

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0121543 (43) 공개일자 2014년10월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 14/78 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01) C12M 1/42 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0037574 (22) 출원일자 2013년04월05일 심사청구일자 2013년04월05일		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 신관우 서울 강남구 선릉로 221, 407동 1102호 (도곡동, 도곡텍슬아파트) 박수진 경기 안양시 만안구 안양로532번길 12, 107동 810호 (석수동, 현대아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 양부현

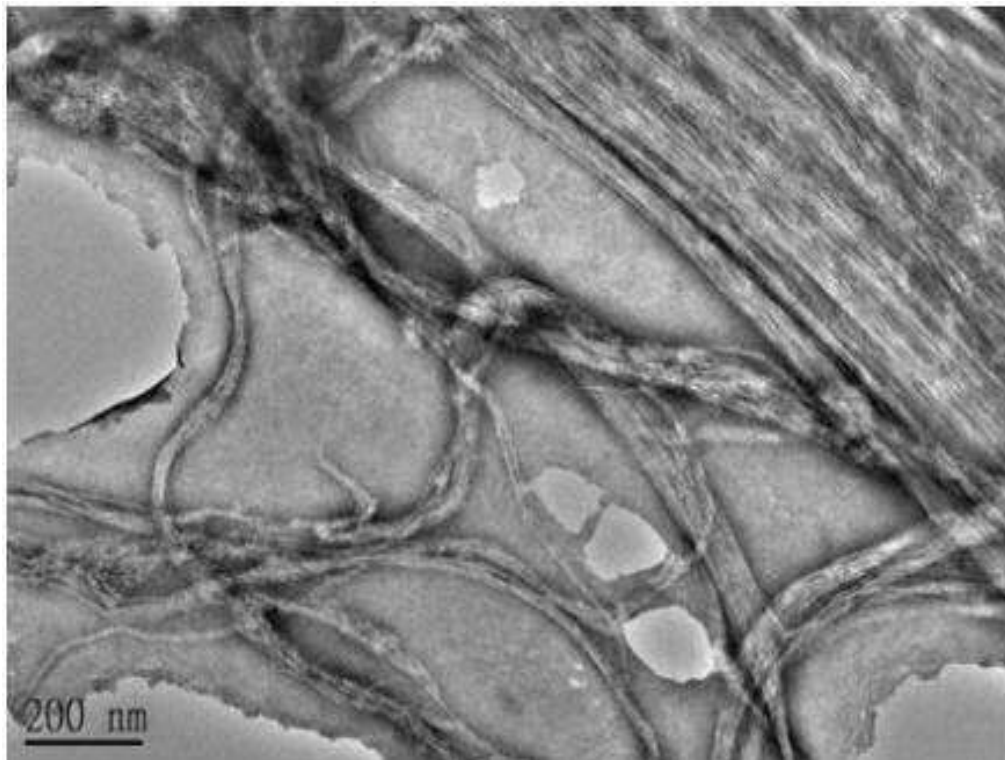
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 전기장을 이용한 세포외막단백질 원섬유 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 전기장을 이용한 세포외막단백질 원섬유 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, (a) 세포외막단백질을 용해하여 세포외막단백질 용액을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유(fibril)를 제조하는 단계를 포함한다. 본 발명은 기존의 화학적인 조건변화에 의하여 한정적으로 변화가 가능하던 방식과 달리, 조작이 용이한 전기장 제어를 통해, 종래에 발표된 바 없는 수 나노의 매우 얇고 균일하며 독립적으로 존재하는 콜라겐 원섬유를 제조할 수 있는 기술을 제공한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

최명철

대전광역시 유성구 구성동 373-1 KAIST 바이오 및
뇌공학과

송채연

대전광역시 유성구 구성동 373-1 KAIST 바이오 및
뇌공학과

김유미

대전광역시 유성구 구성동 373-1 KAIST 바이오 및
뇌공학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017539

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업-중견연구자지원사업-도약연구지원 사업

연구과제명 인공세포 구조 및 기능 모사 연구

기 여 율 7/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0062606

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터지원사업-국가핵심연구센터사업

연구과제명 고휘도 방사광 X-선 기술 및 응용

기 여 율 3/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2015.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 세포외막단백질(extracellular matrix protein) 원섬유 제조 방법:

