



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0129759
(43) 공개일자 2016년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) C12M 1/32 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
A61F 2/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0052198
(22) 출원일자 2016년04월28일
심사청구일자 2016년04월28일
(30) 우선권주장
1020150061625 2015년04월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천광역시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
정문희
경기도 안성시 서운면 상북산길 57 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

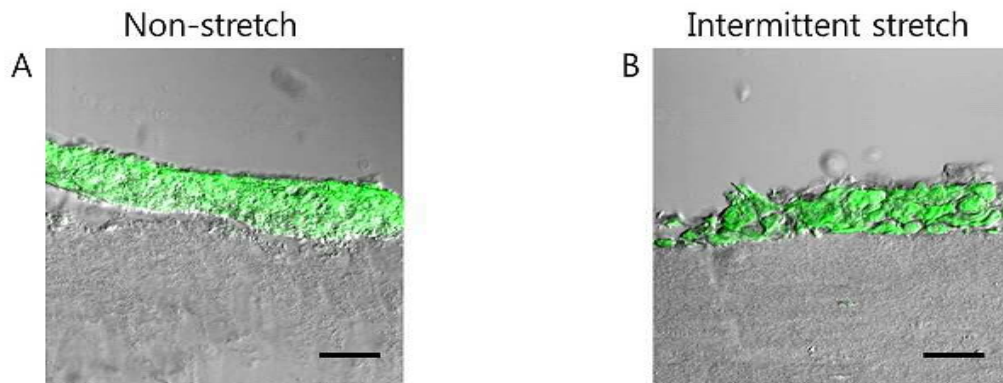
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 인공 피부 제조 장치 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 인공 피부 제조 장치 및 상기 장치를 이용한 인공 피부 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인공 피부 제조 장치를 이용 시, 다른 화학적 및 전기적 자극 없이 간단한 기계적 자극 만으로도 인공 피부를 쉽게 제작할 수 있다. 또한 본 발명의 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조된 인공 피부는 제제 침입도 수준이 높아, 피부 관련 화장품 및 신약 개발 테스트 모델 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61L 27/362 (2013.01)
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 35/00 (2013.01)
C12N 5/0625 (2013.01)
C12N 5/0626 (2013.01)
C12N 5/0629 (2013.01)
C12N 2533/30 (2013.01)
C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

정상명

서울특별시 강남구 논현로51길 25, 현대그린아파트
 동 304호 (도곡동, 현대그린아파트)

민슬기

인천광역시 계양구 계양문화로 142, 308동 2002호
 (용종동, 초정마을두산.쌍용아파트)

이후철

전라북도 전주시 덕진구 편운로 15-15 (동산동)

유순일

전라남도 순천시 중앙초등아랫길 28 (풍덕동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	50758-1
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양생명공학 기술개발
연구과제명	해양바이오폴리머 기반 동물실험 대체용 상피조직 개발
기 여 율	1/1
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2014.08.01 ~ 2015.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

상부가 개방된 몸체부; 및

상기 몸체부의 내부 공간을 분할하고, 상부면에 세포가 배양되는 격막을 포함하는 인공피부 제조 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 몸체부에 천공 형성되어 상기 몸체부의 내측면과 상기 격막의 상부면에 의해 형성되는 상부공간을 외부와 연통시키는 배지공급용 홀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부 제조 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 배지공급용 홀은 상기 몸체부의 내측방향을 향해 상승하는 형태로 형성되는 것을 특징으로 하는 인공피부 제조 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 몸체부의 하부를 막아 하부 공간을 생성하는 하부막을 더 포함하고,

상기 몸체부의 내측면, 상기 격막의 하부면 및 상기 하부막에 둘러싸여 형성되는 하부공간에는 액체가 충전되는 것을 특징으로 하는 인공피부 제조 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 액체의 충전은 상기 하부막에 홀을 생성하고 관을 삽입하여 주입하는 것을 특징으로 하는 인공피부 제조 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인공 피부 제조 장치는 PDMS(polydimethylsiloxane), 폴리에틸렌 (polyethylene) 및 폴리우레탄 (polyurethane)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 재질로 이루어진 것을 특징으로 하는 인공 피부 제조 장치.

청구항 7

(a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 인공 피부 제조 장치의 격막에 콜라겐 층을 형성하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하는 단계;

(c) 상기 (b) 단계의 섬유아세포 층에 피부 세포를 처리하여 피부 세포층을 형성하고 배양하는 단계; 및

(d) 상기 (c)단계의 배양된 피부 세포층에 자극을 주어 각질화를 유도하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (a) 단계의 격막에 나노 필터를 추가하는 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (c) 단계의 배양은 3일 내지 10일동안 수행하는 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 (c) 단계의 피부 세포는 케라틴 생성 세포(keratinocyte), 멜라닌 세포(melanocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans cell) 및 메르켈 세포(Merkels cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 (d) 단계의 자극은 8 내지 15일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 (d) 단계의 자극은 기계적 인장 자극인 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 기계적 인장 자극은 간헐적 자극인 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 (d) 단계의 자극은 몸체부의 하부를 막아 하부 공간을 생성하는 하부막에 둘러싸여 형성되는 하부공간에 액체가 충전되면서 가해지는 자극인 것을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

청구항 15

제7항에 있어서,

상기 피부는 유극층(spinous layer) 및 과립층(granular layer)로 이루어진 표피임을 특징으로 하는, 인공피부 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인공 피부 제조 장치 및 상기 장치를 이용한 인공 피부 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체 체표면 전체를 덮고 있는 가장 큰 장기로서 성인의 경우 그 면적이 약 1.2~2.3 m²에 이른다. 피부의 주 역할은 체액의 유실을 막고, 외부의 유해물질 및 미생물의 유입을 막으며, 물리적 자극, 방사선 및 자외선 등으로부터 우리 몸을 보호하는 기능을 수행하고 있다. 피부에는 모낭, 털, 땀샘, 피지선 등 여러 부속 기관을 보유하고 있어 보호막 기능 외에도 다양한 기능을 수행하고 있는 중요한 복합 기관이다. 피부는 상층부의 표피(epidermis), 표피층 하단부의 기저막(basement membrane) 및 진피(dermis)로 구성된다. 표피에 비해, 진피

