

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011년 3월 10일 (10.03.2011)



(10) 국제공개번호
WO 2011/027932 A1

- (51) 국제특허분류:
A61L 27/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/005716
- (22) 국제출원일: 2009년 10월 7일 (07.10.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0083356 2009년 9월 4일 (04.09.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC))** [KR/KR]; 대전 유성구 궁동 220, 305-764 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이창수 (LEE, Chang Soo)** [KR/KR]; 대전시 서구 삼천동 청솔아파트 6-1106, 302-743 Daejeon (KR). **정재훈 (JUNG, Jae-Hoon)** [KR/KR]; 대전시 유성구 궁동 220 충남대학교, 305-764 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: **김원준 (KIM, Wonjoon)**; 대전시 서구 만년동 386 골드벤처타워 205 호, 302-823 Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

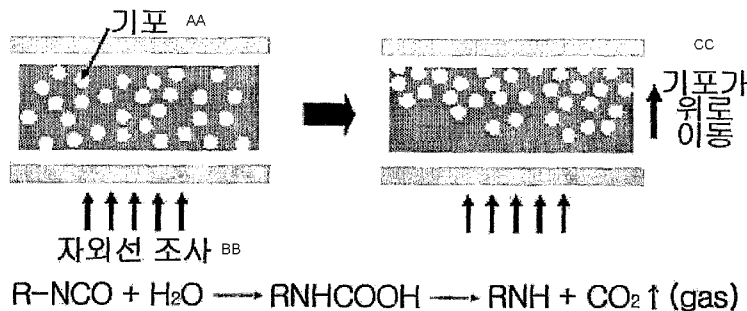
규칙 4.17 에 의한 선언서:

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYMERIC MICRO FIBERS OF JANUS FORM HAVING POROUS SURFACE FOR TISSUE ENGINEERING

(54) 발명의 명칭 : 다공성 표면을 갖는 야누스 형태의 조직공학용 고분자 마이크로 섬유 제조방법

[Fig. 1]



AA ... Bubbles
BB ... Ultraviolet Irradiation
CC ... Moving of bubbles upward

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing polymeric micro fibers with porous surfaces for tissue engineering and an apparatus for producing therefor, and more specifically, a method for producing polymeric micro fibers comprising a step of continuously and concurrently co-feeding photopolymerizable polyurethane monomers and an aqueous solution continuous phase which is not compatible with the above monomers into microchannels to form a monomer jet-stream; and a step of emitting a continuous phase of photo-cured monomers by ultraviolet irradiation of the microchannels; and an apparatus therefor. The method of the present invention allows polymeric micro fibers with porous surfaces to be produced in real time by forming bubbles through the chemical reaction of the monomers with water, concurrently with photopolymerization without a separate process for controlling the surface and without chemicals which are harmful to the human body.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2011/027932 A1



- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 다공성 표면을 갖는 조직공학용 고분자 마이크로 섬유 제조방법 및 이를 위한 제조장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로 광중합성 폴리우레탄 모노머와 상기 모노머와 혼합되지 않는 수용액 연속상을 미세유로에 모노머 제트 스트림이 형성되도록 동시에 연속 주입하면서, 미세유로에 자외선을 조사하여 광경화된 모노머가 연속상으로 배출 되도록 하는 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법 및 이를 위한 제조장치에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 인체에 유해한 화학약품을 사용하지 않고 표면 제어를 위한 별도의 공정을 거치지 않으며 광중합과 동시에 모노머와 물의 화학반응에 의해 기포를 형성시켜 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유를 실시간으로 제조할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 다공성 표면을 갖는 야누스 형태의 조직공학용 고분자 마이크로 섬유 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 다공성 표면을 갖는 조직공학용 고분자 마이크로 섬유의 제조방법 및 이를 위한 제조장치에 관한 것이다. 보다 상세하게는 인체에 유해한 화학약품을 사용하지 않고 표면 제어를 위한 별도의 공정을 거치지 않으며 광중합과 동시에 모노머와 물의 화학반응에 의해 기포를 형성시켜 실시간으로 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유를 제조하는 방법 및 이를 위한 제조장치에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 보건 의료분야에서 최선진국인 미국에서는 매년 10만 명의 환자들이 몸의 일부분인 장기 등을 필요로 하나, 단지 2만 건의 장기만이 기증되고 있다. 장기 이식을 위한 조건을 갖춘 약 3만 6천여명이 대기자 명단에 대기 중에 있으며, 지난 5년 동안 약 만 여명 정도가 대기 중 목숨을 잃었다고 한다. 이렇게 인체장기가 많이 필요함에도 기증자의 숫자는 점차 줄고 있어 수급에 심한 불균형이 초래되고 있으며, 장기이식 수술의 기술적인 어려움, 높은 비용 및 면역 억제제의 사용에 따른 부작용 등의 많은 문제점들이 남아있다.
- [4] 이러한 장기 이식의 새로운 접근법으로서, 조직공학(Tissue Engineering)을 이용한 인공장기의 개발이나 조직의 재생에 대한 필요성이 크게 대두되게 되었다. 조직공학은 생명과학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고, 나아가서 생체조직의 대용품을 만들어 다시 체내에 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용학문이다. 대표적인 조직공학 기법을 요약하면 다음과 같다. 우선, 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 후 분리된 세포를 배양을 통해 필요한 양만큼 증식시킨다. 증식된 세포를 다공성 고분자 지지체(scaffold)에 심어 일정기간 동안 체외 배양하고 그로부터 얻어진 하이브리드형 세포/고분자 구조물을 다시 체내에 이식한다.
- [5] 조직공학에 사용되는 지지체는 이식거부, 세포독성, 염증반응 등을 유발하지 않아서 생체 적합한 성질을 가져야 할 뿐만 아니라, 세포의 부착 및 성장이 용이하고, 지지체로 역할을 수행하기 위하여 생체내의 압력을 견딜 수 있는 높은 기계적 강도를 지녀야 한다. 여러 형태의 지지체 중 섬유 형태의 지지체(fibrous scaffold)는 세포의 성장(growth), 정렬(alignment), 이동(migration) 등에 있어서 가이드 역할을 해줄 수 있기 때문에 조직공학 분야에 많이 이용이 되고 있다. 섬유 형태의 지지체 재료로써 폴리우레탄(polyurethane)은 적당한 기계적 강도와

생체적합성(biocompatibility)에도 불구하고, 세포의 부착력이 낮다는 결정적인 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 섬유형태의 폴리우레탄 지지체를 만든 후 세포가 잘 붙을 수 있는 단백질 등으로 지지체의 표면을 코팅하는 등의 방법이 이용되는데, 이 역시도 지지체의 표면을 균일하게 코팅하기 어렵고, 공정 과정이 복잡해지기 때문에 시간, 비용적인 측면에서 단점을 가지고 있다.

- [6] 조직공학에 있어서 또 다른 중요한 이슈는 생체적합성을 가지는 지지체를 제작하는 방법에 관한 것이다. 섬유를 제작하기 위해 사용되는 종래의 방법으로는 용융방사(melt spinning)와 습식방사(wet spinning)등이 있는데, 이 방법들은 공정과정에서 높은 온도와 세포에 독성을 주는 휘발성 용매가 사용되기 때문에 조직공학용 지지체 제조방법으로서 한계가 있다.

[7]

