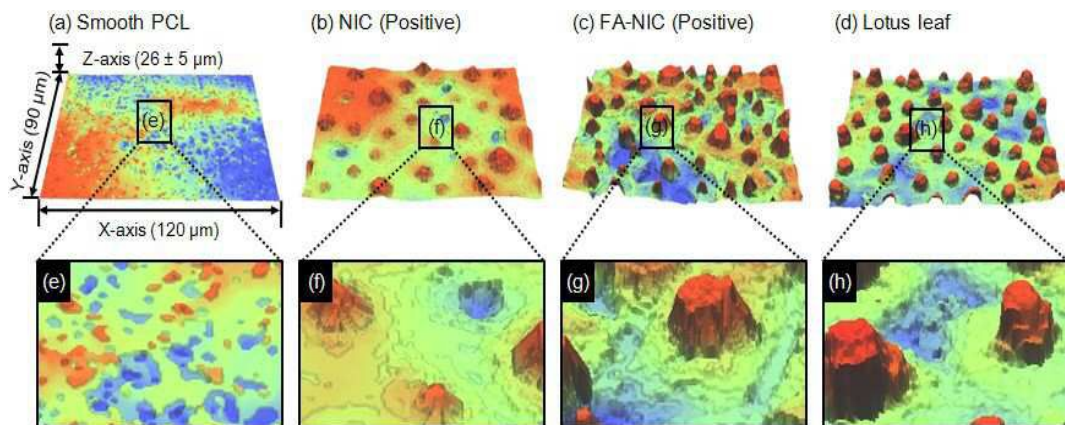
Replicated PDMS



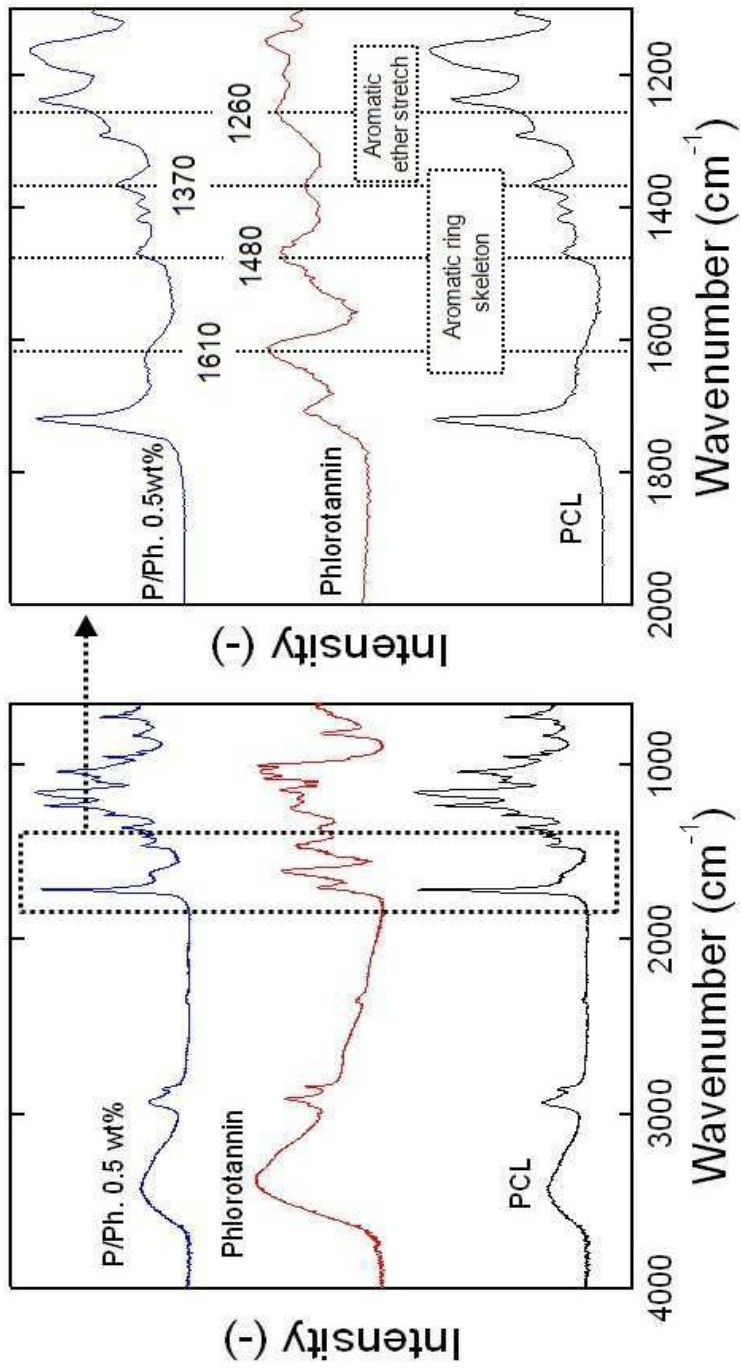
