

<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서							
연구분야(코드)		과제번호	1310180		지원 프로그램	일반연구	
과제성격(기초,응용,개발)	기초	실용화 대상여부	실용화	공개가능여부 (공개,비공개)		공개	
연구과제명	(국문) 전도성 폴리머 나노 와이어의 개발을 통한 효과적인 암세포의 부착 및 분리 연구 (영문) The fabrication of conductive polypyrrole nanowire and its applications for cancer cell capture and electrochemical release						
과제책임자	소 속	NEtT 연구과		직 위	주임연구원		
	성 명	조영남		전 공	화학		
세부과제	구분	세부과제명			세부과제책임자		
		성명	소속(직위)	전 공			
	1	전도성 폴리머 나노 와이어의 개발을 통한 효과적인 암세포의 부착 및 분리 연구			조영남	주임연구원	화학
	2						
3							
총 연구기간	2013년 1월 ~ 2014년 12월 (총 2년)		참여연구원수 (단위: 명, MY)		7 / 2.6		
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립 암센터	기업부담금		
	계	2013.1.1.~2014.12.31	200,000	200,000	소계	현금	현물
	제1차	2013.1.1~2013.12.31	100,000	100,000	0		
	제2차	2014.1.1~2014.12.31	100,000	100,000	0		
	제3차				0		
참여기업	명칭		전화		FAX		
기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.							
2014년 10 월 29 일							
		과제책임자	조영남	(서명)			
국립 암 센터 원 장 귀 하							
(첨부서류)							

목 차

< 요약 문 >

(한글)-----	3
(영문)-----	5
1. 연구의 최종목표-----	7
2. 연구의 내용 및 결과-----	11
3. 연구결과 고찰 및 결론-----	21
4. 연구성과 및 목표달성도-----	23
5. 연구결과의 활용계획-----	26
6. 참고문헌-----	27
7. 첨부서류-----	28

< 요약 문 >

<p>연구목표 (200자 이내)</p>	<p><최종목표></p> <p>고성능 전도성 폴리머 나노 와이어의 제작을 통하여 peripheral blood 및 solid tumor tissue 로부터 전기 자극에 의하여 타겟 암세포만을 손상없이 분리할 수 있는 원천 기술을 개발하고 원발암성 및 전이암 병소의 진단에 응용.</p> <p><당해연도목표></p> <ul style="list-style-type: none"> • Anodic aluminium oxide (AAO)를 이용하여 전도성 폴리머 나노 와이어 구조체의 제작 및 물성 평가. • 전도성 폴리머, 즉 biotin-doped 폴리피롤 표면을 암세포 표적 리간드인 anti-EpCAM으로 수식하는 기술을 개발. 												
<p>연구내용 및 방법 (500자 이내)</p>	<p>1) 연구내용</p> <p>전도성 폴리머를 기반으로 하는 나노 구조체, 즉 nanowire의 합성 및 분석.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 양극산화 조건(양극산화 전압, 산 용액 종류와 농도 및 온도 등)을 변화시켜 구멍간의 간격 및 구멍의 크기와 깊이의 조절을 통하여 실험에 적합한 Anodic aluminium oxide (AAO) template을 제작한다. • AAO template에 전도성 폴리머, 즉 pyrrole을 충전함으로써 다양한 크기와 길이를 가진 전도성 나노 와이어 (nanowire)를 제작하며, 제조된 나노 와이어의 크기, 크기분포, 표면 특성에 따른 안정성을 분석한다. • 나노와이어의 표면을 암세포 표적 리간드로 수식하는 기술을 개발한다. <p>2) 연구방법</p> <ul style="list-style-type: none"> • AAO (Anodic alumina oxide)를 sacrificing template로 이용하여 전도성 나노 와이어의 electro-polymerization을 시도한다. • 나노 와이어의 전도성 폴리머 종류에 따른 제조의 용이성을 분석하고, 제조된 나노 구조체의 표면 특성에 따른 안정성, 전기적/물리적/화학적 특성 평가한다. • 전도성 나노 와이어의 표면의 다양성 (즉, 거침도 (roughness) 및 친수성/소수성으로 표면 개질 등)을 통하여 세포 부착에 효율적인 구조임을 평가한다. • 전도성 나노 와이어의 표면을 암세포 표적 리간드로 수식하는 기술을 개발한다. 												
<p>연구개발에 따른 기대성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">구분</th> <th style="width: 33%;">달성치/목표치¹⁾</th> <th style="width: 33%;">달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>8/3</td> <td>267</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>47.05/14</td> <td>336</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td>미국 출원 1건 국내 출원 1건</td> <td>200</td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p>	구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	8/3	267	IF 합	47.05/14	336	기타 성과	미국 출원 1건 국내 출원 1건	200
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)											
SCI 논문 편수	8/3	267											
IF 합	47.05/14	336											
기타 성과	미국 출원 1건 국내 출원 1건	200											

		<p style="color: red;"><정성적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> - 다기능성 전도성 폴리머 나노 와이어의 제작을 위한 원천 기술 확보. - 개발된 전도성 나노 와이어를 사용하여 원발암성 종양 및 전이암의 존재를 추적 및 진단 할 뿐 아니라 암세포를 분리, 분석 할 수 있는 기술 확보. - 과제 종료 후 기술이전 및 국산화를 통한 국내 시장 확보 및 수출 가능성 확보. 		
색인어	국문	암 진단	순환종양세포	세포 부착/분리
		전도성 고분자,	나노구조체	나노와이어
	영문	cancer diagnosis	circulating tumor cells	cell capture and release
		nanostructure,	conducting polymer	nanowire

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	The fabrication of conductive polypyrrole nanowire and its applications for cancer cell capture and electrochemical release
Key Words	Cancer diagnosis, circulating tumor cells, cell capture and release, nanostructure, conducting polymer, nanowire
Project Leader	Youngnam Cho, PhD, NExT Branch, Research Institute, National Cancer Center
Associated Company	Not applicable
<p><Final Research Goal></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fabricate and characterize conductive polypyrrole-based nanowire. 2. Evaluate electric-field mediated circulating cancer cell capture/release efficiency using conductive nanowire. <p><Research Methods and Results></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fabricate and characterize conductive polypyrrole-based nanowires <ul style="list-style-type: none"> • The experimental conditions for fabricating anodic aluminium oxide (AAO) template were optimized. • Synthetic routes for the fabrication of conductive polypyrrole-based nanowire with diverse diameters and lengths were explored. • The method for decorating nanostructured surface with specific ligands (e.g., anti-EpCAM) were developed and evaluated their biological activity. • Functionalized nanoparticles were incorporated into conductive polypyrrole-based nanowire and evaluated their chemical/biological activity. 2. Evaluate electric-field mediated circulating cancer cell capture/release efficiency using conductive nanowires. <ul style="list-style-type: none"> • We characterized the effect of anti-EpCAM on the preferential adsorption of a cell suspension of EpCAM-positive cancer cells (MCF7 breast cancer and PC3 prostate cancer cells) and EpCAM-negative cancer cells (HeLa cervical cancer cells) on Ppy substrates. • A methodology for non-destructively releasing captured cancer cells from anti-EpCAM-immobilized, biotin-doped Ppy were developed. • The released cells were collected and re-cultured to test viability. • According to the cell capture and release performance using artificial blood samples, a series of cell spiking experiments demonstrated high capture efficiency. • A conductive nano-roughened microfluidic device was developed and demonstrated its use as an electrically modulated capture and release system for studying rare circulating tumor cells (CTCs). 	

- An integrated multifunctional system was constructed by conductive disulfide-biotindoped polypyrrole nanowires (SS-biotin-Ppy NWs) for capture, release, and in situ quantification of circulating tumor cells (CTCs).

<Accomplishment>

- Quantitative
Number of publication of SCI journals: 8 papers / 3 papers = 267%
Cumulative IF 47.05 / 14 = 336%
- Qualitative
 - Provide an original technology for fabricating multifunctional conductive polymer nanowire.
 - Offer the ability to capture circulating tumor cells with high efficiency and non-detrimentally release of the captured cancer cell in response to the applied electric fields.
 - Expect to the transfer of technical know-how about electric-field mediated CTC capture/release system.

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

1. 연구의 최종목표

<최종목표>

고성능 전도성 폴리머 나노 와이어의 제작을 통하여 peripheral blood 및 solid tumor tissue 로부터 전기 자극에 의하여 타겟 암세포만을 손상없이 분리할 수 있는 원천 기술을 개발하고 원발암성 및 전이암 병소의 진단에 응용.

<연구배경>

1.1. Nanostructured substrates as an efficient platform for cell growth

Numerous cellular processes including survival, proliferation, differentiation and migration are initially manipulated by the formation of cell adhesions to underlying substrate (i.e., extracellular matrix (ECM)) by mediating cell-cell and cell-ECM substrate that subsequently trigger a series of biochemical signaling pathways. As the engineered nanostructures mimic the nano-architecture of the natural ECM, the interests in cell-substrate interactions have been stimulated and the attempts to engineer the surface adapted into traditional cell biological work have been made. Significant efforts have been devoted for the fabrication of nanostructured materials due to their unique properties including nanosize, high surface area-to-volume ratio, high porosity, and tunable physicochemical properties. Such nanostructured materials analogous to the components of ECM actively regulate cellular responses by creating artificial microenvironments which resemble the micro/nano-structure and chemical composition in the body.

Recently, some efforts are directed toward designing ECM-mimicking nanostructured materials as templates (scaffolds) to support cell growth and function. Ma et al has demonstrated that nano-textured polymeric surfaces show the potential for bone regeneration by differentiating MSCs towards osteoblastic cell types.¹ Webster et al shows that the fibrous carbon nanotube substrates provide a suitable environment for cell adhesion and proliferation by mimicking unique topographic and porous features of ECM.² Additionally, the electrical conductivity of CNT scaffolds guide and control the adhesion and proliferation of interacting cells in a desired way. Vertical nanowire (NW) substrates were favorable for fibroblast cell attachment, proliferation, and differentiation by mediating cell-to-cell adhesion and function on the ECM-resembling assembly.³ Park et al has demonstrated that the electrospun polymer nanofibers produced by covalently grafting with cell adhesive peptide promote the cellular responses in a controlled way.⁴ Such recent findings indicated that nanostructured surfaces with enhanced morphology and functionalities provide specific structural and chemical cues for improved cellular performance. Indeed, compared to flat substrate, the cells grown on nanostructured surfaces produce many lamellipodia, filopodia, microspikes, and microvilli, supporting that cell makes stable connections to a substrate.

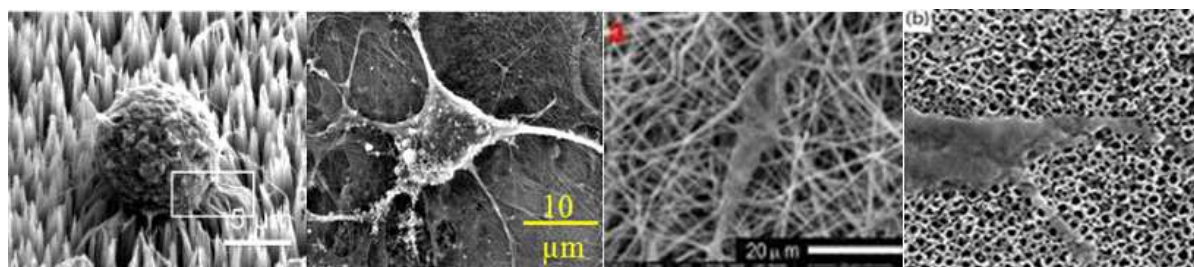


Figure 1-1. The cell growth on various nanostructured substrates.

Accordingly, nanostructured surface has been actively investigated as a platform to achieve a better understanding of how nanostructures affect cellular behaviors such as adhesion, viability, migration, differentiation, and morphology.

1.2. The conductive polymer substrates for biological applications

The fabrication methods for conductive polymer composites have been actively investigated for various applications, in particular prosthetic devices, tissue engineering scaffolds in human body, and controlled drug release. Recently, conducting polymers have attracted much interest as suitable matrices in drug delivery system. Indeed, considerable improvements in the performance of conducting polymer with electrochemically controlled drug release profile have been achieved. Conducting polymers such as polypyrrole (Ppy) can be electrochemically deposited on electrodes by entrapping a variety of anions and cations including anti-cancer drugs, growth factors, anti-inflammatory drugs, ATP, glutamate and protonated dopamine.⁵⁻⁶ These dopants inside the membrane can be released in response to electrical stimulation. Site-specific drug delivery in the vicinity of an implantable device can enhance the performance of drugs and also reduce the exposure of the drug to the whole body and thus prevent potential toxicity.

