(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0046958
(43) 공개일자 2023년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12M 1/12* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0698 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0106664
(22) 출원일자 2022년08월25일
심사청구일자 2022년08월25일
(30) 우선권주장
1020210129433 2021년09월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정석
서울특별시 중구 퇴계로 72, 1601호
원지희
서울특별시 도봉구 도봉로117길 26-5, 501호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

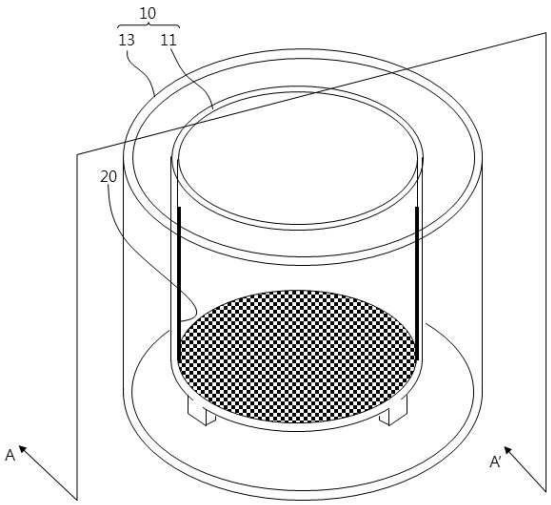
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **인공피부모델 배양방법**

(57) 요 약

본 발명은 인공피부 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 인공피부 제조방법은 내벽 및 다공성 바닥면으로 둘러싸인 내부 챔버(11), 및 내부 챔버(11)와 이격되어 내부 챔버(11)를 감싸는 외부 챔버(13)를 포함하는 배양용기(10)를 이용하는 인공피부 제조방법에 있어서, 내벽을 접착물질로 코팅하여 접착층(20)을 형성하는 단계, 및 접착층(20)이 형성된 배양용기(10)에서 인공피부를 배양하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12M 25/06 (2013.01)
C12M 25/14 (2013.01)
C12N 5/0629 (2013.01)
C12N 5/0656 (2013.01)
C12N 2533/20 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

내벽 및 다공성 바닥면으로 둘러싸인 내부 챔버, 및 상기 내부 챔버와 이격되어 상기 내부 챔버를 감싸는 외부 챔버를 포함하는 배양용기를 이용하는 인공피부 제조방법에 있어서,

(a) 상기 내벽을 접착물질을 코팅하여 접착층을 형성하는 단계; 및

(b) 상기 접착층이 형성된 상기 배양용기에서 상기 인공피부를 배양하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 접착물질은,

도파민 및 폴리-디-라이신 중 어느 하나 또는 그 혼합물인 인공피부 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 (a) 단계는,

분말 상태의 상기 접착물질을 용매에 용해시켜 코팅용액을 제조하는 단계; 및

상기 코팅용액을 상기 내부 챔버에 채우고 반응시켜, 상기 접착층을 형성하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 접착물질은 0.1 ~ 20㎎/㎖의 농도의 상기 도파민인 인공피부 제조방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 용매는 pH 8.0 ~ 9.0의 Tris-HCl인 인공피부 제조방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서,

상기 접착물질은 0.1 ~ 50㎎/㎖의 농도의 상기 폴리-디-라이신인 인공피부 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계는,

1형 콜라겐(Type I Collagen) 용액을 포함하는 스캐폴드 용액을 상기 내부 챔버에 주입하고, 겔화시켜 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질을 생성하는 단계; 및

상기 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질에 표피 각질형성세포를 접종하는 단계;를 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 스캐폴드 용액은, 진피 섬유아세포를 더 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 스캐폴드 용액은, 기저막 성분 물질을 더 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 표피 각질형성세포의 접종은, 상기 표피 각질형성세포를 포함하는 제1 배양액을, 상기 내부 챔버에 공급하여 이루어지는 인공피부 제조방법.

청구항 11

청구항 7에 있어서,

상기 표피 각질형성세포가 접종된 후, 상기 표피 각질형성세포가 부착되도록, 상기 내부 챔버 및 상기 외부 챔버에 제1 배양액을 공급하는 단계;를 더 포함하는 인공피부 제조방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

상기 제1 배양액을 제거하고, 상기 표피 각질형성세포가 분화되도록, 상기 외부 챔버에 제2 배양액을 공급하는 단계;를 더 포함하는 인공피부 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 진피층과 표피층으로 구성된 인공피부모델 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상층부에 대한 액상 시료의 처리를 통해 장벽기능을 평가할 수 있도록 수축하지 않는 인공피부모델을 배양하고, 인공피부모델의 배양에서 발생하는 모델의 변형을 방지하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 피부는 신체를 감싸고 있는 넓은 기관이며, 최외곽에서부터 크게 나누어 표피층과 진피층 등 두 개의 층으로 구성되어 있다. 표피층은 적층구조를 이루고 있는 표피 각질형성세포(Epidermal Keratinocyte)가 대부분을 차지하고 있으며, 진피층은 콜라겐 섬유와 탄력섬유 등의 기질단백질 내부에 진피 섬유아세포가 포함된 기질을 기반으로 혈관, 신경, 피지샘 등이 존재한다. 피부에서는 표피층이 갖는 피부 장벽기능이 가장 중요하며, 피부 장벽기능은 외부로부터의 오염원, 자극원의 침투를 차단하여 신체를 보호하고, 신체 내부의 수분증발을 막아줌으로써 체액의 손실을 방지한다.

[0004] 하기 선행기술문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이, 인공피부(Reconstructed human Skin, RhS)는 바닥면이 다공질의 박막(Porous Membrane)으로 구성된 특수한 배양용기(Filter Membrane Insert)를 이용하여 진피 섬유아세포(Dermal Fibroblast)를 포함하는 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질로 구성된 진피모사체(Dermis Equivalent)를 위치시키고, 그 위를 표피세포(Epidermal Keratinocyte)로 덮은 뒤, 상층부를 공기에 노출시켜 표피세포의 분화를 유도하여 피부 장벽기능을 갖도록 성숙한 표피모사체(Reconstructed Epidermis)를 구현함으로써 제작된 피부모사체(Skin Equivalent)이다. 이러한 인공피부모델은 화상, 외상 등의 피부 손상부위를 대체하는데 이용되거나, 피부 생리연구, 특정 물질의 피부에 대한 자극 평가 또는 기능개선 효능 평가 등에서 활용되고 있다.

