



등록특허 10-2734858



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월27일
(11) 등록번호 10-2734858
(24) 등록일자 2024년11월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0698 (2013.01)
A61L 27/24 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0049234
(22) 출원일자 2024년04월12일
심사청구일자 2024년04월12일
- (56) 선행기술조사문헌
EXPERIMENTAL DERMATOLOGY. 2023;32:13-23 {DOI: 10.1111/EXD.14699}*
NATURE COMMUNICATIONS (2018) 9:5301, P.1-11 {DOI: 10.1038/S41467-018-07579-Y }*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
- (72) 발명자
성건용
서울특별시 성동구 난제로 73, 102동 201호 (하왕십리동, 극동미라주 아파트)
정수빈
서울특별시 광진구 영화사로3가길 21, 102호 (중곡동, 옥현빌라)
남현민
강원특별자치도 춘천시 지석로 97, 111동 305호 (석사동, 현진에버빌1차)
- (74) 대리인
특허법인본

전체 청구항 수 : 총 11 항

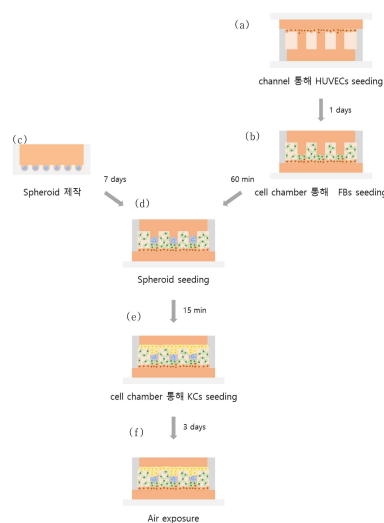
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 (1) 스페로이드를 제조하는 단계; (2) 기관, 하부 채널 패턴층, 스캐폴드 및 상부층을 포함하는 인공 피부 등가물 제조 장치의 하부 채널 패턴층을 통해 콜라겐을 주입하여 콜라겐층을 형성하는 단계; (3) 상기 하부 채널 패턴층을 통해 HUVEC(인간 태줄정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)를 주입하여 콜라겐층 위에 HUVEC를 접종(seeding)하는 단계; (4) 상기 스캐폴드 위에 FB(섬유아세포; fibroblast)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계; (5) 상기 스캐폴드 위에 (1) 단계에서 제조된 스페로이드를 접종(seeding)하는 단계; 및 (6) 상기 스캐폴드 위에 KC(각질형성세포; keratinocyte)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계;를 포함하는, 인공 피부 등가물의 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/60 (2013.01)
G01N 33/5082 (2013.01)
A61L 2430/18 (2013.01)
C12N 2502/094 (2013.01)
C12N 2502/1323 (2013.01)
C12N 2502/28 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711190258
과제번호	2020R1A2C2009928
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	인간유래 3D 아토피피부염 모델 플랫폼 개발
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 스페로이드를 제조하는 단계;
- (2) 기관, 하부 채널 패턴층, 스캐폴드 및 상부층을 포함하는 인공 피부 등가물 제조 장치의 하부 채널 패턴층을 통해 콜라겐을 주입하여 콜라겐층을 형성하는 단계;
- (3) 인공 피부 등가물 제조 장치를 뒤집어서 상기 하부 채널 패턴층을 통해 HUVEC(인간 탯줄 정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)를 주입하여 스캐폴드 아래에 HUVEC를 접종(seeding)하는 단계;
- (4) 인공 피부 등가물 제조 장치를 다시 뒤집어서, 상기 스캐폴드 위에 FB(섬유아세포; fibroblast)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계;
- (5) 상기 스캐폴드 위에 (1) 단계에서 제조된 스페로이드를 접종(seeding)하는 단계; 및
- (6) 상기 스캐폴드 위에 KC(각질형성세포; keratinocyte)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계;를 포함하고,

