(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 7 월 2 일 (02.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/138907 A9

(51) 국제특허분류:
C12N 5/0793 (2010.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/018382

(22) 국제출원일: 2019 년 12 월 24 일 (24.12.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0168191 2018 년 12 월 24 일 (24.12.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

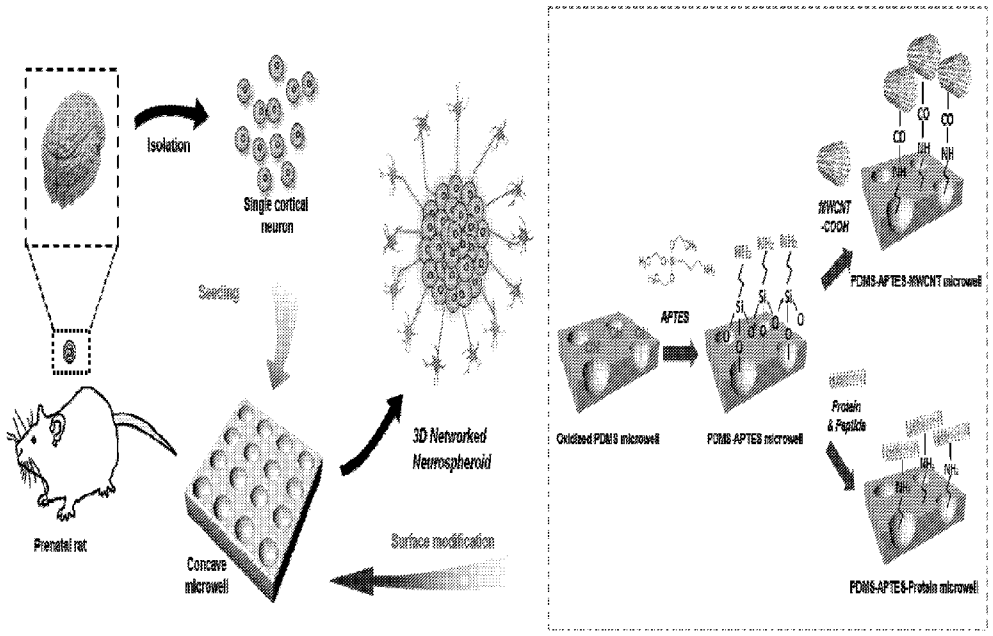
(72) 발명자: 김동휘 (**KIM, Dong Hwee**); 02875 서울시 성북구 낙산길 243-15 (삼선동2가 420, 삼선현대힐스테이트) 107동 201호, Seoul (KR). 이건희 (**LEE, Geon Hui**); 25929 강원도 삼척시 남양길 63-24 (남양동, 현대백조2차아파트) 2동 406호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (**DANA PATENT LAW FIRM**); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4~6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

(54) **Title:** MANUFACTURE OF STRUCTURE CAPABLE OF FORMING THREE-DIMENSIONAL NERVE CELL BODY AND GENERATING NEURITE THROUGH VARIOUS SURFACE PROCESSES

(54) **발명의 명칭:** 다양한 표면공정을 통한 3차원 신경세포체 형성 및 신경 돌기 생성이 가능한 구조체 제작



(57) **Abstract:** The present invention relates to the manufacture of a platform for forming a nerve cell structure and, more specifically, to the manufacture of a structure capable of simultaneously forming a test-tube three-dimensional nerve cell body and generating a neurite by forming a three-dimensional nerve cell body with a micro-platform and forming a neurite between the nerve cell body and the micro-platform so as to enable signal transduction, which is an essential function of a nerve cell.

(57) **요약서:** 본 발명은 신경세포 구조체 형성을 위한 플랫폼 제작에 관한 것이며, 보다 상세하게는 마이크로플랫폼을 이용하여 3차원 신경세포체를 형성하고 신경세포체와 마이크로플랫폼 사이에 신경 돌기가 형성되어 신경세포의 필수기능인 신호전달이 가능하여 시험관 3차원 신경세포체 형성과 동시에 신경 돌기 생성이 가능한 구조체 제작에 관한 것이다.

WO 2020/138907 A9

[다음 쪽 계속]

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) **국제조사보고서 공개일:**
2020 년 8 월 20 일 (20.08.2020)

(48) **본 정정판 공개일:**
2020 년 10 월 1 일 (01.10.2020)

(15) **정정사항에 관한 정보:**
2020 년 10 월 1 일 (01.10.2020) 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 다양한 표면공정을 통한 3차원 신경세포체 형성 및 신경 돌기 생성이 가능한 구조체 제작

기술분야

[1] 본 발명은 신경세포 구조체 및 신경돌기의 3차원 형성을 위한 플랫폼에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인체 내 장기 및 조직들은 세포외기질(extracellular matrix)과 함께 세포를 기본으로 하여 구성되어 있다. 최근 3차원으로 배양된 세포들이 생체내의 생물학적 반응과 비슷하다는 연구결과들이 발표됨에 따라 3차원 세포 배양기술에 관한 중요도성이 대두되고 있다.

[3] 한편 신경세포의 발달과정의 경우 줄기세포에서 분화되어 신경세포가 되고 최종적으로 신경 돌기가형성되어 서로를 연결하는 모양을 보인다. 신경 돌기의 형성은 신경 다발 형성과 신경세포의 발달에 직접적인 영향을 끼친다. 신경 돌기는 세포외기질과 세포-세포 상호작용에 의해 그 형성 여부가 결정된다는 사실이 알려져 있다.

[4] 신경 돌기 형성을 위한 기존 연구는 라미닌이나 폴리-L-라이신 혹은 폴리-D-라이신을 이용하여 신경 돌기 형성을 유도하는 경우가 있다. 예를 들어 나노섬유에 라미닌이나 폴리-L-라이신을 도포하여 세포와 바닥과의 접착력을 향상시켜 신경세포의 생존력과 신경 돌기의 생장을 도운 연구들이 있다. 하지만 이런 연구는 모두 2차원적인 세포배양으로 실제 3차원에서 일어나는 현상과 거리가 있다. 한편 3차원으로 배양이 가능하도록 플랫폼에서 신경세포를 배양한 경우에는 신경세포체의 형상의 균일성이 없거나 신경 돌기가 자라지 않는 한계를 보이고 있다.

[5] [선행기술문헌]

[6] [특허문헌]

[7] 한국특허공개공보 제10-2017-0029237호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 세포-구조체 사이의 상호작용력이 세포-세포 사이의 상호작용력보다 큰 경우 신경 세포는 신경 돌기 형성이 가능하지만 모양이 일정한 구형 3차원 세포집합체로 형성이 되지 않는다. 반면 세포-구조체 사이의 상호작용력이 세포-세포 사이의 상호작용력보다 작은 경우 신경 세포는 모양이 일정한 구형 3차원 세포집합체 형성이 가능하지만 신경 돌기 형성이 불가능하다. 시험관 수준에서 약물 스크리닝 용도 혹은 생체내의 신경세포체를 모사하여 생물학적 유사성의 연구를 위해서는 3차원으로 신경세포체를 형성함과 동시에 신경

동기도 형성이 되어야 한다. 이에 본 발명에서는 세포-구조체 사이의 상호작용력을 최적화하여 신경 돌기가 생성됨과 동시에 모양이 일정한 3차원 신경세포체를 형성할 수 있는 마이크로 플랫폼의 개발이 필요한 실정이다.

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포-구조체 사이의 상호작용력을 최적화하여 신경 돌기가 생성됨과 동시에 모양이 일정한 3차원 신경세포체를 형성할 수 있는 마이크로 플랫폼을 제공한다.

[10] 구체적으로 본 발명은 APTES(3-aminopropyltriethoxysilane)로 표면 처리된 오목 마이크로웰로 이루어진 기판을 포함하는 3차원 신경세포 배양 플랫폼을 제공한다.

[11] 상기 오목 마이크로웰은 편평한 기판 상에 신경세포가 고정되어 배양될 수 있는 움푹 패인 구조를 지칭할 수 있다. 상기 오목 마이크로웰은 배양되어 하나의 신경세포체를 형성하기에 충분한 공간을 제공할 수 있는 크기 및 형태에 제한없이 이용될 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, 상기 오목 마이크로웰은 직경이 100μm 내지 1000μm 범위의 반구형의 오목 마이크로웰이 형성된 기판을 제조하여 사용하였다. 일정한 크기의 구형의 신경세포체를 형성시키기 위하여, 세포 및 배양 플랫폼 간의 고른 상호 작용이 이루어질 수 있는 구조로써 반구형을 선택하였다.