- (a) 세포외막단백질을 용해하여 세포외막단백질 용액을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유(fibril)를 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포외막단백질은 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 헤파린(heparin), 케라틴(keratin) 또는 피브린(fibrin)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 세포외막단백질은 콜라겐인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 상기 세포외막단백질 용액은 pH 1 내지 pH 4의 pH 값을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 전기장은 직류 전기장, 교류 전기장 또는 이의 혼합 전기장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 원섬유는 1 내지 20 nm의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 방법을 통해서 제조된 세포외막단백질 원섬유.

청구항 8

(a) 투명전도성 산화물이 코팅되고 일면에 전도성 물질이 결합된 제1기판; (b) 일측에 시료물질을 주입할 수 있는 주입구를 갖으며 비전도성 물질로 구성된 스페이스(spacer); 및 (c) 투명전도성 산화물이 코팅되고 일면에 전도성 물질이 결합 제2기판을 포함하는 세포외막단백질 원섬유(fibril) 제조 장치.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 투명전도성 산화물은 인-주석 산화물, 인-아연 산화물, 주석 산화물, 아연 산화물, 구리-알루미늄 산화물, 구리-갈륨 산화물, 구리-스칸듐 산화물, 구리-크롬 산화물, 구리-인 산화물, 구리-이트륨 산화물 또는 은-인 산화물인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 투명전도성 산화물은 인-주석 산화물인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 제1기판 및 제2기판은 유리, 금속, 금속 옥사이드, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 제1기판 및 제2기판은 유리인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 전도성 물질은 금속, 초전도체, 반도체 또는 비금속 전도체인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 전도성 물질은 금속인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 15

제 8 항에 있어서, 상기 비전도성 물질은 고무, 유리, 플라스틱, 에보나이트(ebonite) 또는 세라믹(ceramic)인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 비전도성 물질은 고무인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 17

제 8 항에 있어서, 상기 장치는 상기 전도성 물질을 통한 전기장(electrical field) 인가에 의해 작동하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 18

제 8 항에 있어서, 상기 세포외막단백질은 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 헤파린(heparin), 케라틴(keratin) 또는 피브린(fibrin)인 것을 특

징으로 하는 장치.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전기장을 이용한 세포외막단백질 원섬유 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 콜라겐은 대부분 동물에서 발견되는 단백질로 특히 포유동물의 살과 결합조직을 구성하는 몸의 구조적 지지체로 가장 일반적인 단백질이다. 콜라겐의 기본 성분 단위는 트로포콜라겐(tropocollagen) 단백질이다. 트로포콜라겐은 동일한 크기의 세 가지 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있다. 이같은 사슬들은 각각 서로 주위로 감겨서 초나선형(superhelical) 케이블이나 삼중 나선형(triple-helix) 구조를 형성한다. 트로포콜라겐에서 세 가지 사슬 각각이 약 1,000 개의 아미노산의 결합체로 이루어져 있다. 콜라겐 섬유상의 기본 단위인, 트로포콜라겐을 이루는 폴리펩티드 사슬의 종류에 따라 각각 다른 종류의 콜라겐으로 구분된다. 가장 많이 발견되는 콜라겐의 종류로는 지금까지 알려진 약 20여 가지의 다양한 종류 중에서 콜라겐 타입 I, II, III, V 및 등 이런 몇 가지 타입의 콜라겐이 가장 일반적인 규칙적인 원섬유(fibril)의 형태를 갖게 되며, 우리 몸의 조직과 피부, 뼈, 힘줄, 인대 등의 구조를 이루는데 콜라겐 단백질의 90% 이상이 인체 내에서 사용하고 있다. 콜라겐 중에서 인체 내에서 가장 많이 존재하는 콜라겐 I 타입의 경우, 1935년 Wyckoff에 의하여 X-ray에 의하여 구조가 처음 알려졌다(Wyckoff R, Corey R, Biscoe J (1935), Science 82, 2121). 이후, 콜라겐을 구성하는 트로포콜라겐의 삼중 나선형의 구조가 육각형(hexagonal)형태로 모여서 구성된 구체적인 분자구조형태의 전자밀도 지도가 2001년 Orgel(Orgel J. Miller A, Irving TC, Fischetti RF, Hammersely A, Wess TJ (2001) Structure, 9, 1061)에 의하여 확인되었으며, 조직에 따른 섬유상의 분자구조와 기계적인 특성의 상관관계는 1988년 Parry에 의하여 확인 된 바 있다(Parry D. (1988) Biophysical Chemistry 29, 195). 또한, 콜라겐 섬유가 모여서 구성되는 시트(sheet) 타입의 몇 개의 결합구조는 1998년 Wess에 의하여 제시된 바 있다(Wess, TJ, Hammersley AP, Wess L, Miller A, J. (1998) Molecular Biology, 275, 255). 이외에도 X-선 회절에 의하여 콜라겐이 존재하는 다양한 조직마다 특별한 결합구조를 보여주고 있으며, 콜라겐이 존재하는 대부분의 인체 및 동물 조직마다 조금씩 다른 섬유(fibril) 상들의 결합구조를 보여주고 있다. 콜라겐을 구성하는 단백질은 이미 상업용으로 분리정제가 가능하여 제공되고 있으나, 현재 기술로 존재하는 조직에 따라 다양한 섬유상의 결합구조는 그 조직을 구성하는 세포와 외부 환경에 의하여 자연계에서 자기조립이라는 단백질 스스로 변화되어 구성되기 때문에 이를 조직에 맞게 변화시키는 기술은 현재까지 제시된 바 없다.