상기 인공 피부 등가물 제조 장치는, 기관; 상기 기관 위에 형성되고, 유체가 흐를 수 있는 채널이 형성되어 있는 하부 채널 패턴층; 상기 하부 채널 패턴층 위에 형성되고, 복수개의 구멍이 형성되어 있는 스캐폴드; 및 상기 스캐폴드 위에 형성되고, 배지 챔버 및 배양 챔버가 형성되어 있는 상부층을 포함하는 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스페로이드는 DPC(모유두세포; dermal papilla cell) 및 KC(각질형성세포; keratinocyte)를 포함하는 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 DPC는 LEF1, TCF1, Wnt1 또는 Wnt10b로 형질주입된 DPC 중 어느 하나 이상인 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 스페로이드는 DPC(모유두세포; dermal papilla cell), KC(각질형성세포; keratinocyte) 및 HUVEC(인간 탯줄 정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)을 포함하는 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 DPC는 LEF1, TCF1, Wnt1 또는 Wnt10b로 형질주입된 DPC 중 어느 하나 이상인 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드는 실크(Silk), 피브린(Fibrin), 콜라겐(Collagen), 젤라틴(Gelatin), 매트릭젤(Matrigel), 알지네이트(Alginate), 키토산(Chitosan), 피브로넥틴(Fibronectin), 폴리이미드(Polyimides), 히알루론산

(Hyaluronic acid), 폴리아믹스 산(Polyamix acid), 폴리카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리에테르이미드(Polyetherimide), 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리아크릴레이트(Polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(Polymethylmethacrylate), 폴리락트산(Polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(Polyglycolic acid; PGA), 셀룰로오스(Cellulose), 나일론(Nylon), 폴리아라미드(Polyaramid), 폴리비닐알콜(Polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(Poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(Polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(Polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(Polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide), 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(Polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리테트라플루오로에틸렌(Polytetrafluoroethylene; PTFE), 폴리ortho에스터{Poly(ortho ester; POE)}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{Poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{Poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료를 포함하는 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 상부층 및 하부 채널 패턴층은 폴리머 소재를 포함하는 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드에 형성된 구멍은 CNC 머신, 레이저 커팅, 바이오 펀치 중 어느 하나에 의해 형성된 것인, 인공 피부 등가물의 제조 방법.

청구항 11

제1항의 인공 피부 등가물의 제조 방법에 의해 제조된 인공 피부 등가물.

청구항 12

제11항의 인공 피부 등가물을 이용하여 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 인공 피부 등가물에 발모제 조성물과 대조군을 도포하는 단계; 및

스페로이드에서 자란 모발의 길이를 비교하는 단계를 포함하는, 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 매년 탈모 치료 환자 수가 증가하고 있는 추세이지만 현재 시장에 나와 있는 탈모증에 대한 치료법은 많은 한계

가 있다. 그 중 환자 자신의 뒷머리에서 머리카락이 필요한 부위로 모낭을 이동시키는 치료법은 총 모낭 수가 증가하지 않고 기증자로부터 모낭을 받아서 이식한다 해도 환자의 탈모 부위를 커버할 수 있는 모낭이 충분하지 않아 치료에 적합한 환자의 수가 제한되는 경우가 발생한다. 이런 한계가 있기 때문에 인간의 생리학적 환경과 유사한 환경에서 인간 피부 등가물(human skin equivalents)를 3D로 배양한 스킨 온 칩(skin-on-a-chip)에 HF를 적용시키기 위한 연구가 많이 진행되고 있다.

[0003] Wnt는 모발 여포 형태형성(Hair Follicle Morphogenesis)에 중심적인 역할을 하는 신호 분자이다. Wnt가 있으면 베타-카테닌 인산화(β -catenin phosphorylation)를 억제하여 베타-카테닌(β -catenin)의 안정화로 이어지고 안정화된 베타-카테닌은 핵으로 전위되어 베타-카테닌이 TCF(T-cell factor)/LEF 전사 인자(lymphoid enhancer factor transcription factor와 상호작용하여 활성화를 위한 표적 유전자에 작용한다. 이런 Wnt/베타-카테닌 신호 전달은 DPC와 상피 세포 간의 상호 통신에 중요한 역할을 한다. Wnt1은 텔로젠(telogen)에서 아나젠(anagen)로의 HF 진행을 가속화하고 모발의 양을 증가시키며 Gli1, LEF1 과 같은 모발 유도 관련 유전자의 발현을 증가시킨다. Wnt3a는 베타-카테닌을 활성화하여 모발 성장을 증가시키고 전사 활성화와 관련된 DP 세포의 증식을 증가시킨다. Wnt10b는 베타-카테닌 신호전달을 활성화하여 텔로젠에서 HF의 아나젠 재진입을 촉진시키고 베타-카테닌을 안정화시켜 배양된 프라이머리 피부 상피 세포(primary skin epithelial cells)의 모간부(hair shaft) 및 HF의 IRS로의 분화(differentiation)를 향상시킨다. Wnt5a는 텔로젠(telogen) 단계에서 팽대부(bulge) 및 2차 모발 종자 세포(secondary hair germ cells)에서 발현되는 비표준 Wnt(non-canonical Wnt)로 표준 Wnt(canonical Wnt)의 기능을 길항한다. Wnt7b는 정상적인 텔로젠에서 아나젠 전환을 활성화하고 촉진하는데 중요하다.