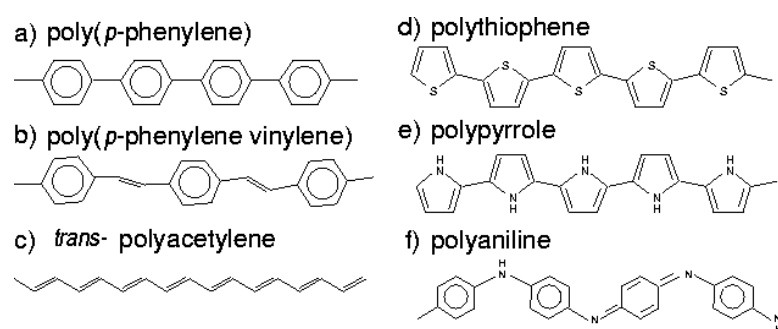


Figure 1-2. The basic class of conducting polymer materials.

On the other hand, conducting polymers are being considered as an unique artificial platform to engineer cellular interactions due to their excellent biocompatibility and low cytotoxicity. An interfacial contact between conducting polymer-based substrate and cells not only controls cell behavior but also promotes electrical signals to stimulate the cell-specific biological function. Inspired by these features, this unique cell-polymer interface seems to be well suited as platform for cancer cell detection, capture and/or sorting in view of their versatility, stability

and specificity. Conducting polymer offers the potential of serving as a biologically inspired platform: i) The spontaneous reversible red-ox reaction of conducting surfaces enables the release of biomolecules in a controlled way. ii) Given that conducting polymer not only reduces the impedance of the electrode to facilitate the signal transport with the tissue but also promotes the cell adhesion in the presence of peptide fragments on the surface of the particles, these platform can be further utilized as a biosensor or cell-related diagnostic and therapeutic platforms. iii) Such biocompatible polymer offers suitable functionalities for conjugation to biomolecules. iv) Conducting polymer can serve as a mechanical buffer between hard inorganic surface and soft tissue and thus facilitate the adhesion of desired cells with long-term stability. v) The chemical substances (e.g., drugs, nerve growth factors, neurotrophic factors, etc) embedded in conducting polymer films can be released in desirable amounts in response to electrical stimulation over an extended period. In addition, the simplicity of fabrication allows our construction to be integrated with conventional cell-chip devices that are already clinically used. The most widely studied classes of conductive polymers include polyacetylene, polypyrrole, and polyaniline. Of them, polypyrrole has been actively investigated due to its aqueous solubility, low oxidation potential, high conductivity, and biocompatibility with mammalian cells.

1.3. Traditional cell capturing and releasing methods

The manipulation of cell-substrate interactions is essential to achieve a better understanding for isolation and interrogation of living cells. The isolation of cell subpopulations from the heterogeneous population in blood or other body fluids is important for the proper applications in both basic cell biology studies and clinical diagnostics. Particularly, as the detection of very low levels of cancer cells from blood is critically important in deciding cancer in the early stages, cell isolation is essential for elucidating cancer development and progression mechanisms. Cell isolation has been attempted through various strategies such as the size or volume, density, or electrical properties, depending on the methods such as filtration, centrifugation, dielectrophoresis or affinity binding. Among them, affinity binding is most commonly employed due to its high specificity. Cell isolation can be conducted by recognizing surface-immobilized ligands, such as antibodies, to antigens present on target cell membrane. Relying on such antigen-antibody specificity, magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence activated cell sorting (FACS) are currently utilized to achieve specific cell isolation. MACS as a single-parameter cell isolator uses a magnetic field to sort microbeads specifically bound to the target cells in conjunction with antibody-based affinity. FACS enables simultaneous manipulation of multiple species of fluorescently labeled antibodies and thus allows sorting of multiple cell types. However, current cell isolation methods result in relatively low yield rates requiring complex and expensive experimental settings.

On the other hand, circulating tumor cell (CTC) has been actively investigated as a emerging tumor biomarker as it provides a valuable information in diagnosis and prognosis in cancer metastasis. Indeed, highly efficient quantification of CTC in patient blood is a very

promising for early cancer diagnosis. However, extreme rarity of CTCs in bloodstream makes it challenging to develop a methodology for isolating/counting of CTCs. Recent studies show various technical advancements in CTC detection and characterization including size / density-based centrifugation, immunomagnetic separation, multiplex reverse-transcription quantitative PCR (RT-PCR)-based methods, image-based approaches, and microfilter and microchip devices.⁷ However, these approaches have some limitations to be used in clinic due to its low recovery rate and poor purity while requiring highly specialized sample processing and handling. Therefore, it is necessary to develop a method that allows enhanced capture and easy release of live cells from affinity surfaces for subsequent analysis and detection. Recently, a number of studies have demonstrated enhanced local topographical interactions between nanostructured substrates and nanoscale components of the cellular surface (e.g., microvilli, filopodia) as a result of increased cell/substrate contact frequency and duration, consequently promoting cell capture efficiency through multivalent binding between cells and nanostructured surface.⁸

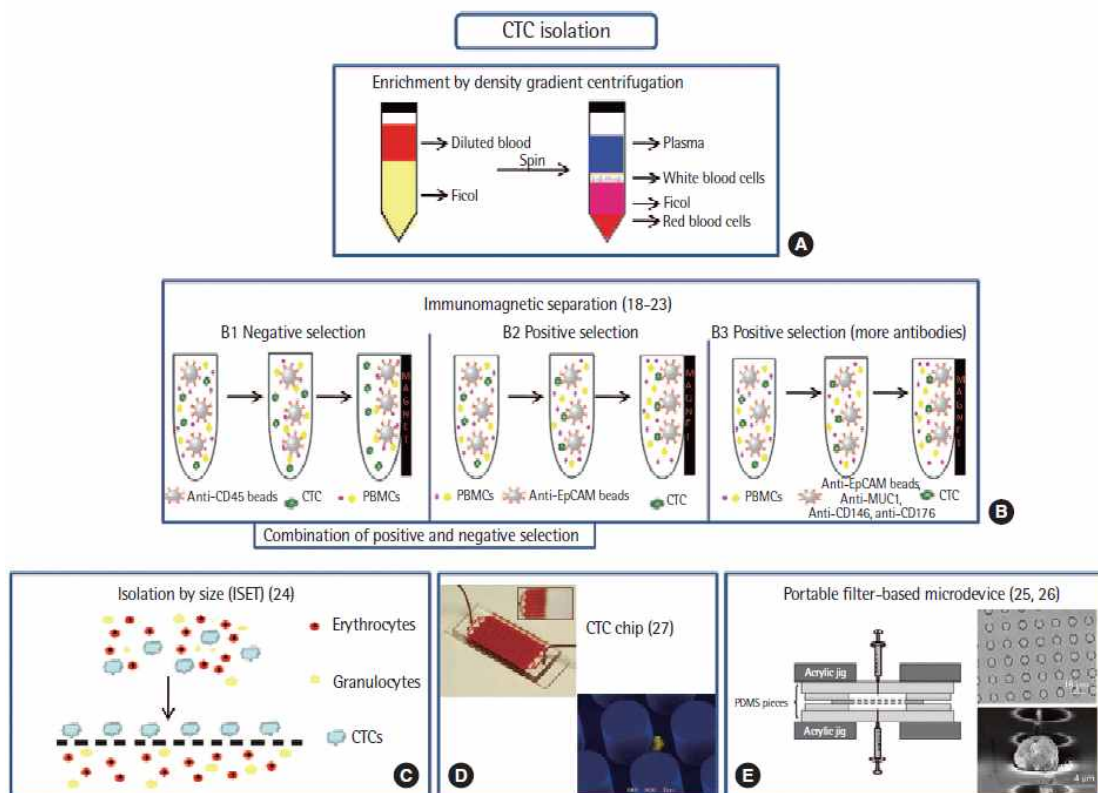


Figure 1-3. The current methods for CTC isolation.

In this grant, I plan to develop an efficient strategy to construct 3D conductive nanowire to capture, isolate and release cells in response to applied electric field, ultimately utilizing them as an efficient cell-capture/release tool.

2. 연구의 내용 및 결과

1) biotin-doped 전도성 폴리피롤 필름의 제작 및 EpCAM-positive or negative인 암세포를 선택적으로 부착/분리하는 연구

- ITO 표면에 biotin이 doping된 polypyrrole 코팅은 0.7V로 1분동안 일정 전압을 가하는 전기중합 (electropolymerization) 방법을 통해서 이루어졌다. (그림 2-1)

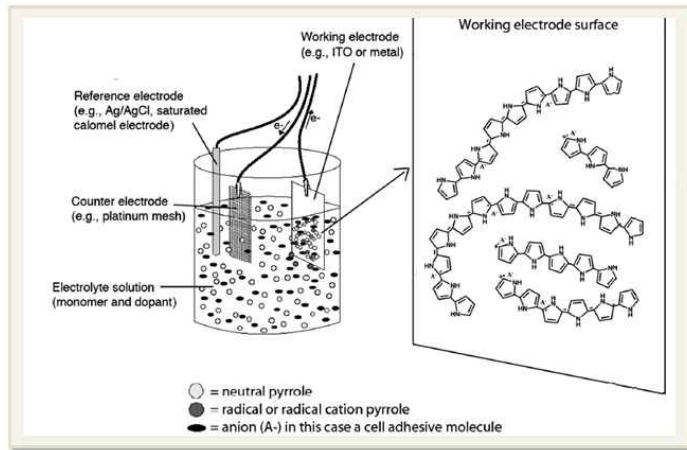


그림 2-1. Electropolymerization 방법을 통해 ITO 표면에 biotin-doped된 polypyrrole을 코팅한다.

- 제작된 biotin-doped polypyrrole 의 생체 안정성 및 전기적/물리적/화학적 특성을 SEM, XPS, Four-point probe 및 cell viability 분석으로 평가하였다.
- EpCAM 항체를 polypyrrole 표면에 고정화시키기 위해서 biotin-doped polypyrrole을 i) streptavidin으로 반응시키고, ii) biotinylated EpCAM 항체를 부착시켰다.
- 또한, polypyrrole에 탑재한 biotin의 양에 따른 EpCAM 항체의 고정화 정도 및 암세포의 부착 능력을 조사하였다. 그림 2-2a에서와 같이 EpCAM 항체의 고정화 없이는 EpCAM-positive인 MCF7 세포의 부착은 거의 보이지 않았다. 그림 2-2b에서 보인 것처럼 polypyrrole 내에 탑재된 biotin의 농도가 증가할수록 더 많은 양의 EpCAM-positive cells (MCF7, PC3)의 부착을 보였으며, EpCAM-negative cell은 biotin의 농도와는 상관없이 거의 부착되지 않는 것을 관찰하였다.

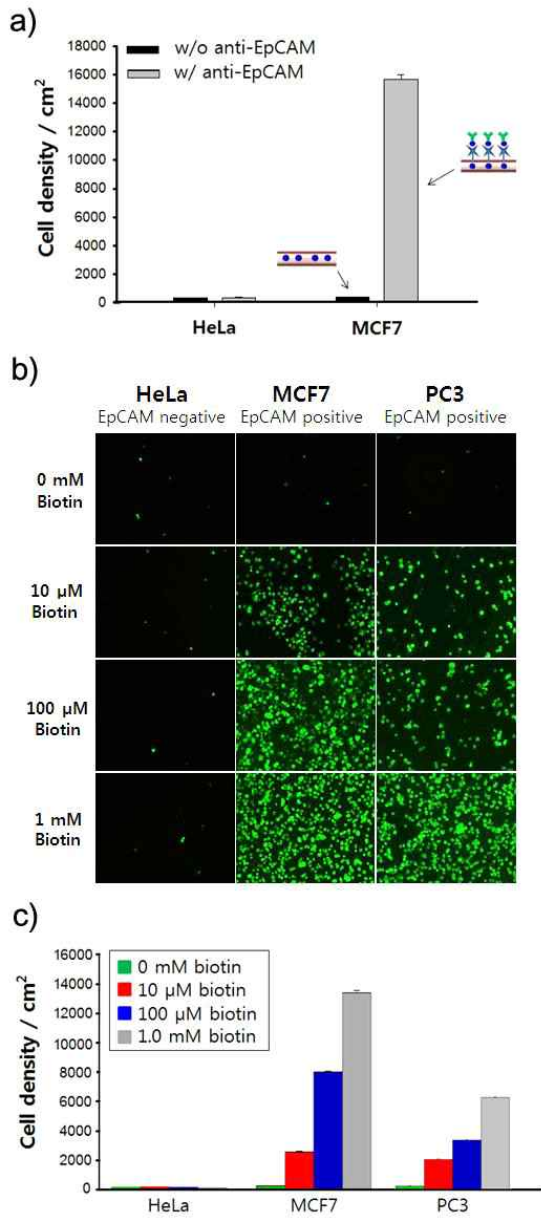


그림 2-2. (a) biotin-doped polypyrrole에 EpCAM 항체를 고정하지 않은 경우 MCF7 cell의 부착에는 큰 차이를 보인 반면 HeLa cell에는 영향을 주지 않는다. (b~c) polypyrrole에 탑재된 biotin의 농도가 증가할수록 EpCAM-positive cell 부착정도에 일정한 향상을 보여준 반면, HeLa cell에는 거의 상관없는 결과를 보이고 있다.

- EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole에 부착된 암세포들을 손상없이 미세한 전기 자극으로 분리하기 위한 시도가 있었다. 다양한 전압과 시간을 가하여 암세포의 분리 정도 및 cell viability를 비교 조사하였다. (그림 2-3)

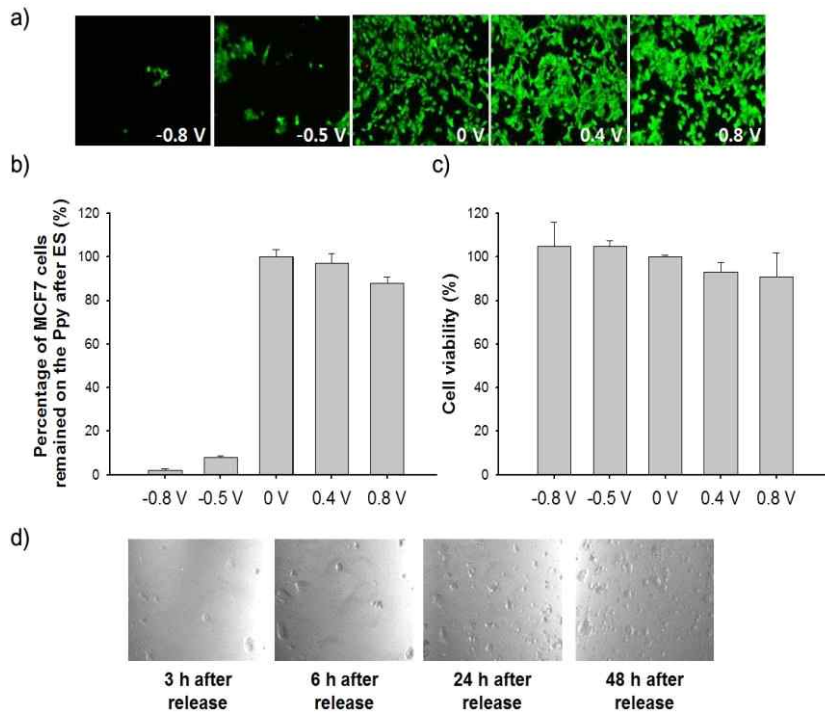


그림 2-3. EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면에 부착된 암세포가 외부에서 가해진 다양한 전압에 반응하는 모습. negative 전압에서만 암세포의 분리가 일어남을 관찰할 수 있음. 분리된 암세포의 cell viability 연구 결과 control 세포와 비슷한 양상을 보임.

- 1초 ~ 1분에 걸쳐 가해진 negative 전압은 polypyrrole 필름을 팽창시켜서 polypyrrole 내에 탑재되어 있던 biotin molecules들을 자유롭게 release 되도록 해 주는 동시에 biotin-streptavidin-biotinylated EpCAM에 연결되어 있던 암세포들도 손상없이 표면으로부터 분리시켜준다. (그림 2-4)

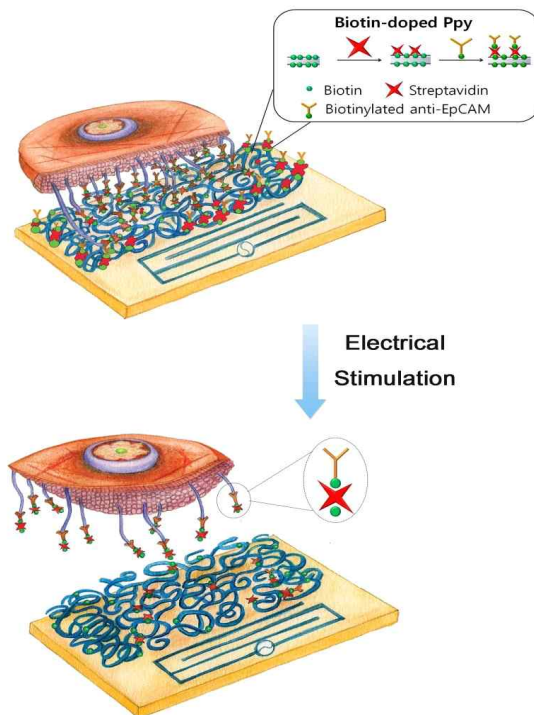


그림 2-4. EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면에 부착된 암세포가 외부에서 가해진 negative 전압에 반응하여 손상없이 release 되는 현상.

- EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면으로부터 전기 자극으로 인해 분리된 암세포를 다시 배양하여 cell phenotype에 변화가 있는지 조사하였다. 그림 2-5에 따르면 전기 자극 전후에 MCF7 세포 표면에 발현된 EpCAM의 양에는 변화가 없는 것으로 확인되었으며, 또한 fluorescent-tagged secondary antibody (green) 를 사용하여 cell 표면에 분포한 EpCAM을 확인한 결과 전기 자극 전후의 cell phenotype에는 변화가 없음을 확인하였다.

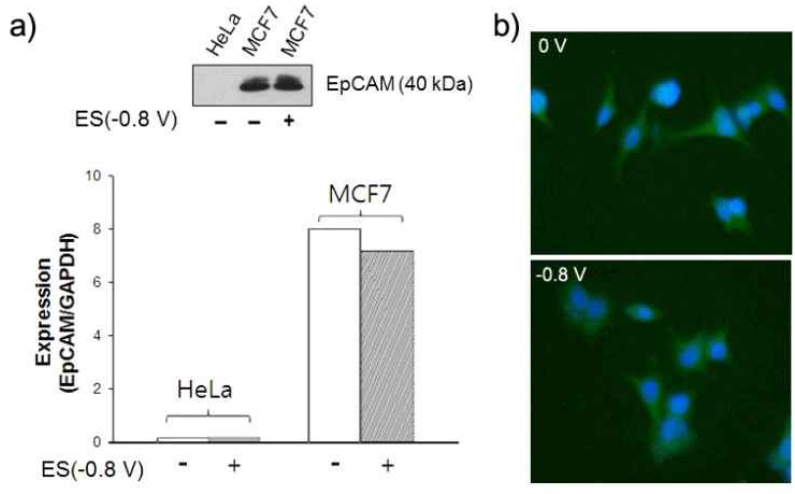


그림 2-5. EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면에 부착된 암세포가 외부에서 가해진 negative 전압에 반응하여 release 된 후 cell phenotype에 변화가 있는지 확인하기 위해 전기 자극 전과 후에 세포 표면에 발현되는 (a) EpCAM의 양을 Western blot으로 비교하였음. (b) fluorescent-tagged secondary antibody (green)를 붙여서 전기 자극 전후의 EpCAM 발현 정도를 비교함.

- EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole이 EpCAM-positive 세포만을 선택적으로 검출하는지 확인하기 위하여 EpCAM-positive인 MCF7과 EpCAM-negative인 HeLa 세포를 1:1로 혼합하여 실험하였다. 그림 2-6에서 관찰된 것과 같이 polypyrrole 필름은 MCF7 세포에게만 특이적으로 반응하여 부착했으며, 그 결과 95%의 capture yield와 96%의 purity를 보였다.

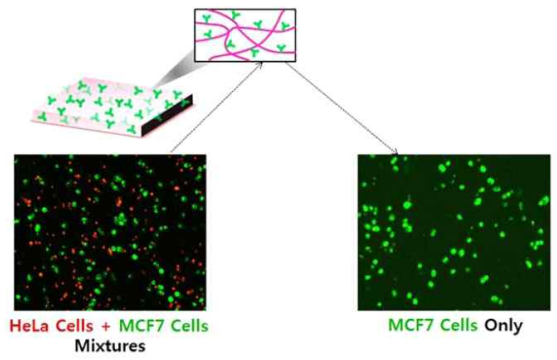


그림 2-6. EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면에 EpCAM-positive인 MCF7과 EpCAM-negative인 HeLa 세포를 1:1로 혼합하여 부착 실험을 한 결과 MCF7 세포만 선택적으로 검출되는 결과를 보임.

- 실제로 혈액에서 순환종양세포를 검출할 수 있는지 확인하기 위해 인공적으로 MCF7 세포들을 전혈 (whole blood)에 추가하여 실험하였다. 100 ~ 1000개의 MCF7 세포들을 혈액에 섞어서 EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 필름에 떨어뜨렸을 때 대부분의 MCF7 세포들은 표면에 부착되었으며 2초동안의 전기 자극을 통하여 90%의 MCF7 세포들을 손상없이 회수할 수 있었다. 이에 반해, 대부분의 혈구세포들은 polypyrrole 표면에 부착되지도 않을뿐더러 부착되었다고 전기자극을 가할 때 release 되지 않고 polypyrrole 표면에 그대로 남아있는 것을 확인하였다. (그림 2-7)
- polypyrrole 표면에 capture 되고 release된 MCF7 세포와 백혈구를 immunofluorescence로 확인한 결과 백혈구에서 특이적으로 발현되는 CD45 와 MCF7에서 발현되는 CK의 존재를 각각 확인하였

다.

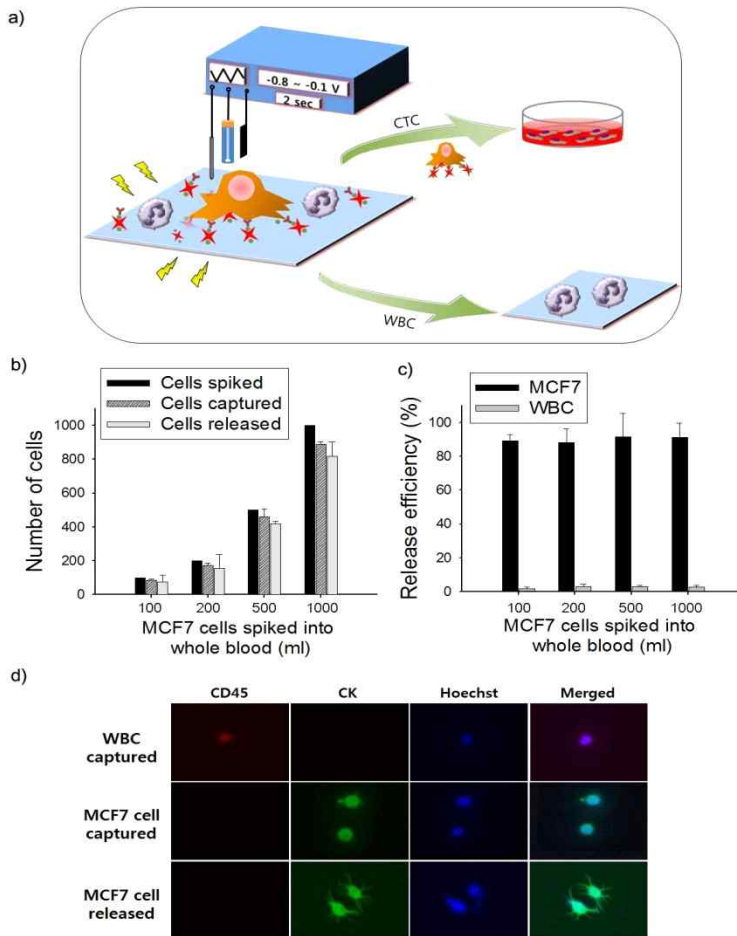


그림 2-7. 1 ml 혈액에 100 ~ 1000 개의 MCF7 세포를 혼합한 후 EpCAM 항체가 고정된 polypyrrole 표면에 부착되고 분리된 MCF7 세포와 백혈구의 수를 확인하였다. 또한 immunifluorescence imaging을 통하여 WBC와 MCF7에서 발현되는 CD45 및 CK의 존재를 확인하였다.

