(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월21일
(11) 등록번호 10-1554490
(24) 등록일자 2015년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/14 (2006.01) *A61F 2/02* (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0040662
(22) 출원일자 2014년04월04일
심사청구일자 2014년04월04일
(56) 선행기술조사문헌
JP2012187072 A
KR100834731 B1
KR1020030076110 A
KR100794174 B1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이상훈
서울특별시 성북구 북악산로 828 101-1408(정릉동, 쌍용아파트)
강 에드워드
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 바이오마이크로시스템 기술협동과정 (안암동5가)
문초혜
서울특별시 서대문구 성산로7안길 36 105동 (연희동, 신세대하이빌)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 정재철

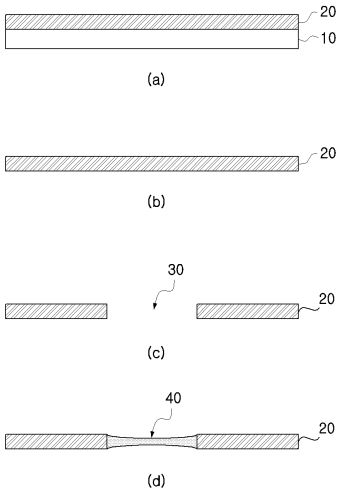
(54) 발명의 명칭 **생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 생체적합성 인공 기저막**

(57) 요 약

본 발명은 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 생체적합성 인공 기저막에 관한 것이다.

본 발명에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 인공 기저막은 상하 독립된 형태의 생체적합성 막으로서, 막의 크기와 두께를 제조 공정상에서 조절하는 것이 가능하다. 또한 한번의 공정을 통해 대량의 기저막을 제조하는 것이 가능하다. 또한 쉽고 빠르게 인공 기저막을 제작하는 것이 가능하며, 간단한 장비로도 제작이 가능하고, 비용이 저렴하다. 또한 세포배양뿐 만 아니라 폐포조직이나 혈관조직의 생체모사에 적합하여, 이들 조직에 존재하는 기저막의 연구에 효과적으로 활용하는 것이 가능하다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012026340
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원_도약연구
연구과제명 마이크로 칩을 이용한 자연 모사 생산 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 고분자 지지체로 이루어졌으며, 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

2) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

를 포함하며,

상기 관통홀의 평균 직경은 1-10 ㎜인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 2

1) 고분자 지지체로 이루어진 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

2) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

3) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

를 포함하며,

상기 관통홀의 평균 직경은 1-10 ㎜인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 3

1) 고분자 지지체가 포함된 용액을 기판 위에 코팅한 후 건조시키는 단계;

2) 상기 1)단계 이후 상기 기판을 제거하여 고분자 지지체로 이루어진 지지막을 수득하는 단계;

3) 상기 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

4) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

5) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

를 포함하며,

상기 관통홀의 평균 직경은 1-10 ㎜인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 기저막 형성액은 Alginate, collagen, Gelatin, PLCL[poly(L-lactide-co-a-caprolactone)], PCL(polycaprolactone), PLA(polylactic acid), PLGA(poly lactic-co-glycolic acid) 및 PGA(polyglycolic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 고분자 지지체는 PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene) PU

(Polyurethane) 및 PE(Polyethylene)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 기판은 Silicon wafer, PS dish, OHP film 및 acryl로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 기저막에서 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 부분의 면적은 하기 [계산식 1]로부터 구해지는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

[계산식 1]

$$\sum f_o = \gamma \sin\alpha \times \pi D \ (\theta < \alpha < \theta + 90)$$

$$\sum f_i = \gamma \times \pi d_{alg}$$

$$\therefore \boldsymbol{d_{alg} = D \sin\alpha}$$

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 최소 높이는 하기 [계산식 2]로부터 구해지는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막의 제조방법.

[계산식 2]

$$\therefore \boldsymbol{t = T - \frac{(D - d_{alg}) \cdot (1 - \sin\alpha)}{\cos\alpha}}$$

청구항 9

고분자 지지체인 것을 특징으로 하는 지지막에 관통홀이 형성되어 이루어지며; 및

상기 관통홀에는 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 부분의 면적을 보유한 기저막;

이 형성되어 이루어지는 것을 특징으로 하며,

상기 관통홀의 평균 직경은 1-10 ㎜인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 지지막의 두께는 50-600 ㎛인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 고분자 지지체는 PDMS(Polydimethylsiloxane), PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene) PU(Polyurethane) 및 PE(Polyethylene)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

청구항 13

제 9항에 있어서,

상기 기저막은 Alginate, collagen, Gelatin, PLCL[poly(L-lactide-co-a-caprolactone)], PCL(polycaprolactone), PLA(polylactic acid), PLGA(poly lactic-co-glycolic acid) 및 PGA(polyglycolic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질로부터 형성되는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

청구항 14

제 9항에 있어서,

상기 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 면적은 하기 [계산식 1]로부터 구해지는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

[계산식 1]

$$\sum f_o = \gamma \sin\alpha \times \pi D \ (\theta < \alpha < \theta + 90)$$

$$\sum f_i = \gamma \times \pi d_{alg}$$

$$\therefore \boldsymbol{d_{alg} = D \sin\alpha}$$

청구항 15

제 9항에 있어서,

상기 최소 높이는 하기 [계산식 2]로부터 구해지는 것을 특징으로 하는 생체적합성 인공 기저막.