[0003] 상기한 배경에 제시한 것과 같이 콜라겐으로의 결합된 섬유상의 결합구조를 조절하는 것은 콜라겐 섬유가 피부 노화 현상 방지(Braumer et al, US patents 4,131,650, Collagen Foil for Cosmetic Application, 1978), 피부에 수분 제공(BioCell Collagen, US patent #6,025,327, #6,323,319, #6,780,841, 및 #7,091,180) 및 기계적인 탄성도의 유지 등의 미용분야(EPOApplication EP/897, US patents 4,320,201, Method for making collagen sponge for medical and cosmetic uses), 근육의 수축과 이완, 상처 치료(Doillon CJ, Brandwein WS, Silver FS (2004), Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology, J. Biomedical Materials Research, 20, 1219), 심혈관재생(Liu et al, Type II collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development (1997) PNAS, 94, 1852), 약물전달(Olsen D et al, Recombinant Collagen and gelatin for drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews (2003), 55, 1547), 골다공증의 치료를 포함하는 의공학 및 조직공학의 전분야에 광범위하게 활용되기 때문에 학술적 의미 뿐 아니라 상업적 활용에 매우 중요하다. 실제로 다양한 기능을 갖고 있는 단백질로서의 콜라겐은 신체의 여러 부분에서 발견되며, 인체를 구성하는 전체 단백질의 30% 이상을 포함하기 때문에 콜라겐의 구조와 특성을 변화시키는 기술의 개발은 매우 절실하다. 자가 조립된 콜라겐은 섬유의 두께 규모에 따라 수십에서 수백 나노미터의 규모인 경우에 '피브릴(fibril)', 수백에서 수 마이크로미터의 두께인 경우에는 '파이버(fiber)'로 분류하며, 상기한 67 nm 단위로 구성된 D-주기 교차 원섬유(D-periodic cross fibril)의 규칙적인 고유의 밴드를 갖게 되며, 이러한 구조는 전자현미경으로 쉽게 관찰되고 있다(Hulmes et al, Electron Microscopy shows periodic structure in collagen fibril cross sections (1981), PNAS, 78, 3567).