[12] 3차원 신경세포를 배양하기 위하여 사용하는 플랫폼의 직경이 100um 이하의 경우 형성되는 신경세포체의 크기가 작아서 3차원 배양의 의미가 없게 되고 1000um 이상의 직경을 사용하여 형성되는 신경세포체는 크기가 300um를 넘어가면서 신경세포체 내부에 산소 및 영양분 부족으로 인해 세포사멸(네크로시스)이 일어날 수 있다 이에 본 발명에서는 100~1000μm 직경의 반구형 플랫폼을 사용하였다.

[13] 상기 기판은 생체 적합성이 우수한 폴리디메틸실록세인 (polydimethylsiloxane, PDMS)으로 제조된 것일 수 있다.

[14] 본 발명자들은 APTES(3-aminopropyltriethoxysilane)이 표면 처리된 오목 마이크로웰이 형성된 기판에 신경세포를 배양함으로써 균일한 구형의 신경세포체 형성을 확인하였으며, 동시에 신경돌기의 형성도 촉진됨을 확인하였다.

[15] 신경세포는 신경세포체와 신경돌기로 이루어지며, 신경돌기를 통하여 다른 신경세포간에 네트워크를 형성하여 신속하게 신호를 전달하고 전달 받을 수 있다.

[16] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명은 상기 APTES(3-aminopropyltriethoxysilane)이 표면 처리된 기판에 탄소나노튜브(CNT), 라미닌(Laminin) 및 폴리-L-라이신(Poly-L-lysin, PLL) 중 하나 이상이 추가로 표면 처리될 수 있다.

[17] APTES(3-aminopropyltriethoxysilane)이 표면 처리된 기판에 탄소나노튜브(CNT), 라미닌(Laminin) 및 폴리-L-라이신(Poly-L-lysin, PLL) 중 하나로 표면 처리된 상기 3차원 신경세포 배양 플랫폼에서 신경세포를 배양한 결과, 탄소나노튜브가 추가로 표면 처리되는 경우, 신경세포체의 형성에 차이가 없음을 확인하였고, 라미닌 또는 폴리-L-라이신이 추가로 표면 처리되는 경우 신경 돌기 형성이 촉진됨을 확인하였다. 상기 물질의 추가 처리를 통하여 신경세포 및 플랫폼 간의 상호 작용력을 조절함으로써 신경세포체 및 신경돌기의 형성을 인위적으로 조절할 수 있음을 확인하였다..

[18] 구체적인 다른 일 실시예에서, 상기 기판에는 복수의 오목 마이크로웰이 다양한 패턴으로 형성될 수 있다, 상기 하나의 오목 마이크로웰은 하나의 신경세포가 배양될 수 있고, 상기 복수의 오목 마이크로웰은 인접하는 마이크로웰 사이가 개방되어 있을 수 있다. 상기 개방된 공간을 통하여 하나의 오목 마이크로웰에서 배양되는 신경세포에서 형성된 신경돌기가 인접한 오목 마이크로웰에서 배양되는 신경세포의 신경세포체와 연결되어 생체 외에서 하나의 신경 네트워크망을 형성시킬 수 있다. 이를 통하여, 생체 외에서 생체 내 신경 네트워크 망 환경과 유사한 3차원 환경을 모사함으로써 신경 세포간의 신호전달 기작 연구 및 신경 질환 약물 스크리닝에 이용될 수 있다.

[19] 본 발명은 상술한 3차원 신경세포 배양 플랫폼에 신경세포를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 신경세포 배양 방법을 제공한다.

[20] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 신경 손상 질환 약물 스크리닝 방법을 제공한다:

[21] 본 발명의 3차원 신경세포 배양 플랫폼에 신경세포를 배양하는 단계;

[22] 상기 배양된 신경세포에 후보 물질을 처리하는 단계;

[23] 후보 물질이 처리된 상기 신경세포에 신경 손상 질환을 유발하는 물질을 처리하는 단계; 및

[24] 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 신경세포에서의 신경돌기 및 신경세포체 형성 정도를 비교하는 단계.

[25] 상기 후보 물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액 또는 동물 조직 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[26] 상기 후보 물질은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 항체 또는 펩티드 이거나, 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 SigmaAldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

[27] 본 발명에서, 신경 손상 또는 신경질환은 뇌손상, 뇌질환, 척수손상, 말초신경손상, 말초신경질환, 또는 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 중 어느 하나일 수 있으며, 상기 뇌손상 또는 뇌질환은 치매(dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 뇌전증(epilepsy), 뇌졸중(stroke), 중풍, 허혈성 뇌질환 또는 퇴행성 뇌질환 중 어느 하나일 수 있다.

[28] 상기 신경세포 배양 플랫폼과 관련하여 상술한 내용과 중복되는 내용에 대한 설명은 생략한다.

발명의 효과

[29] 첫째, 마이크로 플랫폼을 이용하여 모양이 일정한 3차원 신경세포체 배양이 가능하다. 둘째, 세포와 구조체간의 상호작용력을 조절하여 물리적, 화학적, 구조적으로 다른 성질을 갖도록 하는 표면 공정이 가능하다.

[30] 셋째, 신경세포체의 배열이 가능하다. 오목한 웰에 네트워크를 디자인함에 따라 표면공정을 통해 생성된 신경세포체의 신경 돌기들이 상호 연결되어 원하는 대로의 신경세포체의 배열이 가능하다.

[31] 넷째, 효과적으로 생체 내의 신경세포를 모사함으로서 약물 스크린 용도로 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[32] 도 1은 신경 돌기 형성 및 신경세포체 형성이 가능한 오목 마이크로웰의 표면 처리과정을 나타낸 개략도이다.

[33] 도 2는 푸리에 변환 적외선 분광학을 이용한 표면 공정을 진행한 다섯 가지 표면의 다른 화학적 성질을 도시한 것이다.

[34] 도 3은 원자힘 현미경을 이용한 다섯 가지 표면 공정을 통한 오목 마이크로웰의 표면 성질을 나타낸 것이다. 스케일바 : 500nm

[35] 도 4는 접촉각 측정을 통한 다섯 가지 표면 공정을 통한 오목 마이크로웰의 다른 물리적 성질을 나타낸 것이다.

[36] 도 5는 다섯 가지 표면 공정을 통한 오목 마이크로웰의 다른 세포 부착력을 나타낸 것이다.

[37] 도 6은 다섯 가지 표면 공정을 통한 오목 마이크로웰에서의 신경세포체 형성을 나타낸 것이다: a) 일자별 광학 현미경 사진. b) 신경세포체 형성에 소요되는 일자. c) 신경세포체의 크기. 스케일바: 100μm

[38] 도 7은 칼슘 인디케이터 (Fluo-4 AM)을 이용한 다섯 가지 표면에서 배양된 신경세포체의 칼슘 전달 이미지를 나타낸 것이다. 스케일바: 50μm

[39] 도 8은 다섯 가지 표면 공정을 통해 제작된 오목 마이크로웰에서 배양된 신경세포체의 형성 유무와 신경 돌기 생성을 나타낸 것이다: a) 신경세포체의 전자현미경 이미지, b) 신경세포체와 신경 돌기의 형광 염색 이미지, c) 각 오목 마이크로웰에서 형성된 신경 돌기 개수, d) 각 오목 마이크로웰에서 형성된 신경

돌기 길이, e) 접촉각과 세포 부착력, 신경세포 형성과의 관계, f) 각 표면과 신경세포의 부착력 및 신경 돌기 형성 관계에 대한 모식도. 스케일바: 200μm

[40] 도 9는 표면 공정 및 네트워크 구조를 일정한 간격으로 배양된 신경세포체와 연결된 신경 돌기를 보여주는 현미경 사진이다. 스케일바: 500μm

[41] 도 10은 약물 스크리닝 모델 검증을 위한 아밀로이드 베타 투여에 의한 신경 돌기 감소 모델을 나타낸 것이다: a) APTES를 처리한 오목 마이크로웰에서의 신경세포체, b) 아밀로이드 베타 축적 여부, c) 아밀로이드 베타를 처리한 신경세포체, d) 증가된 아밀로이드 베타 축적, e) 아밀로이드 베타 축적 비교, f) 신경 돌기 개수 비교, g) 신경 돌기 길이 비교.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[42] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[43] 신경 돌기 구조를 생성함과 동시에 일정한 모양과 간격으로 신경세포체를 형성할 수 있도록 표면 공정을 통해 세포-구조체 사이의 상호 작용력을 최적화하였고 여기에 태아 쥐(Prenatal rat)로부터 추출한 신경 세포를 폴리디메틸실록세인 (polydimethylsiloxane, PDMS)으로 제작한 오목 마이크로웰 (concave microwell) 에 배양하였다 (도 1).

