



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0137842
(43) 공개일자 2021년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/50 (2006.01) A61F 2/06 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/507 (2013.01)

A61F 2/062 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0056172

(22) 출원일자 2020년05월11일

심사청구일자 2020년05월11일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

황창모

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 310동 3002호(신천동, 파크리오)

홍소영

서울특별시 송파구 위례광장로 163, 2206동 1103호 (장지동, 위례22단지)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **인공 혈관을 포함한 생체 구조물 형성용 멤브레인, 상기 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물 및 이들의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 생체 적합성 고분자에 원하는 혈관 네트워크 형상을 구현한 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인, 상기 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물, 및 이들의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인은 생체적합성 고분자 내부에 원하는 형태 및 사이즈의 3차원 네트워크 공동 채널(예를 들어, 혈관 네트워크)을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인은 세포를 장기간 배양하는 것이 가능하여 보다 치밀한 세포층으로 이루어져 단위 기능을 갖는 인공 생체 구조물, 특히 인공 혈관을 제공할 수 있으며, 이동성, 형태 유지성 및 접근성이 용이한 장점이 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61L 27/14 (2013.01)

A61L 27/3808 (2013.01)

A61F 2240/004 (2013.01)

A61L 2400/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345282178
과제번호	2018R1D1A1B07048956
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	심근 재생 및 약물-스크리닝을 위한 자연심장근육 모사한 3차원 유도 (Guided) 혈관
조직 및 근조직 결합된 복합조직	생성연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2018.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

인공 생체 구조물 형성용 멤브레인으로서,
생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트 및 제2 시트; 및
상기 제1 시트 및 제2 시트의 사이에 구비된 접착층 및 공동 채널을 포함하고,
상기 공동 채널은 상기 멤브레인을 관통하는 중공 형상인, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 공동 채널의 내벽, 제1 시트의 외면, 제2 시트의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 부착된 세포층을 더 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 세포층은 내피세포, 혈관 내피 세포, 혈관 주위 세포, 섬유아세포, 줄기세포, 연골세포, 근세포, 간세포, 신경세포, 척추 추간판 세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리- ϵ -카프로락톤(PCL), 폴리엘-락트산(PLLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리락트산-카프로락톤 공중합체(PLCL), 생체적합성 폴리카보네이트(biodegradable polycarbonate) 및 이들의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 접착층은 에폭시-아민 결합, 아민-카르복실산 결합, 에폭시-카르복실산 결합 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 6

제2항에 있어서,
상기 세포층은 혈관 내피 세포를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 공동 채널은 혈관 네트워크를 형성하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 공동 채널의 적어도 일측에 연결되고, 상기 제1 시트층 및 제2 시트층의 외부로 연장된 제1 튜브 및 제2

튜브를 더 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인.

청구항 9

- (a) 생체적합성 고분자를 이용하여 제1 시트 및 제2 시트를 제조하는 단계;
- (b) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 일면을 각각 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기로 표면 개질시키는 단계;
- (c) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 개질된 표면이 대향하도록 배치하고 사이에 몰드를 위치시킨 후, 상기 제1 반응성 작용기와 제2 반응성 작용기를 반응시켜 중간 구조체를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 중간 구조체로부터 몰드를 제거하여 공동 채널을 형성하는 단계를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계는, 제1 시트 및 제2 시트의 개질시킬 표면을 산소 플라즈마 코팅 후, 각각 APTES((3-Aminopropyl) triethoxysilane), GPTMS((3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane), 및 숙신안하이드라이드(Succinic anhydride, SA)를 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)에 녹인 용액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서로 다른 물질로 처리하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기는 에폭시기, 아민기 및 카르복실산기로 이루어진 군으로부터 선택되는 서로 다른 것인, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 몰드는 하기 (i) 내지 (iii) 단계를 포함하는 방법으로 제조하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법:

- (i) 기관상에 감광수지로 양각 주형을 제작하는 단계;
- (ii) 상기 양각 주형 상에 고분자 수지를 적층하고 열경화 처리하여 음각 주형을 제작하는 단계; 및
- (iii) 상기 음각 주형 내부를 포밍(forming) 재료로 충전하여 몰드를 제작하는 단계.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 포밍 재료는 알지네이트(alginate), 피브린 겔(fibrin gel), 콜라겐(collagen), 플루로닉(pluronic), 아이소말트(isomalt) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

(iv) 상기 몰드의 양 말단에 각각 제1 튜브 및 제2 튜브를 연결하는 단계를 더 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 몰드 제거가 시트르산삼나트륨이수화물(trisodium citrate dihydrate), 트립신/EDTA(trypsin/EDTA), 콜라

겐분해효소(Collagenase), 물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 용해액에 상기 중간 구조체를 수용하여 이루어지는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 16

제9항에 있어서,

(e) 상기 공동 채널의 내벽, 제1 시트의 외면, 제2 시트의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 세포 현탁액을 처리하여 세포를 부착시키는 단계를 더 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 구조물은 인공 혈관인, 인공 생체 구조물.

청구항 19

제2항에 따른 멤브레인 또는 제16항에 따른 제조방법에 의해 제조된 멤브레인을 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 인공 생체 구조물의 제조방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 배양이 관류 배양인, 인공 생체 구조물의 제조방법.

청구항 21

생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트 및 제2 시트;

상기 제1 시트 및 제2 시트의 사이에 구비된 접착층 및 공동 채널;

상기 공동 채널의 내벽에 부착된 혈관 내피 세포 함유 세포층;

상기 제1 시트의 외면, 상기 제2 시트의 외면, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 위치에 부착된 혈관 주위 세포 함유 세포층을 포함하는, 인공 혈관.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 적합성 고분자에 원하는 혈관 네트워크 형상을 구현한 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인, 상기 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물, 및 이들의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관 질환의 치료방법으로 이용되는 자가혈관 이식술로 사용 가능한 이식편은 내유동맥, 대위망동맥, 요동맥, 척골동맥 등으로 매우 제한적이다. 이러한 이유로, 반복수술을 요하는 경우 자가 혈관의 이식이 어렵거나 불가능한 경우가 발생할 수 있다. 이에 따라, 환자의 생명이나 삶의 질의 향상을 위해 동종혈관이나 인조혈관 등의 자가 혈관을 대체할 수 있는 장치가 요구되고 있으며, 상기 장치를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 초기에는 주로 PET(poly(ethyleneterephthalate)) 소재, PTFE(Poly tetra fluoro ethylene) 소재와 같이 생체 내에서 안전성이 확보되는 소재를 이용하여 단순 도관 형태를 갖는 고분자 소재의 인공혈관이 개발되었다. 최근에는, 줄기세포와 함께 이식된 후, 줄기세포로부터 혈관의 분화를 유도함과 동시에 체내에서 서서히 분해되어, 혈관의 재생을 도모할 수 있는 천연 또는 고분자 소재의 인공혈관을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나, 아직까지는 줄기세포로부터 혈관을 완전하게 분화시키는 방법이 개발되지 않고 있다.