[0005] 그러나 인공피부모델은 배양과정에서 진피모사체 내부에 포함된 진피 섬유아세포로부터 기인하여 지속적으로 작용하는 당김힘과 표피 각질형성세포의 분화과정에서 발생하여 한시적으로 작용하는 수축힘에 의해, 인공피부모델이 배양용기의 내벽으로부터 탈착되는 과정을 거쳐 점차적으로 부피가 감소하는 형태의 수축변형(Contraction)이 일어나 배양용기의 바닥면의 일부가 노출된다. 이와 같이 수축변형된 인공피부모델을 이용해 상층부를 통한 액상 물질 처리 실험을 수행할 경우, 대부분의 액상 물질은 노출된 다공질 박막을 통해 배양액에 섞여 들어가 진피층에 직접적으로 전달되기 때문에, 피부의 가장 중요한 기능적 특성인 표피층의 장벽기능이 무시된 형태의 실험만 가능하다는 한계점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0003060 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 인공피부모델 제작시 인공피부모델의 수축변형의 시발점이 되는 인공피부모델의 탈착현상을 방지하기 위한 배양용기 내벽 코팅방법을 제공하고, 이를 이용하여 수축변형 없이 진피모사체 기질 상부에서 피부장벽기능이 갖춰진 표피층이 구현된 인공피부모델을 제조하여, 상층부를 통한 액상 물질 처리 및 전달 실험에서 피부장벽기능이 반영될 수 있도록 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법은 내벽 및 다공성 바닥면으로 둘러싸인 내부 챔버, 및 상기 내부 챔버와 이격되어 상기 내부 챔버를 감싸는 외부 챔버를 포함하는 배양용기를 이용하는 인공피부 제조방법에 있어서, (a) 상기 내벽을 접착물질을 코팅하여 접착층을 형성하는 단계; 및 (b) 상기 접착층이 형성된 상기 배양용기에서 상기 인공피부를 배양하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 접착물질은, 도파민(Dopamine) 및 폴리-디-라이신(Poly-D-lysine) 중 어느 하나 또는 그 혼합물일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계는, 분말 상태의 상기 접착물질을 용매에 용해시켜 코팅용액을 제조하는 단계; 및 상기 코팅용액을 상기 내부 챔버에 채우고 반응시켜, 상기 접착

층을 형성하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 접착물질은 0.1 ~ 20㎎/㎖의 농도의 상기 도파민일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 용매는 pH 8.0 ~ 9.0의 Tris-HCl일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 접착물질은 0.1 ~ 50㎎/㎖의 농도의 폴리-디-라이신일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계는, 1형 콜라겐(Type I Collagen) 용액을 포함하는 스캐폴드 용액을 상기 내부 챔버에 주입하고, 겔화시켜 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질을 생성하는 단계; 및 상기 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질에 표피 각질형성세포를 접종하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 스캐폴드 용액은, 진피 섬유아세포를 더 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 스캐폴드 용액은, 기저막 성분 물질을 더 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 표피 각질형성세포의 접종은, 상기 표피 각질형성세포를 포함하는 제1 배양액을, 상기 내부 챔버에 공급하여 이루어질 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 표피 각질형성세포가 접종된 후, 상기 표피 각질형성세포가 부착되도록, 상기 내부 챔버 및 상기 외부 챔버에 제1 배양액을 공급하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 인공피부 제조방법에 있어서, 상기 제1 배양액을 제거하고, 상기 표피 각질형성세포가 분화되도록, 상기 외부 챔버에 제2 배양액을 공급하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0024] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르면, 인공피부를 배양하는 배양용기의 내부를 강한 접착력을 발휘하는 생체유래 성분인 도파민 등을 코팅하여, 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질이 배양용기 내벽으로부터 탈착되는 문제를 해결하면서도, 기존의 인공피부모델이 가진 생체유사도를 유지할 수 있게 한다. 이로써 수축변형 없이 진피모사체 기질의 상층부에서 피부 장벽기능을 갖도록 성숙한 표피모사체가 구현된 인공피부모델을 제작할 수 있다. 이렇게 제작된 인공피부모델은 인공피부모델의 상층부로부터 처리된 액상 물질을 피부 장벽기능을 갖는 표피층을 통해서 인공피부모델 내부로 전달시킬 수 있다.

[0027] 상층부를 통한 액상 계면활성제의 처리 및 계면활성제에 의한 피부조직의 세포사멸 정도를 평가하는 실험방법은 가장 정확하고 직접적인 인공피부모델의 피부 장벽기능 평가 방법으로, 이것이 가능하기 위해서는 피부 장벽기능을 갖도록 성숙한 표피층이 구현되는 동안 인공피부모델의 수축 변형이 일어나지 않아야 한다는 선행조건이 있다. 기존의 인공피부모델의 배양방법은 이러한 조건을 만족시키지 못하기 때문에, 장벽기능 평가에 있어 어려움이 있었으나, 본 발명을 통하면 인공피부모델의 장벽기능 평가실험이 가능해 진다.

[0028] 특정 성분의 피부에 대한 독성 평가 및 기능개선 효능이 발휘되기 위해서는 해당 성분을 포함하는 시료가 피부 최외곽층에 도포되고 피부 장벽을 통과하여 내부로 전달되어야 한다는 선행조건이 있다. 따라서 해당 성분이 피부의 내부로 잘 전달되기 위한 제형기술에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 그러나 기존의 인공피부모델은 상층부에 시료를 처리할 경우, 수축변형에 의해 노출된 다공질 박막 부위를 통해 배양액에 섞여 들어가 인공피

부모델 내부로 직접적으로 전달되어 표피의 피부 장벽기능이 반영되지 않는다는 한계점이 있다. 본 발명을 이용하면, 피부장벽을 투과하고 피부 내부로 전달되는 효율에 대한 연구가 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명에 따른 인공피부 제조방법에 사용되는 배양용기의 사시도이다.