의 두께는 부위에 따라 많은 차이가 있지만 표피의 약 3배로 알려져 있다

[0003] 표피 조직은 생화학적/형태학적 특성에 따라 구분된 4개의 세포층으로 구성되어 있는데, 즉 기저막에 접한 제일 하단부로부터 기저층(stratum basalis, basal cell layer), 유극층(stratum spinosum, spinous cell layer), 과립층(stratum granulosum, granular cell layer) 및 각질층(stratum corneum)으로 계층화되어 있어 피부 표면에는 최종 분화된 죽은 세포가 여러 겹으로 쌓여 보호막 기능을 수행하게 된다. 기저막은 제4형 콜라겐 격자(lattice)에 라미닌 및 여러 세포 외 간물질이 침착된 얇은 막 형태로 기저층의 세포가 부착하고 있으며 상처가 나면, 상기 기저막의 분해가 동반되어 기저층의 세포가 진피의 제1형 콜라겐과 접하게 된다. 진피는 크게 상층부의 섬유아세포(fibroblast)가 풍부하고 미세 혈관이 분포하는 유두층(papillary layer)과 두꺼운 콜라겐 섬유가 풍부한 세망 결합 조직(reticular connective tissue)으로 구성되어 있다. 모낭 및 여러 피부 부속 기관은 진피 깊숙이 위치하고 있어, 부분층 창상(partial thickness wound) 처럼 표피층이 소실된 경우에도 모낭에서부터 표피세포가 자라 나와서 재-상피화(re-epithelialization)를 유도하게 된다.

[0004] 인공 피부는 피부 기능의 일부를 대신할 수 있도록 인체에 적응시킨 인공 장기라 할 수 있으며, 임상학적으로 볼 때, 일시적으로 손상된 부위의 보호를 목적으로 하는 창상피복제(wound dressing) 및 환자 자신의 정상피부에서 채취한 섬유아세포 혹은 표피 세포를 in vitro에서 배양한 배양 피부(cultured skin equivalent)로 나눌 수 있다. 인공피부로 연구되고 있는 것 중에는 실리콘 가아제, 가교 폴리비닐알코올 스폰지, 특수직물(폴리아미드 섬유, 폴리에스테르 섬유, 폴리프로필렌 섬유, 레이온 섬유 등을 재료로 한 velour), 또 이와 같은 특수직물에 특정 단백질을 피복한 것, 실리콘 고무로 된 막, 피브린 막 및 셀룰로오스 막 등이 있으나 생체와의 거부반응, 기계적 성질 및 밀착성의 결여 등의 문제점으로 인공피부로서의 충분한 기능을 발휘하지 못하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 인공 피부를 효과적으로 제조할 수 있는 방법을 고안하던 중, 인공 피부 제조 장치(100)를 제작하고, 상기 장치를 이용하여 제조한 인공 피부는 각질화가 효과적으로 진행됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 인공피부 제조 장치를 제공하는 것이다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은 인공피부 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 상부가 개방된 몸체부; 및 상기 몸체부의 내부 공간을 분할하고, 상부면에 세포가 배양되는 격막을 포함하는 인공 피부 장치를 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 (a) 상기 인공 피부 제조 장치의 격막에 콜라겐 층을 형성하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 섬유아세포 층에 피부 세포를 처리하여 피부 세포층을 형성하고 배양하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 배양된 피부 세포층에 자극을 주어 각질화를 유도하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 인공 피부 제조 장치를 이용 시, 다른 화학적 및 전기적 자극 없이 간단한 기계적 자극 만으로도 인공 피부를 쉽게 제작할 수 있다. 또한 본 발명의 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조된 인공 피부는 체제 침입도 수준이 높아, 피부 관련 화장품 및 신약 개발 테스트 모델 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치의 평면도이다.

도 2는 도 1의 A-A' 단면도이다.

도 3은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치를 도 1의 B 방향에서 바라본 입면도이다.

도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치를 이용하여 세포에 인장자극을 가하는 것을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 인공 피부 제조 장치를 이용하는 방법을 나타낸 도이다.

도 6은 폴리카프로락톤(polycaprolactone)-나노 필터(PCL-NF)가 존재하지 않는 군(A) 및 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF)가 존재하는 군(B)에서 콜라겐 고정 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 간헐적 자극(intermittent stretch, IS) 및 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)에서 인공 피부의 각질화 분화 인자를 확인할 수 있는 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다(A는 7일 배양, B는 14일 배양한 결과임).

도 8은 자극을 주지 않은 군(NS) 및 간헐적 자극을 준 군(IS)에서 인공 피부의 단백질 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 자극을 주지 않은 군(NS)(A) 및 간헐적 자극을 준 군(IS)(B)에서 지질이 함유된 각질세포(stratum corneum) 형성 정도를 확인한 도이다.