- [0004] 예를 들어, 한국공개특허 제2011-0112556호에는 PDMS(polydimethylsiloxane)과 같은 고분자 표면에 탄소 나노튜브 패턴 표면을 갖는 고분자 소재를 이용하여 인공혈관을 제조하는 방법이 개시되어 있다. 한편, 현재 수화젤을 이용한 혈관 네트워크의 제작이 널리 시도되고 있으나, 이는 형태 유지, 이동, 보관 등의 면에서 용이하지 않다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2011-0112556호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에, 본 발명자들은 생체 내 혈관과 유사한 구조를 갖는 인공 혈관 구조물을 개발하기 위하여 지속적으로 연구한 결과, 세포층을 포함할 수 있는 하나 또는 다수의 공동 채널이 구현된 생체적합성 고분자 멤브레인이 혈관과 유사한 구조 및 기능을 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 본 발명의 목적은 생체적합성 고분자를 포함하는 시트 사이에 원하는 형상 및 사이즈의 조직, 예를 들어 인공혈관 네트워크 패턴을 포함하는 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인, 상기 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물, 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인으로서, 생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트 및 제2 시트; 및 상기 제1 시트 및 제2 시트의 사이에 구비된 접착층 및 공동 채널을 포함하고, 상기 공동 채널은 상기 멤브레인을 관통하는 중공 형상인 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 제공한다. 상기 공동 채널은 혈관 네트워크를 형성할 수 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 측면은, (a) 생체적합성 고분자를 이용하여 제1 시트 및 제2 시트를 제조하는 단계; (b) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 일면을 각각 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기로 표면 개질시키는 단계; (c) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 개질된 표면이 대향하도록 배치하고 사이에 몰드를 위치시킨 후, 상기 제1 반응성 작용기와 제2 반응성 작용기를 반응시켜 중간 구조체를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 중간 구조체로부터 몰드를 제거하여 공동 채널을 형성하는 단계를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법을 제공한다. 또한, (e) 상기 공동 채널의 내벽, 제1 시트의 외면, 제2 시트의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 세포 현탁액을 처리하여 세포를 부착시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 다른 측면은, 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 또는 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법에 의해 제조된 멤브레인을 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 인공 생체 구조물의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 측면은, 생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트 및 제2 시트; 상기 제1 시트 및 제2 시트의 사이에 구비된 접착층 및 공동 채널; 상기 공동 채널의 내벽에 부착된 혈관 내피 세포 함유 세포층; 상기 제1 시트의 외면, 상기 제2 시트의 외면, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 위치에 부착된 혈관 주위 세포 함유 세포층을 포함하는 인공혈관을 제공한다.
- 발명의 효과**
- [0013] 본 발명에 따른 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인은 생체적합성 고분자 내부에 원하는 형태 및 사이즈의 3차원 네트워크 공동 채널(예를 들어, 혈관 네트워크)을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인은 세포를 장기간 배양하는 것이 가능하여 보다 치밀한 세포층으로 이루어져 단위 기능을 갖는 인공 생

체 구조물, 특히 인공 혈관을 제공할 수 있으며, 이동성, 형태 유지성 및 접근성이 용이한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1a는 제1 시트(1), 제2 시트(2), 상기 각 시트의 사이에 구비된 접착층(3) 및 공동 채널(10)을 포함하는 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인(100)의 단면을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 1b는 상기 멤브레인(100)의 공동 채널(10)의 내벽에 세포층(4)이 부착된 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인(200)의 단면을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 1c는 상기 멤브레인(100)의 공동 채널(10)의 내벽, 제1 시트(1)의 외면, 제2 시트(2)의 외면에 세포층(4, 5, 6)이 부착된 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인(300)의 단면을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 PLCL, PCL 및 PLGA를 이용하여 각각의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 구현한 것이다.
- 도 3은 알지네이트 혈관 몰드 제작 과정을 나타낸 것이다.
- 도 4는 알지네이트 혈관 몰드를 이용하여 제작한 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 나타낸 것이다.
- 도 5는 알지네이트 혈관 몰드 제작부터 혈관 내피 세포 부착까지의 개략적인 과정을 나타낸 것이다.
- 도 6은 형광 비드(bead)를 이용하여 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 내부의 관류를 확인한 것이다.
- 도 7은 적색 형광 단백질을 발현하는 혈관 내피 세포를 부착한 후에 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 내부의 관류 및 혈관 생성 여부를 확인한 것이다.
- 도 8은 혈관 내피 세포를 부착한지 5일째 되는 날, 혈관 내피 세포가 멤브레인 내 혈관에 부착되어 자라는 것을 확인한 것이다.
- 도 9는 혈관 내피 세포가 부착된 멤브레인의 상부 시트를 절단하고 오픈하여 콘포칼(confocal) 현미경을 이용하여 멤브레인 내부에 혈관 내피 세포가 잘 부착되어 있는지 확인한 것이다. 이때, 초록색은 액틴(actin), 파란색은 DAPI를 나타낸다(ortho-view).
- 도 10은 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 외면에 혈관 주위 세포층을 형성하는 개략적인 과정을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 일 측면으로, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인(100)으로서, 생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트(1) 및 제2 시트(2); 및 상기 제1 시트(1) 및 제2 시트(2) 사이에 구비된 접착층(3) 및 공동 채널(10)을 포함하고, 상기 공동 채널(10)은 상기 멤브레인을 관통하는 중공 형상인, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인(100)을 제공한다. 이와 관련하여, 도 1a에 본 발명의 일 실시예에 따른 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 단면을 개략적으로 나타내었다.
- [0017] 상기 제1 시트(1) 및 제2 시트(2)는 생체적합성 고분자로 이루어질 수 있고, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 이 공동 채널을 포함할 수 있도록 하는 기본 스캐폴드이다.
- [0018] 본 명세서에서 사용한 용어 "인공 생체 구조물"이란, 생체 세포를 안착시켜 형성된 세포층을 포함하는 구조물, 생체 내 이식 가능한 생체적합성 구조물, 또는 생체 내 특정 조직을 구현한 3차원 구조체를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에서 사용한 용어 "생체적합성 고분자"란, 생체 내 또는 생체 외에서 무해하고, 생체 내 환경에 쉽게 적응하여 거부반응이 발생되지 않는 고분자 물질을 의미한다. 상기 생체적합성 고분자는 체내에 삽입 또는 이식 될 수 있는 보형물, 이식물, 대체장기부터, 약물전달용 담체에 이르는 다양한 분야에서 사용되는 물질을 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 시트에 적용되는 생체적합성 고분자는 체내 삽입 후에도 형태를 유지할 수 있도록 물리적 안정성이 뛰어난 뿐만 아니라, 생분해성이 우수한 물질인 것이 바람직하다. 예를 들어, 폴리락트산(poly(lactic acid, PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid, PGA), 폴리-ε-카프로락톤(poly ε-caprolactone, PCL), 폴리엘-락트산(poly-L-lactic acid, PLLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리락트산-카프로락톤 공중합체(poly(l-lactide-co-ε-caprolactone), PLCL), 생체적합성 폴리카보네이트(biodegradable