[0004] 하지만 모낭 연구를 위한 현재 모델 대부분은 모낭 미세 환경의 몇 가지 주요 기능을 복제하지 못한다. 모낭 연구를 위해 동물 연구에 크게 의존하고 있지만 동물 모델은 인간 생물학을 완전히 모방하지 못한다. 또한 2D 모낭 모델은 일정 기간 후에 볼 수 있는 DPC (모유두세포; dermal papilla cell)의 1차 유도 효능이 사라진다.

[0005] 형질주입(Transfection)은 전달하고자 하는 관심있는 유전자를 원하는 타겟 세포에 형질주입하는 방법이다. 비바이러스(Non-viral) 기반 형질 주입 방법 중 하나인 전기천공(electroporation)은 세포 표면에 높은 전압을 순간적으로 걸어줌으로써 DNA가 통과할 수 있는 구멍을 만들어주는 방법으로 유전자를 전달하는 것이다.

[0006] 따라서 우리는 모발 성장에 영향을 주는 신호 분자인 Wnt 신호를 증폭시키기 위해 DPC를 형질주입하고, KC (keratinocyte), FB (fibroblast), HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell)으로 구성된 전체 피부 등가물을 제작하여 자체적으로 칩 안에서 모낭을 생성할 가능성을 보여준다.

선행기술문헌

[0007] (비특허문헌 1) BEJSOVEC, Amy. Wnt signaling: an embarrassment of receptors. Current Biology, 2000, 10.24: R919-R922.

[0008] (비특허문헌 2) DONG, Liang, et al. Treatment of MSCs with Wnt1a-conditioned medium activates DP cells and promotes hair follicle regrowth. Scientific Reports, 2014, 4.1: 1-9.

[0009] (비특허문헌 3) KISHIMOTO, Jiro; BURGESSON, Robert E.; MORGAN, Bruce A. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. Genes & development, 2000, 14.10: 1181-1185.

[0010] (비특허문헌 4) LI, Y.-H., et al. Wnt10b promotes growth of hair follicles via a canonical Wnt signalling pathway. Clinical and experimental dermatology, 2011, 36.5: 534-540.

[0011] (비특허문헌 5) XING, Yi-Zhan, et al. Adenovirus-mediated Wnt5a expression inhibits the telogen-to-anagen transition of hair follicles in mice. International journal of medical sciences, 2013, 10.7: 908.

[0012] (비특허문헌 6) KANDYBA, Eve; KOBIELAK, Krzysztof. Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. Stem cells, 2014, 32.4: 886-901.

[0013] (비특허문헌 7) INAMATSU, Mutsumi, et al. Establishment of rat dermal papilla cell lines that sustain the potency to induce hair follicles from a follicular skin. Journal of Investigative Dermatology, 1998, 111.5: 767-775.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물을 이용한 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0017] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명은 (1) 스페로이드를 제조하는 단계; (2) 기관, 하부 채널 패턴층, 스캐폴드 및 상부층을 포함하는 인공 피부 등가물 제조 장치의 하부 채널 패턴층을 통해 콜라겐을 주입하여 콜라겐층을 형성하는 단계; (3) 상기 하부 채널 패턴층을 통해 HUVEC(인간 탯줄 정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)를 주입하여 콜라겐층 위에 HUVEC를 접종(seeding)하는 단계; (4) 상기 스캐폴드 위에 FB(섬유아세포; fibroblast)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계; (5) 상기 스캐폴드 위에 (1) 단계에서 제조된 스페로이드를 접종(seeding)하는 단계; 및 (6) 상기 스캐폴드 위에 KC(각질형성세포; keratinocyte)를 주입하여 접종(seeding)하는 단계;를 포함하는, 인공 피부 등가물의 제조 방법을 제공한다.
- [0020] 상기 스페로이드는 DPC(모유두세포; dermal papilla cell) 및 KC(각질형성세포; keratinocyte)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 DPC는 LEF1, TCF1, Wnt1 또는 Wnt10b로 형질주입된 DPC 중 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0022] 상기 스페로이드는 DPC(모유두세포; dermal papilla cell), KC(각질형성세포; keratinocyte) 및 HUVEC(인간 탯줄 정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 DPC는 LEF1, TCF1, Wnt1 또는 Wnt10b로 형질주입된 DPC 중 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0024] 상기 스캐폴드는 실크(Silk), 피브린(Fibrin), 콜라겐(Collagen), 젤라틴(Gelatin), 매트릭젤(Matrigel), 알지네이트(Alginate), 키토산(Chitosan), 피브로넥틴(Fibronectin), 폴리이미드(Polyimides), 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리아믹스 산(Polyamix acid), 폴리카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리에테리미드(Polyetherimide), 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리아크릴레이트(Polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(Polymethylmethacrylate), 폴리락트산(Polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(Polyglycolic acid; PGA), 셀룰로오스(Cellulose), 나일론(Nylon), 폴리아라미드(Polyaramid), 폴리비닐알콜(Polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(Poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(Polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(Polyaniline), 폴리아크릴로니트릴(Polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide), 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(Polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리테트라플루오로에틸렌(Polytetrafluoroethylene; PTFE), 폴리ortho에스터{Poly(ortho ester; POE)}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{Poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{Poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료를 포함할 수 있다..
- [0025] 상기 상부층 및 하부 채널 패턴층은 폴리머 소재를 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 상기 (3) 단계는, 피부 등가물 제조 장치를 뒤집어서 상기 하부 채널 패턴층을 통해 HUVEC(인간 탯줄 정맥 내피 세포; Human umbilical vein endothelial cell)를 주입하여 콜라겐층 위에 HUVEC를 접종(seeding)하는 단계일 수 있다.