- [8] 한편 미세유체 칩은 빠른 반응 시간, 소량의 시약으로 실험 및 분석이 가능하고 작은 공간 내에 여러 공정의 집적화가 가능하다는 장점으로 인해 최근 들어 화학합성, 분석, 세포 실험, 고분자 구조물 제작 등의 다양한 분야에 이용되고 있다. 미세유체 칩을 이용하여 고분자 마이크로 섬유 또한 실시간으로 제조가 가능하며 고온, 고압의 조건이 필요 없기 때문에 비용, 공간적인 측면에서 유리하고, 부수적인 장치들도 간소화 할 수 있다. 하지만 이 경우에도 종래의 방법으로는 미세유체 칩 내에서 실시간으로 마이크로 섬유의 표면 성질을 제어하는 데에는 어려움이 있어, 조직공학용 지지체로 사용하기 위해서는 마이크로 섬유를 제조 한 후 별도의 후처리 공정을 통해 세포가 잘 부착이 될 수 있도록 만들어 주어야 한다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 기계적 강도가 우수할 뿐 아니라 세포의 부착 및 성장이 용이한 다공성 표면을 갖는 조직공학용 고분자 마이크로 섬유의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명은 또한 세포에 독성을 미치는 휘발성 용매를 이용하지 않고, 상온 상압의 온화한 조건에서 단순한 공정에 의해 경제적으로 다공성 표면을 갖는 조직공학용 고분자 마이크로 섬유를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 다공성 표면을 갖는 조직공학용 고분자 마이크로 섬유를 제조할 수 있는 미세유체 칩을 이용한 제조장비를 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 전술한 과제를 해결하기 위한 본 발명은 광중합성 폴리우레탄 모노머와상기 모노머와 혼합되지 않는 수용액 연속상을 미세유로에 모노머 제트 스트림이 형성되도록 동시에 연속 주입하면서, 미세유로에 자외선을 조사하여 광경화된 모노머가 연속상으로 배출되도록 하는 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유 제조방법에 관한 것이다.
- [15]
- [16] 이때, 미세유로에 상기 모노머가 먼저 주입되는 경우 미세유로의 벽면에 흡착되는 것을 방지하기 위해 모노머의 주입 전에 상기 연속상 수용액으로 미세유로를 먼저 채우는 것이 보다 바람직하다.
- [17]
- [18] 상기 광중합성 폴리우레탄 모노머는 광개시제와 폴리우레탄 모노머의 혼합물로 종래 기술에 의해 알려진 통상의 광개시제와 폴리우레탄 모노머를 적절히 혼합하여 사용할 수도 있으며, NOA63(Norland optical adhesive 63), NOA75(Norland optical adhesive 75)등과 같이 상업화된 광중합성 폴리우레탄 모노머를 사용하여도 무관하다.
- [19] 상기 광개시제는 자외선의 조사에 의해 라디칼을 형성할 수 있는 것으로서, 1-Hydroxy-cyclohexyl-phenyl-ketone, 2-Hydroxy-2-methyl-1-phenyl-propan-1-one, 4-(2-hydroxyethoxy)phenyl-(2-hydroxy-2-propyl)ketone, 2-Methyl-1[4-(methylthio)phenyl]-2-morpholinopropan-1-one, 1-Hydroxy-cyclohexyl-phenyl-ketone 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 광개시제의 양은 광개시제의 종류와 폴리우레탄 모노머의 종류에 따라 적절히 조절하여 사용할 수 있으나 폴리우레탄 모노머에 대해 1~5%(w/w)인 것이 바람직하다.
- [20] 상기 폴리우레탄 모노머는 중합반응에 의해 폴리우레탄을 형성할 수 있는 모노머 화합물 또는 모노머 조성물로, 통상의 폴리우레탄 모노머로 사용되는 것이라면 어느 것이어도 무관하며 통상 폴리에소시아네이트, 글리콜, 그리고 디아민의 혼합물로 이루어진다. 폴리우레탄 모노머는 자외선 조사에 의해 광개시제로부터 생성된 라디칼(radical)에 의해 우레탄 결합, 우레아 결합, 알로파네이트(allophanate) 결합 또는 뷰렛(biuret) 결합을 생성하는 한편, 하이드록시기(hydroxy group)를 함유하는 친수성 용액과 접했을 때 폴리에소시아네이트의 이소시아네이트기와 하이드록시기의 반응에 의해 이산화탄소 기체를 발생시킨다. 상기 글리콜로는 ethylene glycol, 1,2-propylene glycol, 1,3-butane diol, trimethylol propane을, 디아민으로는 hydrazine, ethylene diamine, 1,4-ciclehexanediamine, 2,4-tolylenediamine을, 폴리에소시아네이트로는 p-phenylene diisocynate, 1,6-hexamethylene diisocyanate, toluene diisocynate 을 예로 들 수 있으나, 이는 예시에 불과하며 본 발명은 특정 폴리우레탄 모노머에만 적용되는 것이 아니므로 당업자라면 종래 기술에 의해 보다 다양한 종류의 화합물들을 혼합하여 폴리우레탄 모노머로 사용할 수 있음은 용이할 것이다.

