(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0083073
(43) 공개일자 2022년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B25J 9/00 (2006.01) *B25J 9/10* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
B25J 9/0012 (2013.01)
B25J 9/1075 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0172943
(22) 출원일자 2020년12월11일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103동 603호
최진하
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 115동 801호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

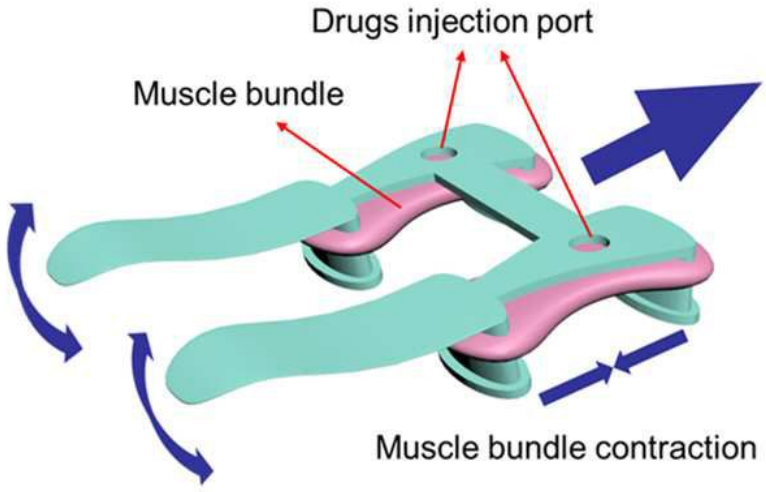
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **근육번들의 제조방법 및 이를 이용한 바이오하이브리드 로봇**

(57) 요 약

본 발명은 근육번들의 제조방법 및 이를 이용한 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)에 관한 것으로서, 상기 근육번들은 금-히얄루로닉산 나노입자로 인하여 전기전도도가 향상되고 세포의 생리활성도가 높으므로, 이를 효과적으로 바이오하이브리드 로봇에 적용하여 근육 질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C12N 5/0658 (2013.01)
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
C12N 2533/10 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2533/80 (2013.01)

(72) 발명자
김동연
서울특별시 노원구 섬밭로 265, 7동 402호

신민규
경기도 파주시 후곡로 50, 403동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711108724
과제번호 2019R1A2C3002300
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 뇌어셈블로이드 기반 생명체 모방 센싱 기능 바이오하이브리드 로봇
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312114
과제번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

판형의 지지대, 및 지지대의 일 말단이 길이방향으로 연장되어 형성된 노를 포함하는 추진부; 및

지지대의 길이방향으로 이격되어 지지대 아래에 수직으로 나란히 구비된 1쌍의 기둥, 및 1쌍의 기둥을 둘러싸는 근육번들을 포함하는 구동부;

로 이루어진 이동 유닛을 2개 이상 포함하고,

서로 평행한 2개 이상의 이동 유닛의 지지대를 서로 연결하는 연결부를 추가적으로 포함하는 것인,

바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot).

청구항 2

제1항에 있어서, 추진부는 상하 방향으로 휘어질 수 있는 탄성 소재로 구현된 것인, 바이오하이브리드 로봇.

청구항 3

제2항에 있어서, 탄성 소재는 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS), 실리콘 및 고무로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 바이오하이브리드 로봇.

청구항 4

제1항에 있어서, 지지대는 약물 주입구가 구비된 것인, 바이오하이브리드 로봇.

청구항 5

제1항에 있어서, 근육번들은 히알루로닉산이 고정화된 금 나노입자 및 근육세포를 배양하여 제조된 것인, 바이오하이브리드 로봇.

청구항 6

제5항에 있어서, 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것인, 바이오하이브리드 로봇.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 근육번들의 제조방법:

금 나노입자를 히알루로닉산으로 코팅하는 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계; 및

금-히알루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육 분화 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것인, 근육번들의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 근육 분화 단계는 5 내지 10일 동안 수행되는 것인, 근육번들의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 근육 세포는 근관세포인 것인, 근육번들의 제조방법.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법:

금 나노입자를 히알루로닉산으로 코팅하는 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계;

금-히알루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육번들 제조 단계;

근육번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

후보 물질을 접촉시킨 근육번들에서의 전기자극에 의한 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육번들과 비교하는 약물 평가 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계는 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 히알루로닉산을 금 나노입자에 고정화시키는 것인, 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 근육번들 제조 단계는 5 내지 10일 동안 수행되는 것인, 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 근육 세포는 근관세포인 것인, 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 근육번들의 제조방법 및 이를 이용한 바이오하이브리드 로봇에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 히알루로닉산이 고정화된 금 나노입자 및 근육세포를 배양하여 근육번들을 제조하고, 상기 근육번들이 전기자극에 의하여 수축하는 성질을 이용하여 바이오하이브리드 로봇을 제조함으로써 이를 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝에 활용하는 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전통적인 의미의 산업용 로봇은 주로 금속으로 구성되어 있으며 이는 관절과 다리의 움직임을 정교한 프로그램에 의해 제어하는 특징을 가지고 있다. 따라서, 프로그램의 오류로 인하여 오작동하거나, 사람에게 위해를 가할 수 있다는 단점이 있다. 반면에, 최근 연구가 집중되고 있는 소프트 로봇(soft robot)은 치밀한 컴퓨팅 연산을 요구하기 보다는 훨씬 유연하고 탄력성 있는 재료를 활용하면서 주변 환경에 적응할 수 있는 특성이 있다. 따라서, 불확실성이 높은 일상적인 환경에서 기존 산업용 로봇에 비해 사용될 여지가 높다.

[0003] 소프트 로봇은 주로 유연하고 부드러운 고분자나 섬유 소재로 구성되며, 구동 방식은 유압. 전기, 열, 빛 등 다양하게 존재한다. 예를 들어, 노인들을 간병해야 하는 간병로봇, 인체의 질병을 치료하기 위한 수술용 의료 로봇, 인명구조활동에 필요한 재난구조용 로봇, 인간과 공동작업을 수행하는 로봇 등 다양한 분야에서 소프트 로봇의 수요가 높다. 그러나, 소프트로봇은 생체물질로 구성되어 있지 않다는 한계점으로 인해 일상적인 환경에서 완벽하게 인간을 모방하고 대체할 수 없다는 한계를 지니고 있다.