도 10은 자극을 주지 않은 군(NS)(A, B) 및 간헐적 자극을 준 군(IS)(C, D)에서 인공 피부 표면의 각질층 형성 정도를 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM)으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 자극을 주지 않은 군(NS)(A) 및 간헐적 자극을 준 군(IS)(B)에서 FITC-라벨된 나노입자 침투를 통하여, 유극층 (spinous layer)와 과립층 (granular layer) 형성 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 상부가 개방된 몸체부; 및 상기 몸체부의 내부 공간을 분할하고, 상부면에 세포가 배양되는 격막을 포함하는 인공 피부 장치를 제공한다.
- [0013] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치의 평면도이고, 도 2는 도 1의 A-A' 단면도이며, 도 3은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치를 도 1의 B방향에서 바라본 입면도이고, 도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치를 이용하여 세포에 인장자극을 가하는 것을 도시한 도면이다.
- [0014] 이하, 도 1 내지 도 4를 참고하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치(100)를 설명한다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치(100)는 몸체부(110), 격막(120), 용기(130) 및 배지공급용 홀(140)을 포함한다.
- [0016] 상기 몸체부(110)는 상부와 하부가 개방된 형태로 형성된다. 도 1에서 몸체부(110)는 원통형으로 형성되어 있으나, 몸체부(110)의 형태는 이에 한정되지 않고 상부와 하부가 개방되고 내부에 공간을 형성할 수 있는 것이라면 어떠한 형상으로 형성되어도 무방하다.
- [0017] 상기 격막(120)은 몸체부(110)의 내측에 형성되어 몸체부(110)의 내부 공간을 상부공간과 하부공간으로 분할한다. 이러한 격막(120)의 상부면에는 세포가 배양되는데, 격막(120)은 안정적인 세포의 배양을 위해 수평하게 배치되고, 세포가 배양되는 상부면은 평편하게 형성되는 것이 바람직하다.
- [0018] 용기(130)는 내부에 몸체부(110)가 수용되는 공간을 구비한다.
- [0019] 몸체부(110)의 하단은 용기(130)의 바닥에 밀실하게 부착되며, 몸체부(110)의 하부공간에는 외부로부터 용기(130)를 관통하여 유체가 유입된다.
- [0020] 이와 같이 몸체부(110)의 하부공간으로 유입된 유체는 격막(120)을 상부방향으로 밀어올림으로써 격막(120)의 표면이 확장되고, 이러한 격막(120)의 표면 상부면에 나노 필터를 부착하고, 상기 나노 필터에 부착된 세포들을 공간변형에 의한 자극을 받게 되는 것이다.
- [0021] 이때, 몸체부(110)의 하부공간에 유입된 유체는 다시 외부로 배출되며, 이와 같은 유입과 배출의 과정을 반복하여 배양되는 세포에 지속적인 자극을 가할 수 있고, 상기 자극에 따라 배지공급용 홀(140)을 격막(120)이 막아 더 이상의 유체 유입을 막을 수 있다.
- [0022] 구체적으로 도시하지는 않았으나, 몸체부(110)의 하부공간에 유체를 유입 및 배출시키기 위해서 유체를 펌핑하는 펌핑수단(미도시)을 구비할 수 있으며, 유체의 출입을 위해 용기(130)에는 몸체부(110)의 하부공간과 연통되는 홀을 형성할 수 있다.

- [0023] 이와 같이 형성되는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치(100)는 격막(120)의 상부면에 나노 필터를 깔고 난 후 콜라겐 층을 형성하고, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 피부 세포를 처리하여 각질층을 형성하여, 인공 피부를 제조할 수 있다. 이때, 상기 격막(120)에 기계적인 인장자극을 전달하여 최종 처리하는 피부 세포의 각질화(분화)를 유도할 수 있다. 이는 도 4에 도시된 바와 같이 격막(120)의 상부면에 세포를 배양하는 중에 몸체부(110)의 하부공간에 유체를 유입시키면 유입된 액체가 격막(120)을 밀어내어 격막(120)이 상부방향으로 굴곡지게 되고, 격막(120)의 상부면은 표면적이 팽창하게 되면서 배양되는 세포에 인장자극을 가하게 된다.
- [0024] 이를 위해 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 인공피부 제조 장치(100)는 신축성을 갖는 막을 격막(120)으로 가질 수 있으며, 세포배양에 적합한 PDMS(polydimethylsiloxane), 폴리에틸렌 (polyethylene) 및 폴리우레탄 (polyurethane)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 재질로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 PDMS이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "PDMS"는 극히 낮은 유리전이 온도(Transition Temperature, Tg), 고온 저항성, 내산화성, 내화학성, 투습성 및 소수성의 특징을 갖는 폴리머 결합체를 의미한다.
- [0026] 즉 본 발명의 인공피부 제조 장치는 pore가 존재하는 멤브레인 및 이의 pore를 통해 배지 공급을 달성하는 air-lift 방식의 trans well과는 달리, pore가 없어 공기 유체의 누수가 없으며, 기계적 인장을 가할 수 있는 격막을 구성으로 하고, 배지공급을 용기와 몸체부 사이의 배지공급 홀(140)을 통하여 달성함으로써 자극 기능 및 air-lift 를 동시에 달성하여 각질화를 효과적으로 달성할 수 있다.
- [0027] 상기 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 측면에 천공형성되어 몸체부(110)의 내측면과 격막(120)의 상부면에 의해 형성되는 상부공간을 외부와 연통시키는 역할을 한다. 이때, 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 내측방향을 향해 상승하는 형태로 형성한다. 다시 말해, 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 내측에 구비되는 배지공급용 홀(140)의 출구가 몸체부(110)의 외측에 구비되는 배지공급용 홀(140)의 입구보다 높은 곳에 배치되도록 형성한다. 이렇게 함으로써 세포배양을 위해 몸체부(110)의 상부를 폐쇄시킨 상태에서 배지공급용 홀(140)을 통해 의도하지 않은 외부의 이물질이 몸체부(110)의 내부로 유입되는 것을 방지할 수 있게 된다.
- [0028] 또한, 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 원주방향으로 1개 내지 11개를 형성하는 것이 바람직하다.
- [0029] 용기(130)와 몸체부(110) 사이의 공간에는 세포 배양에 필요한 물질이 수용되고 이러한 물질은 배지공급용 홀(140)을 통해 상부공간으로 유입되는데, 배지공급용 홀(140)의 수가 11개를 초과하는 경우 유입되는 물질의 양이 과다하여 세포 배양에 불리한 영향을 주는 문제가 있다.
- [0031] 또한 본 발명은 (a) 상기 인공 피부 제조 장치의 격막에 콜라겐 층을 형성하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 섬유아세포 층에 피부 세포를 처리하여 피부 세포층을 형성하고 배양하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 배양된 피부 세포층에 자극을 주어 각질화를 유도하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "배양"은 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 원하는 대상을 생육 또는 영양 공급시키는 것을 의미한다.
- [0033] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산

망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0034] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0035] 본 발명의 목적상, 상기 (a) 내지 (c) 단계의 각 콜라겐 층에 배지공급용 홀(140)을 통하여 영양을 공급하거나, 몸체부(110)에 직접적으로 배지를 공급하여 배양한다.