도 2는 도 1의 A-A' 라인에 따른 단면도이다.

도 3은 본 발명에 따른 인공피부 제조방법의 순서도이다.

도 4a는 비교예 1에 따라 완성된 진피모사체를 촬영한 사진 이미지이다.

도 4b는 실시예 1에 따라 완성된 진피모사체를 촬영한 사진 이미지이다.

도 5a는 비교예 1에 따라 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 상부에서 표피 각질형성세포를 분화시켜 표피층을 구현한 사진 이미지이다.

도 5b는 실시예 1에 따라 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 상부에서 표피 각질형성세포를 분화시켜 표피층을 구현한 사진 이미지이다.

도 6a는 실시예 1에 따라 제작된 인공피부의 이미지이다.

도 6b는 실시예 1에 따라 제작된 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E) staining에 의해 염색한 광학현미경 이미지이다.

도 7은 실시예 1에 따라 제작한 인공피부의 상층부에 1%의 Triton X-100 용액 200㎕을 도포하고 2시간, 5시간, 8시간, 20시간 동안 반응시킨 뒤, 도포하지 않은 무처리군과 함께 1mg/㎖ MTT용액과 3시간 동안 반응시켜 생존한 세포와의 반응을 통해 Thiazolyl Blue Formazan Dye을 생성하게 하여 그 모습을 촬영한 사진 이미지, 및 각각의 처리시간에 따른 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E) staining에 의해 염색한 광학현미경 이미지이다.

도 8은 형성된 Formazan Dye를 2㎖의 2-Propanol으로 용해한 뒤 각각을 96-Well Plate의 Well 하나에 200㎕씩 2개를 담아 Plate Reader에서 570nm 파장의 빛에 대한 흡광도를 측정하여 비교함으로써, 상대적인 세포생존율을 측정하여 기록한 그래프와 생존율이 50%가 되는데 걸리는 시간인 ET_{50}(Effective Time 50)을 도출한 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0032] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 인공피부 제조방법에 사용되는 배양용기(10)의 사시도이고, 도 2는 도 1의 A-A' 라인에 따른 단면도이며, 도 3은 본 발명에 따른 인공피부 제조방법의 순서도이다.

[0035] 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 인공피부 제조방법은 내벽 및 다공성 바닥면으로 둘러싸인 내부 챔버(11), 및 내부 챔버(11)와 이격되어 내부 챔버(11)를 감싸는 외부 챔버(13)를 포함하는 배양용기(10)를 이용하는 인공피부 제조방법에 있어서, 내벽을 접착물질로 코팅하여 접착층(20)을 형성하는 단계, 및 접착층(20)이 형성된 배양용기(10)에서 인공피부를 배양하는 단계를 포함한다.

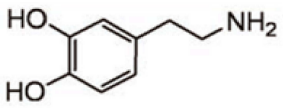
[0037] 본 발명은 인공피부를 배양하여 인공피부를 제조하는 방법에 관한 것이다. 여기서, 인공피부라 함은 좁게는 진피 구성물질인 1형 콜라겐을 기반으로 하고 진피 섬유아세포를 포함하는 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 상부에서 표피층을 구현한 것을 의미하며, 실제 피부와 유사한 구조적 기능적 특성을 나타내는 고분자 복합체라면 모두 포함하는 최광의로 해석되어야 한다. 일례로, 상기 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질에 진피 섬유아세포가 포함되지 않거나, 거기에 기저막 구성 성분이 포함된 경우에도 인공피부에 해당할 수 있다.

[0038] 이러한 인공피부는 배양용기(10)에서 배양되고, 그 배양용기(10)는 내부 챔버(11)를 외부 챔버(13)가 감싸는 이중 구조로 형성될 수 있다. 여기서, 내부 챔버(11)는 내벽 및 바닥면에 의해 내부 공간이 형성되는데, 바닥면은 다수의 관통홀이 형성된 다공성 박막으로 이루어질 수 있고, 그 내부 공간에서 인공피부가 배양된다. 외부 챔버(13)는 외벽 및 바닥면으로, 내부 챔버(11)와 이격되어 그 내부 챔버(11)를 감싸도록 형성된다.

[0039] 이러한 배양용기(10)를 이용하여 인공피부를 제조함에 있어서, 본 발명은 접착층 형성단계, 및 인공피부 배양단계를 포함한다.

[0041] 접착층 형성단계는 내부 챔버(11)의 내벽을 접착물질로 코팅하는 공정으로, 이에 의해 그 내벽에 접착층(20)이 형성된다. 접착물질로는 도파민 및 폴리-디-라이신 중 어느 하나 또는 그 혼합물을 사용할 수 있다. 도파민은 홍합(*Mytilus edulis*)이 바위에 부착되기 위해 분비하는 태(Plaque)가 발휘하는 강한 접착력을 내는 주요 성분인 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(DOPA)와 amine(lysine) group으로 구성된 물질로서, 아래 [화학식 1]과 같은 구조로 이루어진다.

[0042] [화학식 1]

[0043] 

[0044] 일례로, 분말 상태의 접착물질을 소정의 용매에 용해시켜 코팅용액을 제조한 다음에, 그 코팅용액을 내부 챔버(11)에 채우고 일정 시간 반응시킴으로써, 내부 챔버(11)의 내벽의 표면에 접착층(20)을 형성할 수 있다. 보다 구체적으로는, 분말 형태의 도파민을 pH 8.0 ~ 9.0의 Tris-HCl에 0.1 ~ 20㎎/㎖ 농도로 녹여 코팅용액을 내부 챔버(11)에 채우고, 1 ~ 3시간 동안 반응시켜 접착층(20)을 형성할 수 있다. 다만, 용매가 반드시 Tris-HCl에 한정되거나, 도파민의 농도가 상기 농도에 한정되거나, 반응 시간이 상기 시간에 한정되어야 하는 것은 아니다. 또한, 0.1 ~ 50㎎/㎖의 농도의 폴리-디-라이신 혼합액을 이용하여 내부 챔버(11)의 내벽 표면을 코팅할 수 있다.

[0045] 이러한 접착층(20)은 후술하는 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)과 내부 챔버(11)의 내벽 사이에 접착력을 생성시킨다.