도면2



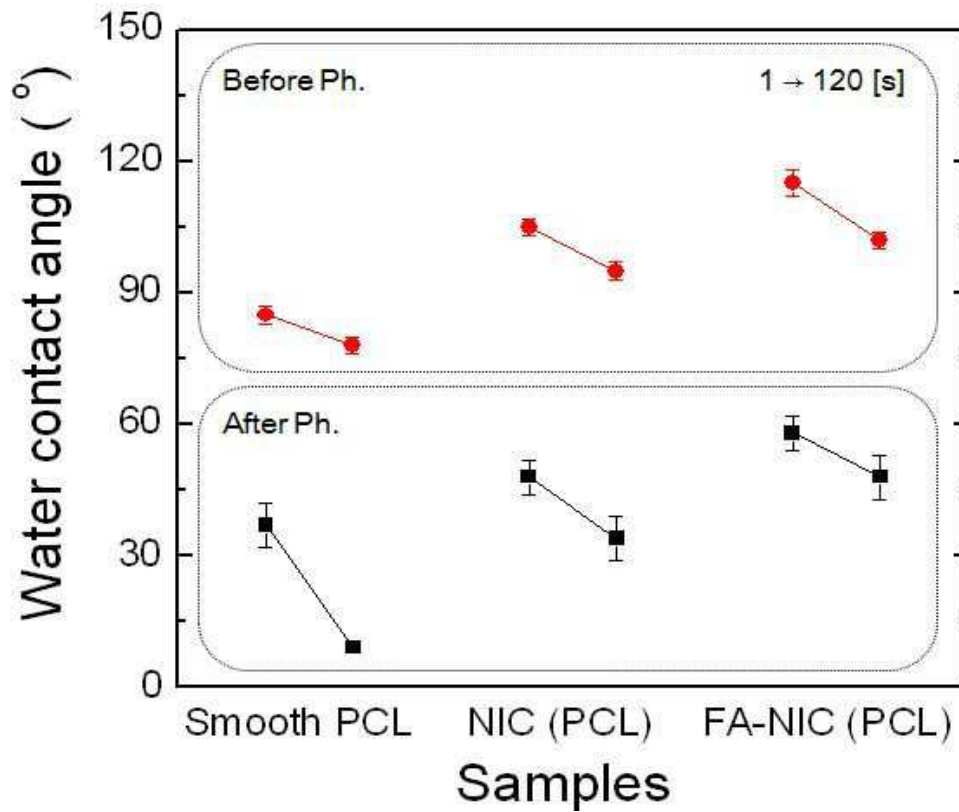
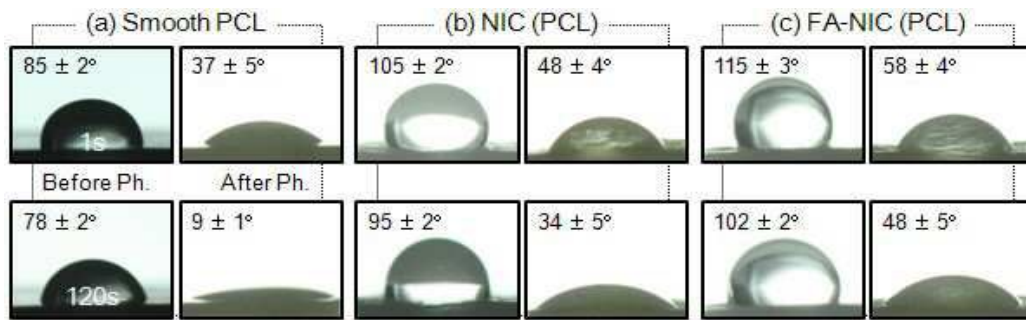
도면3



