



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년07월26일  
 (11) 등록번호 10-1643106  
 (24) 등록일자 2016년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)  
 C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
 C12M 3/00 (2013.01)  
 C12N 5/06 (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2015-0181611  
 (22) 출원일자 2015년12월18일  
 심사청구일자 2015년12월18일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR101446687 B1\*  
 KR1020130057801 A  
 KR101468001 B1  
 KR101484996 B1\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 아주대학교산학협력단  
 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)  
 (72) 발명자  
 곽종영  
 경기도 수원시 영통구 월드컵로 185, 904호(원천동, 캠퍼스빌)  
 정영훈  
 대구광역시 수성구 신천동로 320, 6동 601호(수성동1가, 신세계타운)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 남건필, 박종수, 차상윤

전체 청구항 수 : 총 11 항

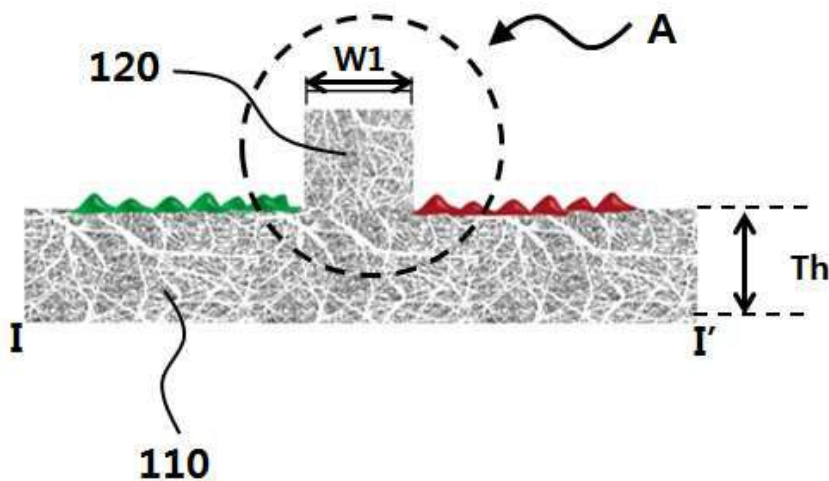
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **세포 배양 나노섬유 구조체, 이의 제조 방법 및 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치**

**(57) 요약**

세포 배양 나노섬유 구조체, 이의 제조 방법 및 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치에서, 세포 배양 나노섬유 구조체는 나노섬유로 형성된 세포 배양층과, 세포 배양층의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하되, 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함한다.

**대표도** - 도2



(52) CPC특허분류

*C12Q 1/02* (2013.01)  
*G01N 33/5005* (2013.01)  
*C12N 2513/00* (2013.01)  
*C12N 2535/00* (2013.01)

**김태연**

경기도 수원시 팔달구 중부대로223번길 91-2, 나눔  
406(우만동)

(72) 발명자

**김정화**

경기도 용인시 수지구 정평로 116, 105동 706호(풍  
덕천동, 한국아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009664

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술파이오니어사업

연구과제명 나노칩 기반으로 개발된 자가손상 방어 면역네트워크의 기능화 및 실용화

기 여 율 1/1

주관기관 아주대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

나노섬유로 형성된 세포 배양층; 및

상기 세포 배양층의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 상기 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하되, 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함하되,

상기 격벽부는 서로 이격된 2개의 돌출부들을 포함하는 이중 격벽 구조를 갖는 것을 특징으로 하는,

세포 배양 나노섬유 구조체.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 격벽부는

2개의 돌출부들 사이에서 상기 세포 배양층의 표면에서 하부를 향해 함입된 함입부를 포함하는 것을 특징으로 하는,

세포 배양 나노섬유 구조체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

2개의 돌출부들 사이의 이격 거리는 300  $\mu\text{m}$  내지 500  $\mu\text{m}$ 이고,

상기 돌출부들 각각의 하단 너비는 200  $\mu\text{m}$  내지 400  $\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는,

세포 배양 나노섬유 구조체.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 돌출부들 각각의 하단에서 상단으로 갈수록 너비가 감소하는 것을 특징으로 하는,

세포 배양 나노섬유 구조체.

**청구항 8**

제1항에 있어서,  
 상기 세포 배양층의 나노섬유 밀도는 상기 격벽부의 나노섬유 밀도보다 조밀한 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체.

**청구항 9**

제1항에 있어서,  
 상기 격벽부는 배양 영역의 가장자리를 따라 단일폐곡선 형태로 배치되는 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체.

**청구항 10**

내부로 함입된 오목부에 의해 적어도 2개의 영역으로 구획된 몰드가 배치된 상태로 나노섬유를 전기방사하여,  
 상기 몰드의 표면을 커버하는 세포 배양층 및 상기 세포 배양층과 연결되어 상기 오목부에 배치되어 상기 세포  
 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하고 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동  
 채널이 되는 격벽부를 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 형성하는 단계; 및  
 상기 몰드로부터 상기 세포 배양 나노섬유 구조체를 분리하는 단계를 포함하되,  
 상기 격벽부는 서로 이격된 2개의 돌출부들을 포함하는 이중 격벽 구조를 갖는 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서,  
 상기 세포 배양 나노섬유 구조체를 분리하는 단계 전에, 상기 몰드 상에 나노섬유가 방사된 상태에서 열처리하  
 는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서,  
 상기 격벽부는 2개의 돌출부들 사이에서 상기 세포 배양층의 표면에서 하부를 향해 함입된 함입부를 더 포함하  
 는 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  
 상기 몰드의 오목부의 너비는 1 mm 이상 2 mm 이하인 것을 특징으로 하는,  
 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법.

**청구항 14**

나노섬유로 형성된 세포 배양층과, 상기 세포 배양층의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 상기 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하되, 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하고,

상기 세포 배양 나노섬유 구조체의 배양 영역들 각각에서 서로 다른 세포를 배양하여 상기 격벽부에 대한 물질 이동을 측정하며,

상기 격벽부는 서로 이격된 2개의 돌출부들을 포함하는 이중 격벽 구조를 갖는 것을 특징으로 하는,

세포 분석 장치.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 세포 배양 나노섬유 구조체, 이의 제조 방법 및 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치에 관한 것으로, 적어도 2 이상의 배양 영역을 포함하도록 구획된 세포 배양 나노섬유 구조체, 이의 제조 방법 및 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 세포 이동은 여러 가지 질병의 발생에 있어서 중요한 역할을 하는데, 여러 단계의 세포작용을 거쳐서 일어난다. 세포 이동은 대표적으로 세포 인베이전(cell invasion), 주화성(chemotaxis), 접촉 주성(haptotaxis) 등이 있다. 면역세포는, 화학 주성 인자의 농도 구배를 인식하여 시간적 공간적으로 이동한다.

[0003] 세포 배양 상태에서, 면역세포 등과 같은 세포의 이동은 Boyden chamber assay, migration gap closure assay, Dunn chemotaxis chamber assay, under-agarose assay, time-lapse video microscopy assay 등의 측정 방법으로 측정하고 있는데, 이들은 2차원적인 세포 이동을 측정하는 방법에 불과하고, 세포 이동의 측정이 end-point로서, 실시간의 세포 이동을 측정하는데 어려움이 있으며 실시간 측정을 위해서는 많은 수의 에세이 (assay)를 필요로 한다.