[0004] 따라서, 기존에 발표된 논문을 살펴보면, 생체 밖(in vitro)에서 동일한 콜라겐 단백질을 조직의 환경과 조건에

유사하게, 혹은 인공적으로 결합구조를 변화시키기 위하여 pH를 변화시키거나 세포와의 동시 배양을 통해 섬유 콜라겐을 형성하는 방법으로 지난 30년간 노력해 오고 있음을 알 수 있다. 실제로 1978년 Williamson은 용해된 콜라겐의 온도와 pH를 변화시켜서 동물조직에서 발견되는 콜라겐 섬유상과 매우 유사한 형태의 원섬유 구조를 얻는데 성공한 바 있고 (Williams, BR, Gelman RA, Poppke DC, Piez, KA, Collagen fibril formation (1974), J. Biological Chemistry, 253, 6578), 혈장과 동시배양을 통한 콜라겐 구조체의 형성(Siljander P, Carpen O, Lassila R, Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis (1996) Blood, 87, 4651), 혹은 콜라겐의 합성과정에 미네랄의 흡착을 통해서 규칙적인 주기(period)를 변화시킬 수 있다는 결과(Lees, S, Mineralization of Type I Collagen (2003) Biophysical J. 85, 204)들이 보고된 바 있다.

[0005] 상기한 논문들의 대부분은 콜라겐의 원섬유로 패킹(packing)된 구조체의 결합구조를 변화시키기 위하여 동물이나 인체 조직에서 주어지는 각각의 다른 환경조건을 갖도록 하여, 최종적인 콜라겐의 섬유구조로서 성장을 확인하거나, 결합되는 섬유구조체 내부의 단백질의 미세한 변화들을 관찰하는 미시적인 연구에 한정되어 있다. 그러나 외부 환경적인 조건을 제공하는 pH, 온도 및 이온 등의 배양조건에서 나타나는 복합적인 환경적 조건으로 인하여, 콜라겐의 섬유화(fiber)로의 자가조립에 대한 변화에 대한 관찰의 결과로서 제시되고 있을 뿐, 실제 산업화에 활용될 수 있는 결정적인 변화 조건인 섬유 콜라겐 원섬유 혹은 원섬유가 패킹되어진 섬유의 결합 두께의 조절, 특히 균일한 크기로 제어 할 수 있는 방법은 제시하지 못하고 있다. 실제로 각각의 다른 두께의 섬유는 생물학적인 활동성과 기계적인 물성이 매우 다르기 때문에, 의공학이나 화장품이나 미용과 관련된 산업 등에 이용될 수 있는 콜라겐 원섬유형성(fibrillogenesis)을 제어할 수 없었던 문제점과 함께, 섬유 콜라겐을 만들더라도 섬유 두께의 균질성을 조절 할 수 있는 방법은 아직 기술적인 난제로 남아 있으며, 패킹된 콜라겐 섬유 두께의 균질성을 제어할 수 있는 기술은 아직 연구나 특허로 제시된 바 없다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 생물체의 다양한 조직에서 자기조립(Self-Assembly)되어 고유한 구조를 갖는 세포외막단백질(Extracellular Matrix Protein)의 원섬유를 균일하게 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유를 제조하는 경우에, 종래에 보고되지 않은 가장 미세한 원섬유를 제조할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 세포외막단백질 원섬유 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 세포외막단백질 원섬유를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 세포외막단백질 원섬유 제조 장치를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포외막단백질 원섬유 제조 방법을 제공한다:

[0013] (a) 세포외막단백질을 용해하여 세포외막단백질 용액을 제조하는 단계; 및

[0014] (b) 상기 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유(fibril)를 제조하는 단계.