[0004] 이와 같은 소프트 로봇이 보유하고 있는 문제점을 극복하기 위하여 생체모방기술 기반의 세포로 구성된 바이오로봇 혹은 생체조직과 소프트 물질, 무기물로 구성된 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)에 대한 연구가 진행되고 있다. 바이오하이브리드 로봇은 생체조직을 직접 추출하거나, 세포를 이용해 생체조직을 만들어서 구동하며, 다양한 고분자 및 유,무기 재료들이 결합되어 제작된다. 대표적으로 2016년에 본 발명자 연구팀이 소속된 서강-하버드 질병 바이오물리 연구센터 연구진은 전기없이 생체조직으로 움직이는 생체세포와 무기물이 결합한 가오리 형태의 로봇을 개발하였다.

[0005] 바이오하이브리드 로봇의 구동 원리는 빛의 자극에 반응하도록 조작한 근육세포를 바이오하이브리드 로봇 위에 분화시키고, 근육이 빛의 빈도 등에 따라 수축-이완하게 함으로써 로봇이 움직이는 것이다. 이와 같은 바이오하

이브리드 로봇은 생체조직과 기계가 결합된 바이오 로봇의 가능성을 보여주며, 향후 인공 지능 기술과 결합하여 인간과 같은 로봇의 개발로 확장될 수 있을 것으로 전망된다.

[0006] 하이드로젤은 3차원 체외 세포 배양을 가능하게 해 주는 물질로써, 세포에게 인체와 유사한 3차원 환경을 제공하여 인체 유사 모델 제작이 가능하게 한다는 장점이 있다. 이를 이용하여 근육세포로 구성된 바이오 액츄에이터에 대한 연구결과가 발표되었으나, 구동력이 약하다는 한계점이 있다.

[0007] 금 나노입자와 히얄루로닉산은 각각 근육의 분화를 향상시키고, 하이드로젤의 수분 손실을 최소화하여 근육세포의 분화를 향상시키는 장점이 있다. 또한 금 나노입자는 하이드로젤 내의 전기전도도를 향상시켜, 전기자극으로 인한 근육의 움직임을 증가시킬 수 있어 구동력을 개선할 수 있다는 점에서 활용가능성이 높다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 근육세포를 3차원 구조로 분화하여 근육번들을 제조함에 있어서, 금-히얄루로닉산 나노입자로 인하여 전기전도도가 향상되고 세포의 생리활성도를 높임으로써, 이를 이용하여 제조된 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)에서 움직임이 향상됨으로 인하여 구동력이 강화된 것을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 판형의 지지대, 및 지지대의 일 말단이 길이방향으로 연장되어 형성된 노를 포함하는 추진부; 및

[0010] 지지대의 길이방향으로 이격되어 지지대 아래에 수직으로 나란히 구비된 1쌍의 기둥, 및 1쌍의 기둥을 둘러싸는 근육번들을 포함하는 구동부;

[0011] 로 이루어진 이동 유닛을 2개 이상 포함하고,

[0012] 서로 평행한 2개 이상의 이동 유닛의 지지대를 서로 연결하는 연결부를 추가적으로 포함하는 것인,

[0013] 바이오하이브리드 로봇을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 근육번들의 제조방법을 제공하는 것이다:

[0015] 금 나노입자를 히얄루로닉산으로 코팅하는 금-히얄루로닉산 나노입자 생성 단계; 및

[0016] 금-히얄루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육 분화 단계.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0018] 금 나노입자를 히얄루로닉산으로 코팅하는 금-히얄루로닉산 나노입자 생성 단계;

[0019] 금-히얄루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육번들 제조 단계;

[0020] 근육번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

[0021] 후보 물질을 접촉시킨 근육번들에서의 전기자극에 의한 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육번들과 비교하는 약물 평가 단계.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 히얄루로닉산이 고정화된 금 나노입자 및 근육세포를 배양하여 제조된 근육번들을 이용하는, 바이오하이브리드 로봇의 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명은 근육번들의 제조방법 및 이를 이용한 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)에 관한 것으로, 본 발명에 따른 바이오하이브리드 로봇은 움직임이 향상됨으로 인하여 구동력이 강화된다.

[0024] 본 발명자들은 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 히얄루로닉산을 금 나노입자에 고정화시킨 금-히얄루로닉산 나노입자를 제조하고, 이를 근육세포와 배양하여 전기전도도가 향상되고 세포의 생리활성도를 높인 근육번들을 제조하여 바이오하이브리드 로봇에 적용함으로써 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 용도로 사용할 수 있음을 제시하였다.

[0025] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0026] 본 발명의 일 양태는 판형의 지지대, 및 지지대의 일 말단이 길이방향으로 연장되어 형성된 노를 포함하는 추진부; 및

[0027] 지지대의 길이방향으로 이격되어 지지대 아래에 수직으로 나란히 구비된 1쌍의 기둥, 및 1쌍의 기둥을 둘러싸는 근육번들을 포함하는 구동부;

[0028] 로 이루어진 이동 유닛을 2개 이상 포함하고,

[0029] 서로 평행한 2개 이상의 이동 유닛의 지지대를 서로 연결하는 연결부를 추가적으로 포함하는 것인,

[0030] 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)이다.

[0031] 본 발명에 있어서 추진부는 상하 방향으로 휘어질 수 있는 탄성 소재로 구현된 것일 수 있다.

[0032] 상기 탄성 소재는 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS), 실리콘 및 고무로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0033] 상기 추진부에서 지지대는 약물 주입구가 구비된 것일 수 있다. 지지대의 위쪽 방향에서 약물이 주입되는 경우, 약물이 약물 주입구를 통과하여 지지대 아래에 구비된 1쌍의 기둥을 둘러싸는 근육번들에 접촉될 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서 근육번들은 히알루로닉산이 고정화된 금 나노입자 및 근육세포를 배양하여 제조된 것일 수 있다.