2) SS-biotin-doped 전도성 폴리피롤 나노와이어의 제작 및 EpCAM-positive or negative인 암세포를 선택적으로 부착/분리하는 연구

- Cell Capture 하는 platform을 기존의 평면 방식보다는 3차원의 구조체로 변경한다면 훨씬 향상된 cell과의 interaction을 기대해도 될 것이다. 따라서, 본 연구계획서에서 제안한 실험과 같이 3차원의 전도성 나노와이어 구조체를 anodic alumina oxide (AAO) 라는 template을 사용하여 제작하였다. (그림 2-8)
- 사용된 AAO의 pore diameter 및 length에 따라 제작된 polypyrrole 나노와이어의 dimension이 결정되어진다.

▪ AAO template-assisted approach

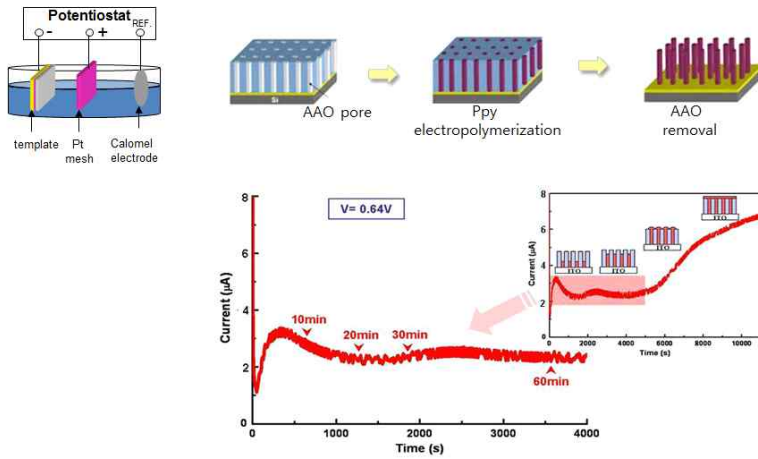


그림 2-8. AAO template를 사용하여 polypyrrole 나노와이어 구조체를 제작하는 과정.

- 또한, polypyrrole을 AAO pore에 전기 중합적 방법으로 electro-polymerization 할 때 NHS-SS-Biotin을 함께 혼합하여 제작하였다. 그림 2-9A에서 설명한 것과 같이 Biotin-doped Polypyrrole 나노와이어 구조체에 streptavidin과 biotinylated EpCAM 항체로 추가로 표면 개질을 하였다.

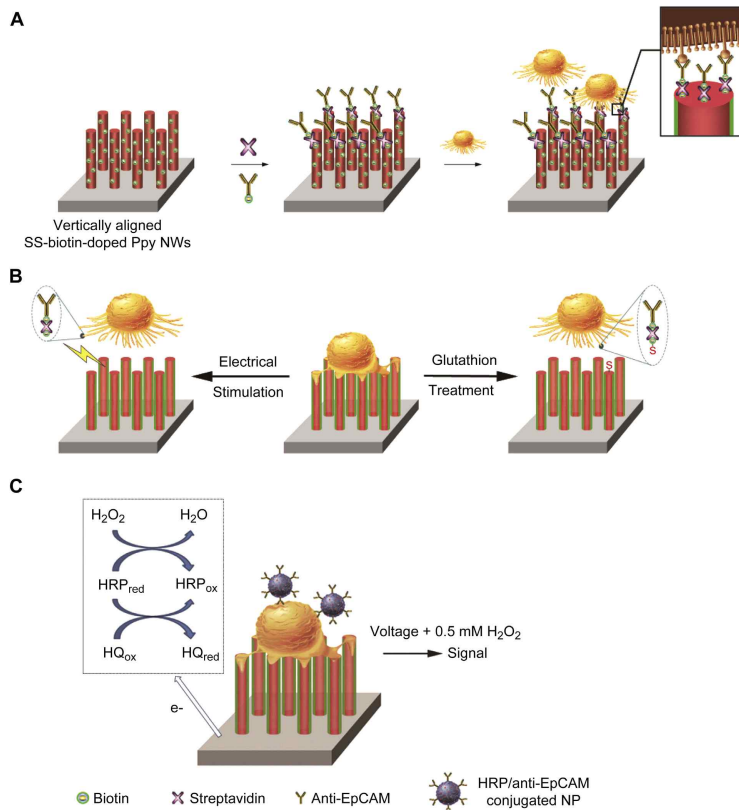


그림 2-9. (A) polypyrrole 나노와이어 구조체에 EpCAM 항체를 고정화시키는 process, (B) CTC를 검출한 후 전기 자극 또는 glutathion treatment에 의해 손상없이 분리하는 과정, (C) 나노 와이어 표면에 부착된 암세포의 수를 정량적으로 측정하는 센서의 개발.

- NHS-SS-Biotin가 도핑된 polypyrrole 나노와이어 구조체를 이용하여 부착된 암세포를 전기자극 또는 glutathion에 의해 손상없이 분리하는 연구를 수행하였다. (그림 2-9B)

- 또한, polypyrrole 나노와이어 구조체를 이용하여 부착된 암세포를 정량적으로 측정하기 위하여 전기화학적 방법을 추가하여 소량의 암세포도 count할 수 있는 바이오 센서 기술을 개발하였다. (그림 2-9C)
- EpCAM 항체 고정화된 polypyrrole 나노와이어 구조체의 EpCAM-positive 세포의 선택적인 부착 능력을 평가하기 위하여 MCF7 cell과 HeLa cell을 평면 polypyrrole 필름과 3차원 polypyrrole 나노와이어 구조체에 부착하였다. 그림 10에서 보는 것과 같이 3차원 나노구조체에서 평면보다 탁월한 세포 부착 능력이 있음을 입증하였다. EpCAM-negative인 HeLa 세포는 평면과 3차원 나노구조체 사이에 부착 능력에 있어서 차이를 보이지 않았다. (그림 2-10)

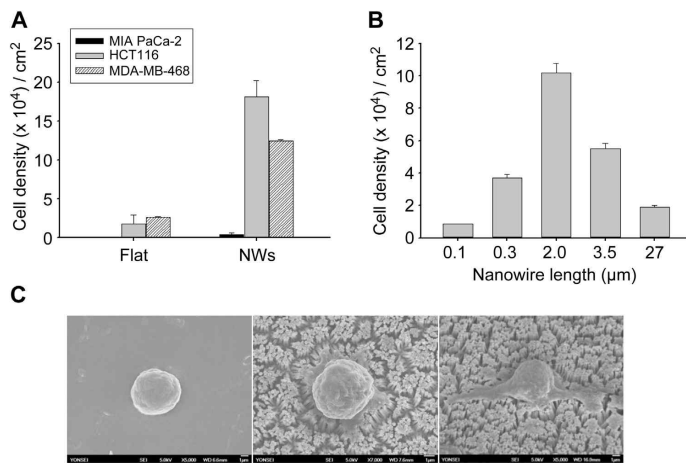


그림 2-10. (A) Flat polypyrrole (Ppy) 및 Ppy 나노와이어 구조체에 MCF7과 HeLa 세포의 부착 능력을 비교하였음. (B) 나노와이어 길이별 암세포의 부착 능력 비교. (C) SEM을 통하여 flat 또는 나노와이어에 부착된 암세포의 이미지를 확보함.

- 전기 자극 및 glutathione에 의하여 부착된 암세포가 가해진 voltage 또는 treatment 시간에 따라 효율적으로 분리되는 것을 확인하였다. 또한, 검출된 암세포를 분리/수집하여 배양한 결과 표면의 단백질의 변화가 없음을 western blot을 통하여 확인 하였다. (그림 2-11)

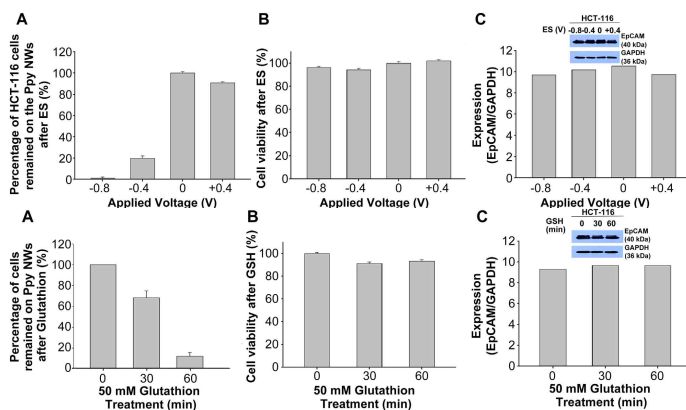


그림 2-11. (상) Ppy 나노와이어 구조체에 부착된 HCT116 세포를 전기자극에 의해 분리하는 과정. (하) Ppy 나노와이어 구조체에 부착된 HCT116 세포를 glutathion 처리에 의해 분리하는 과정.

- Ppy 나노와이어 구조체에 부착된 HCT116 세포의 수를 정량화하기 위하여 HRP-label된 나노입자와 반응시켜서 극소량의 암세포도 선택적으로 측정할 수 있는 시스템을 개발하였다. (그림 2-12)

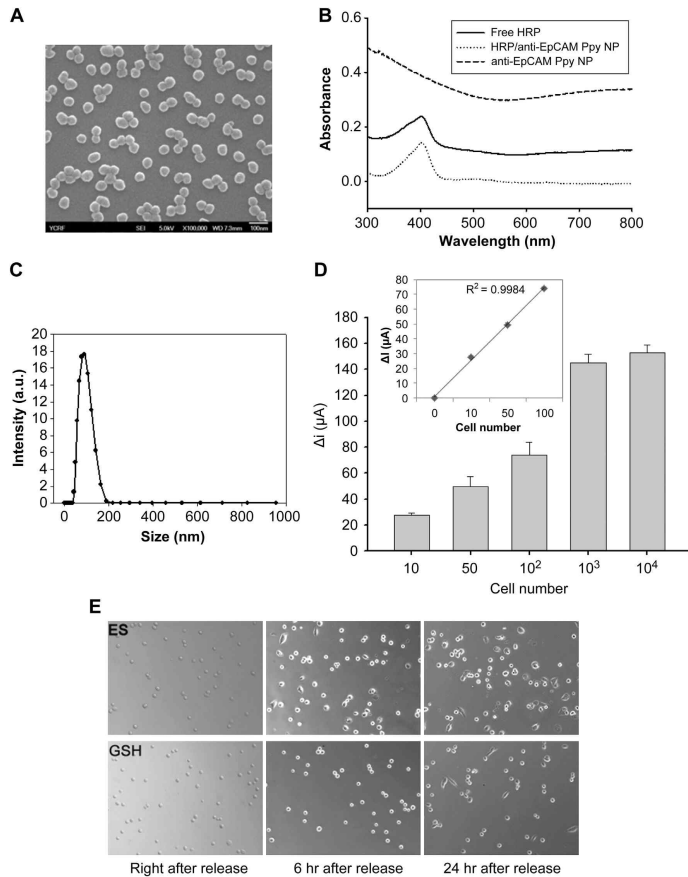


그림 2-12. (A) HRP-label된 나노입자의 SEM 이미지. (B) UV-Vis data를 이용하여 각 나노입자가 HRP를 incorporation 하였는지 평가. (C) 합성된 나노입자의 size를 측정. (D) Ppy 나노와이어에 부착된 HCT116 세포의 양에 따른 전기적 신호의 변화를 관찰. (E) Ppy 나노와이어 구조체에 부착된 HCT116 세포를 전기자극 (ES) 또는 glutathion (GSH) 처리에 의해 분리한 후 24시간 후까지의 morphological 변화를 관찰.

3) biotin-doped 전도성 폴리피롤을 마이크로 플루이딕 채널에 고정화 시킨 후 전기 화학적 반응에 의해 암세포를 검출/분리하는 기술

- Ppy 나노구조체를 마이크로 플루이딕 시스템과 접목시켜서 다량의 혈액에서 단시간에 농축된 암세포를 검출/분리할 수 있는 기술을 개발하였다. (그림 2-13) Voltage에 따른 polypyrrole 폴리머 표면의 거칠도 (roughness) 가 변화됨을 알 수 있다.