[44]

[45] **[실시예 1] 표면 공정**

[46] APTES의 아미노실레인 작용기와 탄소 나노 튜브, 폴리-L-라이신, 라미닌을 이용하여 오목 마이크로웰을 표면을 공정하였다. 먼저 오목 마이크로웰을 산소 플라즈마 (100W, 30s)를 이용하여 표면 처리를 한 뒤 10% (물과 부피비) APTES 용액 혹은 0.01% (물과 부비피)의 탄소 나노 튜브 혹은 20 μg/ml의 라미닌 혹은 20 μg/ml의 폴리-L-라이신을 약 1시간 동안 추가 하여 표면 공정을 진행하였다.

[47]

[48] **[실시예 2] 표면의 화학적, 표면적, 물리적 성질 확인**

[49] 여러 개의 물질로 코팅된 오목 마이크로웰의 표면의 화학적 차이를 보기 위해 푸리에 변환 적외선 분광학 (Fourier transform infrared, FTIR)을 이용하여 다섯 가지의 오목 마이크로웰이 각기 다른 화학적 성질을 보이는 것을 확인하였다 (도 2). 그리고 원자힘현미경 (Automic force microscope, AFM)을 이용하여 표면에 붙어있는 물질이 각기 다른 것을 확인하였다 (도 3). 또한 접촉각 측정 (contact angle)을 이용하여 폴리디메틸실록세인 자체 표면에서 가장 접촉각이 크며 폴리-L-라이신 처리한 표면에서 접촉각이 가장 작은 것을 확인하였다 (도 4).

[50]

[51] **[실시예 3] 신경 세포 부착 실험**

[52] 세포-구조체 사이의 상호작용력을 측정하기 위하여 표면 공정을 통해 제작된 다섯 가지 다른 성질의 표면에 신경 세포 부착 실험을 진행하였다. 각 표면

조건에 2*10^{5}개의 신경세포를 주입 (seeding)하고 3시간 동안 배양 후 세 번 배양액을 교체하여 부착되지 않은 세포들을 제거하였다. 남아있는 세포의 양을 측정하기 위해 세포 측정 키트 (cell counting kit-8, Dojindo, USA)를 이용하여 정량화하였다. 그 결과 폴리디메틸실록세인 자체 표면에서 가장 세포 부착이 적었으며 폴리-L-라이신 처리한 표면에서 세포 부착이 많은 것을 확인하였다 (도 5)

[53]

[54] **[실시예 4] 신경세포체 형성**

[55] 각 다른 표면 조건에서 신경세포체의 형성기간을 확인하였는데 폴리디메틸실록세인 오목 마이크로웰과 탄소나노튜브를 표면처리한 오목 마이크로웰에서는 세포 주입 (seeding) 후 1일 만에 신경세포체가 형성되었다. APTES를 처리한 오목 마이크로웰에서는 세포 주입 후 5일 이후 신경세포체가 형성되었으며 라미닌과 폴리-L-라이신을 처리한 오목 마이크로웰에서는 10일이 지나도 신경세포체가 형성이 되지 않는 것을 보였다. 한편 생성된 신경세포체들 사이에는 크기차이는 없는 것을 확인하였다 (도 6).

[56]

[57] **[실시예 5] 신경을 통한 신호 전달 확인**

[58] 포타슘에 의해 활성화되는 신경 전달을 확인하기 위하여 세포내 칼슘 인디케이터인 Fluo-4 AM을 이용하여 형광이미지로 측정하였다. Fluo-4를 미리 주입한 신경세포체에 고농도의 포타슘으로 자극을 하여 칼슘의 전달을 확인하였으며 이를 통해 다섯 가지 조건의 표면에서 자란 신경세포들이 표면 공정에 의해 신경 세포의 이상이 유도되지 않는 다는 것을 증명하였다 (도 7)

[59]

[60] **[실시예 6] 신경 돌기 형성 및 신경세포체 형성 확인**

[61] 신경 세포들을 다섯 가지 표면 조건의 오목 마이크로웰에서 10일 동안 배양한뒤 신경세포체의 형성 유무와 신경 돌기의 형성 유무를 확인하기 위하여 β-III tubulin을 형광염색하고 전자 현미경으로 관측하였다. 그 결과 신경세포체는 폴리디메틸실록세인 오목 마이크로웰과 탄소나노튜브 및 APTES로 처리한 오목 마이크로웰에서 형성이 되었다. 신경 돌기는 폴리-L-라이신을 처리한 오목 마이크로웰에서 가장 많이 형성되었으며 APTES로 처리한 오목 마이크로웰에서 가장 길게 형성되는 것을 확인함으로써 APTES로 처리한 오목 마이크로웰에서 신경 돌기의 형성 및 신경세포체 형성이 가장 적합한 것으로 결론내었다. 이를 바탕으로 폴리디메틸실록세인 오목 마이크로웰, 탄소 나노 튜브 및 APTES 및 라미닌 및 폴리-L-라이신을 처리한 오목 마이크로웰 순서로 갈수록 세포-구조체 사이의 반발력 감소, 접촉각 감소, 소수성이 감소하며, 세포-구조체 사이의 친화력 증가, 표면 습윤성 증가, 세포 구조체 형성 시간 증가, 신경 돌기 형성 개수 증가를 확인하였다 (도 8). 또한 APTES를 처리한 오목 마이크로웰 사이의 네크워크를 통해 신경세포체 사이의 신경 돌기들이 형성되어 연결되는 것을

확인하였다 (도 9)

[62]

[63] **[실시예 7] 약물 스크리닝을 위한 아밀로이드 베타 (amyloid-beta) 투여 실험**

[64] 신경세포체의 형성과 신경 돌기 형성이 APTES를 처리한 오목 마이크로웰에서 최적임을 확인하여 이를 이용하여 약물 스크리닝 용도로 사용이 가능함을 확인하기 위하여 알츠하이머 (Alzheimer's desease) 질병을 유발하는 대표 물질로 알려진 아밀로이드 베타를 투여하였다. 신경세포체로의 아밀로이드 베타 축척을 확인하기 위하여 thioflavin-S를 이용하여 형광이미지를 얻었다. 그 결과 아밀로이드 베타를 처리한 신경세포체의 신경 돌기의 개수와 길이가 급격하게 감소한 것을 확인하였고 이를 통해 본 발명에서 제시한 방법을 통해 약물 스크리닝 용도로 사용이 가능함을 증명하였다 (도 10).