[0035] 상기 근육 세포는 근관세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 화학링커는 티올기 및 아민기를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학링커는 시스테아민(cysteamine)인 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에서, 화학링커의 티올기는 금 나노입자와 티올-금 반응을 일으키고, 아민기는 히알루로닉산과 아민-카복실산 반응을 일으킴으로써 히알루로닉산이 금 나노입자 표면에 코팅되는 것일 수 있다.

[0038] 상기 구동부에서 근육번들이 지지대 아래에 수직으로 구비된 1쌍의 기둥을 둘러싸는 방식에 있어서, 1쌍의 기둥을 바깥에서 크게 도는 하나의 고리 모양으로 둘러싸는 방식일 수 있다.

[0039] 근육번들이 자극에 의해 수축 작용을 수행하는 경우, 상기 근육번들이 둘러싸고 있는 1쌍의 기둥에는 서로 가까워지는 방향으로 힘이 가해질 수 있다. 1쌍의 기둥에 가해진 힘은 추진부로 전달되면서 힘의 방향이 상하 방향으로 전환되므로, 지지대로부터 전달받은 상하 방향의 힘에 의하여 지지대의 길이방향으로 연장된 노가 상하 방향으로 휘어지게 된다. 노의 움직임에 의하여 유닛에는 노의 반대 방향으로 이동하려는 힘이 가해지므로, 결과적으로 바이오하이브리드 로봇이 노의 반대 방향으로 이동할 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 근육번들의 제조방법이다:

[0041] 금 나노입자를 히알루로닉산으로 코팅하는 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계; 및

[0042] 금-히알루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육 분화 단계.

[0043] 본 발명에 있어서 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것일 수 있다.

[0044] 상기 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 화학링커는 티올기 및 아민기를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학링커는 시스테아민(cysteamine)인 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 구현예에서, 화학링커의 티올기는 금 나노입자와 티올-금 반응을 일으키고, 아민기는 히알루로닉산과 아민-카복실산 반응을 일으킴으로써 히알루로닉산이 금 나노입자 표면에 코팅되는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서 근육 분화 단계는 5 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 있어서 근육 분화 단계는 금-히알루로닉산 나노입자 및 근육세포에 마트리겔, 피브로넥틴, 트롬빈 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 첨가하여 수행되는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서 근육 세포는 근관세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법이다:

[0050] 금 나노입자를 히알루로닉산으로 코팅하는 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계;

[0051] 금-히알루로닉산 나노입자 및 근육세포를 배양하는 근육번들 제조 단계;

[0052] 근육번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

[0053] 후보 물질을 접촉시킨 근육번들에서의 전기자극에 의한 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육번들과 비교하는 약물 평가 단계.

[0054] 본 발명에 있어서 금-히알루로닉산 나노입자 생성 단계는 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 히알루로닉산을 금 나노입자에 고정화시키는 것일 수 있다.

[0055] 상기 히알루로닉산은 이에 결합한 티올기 또는 아민기를 포함하는 화학링커를 통하여 금 나노입자에 고정화되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 화학링커는 티올기 및 아민기를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학링커는 시스테아민(cysteamine)인 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 구현예에서, 화학링커의 티올기는 금 나노입자와 티올-금 반응을 일으키고, 아민기는 히알루로닉산과 아민-카복실산 반응을 일으킴으로써 히알루로닉산이 금 나노입자 표면에 코팅되는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서 근육번들 제조 단계는 5 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에 있어서 근육 번들 제조 단계는 마트리겔, 피브로넥틴, 트롬빈 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 첨가하여 수행되는 것일 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서 근육 세포는 근관세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에 있어서 약물 평가 단계는 후보 물질을 접촉시킨 근육번들의 수축 정도가 강화될 경우 후보 물질이 근육의 수축 기능을 강화 또는 보완하는 효과가 있다는 판단이 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명은 근육번들의 제조방법 및 이를 이용한 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)에 관한 것으로서, 상기 근육번들은 금-히알루로닉산 나노입자로 인하여 전기전도도가 향상되고 세포의 생리활성도가 높으므로, 이를 효과적으로 바이오하이브리드 로봇에 적용하여 근육 질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1a는 본 발명의 실시예에 따른 금 나노입자(Au nanoparticles; AuNPs)에 히알루로닉산(Hyaluronic acid; HA)을 고정화하여 금-히알루로닉산 나노입자(HA-AuNPs)를 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 1b는 본 발명의 실시예에 따른 금-히알루로닉산 나노입자의 형태학적인 확인 결과를 보여주는 분광분석 결과 그래프이다.

도 1c는 본 발명의 실시예에 따른 금-히알루로닉산 나노입자의 형태학적인 확인 결과를 보여주는 주사전자현미경(transmission electron microscope; TEM) 이미지이다.

도 2a는 본 발명의 실시예에 따른 금-히알루로닉산 나노입자 기반의 3차원 근육번들의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2b는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 근육번들을 나타낸 사진이다.

도 2c는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 근육번들에 대하여 근육 분화 마커로 근섬유 분화 정도를 확인한 면역염색 결과 사진이다.

도 3a는 본 발명의 실시예에 따라 제작된 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)의 모식도이다.

도 3b는 본 발명의 실시예에 따라 제작된 바이오하이브리드 로봇의 사진이다.

도 3c는 본 발명의 실시예에 따라 제작된 바이오하이브리드 로봇의 90초 동안의 움직임을 나타낸 비교 사진이다.

도 3d는 본 발명의 실시예에 따라 제작된 바이오하이브리드 로봇에서 금-히알루로닉산 나노입자 유무에 따른 움직임 거리를 나타낸 그래프이다.

도 3e는 본 발명의 실시예에 따라 제작된 바이오하이브리드 로봇에서 금-히알루로닉산 나노입자 유무에 따른 움직임 속도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0066] **실시예 1: 금-히알루로닉산 나노입자 제작 및 확인**

[0067] 3차원 근육번들 제작시에 사용하는 하이드로젤에서 전기전도도 및 근육세포 분화도의 향상을 위해 금-히알루로닉산 나노입자를 제작하였다. 금 나노입자(Au nanoparticles; AuNPs)(BBInternational)는 20 nm 크기로 준비하였다.