polycarbonate) 및 이들의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는, 폴리-ε-카프로락톤, 폴리락트산-카프로락톤 공중합체 또는 폴리락트산-글리콜산 공중합체일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에서, 폴리락트산-카프로락톤(PLCL), 폴리-ε-카프로락톤(PCL) 및 폴리락트산-글리콜산(PLGA)을 이용하여 각각의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 구현하였다. 도 2를 참조하면, 세 가지 소재 모두 내부에 원하는 패턴을 갖는 공동 채널을 형성하기에 적합하며 형태 유지성이 뛰어난 것을 확인하였다.

[0022] 상기 접착층(3)은 제1 시트의 상면과 제2 시트의 하면을 각각 서로 반응성인 작용기로 개질하여 이들을 반응시킴으로써 형성될 수 있다. 바람직하게는, 제1 시트의 상면과 제2 시트의 하면은 각각 에폭시기, 아민기 및 카르복실산기 중 서로 다른 작용기로 개질될 수 있고, 접착층은 개질된 후 시트를 마주 본 상태에서 열경화 처리하여 결합시킴으로써 형성될 수 있다. 구체적으로, 상기 접착층은 에폭시-아민 결합, 아민-카르복실산 결합, 에폭시-카르복실산 결합 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 이렇게 형성된 접착층은 제1 시트 및 제2 시트의 물리적 특성을 해치지 않으면서도 공동 채널의 중공 형상이 유지될 수 있는 접착성을 나타낼 수 있다.

[0023] 상기 공동 채널(10)은 멤브레인의 내부에 비어 있는 통로 공간을 말하는 것으로, 멤브레인이 사용되는 목적에 따라 그 횡단면이 다양한 패턴으로 형성될 수 있다. 상기 공동 채널은 혈관 네트워크를 형성할 수 있고, 구체적으로 3차원 인공 혈관 네트워크를 형성할 수 있다. 또한, 멤브레인에 내재된 공동 채널은 멤브레인의 외부로 통하는 적어도 두 개의 게이트가 있어 체내 이식시 세포, 혈류, 조직액 등이 흐르는 경로가 될 수 있다. 또한, 상기 공동 채널은 하나 또는 복수일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따른 멤브레인(200, 300)은 상기 공동 채널(10)의 내벽, 제1 시트(1)의 외면, 제2 시트(2)의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 부착된 세포층(4, 5, 6)을 더 포함할 수 있다. 도 1b 및 도 1c에 상기 멤브레인의 단면을 개략적으로 나타내었다.

[0025] 상기 세포층(4, 5, 6)은 내피세포, 혈관 내피 세포, 혈관 주위 세포, 섬유아세포, 줄기세포, 연골세포, 근세포, 간세포, 신경세포, 척추 추간판 세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 세포층은 혈관 내피 세포를 포함할 수 있다.

[0026] 구체적으로, 상기 멤브레인은 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 멤브레인 내부에 혈관 내피 세포를 부착하여 혈관 네트워크 구조물을 형성하고, 멤브레인의 겉표면에 혈관 주위 세포를 부착하여 혈관 네트워크 구조물의 성숙을 유도하였다.

[0027] 본 명세서에서 사용한 용어 “혈관 네트워크가 성형된 멤브레인”이란, 동맥류, 혈전, 외상 등의 다양한 원인으로 인하여 손상된 혈관조직을 치료하기 위하여, 대체 이식될 수 있도록 제작된 인공적인 혈관 네트워크 구조물을 의미한다. 상기 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인은 우수한 항혈전성, 천연 혈관과 유사한 수준의 굴곡 및 신장특성, 생체적합성, 종래 혈관과의 접합성, 우수한 봉합성, 누혈(漏血) 방지성 등의 특성을 만족시킬 수 있는 한 상기 멤브레인의 재질 및 구성이 특별히 제한되지는 않는다.

[0028] 상기 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인이 이식 또는 삽입될 환자로부터 유래(분리)된 세포를 사용할 경우, 환자 맞춤형 인공혈관이 될 수 있다. 멤브레인을 구성하는 생체적합성 고분자는 생체 내에서 특별한 거부반응을 일으키지 않지만, 이에 형성되는 세포층의 경우에는 생체거부반응을 유도할 수 있다. 따라서, 상기 멤브레인이 이식 또는 삽입될 환자로부터 유래된 혈관 내피 세포, 혈관 평활근 세포 또는 섬유 세포를 사용하거나 또는 상기 환자로부터 유래된 줄기세포를 이용하여 분화시킨 혈관 내피 세포, 혈관 평활근 세포 또는 섬유 세포를 사용하면 환자로부터 거부반응의 발생을 억제할 수 있으므로, 환자 맞춤형 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인을 제공할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인은 공동 채널의 적어도 일측에 연결되고, 제1 시트층 및 제2 시트층의 외부로 연장된 제1 튜브 및 제2 튜브를 더 포함할 수 있다. 상기 튜브는 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 내에 공동 채널을 형성하기 위한 과정에서 몰드 삽입 및 제거에 용이하도록 구비되는 구조체인 것으로, 공동 채널이 구조체의 외부로 통하는 게이트에 연결되어 있을 수 있다.