청구범위

[청구항 1] APTES(3-aminopropyltriethoxysilane)로 표면 처리된 오목 마이크로웰로 이루어진 기판을 포함하는 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 오목 마이크로웰은 100μm~1000μm 직경의 반구형인 것인, 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 3차원 신경세포 배양 플랫폼은 신경세포체 및 신경돌기의 형성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 기판은 복수의 오목 마이크로웰로 이루어지고, 서로 인접하는 오목 마이크로웰 사이가 개방되어 있는 것을 특징으로 하는 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

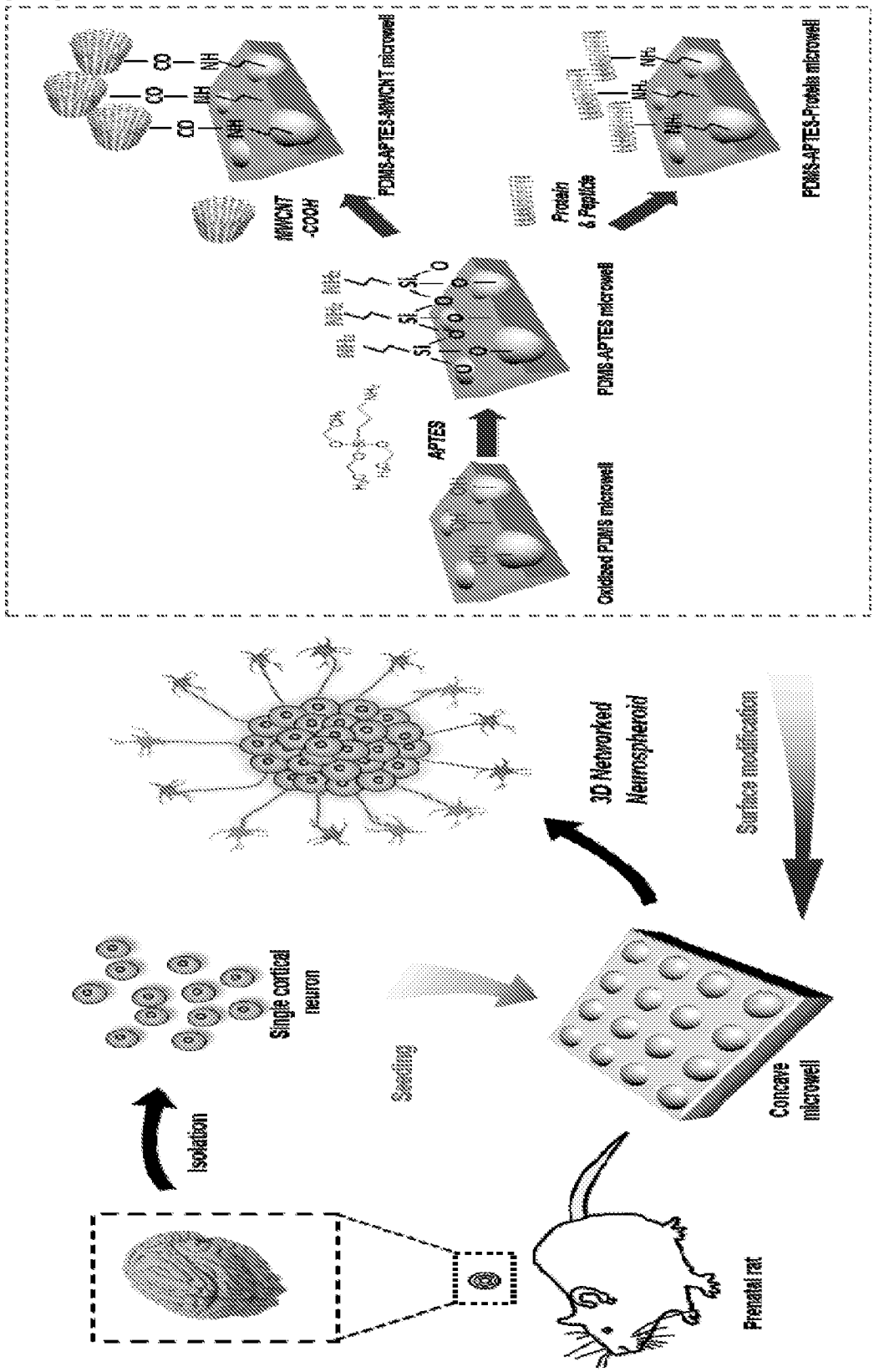
[청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 기판에 탄소나노튜브(CNT), 라미닌(Laminin) 및 폴리-L-라이신(Poly-L-lysin, PLL) 중 하나 이상이 추가로 표면 처리된 것을 특징으로 하는 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 오목 마이크로웰로 이루어진 기판은 폴리디메틸실록세인(polydimethylsiloxane, PDMS)으로 제조된 것인 3차원 신경세포 배양 플랫폼.

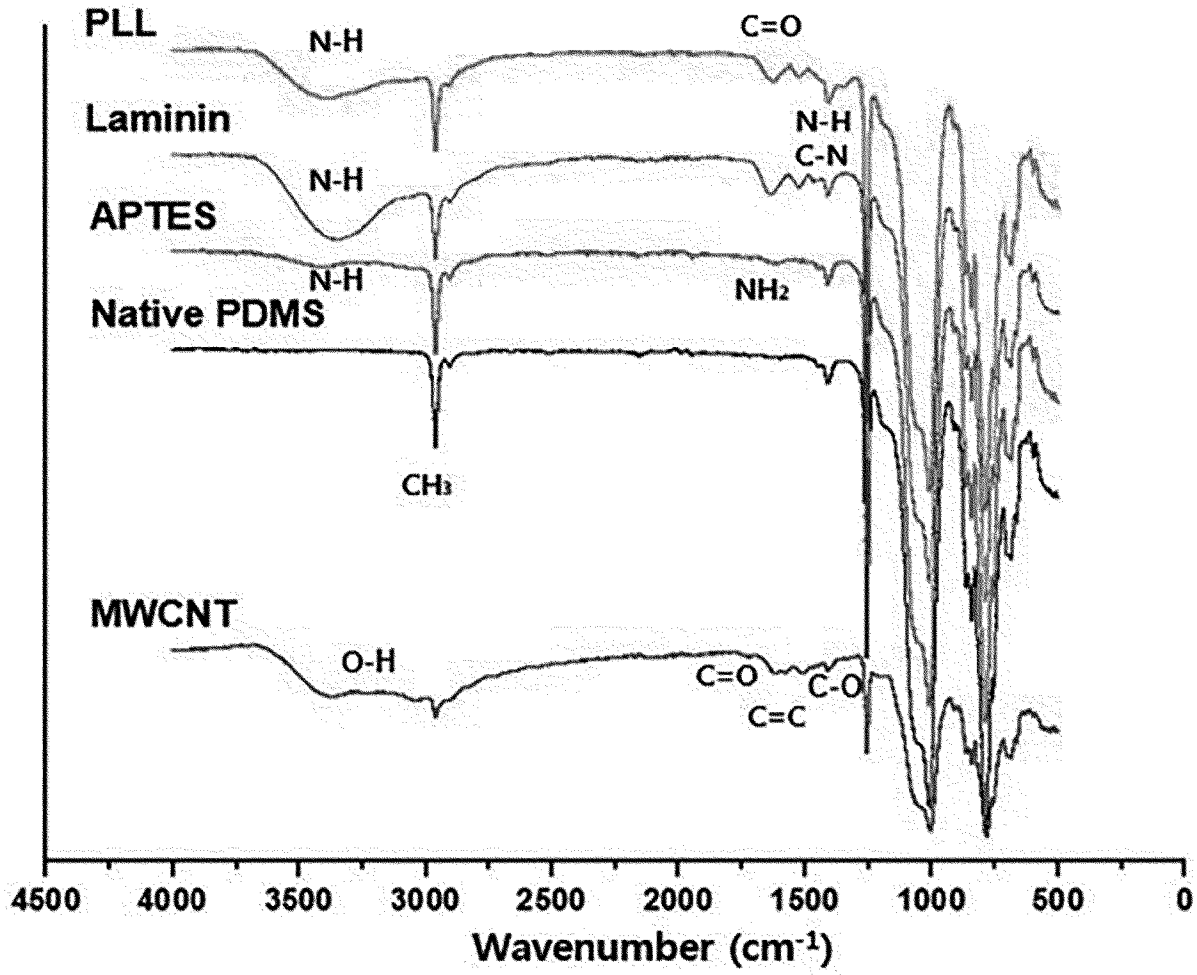
[청구항 7] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 3차원 신경세포 배양 플랫폼에 신경세포를 배양하는 단계를 포함하는 생체 외 3차원 신경세포 배양 방법.

[청구항 8] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 3차원 신경세포 배양 플랫폼에 신경세포를 배양하는 단계;
상기 배양된 신경세포에 후보 물질을 처리하는 단계;
후보 물질이 처리된 상기 신경세포에 신경 질환을 유발하는 물질을 처리하는 단계; 및
후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 신경세포에서의 신경돌기 및 신경세포체 형성 정도를 비교하는 단계를 포함하는 신경 손상 또는 신경 질환 치료용 약물 스크리닝 방법.

