



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월04일
(11) 등록번호 10-1953472
(24) 등록일자 2019년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09C 1/44 (2006.01) C09C 3/06 (2006.01)
C12M 1/42 (2017.01) C12N 13/00 (2017.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C09C 1/44 (2013.01)
C09C 3/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0106299
(22) 출원일자 2017년08월22일
심사청구일자 2017년08월22일
(56) 선행기술조사문헌
JP2009238981 A*
KR1020110128606 A*
KR1020090110101 A*
KR1020140070206 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35, (1단지)동 6층 103-603호(한강로3가, 용산시티파크1단지)
민경준
서울특별시 중구 퇴계로 72, 리더스뷰남산동 18층 메이플1802호(회현동1가, 리더스뷰남산)
김태형
서울특별시 관악구 청룡중앙길 49 203호 (봉천동)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 21 항

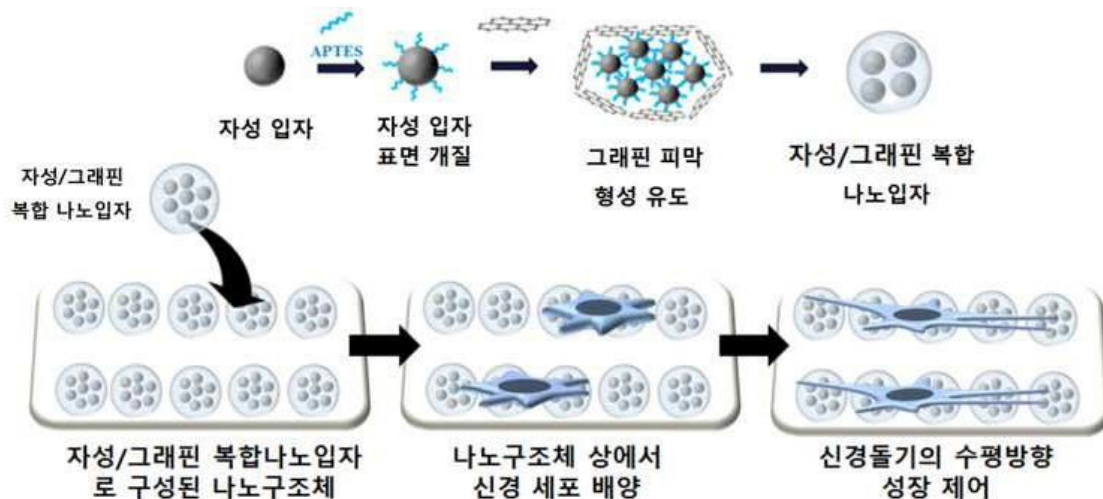
심사관 : 강민구

(54) 발명의 명칭 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 자성 나노입자 표면에 화학적 결합을 통해 탄소질 물질이 고정된 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩, 이의 제조방법 및 상기 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 신경 세포 돌기의 방향성을 유도하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 복합 나노구조체를 이용함으로써, 자기장을 인가하여 원하는 기관에 쉽고 빠르게 패턴화할 수 있고, 세포 독성이 나타나지 않으므로 주변 세포 또는 조직에 손상을 가하지 않고 세포의 성장을 제어하는 데 유용하게 이용할 수 있는 효과가 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12M 35/06 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 5/0619 (2013.01)
C12N 2529/00 (2013.01)
C12N 2533/00 (2013.01)
C12N 2535/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017000367
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중점연구소지원사업
 연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
 기 여 율 40/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016945321
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 뇌질환 약물 스크리닝 기능 나노구조체 기반 뇌 기저핵칩
 기 여 율 30/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016936897
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 동북아 R&D 허브 기반구축
 연구과제명 서강-하버드 질병 바이오펠리 연구 센터
 기 여 율 30/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

아민기(-NH₂)로 표면개질된 자성 나노입자 및 상기 자성 나노입자 표면에 아민기에 의한 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 고정된 그래핀을 포함하는 복합 나노구조체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 금속 또는 금속 산화물인 것인, 복합 나노구조체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만인 것인, 복합 나노구조체.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 그래핀은 그래핀의 산화물을 포함하는 것인, 복합 나노구조체.

청구항 6

삭제

청구항 7

아민기(-NH₂)로 표면개질된 자성 나노입자 표면에 아민기에 의한 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 그래핀이 고정된 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 금속 또는 금속 산화물인 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만인 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 그래핀은 그래핀의 산화물을 포함하는 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩.

청구항 12

삭제

청구항 13

제 7 항에 있어서, 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 um의 선형 구조로 패턴화된 것인, 신경 세포 돌기

방향성 유도용 세포배양칩.

청구항 14

다음 단계를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법:

아민기($-NH_2$)로 표면개질된 자성 나노입자를 포함하는 용액에 그래핀을 투입하는 복합 나노구조체 제조 단계;

복합 나노구조체를 패터닝하는 패터닝 단계; 및

패터닝된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 금속 또는 금속 산화물인 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만인 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

제 14 항에 있어서, 상기 그래핀은 그래핀의 산화물을 포함하는 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제 14 항에 있어서, 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 μm 의 선형 구조로 패터닝된 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법.

청구항 21

제 14 항에 있어서, 상기 패터닝 단계는 복합 나노구조체를 고정시키려는 방향으로 자기장을 인가하여 수행되는 것인, 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법.

청구항 22

기판 상에 패터닝된, 아민기($-NH_2$)로 표면개질된 자성 나노입자 표면에 아민기에 의한 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 그래핀이 고정된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계를 포함하는 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 금속 또는 금속 산화물인 것인, 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만인 것인, 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

제 22 항에 있어서, 상기 그래핀은 그래핀의 산화물을 포함하는 것인, 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

제 22 항에 있어서, 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 um의 선형 구조로 패턴화된 것인, 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

청구항 29

제 22 항에 있어서, 상기 패턴화 단계는 복합 나노구조체를 고정시키려는 방향으로 자기장을 인가하여 수행되는 것인, 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 그래핀 또는 산화그래핀이 자성 나노입자 표면에 화학적 결합을 통해 고정된 복합 나노구조체를 쉽고 빠르게 원하는 기판에 패턴화하여 신경 세포 돌기 성장을 원하는 방향으로 제어하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 재생의학분야에서는 신경 공학 또는 뇌 공학을 이용하여 뇌 네트워크를 모사할 수 있다는 가능성이 인정되고 있다. 이와 관련한 신경세포의 성장 방향 제어 연구에 근거하여, 척수 또는 신경이 손상된 환자들에게 적용하기 위한 새로운 치료 방법들이 개발되고 있다.

[0003] 구체적으로, 도파민 신경세포(Dopaminergic neuron), 가바 신경세포(GABAnergic neuron) 또는 글루타민 신경세포(Glutamatergic neuron)와 같은 다양한 신경 세포의 생성, 신경 돌기의 제어, 신경 회로의 생성, 신경 네트워크 칩의 개발 또는 브레인 올라노이드 생성과 같은 다양한 방법들이 연구되어 왔다. 특히 2차원 신경 세포 돌기 성장 방향 제어 방법은 복잡한 신경 네트워크 안에서 실제로 신경 세포 간의 신호 전달과 밀접한 연관이 있으므로 매우 중요하다.

[0004] 그 중에서도, 대두되고 있는 이차원 물질인 그래핀(Graphene) 및 산화그래핀(Graphene oxide)은 세포의 성장, 부착, 분화 또는 이동에 해당하는 신경 세포의 특성을 제어할 수 있는 명확한 특징을 나타내고 있다. 이 중 가장 흥미로운 특징으로는 인간 신경 줄기세포에서 신경 생성(neurogenesis)과 신경소세포 생성(oligodendrogenesis)의 특성을 증가시키고, 분화된 신경을 특정 방향으로 인도(guiding)할 수 있다는 점이다. 이는 그래핀 또는 산화그래핀의 독특한 물리 화학적 특성에 기인한 것으로 밝혀졌으며, 다양한 종류의 기판에서 신경 세포의 접착력을 향상시키고 기판 표면에서의 성장 인자 또는 단백질의 흡수 또는 반발을 촉진한다.

[0005] 비독성이고 안정적인 생체 적합성 물질인 것으로 보고된 그래핀 또는 산화그래핀을 이용한 패턴화 기술은 기판에 신경 세포를 부착하여 방향성을 제어하는 용도로 활용될 수 있다. 따라서 마이크로 콘택 프린팅 방법을 이용하여 패턴화하는 기존의 방법을 개선하여, 더 쉽고 빠르게 패턴화할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 그래핀 또는 산화그래핀을 쉽고 빠르게 원하는 기판에 패턴화하여 신경 세포 돌기 성장을 원하는 방향으로 제어하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 그래핀과 자성 나노입자의 복합 나노구조체를 자기장을 인가하여 고정할 경우, 상기 복합 나노구조체를 쉽고 빠르게 패턴화하여 신경 세포 돌기 성장