[0030] 본 발명은 다른 측면으로, (a) 생체적합성 고분자를 이용하여 제1 시트 및 제2 시트를 제조하는 단계; (b) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 일면을 각각 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기로 표면 개질시키는 단계; (c) 상기 제1 시트 및 제2 시트의 개질된 표면이 대향하도록 배치하고 사이에 몰드를 위치시킨 후, 상기 제1 반응성 작용기와 제2 반응성 작용기를 반응시켜 중간 구조체를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 중간 구조체로부터 몰드를

제거하여 공동 채널을 형성하는 단계를 포함하는, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법을 제공한다.

- [0031] 상기 제조방법은 (e) 상기 공동 채널의 내벽, 제1 시트의 외면, 제2 시트의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 세포 현탁액을 처리하여 세포를 부착시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 생체적합성 고분자를 포함하는 용액을 전기방사하여 제1 시트 및 제2 시트를 제조하는 단계를 포함한다. 상기 생체적합성 고분자는 전술한 바와 동일하다. 상기 시트의 두께는 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서 25 내지 30 μm 가 될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는, 폴리카프로락톤, 폴리락트산-카프로락톤, 폴리락트산-글리콜산을 유기용매에 녹인 후, 전기 방사를 수행하여 시트를 제작하였다.
- [0034] 상기 유기용매는 Tetrahydrofuran(THF), Dimethylformamide(DMF) 및 Hexafluoro-2-propano(HFIP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 상기 제작된 제1 시트 및 제2 시트의 일면을 각각 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기로 표면 개질시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기는 에폭시기, 아민기 및 카르복실산기로 이루어진 군으로부터 선택되는 서로 다른 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기는 각각 아민기와 에폭시기, 아민기와 카르복실산기 또는 에폭시기와 카르복실산기일 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 상기 제1 시트 및 제2 시트의 일면을 각각 제1 반응성 작용기 및 제2 반응성 작용기로 표면 개질시키는 단계는, 제1 시트 및 제2 시트의 개질시킬 표면을 산소 플라즈마 코팅 후, 각각 APTES((3-Aminopropyl) triethoxysilane), GPTMS((3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane), 및 숙신안하이드라이드(Succinic anhydride, SA)를 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)에 녹인 용액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서로 다른 물질로 처리할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서는, 제작된 시트 각 표면을 산소 플라즈마로 처리한 후, 2%의 APTES와 GPTMS의 용액을 각각 처리하고 건조시킴으로써 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인, 예를 들어 생체적합성 고분자로 이루어진 멤브레인의 각 표면에 아민(amine)기와 에폭시(epoxy)기를 부착하였다.
- [0038] 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 상기 제1 시트 및 제2 시트의 개질된 표면이 대향하도록 배치하고 이 사이에 몰드를 위치시킨 후, 상기 제1 반응성 작용기와 제2 반응성 작용기를 반응시켜 중간 구조체를 제조하는 단계를 포함한다. 상기 중간 구조체는 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 내부에 원하는 패턴으로 성형된 몰드가 내재되어 있는 상태로, 추후 용해액에 수용함에 따라 몰드 성분이 제거되면 이 몰드의 패턴에 따라 공동 채널이 형성될 수 있다.
- [0039] 구체적으로, 상기 몰드는 (i) 기관상에 감광수지로 양각 주형을 제작하는 단계; (ii) 상기 양각 주형 상에 고분자 수지를 적층하고 열처리하여 음각 주형을 제작하는 단계; 및 (iii) 상기 음각 주형 내부를 포밍(forming) 재료로 충전하여 몰드를 제작하는 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다. 또한, 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 (iv) 상기 몰드의 양 말단에 각각 제1 튜브 및 제2 튜브를 연결하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 몰드의 직경은 0.1 내지 10 mm, 바람직하게는 0.1 내지 1 mm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 포밍 재료는 알지네이트(alginate), 피브린 겔(fibrin gel), 콜라겐(collagen), 플루로닉(pluronic), 아이소말트(isomalt) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에서는, SU-8(아크릴)로 양각 주형을 제작한 후, 고분자 수지로서 PDMS(polydimethylsiloxane)를 이용하여 음각 주형을 제작하였다. 상기 제작된 PDMS 음각 주형 내부에 알지네이트(alginate) 용액을 부어 알지네이트 혈관 몰드를 제작하였다. 또한, 상기 제작된 알지네이트의 양 끝에 실리콘 튜빙을 삽입하였다. 이후, 상기 알지네이트 혈관 몰드를 본 명세서에서 제작된 아민기와 에폭시기가 부착된 생체적합성 시트 사이에 넣어 고정한 후 진공과 열을 가하였다.
- [0042] 또한, 본 발명의 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 상기 중간 구조체로부터 몰드를 제거하여 공동 채널을 형성하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 몰드 제거가 시트르산삼나트륨이수화물(trisodium citrate dihydrate), 트립신(EDTA(trypsin/EDTA), 콜라겐분해효소(Collagenase), 물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으

로부터 선택되는 어느 하나의 용해액에 상기 중간 구조체를 수용하여 이루어질 수 있다.