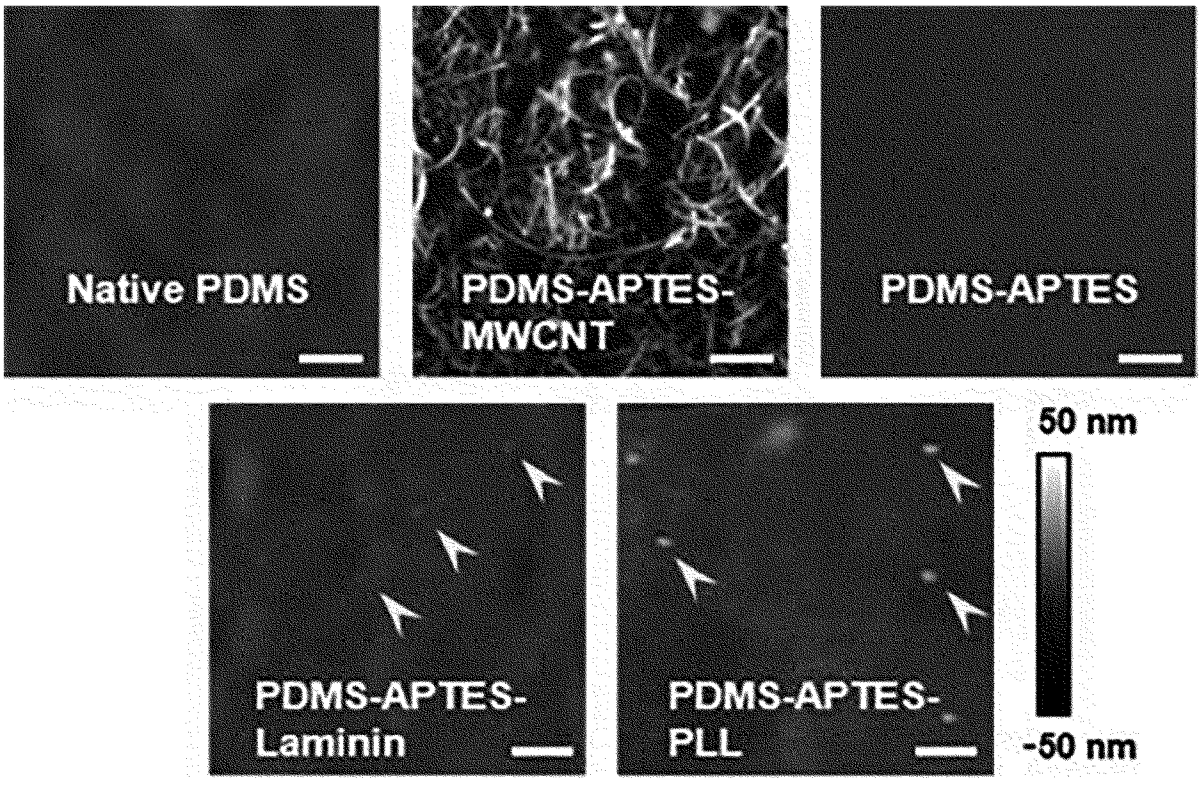
[도1]


Oxidized PDMS microwell
APTES
PDMS-APTES microwell
Protein & Peptide
PDMS-APTES-Proteins microwell
MWCNT -COOH
PDMS-APTES-MWCNT microwell
Prenatal rat
Isolation
Single cortical neuron
Seeding
Concave microwell
3D Networked Neurospheroid
Surface modification

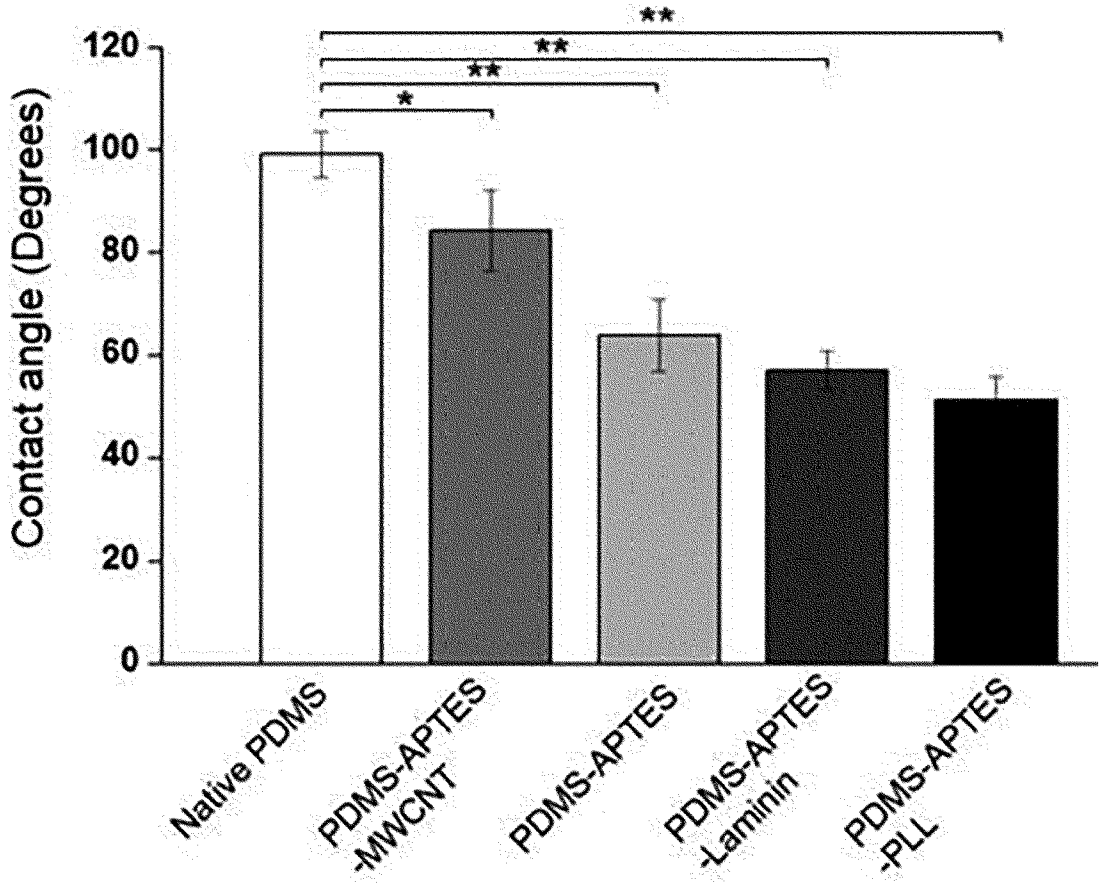
[도2]


PLL
N-H
C=O
Laminin
N-H
C-N
APTES
N-H
NH2
Native PDMS
N-H
CH3
MWCNT
O-H
C=O
C-O
C=C
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Wavenumber (cm-1)