[0004] 조직구조가 유전자 발현 양상이나 세포의 기능에 영향을 주므로 생체유사 시스템은 genotype, phenotype, 및 cell-extrinsic factors 등의 여러 인자간의 영향을 측정할 수 있도록 개발되어야 한다. 3차원 배양 시스템은 high-throughput 실험으로도 가능하며 그 종류로는 spheroid 배양, hanging drop 배양, 세포외기질 겔 배양, 스캐폴드 배양 등이 개발되고 있다. In vitro 연구는 주로 2차원적으로나 3차원 spheroid를 사용하여 이루어졌으나 이러한 시스템은 in vivo와는 큰 차이를 나타낸다.

[0005] 이 중에서, 스캐폴드 배양은 천연/합성 폴리머를 사용하여 공극을 가지는 스캐폴드에서 배양하는 기술이다. 3차원 배양 스캐폴드는 세포 부착 이외 산소, 영양분 및 세포 이동이 가능하도록 제작되어야 한다. 한국 등록특허 제10-1446687호에서는 나노섬유 지지체를 이용한 3차원적 세포 배양에서 서로 다른 두 가지 이상의 세포를 구획하여 배양하기 위하여 플라스틱이나 폴리디메틸실록산(PDMS)으로 독을 만들어서 에세이칩으로 활용하는 기술이 개시되어 있다. 이 경우 조립을 하거나 배양액이 새는 등의 기술적인 보완이 필요하고 각 세포를 포함하는 분획 사이의 간격도 차이가 나는 단점을 나노 수준에서 극복할 기술이 필요하다.

[0006] 또한, 전기방사된 나노섬유 스캐폴드에 lithography나 mechanical micromachining을 사용하여 마이크로패터닝을 제작하는 것은 매우 어려운 공정이다. 나노섬유기반으로 polycaprolactone(PCL) 나노섬유층에 femtosecond laser-ablation을 이용하여 마이크로채널을 제작하는 것이 보고되어 있다(Lee 등, Ann Biomed Eng. 2011;39(12):3031-3041). 마이크로채널은 100 μm 폭, 100 μm 깊이, 10 mm 길이로 만들어졌으며, 마이크로-펌프를 사용하여 평활근세포를 주입하였을 때 마이크로채널에 잘 분포하였으며 채널에서 세포가 막히는 현상이 나타나지 않아서 혈관 모델로 활용할 수 있는 기술로 개발되었으나 다종의 세포를 배양하는 데는 한계가 있다.

[0007] 또 다른 마이크로패터닝 나노섬유를 제작하는 기술로서 PDMS 주형을 이용하여 마이크로 웰을 만들고 여기에 나노섬유와 하이드로젤을 붙여서 제작하였다(Song 등, Applied Materials Interface, 2014;6(10):7034-7044). 마이크로 웰에 나노섬유가 있어서 세포가 부착하기 쉽고 encapsulation 형식으로 세포 배양이 가능한 기술이기는

하지만, 제작 공정이 복잡하고 까다로운 단점이 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허등록 제10-1446687호
- (특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허등록 제10-0953366호
- (특허문헌 0003) 3. 대한민국 특허등록 제10-0968231호

**비특허문헌**

- [0009] (비특허문헌 0001) Lee et al., Fabrication of patterned nanofibrous mats using a direct-write electrospinning, Langmuir, 2012;28(18):7267-7275
- (비특허문헌 0002) Lee et al. Vascular wall engineering via femtosecond laser ablation: scaffolds with self-containing smooth muscle cell populations. Ann Biomed Eng. 2011;39(12):3031-41.
- (비특허문헌 0003) Song et al. Nanofibrous microposts and microwells of controlled shapes and their hybridization with hydrogels for cell encapsulation. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014, 6 (10), pp 7038-7044.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0010] 본 발명의 일 목적은 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획되면서도 물질 이동 채널을 갖는 격벽부를 갖는 세포 배양 나노 섬유 구조체를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 간단한 공정을 갖는 상기 세포 배양 나노 섬유 구조체의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포 배양 나노 섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0013] 본 발명의 일 목적을 위한 세포 배양 나노섬유 구조체는 나노섬유로 형성된 세포 배양층과, 상기 세포 배양층의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 상기 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하되, 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함한다.
- [0014] 일 실시예에서, 상기 격벽부의 하단이 상기 세포 배양층과 연결되고, 상기 격벽부의 하단에서 상단으로 갈수록 너비가 감소할 수 있다. 이때, 상기 격벽부의 하단 너비는 100  $\mu\text{m}$  이상 1 mm 미만일 수 있다.
- [0015] 일 실시예에서, 상기 격벽부는 서로 이격된 2개의 돌출부들을 포함하는 이중 격벽 구조를 가질 수 있다. 이때, 상기 격벽부는 2개의 돌출부들 사이에서 상기 세포 배양층의 표면에서 하부를 향해 함입된 함입부를 포함할 수 있다.
- [0016] 일 실시예에서, 2개의 돌출부들 사이의 이격 거리는 300  $\mu\text{m}$  내지 500  $\mu\text{m}$ 이고, 상기 돌출부들 각각의 하단 너비는 200  $\mu\text{m}$  내지 400  $\mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에서, 상기 돌출부들 각각의 하단에서 상단으로 갈수록 너비가 감소할 수 있다.
- [0018] 일 실시예에서, 상기 세포 배양층의 나노섬유 밀도는 상기 격벽부의 나노섬유 밀도보다 조밀할 수 있다.
- [0019] 일 실시예에서, 상기 격벽부는 배양 영역의 가장자리를 따라 단일폐곡선 형태로 배치될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 목적을 위한 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법은, 내부로 함입된 오목부에 의해 적어도 2개

의 영역으로 구획된 몰드가 배치된 상태로 나노섬유를 전기방사하여, 상기 몰드의 표면을 커버하는 세포 배양층 및 상기 세포 배양층과 연결되어 상기 오목부에 배치되어 상기 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하고 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 형성하는 단계와, 상기 몰드로부터 상기 세포 배양 나노섬유 구조체를 분리하는 단계를 포함한다.

[0021] 일 실시예에서, 상기 방법은 상기 세포 배양 나노섬유 구조체를 분리하는 단계 전에, 상기 몰드 상에 나노섬유가 방사된 상태에서 열처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0022] 일 실시예에서, 상기 격벽부는 서로 이격된 2개의 돌출부들을 포함하는 이중 격벽 구조를 갖고, 2개의 돌출부들 사이에서 상기 세포 배양층의 표면에서 하부를 향해 함입된 함입부를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 몰드의 오목부의 너비는 1 mm 이상 2 mm 이하일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적을 위한 세포 분석 장치는 나노섬유로 형성된 세포 배양층과, 상기 세포 배양층의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 상기 세포 배양층을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획하되, 상기 세포 배양층과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 되는 격벽부를 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하고, 상기 세포 배양 나노섬유 구조체의 배양 영역들 각각에서 서로 다른 세포를 배양하여 상기 격벽부에 대한 물질 이동을 측정한다.