[0068] 도 1a과 같이 금 나노입자에 히알루로닉산(Hyaluronic acid; HA)을 고정화하였다. 금 나노입자 표면과 히알루로닉산을 반응시킬 수 있는 화학링커로서는 티올(thiol) 기와 아민(amine) 기가 양쪽 끝에 존재하는 시스테아민(cysteamine)을 사용하였다. 아민-카복실산(Amine-carboxyl acid)의 특이적인 반응을 이용하여 히알루로닉산과 시스테아민을 붙였으며, 티올-금의 특이적인 반응을 이용하여 금 나노입자 표면에 시스테아민을 고정화하여 히알루로닉산을 금 나노입자 표면에 코팅하였다.

[0069] 구체적으로, 100 mg의 히알루로닉산과 60 mg의 시스테아민을 0.1M 보릭산 (Boric acid) 10 mL에 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 200 mM $NaBH_3CN$ 용액을 첨가하고, 40℃에서 5일 동안 반응시켰다. 시스테아민이 결합된 히알루로닉산이 금 표면에 잘 붙게 하기 위해 100 mM DTT 용액을 첨가하여 자유 티올(free thiol)을 생성하였으며, 이에 OD(optical density)= 1의 20 nm 금 나노입자 1 ml(7×10^{11})을 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다.

[0070] 제작된 금-히알루로닉산 나노입자(HA-AuNPs)를 분리하기 위해 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm으로 60분간 분리해서 반응하지 않은 히알루로닉산과 분리하였다. 이와 같은 과정을 3회 정도 반복하여 원심분리기를 통한 세척(washing)을 진행함으로써 반응하지 않은 히알루로닉산과 금-히알루로닉산 나노입자를 분리하였다.

[0071] 히알루로닉산이 금 나노입자 표면에 고정화되었는지 알아보기 위해, 반응 전과 반응 후 금 나노입자의 흡광도 스펙트럼(absorbance spectrum)을 분광광도계(UV/Vis spectrometer)로 측정하였다.

[0072] 도 1b에서 확인할 수 있듯이, 금 나노입자의 플라스몬(plasmonic) 특성에 의하여 금-히알루로닉산 나노입자의 흡광도 피크(absorbance peak)가 금 나노입자 대비 오른쪽으로 이동하였다.

[0073] 또한, 반응 후 금 나노입자에 대한 형태학(morphology)적인 확인을 위하여 주사전자현미경(transmission electron microscopy; TEM)으로 관찰한 이미지를 확인하였다.

[0074] 도 1c에서 확인할 수 있듯이, TEM 이미지 상에서 금 나노입자 표면에 코팅된 히알루로닉산을 직접적으로 확인하였다.

[0076] **실시예 2: 3차원 근육번들 제작**

[0077] 도 2a와 같이 바이오하이브리드 로봇의 움직임을 담당하는 3차원 근육번들을 제작하기 위해 근육세포 중 하나인 C2C12를 사용하였다. 3차원 근육번들은 200 μL의 C2C12(1×10^7), 300 μL의 마트리겔(Matrigel), 250 μL의 16 mg/ml 피브로넥틴(fibronectin), 10 μL의 트롬빈(thrombin)(0.5 U/1 mg의 피브리노겐(Fibrionogen)), 190 μL 금-히알루로닉산 나노입자(3 nM)의 혼합물질을 이용하여 제조하였다.

[0078] 구체적으로, 미리 3D 프린터를 이용하여 PDMS(polydimethylsiloane)로 만든 근육번들용 틀 위에 C2C12 세포와 금-히알루로닉산 나노입자를 포함하는 상기 혼합물질을 넣고, 근육세포 분화용 세포 배양액(DMEM containing 2%

horse serum, 1 mg/mL of Aminocaproic acid(ACA), 1 ng/mL of Insulin growth factor-1(IGF-1), and antibiotics)을 넣어주었다. 2일에 한 번씩 배양액을 갈아주고, 7일 이후부터 바이오하이브리드 로봇에 결합하여 사용하였다.

[0079] 도 2b에서 확인할 수 있듯이, 근육번들 제작을 위한 틀을 준비하여 이로부터 근육번들을 제조하였고, 제작된 근육번들의 광학 이미지를 얻어 그 모양을 확인하였으며, 결과적으로 3차원 근육번들이 성공적으로 제작되었다.

[0080] 또한, 제작된 근육번들 내의 근육세포 분화를 확인하고자 분화 마커인 α-액티닌(α-actinin) 및 트로포닌-T(troponin-T)를 이용하여 면역염색(anti-α-액티닌(α-actinin) 및 anti- 트로포닌-T(troponin-T))을 실시하였다.

[0081] 도 2c에서 확인할 수 있듯이, 근육번들 내에서 근섬유가 잘 분화된 것이 확연하게 나타났다.

[0083] **실시예 3: 바이오하이브리드 로봇 제작 및 구동 확인**

[0084] 도 3a와 같이, 바이오하이브리드 로봇(Biohybrid Robot)은 근육번들이 결합할 수 있는 두 개의 구동부로 구성되어 있으며, 로봇의 몸체는 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS)으로 제작되었다. 제작된 바이오하이브리드 로봇의 크기는 길이가 27.5 ㎜이며, 높이가 3 ㎜이다.

[0085] 구체적으로, 근육번들을 걸 수 있는 두 개의 기둥이 쌍으로 오른쪽과 왼쪽에 있으며, 이는 근육번들의 수축과 이완을 로봇의 추진력으로 전환시켜 줄 수 있다. 이로 인해 로봇 뒤쪽에 위치한 두 개의 노를 위, 아래로 움직여 추진력을 얻는다.

[0086] 제작된 바이오하이브리드 로봇의 움직임을 확인하기 위해 10 V. 1 Hz의 전기자극을 가해서 움직임을 유도하였다.