[0036] 상기 (a) 단계의 격막에 나노 필터를 추가할 수 있고, 바람직하게는 폴리카프로락톤(polycaprolactone) 재질이다. 상기 (c) 단계의 배양은 3일 내지 10일 동안 배양하며, 바람직하게는 3일 내지 5일 동안 배양하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0037] 상기 (c) 단계의 피부 세포는 케라틴 생성 세포(keratinocyte), 멜라닌 세포(melanocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans cell) 및 메르켈 세포(Merkels cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종이며, 바람직하게는 케라틴 생성 세포이고, 더욱 바람직하게는 인간 유래 HaCaT 세포이다.

[0038] 본 발명에 있어서, "HaCaT 세포"는 케라티노사이트(Keratinocyte)의 셀라인(cell line)으로서, 각질 형성 세포이다. 상기 세포는 분열이 쉽게 되고 가격이 저렴한 장점이 있으며, 피부와 관련된 다양한 실험에서 많이 이용되고 있다.

[0039] 상기 (d) 단계의 자극은 8 내지 15일 동안 수행하고 바람직하게는 9 내지 12일이고, 상기 (d) 단계의 자극은 기계적 인장 자극이고, 바람직하게는 간헐적 자극이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 상기 (d) 단계의 자극은 몸체부의 하부를 막아 하부 공간을 생성하는 하부막에 둘러싸여 형성되는 하부공간에 액체가 충전되면서 가해지는 자극이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 상기 피부는 상기 피부는 유극층(spinous layer) 및 과립층(granular layer)로 이루어진 표피이나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명에서 용어 "유극층"은 중층편평상피의 기저층과 과립층 사이에 존재하는 층이다. 유극층의 세포는 서로 가지모양의 돌기(세포간교)로 연락하고 있는 것처럼 보이기 때문에 유극세포라 불린다. 전자현미경에 의해 인접한 세포 사이에는 원형질연락이 없고, 세포간교가 발달한 데스모솜이라는 것이 밝혀졌다.

[0043] 본 발명에서 용어 "과립층"은 포유류의 표피(각질화한 중층편평상피)에 존재하는 층의 하나이다. 유극층과 투명층 사이에 있으며 케라트히아린 과립을 포함한다.

[0045] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예 1. 인공 피부 제조 장치 제작 및 인공 피부 제조 방법

[0048] 본 발명의 도 1 내지 4에 나타낸 바와 같이, PDMS 재질로 형성된 본 발명의 인공피부 제조 장치(100)는 몸체부(110), 격막(120), 용기(130) 및 배지공급용 홀(140)을 포함하도록 제작하였다.

[0049] 구체적으로, 몸체부(110)는 상부가 개방된 형태로 형성되게 하였으며, 격막(120)은 몸체부(110)의 내측에 형성되어 몸체부(110)의 내부 공간을 상부공간과 하부공간으로 분할하였다. 이러한 격막(120)의 상부면에 본 발명의 인공 피부 층을 제조하였다.

[0050] 용기(130)의 내부에는 몸체부(110)가 수용되고, 몸체부(110)의 하단은 용기(130)에 밀설하게 부착시켰다. 몸체부(110)의 내측면, 격막(120)의 하부면 및 용기(130)에 둘러싸여 형성되는 하부공간에는 액체가 충전되도록 제작하였다. 구체적으로, 격막에 폴리카프로락톤(polycaprolactone) 재질의 나노 필터(PCL-NF)를 깔고, 상기 나노 필터 위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 포함하는 혼합물을 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 각질층을 형성하여, 인공 피부가 생성되

도록 제작하였다. 이 후, 도 4 및 도 5의 A에 나타난 바와 같이, 상기 HaCaT 세포 처리 층에 배지(칼슘과 혈청 등의 보충물(Ham's F12 배지, L-글루타민, 히드로코르티손, 0-스포틸에탄올아민, 아테닌, 프로게스테론, CaCl_2 , 트리오오드티로닌, 신생송아지 혈청을 포함))를 일정량을 더 충전하였다.

[0051] 몸체부(110)와 용기(130) 사이의 공간에 상기 배지와 동일한 성분의 배지를 충전하여 몸체부(110)에 충전한 배지와 높이를 맞추어, 배지공급용 홀(140)을 통하여 몸체부(110)로 배지의 유입을 통하여 콜라겐 층에 영양을 공급하도록 하였다. 상기 과정을 4일간 수행하여 배양하였다. 또한, 도 4 및 도 5의 B 및 C에 나타난 바와 같이, 상기 배지의 양을 줄이고, 격막(120)의 상부면에 세포를 배양하는 중에 몸체부(110)의 하부공간에 액체를 유입시키면, 충전된 액체가 격막(120)을 밀어내면서 10일 동안 30분을 주기로 하여 간헐적 자극을 주도록 하였다. 상기 간헐적 자극으로 격막(120)이 상부방향으로 굴곡지게 되고, 격막(120)의 상부면은 표면적이 팽창하게 되면서 공기 중에 노출되면서 최종 처리하는 HaCaT 세포의 각질화(분화)를 유도할 수 있다.