**발명의 효과**

[0024] 상기에서 설명한 본 발명의 세포 배양 나노섬유 구조체, 이의 제조 방법 및 세포 배양 나노섬유 구조체를 포함하는 세포 분석 장치에 따르면, 적어도 2 이상의 배양 영역을 포함하되, 격벽부가 배양층과 동일한 나노섬유로 이루어져 있어 물질 이동 채널인 격벽부를 통해 세포간 이동이나 세포에서 생성되는 분자가 확산될 수 있다. 상기 격벽부에 의한 2 이상의 배양 영역의 형성으로 인해, 본 발명의 세포 배양 나노섬유 구조체가 2개 이상의 배양 영역을 포함하는 세포 배양 챔버가 될 수 있다.

[0025] 이러한 세포 배양 나노섬유 구조체는 세포 배양 및/또는 세포 이동의 측정과 분석을 위한 세포 분석 장치에 구비되어, 동시에 여러 종류의 세포들의 이동을 실시간으로 측정할 수 있다. 이에 따라, 실시간으로 세포 분석을 수행할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 사시도이다.  
 도 2는 도 1의 I-I'라인을 따라 절단한 단면도이다.  
 도 3은 도 2의 A 부분을 확대한 확대도이다.  
 도 4는 도 1 내지 도 3의 세포 배양 나노섬유 구조체를 구성하는 나노섬유를 설명하기 위한 사진들을 도시한 도면이다.  
 도 5 내지 도 7은 도 1 내지 도 4에서 설명한 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법을 설명하기 위한 도면들이다.  
 도 8 및 도 9는 도 1과 다른 형태의 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 도면들이다.  
 도 10은 본 발명의 다른 실시예에 따른 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 단면도이다.  
 도 11 내지 도 14는 세포 배양 샘플 1 내지 4의 사진들을 나타낸 도면들이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0027] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호

를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다.

- [0028] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0029] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 사시도이고, 도 2는 도 1의 I-I' 라인을 따라 절단한 단면도이다.
- [0031] 도 1 및 도 2를 참조하면, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)는 세포 배양층(110)과 격벽부(120)를 포함한다.
- [0032] 세포 배양층(110)은 나노섬유로 형성되고, 층상의 3차원적 매트릭스 구조를 가질 수 있다. 세포 배양층(110)은 나노섬유로 형성됨으로써 유효 표면적이 매우 크고 내구성이 높으며, 취급이 용이하고 다양한 형태로 제작이 가능한 장점이 있다. 또한, 세포 배양층(110)에 다양한 물질을 화학적으로 용이하게 결합시킬 수 있다.
- [0033] 세포 배양층(110)을 구성하는 나노섬유는 합성 고분자, 생체 적합성 고분자 등 다양한 재료로 제조될 수 있다. 세포 배양층(110)을 구성하는 나노섬유를 형성하는 화합물의 예로서는, 키토산, 엘라스틴, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐, 셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene-oxide), 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리락트산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycol acid, PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산))(polylactic-co-glycolic acid), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레익산)(polyhydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid), 폴리다이옥산온(polydioxanone), 폴리[(락타이드)-(카프로락톤)] (polylactidecaprolacton), 폴리(에스테르우레탄)(polyesterurethan), 폴리[(L-락타이드)-(D-락타이드)](polylactide-lactide), 폴리[에틸렌-(비닐알코올)](polyethylenevinylalcohol), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리아닐린(polyaniline) 등을 들 수 있다. 이들은 각각 단독으로 또는 2 이상이 조합되어 이용될 수 있다. 2 이상의 조합은, 공중합체이거나 단순 혼합물 형태일 수 있다. 특히, 상기 나노섬유를 형성하는 화합물이 생체적합성 고분자인 경우, 세포가 통과할 수 있는 공극을 다수 개 포함하므로 세포의 부착 및 배양이 보다 더 용이한 장점이 있다.
- [0034] 한편, 상기 나노섬유를 형성하는 화합물은 수평균 분자량이 10,000 내지 1,000,000일 수 있다. 예를 들어, 상기 나노섬유를 형성하는 화합물의 수평균 분자량은 50,000 내지 500,000일 수 있다.
- [0035] 일례로, 나노섬유의 직경은 100 nm 내지 900 nm일 수 있고, 세포 배양층(110)은 나노섬유가 랜덤하게 집적되어 50 μm 내지 70 μm의 두께(Th)를 갖는 단일 층상일 수 있다.
- [0036] 격벽부(120)는 세포 배양층(110)의 표면으로부터 상부를 향해 돌출되어 세포 배양층(110)을 적어도 2 이상의 배양 영역으로 구획한다. 이때, 격벽부(120)는 세포 배양층(110)과 동일한 나노섬유로 형성되어 물질 이동 채널이 된다. 배양 영역 각각에 세포가 배치된 경우, 세포들은 격벽부(120)를 통과하여 이동할 수 있다. 격벽부(120)에 의한 물질 이동 채널은 나노섬유의 불규칙한 집적과 나노섬유 그 자체가 가지고 있는 기공에 의해서 형성된다. 평면에서 볼 때, 격벽부(120)는 세포 배양층(110) 상에서 일 방향으로 연장되어 배양 영역을 구획하는데 일 방향으로 연장되어 길이를 갖고, 제1 너비(W1)를 갖는다.
- [0037] 이하에서는 도 3 및 도 4를 도 1 및 도 2와 함께 참조하여 격벽부(120)에 대해서 보다 구체적으로 설명한다.
- [0038] 도 3은 도 2의 A 부분을 확대한 확대도이다.
- [0039] 도 3을 도 1 및 도 2와 함께 참조하면, 격벽부(120)의 높이(H)가 세포 배양층(110)의 표면에서부터 격벽부(120)의 최고점까지의 거리로 정의되고, 격벽부(120)의 하단이 세포 배양층(110)과 연결되고 상기 최고점은 격벽부



(120)의 상단에 포함된다. 격벽부(120)의 높이(H)와 세포 배양층(110)의 두께(Th)의 비율은 1:1.2 내지 1:1.5일 수 있다. 바람직하게는, 격벽부(120)의 높이(H)와 세포 배양층(110)의 두께(Th)의 비율이 1:1인 경우, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)가 구조적으로 안정한 형태가 되고 배양 영역에서 각각 안정적으로 세포들이 배양될 수 있다. 예를 들어, 격벽부(120)의 높이(H)는 50  $\mu\text{m}$  내지 70  $\mu\text{m}$ 일 수 있다.