[계산식 2]

$$\therefore \boldsymbol{t = T - \frac{(D - d_{alg}) \cdot (1 - \sin\alpha)}{\cos\alpha}}$$

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 생체적합성 인공 기저막에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기저막(basement membrane, 基底膜)이란 결합 조직과 상피, 근육, 신경 조직이 맞닿는 곳에 있는 막으로 경계막이라 불리기도 한다. 신장 사구체의 사구체 기저막 (Glomerular basenebt membrane, GBM)은 혈관 내피세포와 상피세포(Podocyte, 족세포)에 의해 생산되며, 강력한 음전하 성질을 가지고 있어 혈장단백을 통과시키지 않고 밀어내는 역할을 하여 8nm 이상의 크기를 가진 혈장 단백통과를 막을 수 있는 장벽으로 작용한다. 이러한 기저막의 두께는 일반적으로 250-300 nm이다. 또한 기저막은 섬유를 포함하여 다당류로 되어 있는데, 현저하게 발달되어 있는 부분과 그렇지 않은 부분이 있다. 기저막이 팽화하거나 밀도가 낮아지면 단백질이 통과하여 단백뇨를 일으키고, 기저막에 균열, 파괴 등이 일어나면 적혈구 등의 혈액 고형성분이 투과하여 혈뇨가 된다. 소리를 듣는데 가장 중요한 진동성 조직은 두개골의 하부에 있는 기저막으로, 이것은 달팽이관의 길이만큼 뻗어 있는데, 19세기 중반 이후부터 이 막이 달팽이관을 두 개의 내부관으로 나눈다는 것이 알려져 있었다. 게오르그 베케시는 소리가 기저막을 따라서 일련의 파장 형태로 이동한다는 것을 발견했다. 이렇듯 기저막은 우리의 인체 내에서 여러 가지 방면으로 활용되고 있으며, 인체의 중요한 여러 대사에 관여하는 생체막인 것이다.

[0003] 그리하여 이러한 기저막을 인공적으로 제조하여 이를 가지고 세포 및 조직의 각종 대사를 연구하기 위한 노력이 한창이다. 이러한 연구 결과로서 생체 및 합성 재료를 이용하여 제작한 마이크로 기저막의 제작 및 이를 이용한 세포배양 기술은 몇몇 그룹에서 개발되었다. 하지만 기존 세포배양법은 2차원 배양 접시 위에서 행해지게 된다. 이 경우 배지 및 성장 인자들은 세포 위에서만 전달된다. 이럴 경우 생체 내 세포의 경우 대부분 기저막 위에 존재하면서, 위쪽뿐 만 아니라 기저막의 아래쪽에서도 growth factor 및 molecule 등을 공급받아 기능하거나 증식 및 분화하게 된다. 그러므로 2차원 배양 접시 위에서만 행해지는 기존의 세포배양법으로는 인체 내에서 막의 상하를 모두 활용하여 활발하게 기능하는 기저막을 실제와 동일하게 재현하여 세포 및 조직의 각종 대사를 연구하기는 어렵다는 문제점이 있다.

[0004] 또한 최근의 기저막 배양법 연구는 바이오 멤스 기술 및 조직공학의 발달로 Gel을 이용한 3차원 배양, 폴리머 등을 이용한 인공 기저막 개발 및 마이크로 유체칩 등이 있다. 이러한 기술들은 2차원 세포배양법에 견주어 생체와 보다 유사한 환경을 제공하기는 하나, 이러한 경우에도 생체와 흡사한 환경을 제공하는데 아직까지 한계가 있고, 폐포조직이나 혈관조직과 같은 경우에는 적용하기 어렵다는 문제점이 있다.

[0005] 본 발명과 관련된 선행기술로는 대한민국 등록특허 제10-0834731호(특허문헌 1)가 개시되어 있으며, 구체적으로 상기 특허문헌 1에는 기저막이 보존된 상태로 양막을 처리한 후, 상기 처리된 양막에 세포를 배양하는 단계를 필수적으로 포함하고, 태반으로부터 분리된 생체적합성 양막을 세포배양기질로서 이용하여 각종 세포를 배양하는 세포치료제의 제조방법에 관해 개시되어 있어 세포배양법을 통한 기저막 제조방법이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-0834731호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 상하 독립된 형태의 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 생체적합성 인공 기저막을 제공하는 것이다. 또한 생체 재료를 이용하

여 쉽고 빠르게 인공 기저막을 제조하는 것이 가능한 제조방법을 제공하는 것이다. 또한 막의 위와 아래 면을 통해 물, 작은 분자, 공기 및 단백질 등을 이동시키면서 큰 분자들은 통과시키지 않아 세포의 배양이나 폐, 신장조직 및 혈관조직에 존재하는 기저막과 매우 유사한 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 기저막을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 첫번째 제조방법은

[0009] 1) 고분자 지지체로 이루어졌으며, 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0010] 2) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0011] 를 포함한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 두번째 제조방법은

[0013] 1) 고분자 지지체로 이루어진 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

[0014] 2) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0015] 3) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0016] 를 포함한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 세번째 제조방법은

[0018] 1) 고분자 지지체가 포함된 용액을 기관 위에 코팅한 후 건조시키는 단계;

[0019] 2) 상기 1)단계 이후 상기 기관을 제거하여 고분자 지지체로 이루어진 지지막을 수득하는 단계;

[0020] 3) 상기 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

[0021] 4) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0022] 5) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0023] 를 포함한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막은

[0025] 고분자 지지체인 것을 특징으로 하는 지지막에 관통홀이 형성되어 이루어지며; 및

[0026] 상기 관통홀에는 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 부분의 면적을 보유한 기저막;

[0027] 이 형성되어 이루어지는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 인공 기저막은 상하 독립된 형태의 생체적합성 막으로서, 막의 크기와 두께를 제조 공정상에서 조절하는 것이 가능하다. 또한 한번의 공정을 통해 대량의 기저막을 제조하는 것이 가능하다. 또한 쉽고 빠르게 인공 기저막을 제작하는 것이 가능하며, 간단한 장비로도 제작이 가능하고, 비용이 저렴하다. 또한 세포배양뿐 만 아니라 폐포조직이나 혈관조직의 생체모사에 적합하여, 이들 조직에 존재하는 기저막의 연구에 효과적으로 활용하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 실시예의 제조과정을 도식화한 그림이다.