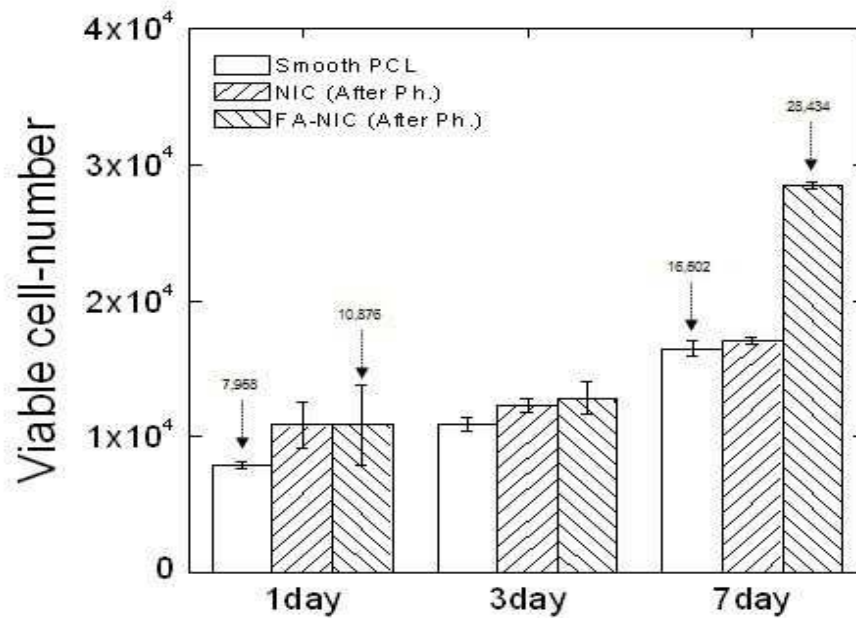
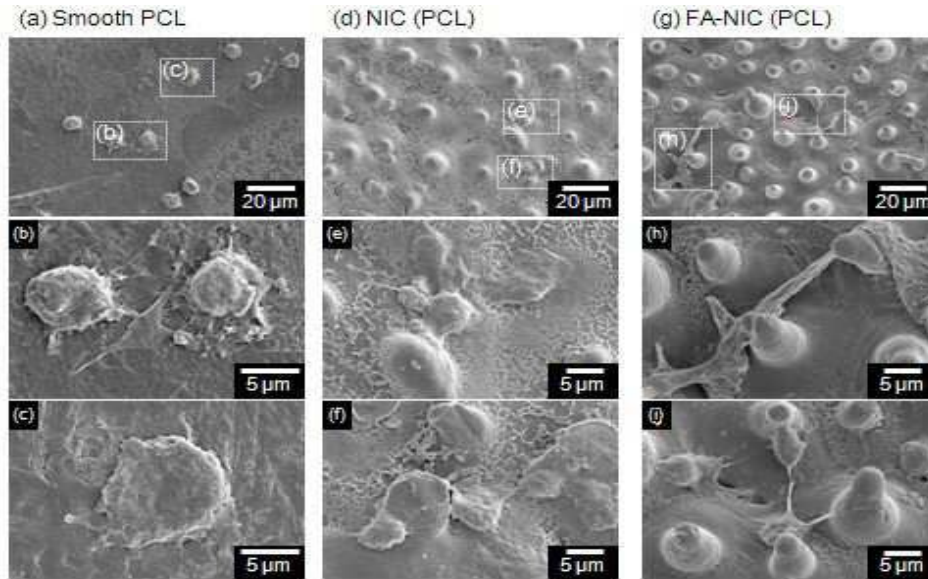
도면4