- [0040] 격벽부(120)의 제1 너비(W1)는 격벽부(120)의 하단 너비로 정의되고, 격벽부(120)의 하단에서 상단으로 갈수록 격벽부(120)의 너비가 점차 감소할 수 있다. 특히, 격벽부(120)의 상단은 첨부(apex portion)가 라운드진 형상을 가질 수 있다. 이때, 격벽부(120)의 높이(H)는 세포 배양층(110)의 두께(Th)와 실질적으로 동일하거나 세포 배양층(110)의 두께(Th)보다 얇을 수 있다.
- [0041] 격벽부(120)를 중심으로 일측의 세포 배양층(110) 상에는 제1 세포(녹색으로 도시)를 부착하여 배양하고, 타측의 세포 배양층(110) 상에는 상기 제1 세포와 다른 종의 제2 세포(적색으로 도시)를 부착하여 배양할 수 있다. 이때, 각각의 배양 영역에는 서로 다른 종류의 형광 염색제가 주입될 수 있다.
- [0042] 일례로, 상기 제1 세포는 질환 세포 또는 세균 등일 수 있고, 상기 제2 세포는 면역 세포일 수 있다. 상기 제1 및 제2 세포를 1개의 세포 배양 나노섬유 구조체에서 동시에 배양함으로써 면역 세포의 이동 및 활성화, 질환 세포의 손상, 사멸, 증식 정도 등을 직접 측정할 수 있다. 각각의 배양 영역의 형광 염색제의 컬러에 의해서 세포 이동을 형광 현미경으로 용이하게 관찰할 수 있다.
- [0043] 이때, 상기 면역 세포는 호중구, 대식세포, 수지상세포, NK세포, T세포, B세포 등을 포함할 수 있다. 상기 면역 세포는 인간 또는 마우스 유래 세포일 수 있으며, 구체적으로는 인간 혈액으로부터 분리하거나 마우스 골수로부터 분리된 골수세포를 면역세포 배양용 배지에서 면역세포로 분화시켜 수득할 수 있다.
- [0044] 상기 질환 세포는 질환이 유도된 세포로서, 암세포일 수 있다. 암세포의 예로서는, 간암세포, 대장암세포, 위암세포, 폐암세포, 자궁암세포, 유방암세포, 갑상선암세포, 췌장암세포 등을 들 수 있다. 또는, 상기 질환 세포가 대장균, 포도상구균, 살모넬라균, 이질균, 결핵균, 헬리코박터 파일로리균, 효모균, 황색점액균 또는 파상풍균 일 수 있다.
- [0045] 도 4는 도 1 내지 도 3의 세포 배양 나노섬유 구조체를 구성하는 나노섬유를 설명하기 위한 사진들을 도시한 도면이다.
- [0046] 도 4를 도 1 내지 도 3과 함께 참조하면, 세포 배양층(110) 및 격벽부(120) 각각은 도 4에 도시된 전자현미경 사진과 같이 나노섬유들이 불규칙하게 얽혀 있는 구조를 갖는 매트릭스를 포함한다. 왼쪽 사진은 100  $\mu\text{m}$  스케일이고, 오른쪽 사진은 50  $\mu\text{m}$  스케일이다.
- [0047] 나노섬유들이 집적되어 있는 상태를 나타내는 "밀도"에 있어서, 세포 배양층(110)의 밀도가 격벽부(120)의 밀도보다 조밀하다. 즉, 격벽부(120)의 밀도는 세포 배양층(110)의 밀도보다 낮아, 물질 이동 통로가 더 넓게 되고 이에 따라 동일한 물질이라도 세포 배양층(120)에 비해서 격벽부(120)가 물질 이동 채널로서 물질이 이동할 수 있다. 이러한 밀도 차이는, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)를 몰드(200, 도 5 및 도 6 참조)를 이용하여 나노섬유를 전기방사 하여 형성함으로써 구현할 수 있다.
- [0048] 이하에서는, 도 5 내지 도 7을 참조하여 도 1 내지 도 4에서 설명한 세포 배양 나노섬유 구조체(100)의 제조 방법에 대해서 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0049] 도 5 내지 도 7은 도 1 내지 도 4에서 설명한 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법을 설명하기 위한 도면들이다.
- [0050] 먼저, 도 5를 참조하면, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)는 전기방사 장치를 이용하여 제조한다. 전기방사 장치는 고분자 용액(polymer solution)을 수용하는 실린지(syringe)가 니들(needle)을 통해서 고분자 용액을 분사되 실린지와 집적판(collector) 사이에 전기장을 걸어 전기방사(electrospinning jet)를 수행함으로써 집적판 상에 나노섬유를 집적시킬 수 있다. 이때, 집적판 상에는 몰드(200)가 배치된 상태에서 전기방사가 수행된다.
- [0051] 몰드(200)는 제조하고자 하는 세포 배양 나노섬유 구조체(100)의 형상과 역상 형상을 갖는 것으로서, 몰드(200)의 표면으로부터 내부로 함입된 오목부(210)를 포함한다. 오목부(210)에 의해서, 오목부(210)보다 상대적으로 돌출된 부분이 볼록부로 정의된다. 오목부(210)가 세포 배양 나노섬유 구조체(100)의 격벽부(120)를 형성하는 부분이고, 몰드(200)의 표면을 전체적으로 커버하는 세포 배양층(110)이 격벽부(120)와 연결되어 형성될 수 있다. 오목부(210)의 너비(SP)는 격벽부(120)의 하단 너비(W1)와 실질적으로 동일할 수 있다. 오목부(210)의 너비(SP)가 100  $\mu\text{m}$  이상 1 mm 미만인 경우에 도 1 내지 도 4에서 설명한 세포 배양 나노섬유 구조체(100)가 형성될

수 있다.