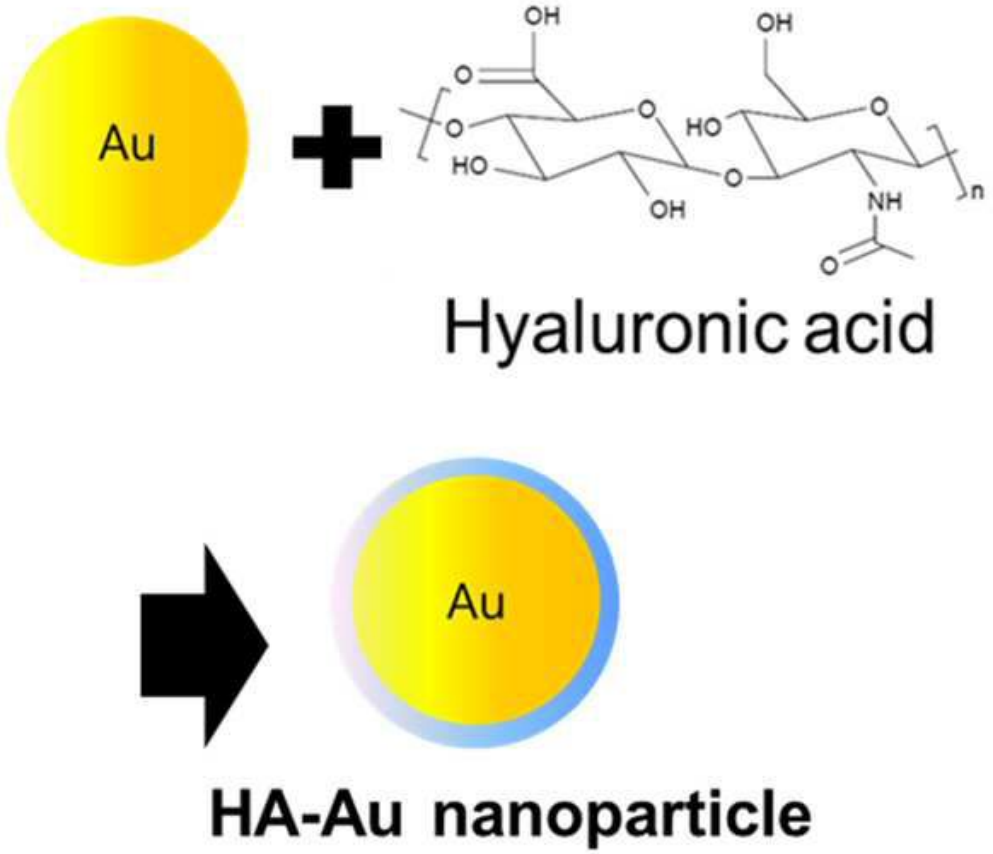
[0087] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 그 결과 바이오하이브리드 로봇이 90초 동안 대략 1.2 ㎜ 정도 전진하는 것을 확인하였다.

[0088] 또한, 금-히얄루로닉산 나노입자의 구동력 강화 효과를 확인하기 위해 금-히얄루로닉산 나노입자 유무에 따른 60초 동안의 바이오하이브리드 로봇의 움직임을 수치화하여 비교하였다.

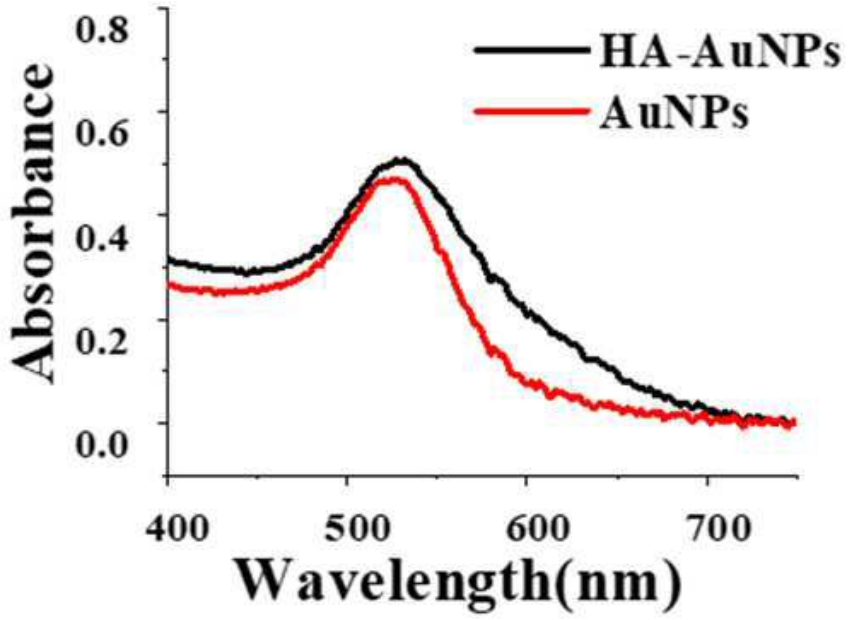
[0089] 도 3d 및 3e에서 확인할 수 있듯이, 금-히얄루로닉산 나노입자를 사용한 바이오하이브리드 로봇은, 금-히얄루로닉산 나노입자를 포함하지 않은 바이오하이브리드 로봇 대비 움직임 거리뿐만 아니라 움직임 시의 속도 또한 1 ㎜/min에서 2 ㎜/min으로 대략 2배 정도 증가하였다. 이에 따라 금-히얄루로닉산 나노입자에 의하여 바이오하이브리드 로봇에서 움직임 강화 효과가 유도됨을 입증하였다.