도 2는 본 실시예에 따른 생체적합성 인공 기저막이 일정한 두께의 평평한 막으로 구성되어 있음을 보여주는 그림이다.

도 3은 본 실시예에 따른 생체적합성 인공 기저막은 관통홀에 형성된 기저막과 지지막의 접촉각에 의해 최소 두께가 유지되는 부분의 면적이 결정되는데 이를 보여주는 그림 및 계산식이다.

도 4는 접촉각에 따라 기저막의 최소 두께가 유지되는 평평한 부분의 면적을 구한 것이다.

도 5는 지지막의 두께, 지지막에 뚫린 구멍의 크기, 기저막 형성액과 지지막의 접촉각을 이용하여 구한 이론적인 기저막의 최저두께를 나타낸 그림이다.

도 6은 관통홀의 직경에 따른 지지막의 두께를 나타낸 그림이다.

도 7 및 도 8은 Confocal로 촬영한 Alginate 기저막의 단면 및 2D 및 3D 사진이다

도 9는 PLCL 농도와 PDMS 지지막의 두께에 따른 membrane의 두께를 그린 그래프이다.

도면 10 및 도 11은 1 %의 PLCL을 사용하여 제작한 기저막의 단면 및 윗면 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이에 본 발명자들은 상하 독립된 형태이면서 세포배양뿐 만 아니라 폐조직 또는 혈관조직의 연구에도 적용이 가능하면서 제조방법이 간단한 생체적합성 인공 기저막을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 및 이를 이용한 인공 기저막을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0031] 구체적으로 본 발명에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 첫번째 제조방법은

[0032] 1) 고분자 지지체로 이루어졌으며, 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0033] 2) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0034] 를 포함한다.

[0035] 또한 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 두번째 제조방법은

[0036] 1) 고분자 지지체로 이루어진 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

[0037] 2) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0038] 3) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0039] 를 포함한다.

[0040] 또한 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법 중 세번째 제조방법은

[0041] 1) 고분자 지지체가 포함된 용액을 기판 위에 코팅한 후 건조시키는 단계;

[0042] 2) 상기 1)단계 이후 상기 기판을 제거하여 고분자 지지체로 이루어진 지지막을 수득하는 단계;

[0043] 3) 상기 지지막에 관통홀을 형성하는 단계;

[0044] 4) 상기 관통홀이 형성된 지지막을 기저막 형성액에 침지시키는 단계; 및

[0045] 5) 상기 지지막을 기저막 형성액으로부터 분리시킨 후 경화시켜 상기 관통홀에 기저막을 형성하는 단계;

[0046] 를 포함한다.

[0047] 상기 기저막 형성액은 생체적합성을 가진 생체재료로서 기저막과 유사한 성질을 가지고 있는 것이라면 특별한 제한이 없으며, 바람직하게는 Alginate, collagen, Gelatin, PLCL[poly(L-lactide-co-a-caprolactone)],

PCL(polycaprolactone), PLA(polylactic acid), PLGA(poly lactic-co-glycolic acid) 및 PGA(polyglycolic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 포함하여 이루어지는 것일 수 있다. 한편 상기 침지의 시간은 기저막 형성액이 기저막으로 형성되는데 필요한 시간이라면 특별한 제한이 있는 것은 아니다.

[0048] 상기 기판은 상기 고분자 지지체로 코팅하는 것이 가능하면서 지지막의 역할을 수행할 수 있는 것이라면 특별한 제한이 없으며, 바람직하게는 Silicon wafer, PS dish, OHP Film 및 Acryl로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0049] 한편, 상기 세번째 제조방법에서 상기 기판을 제거하는 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 물리적인 힘으로 분리하여 제거하는 것도 가능하지만, 바람직하게는 지지체의 손상을 줄이기 위하여 용매를 활용할 수 있으며, 상기 사용 가능한 용매로는 물, 메탄올, 아세톤 및 이소프로필알코올로 이루어지는 군으로부터 어느 하나 이상의 용매를 이용하여 기판을 제거할 수 있다. 이렇게 상기 기판과 고분자 지지체는 기판을 분리하면서 제거하는 것이 가능하며, 상기 기판을 사용하여 고분자 지지체를 코팅하는 이유는 고분자 지지체가 경화될 때까지 지지막의 형태를 유지하기 위함이다. 또한 상기 기판의 제거는 메탄올 등의 용매를 이용하여 제거할 수도 있지만, 특별한 방법의 제한 없이 고분자 지지체와 물리적 힘만으로 분리하여 제거하는 것이 가능한데, 이것이 가능한 이유는 고분자 지지체가 형틀을 유지한 채로 경화되어 경도가 향상되었으며, 기판과 경화된 고분자 지지체 간에 결합력이 분리를 방해할 만큼 크지 않기 때문이다.