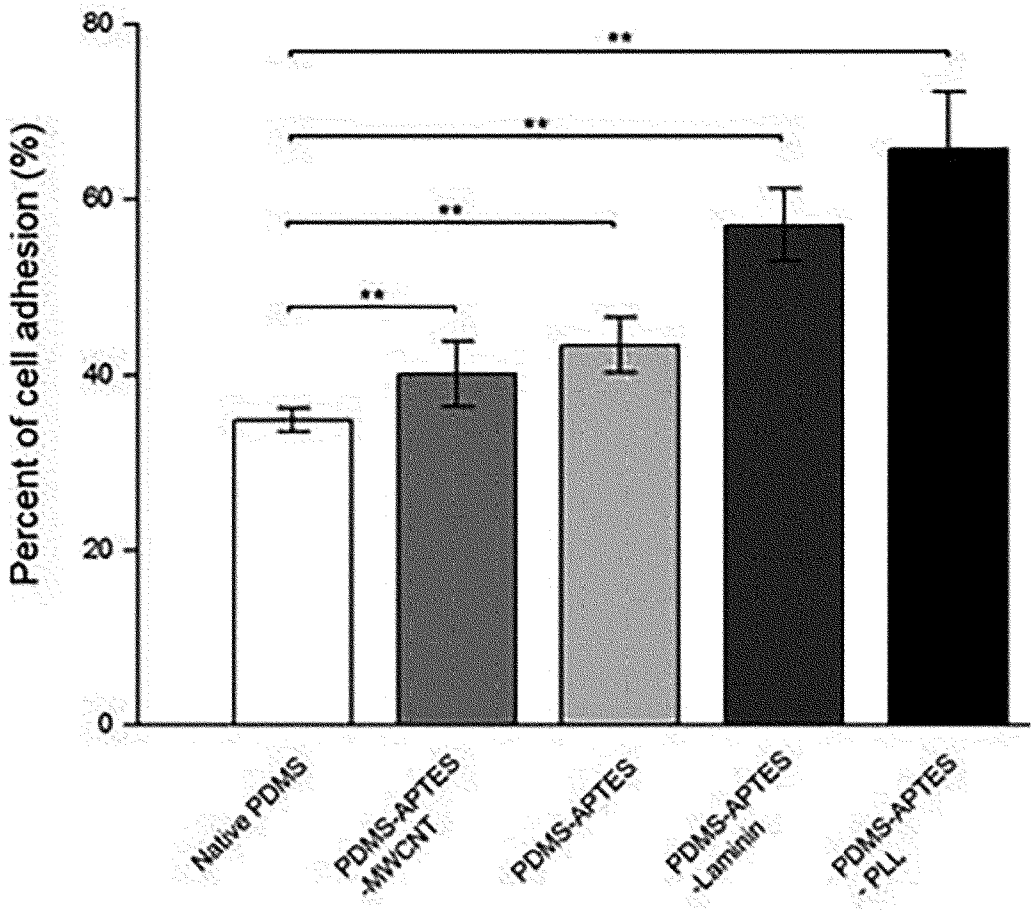
[도3]


Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES-Laminin
PDMS-APTES-PLL
50 nm
-50 nm

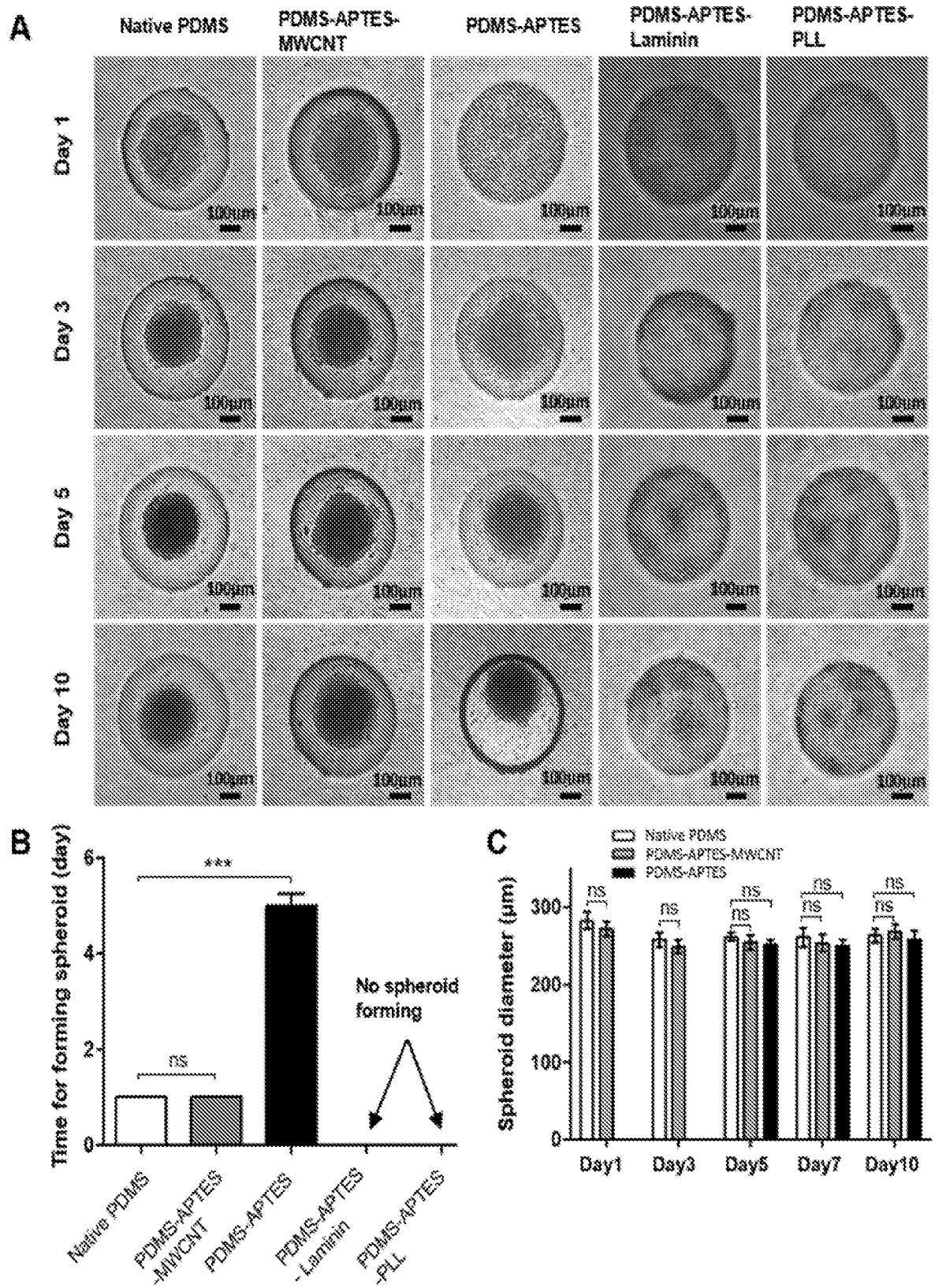
[도4]


Contact angle (Degrees)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
*
Native PDMS
PDMS-APTES -MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES -Laminin
PDMS-APTES -PLL

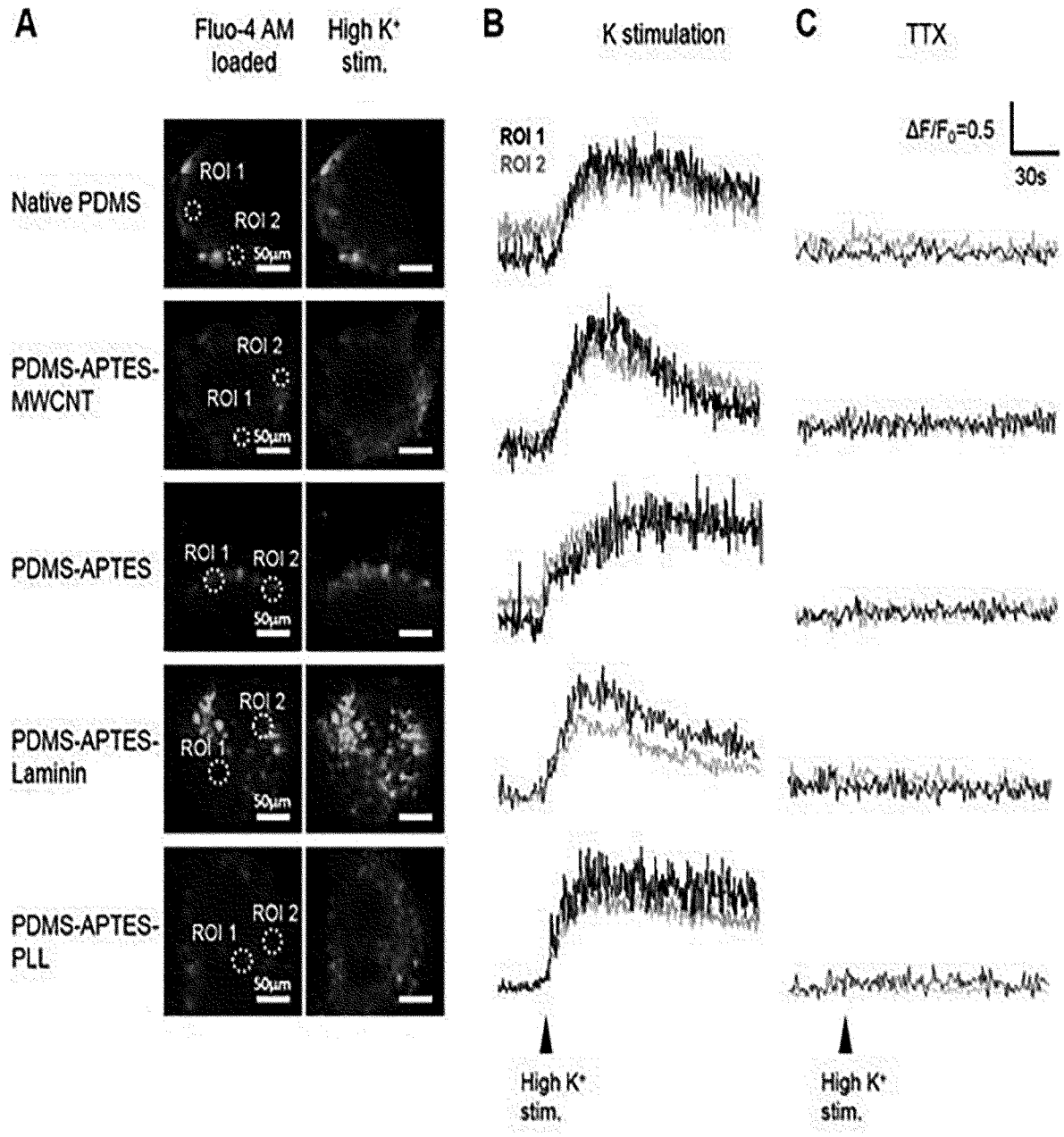
[도5]