[0052] 또한, 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 측면에 천공 형성되어 몸체부(110)의 내측면과 격막(120)의 상부면에 의해 형성되는 상부공간을 외부와 연통시키는 역할을 하도록 제작하였다. 이때, 배지공급용 홀(140)은 몸체부(110)의 내측방향을 향해 상승하는 형태로 형성하며 구체적으로, 배지공급용 홀(140)은 총 11개이고, 몸체부(110)의 내측에 구비되는 배지공급용 홀(140)의 출구가 몸체부(110)의 외측에 구비되는 배지공급용 홀(140)의 입구보다 높은 곳에 배치되도록 제작하여, 의도하지 않은 외부 이물질이 몸체부(110)의 내부로 유입되는 것을 방지할 수 있도록 하였다.

[0054] 실시예 2. 인공 피부 제조 장치의 나노 필터 유무에 따른 콜라겐 고정 정도 확인

[0055] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)를 이용하여, 격막(120) 상의 폴리카프로락톤 나노 필터(PCL-NF) 유무에 따른 진피층인 섬유아세포층 배양의 콜라겐 고정 정도를 확인하였다.

[0056] 구체적으로, 격막(120) 상의 폴리카프로락톤 나노 필터(PCL-NF)가 존재하는 군과, 존재하지 않는 각 군에 콜라겐 및 섬유아세포 혼합물을 1일간 배양하였다. 이 후 상기 각 군의 콜라겐 상태를 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0057] 도 6에 나타난 바와 같이, 격막(120) 상의 폴리카프로락톤 나노 필터(PCL-NF)가 존재하는 군에서는 콜라겐 및 섬유아세포 혼합물의 매트릭스(matrix)가 격막(120)에 고정되어 수축하지 않음을 확인하였다. 그러나, 폴리카프로락톤 나노 필터(PCL-NF)가 존재하지 않는 군에서는 콜라겐 및 섬유아세포 혼합물의 매트릭스(matrix)가 격막(120)에 고정되지 않고, 수축됨을 확인하였다.

[0058] 따라서, 인공 피부 제조 시 폴리카프로락톤 나노 필터(PCL-NF)가 콜라겐 및 섬유아세포 혼합물의 매트릭스의 고정에 효과적임을 확인하였다.

[0060] 실시예 3. 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조한 인공 피부의 분화인자 확인

[0061] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100) 및 제조 방법을 이용하고 자극 유무에 따라 제조된 인공 피부의 각질화 분화 인자를 확인할 수 있는 mRNA의 발현 수준을 확인하였다.

[0062] 구체적으로, 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)의 격막(120)에 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF)를 깔고, 상기 나노 필터위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 최종적으로 각질층을 형성하도록 간헐적 자극(intermittent stretch, IS)을 주었다. 또한, 이의 대조군으로 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)을 두어, 각 군을 7일 또는 14일 동안 배양한 후, HaCaT 세포의 분화 인자를 각질 마커 발현에 대한 qRT-PCR을 수행하였다. 상기 qRT-PCR은 QuantiTect Reverse Transcription kit로 시료를 준비하였고, Rotor-Gene Q PCR 프로그램을 사용하여 변성 조건 95도에서 5분, 45회 반복 조건으로 수행하였다. 다음의 마커들은 HaCaT 세포가 분화할 때 발현 되는 분화 인자이며, keratin 1(K1)은 표피층의 가장 아래 기저층(basal layer)에서 발현되어 세포의 분화 정도를 나타내는 지표이고, 인보루크린(involucrin, inv) 및 필라그린(filaggrin)은 유극층(spinous) 및 과립층(granule layer)에서 발현이 되면서 세포의 분화 정도를 나타내는 지표이다. 로리크린(loricrin, Lor)은 표피층의 가장 위(cornified layer)에서 발현됨을 나타내는 지표이다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0063] 도 7의 A에 나타난 바와 같이, 7일 동안 인공 피부 제조 장치(100)를 이용하여 배양하고 간헐적 자극을 준

HaCaT 세포의 분화 인자 중 하나인 케라틴 1(keratin 1, K1)은 대조군에 비해 낮은 발현률이 나타나고, 인보루크린(involutrin, inv)은 증가함을 확인하였다. 또한, 로리크린(loricrin, Lor)의 경우, 간헐적 자극(IS)을 준 군이 비자극 군(NS)보다 낮은 발현을 나타냄을 확인하여, 최종 분화는 아직 이루어지지 않았음을 확인하였다.

[0064] 또한, 간헐적 자극(IS)을 준 군의 기저층(basal layer)에서 발현되는 마커는 줄고 spinous granular에 존재하는 마커의 발현은 증가함을 확인하여, 각질화 과정이 진행됨을 확인하였다.

[0065] 또한, 도 7의 B에 나타난 바와 같이, 14일 동안 인공 피부 제조 장치(100)를 이용하여 배양하고 간헐적 자극을 준 HaCaT 세포의 분화 인자 중 K1은 낮고 인보루크린(involutrin, inv) 및 로리크린(loricrin, Lor)의 발현은 증가함을 확인하여, HaCaT의 분열과정이 전이(transition)되면서 각질화가 진행됨을 확인하였다. 또한, 로리크린(loricrin, Lor)의 발현량이 더 높은 것을 보아 최종 분화가 진행되었음을 확인하였다.

[0067] 실시예 4. 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조한 인공 피부의 단백질 발현 확인

[0068] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100) 및 제조 방법을 이용하고 간헐적 자극 유무에 따라 제조된 인공 피부의 단백질 발현을 확인하였다.

[0069] 구체적으로, 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)의 격막(120)에 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF) 나노 필터를 깔고, 상기 나노 필터위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 최종적으로 각질층을 형성하도록 간헐적 자극(intermittent stretch, IS)을 주었다. 또한, 이의 대조군으로 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)을 두어, 각 군을 14일 동안 배양한 후, 제조된 인공 피부의 단백질 발현 정도를 확인하였다. 분화 마커로서 붉은 색으로 필라그린(filaggrin) 및 로리크린(loricrin)을 사용하였으며, 푸른색으로 DAPI로 핵을 염색시켰다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0070] 도 8에 나타난 바와 같이, 자극을 주지 않은 군(NS)에서는 핵의 분포도로 표피(epidermis)가 형성됨을 확인하였으나, 각각의 단백질 발현은 미비함을 확인하였다. 그러나, 간헐적 자극을 준 군(IS)에서는 필라그린(filaggrin) 및 로리크린(loricrin)의 발현이 강함을 확인하여, 표피 두께(epidermal thickness)가 더 두껍게 형성되었으며, 단백질의 발현도 높게 나타남을 확인하였다.