- [0043] 구체적으로, 포밍재료로서 알지네이트를 사용하여 알지네이트 혈관 몰드를 제작한 경우, 시트르산삼나트륨이수 화물에 알지네이트 혈관 몰드가 내제된 중간 구조체를 수용하여 몰드를 제거할 수 있다. 또한, 포밍재료로서 피브린 겔을 사용하여 피브린 겔 혈관 몰드를 제작한 경우, 트립신/EDTA에 피브린 겔 혈관 몰드가 내제된 중간 구조체를 수용하여 몰드를 제거할 수 있다.
- [0044] 또한, 포밍재료로서 콜라겐을 사용하여 콜라겐 혈관 몰드를 제작한 경우, Collagenase를 이용하여 콜라겐 혈관 몰드가 중간에 접촉되어 붙어 있는 중간 구조체를 수용하여 몰드를 제거할 수 있다. 또한, 포밍재료로서 플루로닉을 사용하여 플루로닉 혈관 몰드를 제작한 경우, 물을 이용하여 플루로닉 혈관 몰드가 중간에 접촉되어 붙어 있는 중간 구조체를 수용하여 몰드를 제거할 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법은 (e) 상기 공동 채널의 내벽, 제1 시트의 외면, 제2 시트의 외면 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 위치에 세포 현탁액을 처리하여 세포를 부착시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에서는, 공동 채널의 내벽에 혈관 내피 세포를 부착하고, 체내에 이식시 생체 조직과 맞닿을 멤브레인의 면, 예를 들어, 제1 시트의 하면 또는 제2 시트의 상면에 혈관 주위 세포를 부착함으로써, 3차원 인공 혈관 네트워크를 제공하는 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 구현하였다.
- [0047] 상술한 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 제조방법에 있어서, 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 각 구성 요소의 형상, 재질 및 물성에 대한 설명은 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인에 기재된 설명을 참조한다.
- [0048] 본 발명은 또 다른 측면으로, 본 명세서에 따른 멤브레인을 포함하는 인공 생체 구조물을 제공한다. 상기 인공 생체 구조물은 혈관 네트워크를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 인공 생체 구조물은 인공 혈관일 수 있다. 또한, 상기 인공 생체 구조물은 멤브레인의 외면 일부 또는 전부에 다른 조직, 예컨대, 근육, 피부, 지방, 뼈 등에서 유래된 1종 이상의 세포를 함유하는 세포층이 부착된 형태일 수 있다.
- [0049] 본 발명은 다른 측면으로, 상기 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인 또는 이의 제조방법에 의해 제조된 멤브레인을 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 인공 생체 구조물의 제조방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 배양은 회분 배양, 유가식 회분 배양, 연속 배양 또는 관류 배양 방식으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 관류 배양일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 측면은, 생체적합성 고분자를 포함하는 제1 시트 및 제2 시트; 상기 제1 시트 및 제2 시트의 사이에 구비된 접착층 및 공동 채널; 상기 공동 채널의 내벽에 부착된 혈관 내피 세포 함유 세포층; 상기 제1 시트의 외면, 상기 제2 시트의 외면, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 위치에 부착된 혈관 주위 세포 함유 세포층을 포함하는 인공혈관을 제공한다.
- [0051] 상기 인공혈관은, 생체적합성 고분자로 이루어진 시트 형상의 멤브레인 내부에 이를 관통하는 중공 형상의 공동 채널이 구비된 바이오 스캐폴드에 있어서, 채널의 내벽에 혈관 내피 세포가, 멤브레인의 외부에는 혈관 주위 세포가 형성된 것이다. 상기 인공 혈관은 병적인 생체 혈관을 대체하거나, 우회 혈관으로 사용될 수 있다. 또한, 혈관 오가노이드(organoid)로서 예를 들어, in vitro에서 혈관과 관련된 다양한 연구 목적으로 활용될 수 있다.
- [0052] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0053] **실시예 1. 혈관 몰드 제작**
- [0054] 목적하는 혈관 네트워크 형태를 가지는 SU-8(아크릴)로 양각 주형을 제작한 후, PDMS(polydimethylsiloxane)를 그 상부에 적층하여 음각 주형으로 제작하였다. 상기 제작된 PDMS 몰드 하단을 10% 젤라틴 하이드로젤과 5% CaCl₂로 굳힌 후, PDMS 음각 주형 내부에 6%의 알지네이트 용액을 부어 몰드 형태를 따라 알지네이트 혈관 몰드를 제작하였다. 상기 제작된 알지네이트의 양 끝에 실리콘 튜빙을 끼웠다. 상기 알지네이트 혈관 몰드 제작 과정을 도 3에 나타내었다.
- [0055] **실시예 2. 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인의 제작**
- [0056] **실시예 2.1. PCL 멤브레인의 제작**
- [0057] 열을 이용하여 성형이 가능한 고분자인 12.5%(w/v)의 PCL(polycaprolactone)을 유기용매(Hexafluoro-2-

propano, HFIP)에 녹이고, 전기 방사를 수행하여 생분해성 고분자를 포함하는 시트를 2개 제작하였다.

[0058] 상기 제작된 시트의 한 표면을 산소 플라즈마로 처리한 후, 2%의 (3-Aminopropyl)triethoxysilane 용액 및 2%의 (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane 용액을 각각 처리하고 건조시킴으로써 두 개 시트의 표면에 각각 아민(amine)기와 에폭시(epoxy)기를 부착하였다.

[0059] 상기 실시예 1에서 제작된 알지네이트 혈관 몰드를 상기 아민기와 에폭시기가 부착된 시트 사이에 넣어 고정 한 후 진공과 열을 가하였다. 이때, 온도는 섭씨 55도로 오버나이트(0/N) 처리하였다. 알지네이트 혈관 몰드가 내 재된 중간 구조체를 0.2M trisodium citrate dihydrate로 1일 동안 용해시켰으며, 그 결과 도 4와 같은 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인을 획득하였다.

[0060] 알지네이트 혈관 몰드의 제작부터 혈관 내피 세포 부착까지의 전반적인 과정을 도 5에 나타내었다.

[0061] 실시예 2.2. PLCL 멤브레인의 제작

[0062] 생체적합성 고분자로서 15%(w/v)의 PLCL을 사용한 것을 제외하고는 실시예 2.1과 동일한 방법으로 생체적합성 구조체를 획득하였다.

[0063] 실시예 2.3. PLGA 멤브레인의 제작

[0064] 생체적합성 고분자로서 15%(w/v)의 PLGA를 사용한 것을 제외하고는 실시예 2.1과 동일한 방법으로 생체적합성 구조체를 획득하였다.

[0065] 실시예 3. 혈관 네트워크가 성형된 멤브레인을 이용한 생체 조직의 형성

[0066] 실시예 3.1. 멤브레인 내부에 혈관 내피 세포층의 형성

[0067] 형광 비드(bead)와 적색 형광 단백질로 염색된 혈관 내피 세포(red fluorescent protein- human umbilical vein endothelial cells; RFP-HUVECs)(Olaf Pharmaceuticals)를 준비하였다. 3%의 젤라틴을 오토클레이브 (autoclave)한 후 상기 비드 및 세포와 믹싱하여 세포 현탁액을 준비하였다. 실시예 2.1에서 제작된 멤브레인의 공동 채널로 상기 비드 및 세포 현탁액을 주입하고 2시간 동안 인큐베이터에서 배양하여 혈관 내피 세포를 상기 공동 채널의 내벽에 부착시켰다. 이후, 공동 채널을 세포 배양 배지와 연결하여 관류배양하였다.