- [0015] 본 발명자들은 생물체의 다양한 조직에서 자기조립(Self-Assembly)되어 고유한 구조를 갖는 세포외막단백질(Extracellular Matrix Protein)의 원섬유를 균일하게 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유를 제조하는 경우에, 종래에 보고되지 않은 가장 미세한 원섬유를 제조할 수 있음을 규명하였다.
- [0016] 본 특허에서 제시하는 방법은 기존의 단백질 결합에 pH, 이온농도 등과 같은 화학적인 환경이 아닌, 대량으로 전체 시료에 영향을 줄 수 있는 전기장을 통하여 제어하는 기술로, 균일한 콜라겐 섬유의 구조를 변화시킬 수 없었던 종래의 문제점을 해결하고자 한다. 기존에 전기장은 실제로 조직형성에 영향을 미칠 수 있다는 보고는 제시된 바 있다. 2010년 MB Keogh가 발표한 논문 (Cell and Tissue Research. 1, 340, 2010.)을 보면 콜라겐 세포지지체(collagen scaffold)가 골 형성을 도왔다는 것을 알 수 있으며, 2008년 J Behari가 저술한 자료 (Recent Advances in Microwave Theory and Applications, 2008.)를 살펴보면, 전기적 자극이 골다공증이 걸린 쥐의 뼈에 콜라겐을 풍부하게 했다는 것을 알 수 있다. 또한 전기장을 가하는 방향에 상관없이 전기장의 영향에 의해 콜라겐을 이루는 주요 성분중 하나인 하이드록시프롤린(hydroxyproline) 성분이 양적으로 증가했다는 사실은 이미 1996년에 보고되었다(General Physiology and Biophysics. 6, 15, 1996.). 이와 같은 결과들은 전기장이 콜라겐의 생체반응에 변화를 주기 위한 자극으로 활용되었을 뿐, 실제 산업화에 활용될 수 있는 콜라겐의 직접적인 구조 제어기술은 아직까지 보고 된 바 없다.
- [0017] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 방법을 단계별로 설명하고자 한다.
- [0018] 단계 (a): 세포외막단백질 용액의 제조
- [0019] 본 발명은 세포외막단백질 원섬유를 제조하기 위해 다양한 세포외막단백질을 이용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외막단백질은 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 헤파린(heparin), 케라틴(keratin) 또는 피브린(fibrin)이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포외막단백질은 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 또는 피브로넥틴이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포외막단백질은 콜라겐이다.
- [0021] 본 발명에서 세포외막단백질 원섬유를 제조하기 위해 이용되는 세포외막단백질은 다양한 포유동물의 조직으로부터 실험적으로 또는 상업적으로 수득할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 인간, 소, 말, 양, 돼지, 토끼, 염소, 마우스, 햄스터 또는 랫트이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 인간, 소, 돼지 또는 랫트이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 소(bovine)의 콜라겐이다.
- [0023] 본 발명의 세포외막단백질은 상기 포유동물의 다양한 조직으로부터 수득할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조직은 힘줄, 인대, 피부, 각막, 연골, 뼈, 혈관, 내장 또는 추간판이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조직은 힘줄, 인대, 피부 또는 진피이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 조직은 피부내부의 진피이다.
- [0025] 본 발명은 상기 세포외막단백질을 용해하여 세포외막단백질 용액을 제조한다. 본 발명의 콜라겐은 물에 대한 용해도가 매우 낮으므로, 산성 용액(예컨대, 염산)에 용해하고 알칼리 용액(예컨대, 수산화 나트륨 수용액)을 첨가하여 pH를 조절하여 콜라겐 용액을 제조한다. 상기 알칼리 용액의 첨가에 따라, 콜라겐은 반응이 가능한 상태가 된다. 이는 부분적으로 단백질 간의 자기조립(self-assembly) 반응이 상태가 된 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외막단백질 용액은 pH 1 내지 pH 4의 pH 값을 갖고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포외막단백질 용액은 pH 1 내지 pH 3의 pH 값을 갖는다.
- [0027] 단계 (b): 세포외막단백질 원섬유(fibril)의 제조