[0047] 인공피부 배양단계는 접착층(20)이 형성된 배양용기(10)에서 인공피부를 배양하는 공정이다. 여기서, 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)을 생성하고, 그 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)에 표피 각질형성세포(40)를 접종한다.

[0048] 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)을 생성하기 위해서는, 1형 콜라겐(Type I Collagen) 용액을 포함하는 스캐폴드 용액을 내부 챔버(11)에 주입하고 겔화시킨다. 스캐폴드 용액은 1형 콜라겐을 2.0 ~ 6.0㎎/㎖ 농도로 포함하도록 제조할 수 있으나, 그 농도가 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 스캐폴드 용액은 진피 섬유아세포를 더 포함함으로써, 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)이 진피모사체로 제작될 수 있다. 여기서, 진피 섬유아세포 수는 1.0×10^5 ~ 3.0×10^5cells/㎖일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 스캐폴드 용액은 기저막 성분물질을 더 포함할 수 있다. 기저막 성분물질은 라미닌, 4형 콜라겐, 및 7형 콜라겐으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 그 농도는 0.1 ~ 50㎎/㎖일 수 있는데, 그 성분물질의 종류 및 농도가 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질(30)이 생성되면, 그 상부에 표피 각질형성세포(40)를 접종한다. 이때, 표피 각질형성세포(40)의 수는 100,000 ~ 400,000cells/cm^2일 수 있으나, 그 수는 조절 가능하다. 여기서, 내부 챔버

(11)에는 표피 각질형성세포(40)를 포함하는 제1 배양액(50)을, 외부 챔버(13)에는 표피 각질형성세포(40)를 포함하지 않는 제1 배양액(50)을 공급한 다음에, 일정 시간(예를 들면, 12 ~ 24시간) 방치하여 표피 각질형성세포(40)를 부착시킬 수 있다. 또는, 표피 각질형성세포(40)를 접종한 후, 표피 각질형성세포(40)가 부착되도록, 내부 챔버(11) 및 외부 챔버(13)에 제1 배양액(50)을 더 공급할 수 있다.

[0051] 이렇게 표피 각질형성세포(40)가 도입되면, 그 세포의 분화를 유도하여 표피층을 형성할 수 있다. 인공피부에서 피부 장벽기능이 갖춰진 표피층을 구현하기 위해서는, 표피 각질형성세포(40)가 도입된 배양용기(10) 내부의 배양액을 제거하여 공기에 노출시킴으로써, 표피 각질형성세포(40)의 분화를 유도할 수 있다. 일례로, 배양용기(10) 내의 상기 제1 배양액(50)을 제거하고, 외부 챔버(13)에 표피 각질형성세포(40)의 분화를 위한 제2 배양액을 공급할 수 있다. 이후 주기적으로 배양액을 교체하면서 10일간 분화를 유도할 수 있다. 다만, 분화를 유도하는 기간이 반드시 10일에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 이하에서는 구체적인 실시예와 실험예를 들어 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0055] 실시예 1: 내벽이 도파민으로 코팅된 배양용기 제작

[0056] 본 발명의 실시예로서, 12㎜ 외경을 가지며 다공질 박막을 바닥면으로 하는 배양용기(Filter Membrane Insert)의 내부에 분말 상태의 도파민을 Tris-HCl pH 8.5 용매에 2.0㎎/㎖의 농도로 녹인 용액을 넣고 2시간 동안 상온에서 반응시켜 내벽을 코팅한 배양용기를 준비하였다.

[0058] 비교예 1

[0059] 본 발명의 비교예로서, 아무런 처리도 하지 않은 같은 종류의 배양용기를 준비하였다.

[0061] 실험예 1: 진피모사체의 배양

[0062] 상기 제조된 실시예 1, 비교예 1을 이용하여 진피모사체를 하기의 방법에 따라 각각 배양하였다. 이때 제조되는 진피모사체는 진피 섬유아세포(Normal Human Dermal Fibroblasts, LONZA)를 포함하는 1형 콜라겐 기반의 3차원 스캐폴드를 이용하여 형성하였다.

[0063] 먼저, 1X PBS(Phosphate Buffered Saline), pH 7.6 용액 기반의 1형 콜라겐 용액을 만들기 위해 Type I Collagen(Corning)을 10X PBS, 1.0M NaOH, DDW(Distilled Deionized Water), 진피 섬유아세포를 포함하는 세포 용액을 적정비율로 혼합하여 2.0㎎/㎖의 1형 콜라겐과 3.0×10^{5}cells/㎖의 진피 섬유아세포를 갖는 콜라겐-섬유아세포 혼합용액을 제조하였다.

[0064] 상기 용액을 실시예 1과 비교예 2에 150㎕를 넣고 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 30분간 보관하여 겔화시켰다.

[0065] 인공피부 배양용기를 챔버 내부에 위치시킨 다음, 챔버 내부에 배양액(Fibroblast Growth Medium-2, LONZA)을 공급하여 3차원으로 11일간 배양한다.

[0066] 상기와 같이 진피모사체를 배양하는 동안 진피층의 수축 정도를 관찰하였고, 최종적으로 완성된 진피모사체의 모습을 촬영하여 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 도 4a는 비교예 1에 따라 완성된 진피모사체를 촬영한 사진 이미지이고, 도 4b는 실시예 1에 따라 완성된 진피모사체를 촬영한 사진 이미지이다.

[0067] 그 결과, 도 4a와 같이 아무런 처리를 하지 않은 배양용기인 비교예 1의 경우 진피모사체에 내재된 진피 섬유아세포의 당김힘에 의해 진피모사체가 배양용기 내벽으로부터 탈착되어 수축하였음을 확인할 수 있다. 이에 반해, 도 4b를 참고로, 본 발명에 따른 실시예 1의 도파민으로 내벽을 코팅한 배양용기는 진피모사체의 기질에 해당하는 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드와 배양용기 내벽 사이의 강한 접착력에 의해, 진피모사체가 배양용기 내벽으로부터 탈착되지 않았고, 결과적으로 진피모사체의 수축도 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

[0069] 실험예 2: 표피모사체의 배양

[0070] 상기 제조된 실시예 1, 비교예 1을 이용하여 표피모사체를 하기의 방법에 따라 각각 배양하였다. 이때 제조되는 표피모사체는 진피 섬유아세포를 포함하지 않는 1형 콜라겐 기반의 3차원 스캐폴드 기질(Acellular Dermal Matrix) 상부에서 표피 각질형성세포를 배양하고 분화를 유도함으로써, 피부장벽기능이 갖춰진 표피층을 구현하여 제작하였다.