[0068] 도 6 및 도 7을 참조하면, 멤브레인의 공동 채널을 따라 형성된 세포층에서 각각 형광 비드 또는 적색 형광 단백질의 발현이 관찰되는바, 멤브레인 내부의 관류를 확인할 수 있다.

[0069] 혈관 내피 세포를 부착한지 5일째 되는 날, 세포가 부착된 멤브레인을 고정한 후, 액틴(F-Actin)과 세포의 핵을 다피(DAPI)로 염색하여 혈관 내피 세포가 멤브레인 내 혈관에 부착되어 자라는 것을 확인하였고, 이를 도 8에 나타내었다. 또한, 혈관 내피 세포가 부착된 멤브레인의 상부 시트를 절단하고 오픈하여 콘포칼(confocal) 현미경을 이용하여 촬영한 결과, 멤브레인 내부에 혈관 내피 세포가 잘 부착되어 있음을 확인하였다(도 9 참조).

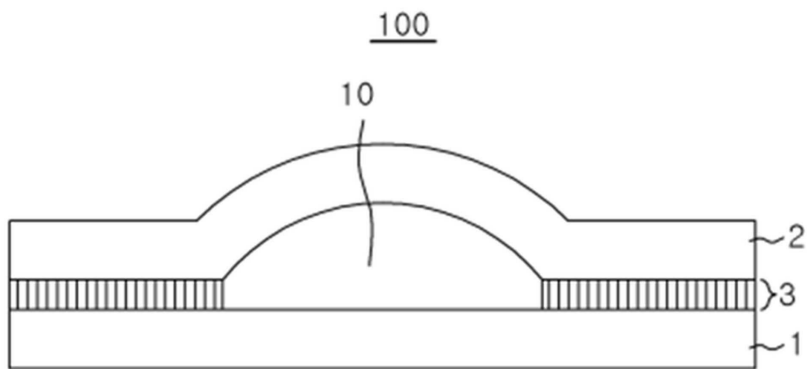
[0070] 실시예 3.2. 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 외면에 혈관 주위 세포층 형성

[0071] 혈관 성숙을 도와줄 수 있는 혈관 주위 세포(pericyte)를 시트 외면에 부착하여 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 성숙을 유도하였다. 구체적으로, 혈관 내피 세포를 부착한 후, 다음날 혈관 주위 세포를 150 ul의 배양 배지와 혼합하여 세포 현탁액을 준비하여 멤브레인 단면에 골고루 뿌려 2시간 동안 부착 시킨 후에, 세포 배양 배지를 충분히 넣어 배양하였다. 상기 실험의 개략적인 과정을 도 10에 나타내었다.

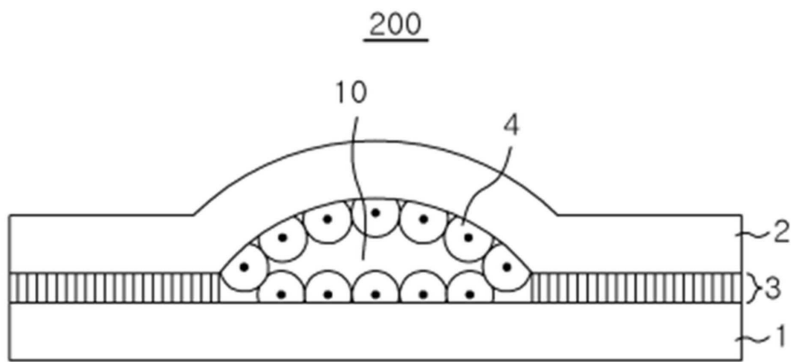
[0072] 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인의 공동 채널의 내벽뿐만 아니라 외면에도 세포층을 도입함으로써 인공 생체 구조물 형성용 멤브레인에 근육, 피부, 지방, 뼈 등의 다른 조직의 세포도 부착하여 배양할 수 있음을 확인하였다.