- [0052] 몰드(200)는 실리콘(silicon), 석영(quartz), 세라믹(ceramic), 알루미늄, 타이타니아, 유리(glass) 등으로 형성될 수 있다. 몰드(200)는 일반적인 습식 및/또는 건식식각 공정을 이용하여 실리콘 웨이퍼로도 제조할 수 있다. 뿐만 아니라, 알루미늄 박막과 알루미늄 테이프를 이용하여 요철 패턴을 갖는 몰드(200)의 제조가 가능하다. 몰드(200)가 도전성 재료로 형성되는 경우, 별도의 집적판을 이용하지 않고, 몰드(200)와 실린지 사이에 전기장을 걸어 전기방사 공정을 수행할 수 있다.
- [0053] 도 5 및 도 6을 참조하면, 몰드(200)를 집적판 상에 배치한 상태에서 전기 방사 공정을 수행한다. 전기 방사 공정에서의 고분자 용액의 농도, 전압, 방사 거리 등을 조절하여 나노섬유의 직경, 기공의 크기, 집적 밀도 등을 조절할 수 있다.
- [0054] 도 7을 참조하면, 전기 방사 공정을 통해서 몰드(200)의 오목부(210)에 나노섬유가 집적되고 몰드(200)의 표면에 나노섬유가 집적된다. 오목부(210)에 대응하여 격벽부(120)가 형성되고 몰드(200)를 전체적으로 커버하는 층상 구조의 세포 배양층(110)이 형성된다. 이때, 격벽부(120)의 하단 너비(W1)는 오목부(210)의 너비(SP)와 실질적으로 동일할 수 있다. 다만, 오목부(210)의 내부에 배치되는 격벽부(120)의 상단은 하단보다 좁게 형성되어 오목부(210)를 완전히 채우지 않은 상태로 형성될 수 있다. 또한, 전기방사에 의해서 몰드(200)의 표면에 집적된 나노섬유의 밀도가 오목부(210)의 내부에 집적되는 나노섬유의 밀도보다 조밀하게 형성된다.
- [0055] 전기 방사 공정 후에, 몰드(200)와 나노섬유 구조체(100)가 결합된 상태에서 열처리하고, 열처리 공정 후에 나노섬유 구조체(100)를 몰드(200)로부터 분리시킴으로써 도 1 내지 도 4에서 설명한 나노섬유 구조체(100)를 제조할 수 있다. 열처리 공정은 50℃ 내지 70℃에서 수행될 수 있다.
- [0056] 한편, 도 1 내지 도 7에서 도시하지 않았으나, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)는 지지체로서 베이스 기재 상에 배치될 수 있다. 이때, 베이스 기재와 세포 배양층(110) 사이에 고분자 코팅층이 배치될 수 있다. 상기 고분자 코팅층은 세포 배양 나노섬유 구조체(100)와 상기 베이스 기재 사이의 부착력을 증가시킬 수 있다. 상기 고분자 코팅층을 형성하는 물질의 예로서는, 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리스타이렌(PS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리에틸렌(PE), 폴리우레탄(PU), 셀룰로오스, 실리콘 고무 등을 들 수 있다. 예를 들어, 상기 고분자 코팅층은 상기 베이스 기재 상에 스핀 코팅법으로 코팅될 수 있으며, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)를 구성하는 나노섬유와 실질적으로 동일한 물질로 형성될 수도 있으나, 상기 고분자 코팅층은 상기 베이스 기재 상에 균일하게 형성되는 박막이고 세포 배양층(110)과 격벽부(120)는 나노섬유가 매트릭스를 이루고 있는 구조를 갖는다.
- [0057] 도 8 및 도 9는 도 1과 다른 형태의 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 도면들이다.
- [0058] 도 8 및 도 9에서는 적어도 3개 이상의 배양 영역을 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 나타낸 것으로, 도 8의 (a), (b) 및 (c)에서와 같이 격벽부를 일 방향 또는 서로 다른 2개의 방향으로 연장되도록 디자인하여 복수개의 배양 영역을 포함하는 세포 배양 나노섬유 구조체를 형성할 수 있다. 이러한 복수개의 배양 영역을 갖는 세포 배양 나노섬유 구조체는 세포 분석 장치에 구비되어, 동시에 여러 종의 세포들의 이동을 관찰할 수 있고, 같은 종이라도 동시에 많은 실험을 수행할 수 있다.
- [0059] 도 9를 참조하면, 격벽부는 배양 영역의 가장자리를 따라 단일폐곡선 형태로 배치되어 배양 영역을 구획할 수 있다. 도 9의 (a) 및 (b)는 4개의 배양 영역을 포함하는 배양 챔버인 구조체를 도시한 것으로, 배양 영역들 각각의 가장자리를 따라 단일 폐곡선 형태로 배치된다. 도 9의 (b)와 같이 모든 부분에서 격벽부의 너비를 일정하게 형성할 수 있고, (a)와 같이 격벽부가 교차하는 중앙부에서는 다른 부분들에 비해서 상대적으로 넓은 너비로 형성할 수도 있다. 도 9에서는 4개의 배양 영역으로 구획된 구조체를 도시하였으나, 격벽부(120)의 디자인을 조절하여 적어도 2개 이상의 배양 영역을 갖는 나노섬유 구조체를 다양하게 디자인할 수 있다.
- [0060] 도 8 및 도 9에 도시된 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조 방법 또한 도 5 내지 도 7에서 설명한 것과 실질적으로 동일하므로, 중복되는 구체적인 설명은 생략한다.
- [0061] 도 10은 본 발명의 다른 실시예에 따른 세포 배양 나노섬유 구조체를 설명하기 위한 단면도이다.
- [0062] 도 10에 도시된 세포 배양 나노섬유 구조체는 격벽부의 구조를 제외하고는 도 1 내지 도 4에서 설명한 것과 실질적으로 동일하다. 따라서, 중복되는 상세한 설명은 생략하고 차이점이 있는 부분에 대해서 설명한다.

[0063] 도 10을 도 1과 함께 참조하면, 격벽부(120)는 서로 이격된 2개의 돌출부들(122, 124)과 그들 사이의 함입부를 포함한다. 2개의 돌출부들(122, 124) 각각은 세포 배양층(112)의 표면으로부터 돌출되고, 상기 함입부는 세포 배양층(112)의 표면으로부터 내부를 향해서 함입된다. 상기 함입부에 의해서 2개의 돌출부들, 즉 제1 돌출부(122)와 제2 돌출부(124)가 형성된다. 제1 및 제2 돌출부들(122, 124) 각각도 도 3에서 설명한 것과 같이 하단 너비( $W_{s1}$ ,  $W_{s2}$ )가 상단 너비보다 넓게 형성되어 하단에서 상단으로 갈수록 너비가 점차 감소하는 구조를 갖는다. 제1 및 제2 돌출부들(122, 124) 각각의 하단 너비( $W_{s1}$ ,  $W_{s2}$ )는 200  $\mu\text{m}$  내지 400  $\mu\text{m}$ 일 수 있고, 상기 함입부의 너비이자, 제1 및 제2 돌출부들(122, 124) 사이의 이격 거리(SG)는 300  $\mu\text{m}$  내지 500  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 제1 및 제2 돌출부들(122, 124) 각각의 하단 너비( $W_{s1}$ ,  $W_{s2}$ )와 이격 거리(SG)의 합인 격벽부(120)의 하단 너비( $W_2$ )는 1 mm 이상일 수 있다. 예를 들어, 2개의 돌출부들(122, 124)을 포함하는 격벽부(120)의 하단 너비( $W_2$ )는 1 mm 이상 2 mm 이하일 수 있다.

[0064] 2개의 돌출부들(122, 124)이 배양 영역들을 구획하는 실질적인 격벽이 되지만, 이들 사이에 배치되는 함입부에 이동되는 세포가 축적될 수 있어 세포의 이동을 보다 정확하게 확인할 수 있는 장점이 있다. 즉, 일 배양 영역에 배치된 세포가 제1 돌출부(122)를 통과하여 상기 함입부에 배치될 수 있어, 상기 함입부에 축적되는 세포 수를 측정하여 세포의 이동도 등을 분석할 수 있다.

[0065] 격벽부(120)가 2개의 돌출부들(122, 124) 및 상기 함입부를 갖는 구조는 도 5 내지 도 7에서 설명한 전기방사를 이용한 제조 공정 중에서 몰드(200)의 오목부(210)의 너비(SP)를 1 mm 이상으로 조절함으로써 형성할 수 있다. 오목부(210)의 너비(SP)가 1 mm 이상이 되는 경우, 전기방사 공정에서 나노섬유가 오목부(210) 내에 전체적으로 집적되지 않고 오목부(210)의 가장자리에 우선적으로 집적되어 오목부(210) 내에서도 나노섬유 밀도 차이가 발생하게 되고, 몰드(200)와 나노섬유 구조체를 분리함에 따라서 2개의 돌출부들(122, 124) 및 상기 함입부를 갖는 이중 격벽 구조의 격벽부(120)가 형성될 수 있다. 격벽부(120)의 너비가 2 mm 초과인 경우에는 세포의 이동을 관찰하기가 상대적으로 용이하지 않으므로, 격벽부(120)의 너비는 1 mm 이상 2 mm 이하인 것이 바람직하다.