을 조절하기 위한 기판에 적용할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은, 자성 나노입자, 및 상기 자성 나노입자 표면에 화학적 결합을 통해 고정된 탄소질 물질을 포함하는 복합 나노구조체를 제공함에 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, 자성 나노입자 표면에 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 탄소질 물질이 고정된 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩을 제공함에 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 다음 단계를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법을 제공함에 있다: 자성 나노입자를 포함하는 용액에 탄소질 물질을 투입하는 복합 나노구조체 제조 단계; 복합 나노구조체를 패턴화하는 패턴화 단계; 및 패턴화된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 기판 상에 패턴화된, 자성 나노입자 표면에 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 탄소질 물질이 고정된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계를 포함하는 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 그래핀과 자성 나노입자의 복합 나노구조체를 자기장을 인가하여 빠르게 패턴화함으로써 신경 세포 돌기의 방향성을 조절하기 위한 세포배양칩을 제조하는 방법을 포함한다. 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0012] 본 발명의 일 양태는 자성 나노입자, 및 상기 자성 나노입자 표면에 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 고정된 탄소질 물질을 포함하는 복합 나노구조체이다.
- [0013] 상기 자성 나노입자는 자성을 띠는 나노입자를 의미하는 것으로서, 금속 또는 금속 산화물일 수 있다.
- [0014] 상기 금속은 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Ge, Ga, In, Si, Ge, Bi, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au 및 Hg로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe 또는 Zn일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 자성 나노입자로 FeO(산화철 I), Fe₂O₃(산화철 II) 또는 ZnFe₂O₄를 사용할 수 있다.
- [0016] 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만, 10 nm 이상 내지 180 nm 미만, 10 nm 이상 내지 150 nm 미만, 10 nm 이상 내지 120 nm 미만, 10 nm 이상 내지 100 nm 미만, 10 nm 이상 내지 80 nm 미만, 10 nm 이상 내지 50 nm 미만, 10 nm 이상 내지 20 nm 미만, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있고, 예를 들어, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 많은 양의 자성 나노입자를 분포시키기 위해서는 나노입자의 크기가 작아야 하기 때문에, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만의 크기인 것이 적합하다. 너무 작을 경우, 자성 나노입자의 특성상 입자 간의 자력에 의해 응집 현상을 나타낼 수 있다.
- [0017] 상기 자성 나노입자는 아민기(-NH₂)로 표면개질된 것일 수 있다. 자성 나노입자를 아민기로 표면개질함으로써, 자성 나노입자를 탄소질 물질과 반응시켜 화학적 결합을 유도하고 자성 나노입자의 표면에 탄소질 물질이 화학적 결합을 이룬 복합 나노구조체를 형성할 수 있다.
- [0018] 상기 표면개질을 위해서는 아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; 이하 APTES)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 탄소질 물질은 탄소질 물질의 산화물을 포함하는 것일 수 있고, 상기 탄소질 물질은 그래핀, 탄소나노섬유, 탄소나노튜브 또는 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 탄소질 물질은 산화그래핀일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태는 자성 나노입자 표면에 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 탄소질 물질이 고정된 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩이다.
- [0021] 상기 자성 나노입자는 자성을 띠는 나노입자를 의미하는 것으로서, 금속 또는 금속 산화물일 수 있다.
- [0022] 상기 금속은 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Ge, Ga, In, Si, Ge, Bi, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg로 이루어지는 군으

로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. Fe가 상대적으로 강한 자력을 나타내기 때문에, Fe를 사용하는 것이 바람직하다.

- [0023] 상기 금속 산화물은 FeO(산화철 I), Fe_2O_3 (산화철 II), ZnFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , Co_3O_4 , NiO 및 $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe_2O_3 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만, 10 nm 이상 내지 180 nm 미만, 10 nm 이상 내지 150 nm 미만, 10 nm 이상 내지 120 nm 미만, 10 nm 이상 내지 100 nm 미만, 10 nm 이상 내지 80 nm 미만, 10 nm 이상 내지 50 nm 미만, 10 nm 이상 내지 20 nm 미만, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있고, 예를 들어, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 많은 양의 자성 나노입자를 분포시키기 위해서는 나노입자의 크기가 작아야 하나, 너무 작을 경우, 자성 나노입자의 특성상 입자 간의 자력에 의해 응집 현상을 나타낼 수 있기 때문에, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만의 크기인 것이 적합하다.
- [0025] 상기 자성 나노입자의 크기는 균일한 것이 바람직하며, 입자의 크기가 균일한 경우 자기장을 인가했을 때 패턴의 형성이 균일하게 이루어지며 이를 통해 더욱 효과적으로 세포의 성장 방향성을 제어할 수 있다.
- [0026] 상기 자성 나노입자는 아민기($-\text{NH}_2$)로 표면개질된 것일 수 있다. 자성 나노입자를 아민기로 표면개질함으로써, 자성 나노입자를 탄소질 물질과 반응시켜 화학적 결합을 유도하고 자성 나노입자의 표면에 탄소질 물질이 화학적 결합을 이룬 복합 나노구조체를 형성할 수 있다.
- [0027] 상기 표면개질을 위해서는 아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; 이하 APTES)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 탄소질 물질은 탄소질 물질의 산화물을 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 탄소질 물질은 그래핀, 탄소나노섬유, 탄소나노튜브 또는 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 산화그래핀일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 μm , 50 내지 100 μm , 75 내지 100 μm 또는 100 μm 의 선형 구조로 패턴화될 수 있고, 예를 들어, 폭 100 μm 의 선형 구조로 패턴화되어 상기 세포배양칩에 적용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 폭의 두께가 넓어질수록 패턴화된 복합 나노구조체 상에 배양되는 신경 세포 간의 신호 전달이 강화되는 효과가 있으나, 폭의 두께를 100 μm 이상으로 적용했을 때 발생하는 추가적인 상승효과는 없다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩의 제조방법이다:
- [0032] 자성 나노입자를 포함하는 용액에 탄소질 물질을 투입하는 복합 나노구조체 제조 단계; 복합 나노구조체를 패턴화하는 패턴화 단계; 및 패턴화된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계.
- [0033] 상기 자성 나노입자는 자성을 띠는 나노입자를 의미하는 것으로서, 금속 또는 금속 산화물일 수 있다.
- [0034] 상기 금속은 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Ge, Ga, In, Si, Ge, Bi, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au 및 Hg로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. Fe가 상대적으로 강한 자력을 나타내기 때문에, Fe를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0035] 상기 금속 산화물은 FeO(산화철 I), Fe_2O_3 (산화철 II), ZnFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , Co_3O_4 , NiO 및 $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe_2O_3 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만, 10 nm 이상 내지 180 nm 미만, 10 nm 이상 내지 150 nm 미만, 10 nm 이상 내지 120 nm 미만, 10 nm 이상 내지 100 nm 미만, 10 nm 이상 내지 80 nm 미만, 10 nm 이상 내지 50 nm 미만, 10 nm 이상 내지 20 nm 미만, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있고, 예를 들어, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있다. 많은 양의 자성 나노입자를 분포시키기 위해서는 나노입자의 크기가 작아야 하나, 너무 작을 경우, 자성 나노입자의 특성상 입자 간의 자력에 의해 응집 현상을 나타낼 수 있기 때문에, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만의 크기인 것이 적합하다.
- [0037] 상기 자성 나노입자의 크기는 균일한 것이 바람직하며, 입자의 크기가 균일한 경우 자기장을 인가했을 때 패턴의 형성이 균일하게 이루어지며 이를 통해 더욱 효과적으로 세포의 성장 방향성을 제어할 수 있다.

- [0038] 상기 자성 나노입자는 아민기(-NH₂)로 표면개질된 것일 수 있다. 자성 나노입자를 아민기로 표면개질함으로써, 자성 나노입자를 탄소질 물질과 반응시켜 화학적 결합을 유도하고 자성 나노입자의 표면에 탄소질 물질이 화학적 결합을 이룬 복합 나노구조체를 형성할 수 있다.
- [0039] 상기 표면개질을 위해서는 아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; 이하 APTES)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 탄소질 물질은 탄소질 물질의 산화물을 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 탄소질 물질은 그래핀, 탄소나노섬유, 탄소나노튜브 또는 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 산화그래핀일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 μm , 50 내지 100 μm , 75 내지 100 μm 또는 100 μm 의 선형 구조로 패턴화될 수 있고, 예를 들어, 폭 100 μm 의 선형 구조로 패턴화되어 상기 세포배양칩에 적용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 패턴화 단계는 복합 나노구조체를 고정시키려는 방향으로 자기장을 인가하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 자기장은 0.01 내지 1.00 T, 0.01 내지 0.50 T, 0.01 내지 0.20 T, 0.02 내지 1.00 T, 0.02 내지 0.50 T, 0.02 내지 0.20 T, 0.05 내지 1.00 T, 0.05 내지 0.50 T, 0.05 내지 0.20 T, 0.10 내지 1.00 T 또는 0.10 내지 0.50 T, 예를 들어, 0.10 내지 0.20 T의 세기로 인가할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 자기장은 0.5분 내지 30분, 0.5분 내지 20분, 0.5분 내지 10분, 0.5분 내지 7분, 1분 내지 30분, 1분 내지 20분, 1분 내지 10분, 1분 내지 7분, 3분 내지 30분, 3분 내지 20분 또는 3분 내지 10분, 예를 들어, 3분 내지 7분 동안 인가할 수 있다.
- [0046] 상기 자기장을 인가하는 시간에 따라 복합 나노구조체의 패턴화 정도가 달라질 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태는 기관 상에 패턴화된, 자성 나노입자 표면에 화학적 결합(chemical bonding)을 통해 탄소질 물질이 고정된 복합 나노구조체에 세포를 접촉시켜 배양하는 세포 배양 단계를 포함하는 신경 세포 돌기의 방향성 유도방법이다.
- [0048] 상기 자성 나노입자는 자성을 띠는 나노입자를 의미하는 것으로서, 금속 또는 금속 산화물일 수 있다.
- [0049] 상기 금속은 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Ge, Ga, In, Si, Ge, Bi, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. Fe가 상대적으로 강한 자력을 나타내기 때문에, Fe를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0050] 상기 금속 산화물은 FeO(산화철 I), Fe₂O₃(산화철 II), ZnFe₂O₄, MnFe₂O₄, Co₃O₄, NiO 및 CuZnFe₂O₄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, Fe₂O₃일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 상기 자성 나노입자의 크기는 10 nm 이상 내지 200 nm 미만, 10 nm 이상 내지 180 nm 미만, 10 nm 이상 내지 150 nm 미만, 10 nm 이상 내지 120 nm 미만, 10 nm 이상 내지 100 nm 미만, 10 nm 이상 내지 80 nm 미만, 10 nm 이상 내지 50 nm 미만 또는 10 nm 이상 내지 20 nm 미만, 예를 들어, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만일 수 있다.
- [0052] 많은 양의 자성 나노입자를 분포시키기 위해서는 나노입자의 크기가 작아야 하나, 너무 작을 경우, 자성 나노입자의 특성상 입자 간의 자력에 의해 응집 현상을 나타낼 수 있기 때문에, 10 nm 이상 내지 15 nm 미만의 크기인 것이 적합하다.
- [0053] 자성 나노입자의 크기는 균일한 것이 바람직하며, 입자의 크기가 균일한 경우 자기장을 인가했을 때 패턴의 형성이 균일하게 이루어지며 이를 통해 더욱 효과적으로 세포의 성장 방향성을 제어할 수 있다.
- [0054] 상기 자성 나노입자는 아민기(-NH₂)로 표면개질된 것일 수 있다. 자성 나노입자를 아민기로 표면개질함으로써, 자성 나노입자를 탄소질 물질과 반응시켜 화학적 결합을 유도하고 자성 나노입자의 표면에 탄소질 물질이 화학적 결합을 이룬 복합 나노구조체를 형성할 수 있다.
- [0055] 상기 표면개질을 위해서는 아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; 이하 APTES)를 사용할