[0050] 상기 고분자 지지체는 경화 후에도 얇은 두께를 유지하면서 관통홀의 형성이 가능한 고분자 지지체라면 특별한 제한이 없으며, 바람직하게는 PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene) PU (Polyurethane) 및 PE(Polyethylene)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0051] 한편 상기 고분자 지지체는 기판을 이용하여 코팅함으로써 균일한 두께로 제작 될 수 있으며, 이는 고분자 지지체의 농도와 스핀속도에 따라 달라질 수 있다. 스핀속도는 100-2000 rpm에서 수행하는 것이 바람직하며 이에 따른 지지막의 두께도 50-600 ㎛내에서 해당할 수 있다.

[0052] 한편 상기 관통홀의 형성은 특별한 방법의 제한이 있는 것은 아니며, 바람직하게는 분리된 지지체에 날이 선 원통형 펀치를 이용하여 제작한다. 형성될 기저막의 예상 모양에 따라 펀치의 종류를 달리할 수 있으며 그 종류로는 사각형, 삼각형 등 다각형이 있다. 또한 상기 관통홀의 형성 후, 바람직하게는 플라즈마를 조사하여 지지막의 친수성 또는 소수성을 조절할 수 있다.

[0053] 한편 본 발명에 따른 생체적합성 인공 기저막의 제조방법에 의해 인공 기저막을 제조하게 되면 제조 과정 안에서 기저막의 면적과 두께를 조절하는 것이 가능하다. 구체적으로는 상기 기저막에서 최소 높이가 유지되는 부분, 즉 기울기가 형성되지 않으면서 평평한 상태가 유지되는 부분의 면적은 기저막 형성액과 지지막의 경계에 형성된 접촉각에 의해 결정된다. 이러한 기저막의 면적을 구하기 위한 방정식은 하기 계산식 1과 같다. 또한 상기 최소 높이는 하기 계산식 2에 의해 구해질 수 있다.

[0054] [계산식 1]

$$\sum f_o = \gamma \sin\alpha \times \pi D \ (\theta < \alpha < \theta + 90)$$

$$\sum f_i = \gamma \times \pi d_{alg}$$

[0055] $$\therefore d_{alg} = D \sin\alpha$$

[0056] [계산식 2]

[0057] $$\therefore t = T - \frac{(D - d_{alg}) \cdot (1 - \sin\alpha)}{\cos\alpha}$$

[0058] 이렇게 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된 생체적합성 인공 기저막은 상하 독립된 형태의 생체적합성 인공 기저막에 해당하여 기저막의 위쪽뿐 만 아니라 아래쪽에서도 Growth factor 및 molecule 등을 공급 받아 기능, 증

식, 분화하는 것이 가능하다. 또한 막의 크기와 두께를 제조공정상에서 조절하는 것이 가능하다. 또한 한번의 공정을 통해 대량의 기저막을 제조하는 것이 가능하다. 또한 쉽고 빠르게 인공 기저막을 제작하는 것이 가능하며, 간단한 장비로도 제작이 가능하고, 비용이 저렴하다. 또한 세포배양뿐 만 아니라 폐, 폐포, 신장조직 및 혈관조직의 생체모사에 적합하여, 이들 조직에 존재하는 기저막의 연구에 효과적으로 활용하는 것이 가능하다.

[0059] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 생체적합성 인공 기저막은

[0060] 고분자 지지체인 것을 특징으로 하는 지지막에 관통홀이 형성되어 이루어지며; 및

[0061] 상기 관통홀에는 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 부분의 면적을 보유한 기저막;

[0062] 이 형성되어 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0063] 상기 고분자 지지체는 바람직하게는 PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene) PU (Polyurethane) 및 PE(Polyethylene)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0064] 또한 상기 기저막은 바람직하게는 Alginate, collagen, Gelatin, PLCL[poly(L-lactide-co-a-caprolactone)], PCL(polycaprolactone), PLA(polylactic acid), PLGA(poly lactic-co-glycolic acid) 및 PGA(polyglycolic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질로부터 형성되는 것일 수 있다.

[0065] 또한 상기 지지막의 두께는 50-600 ㎛ 것이 바람직한데, 상기 지지막의 두께가 50 ㎛ 미만이면 기저막 형성이 어려워 바람직하지 않으며, 상기 지지막의 두께가 600 ㎛를 초과하면 지나치게 지지막의 두께가 두꺼워 보다 정교한 기저막 형성이 어려우므로 바람직하지 않다.

[0066] 또한 상기 관통홀의 평균 직경은 1-10 ㎜인 것이 바람직한데, 상기 관통홀의 평균 직경이 1 ㎜ 미만인 경우에는 기저막 관찰이 어려워 바람직하지 않고, 상기 관통홀의 평균 직경이 10 ㎜를 초과하는 경우에는 기저막의 최소 두께가 너무 얇아 기저막이 안정적이지 못함으로 바람직하지 않다.

[0067] 또한 상기 최소 높이가 변화하지 않고 유지되는 면적은 하기 [계산식 1]로부터 구해질 수 있으며, 상기 최소 높이는 하기 [계산식 2]로부터 구해질 수 있다.