[0071] 먼저, 1X PBS, pH 7.6 용액 기반의 1형 콜라겐 용액을 만들기 위해 Type I Collagen(Corning)을 10X PBS, 1.0M NaOH, DDW를 적정비율로 혼합하여 2.0mg/㎖ 내지 6.0mg/㎖의 1형 콜라겐 용액을 제조하였으며, 각각의 콜라겐 용액에 기저막 구성 성분이 1.0mg/㎖의 농도로 추가된 용액도 제조하였다.

[0072] 상기 용액들을 실시예 1과 비교예 1에 150㎕를 넣고 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 30분간 보관하여 겔화시켰다.

[0073] 상기와 같이 형성된 진피 섬유아세포를 포함하지 않는 1형 콜라겐 기반의 3차원 스캐폴드 기질 위에 각질형성세포(Normal Human Epidermal Keratinocytes, LONZA)를 250,000cells/cm^2 로 심고, 배양용기의 내부와 외부 챔버에 배양액(Keratinocyte Growth Medium-GOLD, LONZA)을 넣고 하루 밤 동안 부착시켰다. 이후 배양용기 내부의 배양액을 제거하고, 외부의 챔버에 표피층 형성을 위한 배양액을 넣어 각질형성세포의 분화를 유도하였다. 이후 매일 배양액을 교체해 주면서 10일간 분화를 유도하여 표피층을 생성시켰다.

[0074] 상기와 같이 표피모사체를 배양하는 동안 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질의 변형 정도를 관찰하였고, 6일이 지난 뒤의 모습을 촬영하여 도 5a 및 도 5b에 나타내었다. 도 5a는 비교예 1에 따라 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 상부에서 표피 각질형성세포를 분화시켜 표피층을 구현한 사진 이미지이고, 도 5b는 실시예 1에 따라 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 상부에서 표피 각질형성세포를 분화시켜 표피층을 구현한 사진 이미지이다.

[0075] 그 결과, 도 5a와 같이 아무런 처리를 하지 않은 배양용기인 비교예 1의 경우 표피형성세포가 분화과정에서 갖는 이동성으로부터 기인한 수축힘에 의해 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질이 배양용기 내벽으로부터 탈착되어 변형이 일어났음을 확인할 수 있다. 이에 반해, 도 5b를 참고로, 본 발명에 따른 실시예 1의 도파민으로 내벽을 코팅한 배양용기는 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드와 배양용기 내벽 사이의 강한 접착력에 의해, 기질이 배양용기 내벽으로부터 탈착되지 않았고, 결과적으로 변형이 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

[0077] 실험예 3: 인공피부의 배양

[0078] 상기 제조된 실시예 1을 이용하여 인공피부를 하기의 방법에 따라 각각 배양하였다. 이때 제조되는 인공피부는 진피모사체 상부에서 표피 각질형성세포를 배양하고 분화를 유도함으로써, 피부장벽기능이 갖춰진 표피층을 구현하여 제작하였다.

[0079] 먼저, 1X PBS(Phosphate Buffered Saline), pH 7.6 용액 기반의 1형 콜라겐 용액을 만들기 위해 Type I Collagen(Corning)을 10X PBS, 1.0M NaOH, DDW(Distilled Deionized Water), 진피 섬유아세포를 포함하는 세포용액을 적정비율로 혼합하여 6.0mg/㎖의 1형 콜라겐과 1.0×10^5cells/㎖의 진피 섬유아세포를 포함하는 콜라겐-섬유아세포 혼합용액을 제조하고, 각각의 혼합용액에 기저막 구성 성분이 1.0mg/㎖의 농도로 추가된 혼합용액도 제조하였다.

[0080] 상기 용액들을 실시예 1에 150㎕를 넣고 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 30분간 보관하여 겔화시켰다.

[0081] 상기와 같이 형성된 진피모사체 상부에 각질형성세포(Normal Human Epidermal Keratinocytes, LONZA)를 250,000cells/cm^2 로 심고, 배양용기의 내부와 외부 챔버에 배양액(Keratinocyte Growth Medium-GOLD, LONZA)을 넣고 하루 밤 동안 부착시켰다. 이후 배양용기 내부의 배양액을 제거하고, 외부의 챔버에는 표피층 형성을 위한 배양액을 넣어 각질형성세포의 분화를 유도하였다. 이후 매일 배양액을 교체해 주면서 10일간 분화를 유도하여 표피층을 생성시켰다.

[0082] 상기와 같이 배양되어 최종적으로 완성된 인공피부를 촬영한 것과 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E) staining에 의해 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었다. 도 6a는 실시예 1에 따라 제작된 인공피부의 이미지이고, 도 6b는 실시예 1에 따라 제작된 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E)

staining에 의해 염색한 광학현미경 이미지이다.

[0083] 그 결과, 도 6a와 같이 본 발명에 따른 실시예 1의 도파민으로 내벽을 코팅한 배양용기는 1형 콜라겐 기반의 3차원 하이드로겔 스캐폴드와 배양용기 내벽 사이의 강한 접착력에 의해, 진피모사체에 내재된 진피 섬유아세포의 당김힘이나 표피형성세포가 분화과정에서 갖는 이동성으로부터 기인한 수축힘으로 인해 기질이 배양용기 내벽으로부터 탈착되는 현상이 나타나지 않았고, 결과적으로 수축변형이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 도 6b와 같이 실시예 1에서 제작된 인공피부는 조직학적으로 인체피부와 매우 유사함을 확인할 수 있었다.