수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 상기 탄소질 물질은 탄소질 물질의 산화물을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 탄소질 물질은 그래핀, 탄소나노섬유, 탄소나노튜브 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 산화그래핀일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 상기 복합 나노구조체는 폭 25 내지 100 μm , 50 내지 100 μm , 75 내지 100 μm 및 100 μm 의 선형 구조로 패터닝될 수 있고, 예를 들어, 폭 100 μm 의 선형 구조로 패터닝되어 상기 세포배양칩에 적용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 상기 패터닝 단계는 복합 나노구조체를 고정시키려는 방향으로 자기장을 인가하여 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0060] 본 발명은 그래핀 또는 산화그래핀이 자성 나노입자 표면에 화학적 결합을 통해 고정된 복합 나노구조체를 포함하는 신경 세포 돌기 방향성 유도용 세포배양칩 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 복합 나노구조체를 이용함으로써, 자기장을 인가하여 원하는 기관에 쉽고 빠르게 패터닝할 수 있고, 세포 독성이 나타나지 않아 주변 세포 또는 조직에 손상을 가하지 않고 세포의 성장을 제어하는 데 유용하게 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 본 발명에 따른 자성/그래핀 복합 나노구조체 합성 및 수평방향 성장 유도 모식도이다.

도 2a는 자성/그래핀 복합 나노구조체의 투사전자현미경(transmission electron microscope; TEM) 사진이다.

도 2b는 자성/그래핀 복합 나노구조체의 동적빛산란(Dynamic light scattering, DLS) 결과에 따른 크기 분포도이다.

도 3a는 자기장을 인가하여 자성/그래핀 복합 나노구조체를 패터닝한 기관의 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; 이하 SEM) 사진이다.

도 3b는 자기장을 인가하지 않고 자성/그래핀 복합 나노구조체를 패터닝한 기관의 SEM 사진이다.

도 4a는 기관 위에 선형으로 패터닝된 자성/그래핀 복합 나노구조체에 대한 라만 이미지(Raman image) 측정 결과이다.

도 4b는 상기 도 4a에서 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 (i)로 표시된 위치에서의 라만 피크(Raman peak)를 나타낸 그래프이다.

도 4c는 상기 도 4a에서 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하지 않는 (ii)로 표시된 위치에서의 라만 피크(Raman peak)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 자성/그래핀 복합 나노구조체로 패터닝한 25, 50, 75 및 100 μm 두께의 선형 패턴 상에 SHSY-5Y 세포를 배양했을 때의 광학 현미경 사진과 이를 형광 염색한 후 형광 현미경으로 촬영한 이미지이다(핵: Hoechst, blue, 섬유성 액틴(Filamentous actin; 이하 F-액틴): Phalloidin, red).

도 6a는 상기 도 5의 결과 중 핵 및 F-액틴을 염색한 사진이다.

도 6b는 상기 도 6a의 기관에서 (i)로부터 (ii)까지의 F-액틴의 신호의 유무를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 자성/그래핀 복합 나노구조체로 패터닝한 25, 50, 75 및 100 μm 두께의 선형 패턴 상에 SHSY-5Y 세포를 배양했을 때의 광학 현미경 사진과 이를 형광 염색한 후 공초점 현미경(Confocal Microscope)으로 촬영한 이미지이다(핵: Hoechst, blue, 세포골격: MAP-2, red, 시냅스: 시냅신, green).

도 8은 상기 도 7에서 25, 50, 75 및 100 μm 두께의 선형 패턴에 따른 세포골격과 시냅스로부터 발현되는 형광의 세기를 나타낸 그래프이다.

도 9a는 100 μm 두께의 자성/그래핀 복합 나노구조체 선형 패턴을 정렬한 후 SH-SY5Y 세포를 배양했을 때의 신호전달 모식도이다.

도 9b는 100 μm 두께의 자성/그래핀 복합 나노구조체 선형 패턴을 20, 40, 60, 80 및 100 μm 씩 엇갈리게 패터닝한 후 SH-SY5Y 세포를 배양했을 때의 신호전달 모식도이다.

도 10은 자성/그래핀 복합 나노구조체가 100 um 두께로 정렬하여 선형으로 패터화된 기판, 20, 40, 60, 80 및 100 um씩 엇갈려 선형으로 패터화된 기판, 및 패터화되지 않은 기판에서 각각 SH-SY5Y 세포를 배양했을 때의 공초점 현미경 촬영 이미지이다.

도 11은 자성/그래핀 복합 나노구조체가 100 um 두께로 정렬하여 선형으로 패터화된 기판, 20, 40, 60, 80 및 100 um씩 엇갈려 선형으로 패터화된 기판, 및 패터화되지 않은 기판에서 각각 SH-SY5Y 세포를 배양했을 때의 MAP-2 및 시냅신으로부터 발현되는 형광 세기를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0064] **실시예 1: 자성/그래핀 복합 나노구조체의 제조**
- [0065] 5 mg/mL 의 농도로 H₂O에 녹아 있는 10 nm 크기의 Fe₂O₃를 10배수 중량의 증류수(distilled water)에 희석시켰다. 이후 에탄올에 5(v/v)% 농도로 희석된 3-아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; APTES)를 0.01(v/v)% 첨가하여 아민기(NH₂)로 표면개질된 자성 나노입자를 제작하였다.
- [0066] 산화그래핀 나노 플레이크(nano flake)를 13200 rpm 조건에서 30분 동안 원심분리하여 상층액만 수거하고, 아민기로 표면개질된 자성 나노입자의 10배수 중량으로 투입한 후 교반기에 넣어 25℃, 800 rpm 조건에서 30분 동안 반응시킴으로써 자성/그래핀 복합 나노구조체를 제조하였다.
- [0067] 도 2a에서 확인할 수 있듯이, 투사전자현미경(transmission electron microscope; TEM)을 이용하여 자성 나노입자 표면에 형성된 산화그래핀 막을 관찰함으로써 자성/그래핀 복합 나노구조체가 합성되었음을 확인하였다. 산화그래핀 막과 자성 나노입자 모두 크기가 매우 작은 전도성 물질이므로 TEM 이미징을 통해 자성/그래핀 복합 나노구조체의 형성 여부를 확인할 수 있었다.
- [0068] 도 2b에서 확인할 수 있듯이, 동적빛산란(Dynamic light scattering; DLS)을 이용하여 합성된 자성/그래핀 복합 나노구조체는 3.5%가 193.5 nm, 82%가 220 nm, 14.5%가 247 nm인 분포를 나타냈다. 따라서 제조된 자성/그래핀 복합 나노구조체가 평균 220 nm의 균일한 크기를 가짐을 확인하였다.
- [0070] **실시예 2: 자성/그래핀 복합 나노구조체의 패터화**
- [0071] 기존의 포토리소그래피 기술을 이용하여 실리콘 웨이퍼(wafer)에 포토리지스트 마이크로패턴을 패터화하였다. 그 후 데시케이터 안에서 패터화된 실리콘 웨이퍼에 6시간 동안 트리클로로실란(heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydroecyl; trichlorosilane)으로 코팅하였다. 이는 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; 이하 PDMS)을 부착 혹은 떼어냈을 때 실리콘 웨이퍼에 손상이 가지 않게 하기 위함이다.
- [0072] 이후 PDMS를 패터화된 웨이퍼에 부은 뒤 70℃ 오븐에서 4시간 동안 큐어링(curing)시켰다. 실리콘 웨이퍼에서 PDMS를 떼어낸 후, 자성/그래핀 복합 나노구조체를 부착시키기 위해 PDMS에 산소 플라즈마(oxygen plasma) 처리를 하였다.
- [0073] 증류수에 5.0 mg/mL의 농도로 녹아있는 자성/그래핀 복합 나노구조체 용액을 스핀 코팅기를 사용하여 500 rpm의 조건에서 30초 동안 슬라이드 글래스에 코팅하였다. 이후 슬라이드 글래스에 코팅된 자성/그래핀 복합 나노구조체를 앞서 만들어진 PDMS 스탬프에 접촉시켜 부착시켰다. 자성/그래핀 복합 나노구조체가 부착된 PDMS 스탬프를 이용해 원하는 기판에 자성/그래핀 복합 나노구조체를 접촉시키고, 반대 면에 자석을 이용하여 0.2 T 세기의 자기장을 5분 동안 가함으로써 기판 상에 자성/그래핀 복합 나노구조체를 패터화하였다. 자기장의 존재 유무에 따라 패터화된 기판을 비교하기 위해 투사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)으로 관찰하였다.
- [0074] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, 자기장을 인가하여 자성/그래핀 복합 나노구조체를 선형으로 패터화할 수 있었다.
- [0075] 반면 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 자기장을 인가하지 않은 경우 도 3a에서 볼 수 있는 것과 같이 선명하게 선형으로 패터화된 자성/그래핀 복합 나노구조체를 관찰할 수 없었다.
- [0076] 그러므로 자기장을 인가하였을 때 자성/그래핀 복합 나노구조체의 선형 패터화가 효과적으로 이루어진다는 점을 알 수 있다.