[0066] 상기에서 설명한 바에 따르면, 세포 배양 나노섬유 구조체(100)가 적어도 2 이상의 배양 영역을 포함하되, 격벽부(120)가 세포 배양층(110)과 동일한 나노섬유로 이루어져 있어 물질 이동 채널인 격벽부(120)를 통해 세포간 이동이나 세포에서 생성되는 분자가 확산될 수 있다. 격벽부(120)에 의한 2 이상의 배양 영역의 형성으로 인해, 본 발명의 세포 배양 나노섬유 구조체(100)가 2개 이상의 배양 영역을 포함하여 동시에 2종 이상의 세포를 배양할 수 있는 세포 배양 챔버가 될 수 있다. 이러한 세포 배양 나노섬유 구조체(100)는 세포 배양 및/또는 세포 이동의 측정과 분석을 위한 세포 분석 장치에 구비되어, 동시에 여러 종류의 세포들의 이동을 실시간으로 측정할 수 있다. 이에 따라, 실시간으로 세포 분석을 수행할 수 있다.

[0067] 이하에서는, 구체적인 예들을 통해서 본 발명에 대해서 보다 구체적으로 설명하기로 한다. 하기의 예들은 본 발명의 실시예들을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] **실시예: 세포 배양 나노섬유 구조체의 제조**

[0069] **(1) 몰드의 준비**

[0070] 알루미늄 박판을 준비하고, 알루미늄 테이프를 정방형으로 절단한 후 상기 알루미늄 박막 상에 서로 이격시켜 매트릭스 형태로 부착하였다. 이에 따라, 알루미늄 테이프가 부착된 부분이 볼록부가 되고 알루미늄 테이프들 사이의 이격된 부분이 오목부가 되는 도 5 및 도 6에서 설명한 몰드(200)와 실질적으로 동일한 구조를 갖는 몰드를 준비하였다. 이때, 오목부의 너비는 1 mm이었다.

[0071] **(2) 전기방사**

[0072] 상기에서 준비된 몰드를, 전기방사장치의 집적판 상에 배치한 상태에서 상기 몰드를 향해 나노섬유를 전기방사하였다. 방사거리는 10 cm이고, 전압은 10 내지 15 kV를 이용하였다. 이때, 전기방사는 상기 몰드 상에 나노섬유가 균일한 두께로 방사될 수 있도록 2축의 스테이지를 이동하며 수행하였으며, 나노섬유로서는 폴리카프로락톤(PLC)을 이용하였고, 나노섬유의 평균 직경은 500 nm이었다.

[0073] **(3) 열처리 및 분리**

[0074] 나노섬유를 전기방사한 후, 나노섬유가 상기 몰드 상에 집적된 상태에서 약 60°C의 온도에서 약 5초간 열처리하였다. 열처리된 세포 배양 나노섬유 구조체를 상기 몰드로부터 분리하였다. 이에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 나노섬유 구조체를 제조하였다. 제조된 세포 배양 나노섬유 구조체의 세포 배양층의 두께는 약

50  $\mu\text{m}$ 이었고, 격벽부는 이중 격벽 구조로 형성되었다. 이중 격벽 구조에서, 2개의 돌출부들 각각의 높이는 약 50  $\mu\text{m}$ 이었으며 각각의 너비는 300  $\mu\text{m}$ 이며, 돌출부들 사이의 이격 거리는 400  $\mu\text{m}$ 이었다(도 10 및 도 11 참조).

[0075] **세포 배양 샘플 1**

[0076] 골수로부터 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)와 interleukin-4(IL-4)로 분화시켜 얻은 수지상세포를 10  $\mu\text{l}$ 의 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 10,000개의 세포를 섞은 후 상기와 같이 준비된 세포 배양 나노섬유 구조체의 배양 영역에 배치시킨 후, 4시간 동안 방치하였다. 그 결과를 도 11에 나타낸다.

[0077] 도 11은 세포 배양 샘플 1의 전자현미경 사진으로서, 이를 참조하면 격벽부의 일측, 즉 세포 배양층을 구성하는 나노섬유에 수지상 세포들이 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0078] **세포 배양 샘플 2**

[0079] 대장암 세포주인 CT-26 세포와 세포 배양 샘플 1의 제조에서 이용한 수지상세포를 각각 PKH67(녹색 형광)과 PKH26(적색 형광)으로 염색한 후 10  $\mu\text{l}$ 의 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 10,000개의 세포를 섞은 후, 상기와 같이 준비된 세포 배양 나노섬유 구조체의 배양 영역에 배치시킨 후, 4시간 동안 방치하였다. 형광 현미경으로 촬영하여 그 결과를 도 12의 A에 나타낸다.

[0080] 동시에, 상기와 같이 준비된 세포 배양 나노섬유 구조체의 배양 영역에 대장암 세포를 적색 형광 및 청색 형광으로 염색하고 녹색 형광으로 염색된 수지상 세포와 함께 배치시킨 후, 4시간 동안 방치하였다. 형광 현미경으로 촬영하여 그 결과를 도 12의 A에 나타낸다.

[0081] 도 12에서 A의 왼쪽 사진은 녹색/적색 형광을 나타내고, A의 오른쪽 사진은 녹색/청색/적색 형광을 나타낸다. 이들 사진을 통해서 세포 배양 나노섬유 구조체에 대장암 세포와 수지상 세포가 안정적으로 배양됨을 알 수 있다.

[0082] **세포 배양 샘플 3**

[0083] 수지상 세포로서, 마우스로부터 골수 세포를 분리한 후 수지상 세포로 분화 유도하여 이용한 것을 제외하고는 세포 배양 샘플 2의 제조와 실질적으로 동일한 방법으로 세포 배양 샘플 3을 준비하였다. 수지상 세포는 다음과 같이 준비하였다.

[0084] 5-6 주령의 Balb/c 마우스의 대퇴부 및 종아리에서 골수 세포를 분리하였다. 분리된 골수 세포 ( $1 \times 10^6$  cells/ml)는 10 % 소 태아 혈청과 100 U/ml 페니실린 그리고 100  $\mu\text{g/ml}$  스트렙토마이신이 들어있는 RPMI-1640 배지에서 10 %의  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 37 $^\circ\text{C}$  배양기로 배양하였으며, 수지상세포로 분화유도를 위하여 15 ng/ml 과립구 대식세포 집락 자극인자(GM-CSF)와 15 ng/ml의 인터루킨-4(IL-4)를 7일 동안 함께 배양하였다. 분화된 수지상세포는 특이적 단백질 표본 인자인 CD11c 및 major histocompatibility complex(MHC)-II를 이용하여 구분하고, CD11c 마이크로비드를 이용하여 분리하였다. 형광 현미경으로 촬영하여 그 결과를 도 12의 B에 나타낸다.