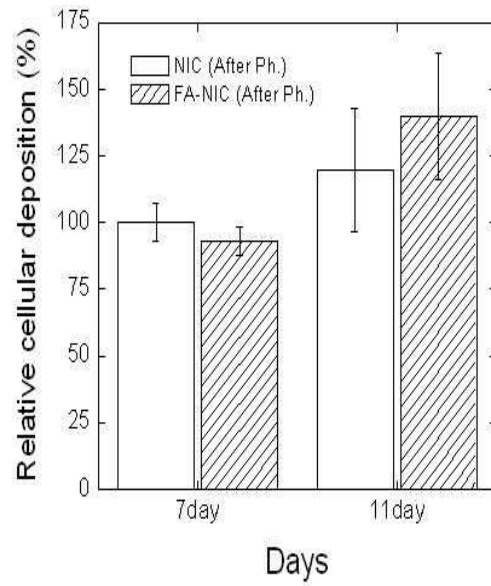
도면5



도면6



도면7



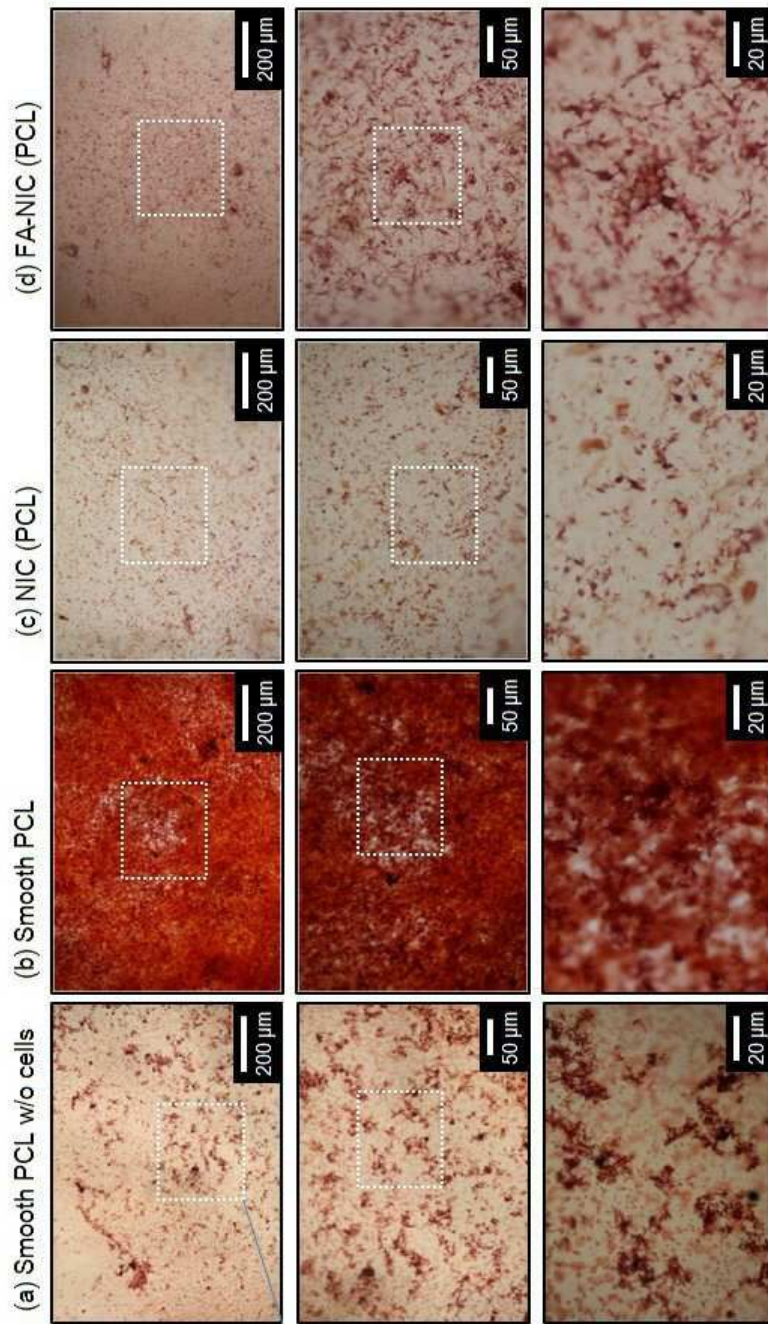
| BONE/BCA 7일차 |       |       |       |       |       |       |       |       | AVE   | STD   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PCL          | 0.419 | 0.442 | 0.527 | 0.814 | 0.411 | 0.364 | 0.682 | 0.403 | 0.508 | 0.159 |
| NIC          | 0.321 | 0.455 | 0.375 | 0.375 | 0.348 | 0.321 | 0.334 | 0.321 | 0.342 | 0.024 |
| FA-NIC       | 0.321 | 0.310 | 0.310 | 0.393 | 0.310 | 0.298 | 0.321 | 0.357 | 0.318 | 0.019 |