도면

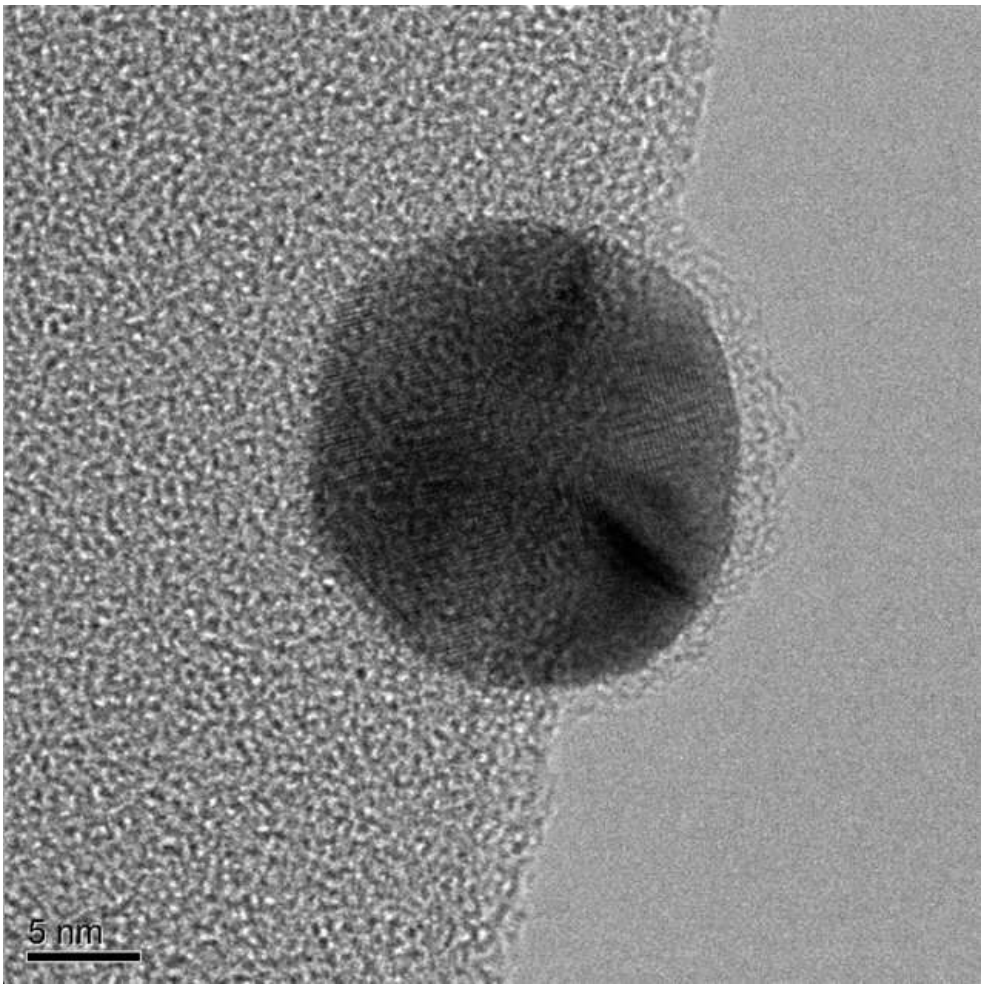
도면1a


Au
OH
O
HO
OH
NH
n
Hyaluronic acid
Au
HA-Au nanoparticle

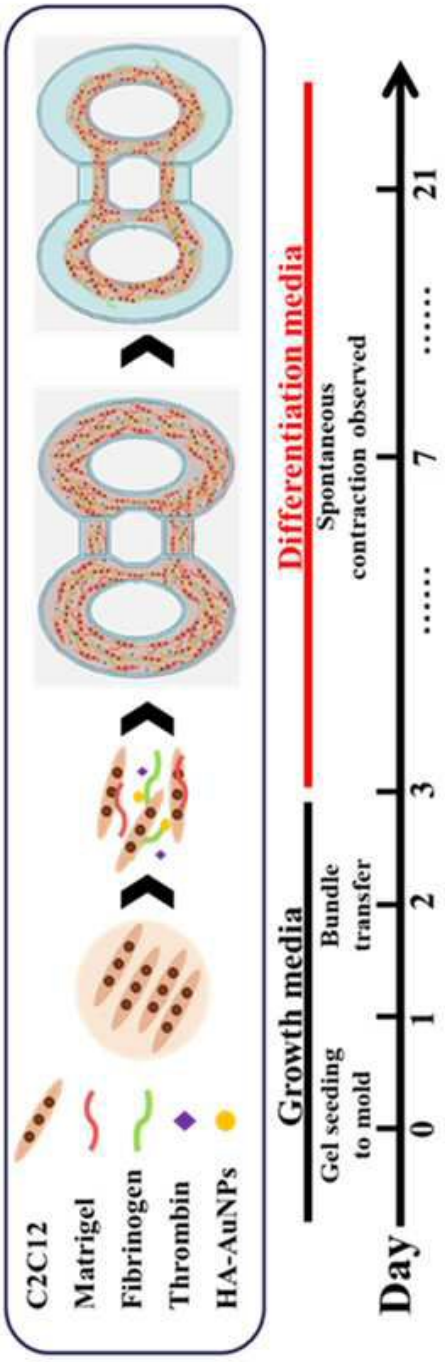
도면1b


Absorbance
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
HA-AuNPs
AuNPs
400
500
600
700
Wavelength(nm)