[0027] 상기 인공 피부 등가물 제조 장치는, 기관; 상기 기관 위에 형성되고, 유체가 흐를 수 있는 채널이 형성되어 있는 하부 채널 패턴층; 상기 하부 채널 패턴층 위에 형성되고, 복수개의 구멍이 형성되어 있는 스캐폴드; 및 상기 스캐폴드 위에 형성되고, 배지 챔버 및 배양 챔버가 형성되어 있는 상부층을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 상기 스캐폴드에 형성된 구멍은 CNC 머신, 레이저 커팅, 바이오 펀치 중 어느 하나에 의해 형성된 것일 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 인공 피부 등가물의 제조 방법에 의해 제조된 인공 피부 등가물을 제공할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한, 상기 인공 피부 등가물을 이용하여 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법을 제공할 수 있다.

[0031] 상기 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법은, 상기 인공 피부 등가물에 발모제 조성물과 대조군을 도포하는 단계; 및 스페로이드에서 자란 모발의 길이를 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0032] 인공 피부 등가물에 발모제 조성물과 이에 대한 대조군을 도포하여, 모낭으로부터 모발이 성장하는 속도를 비교하여 발모제 조성물의 효능을 평가할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명은 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물의 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물을 제공할 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한, 모낭을 포함하는 인공 피부 등가물을 이용한 발모제 조성물의 효능을 평가하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은, 본 발명의 인공 피부 등가물의 제조 장치를 나타낸다.

도 2는, 본 발명의 한 구현예에 따른 스캐폴드를 나타낸다.

도 3은, 형질주입된 DPC와 KC를 이용하여 제조될 수 있는 스페로이드의 예시를 나타낸다.

도 4는, 형질주입된 DPC, KC 및 HUVEC를 이용하여 제조될 수 있는 스페로이드의 예시를 나타낸다.

도 5는, 본 발명의 한 구현예에 따른 인공 피부 등가물 제조 방법의 흐름도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 모낭이 포함된 피부 등가물의 제조를 위한 장치

[0039] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 한 구현예에 따른 모낭이 포함된 피부 등가물의 제조를 위한 장치(100)는 PDMS (Polydimethylsiloxane)로 제작되어 배지 챔버(111)와 배양 챔버(112)로 구성된 상부층(110), 모낭에서 머리카락이 자랄 수 있도록 모낭 스페로이드를 위치시키기 위해 구멍이 형성된 스캐폴드(120), PDMS로 제조된 하부 채널 패턴층(130), 유리 기관(140)으로 구성된다.

[0040] 상기 PDMS는 실리콘 탄성 주체 (Silicone Elastomer Base)와 실리콘 탄성 경화제 (Silicone Elastomer Curing Agent; Sylgard 184, K1 solution)를 10:1 중량비율로 사용하였다.