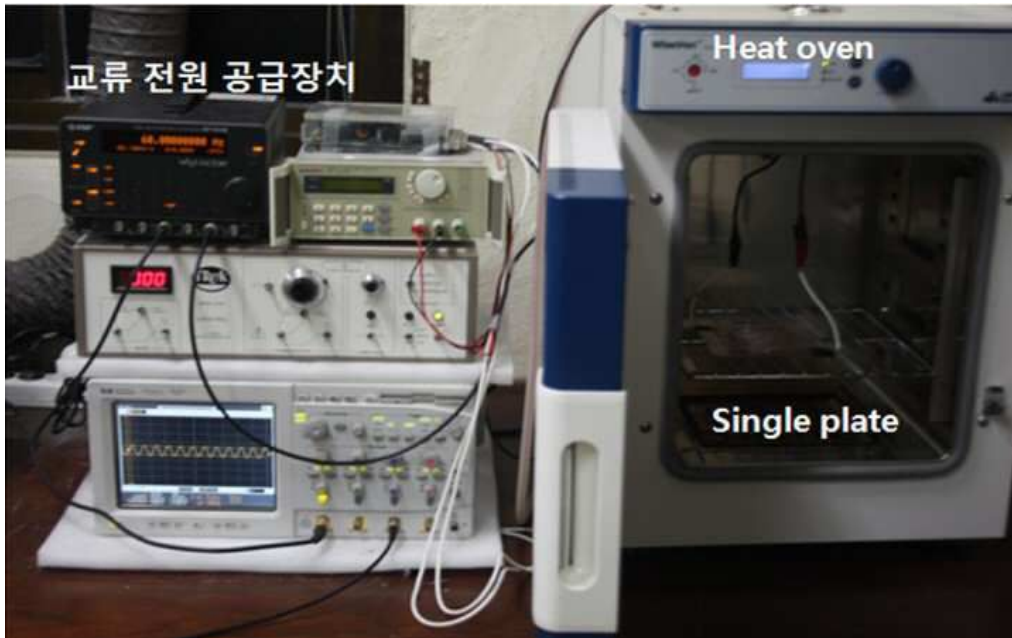
| BONE/BCA 11일차 |       |       |       |       |       |       |       |       | AVE   | STD   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PCL           | 0.943 | 0.567 | 0.093 | 0.674 | 0.184 | 0.782 | 0.858 | 1.042 | 0.643 | 0.323 |
| NIC           | 0.345 | 0.524 | 0.345 | 0.441 | 1.048 | 0.455 | 0.303 | 0.455 | 0.41  | 0.08  |
| FA-NIC        | 1.020 | 0.416 | 0.403 | 0.403 | 0.537 | 0.523 | 1.114 | 0.591 | 0.479 | 0.082 |

도면8

Bone 11 일차



도면9



도면10