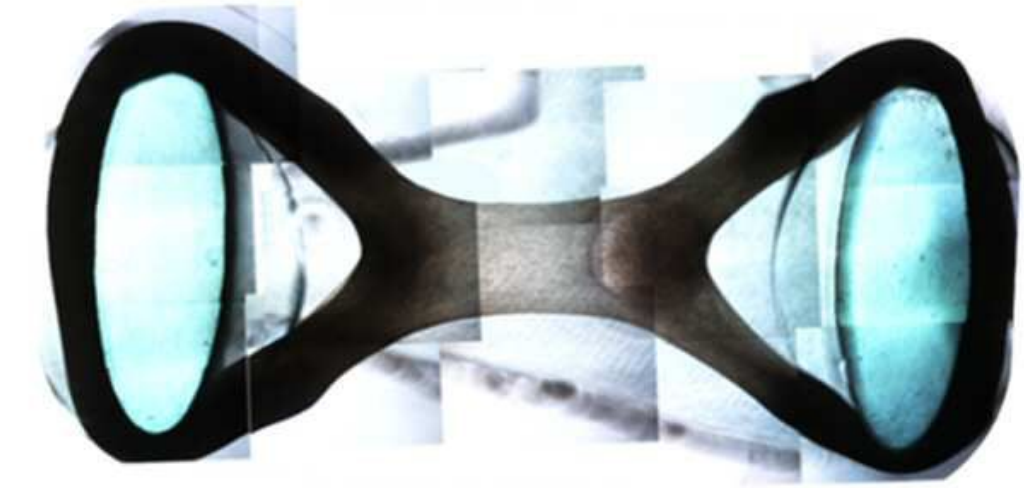
도면1c



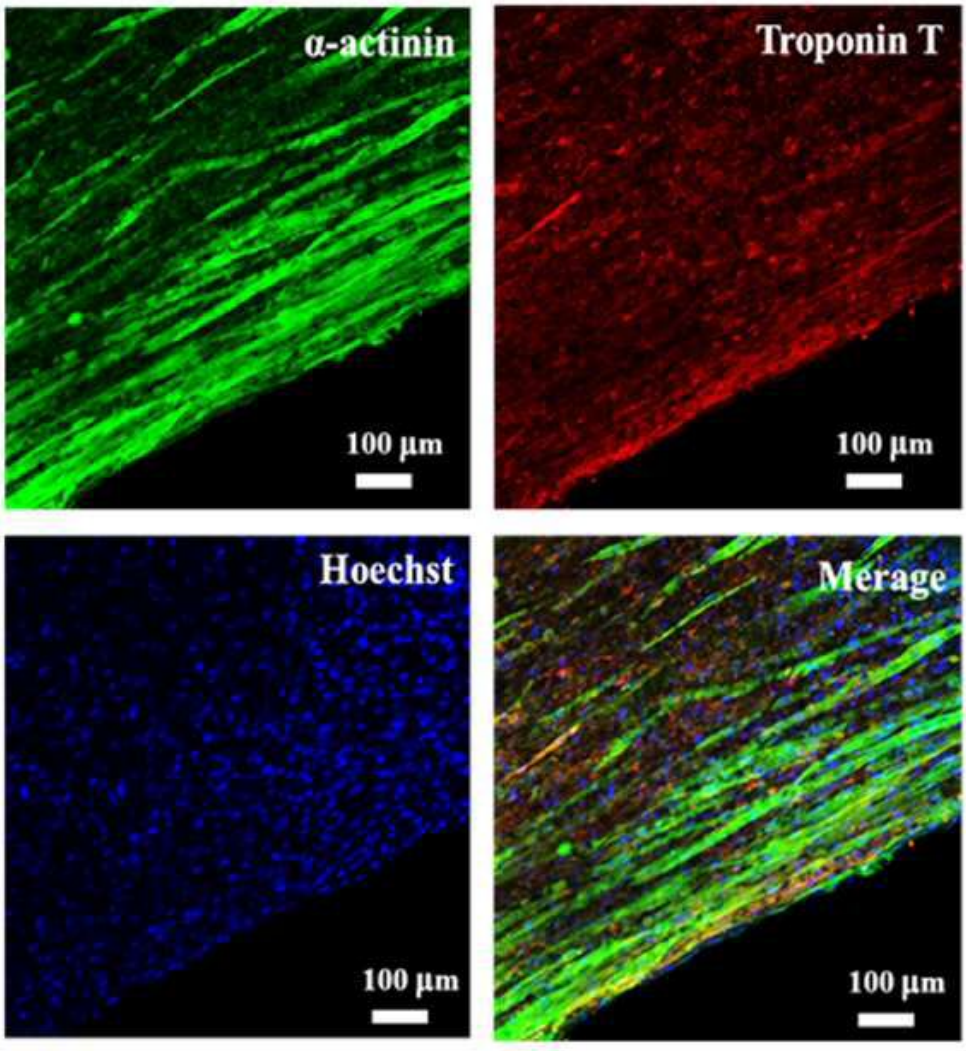
도면2a


C2C12
Matrigel
Fibrinogen
Thrombin
HA-AuNPs
Growth media
Differentiation media
Gel seeding to mold
Bundle transfer
Spontaneous contraction observed
Day
0
1
2
3
7
21