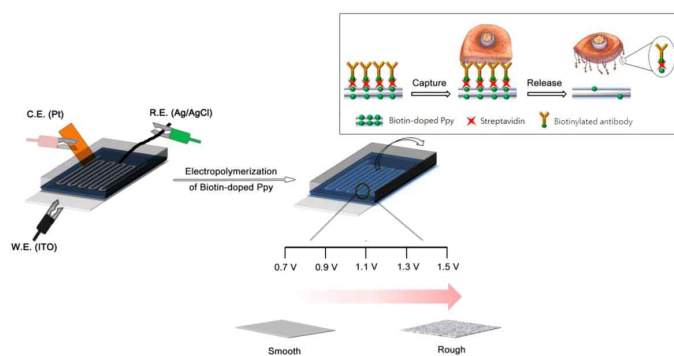


그림 2-13. 마이크로 플루이딕 채널에 biotin-doped된 Ppy 나노구조체를 전기화학적으로 코팅한 후 표면에 anti-EpCAM 을 고정화하는 기술.

- 그림 2-14에서 보는 것과 같이, 가해진 voltage에 따른 polypyrrole 표면의 거칠도의 값이 달라짐에 따라 암세포의 부착능력 또한 달라짐을 알 수 있다. Applied voltage 값이 높아질수록 폴리머 표면의 거칠도도 높아지고 또한 cell capture yield 가 월등히 향상됨을 알 수 있다. (그림

2-14 상)

- 마이크로 플루이딕 시스템의 flow rate에 따른 cell capture efficiency를 비교하였다. 일반적으로 flow rate 이 느릴수록 cell capture 효율이 좋으나, 마이크로 플루이딕 채널에 고정된 EpCAM 항체의 양이 증가할 때, 즉 50 ng/ml일 때는 flow rate과 상관없이 높은 cell capture 효율을 보였다. (그림 2-14 하)

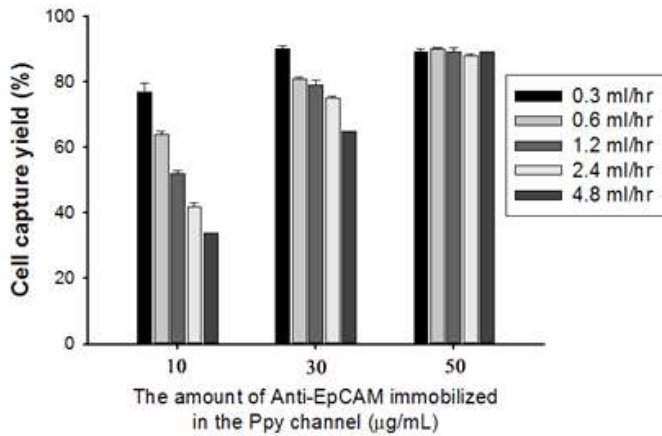
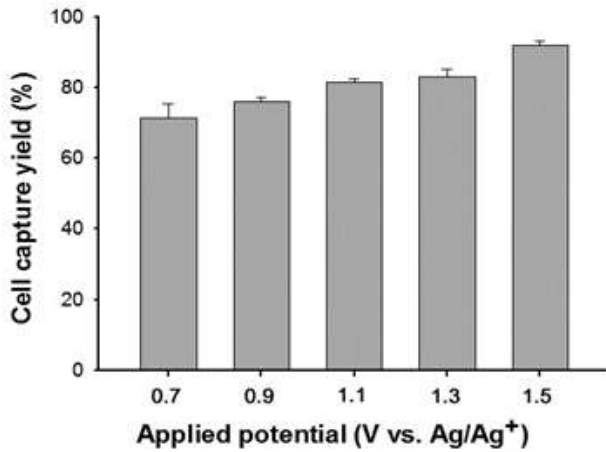


그림 2-14. (상) 가해진 voltage에 따라 마이크로 플루이딕 채널에 코팅된 biotin-doped된 Ppy의 거침도가 변화됨, 거침도가 높아질수록 cell 부착능력이 향상됨. (하) 마이크로 플루이딕 시스템의 flow rate에 따른 세포 부착 능력 변화.

- Voltage의 변화, 즉 negative voltage와 positive voltage를 한꺼번에 가할 때 비선택적으로 부착된 백혈구는 제거하며 암세포만을 선택적으로 분리하는 기술을 확인하였다. (그림 2-15)

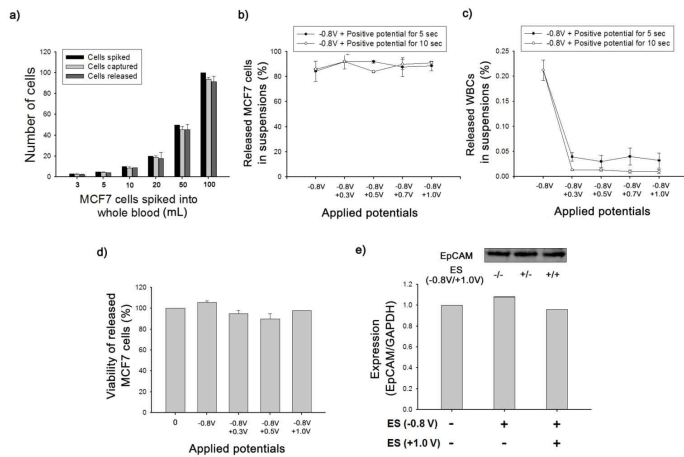


그림 2-15. (A) 혈액 내 존재하는 암세포 (MCF7)를 선택적으로 분리하였음. (B)-(C) Ppy 나노와이어에 부착된 세포에 다양한 voltage를 가하여 MCF7을 선택적으로 분리하며 WBC는 제거하는 과정. (D) Voltage에 따라 분리된 암세포의 viability. (E) Western blot을 통해 분리된 암세포의 EpCAM expression을 측정.

- 전기 자극 전과 후에 관찰을 통해, 마이크로 플루이딕 채널에 capture된 암세포와 백혈구의 모습의 변화를 분석하였다. -0.8 V 와 0.5 V 를 차례대로 가했을 때 마이크로 플루이딕 채널에 비선택적으로 부착된 대부분의 백혈구는 전도성 표면과의 직접적인 접촉을 통해 타서 세포 표면이 깨짐으로 제거되는 양상을 보인 반면, 리간드에 의해 표면으로부터 약간 떠 있는 듯 붙어있는 암세포는 손상없이 제거되는 것을 관찰하였다. (그림 2-16)

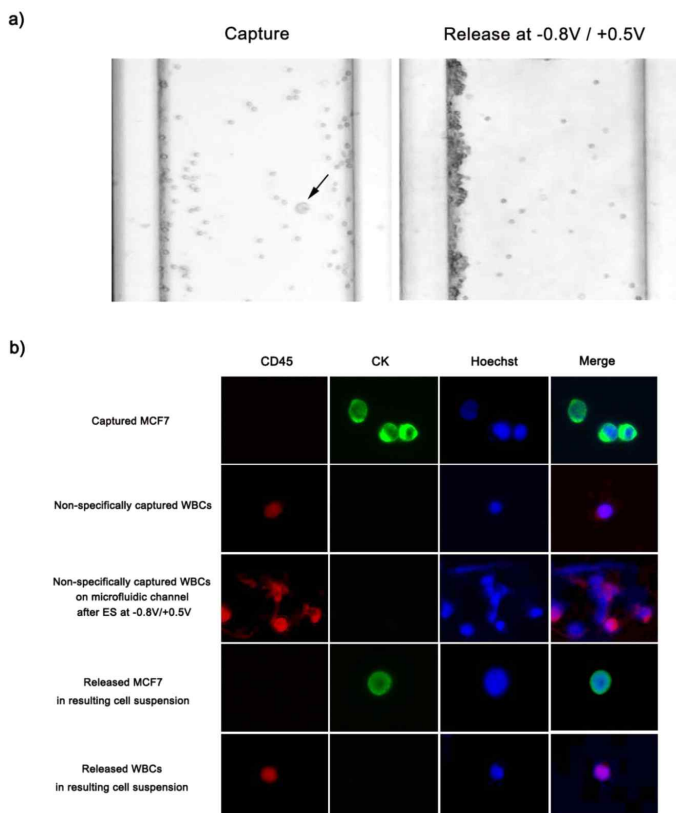


그림 2-16. (A) 마이크로 플루이딕 채널의 모습. 혈액 내 존재하는 암세포 (MCF7)는 선택적인 부착 및 백혈구의 비선택적인 부착 모습. -0.8V 와 0.5V 의 연속적인 전기 자극 후에 암세포는 손상없이 분리된 반면 대부분의 백혈구는 전기 자극에 의해 세포 표면이 깨지는 현상이 발생됨. (B) 형광염색을 통하여 Ppy 나노와이어에 부착된 세포의 다양한 morphology를 관찰함.

- EpCAM 한가지의 항체 뿐만 아니라 5종류의 항체를 혼합하여 Ppy 나노와이어를 제작하였다. Antibody mixture-immobilized Ppy 코팅된 마이크로 플루이드스의 cell capture 효율이 EpCAM 항체 한 가지만 사용하였을 때의 경우보다 월등히 향상된 검출/분리 효과를 보였다. (그림 2-17)

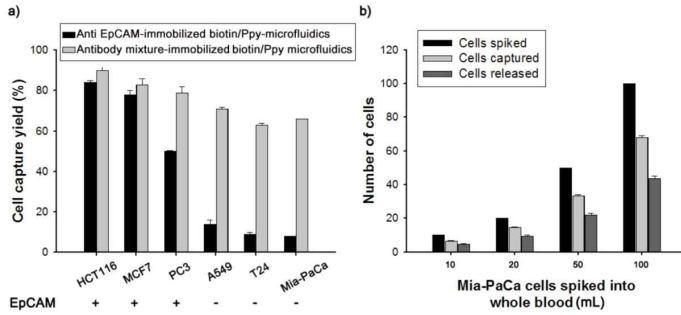


그림 2-17. (A) 마이크로 플루이드 제작 시 immobilized된 항체의 종류에 따른 암세포의 부착 능력 평가. (B) 혈액에 EpCAM-negative인 암세포를 spike시킨 후 antibody mixture-immobilized Ppy 마이크로 플루이드스의 검출 및 분리 효율 분석.

3. 연구결과 고찰 및 결론

- 혈중암세포 (CTC)의 분석은 암의 조기 발견과 치료 및 전이과정 규명을 위한 새로운 진단분야로서 많은 관심을 받고 있다. 환자의 혈액 내에서 검출/분리된 CTC를 통하여 새로운 암 표지자의 발굴 및 암 전이의 메커니즘을 밝히는 등의 생물학적 연구뿐만 아니라 실제 임상에 적용하여 수술 후 조기 재발 여부 판정에 도움이 되는 추적 관찰, 항암제 치료의 기능을 모니터링하는 기술, 더 나아가 분리된 혈중암세포의 분자생물학적 특성 분석을 통한 환자 개인별 맞춤형 치료까지 가능하게 하고 있다.
- 그러나, 혈액에 존재하는 혈중암세포의 수가 매우 적고 또한 검출 및 분리가 용이하지 않기 때문에 실제로 얻을 수 있는 표본의 양이 매우 제한적이다. 또한, 다량의 혈구세포가 비선택적으로 검출되기 때문에 false-positive로서 암세포의 분석에 방해가 되고 있다.
- 최근의 혈중암세포 검출 및 분리 방법의 기술적 진보는 이러한 문제점들을 극복하게 하며 다양한 검출 플랫폼들을 통하여 임상 적용을 가능하게 했다. 현재 혈중암세포의 분리와 농축을 위해 가장 널리 쓰이는 방법으로는 밀도차를 이용한 원심분리법, 상피종양세포들의 크기를 이용한 미세여과법 (isolation by size of epithelial tumor cells, ISET), 상피세포 특정 항체를 이용한 면역자기분리법 (immuno-magnetic isolation), 다중역전사정량중합효소연쇄반응 (RT-PCR), 및 미소유체공학 (Microfluidics)이나 마이크로칩 장치 같은 최신의 분석 플랫폼들이 있다.
- 검출된 혈중암세포는 면역세포화학법 (immunocytochemistry, ICC), 높은 민감도의 전사정량중합효소연쇄반응 방법 (RT-PCR), 분자와 영상이 조합된 방법들 같은 혈중암세포들의 핵산분석법을 기반으로 한 분자분석방법, 혈중암세포에서 표현되는 암특이 단백질을 검출하는 Epi-Spot 분석 같은 단백질 기반 분석법 (즉, 항 CK (anti-cytokeratin) 항체를 이용한 검출)들을 통하여 검증되고 해석되어 진다.
- 본 연구에서는 biotin-doped polypyrrole (Ppy) 나노 구조체를 이용하여 EpCAM 양성 암세포를 혈액 내에서 특이적으로 포획하고 손상 없이 분리해낼 수 있는 기술을 개발하였다. Ppy에 도핑된 biotin에 암세포 특이적인 항체를 고정화시킨 후 혈중암세포를 효과적으로

검출할 수 있으며, 또한 다양한 전기 voltage에 의해 부착된 암세포의 분리가 조절되기 때문에 이를 이용하여 선택적으로 혈중 암세포를 포획하고 분리해낼 수 있다.