Percent of cell adhesion (%)
80
60
40
20
0
**
**
**
**
Native PDMS
PDMS-APTES -MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES -Laminin
PDMS-APTES -PLL

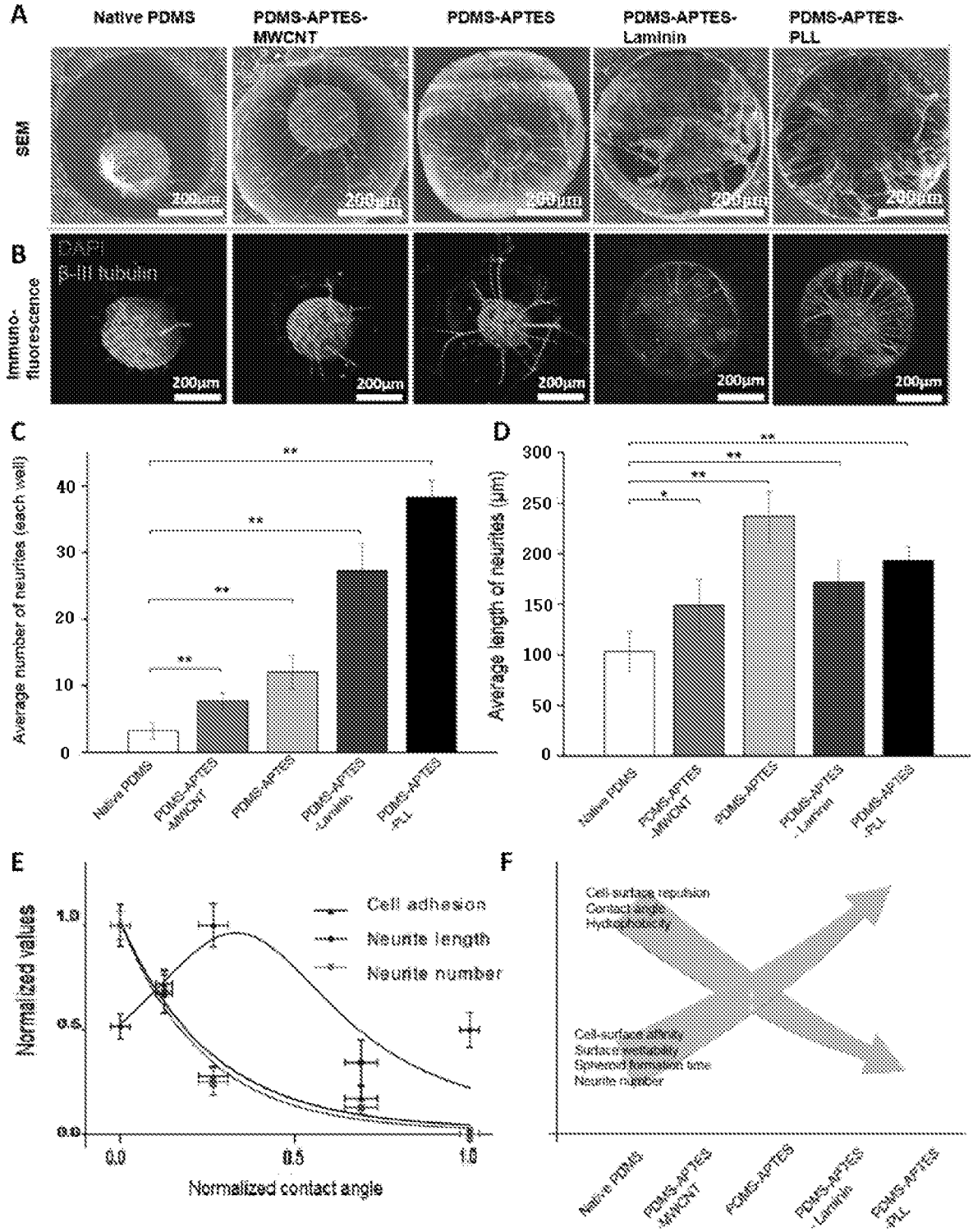
[도6]


A
Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES-Laminin
PDMS-APTES-PLL
Day 1
Day 3
Day 5
Day 10
100μm
B
Time for forming spheroid (day)
***
ns
No spheroid forming
Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES-Laminin
PDMS-APTES-PLL
C
Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
Spheroid diameter (μm)
Day1
Day3
Day5
Day7
Day10

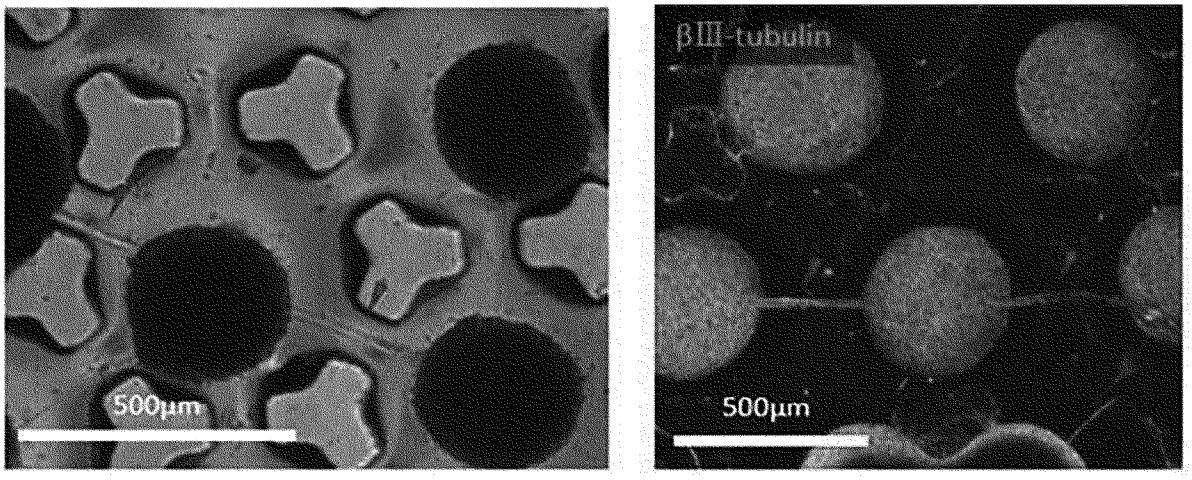
[도7]


A
Fluo-4 AM loaded
High K+ stim.
Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES-Laminin
PDMS-APTES-PLL
ROI 1
ROI 2
50μm
B
K stimulation
ROI 1
ROI 2
High K+ stim.
C
TTX
ΔF/F0=0.5
30s
High K+ stim.