- [0028] 상기 세포외막단백질 용액에 전기장(electric field)을 인가하여 세포외막단백질 원섬유를 제조한다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 ‘전기장’은 전기적으로 전하된 입자 둘러싸여있는 시가변적(time-varying) 자기장을 의미한다. 상기 전기장은 전기적으로 전하된 물체에 전기적으로 전하된 입자를 둘러싼 힘(force)이 가해지는 것이다. 이의 정성적(qualitative) 정의는 상기 전기장은 쿨롱(coulomb, NC^{-1}) 당 뉴턴의 SI 유닛을 갖는 벡터장(vector field), 또는 미터(metre) 당 볼트(volts)(Vm^{-1})이다. 상기 전기장에서의 SI 유닛은 $\text{kgms}^{-3}\text{A}^{-1}$ 이다. 기지점에서의 장(field)의 세기(strength) 또는 규모(magnitude)는 힘(force)의 방향에 의해 주어지는 장의 방향에 대한 1 쿨롱의 양성 시험전하(test charge)에 가해지는 값이다.
- [0030] 즉, 본 발명의 세포외막단백질 용액에 가해지는 전기적인 전하를 갖는 힘을 모두 포함한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 직류 전기장, 교류 전기장 또는 이의 혼합 전기장이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 직류 전기장 또는 교류 전기장이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 직류 전기장이다.
- [0032] 본 발명의 전기장 인가에 의해 제조되는 세포외막단백질 원섬유는 트로포콜라겐(tropocollagen)이다. 상기 트로포콜라겐은 콜라겐 섬유구조체(fibrous structure)의 기본 단위이며, 왼쪽-나선형 구조의 3개 폴리펩타이드 가닥이 3중 오른쪽-나선형 구조(triple-helix)를 갖거나, 초나선형(superhelical) 케이블 구조를 갖으며, 약 300 nm 길이 및 약 1.5 nm 직경을 갖는다.
- [0033] 상기 세포외막단백질 원섬유는 다양한 조직에서 다른 조합 및 농도로 배열되어(arranged) 다른 조직적 특성을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 방법에 의해 제조된 세포외막단백질 원섬유를 제공한다.
- [0035] 상기 세포외막단백질 원섬유는 상기 세포외막단백질 원섬유 제조 방법에 의해 제조되는 세포외막단백질 원섬유이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 투명전도성 산화물이 코팅되고 일면에 전도성 물질이 결합된 제1기판; (b) 일측에 시료물질을 주입할 수 있는 주입구를 갖으며 비전도성 물질로 구성된 스페이서(spacer); 및 (c) 투명전도성 산화물이 코팅되고 일면에 전도성 물질이 결합 제2기판을 포함하는 세포외막단백질 원섬유(fibril) 제조 장치를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 장치에 포함되는 제1기판 및 제2기판은 전도성을 부여하기 위해 투명전도성 산화물로 코팅한다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 투명전도성 산화물은 인-주석 산화물(Indium-Tin Oxide; ITO), 불소-주석 산화물(Fluorine-Tin Oxide; FTO), 아연 산화물(Zinc Oxide), 알루미늄-아연 산화물(Aluminum-Zinc Oxide; AZO) 또는 인-카드뮴 산화물(Indium-Cadmium Oxide)이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 투명전도성 산화물은 인-주석 산화물, 불소-주석 산화물 또는 아연 산화물이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 투명전도성 산화물은 인-주석 산화물이다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1기판 및 제2기판은 유리, 금속, 금속 옥사이드, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제1기판 및 제2기판은 유리, 세라믹 또는 석영이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 제1기판 및 제2기판은 유리이다.
- [0040] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 장치에 포함되는 제1기판 및 제2기판의 일면에 전류를 제공하기 위한 전도성 물질이 결합되어 있다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전도성 물질은 금속, 초전도체, 반도체 또는 비금속 전도체이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전도성 물질은 금속이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 전도성 물질은 구리(cooper)이다.