[0072] 실시예 5. 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조한 인공 피부의 지질 형성을 통한 각질화 확인

[0073] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100) 및 제조 방법을 이용하고 간헐적 자극 유무에 따라 제조된 인공 피부의 지질 형성을 통하여 인공 피부의 각질화를 확인하였다.

[0074] 구체적으로, 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)의 격막(120)에 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF)를 깔고, 상기 나노 필터위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 최종적으로 각질층을 형성하도록 간헐적 자극(intermittent stretch, IS)을 주었다. 또한, 이의 대조군으로 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)을 두어, 각 군을 14일 동안 배양한 후, 제조된 인공 피부 표피의 지질 함량 정도를 Nile red 염색으로 확인하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0075] 도 9에 나타난 바와 같이, 자극을 주지 않은 군(NS)의 인공 피부 표피에서 지질이 국소적으로 형성됨을 확인하였으나, 전체적으로 낮은 함량이 보임을 확인하였다. 반면, 간헐적 자극을 준 군(IS)에서는 30 μ m의 범위로 인공 피부 표피에 높은 지질의 함량이 나타남을 확인하였다.

[0077] 실시예 6. 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조한 인공 피부 각질층 형성 확인

[0078] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100) 및 제조 방법을 이용하고 간헐적 자극 유무에 따라 제조된 인공 피부의 각질층 형성 정도를 확인하였다.

[0079] 구체적으로, 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)의 격막(120)에 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF)를 깔고, 상기 나노 필터위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 최종적으로 각질층을 형성하도록 간헐적 자극

(intermittent stretch, IS)을 주었다. 또한, 이의 대조군으로 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)을 두어, 각 군을 14일 동안 배양한 후 각질층 형성 정도를 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0080] 도 10에 나타낸 바와 같이, 자극을 주지 않은 군(NS)의 인공 피부 표피에서 표피의 각질층이 고르게 형성되지 않음을 나타내는 콜라겐섬유(화살표)가 대부분 관찰되고(A), 콜라겐에 각질층 형성이 제대로 이루어지지 않음(B)을 확인하였다. 반면, 간헐적 자극을 준 군(IS)에서는 콜라겐 섬유가 적게 관찰되고(C) 콜라겐을 덮고 있는 각질층이 대부분 관찰되어(D), 간헐적 자극을 주면 인공 피부의 각질층 형성에 효과적임을 확인하였다.

[0082] 실시예 7. 인공 피부 제조 장치를 이용하여 제조한 인공 피부의 FITC-라벨된 나노입자의 침투 정도

[0083] 상기 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100) 및 제조 방법을 이용하고 간헐적 자극 유무에 따라 FITC-라벨된 나노입자의 침투 정도를 통하여 피부의 제제 침입도 수준 및 피부의 내피 형태를 확인하였다.

[0084] 구체적으로, 실시예 1의 인공 피부 제조 장치(100)의 격막(120)에 폴리카프로락톤-나노 필터(PCL-NF)를 깔고, 상기 나노 필터위에 콜라겐 층을 형성하였다. 또한, 상기 콜라겐 층에 섬유아세포를 처리하여 섬유아세포 층을 형성하였으며, 상기 섬유아세포 층에 HaCaT 세포를 처리하여 최종적으로 각질층을 형성하도록 간헐적 자극(intermittent stretch, IS)을 주었다. 또한, 이의 대조군으로 자극을 주지 않은 군(non-stretch, NS)을 두어, 각 군을 14일 동안 배양한 후, 180 nm로 제형된 FITC-라벨된 나노입자(FITC-labeled nanoparticle nanoparticle)을 처리하였다. 상기 FITC-라벨된 나노입자는 제제의 침입도 수준(penetration level)뿐만 아니라 피부의 내피 형태를 확인 할 수 있어, 약물에 대한 효능 또한 확인할 수 있다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

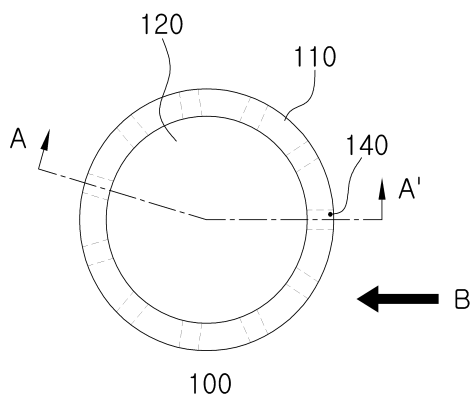
[0085] 도 11에 나타낸 바와 같이, 자극을 주지 않은 군(NS)의 인공 피부 표피에는 180 nm로 제형된 FITC-라벨된 나노입자가 피부(dermis)층까지 침투하지 못하지만, 표피를 구성한 세포의 모양을 확인하였다. 반면, 간헐적 자극을 준 군(IS)에서는 180 nm로 제형된 FITC-라벨된 나노입자가 표피까지 침투되어, 약물에 대한 침입도 수준이 높을 것이고 그 효능 또한 효과적일 것으로 확인하였다. 또한, 간헐적 자극을 준 군의 인공 피부는 유극층(spinous layer) 및 과립층(granular layer)로 구성된 표피임을 확인하였다.