- Ppy 폴리머는 가공이 용이하며 비용이 경제적이라는 장점이 있다. Ppy를 이용하여 다양한 나노 구조체를 제작할 수 있으며, 또한 마이크로 플루이딕 시스템에 쉽게 전기화학적으로 코팅시켜 30분 내에 4 ml의 혈액에서 혈중암세포를 분리할 수 있는 기술을 제공할 수 있다.
- 또한, 전도성 폴리머인 Ppy를 바이오 센서로써 사용하여 환자 혈액으로부터 검출된 극미량의 암세포를 효과적으로 센싱하여 정량화 할 수 있는 기술에 사용할 수 있다. 마이크로 플루이딕 시스템을 통하여 검출된 암세포를 분리할 필요 없이 바로 전기화학적 방법으로 센싱하여 암세포의 양을 측정할 수 있다면 하나의 platform을 사용하여 암세포 검출, 센싱, 그리고 분리까지 할 수 있는 도구가 될 것이다.
- Ppy 나노 구조체에 도핑된 biotin을 통하여 암세포에 특이적인 다양한 항체들을 고정화 시킴으로써 EpCAM의 발현 유무에 관계없이 혈액내에 떠다니는 모든 암세포들을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
An Electroactive Biotin-Doped Polypyrrole Substrate That Immobilizes and Releases EpCAM-Positive Cancer Cells	조영남 (교신)	Angewandte Chemi Int. Ed. (11.336)	2014; 53:4597-4602	국외 SCI	1310180
An integrated multifunctional platform based on biotin-doped conducting polymer nanowires for cell capture, release, and electrochemical sensing	조영남 (교신)	Biomaterials (8.312)	2014; 35:9573-80	국외 SCI	1310180
High-Purity Isolation and Recovery of Circulating Tumor Cells using Conducting Polymer-deposited Microfluidic Device	조영남 (교신)	Theranostics (7.827)	2014; 4:1123-32	국외 SCI	1310180
A nanowire-based label-free immunosensor: Direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole	조영남 (교신)	Biosensors and Bioelectronics (6.451)	2014; 57:157-61	국외 SCI	없음
Action at a Distance: Functional Drug Delivery Using Electromagnetic-Field-Responsive Polypyrrole Nanowires	조영남 (교신)	Langmuir (4.384)	2014; 30:7778-788	국외 SCI	없음
Hyaluronic Q1 acid - polypyrrole nanoparticles as pH-responsive Q2 theranostics	조영남 (공동)	Chem. Comm. (6.718)	2014: Accepted	국외 SCI	없음
Electrically controlled release of the nerve growth factor from a collagen - carbon nanotube composite for supporting neuronal growth	조영남 (교신)	J. Mater. Chem. B	2013; 1:4166-70	국외 SCI	없음
A graphene oxide - photosensitizer complex as an enzyme-activatable theranostic agent	조영남 (제1)	Chem. Comm. (6.718)	2013; 49:1202-04	국외 SCI	없음

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
An integrated multifunctional platform based on biotin-doped conducting polymer nanowires for cell capture, release, and electrochemical sensing	홍우영 전승현 조영남	2014 한국바이오택 학회	국내	1310180

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	COMPOSITION COMPRISING OF A CONDUCTING POLYMER FOR DETECTING, CAPTURING, RELEASING, AND COLLECTING CELL	Youngnam Cho	국제출원 (미국)	14/141,366
발명특허	전도성 고분자를 포함하는 세포의 검출 및 회수용 조성물	조영남	국내출원	10-2013-0143833
발명특허	효소 반응성 그래핀 옥사이드/생체 고분자-광감각제 나노복합체 및 이를 포함하는 형광 영상 진단 또는 광역학/광열 치료용 조성물	조영남 최용두	국내출원	10-2012-0114467
발명특허	이황화물 연결자 함유 그래핀 옥사이드-광감각제 결합체 및 이를 이용한 암의 진단 및 치료용 조성물	조영남 최용두	국내출원	10-2012-0080391

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
	1차년도	Develop synthetic routes for the fabrication of a diversity of conductive nanowires	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 길이와 직경을 가진 전도성 폴리머 나노구조체의 제작 기술을 획득 전도성 나노구조체 제작시 biotin을 doping하여 다양한 바 	100	50

			이오 물질들을 conjugate할 수 있는 방법을 확립함.		
		Decorate nanostructured surface with specific ligands (e.g., anti-EpCAM) and evaluate their biological activity	<ul style="list-style-type: none"> • biotin 도핑된 전도성 나노구조체를 사용하여 EpCAM 항체를 비롯한 multiple 항체들을 부착하는 방법을 수립하였음. 		
	2차년도	Examine cell-capture efficiency of conductive nanowire	<ul style="list-style-type: none"> • EpCAM-conjugated된 전도성 나노구조체를 사용하여 EpCAM-positive 암세포들을 선택적으로 검출하는 능력을 평가하였음. • EpCAM 항체외에도 다양한 항체 mixture를 전도성 나노구조체에 부착함으로써 혈액 내에서 EpCAM 발현 유무에 관계없이 암세포의 검출 능력이 향상됨을 확인하였음. 	100	50
		Detect and quantify the captured cells using both electrochemical and optical approaches	<ul style="list-style-type: none"> • 전도성 나노와이어 구조체에 부착된 암세포를 정량화하기 위하여, 나노입자와의 반응을 통한 전류의 변화를 전기화학적 방법으로 측정하였음. • 극미량의 암세포, 즉 100개 이하의 암세포가 나노와이어 구조체에 부착되었을 때에도 감지할 수 있는 초고감도 바이오 센서를 개발하여 성능을 평가하였음. 		
		Observe cell release profile in response to the applied electrical field through electrochemical disruption of the underlying ligand layer	<ul style="list-style-type: none"> • 전도성 나노와이어 구조체에 부착된 암세포를 미세한 마이너스 voltage를 가함으로 손상없이 분리하는 기술을 수행하였음. • 다양한 voltage를 가함에 따라 암세포가 표면으로부터 분리되는 능력을 평가하였음. • 분리된 암세포를 수집 및 배양하여 cell viability 및 western blot을 수행함 		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
The fabrication of anodic aluminium oxide (AAO) templates with a variety of diameter and length	실험 시간 및 조건의 변경을 통하여 다양한 길이와 직경을 가진 AAO template의 제작을 수행하였음.
The fabrication of conductive nanowired structure based on AAO templates	전도성 고분자인 polypyrrole과 biotin을 혼합하여 전기화학적 방법으로 AAO template를 통해 전도성 나노와이어를 제작하였음.
The decoration of nanowires with specific target ligands (e.g., anti-EpCAM)	전도성 나노와이어에 도핑된 biotin을 통하여 target 항체를 고정화하는 기술을 수립하였음.
Assessing in vitro cell-capture efficiency of conductive nanowire	EpCAM 항체가 고정화된 전도성 나노와이어를 통해 EpCAM-positive 암세포를 선택적으로 검출하였음.
Evaluating in vitro electrical field-mediated cell-release profile from conductive nanowire	전도성 나노와이어에 미세한 마이너스 voltage를 가함으로 부착된 암세포를 손상없이 효과적으로 분리할 수 있었음.
Detect and quantify the captured cells using both electrochemical and optical approaches	전도성 나노와이어에 부착된 암세포를 정량화하기 위해 나노입자와 반응을 시킨 후 전기화학적 방법으로 전류의 변화를 측정하였음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Biomaterials (IF 8.312)
산업재산권 등록	2	국내/국제 특허 등록
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

가. 기술적 측면

- 혈중종양세포 (CTC) 분석은 암의 진단 및 치료를 위한 실용적이고 효과적인 분야이다. 치료 전/후 환자의 혈액으로부터 발견된 순환종양세포의 숫자를 비교하여 암의 병기를 진단하고 치료 방법을 선정할 수 있으며, 치료 후 종양의 이동을 모니터링하기 위한 수단으로써 사용가능하다.
- 따라서, 본 연구에서는 전도성 나노와이어 구조체를 통하여 혈중 종양 세포들을 효율적으로 capture하고 release 하는 기술을 제공하였다. 손상없이 분리된 CTC는 재배양을 통해 분자생물학적인 분석을 거쳐서 기존의 치료 방법을 보완할 수 있다.
- 이렇듯, 혈액을 이용한 진단 방법은 보편적으로 시행되고 있는 종양이 침투한 부위에서 조직을 반복적으로 채취해 조직검사를 하는 방법보다 좀 더 실용적이고 간단하여 기존의 진단 및 치료 방법을 개선할 수 있다.
- 본 연구에서 제시한 전도성 나노와이어 구조체를 통한 CTC 검출 및 분리 기술은 다양

한 종양을 혈액을 통해 진단하는 일을 가능하게 할 것이며, 결론적으로 초기 암 진단과 암 치료 효율을 높이는 계기가 될 것이다.

- 또한, 전도성 나노 와이어 구조체의 가공이 용이하며 적은 비용으로 제작이 가능하기 때문에 대용량의 생산이 용이하며 상업화가 가능하다.
- CTC 검출/분리 기술 뿐 아니라, 각각의 나노 와이어 기둥에 약물과 금 나노입자를 효율적으로 탑재시킬 수 있으므로 암 진단 및 치료 효과를 동시에 탑재시켜 다기능성 platform으로써의 개발을 기대할 수 있다.

나. 경제/산업적 측면

- 기존의 CTC 분리 방법에서 발생하는 세포의 손상과는 달리, 전도성 나노 와이어를 이용할 경우 종양 세포를 단 시간 내에 감지, 분리 및 미세한 전기 자극에 의하여 손상없는 추출, 분석이 가능하므로 임상에서의 적용에 장점이 될 수 있다.
- 전기적/광학적 측정방법을 이용하여 저 농도의 CTC 검출을 가능하게 하는 진단용 바이오 칩의 구현을 가능하게 한다.
- 기존의 마이크로 플루이딕 (microfluidic) 기술과 접목하면 세포와 표면의 각각의 나노 패턴들과의 반응 시간, 횡수를 증가시키므로 나노 구조체를 통하여 매우 작은 양의 혈중 종양세포들을 탐색하는데 있어서 민감도 및 선택성을 향상시킬 수 있다.
- 전도성 나노 와이어 구조체를 기존의 마이크로 칩이나 센서에 장착하여 CTC 검출을 실시간으로 모니터링하는 기술로의 구현이 가능하다.

다. 활용방안

- 새로운 혈액 진단 장치로서 제약이 많은 현재의 조직생검 기술을 대체한다.
- 혈액을 이용하여 암의 진단 및 치료 효능을 추적할 수 기술을 제공한다.
- 국립 암센터 및 제약 회사등과 연구 협력을 통하여 전도성 나노 와이어 구조체의 다기능화 및 안정화를 유도함으로써 더 효과 있는 진단 장치로써의 개발을 위한 자료를 제공한다.

6. 참고문헌

- (1) P. Ma et al, SS Gambhir, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, **25**, 4749 - 4757 (2004).
- (2) T. J. Webster et al, Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants, *Nanotechnology*, **15**, 48 (2004).
- (3) M. Yang et al., Cell Adhesion and Spreading Behavior on Vertically Aligned Silicon Nanowire Arrays. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **1**, 30 - 34 (2009).
- (4) Park et al., Biomimicking Extracellular Matrix: Cell Adhesive RGD Peptide Modified Electrospun Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Nanofiber Mesh, *Tissue Engineering*, **12**, 221-233 (2006).
- (5) D. Martin et al, In vivo studies of polypyrrole/peptide coated neural probes. *Biomaterials*, **24**, 777-787 (2003).
- (6) X. Cui et al., Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials*, **27**, 3031-3037. (2006)
- (7) N. L. Benali et al., Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*, **253**, 180-204 (2007).