도면

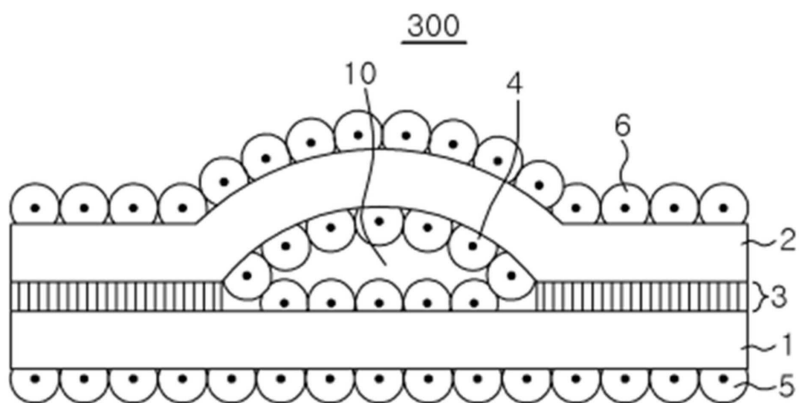
도면1a



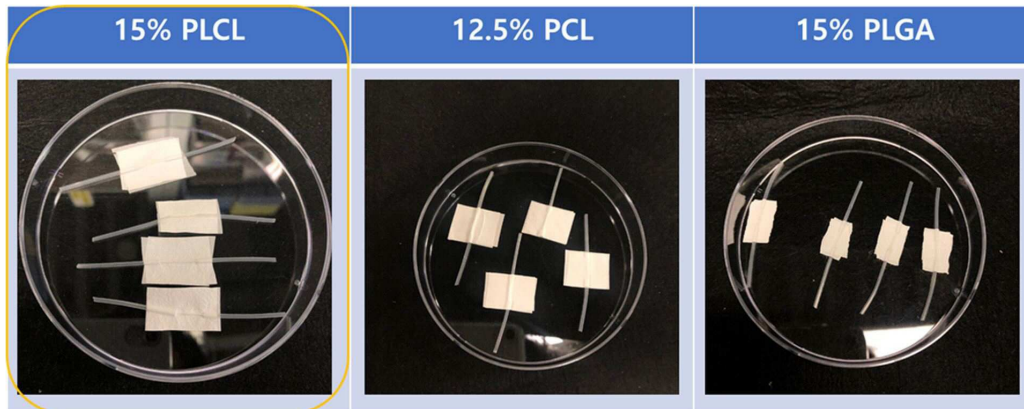
도면1b



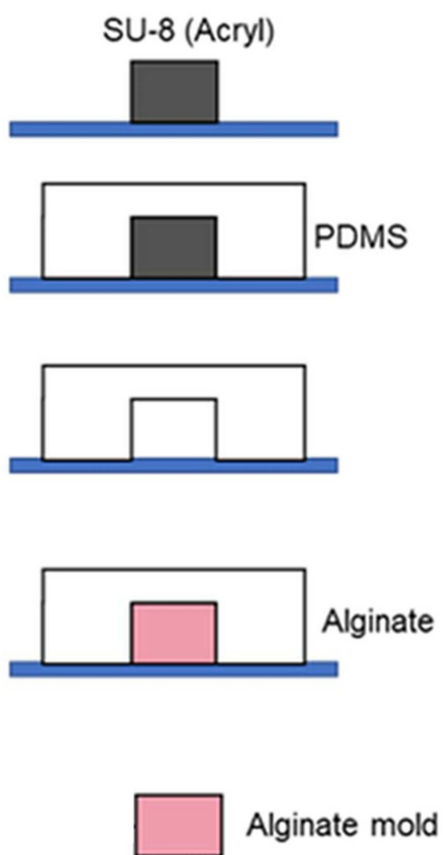
도면1c



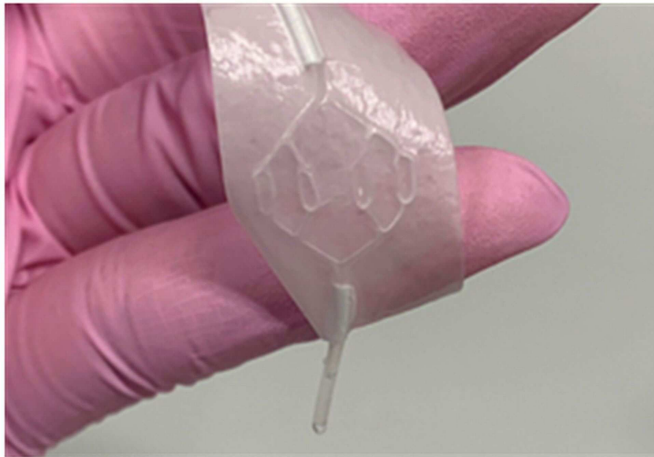
도면2



도면3

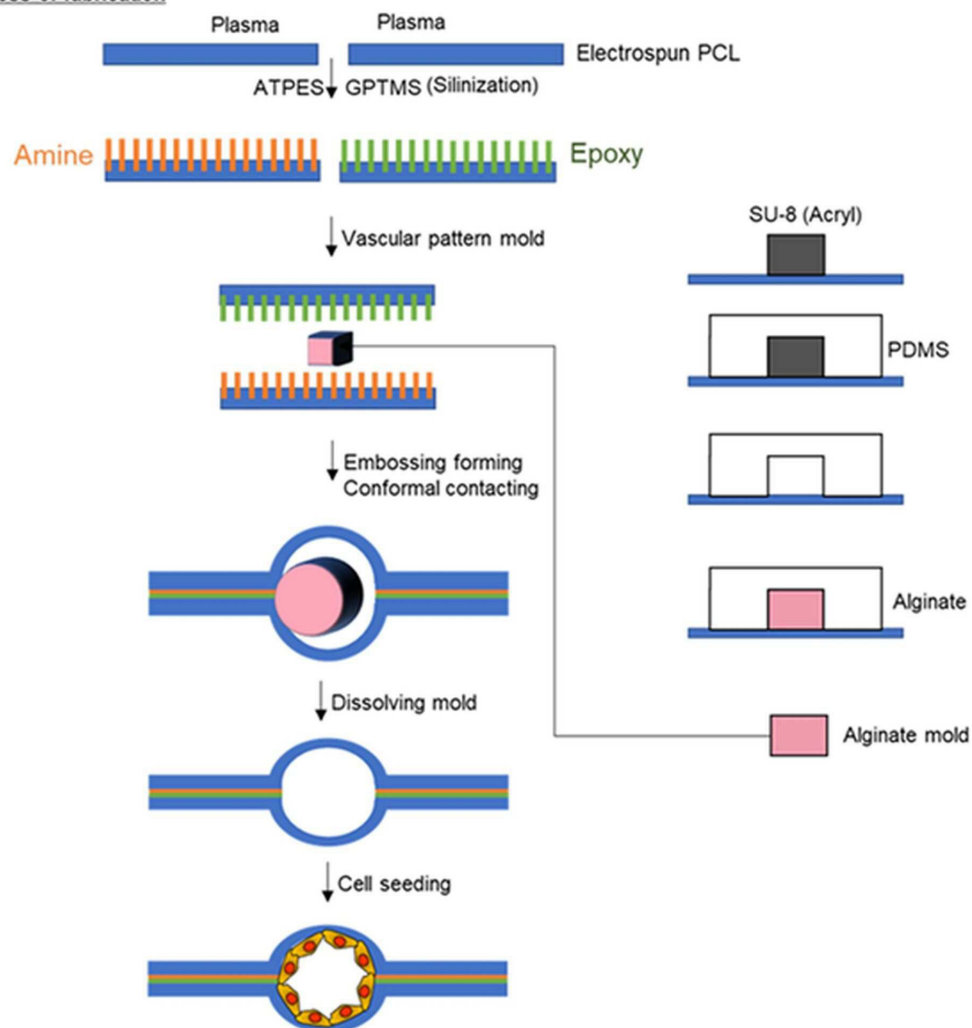