[0085] 실험예 4: 인공피부를 이용한 액상 계면활성제에 대한 피부 장벽기능 평가

[0086] 본 발명에 의해 제작된 인공피부의 피부 장벽기능을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에 해당하는 도파민으로 내벽을 코팅한 배양용기에서 제작된 인공피부를 이용하여 피부장벽기능을 평가하였다. 피부장벽기능의 평가는 OECD Test Guideline 439에서 Performance Standard로 제시하는 Barrier Evaluation 방법 중 하나인 1% Triton X-100의 처리시간에 따른 무처리군에 대한 상대적인 세포생존율을 측정하여, 생존율이 50%가 되는데 걸리는 시간인 ET_{50}(Effective Time 50%)를 도출하는 방법으로 평가하였다.

[0087] 상기 실시예 1을 이용하여 제작한 인공피부의 상층부에 1%의 Triton X-100 용액 200㎕을 도포하고 2시간, 5시간, 8시간, 20시간 동안 반응시킨 뒤, 도포하지 않은 무처리군과 함께 1mg/㎖ MTT용액과 3시간 동안 반응시켜 생존한 세포와의 반응을 통해 Thiazolyl Blue Formazan Dye을 생성하게 하여 그 모습을 촬영한 것과 각각의 처리시간에 따른 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E) staining에 의해 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과를 도 7에 나타내었다. 형성된 Formazan Dye를 2㎖의 2-Propanol으로 용해한 뒤 각각을 96-Well Plate의 Well 하나에 200㎕씩 2개를 담아 Plate Reader에서 570nm 파장의 빛에 대한 흡광도를 측정하여 비교함으로써, 상대적인 세포생존율을 측정하여 기록한 그래프와 생존율이 50%가 되는데 걸리는 시간인 ET_{50}(Effective Time 50)을 도출한 값을 도 8에 나타내었다.

[0088] 그 결과 도 7과 같이, 1% Trinton X-100 처리시간이 증가함에 따라 MTT 반응에 의해 생성되는 Formazan Dye의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 인공피부의 표피층이 손상되어 구조가 망가지고, 표피층 아래의 진피층까지 손상이 발생함을 확인할 수 있었다.

[0089] 또한, 도 8과 같이, 1% Trinton X-100 처리시간에 따라 상대적인 생존률이 감소하였으며, ET50 값은 약 4.5시간으로, OECD Test Guideline 439에서 Performance Standard로 제시하는 Barrier Property의 Criteria를 충족하는 것으로 확인되었다.