- [0042] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 장치는 상기 전도성 물질을 통한 전기장(electrical field) 인가에 의해 작동한다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 직류 전기장, 교류 전기장 또는 이의 혼합 전기장이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 직류 전기장 또는 교류 전기장이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 직류 전기장이다.
- [0044] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 장치에 포함되는 스페이서는 일측에 시료물질을 주입할 수 있는 주입구를 갖으며 비전도성 물질로 구성된다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비전도성 물질은 고무, 유리, 플라스틱, 에보나이트(ebonite) 또는 세라믹(ceramic)이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비전도성 물질은 고무, 유리 또는 플라스틱이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 비전도성 물질은 고무이다.
- [0046] 본 발명의 세포외막단백질 원섬유 제조 장치는 원섬유를 갖는 다양한 세포외막단백질에 적용 될 수 있으며, 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 헤파린(heparin), 케라틴(keratin) 또는 피브린(fibrin)이고, 이에 한정되지 않는다. 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 II, 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 V, 콜라겐 타입 IX, 및 이의 조합을 포함한다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0048] (a) 본 발명은 세포외막단백질 원섬유 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0049] (b) 본 발명은 기존의 화학적인 조건변화에 의하여 한정적으로 변화가 가능하던 방식과 달리, 조작이 용이한 전기장 제어를 통해, 종래에 발표된 바 없는 수 나노의 매우 얇고 균일하며 독립적으로 존재하는 세포외막단백질 원섬유를 제조할 수 있는 기술을 제공한다.
- [0050] (c) 본 발명은 세포외막단백질 원섬유를 제조함에 있어서 이는 산업적 용도에 맞게 섬유구조체를 제조할 수 있으며, 산업상 이용에 있어서 생체 적합성 및 조직 적합성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1a 및 도 1b는 생체 밖(*in vitro*) 조건에서 전기장에 의해 제조된 약 8 nm의 균일한 콜라겐 원섬유를 전자투과 현미경(Transmission Electron Microscope; TEM)으로 관찰한 이미지들을 보여준다. 도 1a는 pH 3.01조건에서 1 V/cm DC를 5분동안 인가한 원섬유의 TEM사진이며, 도 1b는 pH 2.99에서 DC 1 V/cm를 5분 동안 인가한 결과물이다. 모두 매우 균질의 원섬유가 독립적으로 형성되었음을 확인할 수 있다.
- 도 2는 생체 밖(*in vitro*) 조건에서 pH 조절에 의해 제조된 콜라겐 원섬유의 이미지이다. 약 10-160 nm의 콜라겐 섬유가 엉켜있는 모습이다.
- 도 3은 콜라겐 용액에 전기장을 가해주기 위하여 제작된 전기장 장치의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0053] **실시예 1: 콜라겐의 용해 및 전처리 과정**
- [0054] 일반적으로, 쉽게 구매할 수 있는 콜라겐 단량체의 경우 물에 대한 용해도가 매우 낮으므로, 산성의 용액에 용해한다. 본 실시예에서는 0.01 M 염산(HCl)에 용해하여 추출한 콜라겐 타입 I(Sigma-Aldrich사 구매, 소 진피 유래)의 경우, 용해된 콜라겐 용액에 0.1 M NaOH를 이용하여 pH 2에서 pH 3까지 올려주었다. 본래 콜라겐 용액에 용해되어있는 콜라겐 단량체는 낮은 pH에서 안정한 상태로 존재하지만, 약간의 pH 변화에 의해 반응이 가

능한 상태가 된다. 이는 단백질 간의 자기조립반응이 일부 상태가 된 것을 의미한다.

[0055] **실시예 2: 전기장 제어 장치 제작**

[0056] 본 발명의 실시예에서는 본 발명의 효과를 보여주기 위하여 제작된 장치를 이용하고 있다. 전기장을 용액에 제공하기 위하여 두 개의 전극이 용액 내에 존재하여야 하는데, 본 실시예에서는 전극으로 ITO(Indium Tin Oxide)를 사용하였으며, ITO가 코팅된 2장의 유리판을 활용하였다. ITO 유리판을 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 로 절단한 후 구리테이프를 이용하여 각각의 ITO 유리판 끝에 전원을 연결시킬 부분을 만든다. ITO가 코팅된 부분을 마주보게 하여 전처리된 콜라겐 용액을 담지할 공간을 제공할 스페이서(spacer)를 삽입한다. 이때 스페이서는 간단한 고무소재 등의 절연소재를 이용하면 된다. 스페이서 내부 공간에는 전기장을 가해줄 콜라겐 용액으로 채운다(도 3).

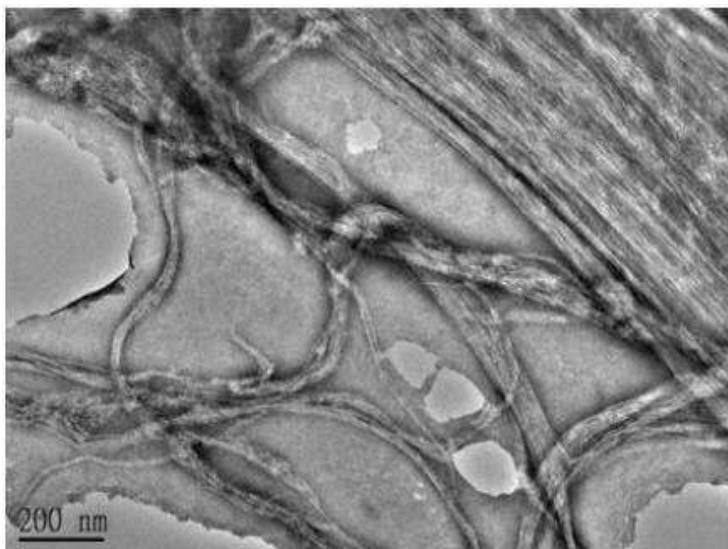
[0057] **실시예 3: 전기장 조사를 통한 최소단위 원섬유 형성**