[0068] [계산식 1]

$$\sum f_o = \gamma \sin\alpha \times \pi D \ (\theta < \alpha < \theta + 90)$$

$$\sum f_i = \gamma \times \pi d_{alg}$$

[0069] $$\therefore \boldsymbol{d_{alg} = D \sin\alpha}$$

[0070] [계산식 2]

[0071] $$\therefore \boldsymbol{t = T - \frac{(D - d_{alg}) \cdot (1 - \sin\alpha)}{\cos\alpha}}$$

[0072] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예**

[0074] **실시예 1**

[0075] 고분자 지지체 용액로서 PDMS를 사용하였으며, 이러한 용액을 Silicon Wafer 위에 스핀 코팅의 방법으로 코팅하

였다. 이때 스핀 코팅시 rpm을 조절하여 기판을 포함한 코팅 두께를 조절하였다. 그리하여 전체 두께는 200 ?m가 되도록 rpm을 300 rpm 으로 하여 코팅하였다. 그 후 이를 80도 oven에서 경화시켰다. 그 후 경화된 지지체를 기판에서 메탄올을 이용하여 분리하여 지지막을 제조하였으며, 그 후 여기에 punch 를 이용하여 구멍을 뚫었다. 이때 구멍의 직경은 2 mm로 하여 관통홀에 해당하는 구멍을 뚫었다. 이러한 과정을 통해 관통홀이 형성된 지지막을 수득하였다. 그 후 이렇게 관통홀이 형성된 지지막에 플라즈마를 조사하였다. 플라즈마 조사 후, 관통홀이 형성된 지지막을 Alginate 2 % solution에 침지시켰다. 이때 이러한 Alginate solution과 PDMS의 접촉각(Contact angle)은 상온(20 ℃)에서 시간의 경과에 따라 조절하는 것이 가능한데, 본 실시예에서는 8 시간 동안 시간이 경과한 후에 접촉각을 55 ° 로 하였다. 이렇게 접촉각을 55 ° 로 하였으며, 이때의 최저 두께는 70 ㎛이고, 이러한 최저 두께가 유지되는 부분의 면적은 1.5 ㎜으로 하여 생체적합성 인공 기저막을 제작하였다. 한편 Alginate solution이 담긴 Bath에서 경화시켜 생체적합성 인공 기저막을 제작하였다.

[0076] 하기 도 1은 이러한 실시예 1의 제조과정을 나타낸 것이다. 구체적으로 도 1a는 실시예 1의 제조과정을 나타낸 것이며, 이중 (a)는 기판에 고분자 지지체를 코팅, (b)는 기판을 제거하여 지지막 형성, (c)는 지지막에 관통홀 형성, (d)는 기저막 형성을 나타낸 것이다. 또한 도 1b는 관통홀이 형성된 지지막의 단면(a) 및 관통홀 형성 후 관통홀이 형성되지 않은 부위의 단면(b)을 나타낸 것이다.

[0077] 또한 도 2는 본 실시예 1에 따른 생체적합성 인공 기저막이 일정한 두께의 평평한 막으로 구성되어 있음을 보여주는 그림이다. 도 3은 본 실시예 1에 따른 생체적합성 인공 기저막은 관통홀에 형성된 기저막과 지지막의 접촉각에 의해 최소 두께가 유지되는 부분의 면적이 결정되는데 이를 보여주는 그림 및 계산식이다. 도 4는 접촉각에 따라 기저막의 최소 두께가 유지되는 평평한 부분의 면적을 구한 것이다. 도 5는 지지막의 두께, 지지막에 뚫린 구멍의 크기, 기저막 형성액과 지지막의 접촉각을 이용하여 구한 이론적인 기저막의 최저두께를 나타낸 그림이다. 또한 하기 표 1은 rpm에 따른 지지막의 두께 변화를 나타낸 그림이다. 또한 표 2는 PDMS에 플라즈마 조사 후 시간에 따른 Alginate solution의 접촉각 변화를 나타낸 표이다. 또한 도 6은 관통홀의 직경에 따른 지지막의 두께를 나타낸 그림이다. 상기 경화된 기저막을 지지막에 부착된 형태로 medium에 담가 보관하였다. 기저막 원용액에 300 nm 형광 PS bead를 혼합하여 기저막을 제작한 후 Confocal 현미경을 이용하여 모양을 확인하였다. contact angle이 90 도 보다 적을 경우 두께는 얇아지며 범위는 10 ㎜에서 지지막의 두께까지 나타난다. 도 7 및 도 8은 Confocal로 촬영한 Alginate 기저막의 단면 및 2D 및 3D 사진이다(Hole diameter: 1-3 ㎜, alginate 1 %, PDMS membrane thickness: 150 ㎛).

표 1

RPM	Thickness (μm)	S.D.
150	442.44	4.438885
200	413.11	6.256848
250	227.11	4.670633
300	202.33	6.244998
350	185.67	1.154701
400	162.89	3.892062
450	149.22	2.457038
500	126.778	4.525647
550	105.89	4.194352
600	85.56	2.523959

[0078]

표 2

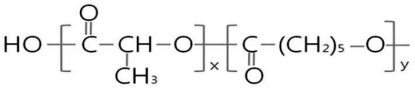
	1%	2%	3%
Pure PDMS	114.61	118.90	120.80
Plasma treatment	7.08	11.57	16.72
1h after Plasma tr.	10.30	10.86	12.06
3h after Plasma tr.	37.07	37.31	39.79
6h after Plasma tr.	37.83	43.76	75.45
12h after Plasma tr.	66.80	78.43	86.23
24h after Plasma tr.	71.49	78.47	90.61
10 min in oven after Plasma tr.	52.57	54.00	60.99
1h in oven after Plasma tr.	80.31	80.60	82.02
10min in acetone exposure after Plasma tr.	90.22	90.42	89.10
10min in oven and acetone exposure after Plasma tr.	57.44	57.96	58.09

[0079]