[0078] **실시예 3: 자성/그래핀 복합 나노구조체 패턴화 영역의 확인**

[0079] 기관 상에 선형으로 패턴화된 자성/그래핀 복합 나노구조체에서, 그래핀의 존재 여부를 라만 이미징을 통해 확인하였다.

[0080] 도 4a와 같이 선형으로 패턴화된 기관 상에서, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 영역(i)과 존재하지 않는 영역(ii)으로 나누어 라만 이미징을 수행하였다.

[0081] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 영역(i)에서는 산화그래핀(graphene oxide)의 특정 라만 피크(Raman peak, D-band : 1350 cm^{-1} , G-band : 1600 cm^{-1})를 보였다.

[0082] 도 4c에서 확인할 수 있듯이, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하지 않는 영역(ii)에서는 산화그래핀의 특정 라만 피크가 나타나지 않았다.

[0083] 이로부터 기관 상에 선형으로 패턴화된 자성/그래핀 복합 나노구조체에 산화그래핀이 존재함을 확인하였다.

[0085] **실시예 4: 세포의 성장 방향성 제어**

[0086] 다양한 두께의 선형 패턴(25, 50, 75 및 $100\text{ }\mu\text{m}$)을 적용하여 패턴화한 기관상에 인간의 신경아세포종(neuroblastoma)인 SHSY-5Y(ATCC, Manassas, VA, USA)를 배양하였다. 배지로는 DMEM(Dubelco's Modified Eagle Medium)에 10(v/v)% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1(v/v)% 페니실린(penicillin)을 첨가한 혼합물을 사용하였다. 세포의 농도는 $1.0 \times 10^5\text{ cells/mL}$ 로 적용하였으며 2일 동안 배양하였다.

[0087] 이후 핵(Hoechst, blue) 및 섬유성 액틴(Filamentous actin; 이하 F-액틴, Phalloidin, red)을 형광 염색하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0088] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 영역에서는 SHSY-5Y 세포가 더 잘 고정되고, 그렇지 않은 부분에서는 세포가 거의 자라지 않았음을 광학 현미경(Phase)을 통해 관찰하였다. 배양한 SHSY-5Y 세포가 패턴화된 부분에만 잘 고정되어 있는지는 F-actin의 형광세기(Phalloidin)로 확인하였다. 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 영역에서는 세포로부터의 신호가 나타났고, 구조체가 없는 부분에서는 신호가 나타나지 않음을 확인하였다.

[0089] 이로부터, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 영역은 나노구조체에 의한 표면적 증가, 산화그래핀의 세포막과 방향족 탄소 화합물 간의 결합력 등에 의해, 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하지 않는 부분에 비해 상대적으로 세포가 잘 붙어 성장하는 것을 알 수 있었다.

[0090] 결론적으로, 자성/그래핀 복합 나노구조체를 패턴화하는 방법을 통해 특정 영역에서 신경세포가 배양되도록 제어하고, 수평방향으로 세포의 성장 방향성이 제어되는 특성을 이용함으로써, 타겟 세포의 수평방향 네트워크 형성을 유도할 수 있다.

[0091] 도 6a와 같이 도 5 중에서 핵 및 F-액틴을 함께 관찰한 기관을 기준으로, (i) 지점으로부터 (ii) 지점까지를 표시하고, 두 지점 사이에서 F-액틴의 신호 유무를 형광현미경(Eclipse Ti-U, Nikon)으로 측정하였다.

[0092] 도 6b는 상기 도 6a에 표시된 (i) 지점으로부터 (ii) 지점까지의 사이에서 F-액틴의 신호 유무를 나타내는 그래프이다.

[0093] 자성/그래핀 복합 나노구조체가 존재하는 부분에서는 F-액틴 신호가 나타났고, 존재하지 않는 부분에서는 신호가 나타나지 않았으므로, 신경세포가 자성/그래핀 복합 나노구조체가 있는 부분에만 부착되는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] **실시예 5: 시냅스의 형성 방향성 제어**

[0096] 상기 실시예 3의 방법으로 자성/그래핀 복합 나노구조체가 패턴화된 기관 상에 SH-SY5Y 세포를 배양하고, 핵(Hoechst로 염색), 세포골격(cytoskeleton, MAP-2로 염색) 및 시냅스(rabbit monoclonal[YE269](Synaptophysin, Abcam, USA)로 염색)를 형광 염색하여 공초점현미경으로 관찰하였다.

[0097] 도 7 및 도 8에서 확인할 수 있듯이, 동일 면적당 시냅신 및 MAP-2로부터 나타나는 형광의 세기를 측정한 결과, $100\text{ }\mu\text{m}$ 의 두께의 선형 패턴에서 가장 강한 세기를 나타냈다.

[0098] 신경세포에서 전기 또는 화학적 신호의 전달은 시냅스를 통해 이루어지는데, 시냅신 항체를 사용하면 시냅스의

뉴런 상호 간의 접합관계나 접합부위에 특이적으로 결합시킬 수 있으므로, 염색을 통해 시냅스의 특정 부위를 확인할 수 있다. 따라서 시냅신의 형광 발현 세기가 크다는 것은 세포 또는 뉴런 간의 연결이 잘 되어 있고 신호가 잘 전달된다는 것을 뜻한다.

[0099] 이로부터, 100 um 두께의 선형 패턴에서 가장 시냅스 형성이 많이 일어나며 세포 신호의 연결이 우수하다는 점을 알 수 있었다.

[0101] **실시예 6: 선형 패턴의 엇갈림 정도에 따른 시냅신 형성 정도의 확인**

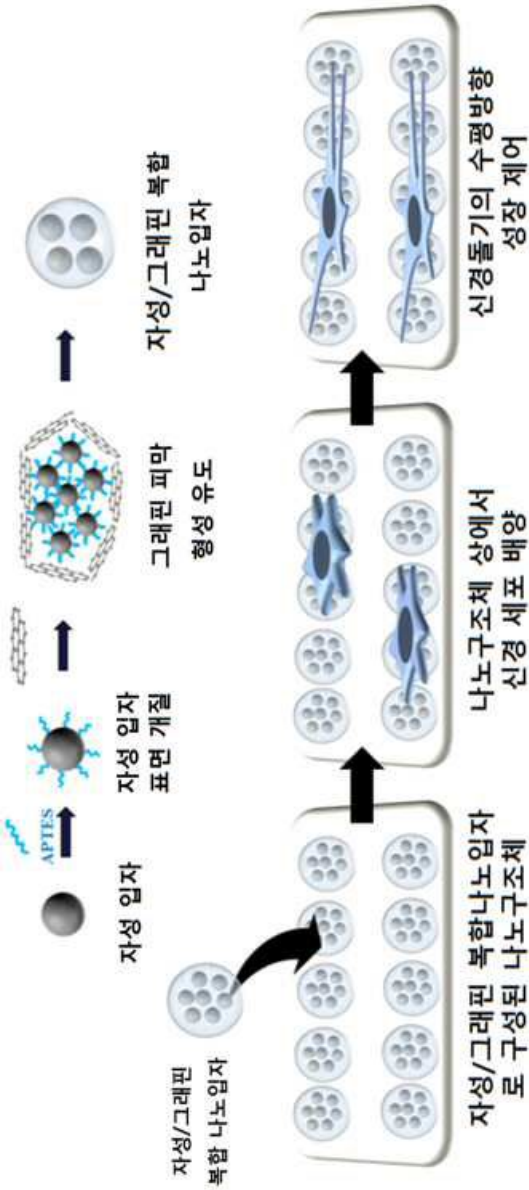
[0102] 도 9a 및 9b와 같이, 자성/그래핀 복합 나노구조체 선형 패턴을 정확하게 정렬한 경우와 엇갈리게 정렬한 경우에서의 신호전달 정도를 확인하였다.