[0058] 상기한 실시예 1에서 준비된 콜라겐 용액을, 상기 실시예 2의 스페이서 내부 공간에 채워 넣고, 마주본 전극에 전기장을 걸어주게 된다. 본 발명의 바람직한 예로서 제시된 본 실시예의 전압의 크기는 제한되어 있는 것은 아니다. 하나의 예로써 약 2.5 V/cm DC를 5분 동안 인가해준다. 이때 콜라겐의 상태를 확인하기 위해 투과 전자현미경(TEM; Transmission Electron Microscope)을 이용해 이미지를 확인한 결과 도 1과 같이 종래에 제작된바 없었던 약 8 nm 두께의 매우 얇고 균일한, 머리카락처럼 독립적으로 존재하는 콜라겐 원섬유(fibril) 구조를 얻을 수 있었다. 이러한 현상은 가해진 전기장이 콜라겐의 단일한 섬유형태로 성장하는 과정에서 다른 콜라겐과 결합을 제한하는 역할을 하는 것으로 확인된다.

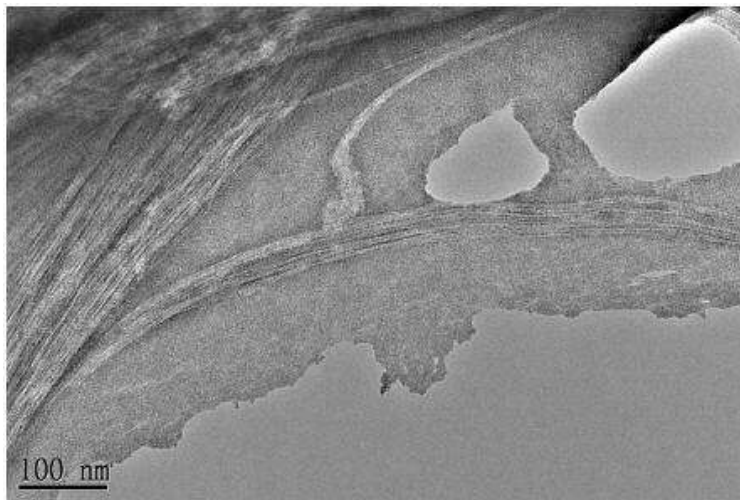
[0059] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

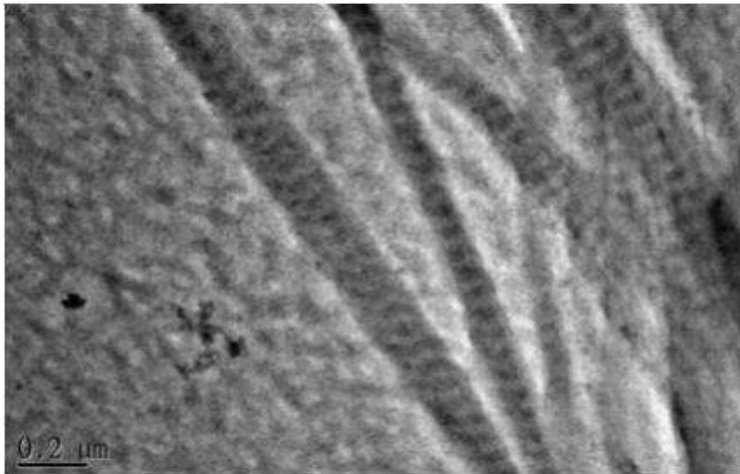
도면1a



도면1b



도면2



도면3