도면4

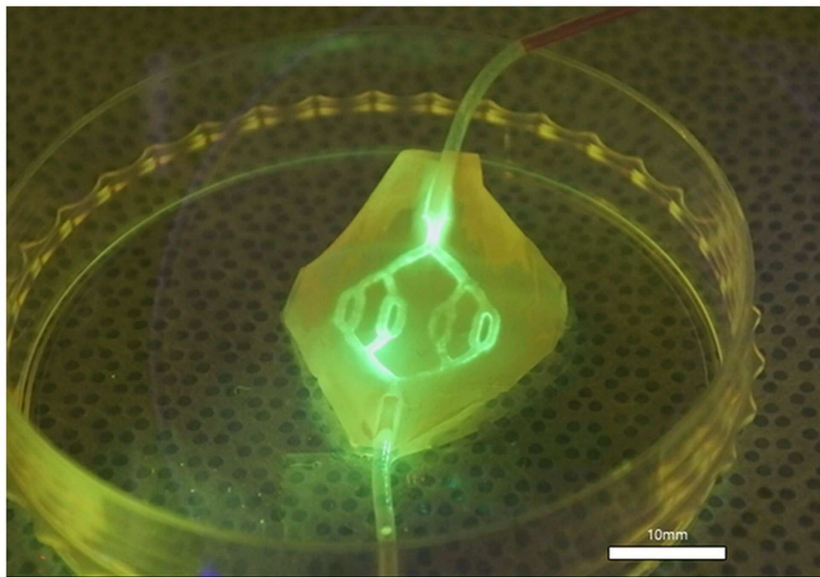


도면5

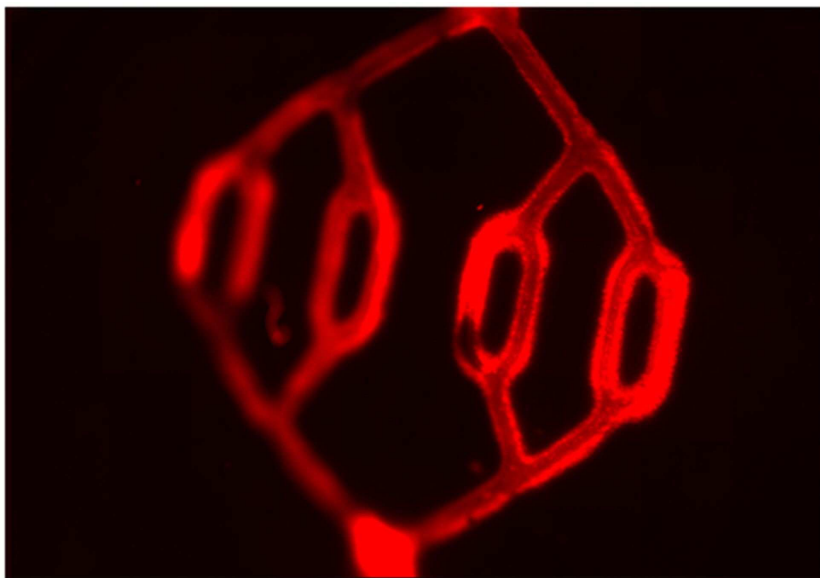
Process of fabrication



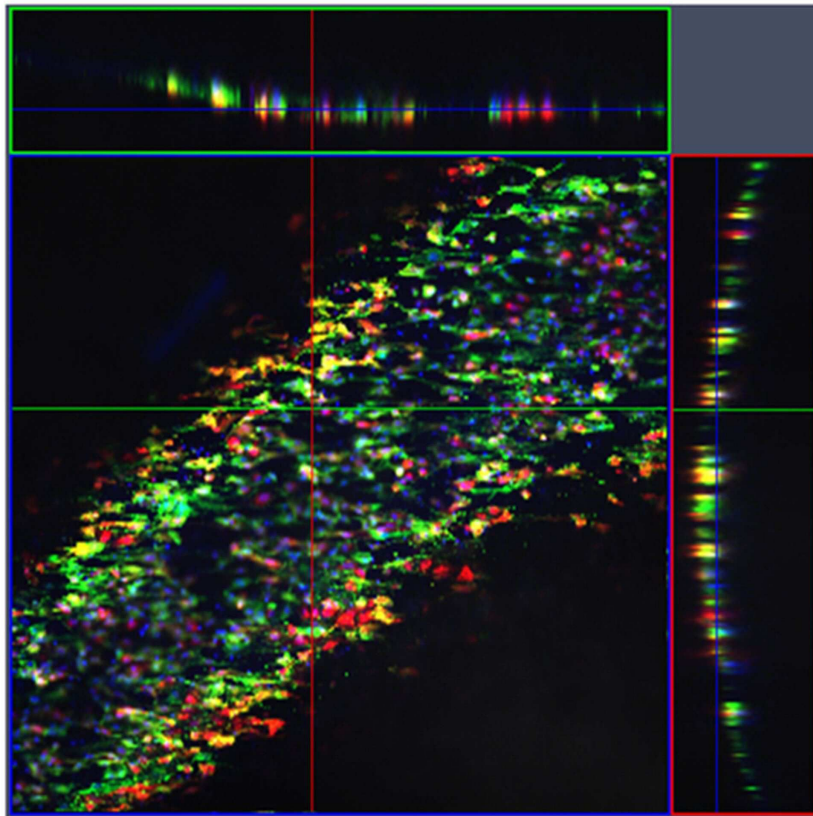
도면6



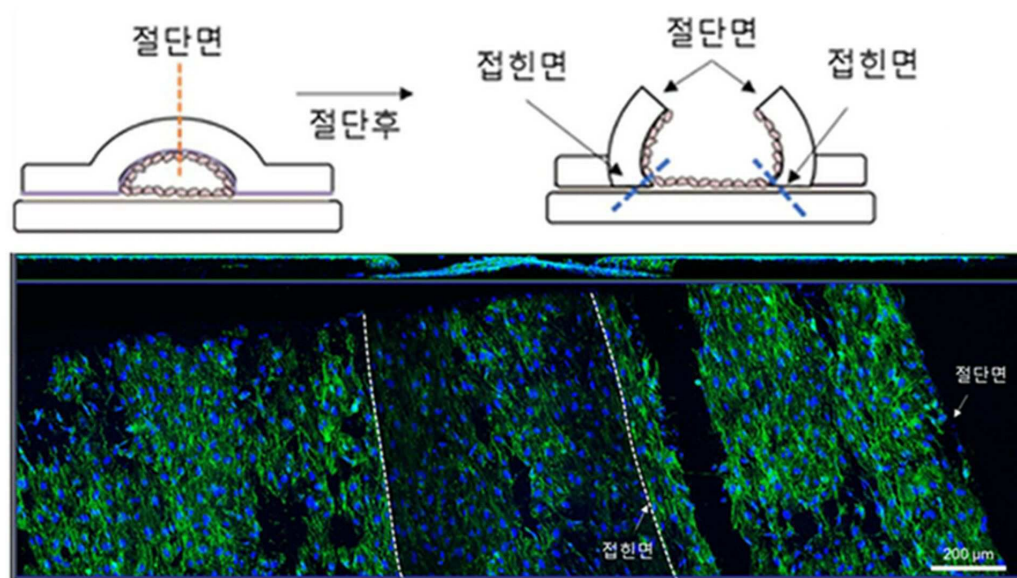
도면7



도면8



도면9



도면10