[0085] 도 12의 B는 10배, 20배 및 50배의 배율로 촬영한 형광 현미경 사진을 나타내고, 이를 참조하여 녹색 형광으로 염색된 수지상 세포와 청색 및 적색 형광으로 염색된 대장암 세포가 각각 배양 영역에서 안정적으로 배양됨을 알 수 있다.

[0086] **세포 배양 샘플 4**

[0087] 면역 세포로서 마우스로부터 호중구를 분리하여 이용하고, 질환 세포로서 포도상 구균을 이용하여 세포 배양 샘플 4를 준비하였다. 수지상 세포 및 포도상 구균 각각은 다음과 같은 방법으로 수득하였다.

[0088] 5-6 주령의 Balb/c 마우스의 복강에 3% Thioglycollate 용액 3 ml을 26G 주사바늘을 사용하여 주사하였다. 6 시간 후에 마우스를 경추탈골을 하여 피부를 벗겨낸 후에 복막을 가위로 잘라 파스퇴르 피펫을 이용하여 복강

내의 용액을 수거하였다. 적혈구 용해액을 마리당 2 ml 씩 첨가하여 섞어준 뒤 2분간 반응시킨 후 수거한 용액을 1700 rpm에 4℃에서 원심분리하였다. 원심분리 후 나온 세포는 500  $\mu$ l의 EDTA-BSS 용액에 10  $\mu$ l의 Ly6-G biotin 항체를 처리하여 20분간 4℃에서 반응시켰다. EDTA-BSS 용액을 첨가하여 원심분리하고, 다시 500  $\mu$ l의 EDTA-BSS 용액에 10  $\mu$ l의 biotin에 대한 항체가 결합된 마이크로비드를 처리하여 20분간 4℃에서 반응시켰다. 마이크로비드가 결합된 호중구세포는 MACS의 MS coloum을 사용하여 분리하였다.

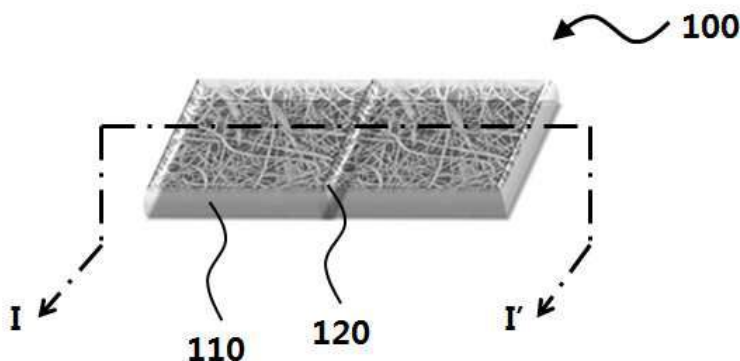
- [0089] 포도상구균인 *Staphylococcus aureus*는 LB 배지에서 배양하여 증식시켰다.
- [0090] 호중구와 포도상구균은 각각 PKH67과 PKH26로 형광 염색하였고, 나노섬유 구조체에 부착시킨 전자 현미경 사진을 도 13에 나타내고, 12시간동안 방치한 후의 형광 현미경 사진을 도 14에 나타낸다.
- [0091] 도 13에서 A는 호중구가 부착된 사진이고, B는 포도상구균이 부착된 사진이다. 도 13을 참조하면, 면역세포와 질환세포 각각이 배양 영역의 나노섬유에 안정적으로 부착되어 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0092] 도 14에서 (a)는 A, B 및 C 배양 영역을 포함하는 나노섬유 구조체에서 A에는 호중구가, B 및 C에는 포도상구균이 부착된 상태를 나타내며, (a)의 우측 하단 그림에서 A와 C 사이의 영역이 region 1로, A와 B 사이의 영역이 region 2로 정의된 것을 알 수 있다. 이때, (b)의 상부 2개의 사진들은 region 1 및 2 각각을 나타내며 하부 2개의 사진들은 12시간이 경과한 후의 사진을 나타낸다.
- [0093] 도 14의 (b)를 참조하면, 12시간이 경과한 후에 호중구가 2개의 배양 영역들 사이에 배치된 격벽부로 이동하는 것을 확인할 수 있다. 이와 같이, 본 발명에 따른 나노섬유 구조체를 이용하여 시간에 따라 형광 현미경을 통해서 세포의 이동을 관찰할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0094] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

**부호의 설명**

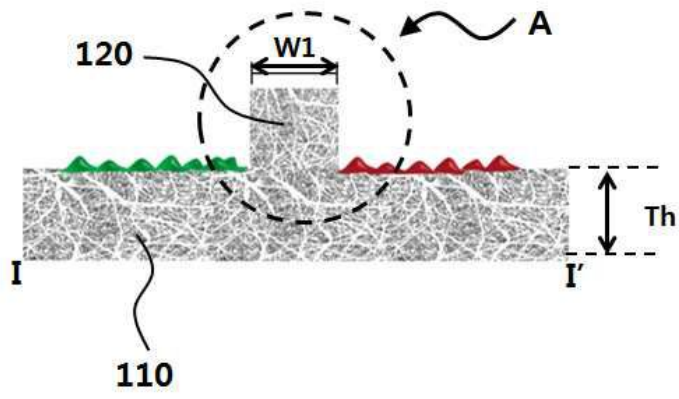
- [0095] 100: 세포 배양 나노섬유 구조체
- 110: 세포 배양층
- 120: 격벽부
- 200: 몰드
- 210: 오목부
- 122, 124: 제1, 제2 돌출부