[0103] 구체적으로, 100 um 두께의 선형 패턴을 각각 20, 40, 60, 80 및 100 um만큼 엇갈리게 패턴화한 기관 상에 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 SH-SY5Y 세포를 배양하였다. 이후 선형 패턴의 엇갈림 정도가 시냅스 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

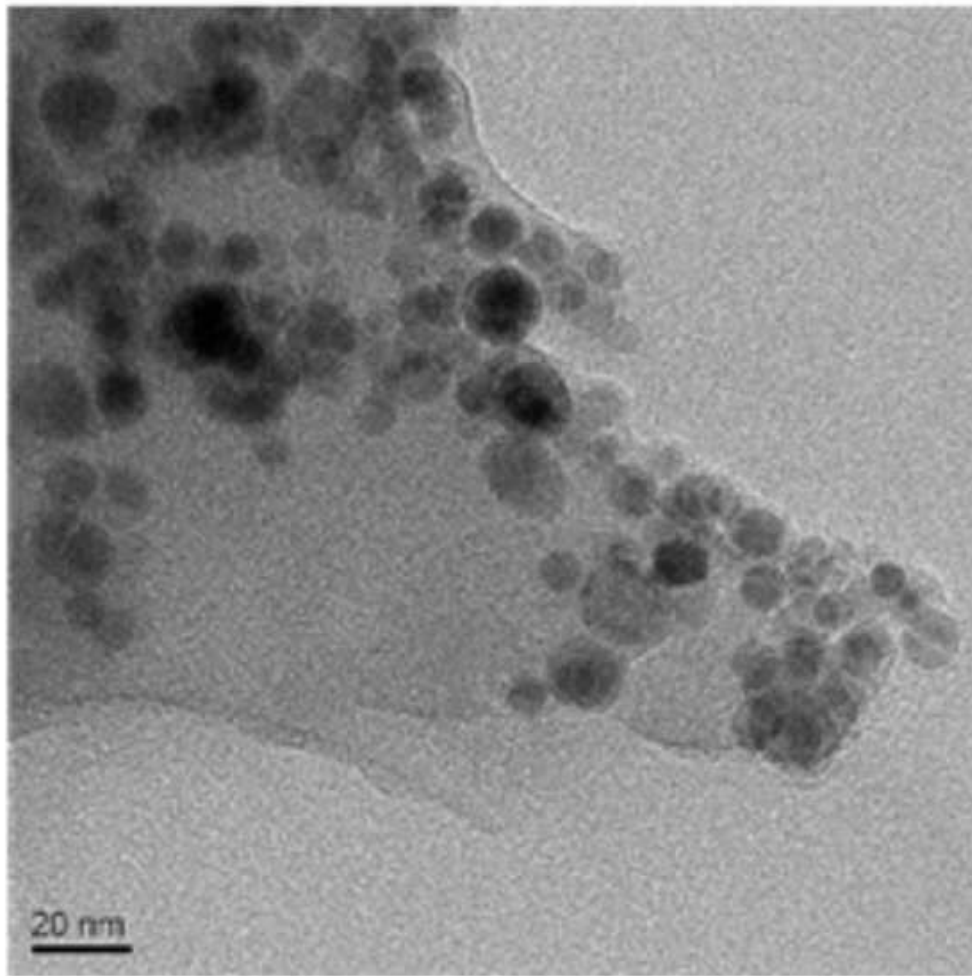
[0104] 도 10 및 11에서 확인할 수 있듯이, 핵, 세포골격 및 시냅신을 형광 염색하여 관찰한 결과 선형 패턴이 엇갈리지 않았을 때 가장 많은 시냅스 형성이 이루어지고 세포 신호의 전달이 우수하다는 점을 공초점 현미경 관찰 결과 및 MAP-2과 시냅신에 대한 형광 세기의 측정을 통해 확인할 수 있었다.