[0080] **실시예 2**

[0081] 상기 실시예 1의 방법을 이용하여 PLCL 기저막을 제작하였다. PLCL은 합성 폴리머로서 분자식은 하기 화학식 1과 같다. 상기 PLCL은 chloroform 용액에 dilution해서 사용하며, methanol에 의해 경화된다. PLCL/chloroform 용액의 경우 PDMS 지지막과 유사한 hydrophobic성질을 가지기 때문에 Contact angle값이 90도 이하이다. 즉, Plasma를 이용한 표면 성질 변화 없이 지지막의 사용이 가능하다. 농도와 분자량에 따른 PDMS에서 PLCL의 접촉각은 하기 표 3과 같다. 도 9는 PLCL 농도와 PDMS 지지막의 두께에 따른 membrane의 두께를 그린 그래프이다. 하기 표 4는 PLCL 농도와 지지막 구멍의 크기 및 PDMS 지지막의 두께에 따른 기저막의 두께를 나타낸 표이다. 위의 Alginate 기저막 제작방법과 동일하게 PLCL용액을 구멍에 채운 후 Methanol에 담가 경화시킨다. 도면 10, 11는 1 %의 PLCL을 사용하여 제작한 기저막의 단면 및 윗면 SEM 사진이다. 10 ㎛ 막의 두께가 제작되었으며 다공성 구조를 보인다.

화학식 1

[0082] 

[0083] [표 3]

	1% (Chloroform)	2%	3%
Low PLCL on PDMS	38.02 ± 4.13	52.86 ± 2.47	66.59 ± 3.96
High PLCL on PDMS	43.20 ± 2.55	56.80 ± 4.16	71.97 ±2.79

[0084]

[0085] [표 4]

Hole diameter	Concentration	PDMS membrane Thickness (0.1 mm)	PDMS membrane Thickness (0.15 mm)	PDMS membrane Thickness (0.2 mm)
2mm	Low PLCL 1 %	-	-	-
	2 %	-	0.014 μm	0.064 μm
	3 %	0.069 μm	0.123 μm	0.166 μm
	High PLCL 1 %	-	-	-
	2 %	0.003 μm	0.053 μm	0.103 μm
	3 %	0.084 μm	0.134 μm	0.184 μm
3 mm	Low PLCL 1 %	-	-	-
	2 %	-	-	-
	3 %	0.049 μm	0.099 μm	0.149 μm
	High PLCL 1 %	-	-	-
	2 %	-	0.004 μm	0.054 μm
	3 %	0.077 μm	0.127 μm	0.177 μm

[0086]

[0087] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

부호의 설명

[0088] 10. 기관

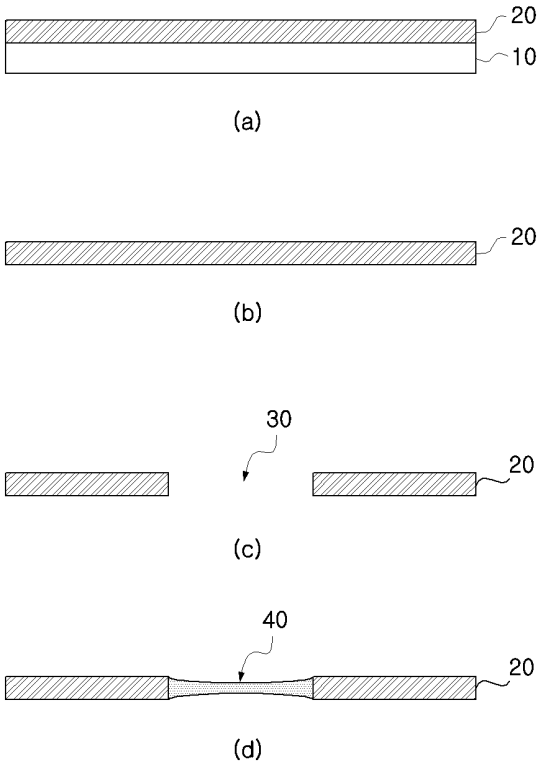
20. 고분자 지지체

30. 관통홀

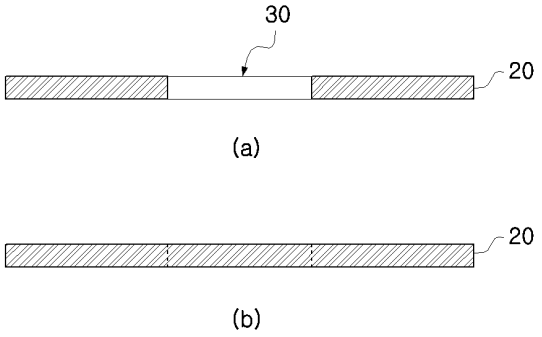
40. 기저막이 형성된 부위

도면

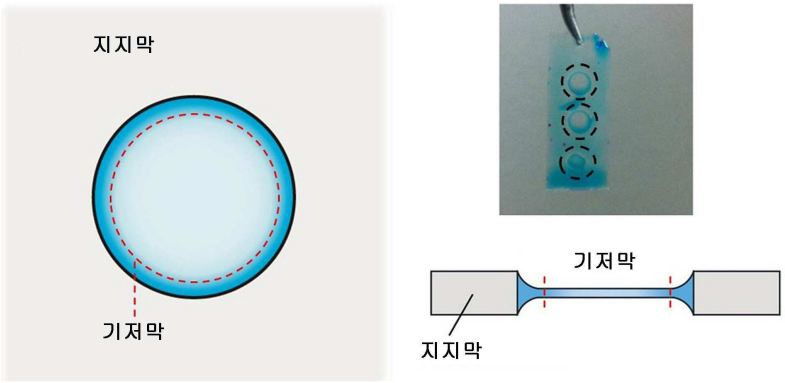
도면1a



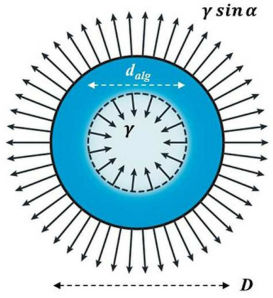
도면1b



도면2



도면3

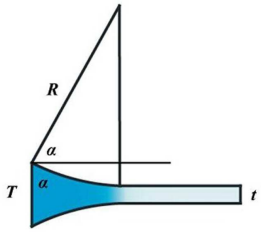


Diameter of flat area (평평한 면적)