[0041] 배지 챔버는 배양 배지를 저장 또는 보관하기 위한 공간이며, 배양 챔버는 세포를 배양하기 위한 공간이다. 배지 챔버 2개와 배양 챔버 1개가 포함된 상부층을 제작하기 위해 양각으로 알루미늄 금속 몰드를 제작하고 하부 채널 패턴층을 제작하기 위해 알루미늄 금속 몰드에 폭 0.2 mm, 높이 0.15 mm인 미세유체 채널을 양각한다. 몰드에 PDMS를 넣고 그 위에 PET 필름을 기포가 생기지 않도록 얹은 다음 중량체로 눌러 PDMS를 평평하게 한다. 80 °C 오븐에서 1시간 경화 후 몰드에서 PDMS를 떼어내어, 상부층 및 하부 채널 패턴층을 제작할 수 있다.

[0042] 도 1에 나타난 바와 같이, O₂ 플라즈마로 표면을 처리하여 유리 기관, 하부 채널 패턴층, 스캐폴드, 상부층 순으로 접한 후 오토클레이브에서 121 °C에서 30분간 처리하여 멸균하였고, 24시간 건조하여 제조한다.

[0043] 스캐폴드는 세포에서 자란 털이 통과할 수 있도록 복수개의 구멍이 형성되어 있는 판이며, 그 형태는 원형, 삼

각형, 사각형, 다각형 등 특별히 제한되는 것은 아니나, 원형이 바람직하다. 스캐폴드는 30~100마이크로미터의 구멍을 갖고 있으며, 바람직하게는 50 마이크로미터의 기공을 갖고 있다.

[0044] 도 2에 나타난 바와 같이, 스캐폴드 (Alvetex™)는 레이저를 통해 모양의 위치를 원형 패턴으로 가공하였다. 스캐폴드의 구멍 크기는 100~500 μm 로 설정하여 쓰일 수 있다. 상기 스캐폴드에 형성된 구멍은 CNC 머신, 레이저 커팅, 바이오 펀치 중 어느 하나에 의해 형성된 것일 수 있다. 스캐폴드의 재료로는 실크(Silk), 피브린(Fibrin), 콜라겐(Collagen), 젤라틴(Gelatin), 매트릭셀(Matrigel), 알지네이트(Alginate), 키토산(Chitosan), 피브로넥틴(Fibronectin), 폴리이미드(Polyimides), 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리아믹스 산(Polyamix acid), 폴리카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리에테르이미드(Polyetherimide), 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리아크릴레이트(Polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(Polymethylmethacrylate), 폴리락트산(Polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(Polyglycolic acid; PGA), 셀룰로오스(Cellulose), 나일론(Nylon), 폴리아라미드(Polyaramid), 폴리비닐알콜(Polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(Poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(Polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(Polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(Polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide), 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(Polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리테트라플루오로에틸렌(Polytetrafluoroethylene; PTFE), 폴리ortho 에스터(Poly(ortho ester; POE), 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트(Poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA) 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트(Poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료를 사용할 수 있다.

[0046] **형질주입(Transfection)된 DPC(모유두세포; dermal papilla cell)의 제조**

[0047] (1) LEF1 형질주입

[0048] DPC를 70~90%가 채워지도록 배양하고 PBS로 세포를 수확한다. Resuspension buffer R (Invitrogen) 100 μl 에 DPC($1-2 \times 10^6$ cell)을 넣고 LEF1 plasmid DNA (5-10 μl)를 첨가한 다음 Neon transfection system(Invitrogen)을 사용하여 적절한 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)로 DPC 형질주입을 진행한다. FBS(Fetal Bovine Serum)이 보충된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)으로 채운 배양 접시에 형질주입이 진행된 DPC를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 인큐베이터에서 이틀간 배양한다. 세포는 계대번호 5~8번으로 사용되었다.

[0049] (2) TCF1 형질주입

[0050] DPC를 70~90%가 채워지도록 배양하고 PBS로 세포를 수확한다. Resuspension buffer R (Invitrogen) 100 μl 에 DPC($1-2 \times 10^6$ cell)을 넣고 TCF1 plasmid DNA (5-10 μl)를 첨가한 다음 Neon transfection system(Invitrogen)을 사용하여 적절한 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)로 DPC 형질주입을 진행한다. FBS(Fetal Bovine Serum)이 보충된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)으로 채운 배양 접시에 transfection이 진행된 DPC를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 인큐베이터에서 이틀간 배양한다. 세포는 계대번호 5~8번으로 사용되었다.