도면

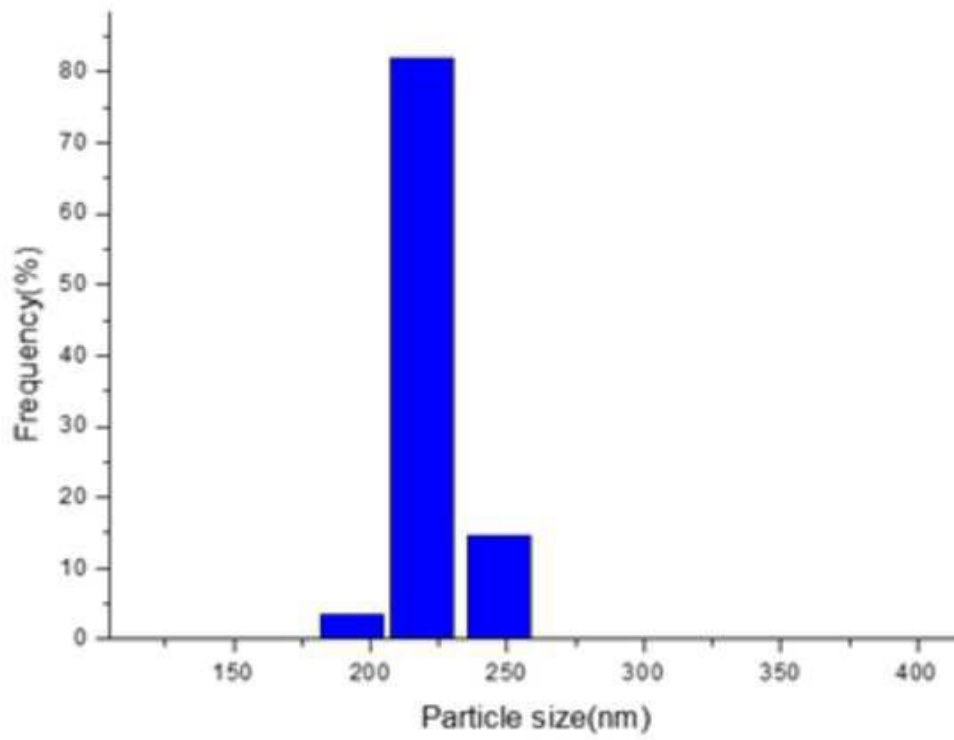
도면1



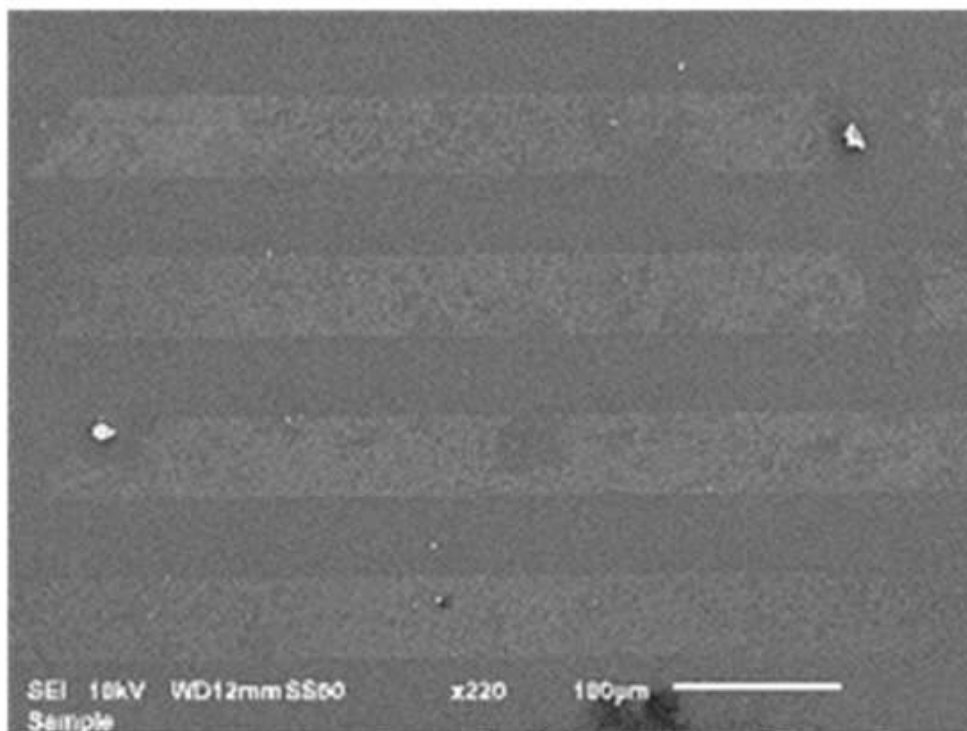
도면2a



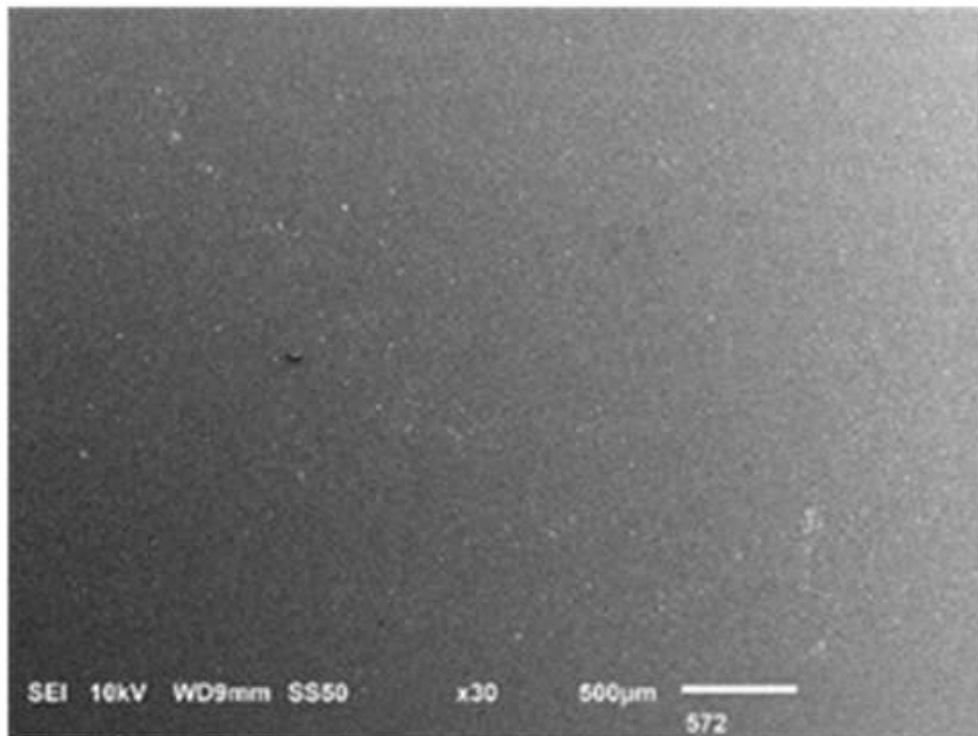
도면2b



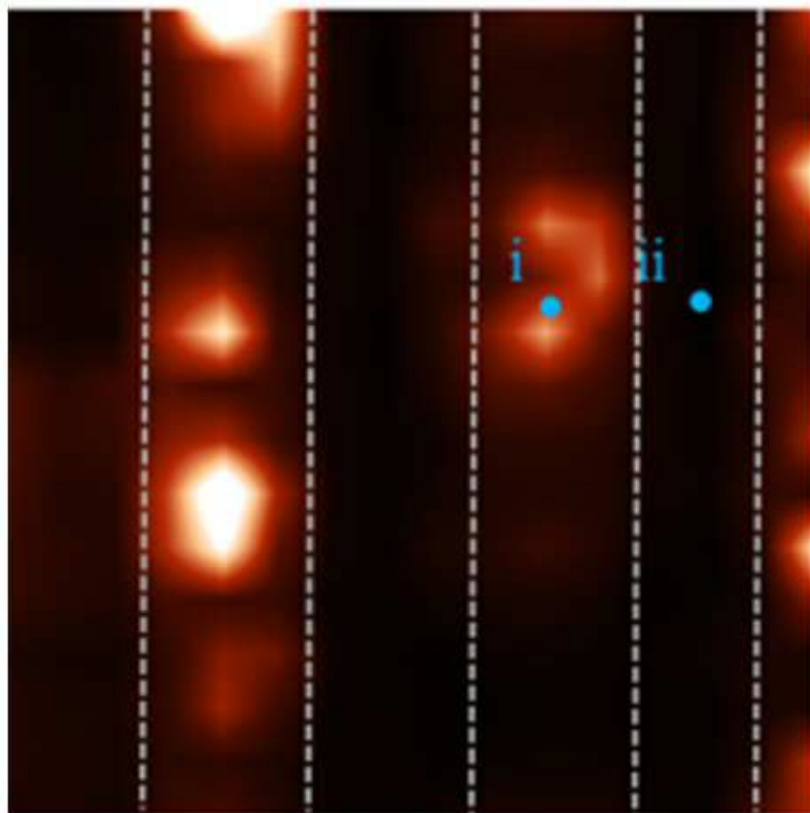
도면3a



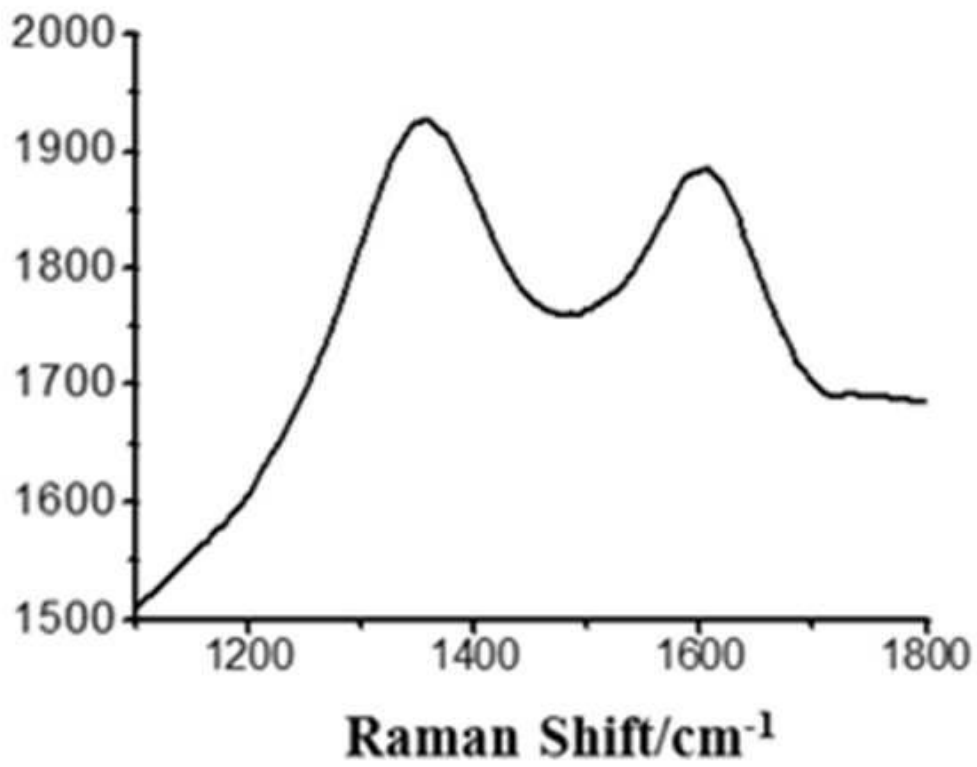