$$\sum f_o = \gamma \sin\alpha \times \pi D \ (\theta < \alpha < \theta + 90)$$

$$\sum f_i = \gamma \times \pi d_{alg}$$

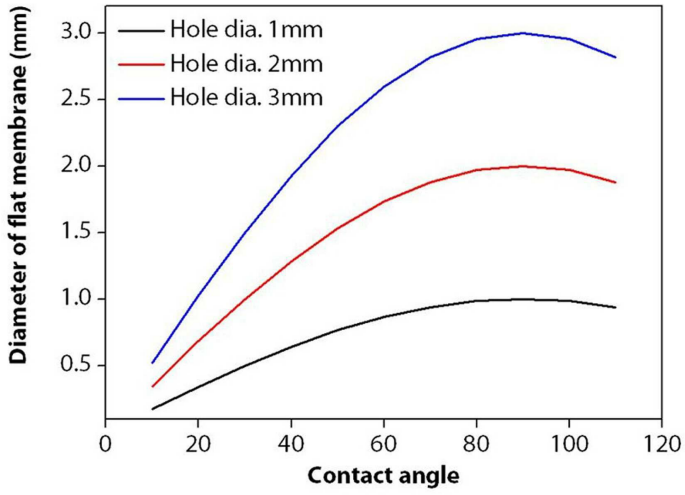
$$\therefore \boldsymbol{d_{alg} = D \sin\alpha}$$



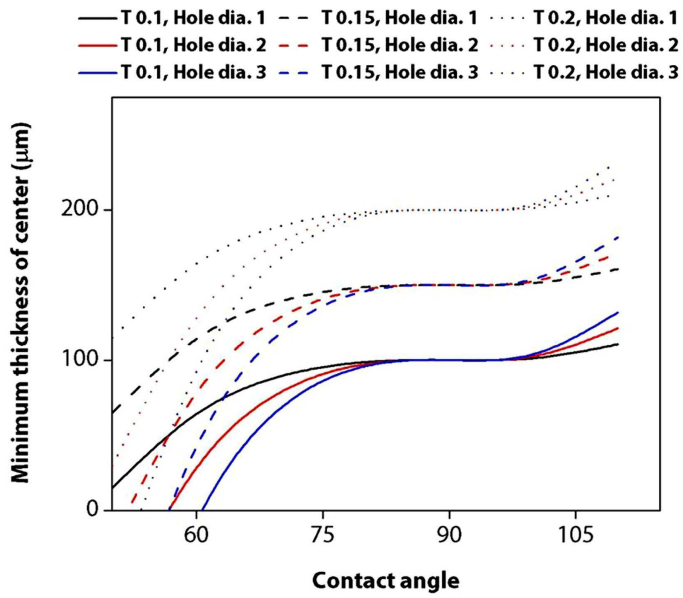
Minimum thickness of alginate membrane (최소 높이)

$$\therefore \boldsymbol{t = T - \frac{(D - d_{alg}) \cdot (1 - \sin\alpha)}{\cos\alpha}}$$

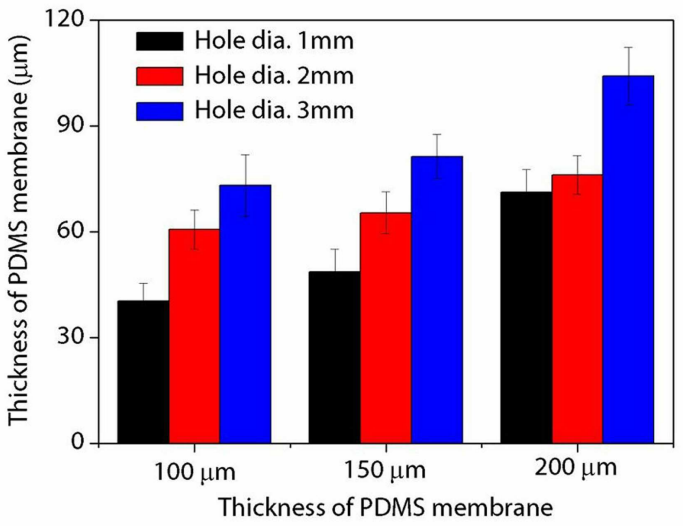
도면4



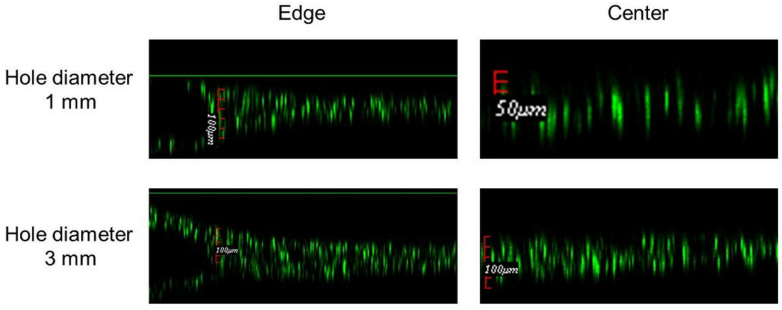
도면5


T 0.1, Hole dia. 1
T 0.15, Hole dia. 1
T 0.2, Hole dia. 1
T 0.1, Hole dia. 2
T 0.15, Hole dia. 2
T 0.2, Hole dia. 2
T 0.1, Hole dia. 3
T 0.15, Hole dia. 3
T 0.2, Hole dia. 3
Minimum thickness of center (μm)
200
100
0
60
75
90
105
Contact angle