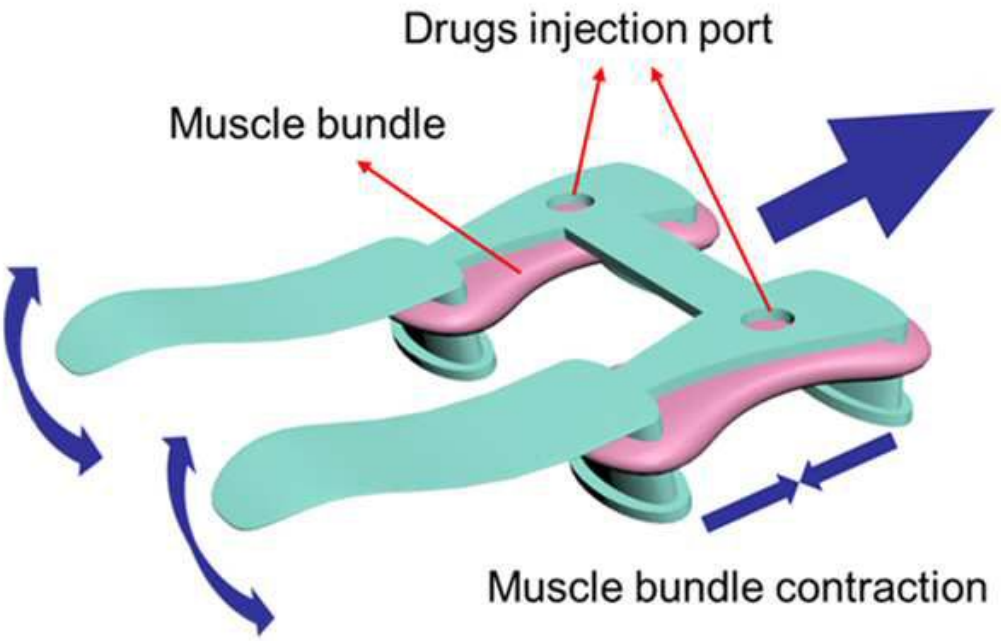
도면2b



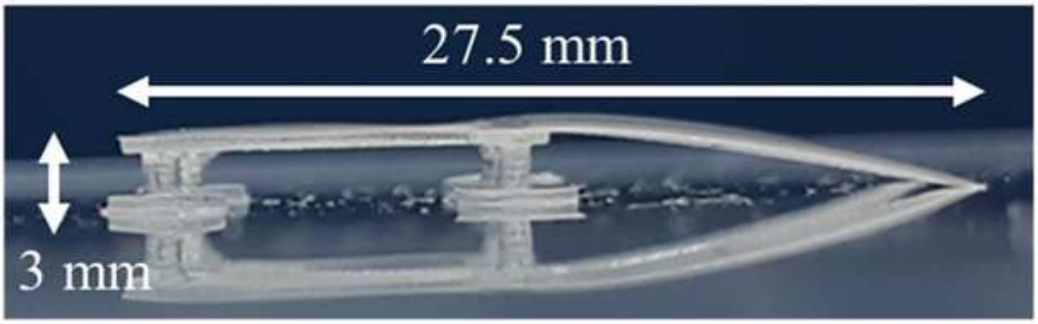
도면2c


α-actinin
100 μm
Troponin T
100 μm
Hoechst
100 μm
Merage
100 μm

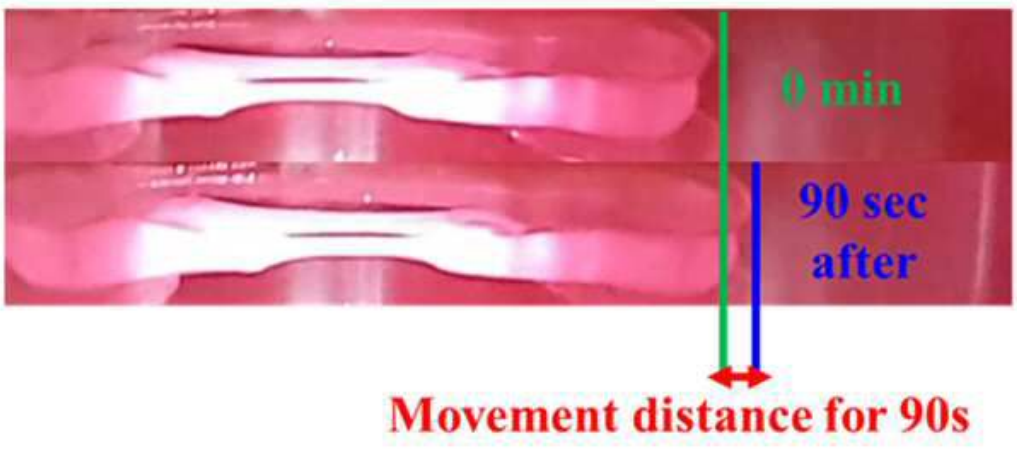
도면3a



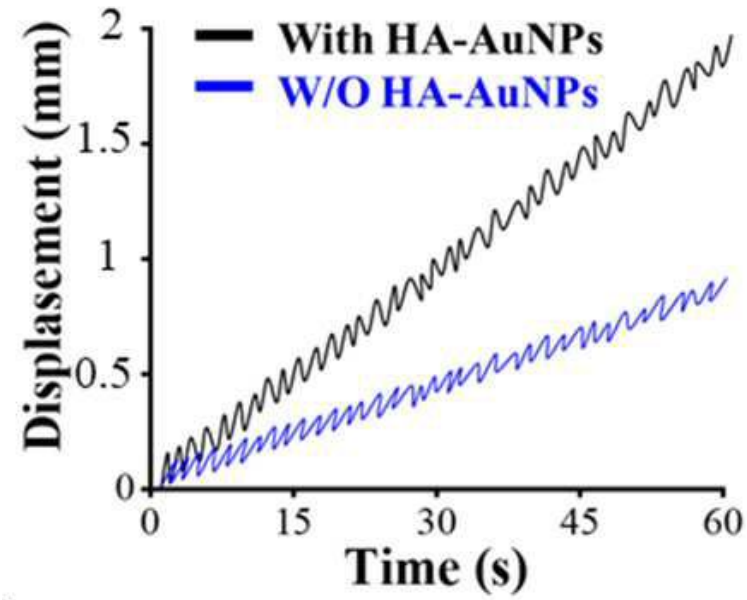
도면3b



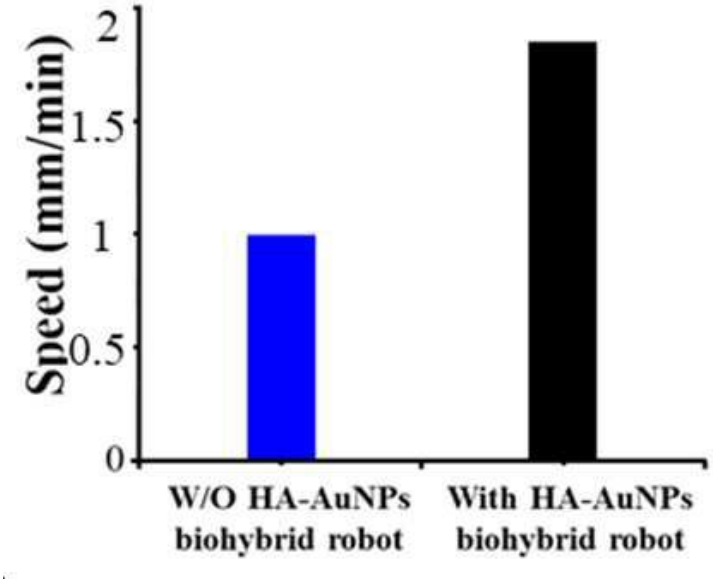
도면3c



도면3d


With HA-AuNPs
W/O HA-AuNPs
Displasement (mm)
2
1.5
1
0.5
0
0
15
30
45
60
Time (s)

도면3e


Speed (mm/min)
2
1.5
1
0.5
0
W/O HA-AuNPs
biohybrid robot
With HA-AuNPs
biohybrid robot