상기 글리콜 : 디아민 : 폴리이소시아네이트의 혼합비는 최종적으로 얻고자 하는 폴리우레탄 섬유의 물성과 사용하는 글리콜, 디아민 및 폴리이소시아네이트의 종류에 따라 종래기술에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[21]

[22] 상기 연속상은 상기 모노머와 혼합되지 않아 모노머 제트 스트림을 형성할 수 있는 수용액이라면 어떤 것이라도 무방하다. 즉, 단순히 물을 사용할 수도 있으나, 모노머와 연속상간의 계면장력을 낮춰 주어 모노머 제트스트림을 길게 형성 시키는 데 보다 유리하도록 계면활성제 수용액을 사용하는 것이 보다 바람직하다. 상기 계면활성제는 이온성, 비이온성의 어떠한 것을 사용하여도 무방하며 당업자라면 종래의 계면활성제 중 어느 것이나 선정하여 사용하는 데 어려움이 없으므로 구체적인 종류는 별도로 기재하지 않는다. 계면활성제의 농도는 1~10 %(w/w)인 것이 바람직하다.

[23] 서로 혼합되지 않는 모노머와 연속상이 만나면 두 유체가 만나는 부분에서 모노머 액적이 형성되는데, 이때 모노머의 부피유속이 증가함에 따라 모노머 액적은 긴 원통형의 모노머 제트 스트림으로 형태가 바뀌게 된다. 상기 부피유속은 미세유로의 넓이나 연속상의 종류, 연속상의 부피유속에 따라 변화하므로 구체적인 수치로 한정될 수 없음은 당연하다. 또한, 당업자라면 해당 조건에서 모노머가 제트 스트림을 형성하는 모노머의 부피유속을 결정하는 것은 용이할 것이다.

[24] 상기 미세유로에 형성된 모노머 제트 스트림과 연속상의 계면에서 폴리우레탄 모노머의 이소시아네이트기는 연속상에 포함된 물과 반응하여 이산화탄소를 발생시킨다(반응식 1). 이렇게 발생된 이산화탄소 기체는 도 3에 도시하였듯이 모노머 제트 스트림 내부에서 중력 반대 방향인 위쪽으로 떠오르게 되며, 이와 동시에 모노머 제트 스트림은 실시간으로 경화되어 배출된다. 따라서 이산화탄소 기체의 일부는 마이크로 섬유 내부에 갇히고 일부는 위쪽 표면에서 배출 되던 중 경화되어 표면에 작은 구멍(pore)을 형성하게 되어 결과적으로 배출되는 위쪽 표면은 다공성 구조이고, 아래쪽 표면은 비다공성 구조로 되어 있는 마이크로 섬유를 형성하게 된다.

[25] <반응식 1>

[26] $R-NCO + H_2O \rightarrow (RNHCOOH \rightarrow) RNH_2 + CO_2 \uparrow$

[27]

[28] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 고분자 마이크로 섬유를 제조할 수 있는 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명의 고분자 마이크로 섬유(3) 제조장치(100)는 도 2에 도시한 것과 같이 모노머가 주입되는 모노머 주입구(1a), 연속상이 주입되는 연속상 주입구(1b), 상기 모노머와 상기 연속상이 접촉되는 접합점(2a), 접촉된 모노머와 연속상이 흐르는 미세유로(2)와 미세유로의 말단에 형성되어 접촉된 모노머와 연속상이 배출되는 배출구(2b)로 이루어진 미세유체 칩; 상기 미세유체 칩이 내부에 놓여지는 수조(5); 및 상기 미세유체 칩의

미세유로에 자외선을 조사하는 자외선 조사 수단(6);으로 이루어진다.

[29]

[30] 상기 미세유체 칩에서 미세유로의 폭은 제조하고자 하는 마이크로 섬유의 두께, 모노머의 종류에 따라 적절히 조절하는 것이 가능할 것이나, 50~300 μ m인 것이 바람직하다. 미세유로의 폭이 너무 넓다면 미세유로 내에서 균일한 모노머 제트스트림을 유지하기 위해 보다 많은 양의 연속상을 주입해 주어야 하고, 폭이 너무 좁은 경우 미세유로의 벽면에 모노머 제트스트림이 접촉하게 되어 자외선 조사에 의해 경화된 모노머 제트스트림이 미세유로를 막게 되는 문제점이 있다. 본 발명에서 자외선의 조사는 미세유로의 일부분에 집중적으로 이루어지므로 미세유로의 길이는 반응에 크게 영향을 미치지 않는다.