- (8) H. R. Tseng, Three-Dimensional Nanostructured Substrates toward Efficient Capture of Circulating Tumor Cells, *Angewandte Chemie*, **121**, 9132–9135 (2009).

7. 첨부서류

Electroactive Platforms

DOI: 10.1002/anie.200((will be filled in by the editorial staff))

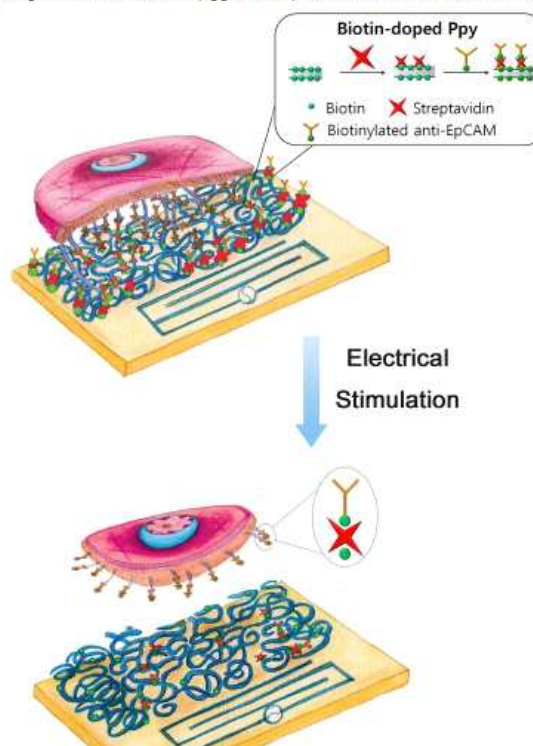
An Electroactive Biotin-doped Polypyrrole Substrate that Immobilizes and Releases EpCAM-positive Cancer Cells

SeungHyun Jeon¹, Jeong-Mi Moon¹, Eun Sook Lee, Yon Hui Kim, and Younghan Cho*

Significant efforts have been directed toward the development of novel strategies for sorting, characterizing, and subsequently releasing desired pure cells from complex cell mixtures.^[1-3] Cell isolation and detailed analysis of purified cells is essential for research in a variety of fields such as fundamental biology and for the development of new clinical diagnostics and therapeutic modalities. The isolation of rare cells (e.g., cancer stem cells and circulating tumor cells) from various biological sources is of great importance because the study of rare types of cancer cells is critical to unraveling previously inaccessible mechanisms that might be associated with cancer development and progression. In particular, because circulating tumor cells play an important role in the metastasis of cancer, their detection could have an impact on establishing the presence of metastasis, which could be useful in point-of-care medical tests.^[4-6] Approaches that rely primarily on antigen-antibody affinity by recognizing biomarkers found on target cell membranes with high affinity and specificity have been developed. These include immune-magnetic beads, micro- and nano-structured surfaces, and microfluidic devices.^[7-13] Compared with traditional bench-top methods (e.g., flow cytometers and isolation by size of epithelial tumor cells), current platform-based technologies have demonstrated improved cell recovery and purity and enhanced enrichment of target cells from blood samples. However, although recent findings have typically focused on enhancing capture yield and sensitivity, techniques for demonstrating the feasibility of non-destructive release of captured cells and subsequent characterization of retrieval cells have not been actively developed.

This study is an initial attempt to develop a novel biotin-doped conductive polypyrrole (Ppy) platform ideally suited for i) the specific capture and enrichment of epithelial-cell adhesion molecule (EpCAM)-positive cancer cells and ii) their subsequent non-destructive, weak electrical potential-mediated release. Conducting polymers such as Ppy have widely been used in novel polymeric implants or even as drug carriers because they can accommodate a variety of anions and cations including growth factors, anti-inflammatory drugs, ATP, glutamate, and protonated dopamine

through simple electro-polymerization.^[14-22] The dopants embedded in the Ppy membrane are specifically released when triggered by electric fields. In parallel with advances in drug delivery systems, we applied this strategy to capture and release EpCAM-positive cancer cells efficiently. Biotin, as a counter-anion for Ppy formation, offers significant affinity interactions with targets through biotin-streptavidin coupling, ultimately yielding a surface that is readily available for the sequential absorption of biotinylated anti-EpCAM as depicted in Scheme 1 (upper inset). Given that most surfaces are





An integrated multifunctional platform based on biotin-doped conducting polymer nanowires for cell capture, release, and electrochemical sensing



Woo Young Hong, Seung Hyun Jeon, Eun Sook Lee, Youngnam Cho*

New Experimental Therapeutic Branch, National Cancer Center, 111 Jungbalsan-ro, Ilsamdong-gu, Goyang, Gyeonggi-do 410-769, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2014

Accepted 18 August 2014

Available online 3 September 2014

Keywords:

Cancer diagnosis

Circulating tumor cells

Conducting polymer

Electrical stimulation

Immunosensor

ABSTRACT

Here, we propose an integrated multifunctional system constructed by conductive disulfide-biotin-doped polypyrrole nanowires (SS-biotin-Ppy NWs) for capture, release, and *in situ* quantification of circulating tumor cells (CTCs). A well-ordered three-dimensional nanowire structure equipped with a monoclonal antibody offers a significant impact on the cell-capture efficiency, as well as on electrical- or glutathione (GSH)-mediated release of the captured cells. In addition, the electrochemical identification/detection of the captured cancer cells can be directly conducted on the same Ppy NW platform by using horseradish peroxidase (HRP)-labeled and anti-EpCAM-conjugated nanoparticles (HRP/anti-EpCAM Ppy NPs), showing very high sensitivity and specificity. The signal amplification can be clearly attributed to the catalytic response resulting from enzymatic reduction of hydrogen peroxide on Ppy NWs, consequently generating a greatly increased amperometric response with a detection range of 10 to 1×10^4 cells and a detection limit of as low as 10 cells. Overall, the proposed Ppy NWs not only present a promising platform for effective cell capture and release but also permit cytosensing capability for on-site analysis.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recently, significant efforts have been devoted for achieving a better understanding of circulating tumor cells (CTCs) in order to unravel the complex mechanisms governing cancer biology [1–4]. As CTCs are very rarely present in the bloodstream, the detection and isolation of viable tumor cells from an individual patient can offer unique opportunities in evaluating the metastasis; predicting cancer progression; and deciding an effective treatment plan after surgery, chemotherapy, or radiotherapy in clinics. Therefore, it is highly desirable to develop simple, sensitive, and reliable methods for efficient capture and release of target CTCs with high recovery

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and isolation of epithelial tumor cells by their size (ISET) [13–16]. Particularly, nanoscale topographic features have been reported as an effective way to enhance the detection performance of rare cancer cells.

In our previous research, we demonstrated highly efficient cell capture/release system using a conducting polymer, polypyrrole (Ppy) [17]. By electrochemically polymerizing biotin-doped Ppy on electrodes, we attempted an electrical field-induced capture and subsequent release of the adhered cancer cells. The greatest advantage of Ppy is the reversible polymeric volume change according to the applied electrical field [18,19]. Interestingly, Ppy film expands up to approximately 35% at the oxidation state, ideally

Research Paper

High-Purity Isolation and Recovery of Circulating Tumor Cells using Conducting Polymer-deposited Microfluidic Device

SeungHyun Jeon, WooYoung Hong, Eun Sook Lee, and Youngnam Cho[✉]

New Experimental Therapeutic Branch, National Cancer Center, 111 Jungbalsan-ro, Ilsamdong-gu, Goyang, Gyeonggi-do 410-769, South Korea.

✉ Corresponding author. Email: yncho@ncc.re.kr.

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2014.05.11; Accepted: 2014.07.10; Published: 2014.09.05

Abstract

We have developed a conductive nano-roughened microfluidic device and demonstrated its use as an electrically modulated capture and release system for studying rare circulating tumor cells (CTCs). The microchannel surfaces were covalently decorated with epithelial cancer-specific anti-EpCAM antibody by electrochemical deposition of biotin-doped polypyrrole (Ppy), followed by the assembly of streptavidin and biotinylated antibody. Our method utilizes the unique topographical features and excellent electrical activity of Ppy for i) surface-induced preferential recognition and release of CTCs, and ii) selective elimination of non-specifically immobilized white blood cells (WBCs), which are capable of high-purity isolation of CTCs. In addition, the direct incorporation of biotin molecules offers good flexibility, because it allows the modification of channel surfaces with diverse antibodies, in addition to anti-EpCAM, for enhanced detection of multiple types of CTCs. By engineering a series of electrical, chemical, and topographical cues, this simple yet efficient device provides a significant advantage to CTC detection technology as compared with other conventional methods.

Key words: cancer, cancer diagnosis, circulating tumor cells, conducting polymer, electrical stimulation.

Introduction

In recent years, efforts to detect circulating tumor cells (CTCs) have increased. Unlike conventional tissue biopsy taken from tumor



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Short communication

A nanowire-based label-free immunosensor: Direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole



Jeong-Mi Moon, Yon Hui Kim, Younngam Cho*

New Experimental Therapeutics Branch, National Cancer Center, 111 Jungbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi-do 410-769, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2013

Received in revised form

7 February 2014

Accepted 7 February 2014

Available online 19 February 2014

Keywords:

Polypyrrole

Nanowire

Prostate-specific antigen

Differential pulse voltammetry

Label-free immunosensor

ABSTRACT

We have suggested a novel method for the preparation of a label-free electrochemical immunosensor for the detection of prostate-specific antigen (PSA) as target marker for prostate cancer. Direct incorporation of PSA antibody (anti-PSA) into polypyrrole (Ppy) electropolymerized on a three-dimensional Au nanowire array has resulted in enhanced molecular interactions, ultimately leading to improved sensing performance. The electrochemical performance of the nanowire-based immunosensor array were characterized by (1) differential pulse voltammetry (DPV) to evaluate the specific recognition of PSA, (2) impedance and cyclic voltammetry to observe surface resistance and electroactivity, and (3) scanning electron microscopy (SEM) to demonstrate the three-dimensional architecture. The vertically-aligned geometric organization of Ppy provides a novel platform to improve the anti-PSA loading capacity. Overall, enhanced electrochemical performance of the proposed immunosensor has been demonstrated by its linear response over PSA concentrations ranging from 10 fg mL^{-1} to 10 ng mL^{-1} and a detection limit of 0.3 fg mL^{-1} , indicating that the strategy proposed here has great potential for clinical applications.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A lot of effort has been expended to achieve significant progress in the field of immunosensors for the early detection and monitoring of cancer markers in blood. Currently, using various detection signals based on electrochemical, optical, mass, or calorimetric-sensitive mechanisms, target analytes in biological specimens can be easily detected and identified even at very low levels (Owino et al., 2008; Liu et al., 2008; Long et al., 2009; Tseng et al., 2012; Yuan et al., 2012). Among these promising approaches, electrochemical detection has attracted much interest because it allows direct, specific, and real-time monitoring (Wilson, 2005; Wan et al., 2011). Electrochemical biosensors can recognize subtle

and optical characteristics as well as high surface area with enhanced reaction activity, nanostructure has great potential in medical applications, particularly in diagnostic devices and point-of-care testing. However, in spite of these advances, significant challenges including complications in fabrication and subsequent functionalization with desired biomolecules as well as problems with regard to the chemical/mechanical stability of the sensor architecture remain unaddressed.