[0091] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

[0092] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

부호의 설명

[0094] 10: 배양용기 11: 내부 챔버

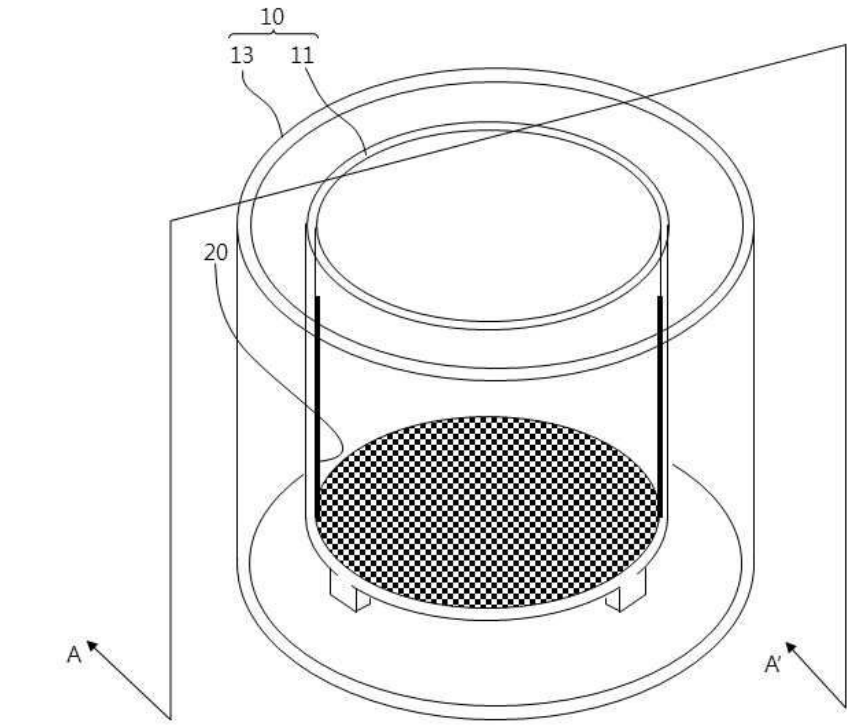
13: 외부 챔버 20: 접착층

30: 3차원 하이드로겔 스캐폴드 기질 40: 표피 각질형성세포

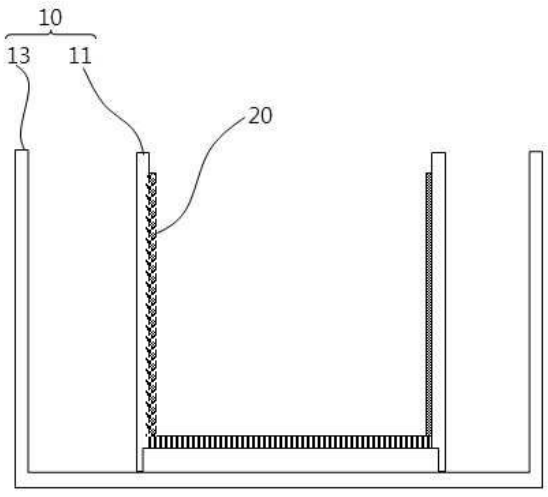
50: 배양액

도면

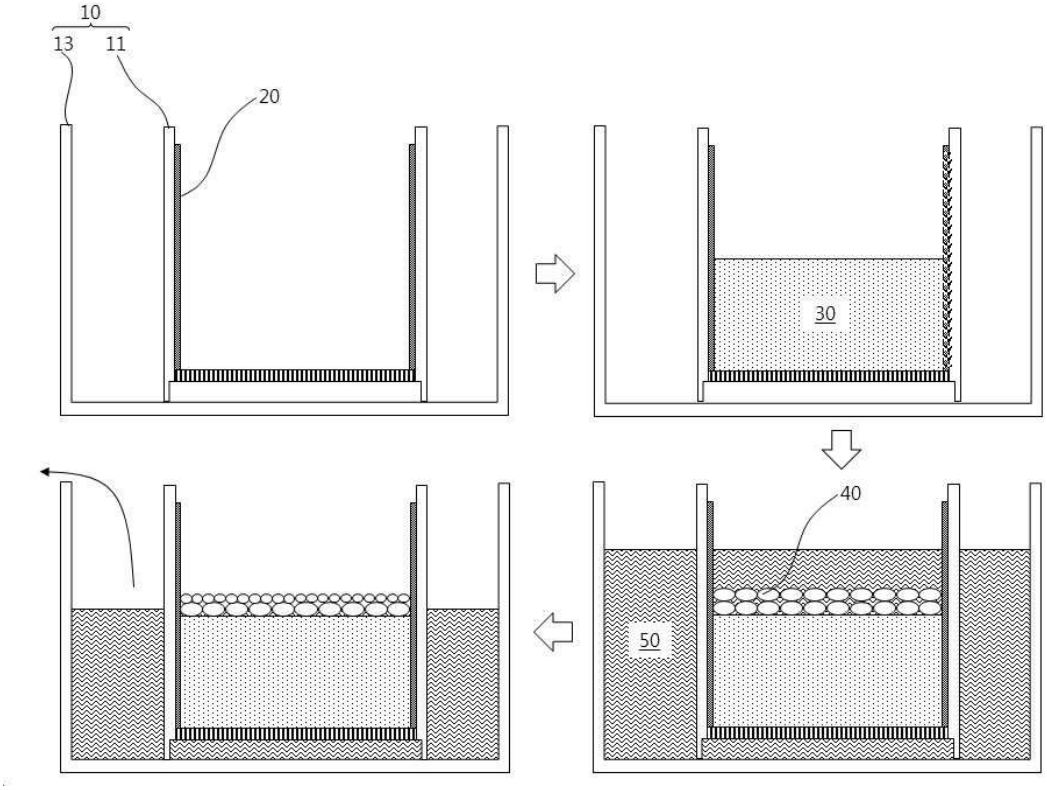
도면1



도면2



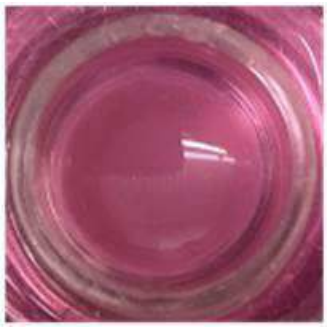
도면3



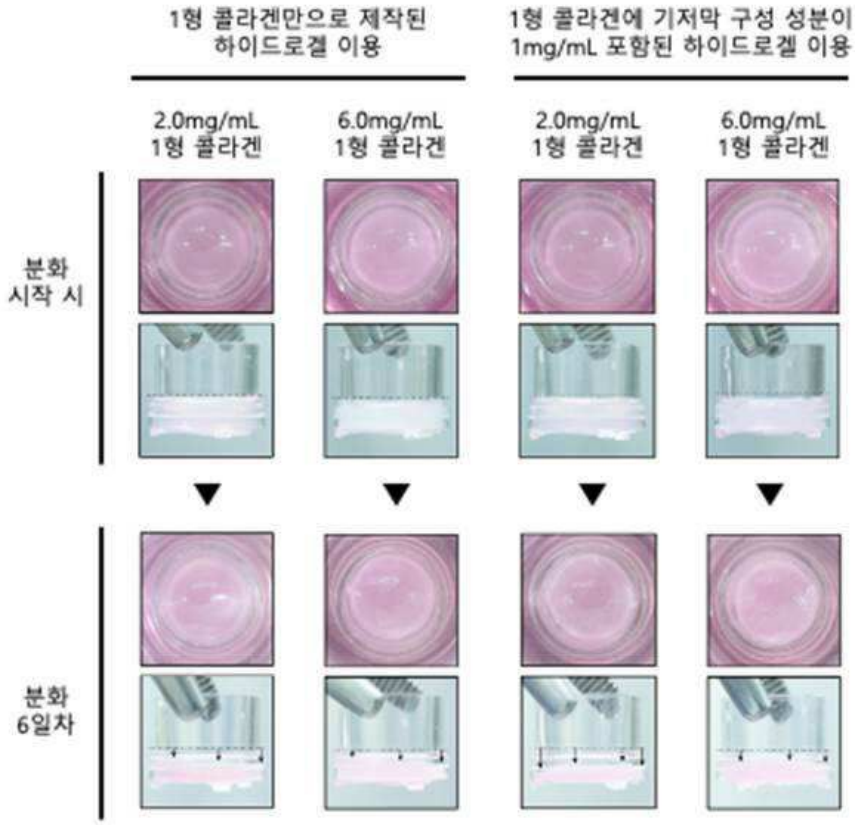
도면4a



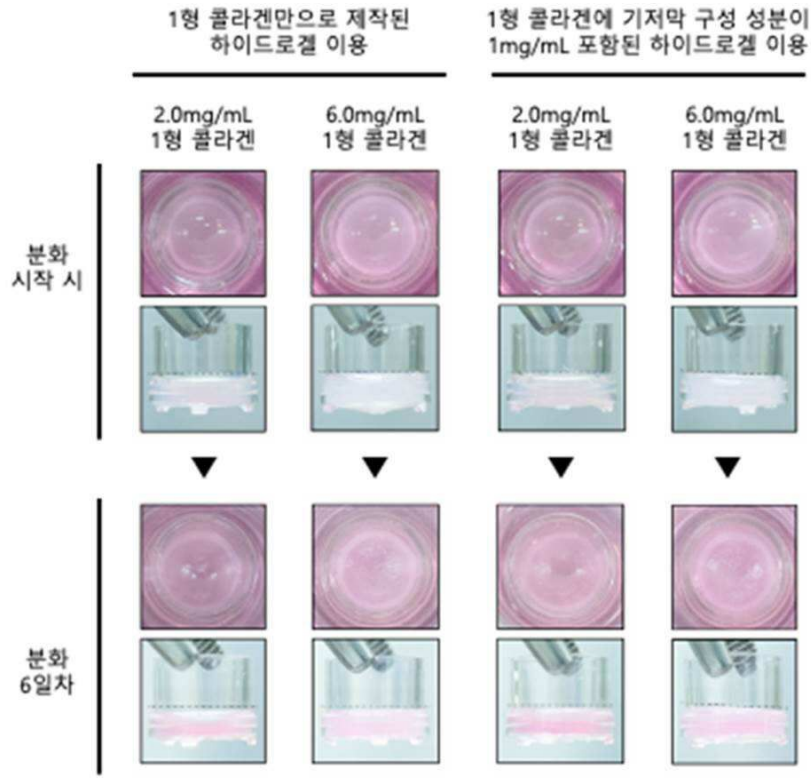
도면4b



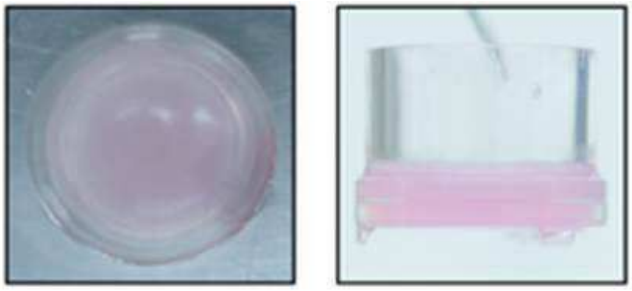
도면5a


1형 콜라겐만으로 제작된