부호의 설명

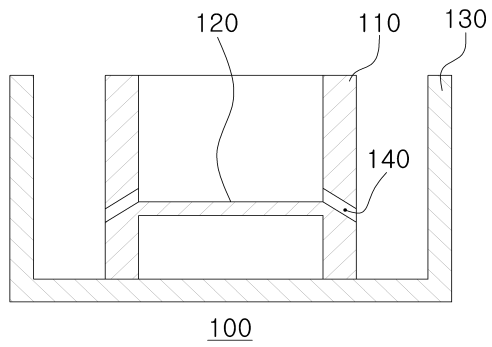
[0086] 100: 인공 피부 제조 장치
110: 몸체부 120: 격막
130: 용기 140: 배지공급용 홀

도면

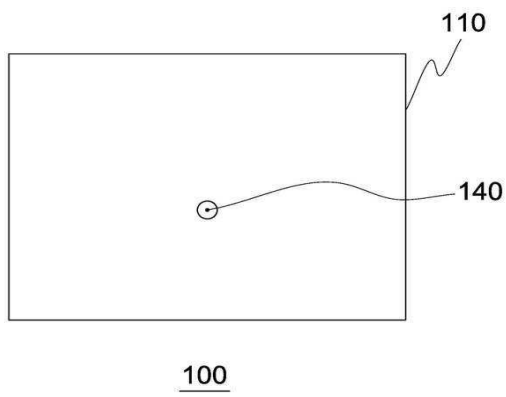
도면1



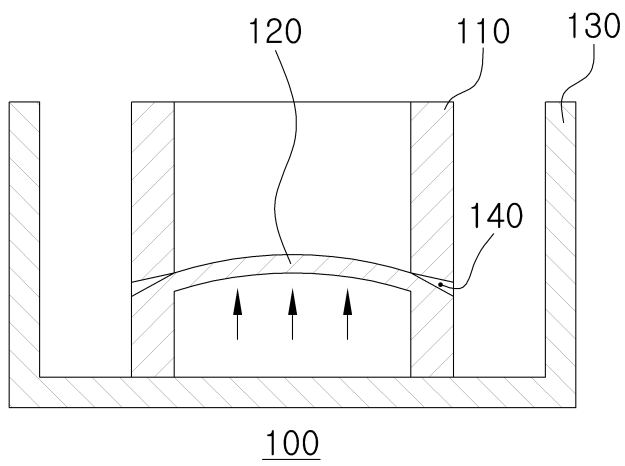
도면2



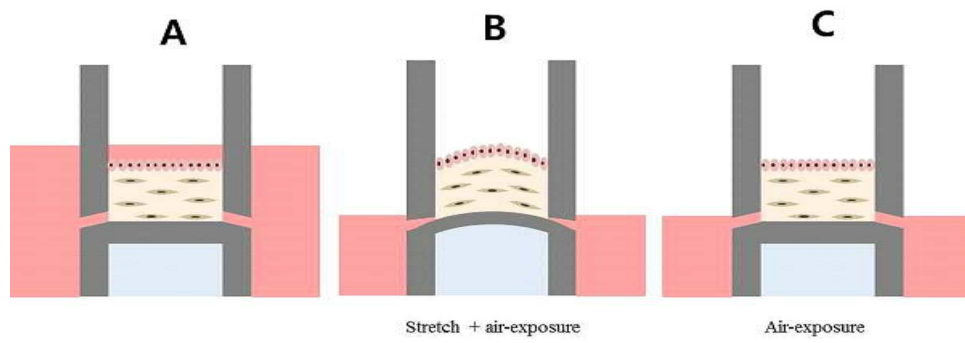
도면3