[0051] (3) Wnt1 형질주입

[0052] DPC를 70~90%가 채워지도록 배양하고 PBS로 세포를 수확한다. Resuspension buffer R (Invitrogen) 100 μl 에 DPC($1-2 \times 10^6$ cell)을 넣고 Wnt1 plasmid DNA (5-10 μl)를 첨가한 다음 Neon transfection system(Invitrogen)을 사용하여 적절한 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)로 DPC 형질주입을 진행한다. FBS(Fetal Bovine Serum)이 보충된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)으로 채운 배양 접시에 transfection이 진행된 DPC를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 인큐베이터에서 이틀간 배양한다. 세포는 계대번호 5~8번으로 사용되었다.

[0053] (4) Wnt10b 형질주입

[0054] DPC를 70~90%가 채워지도록 배양하고 PBS로 세포를 수확한다. Resuspension buffer R (Invitrogen) 100 μl 에 DPC($1-2 \times 10^6$ cell)을 넣고 Wnt10b plasmid DNA (5-10 μl)를 첨가한 다음 Neon transfection system

(Invitrogen)을 사용하여 적절한 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)로 DPC 형질주입을 진행한다. FBS(Fetal Bovine Serum)이 보충된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)으로 채운 배양 접시에 transfection 이 진행된 DPC를 넣고 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 이틀간 배양한다. 세포는 계대번호 5~8번으로 사용되었다.

[0055] 스페로이드(Spheroid) 제작

[0056] (1) DPC, KC 스페로이드 제작

[0057] StemFIT 3D((주)마이크로펫) 플레이트에 70% EtOH를 넣고 웰(well) 내부의 버블을 파이펫팅으로 제거한 후 DMEM:KGM(keratinocyte growth medium)(3:1) 배지를 채우고 파이펫팅으로 웰(well) 내부의 잔여 EtOH를 제거한다. 단일 세포(single cell) (DPC: KC=1:1) 5x10⁴을 StemFIT 3D 내부의 중앙에 균일하게 도포되도록 넣고 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 15분간 배양한다. 세포가 침전된 것을 확인한 후 웰(well) 외부의 잔여 세포 제거를 위해 배지를 조심스럽게 흡입하고 남아있는 세포가 웰(well) 외부로 빠져나오지 않도록 새 배지를 첨가한다. StemFIT 3D의 DPC, KC를 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하여 스페로이드(spheroid) 형성을 유도한다. 배양 기간은 3~7일로 설정하여 배양할 수 있다. 배양 배지로는 DMEM:KGM(3:1) 배지를 사용하였고 매일 교체하였다.

[0058] (2) 형질주입된 DPC, KC 스페로이드 제작

[0059] StemFIT 3D에 70% EtOH를 넣고 웰(well) 내부의 버블을 파이펫팅으로 제거한 후 DMEM:KGM(keratinocyte growth medium)(3:1) 배지를 채우고 파이펫팅으로 웰(well) 내부의 잔여 EtOH를 제거한다. 단일 세포(single cell) (형질주입된 DPC: KC=1:1) 5x10⁴을 StemFIT 3D 내부의 중앙에 균일하게 도포되도록 넣고 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 15분간 배양한다. 세포가 침전된 것을 확인한 후 웰(well) 외부의 잔여 세포 제거를 위해 배지를 조심스럽게 흡입하고 남아있는 세포가 웰(well) 외부로 빠져나오지 않도록 새 배지를 첨가한다. StemFIT 3D의 형질주입(transfection)된 DPC, KC를 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하여 스페로이드(spheroid) 형성을 유도한다. 배양 기간은 3~7일로 설정하여 배양할 수 있다. 배양 배지로는 DMEM:KGM(3:1) 배지를 사용하였고 매일 교체하였다. 이때 형질주입(transfection)된 DPC는 각 LEF1, TCF1, Wnt1, Wnt10b로 형질주입된 DPC의 조합으로 사용할 수 있다(도 3).