도면3b



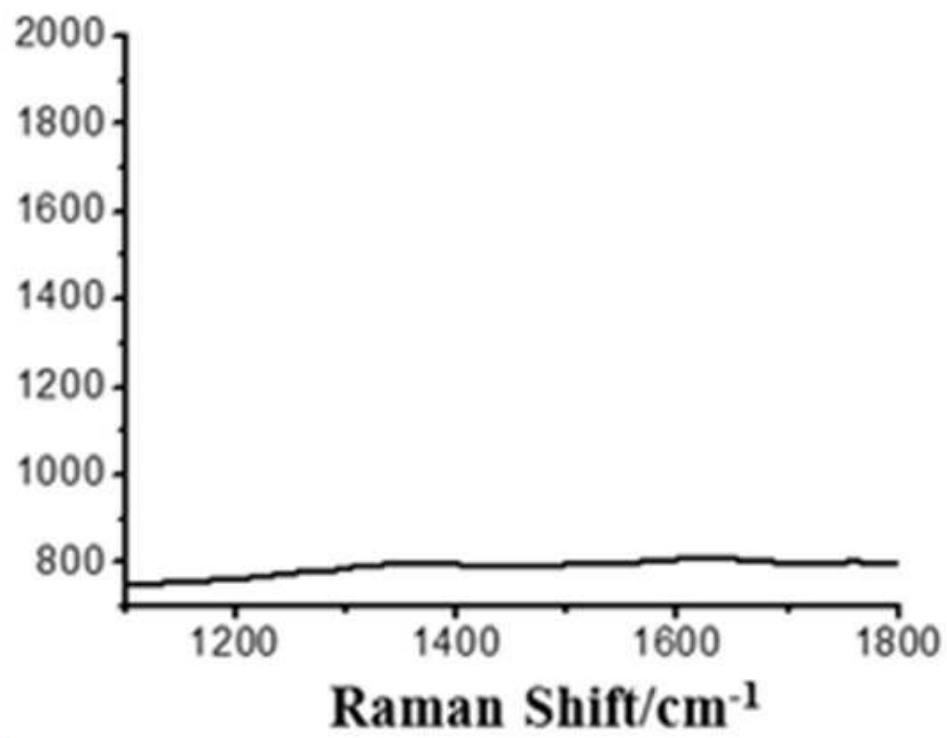
도면4a



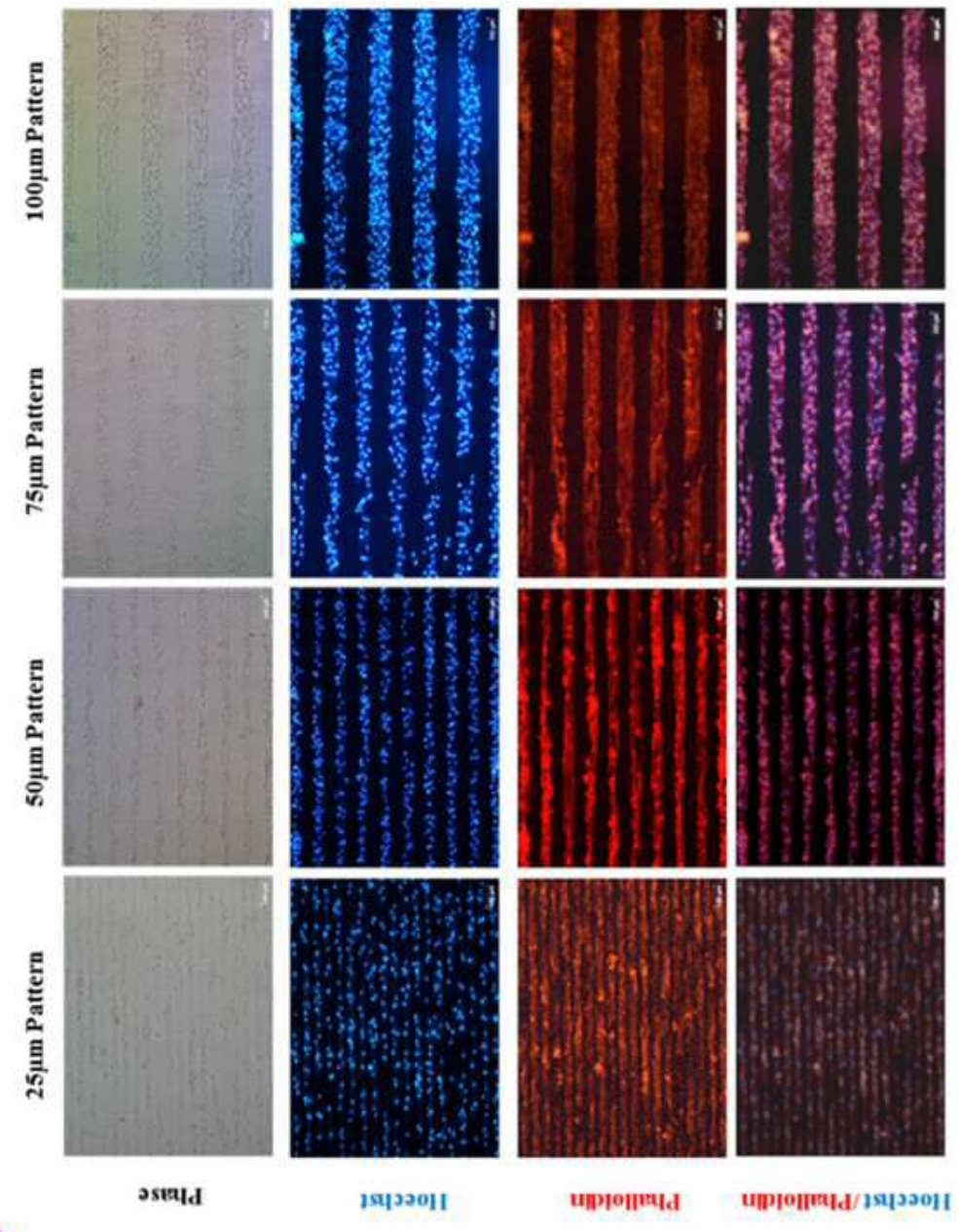
도면4b



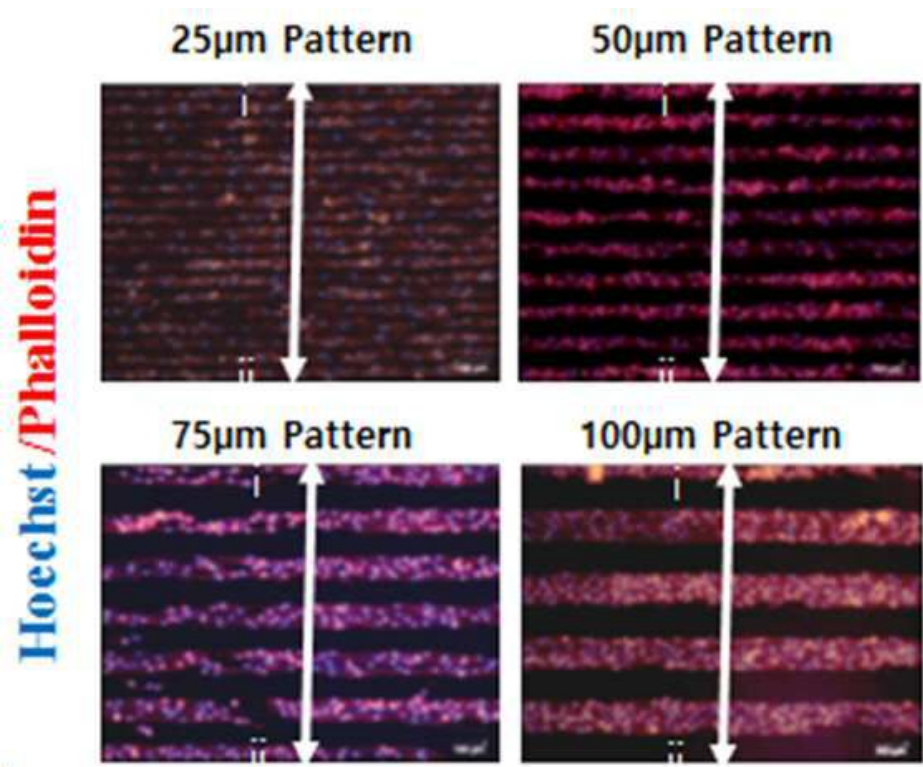
도면4c



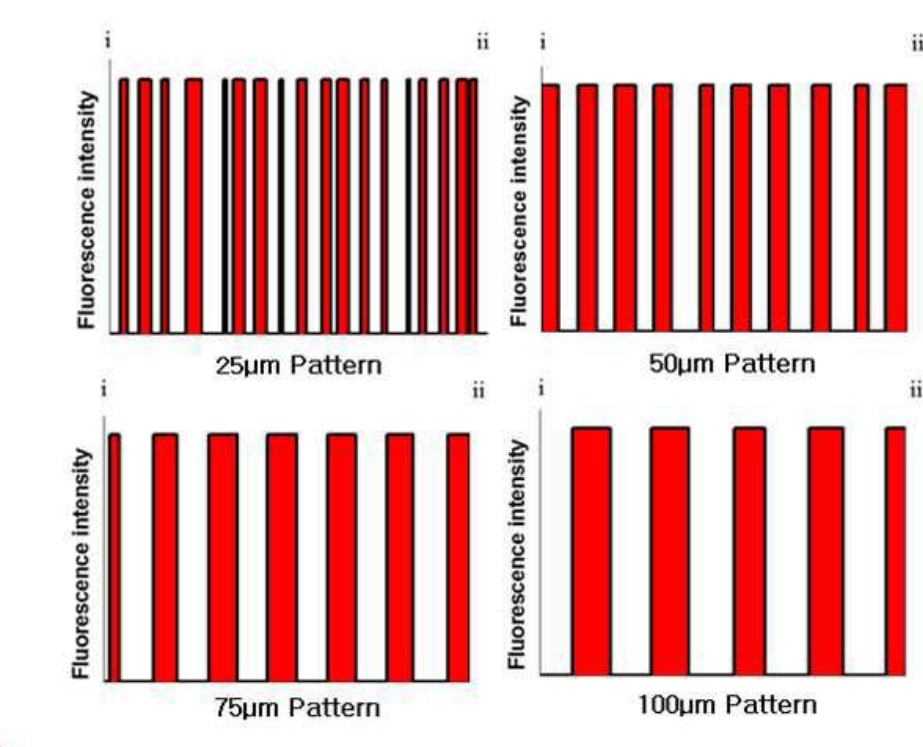
도면5



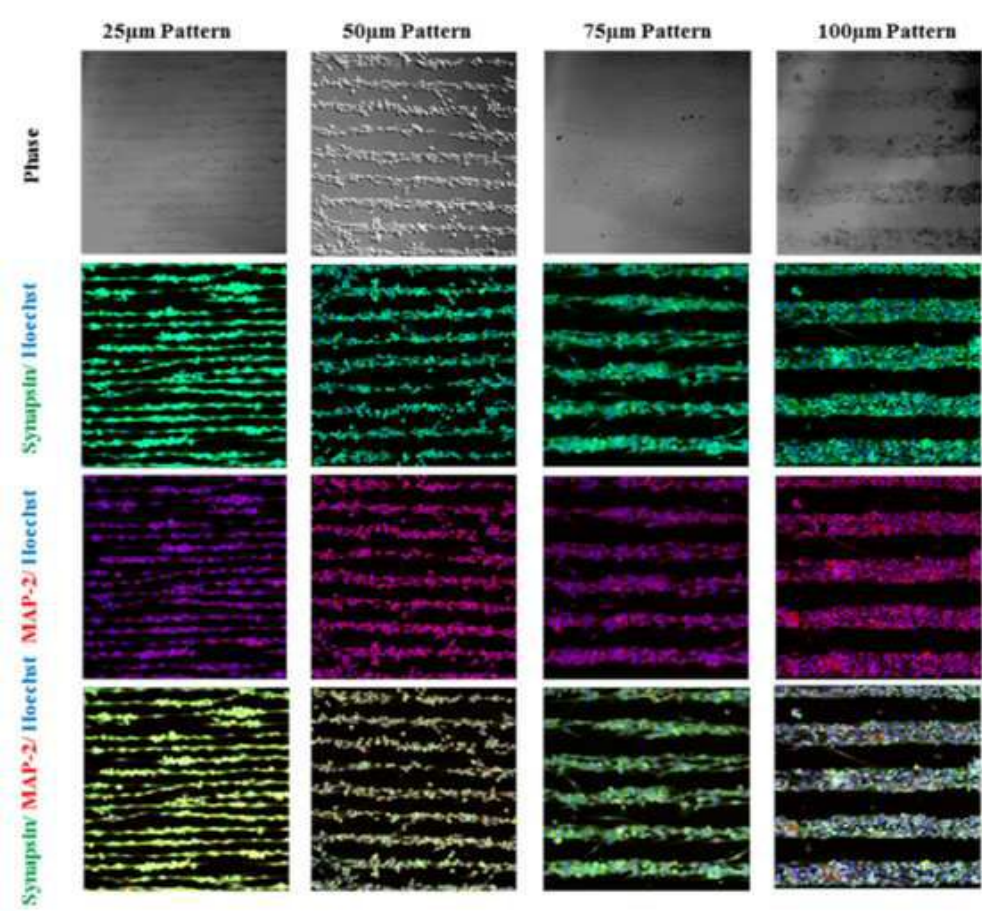