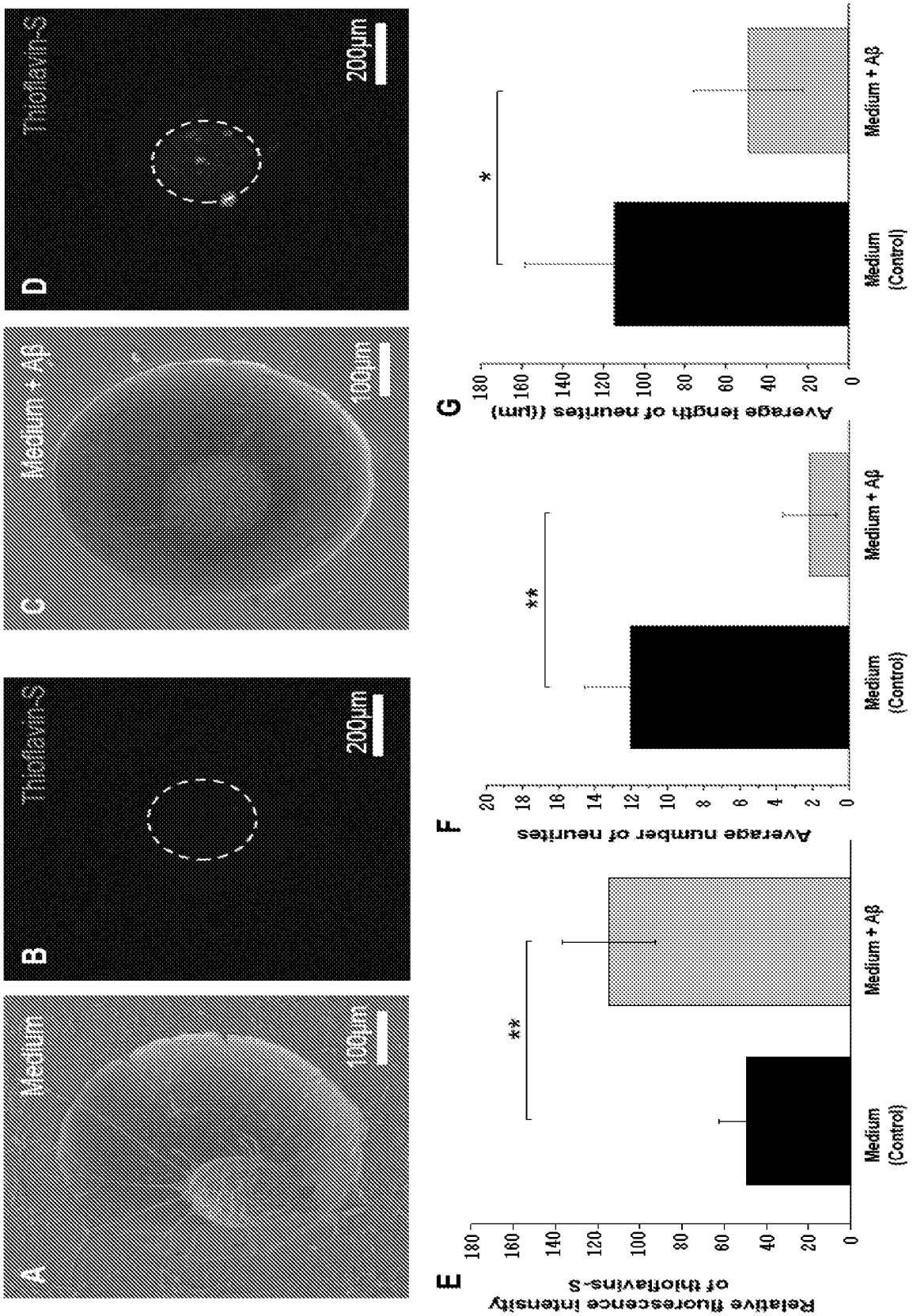
[도8]


A
Native PDMS
PDMS-APTES-MWCNT
PDMS-APTES
PDMS-APTES-Laminin
PDMS-APTES-PLL
SEM
B
Immuno-fluorescence
DAPI
β-III tubulin
200μm
C
Average number of neurites (each well)
D
Average length of neurites (μm)
E
Normalized values
Cell adhesion
Neurite length
Neurite number
Normalized contact angle
F
Cell surface repulsion
Contact angle
Hydrophobicity
Cell-surface affinity
Surface wettability
Spheroid formation time
Neurite number

[도9]



[도10]


A
Medium
100μm
B
Thioflavin-S
200μm
C
Medium + Aβ
100μm
D
Thioflavin-S
200μm
E
Relative fluorescence intensity of thioflavins-S
Medium (Control)
Medium + Aβ
**
F
Average number of neurites
Medium (Control)
Medium + Aβ
**
G
Average length of neurites (μm)
Medium (Control)
Medium + Aβ
*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/018382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0793(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/0793; A61L 27/24; A61L 27/52; C12N; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: APTES(3-aminopropyltriethoxysilane), concave microwell, 3D neuronal spheroid, neurite

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, G. et al. Construction of neurospheroids via surface modified concave microwells. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. (Electronic publication)31 January 2018, vol. 62, pages 341-351 See abstract; pages 342, 344, 345, 347, 350; figure 1.	1-8
X	LIM, Jae Ho. 3D Brain Model Construction by a Simultaneous Control of Cell-Cell and Cell-Surface Interactions. 석사논문, 고려대학교 대학원, 바이오융합공학과 (Master's Thesis, Graduate School of Korea University, Department of Bio-convergence Engineering). 2016, pages 1-42 See pages 1-5, 29-33.	1-8
A	KUDDANNAYA, S. et al. Enhanced in vitro biocompatibility of chemically modified poly (dimethylsiloxane) surfaces for stable adhesion and long-term investigation of brain cerebral cortex cells. ACS Applied Materials & Interfaces. 27 October 2015, vol. 7, pages 25529-25538 See the entire document.	1-8
A	CHANG, T. C. et al. Microwell arrays reveal cellular heterogeneity during the clonal expansion of transformed human cells. Technology. December 2015, vol. 3, no. 4, pages 163-171 See the entire document.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 JUNE 2020 (15.06.2020)	**15 JUNE 2020 (15.06.2020)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/018382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0103970 A (DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 14 September 2015 See the entire document.	1-8
A	WO 2004-046337 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 03 June 2004 See the entire document.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/018382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0103970 A	14/09/2015	KR 10-1629547 B1	10/06/2016
WO 2004-046337 A2	03/06/2004	AU 2003-291093 A1	15/06/2004
		US 2006-0141617 A1	29/06/2006
		WO 2004-046337 A3	18/11/2004

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/018382

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/0793(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0793; A61L 27/24; A61L 27/52; C12N ; G01N 33/50

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:APTES(3-aminopropyltriethoxysilane), 오목 마이크로웰(concave microwell), 3차원 신경세포(3-D neuronal spheroid), 신경돌기(neurite)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, G. 등, 'Construction of neurospheroids via surface modified concave microwells', Journal of Industrial and Engineering Chemistry, (전자공개)2018.01.31, 62권, 341-351 페이지 초록; 페이지 342, 344, 345, 347, 350; 도면 1	1-8
X	임재호, '3D Brain Model Construction by a Simultaneous Control of Cell-Cell and Cell-Surface Interactions', 석사논문, 고려대학교 대학원, 바이오융합공학과, 2016, 1-42 페이지 페이지 1-5, 29-33 참조	1-8
A	KUDDANNAYA, S. 등, 'Enhanced in vitro biocompatibility of chemically modified poly (dimethylsiloxane) surfaces for stable adhesion and long-term investigation of brain cerebral cortex cells', ACS Applied Materials & Interfaces, 2015.10.27, 7권, 25529-25538 페이지 전체 문헌	1-8
A	CHANG, T. C. 등, 'Microwell arrays reveal cellular heterogeneity during the clonal expansion of transformed human cells', Technology, 2015.12, 3권, 4호, 163-171 페이지 전체 문헌	1-8

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 06월 15일 (15.06.2020)	2020년 06월 15일 (15.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/018382

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0103970 A (단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단) 2015.09.14 전체 문헌	1-8
A	WO 2004-046337 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 2004.06.03 전체 문헌	1-8

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/018382

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0103970 A	2015/09/14	KR 10-1629547 B1	2016/06/10
WO 2004-046337 A2	2004/06/03	AU 2003-291093 A1	2004/06/15
		US 2006-0141617 A1	2006/06/29
		WO 2004-046337 A3	2004/11/18