Conducting polymers such as polypyrrole (Ppy), into which various anions and cations including growth factors, anti-inflammatory drugs, ATP, glutamate, and protonated dopamine can be incorporated, can be electro-chemically deposited on electrodes for use as implantable devices or drug carriers

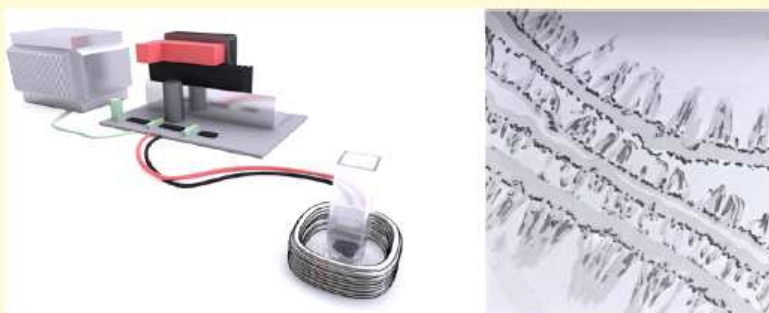
Action at a Distance: Functional Drug Delivery Using Electromagnetic-Field-Responsive Polypyrrole Nanowires

Wen Gao,[†] Jianming Li,[†] John Cirillo,[†] Richard Borgens,^{*,†,‡} and Youngnam Cho^{*,†,§}

[†]Center for Paralysis Research, Department of Basic Medical Sciences, College of Veterinary Medicine and [‡]Weldon School of Biomedical Engineering, College of Engineering, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, United States

[§]New Experimental Therapeutic Branch, National Cancer Center, 111 Jungbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Gyeonggi-do 410-769, South Korea

Supporting Information



ABSTRACT: In this work, we introduce a free-standing, vertically aligned conductive polypyrrole (Ppy) architecture that can serve as a high-capacity drug reservoir. This novel geometric organization of Ppy provides a new platform for improving the drug-loading efficiency. Most importantly, we present the first formal evidence that an impregnated drug (dexamethasone, DEX) can be released on demand by a focal, pulsatile electromagnetic field (EMF). This remotely controlled, on–off switchable polymer system provides a framework for implantable constructs that can be placed in critical areas of the body without any physical contact (such as percutaneous electrodes) with the Ppy, contributing to a low “foreign body” footprint. We demonstrate this possibility by using a BV-2 microglia culture model in which reactive oxygen species (ROS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression was attenuated in response to DEX released from EMF-stimulated Ppy.

1. INTRODUCTION

There are growing clinical demands for controlled and sustained drug release systems to serve as implantable devices for patients

results similar to Teflon when implanted as a neural prosthetic.⁴ Both glial and neuronal cells were found to be in intimate contact with the Ppy material. Other studies noted that Ppy extracts exhibited no hemolytic, allergenic, or mutagenic properties

Electrically controlled release of the nerve growth factor from a collagen–carbon nanotube composite for supporting neuronal growth

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4166

Youngnam Cho^{*ab} and Richard Ben Borgens^b

We report the use of a nerve growth factor-loaded collagen–carbon nanotube (NGF-Col–CNT) composite as a substrate for *in vitro* growth of PC 12 cells. The feasibility of such novel composites as drug carriers was assessed using an *in vitro* drug-release test (ELISA immunoassay) in the presence of an electrical field. Subsequent studies included four-point probes, cyclic voltammograms, and *in vitro* PC 12 growth of fibers. The facile incorporation of NGF within fibrous collagen structures significantly mediated PC 12 (nerve) fiber process formation during the application of electrical voltage. Indeed, electrical stimulation (500 mV) using non-polarized Ag/AgCl electrodes to electro-active composites facilitated the sustained release of NGF. Given that PC 12 cells require NGF in the media to produce fiber outgrowth, this assay was clearly informative when the differentiation and branching of PC 12 cells into neurons was significantly enhanced. NGF responses were also evident from other developmental events including protrusions of neuronal filopodia and the formation of microspikes. Col–CNT composites, when electrically stimulated, could serve not only as neuronal scaffolds, but also as an electrically controllable drug release system to improve the performance and preferential timing of growth factor release in various biomedical applications.

Received 9th April 2013
Accepted 27th June 2013
DOI: 10.1039/c3tb20505c
www.rsc.org/MaterialsB

1 Introduction

The intimate interaction of carbon nanotubes and biomolecules has inspired considerable interest in recent years. Indeed, remarkable structural, electrical, and mechanical features of the nanotubes make them suitable for developing unique recognition-based tools at the molecular and cellular levels.^{1–3} In particular, the highly conductive characteristic of the fibrous structures usually mimics the morphological features of the native extracellular matrix (ECM) that would be vital for the design and development of new hybrid systems in neuronal engineering.^{4–8} The desire to construct nanotube-based

passage of electrical current through the nanotube substrates preferentially supports and guides neurites that might be associated with nerve regeneration.¹⁴ However, the complexity associated with the optimization of an interface between neural devices and tissues poses significant challenges. These not only include the control of cell behavior(s) but also the induction of physiologically important electrical signals to improve neurological functions. In addition, foreign material responses induced by undesirable scar tissue formation after implantation of matrix materials, and the distinct differences in mechanical compatibility between tissues and electrode, pose possible problems such as unpredictable device failure. These


 CrossMark
click for updates

Cite this: DOI: 10.1039/c4cc06349j

 Received 13th August 2014,
Accepted 14th October 2014

DOI: 10.1039/c4cc06349j

www.rsc.org/chemcomm

Hyaluronic acid–polypyrrole nanoparticles as pH-responsive theranostics†

 Dongjin Park,^a Youngnam Cho,^b Sung-Ho Goh*^c and Yongdoo Choi*^a

Doxorubicin-loaded hyaluronic acid–polypyrrole nanoparticles were developed for pH-responsive activatable fluorescence imaging and therapy of proliferating macrophages.

Atherosclerosis is the major reason for cardiovascular disease, which accounts for 39% of all global deaths under the age of 70.¹ Macrophages, representing up to 20% of the cells within atherosclerotic lesions, play a pivotal role both in the development of atherosclerosis, and also in atheroma plaque destabilization and rupture, an occurrence that frequently leads to thrombo-occlusive complications (*i.e.*, myocardial infarction and strokes).² Thus, anti-macrophage therapeutic strategies including systemic modulation of macrophage activity and local photodynamic therapy using conventional and smart photosensitizers have been attempted.^{3–5}

It has recently been reported that the majority of macrophages in atherosclerotic lesions are derived from local macrophage proliferation rather than the inflammatory monocyte recruitment from peripheral blood.⁶ These reports reveal that targeting macrophage proliferation could be a new strategy to treat established atherosclerosis. However, few studies have evaluated antiproliferating agents.^{6b,7} Here, we developed drug-loaded hyaluronic acid–polypyrrole nanoparticles (HA–PPyNPs) as a smart theranostic platform for noninvasive fluorescence imaging and therapy of proliferating macrophages in atherosclerotic lesions (Fig. 1).

We first synthesized hyaluronic acid–conjugated polypyrrole nanoparticles (HA–PPyNPs), and then an antiproliferating agent

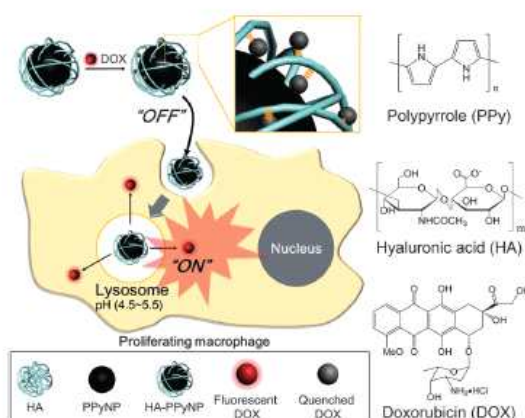


Fig. 1 Schematic diagram of the pH-responsive theranostic system. DOX forms a charge complex with HA on the surface of polypyrrole nanoparticles, leading to fluorescence quenching of DOX (OFF) through a FRET mechanism. When DOX-loaded HA–PPyNPs are taken up into the proliferating macrophage cells, DOX release from the PPyNP surface is stimulated, resulting in both the turn on of DOX fluorescence and therapy of the proliferating macrophages.

are reported to have an immense absorption coefficient (*i.e.*, 10^4 -fold to 10^6 -fold higher than conventional organic fluorochromes) with a broad peak,⁸ and therefore may have great potential as ultra-efficient

A graphene oxide–photosensitizer complex as an enzyme-activatable theranostic agent†

Youngnam Cho,[‡] Hyunjin Kim[‡] and Yongdoo Choi*[‡]

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1202

Received 30th August 2012,
Accepted 18th December 2012

DOI: 10.1039/c2cc36297j

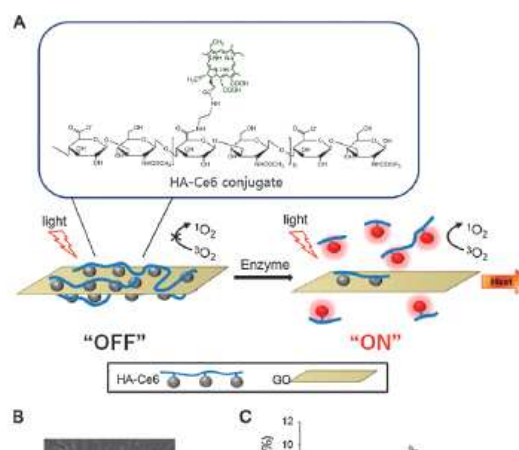
www.rsc.org/chemcomm

The development of a target-activatable “smart” platform with high-affinity and specificity is of great importance for a wide range of biomedical applications. Here, we attempted to develop a new enzyme-activatable graphene oxide–photosensitizer complex as a biologically tunable theranostic agent, making it promising for near-infrared (NIR) fluorescence imaging and photo-induced cancer therapy.

Recently, graphene and its derivative graphene oxide (GO) have become particularly attractive materials because they possess extraordinary electrical, optical, mechanical, and thermal characteristics.¹ In particular, these materials have been shown to exhibit ultra-efficient fluorescence-quenching abilities for various fluorescent dyes as well as a strong surface plasmon absorption in the near-infrared (NIR) region, supporting their potential use in biosensing applications and light-induced photothermal cancer therapy.² In addition, the large surface area of nano-sized graphene and GO, covering both sides of the basal plane and the edges, creates an ideal loading platform for various biomolecules and therapeutic agents, *via* either physical adsorption or chemical conjugation strategies.³ Recent studies have extensively investigated graphene-based nanostructures through efficient functionalization with biomolecules such as DNA, aptamers, peptides, proteins, and cells, and these studies have demonstrated the potential uses of these materials in applications such as bioelectronics, biosensors, and medicine.⁴

Here, we attempted to develop a new enzyme-activatable GO–photosensitizer complex as a biologically tunable theranostic

biocompatible and natural polysaccharide, was used in this study as a model polymeric enzyme-responsive substrate. HA is mostly found in the extracellular matrix (ECM) and tends to degrade rapidly through preferential cleavage of glycosidic linkages in the presence of hyaluronidase (HAdase).⁵ Next, a noncovalent complex between GO and HA–Ce6 (*i.e.*, GO–HA–Ce6) was prepared *via* physical adsorption of HA–Ce6 on the surface of GO plates (Fig. 1A). Close proximity of HA–Ce6 to GO sheets in the GO–HA–Ce6 complex was expected to result in strong inhibition of both fluorescence and singlet oxygen



Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	17763555
Application Number:	14141366
International Application Number:	
Confirmation Number:	1949
Title of Invention:	COMPOSITION COMPRISING OF A CONDUCTING POLYMER FOR DETECTING, CAPTURING, RELEASING, AND COLLECTING CELL
First Named Inventor/Applicant Name:	Young-Nam Cho
Customer Number:	35736
Filer:	Hyo Suk Kim/Joy Kim
Filer Authorized By:	Hyo Suk Kim
Attorney Docket Number:	20200-15USA
Receipt Date:	26-DEC-2013
Filing Date:	
Time Stamp:	20:41:08

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2012.10.15
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0114467 (접수번호 1-1-2012-0837033-12)
출원인명칭 국립암센터(1-2000-036786-6)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 최용두 조영남 김인후
발명의명칭 효소 반응성 그라핀 옥사이드/생체 고분자-광감각제 나노복합체 및 이를 포함하는 형광 영상 진단 또는 광역학/광열 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격고환허가서(PTO/88/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

출원번호통지서

출원일자 2012.07.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0080391 (접수번호 1-1-2012-0589486-74)
출원인명칭 국립암센터(1-2000-036786-6)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 최용두 조영남 김인후
발명의명칭 이황화물 연결자 함유 그래핀 옥사이드-광감각제 결합체 및 이를 이용한 암의 진단 및 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
* 미국특허상표청의 선출권을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2013.11.25
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2013-0143833 (접수번호 1-1-2013-1072066-99)
출원인명칭 국립암센터(1-2000-036786-6)
대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)
발명자성명 조영남
발명의명칭 전도성 고분자를 포함하는 세포의 검출 및 회수용 조성물

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.