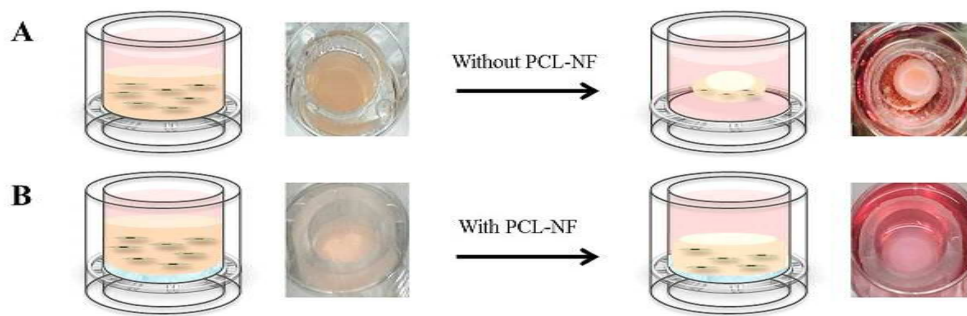
도면4



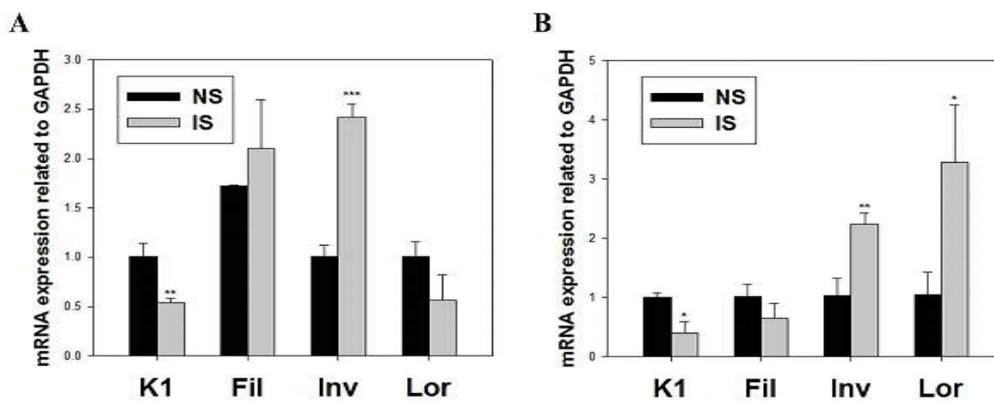
도면5



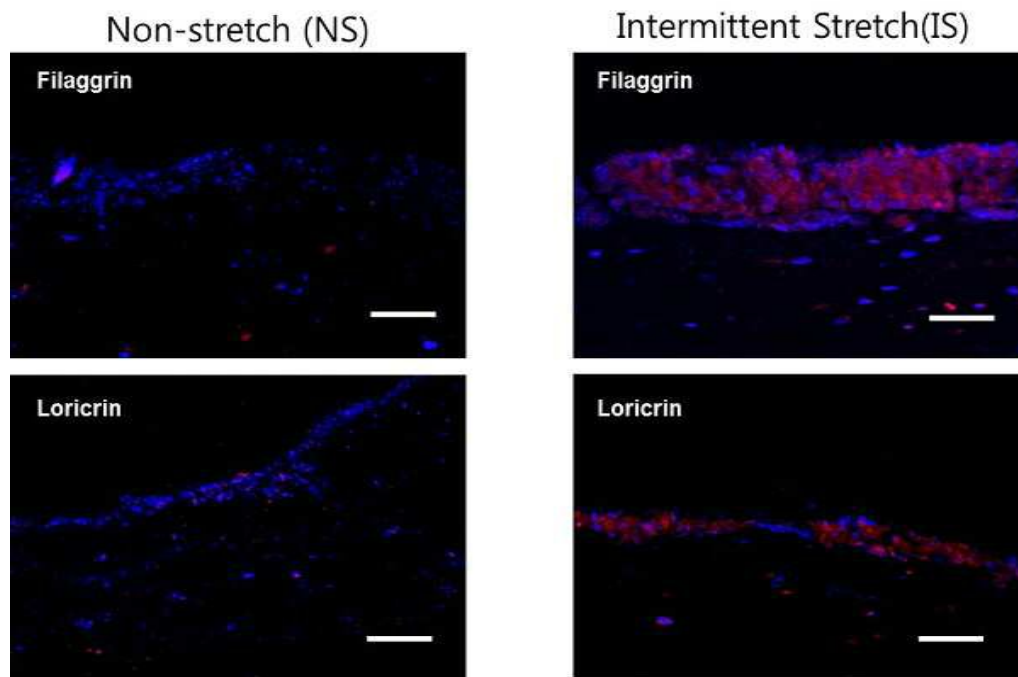
도면6



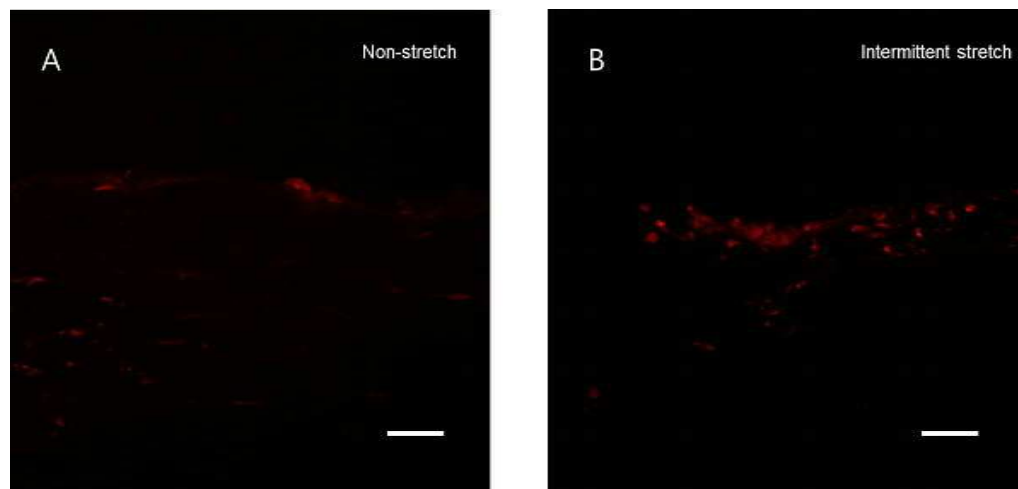
도면7



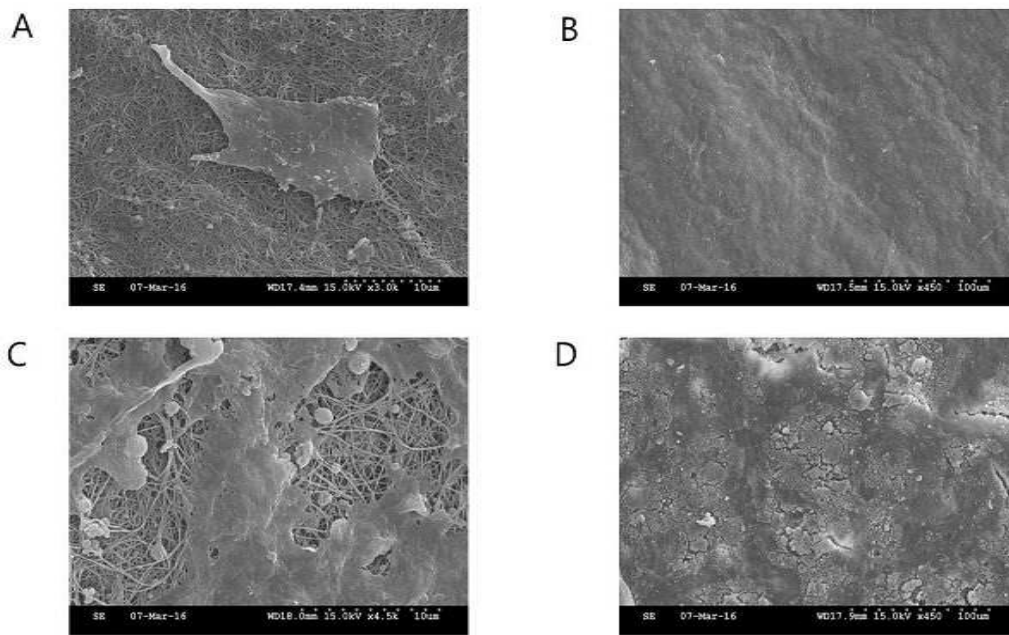
도면8



도면9



도면10



도면11