[0060] (3) DPC, KC, HUVEC 스페로이드 제작

[0061] StemFIT 3D에 70% EtOH를 넣고 웰(well) 내부의 버블을 파이펫팅으로 제거한 후 DMEM:KGM(keratinocyte growth medium):EGM-2(endothelial growth medium)(3:1:4) 배지를 채우고 파이펫팅으로 웰(well) 내부의 잔여 EtOH를 제거한다. 단일 세포(single cell) (DPC: KC: HUVEC=1:1:1) 5x10⁴을 StemFIT 3D 내부의 중앙에 균일하게 도포되도록 넣고 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 15분간 배양한다. 세포가 침전된 것을 확인한 후 웰(well) 외부의 잔여 세포 제거를 위해 배지를 조심스럽게 흡입하고 남아있는 세포가 웰(well) 외부로 빠져나오지 않도록 새 배지를 첨가한다. StemFIT 3D의 DPC, KC, HUVEC를 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하여 스페로이드(spheroid) 형성을 유도한다. 배양 기간은 3~7일로 설정하여 배양할 수 있다. 배양 배지로는 DMEM:KGM:EGM-2(3:1:4) 배지를 사용하였고 매일 교체하였다.

[0062] (4) 형질주입된 DPC, KC, HUVEC 스페로이드 제작

[0063] StemFIT 3D에 70% EtOH를 넣고 웰(well) 내부의 버블을 파이펫팅으로 제거한 후 DMEM:KGM(keratinocyte growth medium):EGM-2(endothelial growth medium)(3:1:4) 배지를 채우고 파이펫팅으로 웰(well) 내부의 잔여 EtOH를 제거한다. 단일 세포(single cell) (형질주입된 DPC: KC: HUVEC=1:1:1) 5x10⁴을 StemFIT 3D 내부의 중앙에 균일하게 도포되도록 넣고 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 15분간 배양한다. 세포가 침전된 것을 확인한 후 웰(well) 외부의 잔여 세포 제거를 위해 배지를 조심스럽게 흡입하고 남아있는 세포가 웰(well) 외부로 빠져나오지 않도록 새 배지를 첨가한다. StemFIT 3D의 형질주입(transfection)된 DPC, KC, HUVEC를 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하여 스페로이드(spheroid) 형성을 유도한다. 배양 기간은 3~7일로 설정하여 배양할 수 있다. 배양 배지로는 DMEM:KGM:EGM-2(3:1:4) 배지를 사용하였고 매일 교체하였다. 이때 형질주입된 DPC는 각 LEF1, TCF1, Wnt1, Wnt10b로 형질주입된 DPC의 조합으로 사용할 수 있다(도 4).

[0065] 모낭 스페로이드(spheroid)가 포함된 전체 피부 등가물 배양

[0066] 모낭 스페로이드(spheroid)가 포함된 전체 피부 등가물의 하부 채널을 PBS와 EGM-2로 세척하고 배양 챔버에 EGM-2 첨가 후 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 10분간 스캐폴드를 습윤한다.

[0067] HUVEC (1×10^5 cell/100 μ l)을 하부 채널을 통해 넣고 배양 챔버와 배지 챔버에 EGM-2를 가득 채운다. 도 5의 (a)에 나타낸 바와 같이, 멸균된 유리 기판을 배지가 새지 않도록 위에 덮은 후 뒤집은 상태에서 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 1일간 배양한다. 세포는 계대번호 5~7번으로 사용되었다.

[0068] 도 5의 (b)에 나타낸 바와 같이, 다시 장치를 뒤집어서, FB(1×10^6 cell /100 μ l)을 스캐폴드에 넣고 배양 챔버에 FGM(fibroblast growth medium):EGM-2(1:3) media을 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 1시간 동안 배양한다. 세포는 계대번호 5~7번으로 사용되었다.

[0069] 도 5의 (d)에 나타낸 바와 같이, StemFIT 3D에서 생성된 형질주입된 DPC, KC, HUVEC의 스페로이드(spheroid)를 파이펫팅으로 떠온 다음 스캐폴드의 구멍으로 하나씩 들어가게 한다. 15분간 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 침전시키고 구멍에 스페로이드(spheroid)를 잘 안착시키기 위해 25 °, 10 초 간격으로 좌우 왕복 3번 & 상하 왕복 3번 3세트를 적용시킨다.

[0070] 도 5의 (e)에 나타낸 바와 같이, 배지를 흡입한 후 KC (5×10^5 cell/100 μ l)를 스캐폴드 위에 넣고 배지 챔버에 100 μ g/ml 아스코르브산(ascorbic acid)가 보충된 FGM:EGM-2(1:3) 배지를 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에서 1시간 동안 배양한다. 그 후 3일 동안 각도 15 °, 12 분 간격을 적용하여 하부 채널의 유체 흐름을 유도한다. 사용된 세포는 계대번호 5~7번이고 배양 배지는 100 μ g/ml 아스코르브산이 보충된 FGM:EGM-2(1:3) 배지를 배지 챔버에 넣고 1.5 mM 칼슘 클로라이드(calcium chloride)가 보충된 KGM을 배양 챔버에 첨가하여 매일 교체한다.