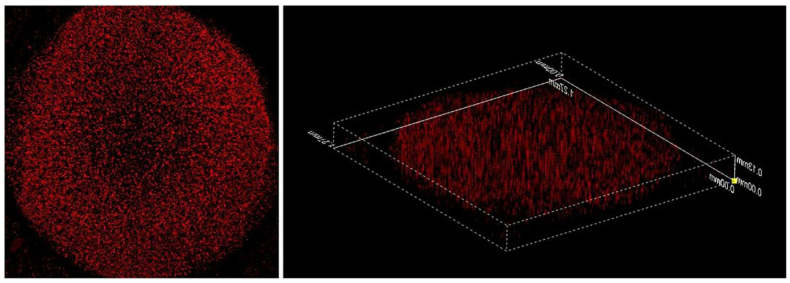
도면6


120
90
60
30
0
Thickness of PDMS membrane (μm)
Hole dia. 1mm
Hole dia. 2mm
Hole dia. 3mm
100 μm
150 μm
200 μm
Thickness of PDMS membrane

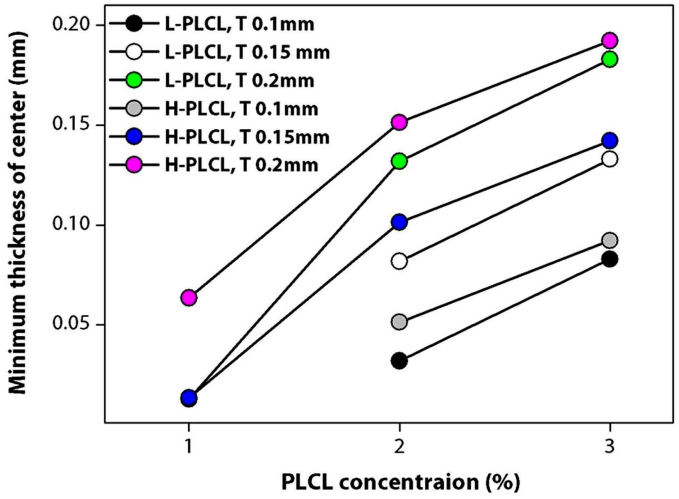
도면7


Edge
Center
Hole diameter
1 mm
50μm
Hole diameter
3 mm
100μm

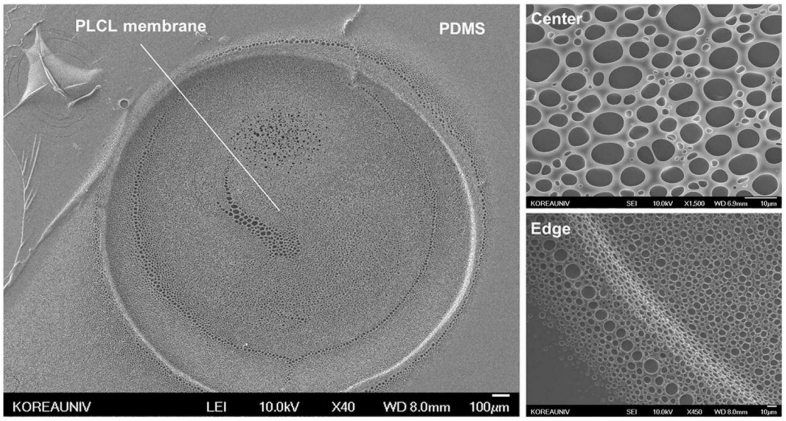
도면8



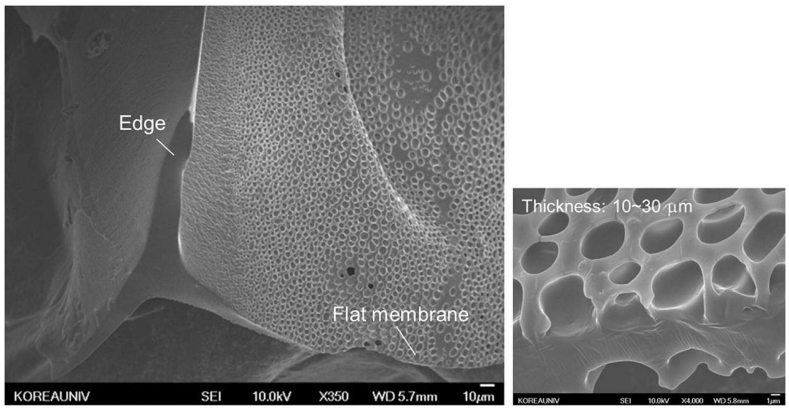
도면9


L-PLCL, T 0.1mm
L-PLCL, T 0.15 mm
L-PLCL, T 0.2mm
H-PLCL, T 0.1mm
H-PLCL, T 0.15mm
H-PLCL, T 0.2mm
Minimum thickness of center (mm)
0.20
0.15
0.10
0.05
1
2
3
PLCL concentraion (%)

도면10


PLCL membrane
PDMS
KOREAUNIV LEI 10.0kV X40 WD 8.0mm 100μm
Center
Edge

도면11


Edge
Flat membrane
KOREAUNIV SEI 10.0kV X350 WD 5.7mm 10μm
Thickness: 10~30 μm
KOREAUNIV SEI 10.0kV X4,000 WD 5.8mm 1μm