하이드로겔 이용
1형 콜라겐에 기저막 구성 성분이
1mg/mL 포함된 하이드로겔 이용
2.0mg/mL
1형 콜라겐
6.0mg/mL
1형 콜라겐
2.0mg/mL
1형 콜라겐
6.0mg/mL
1형 콜라겐
분화
시작 시
분화
6일차

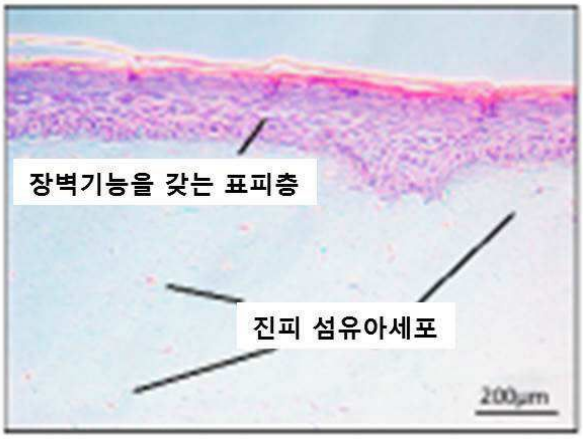
도면5b


1형 콜라겐만으로 제작된
하이드로겔 이용
1형 콜라겐에 기저막 구성 성분이
1mg/mL 포함된 하이드로겔 이용
2.0mg/mL
1형 콜라겐
6.0mg/mL
1형 콜라겐
2.0mg/mL
1형 콜라겐
6.0mg/mL
1형 콜라겐
분화
시작 시
분화
6일차

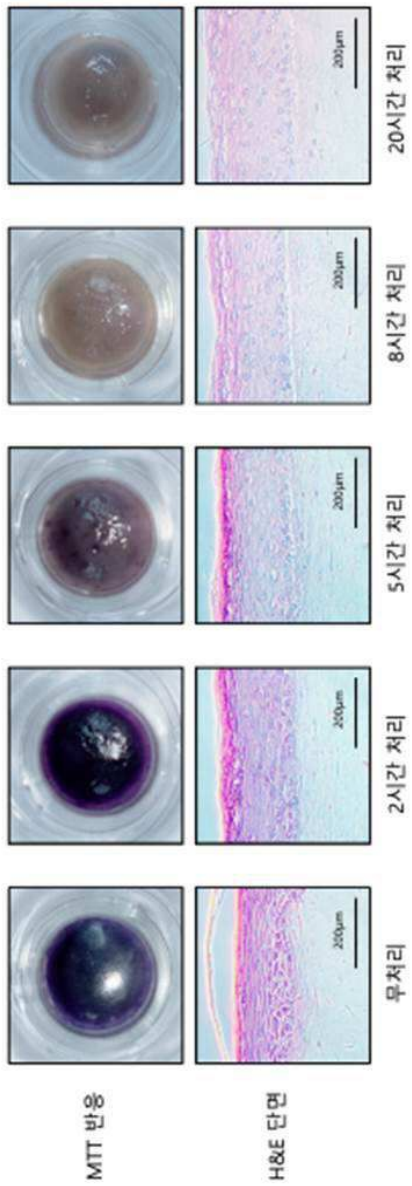
도면6a



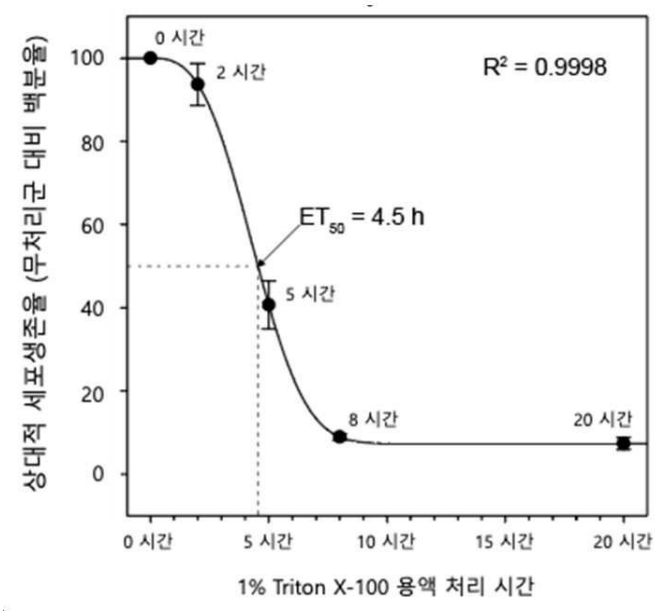
도면6b



도면7



도면8


0 시간
2 시간
5 시간
8 시간
20 시간
R² = 0.9998
ET50 = 4.5 h
100
80
60
40
20
0
0 시간
5 시간
10 시간
15 시간
20 시간
상대적 세포생존율 (무처리군 대비 백분율)
1% Triton X-100 용액 처리 시간