도면6a



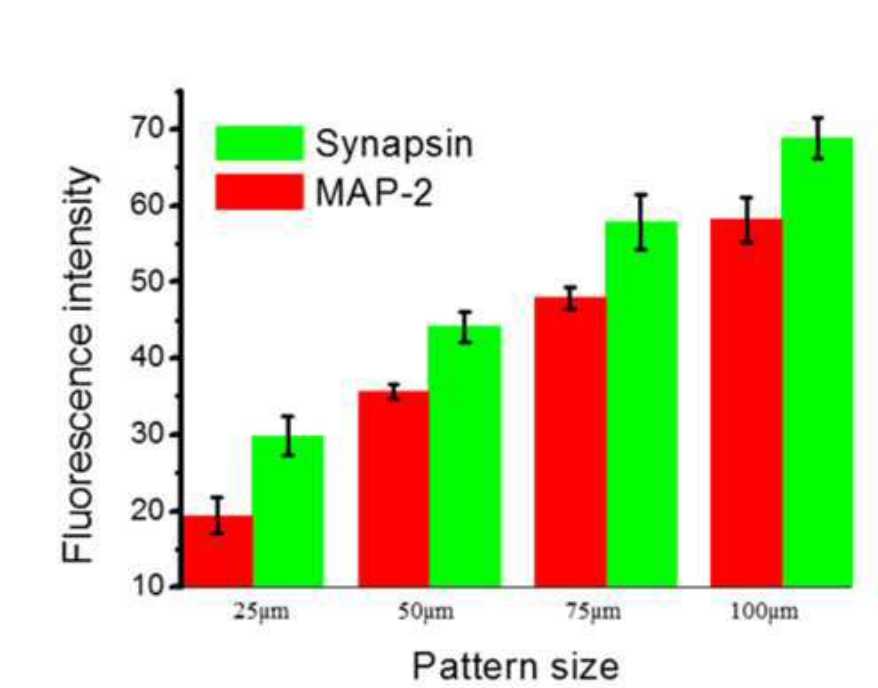
도면6b



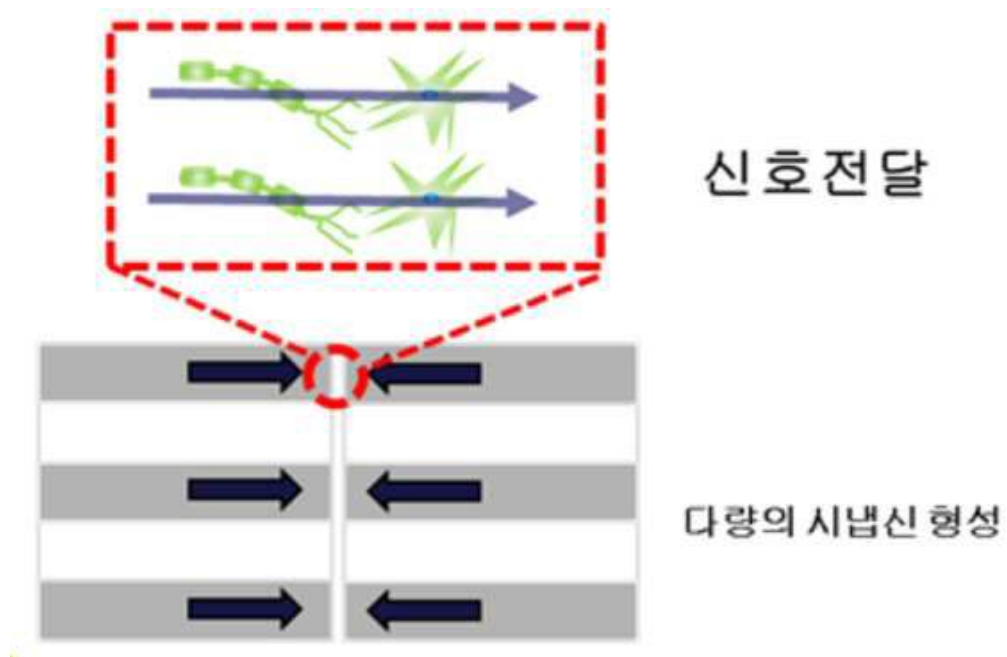
도면7



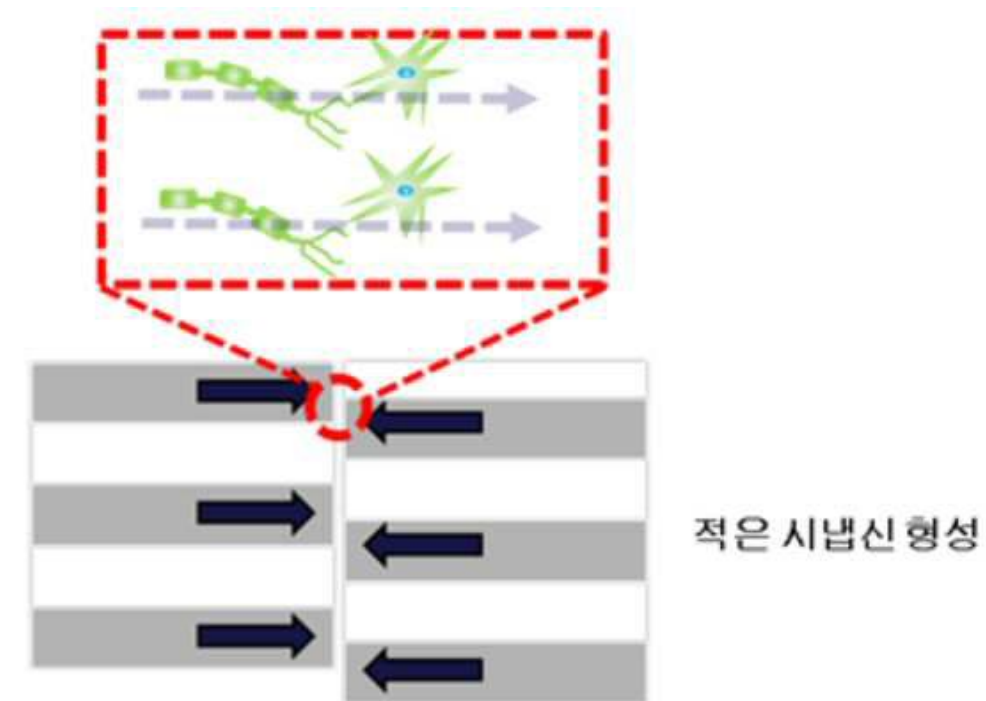
도면8



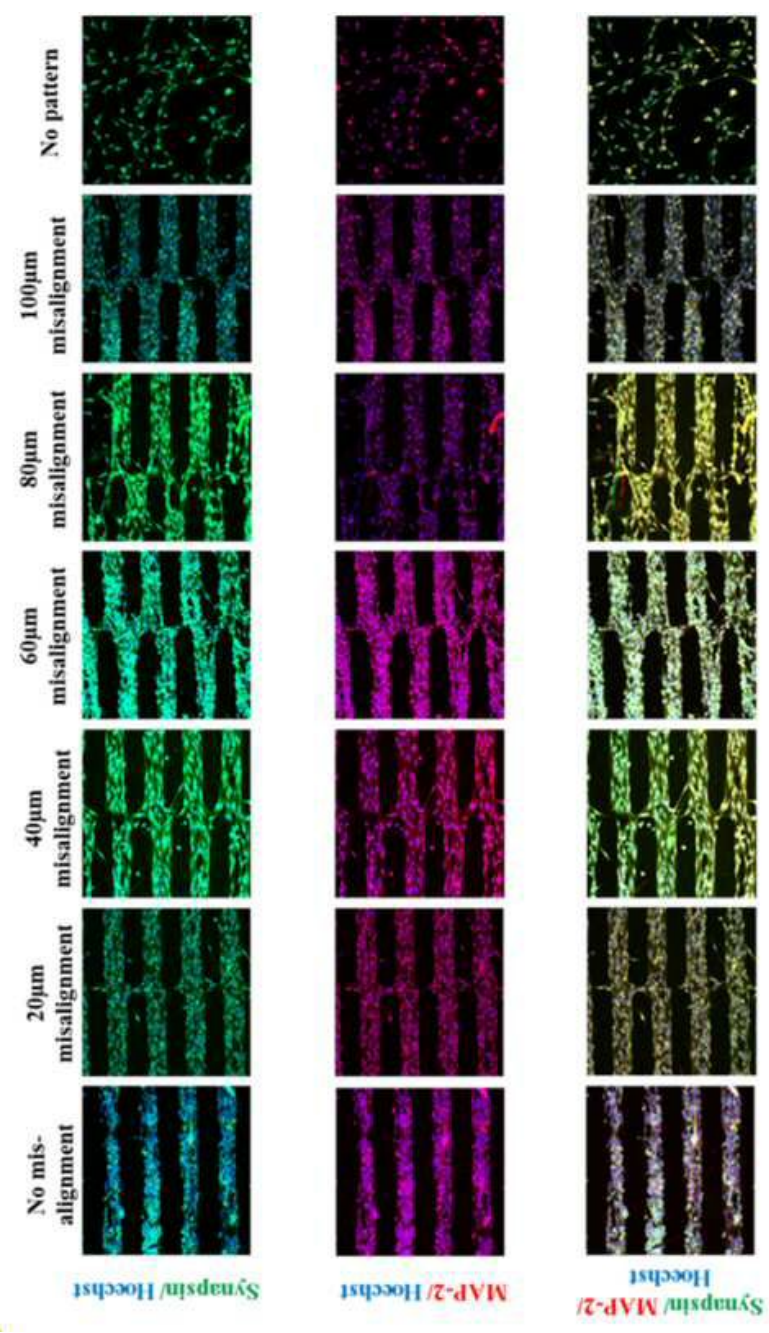
도면9a



도면9b



도면10



도면11