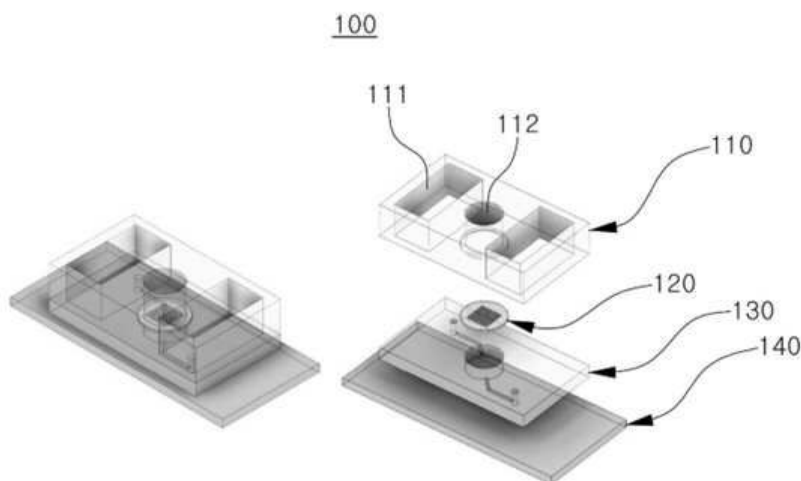
[0071] 도 5의 (f)에 나타낸 바와 같이, 그 후 기액 상호작용(air liquid interface) 상태에서 100 μ g/ml L-아스코르브산과 1.5 mM 칼슘 클로라이드 가 보충된 E-media:EGM-2 (3:1) 배지를 배지 챔버에만 첨가하여 각도 15 °, 12 분 간격으로 4주간 배양한다.

부호의 설명

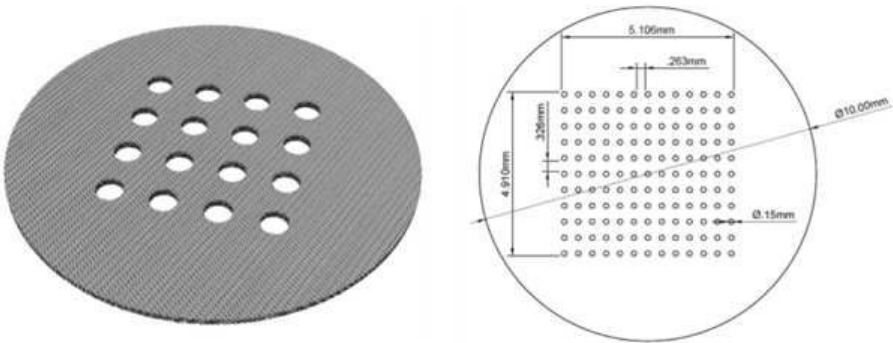
[0072] 100: 모낭을 포함하는 피부의 등가물 제조를 위한 장치; 110 : 상부층; 120 : 스캐폴드; 130: 하부 채널 패턴층; 140: 기판; 111: 배지 챔버; 112: 배양 챔버

도면

도면1



도면2



도면3

transfection된 DPC와 KC로 제작할 수 있는 spheroid 조합 리스트	
LEF1-DPC, KC	TCF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
TCF1-DPC, KC	Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
Wnt1-DPC, KC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt1-DPC, KC
Wnt10b-DPC, KC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
LEF1-DPC, TCF1-DPC, KC	LEF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
LEF1-DPC, Wnt1-DPC, KC	TCF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
LEF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC
TCF1-DPC, Wnt1-DPC, KC	

도면4

transfection된 DPC, KC 및 HUVEC으로 제작할 수 있는 spheroid 조합 리스트	
LEF1-DPC, KC, HUVEC	TCF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
TCF1-DPC, KC, HUVEC	Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
Wnt1-DPC, KC, HUVEC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt1-DPC, KC, HUVEC
Wnt10b-DPC, KC, HUVEC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
LEF1-DPC, TCF1-DPC, KC, HUVEC	LEF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
LEF1-DPC, Wnt1-DPC, KC, HUVEC	TCF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
LEF1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC	LEF1-DPC, TCF1-DPC, Wnt1-DPC, Wnt10b-DPC, KC, HUVEC
TCF1-DPC, Wnt1-DPC, KC, HUVEC	

도면5