**도면**

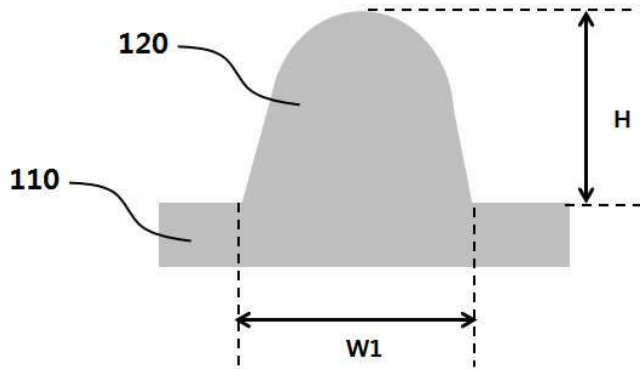
**도면1**



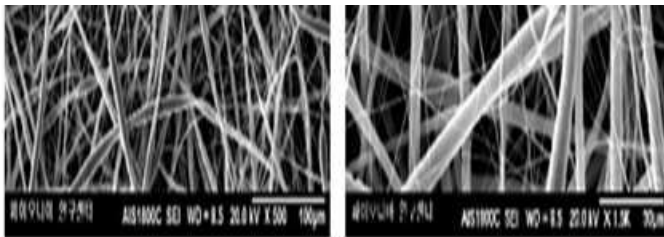
도면2



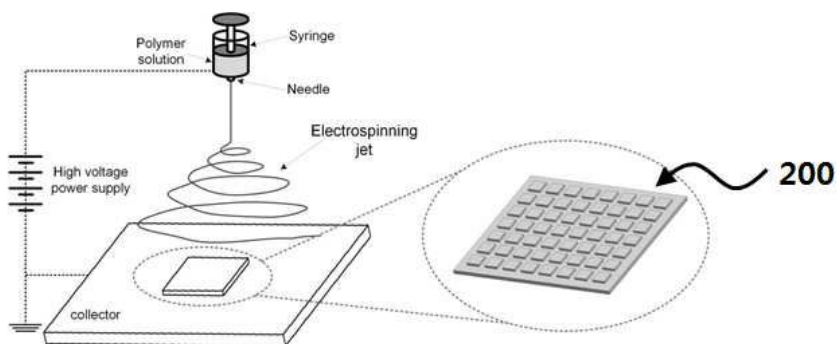
도면3



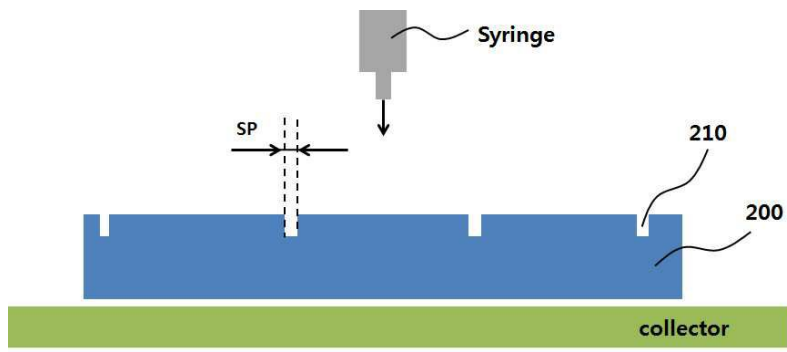
도면4



도면5



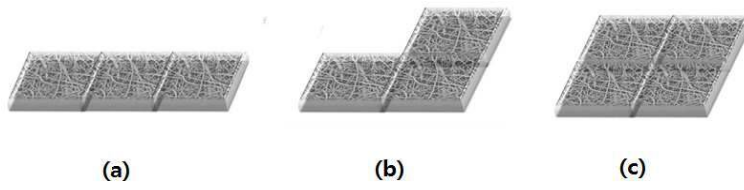
도면6



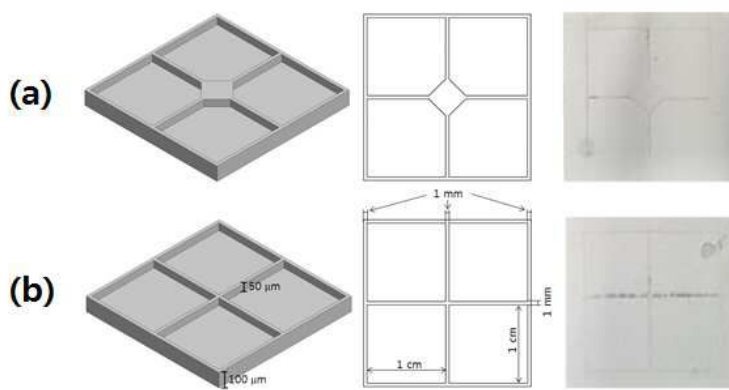
도면7



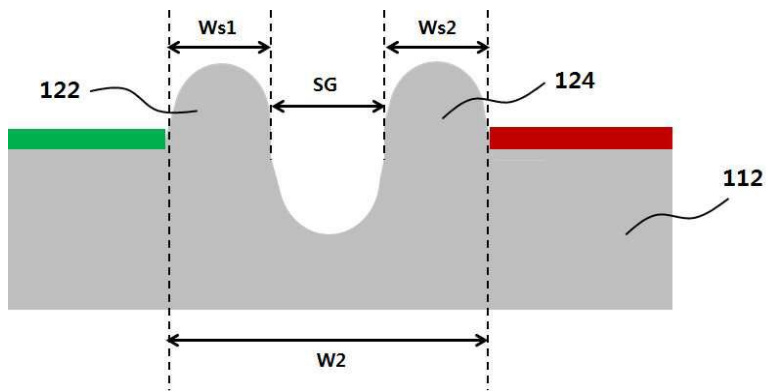
도면8



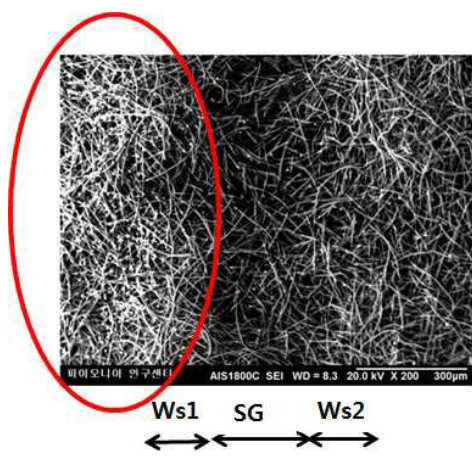
도면9



도면10

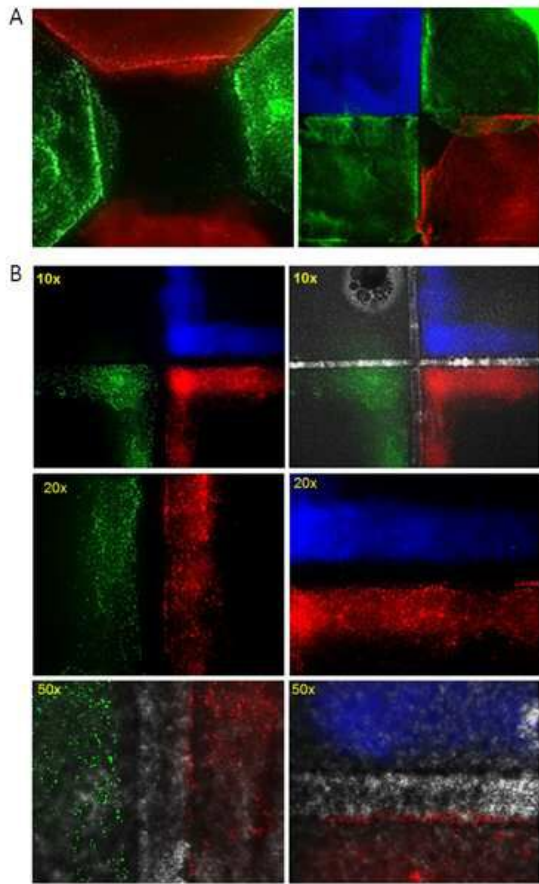


도면11

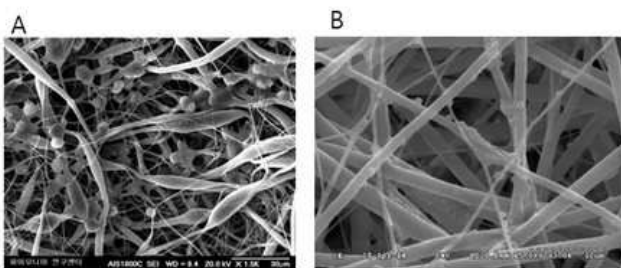




도면12



도면13



도면14