[31]

[32] 상기 수조는 미세유체 칩으로부터 배출되는 광경화된 고분자 마이크로 섬유와 연속상이 담겨지게 된다. 이때 수조에는 상기 마이크로 섬유 제조 시에 사용되는 연속상이 미리 담겨있어 배출구(2b)를 경계로 미세유체 칩 내부와 외부의 조건이 급격히 변화하지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[33] 도 3에 도시된 것과 같이 모노머 주입구(1a) 및 연속상 주입구(1b)는 각각 2개로 구성될 수 있다. 서로 대칭으로 위치한 2개의 연속상 주입구를 이용하게 되면 주입된 모노머의 흐름에 좌우로 균일한 전단력을 가해줄 수 있기 때문에 모노머 제트스트림을 형성시키는데 보다 유리하다. 한편, 2개의 모노머 주입구를 통해 서로 다른 성질을 가진 두 종류의 모노머를 각각의 주입구로 주입해 주게 되면, 양면이 서로 다른 성질을 가지는 마이크로 섬유를 제조할 수 있다. 실시 예에서와 같이 한가지 종류의 모노머를 이용하는 경우에는 모노머 주입구를 1개로 하는 것과 2개로 하는 것은 결과에 큰 영향을 미치지 않는다.

[34] 또한 상기 미세유체 칩의 배출구가 수직방향을 향하는 경우 자외선에 의해 경화된 마이크로 섬유가 미세유로에 막힐 수 있으므로 이를 방지하기 위해 상기 배출구는 수평방향을 향해 있는 것이 바람직하다.

[35]

[36] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 조직공학용 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유에 관한 것이다. 상기 고분자 마이크로 섬유는 도 4 내지 도 6에서 확인할 수 있듯이 균일한 두께를 가지며 표면의 절반은 다공성 구조이고 나머지 절반은 비다공성인 야누스 구조를 갖는다. 마이크로 섬유의 절반인 다공성 구조는 세포의 부착과 성장이 용이하도록 하며, 비다공성 구조를 가지는 나머지 절반의 표면은 마이크로 섬유의 기계적인 강도를 좀 더 강하게 유지하여 본 발명에 의해 제조된 마이크로 섬유가 조직공학용 지지체로 보다 적합한 특성을 나타내도록 한다.

[37]

본 발명의 고분자 마이크로 섬유를 세포 배양 지지체로 사용하여 NH3T3 세포를 배양한 결과, 초반에는 마이크로 섬유의 다공성 표면에 세포가 부착되기 시작하여 36시간 이후에는 비다공성 표면까지 세포가 부착되었으며 장기간

배양시에도 세포가 성장하는 것을 확인하였다. 또한 상기 고분자 마이크로 섬유가 교차되는 부분에서는 얇은 막 형태로 뻗어서 성장하여 배양 시간이 경과할수록 막의 거리가 점차 넓어져 2D 형태의 세포 배양 뿐 아니라 3D 형태의 세포 배양과 연구에 응용될 수 있음을 확인하였다.

[38]

발명의 효과

[39] 이상과 같이 본 발명의 제조방법 및 제조장치에 의하면, 상온, 상압에서 세포에 독성을 미치는 휘발성 용매를 사용하지 않고 간단한 공정에 의해 균일한 두께의 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유를 연속적으로 제조할 수 있다.

[40] 또한 본 발명에 의한 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유는 폴리우레탄의 우수한 기계적 강도를 유지하며 다공성 표면 구조로 인해 세포의 부착 및 성장이 용이하여 별도의 표면처리를 하지 않아도 조직공학 분야의 세포배양 지지체로 이용될 수 있다.

[41] 또한 본 발명에 의한 고분자 마이크로 섬유가 교차되는 부분에서는 세포가 얇은 막 형태로 뻗어서 성장되므로 2D 형태의 세포 배양 뿐 아니라 3D 형태의 세포 배양과 연구에 응용될 수 있다.

[42]

도면의 간단한 설명

[43] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유의 형성 메카니즘을 보여주는 모식도와 반응식.

[44] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 섬유 제조장치의 단면도.

[45] 도 3은 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로 섬유 제조장치의 사시도.

[46] 도 4는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유의 광학현미경 사진.

[47] 도 5는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유의 표면구조를 보여주는 주사전자현미경 사진.

[48] 도 6은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유의 단면 구조를 보여주는 주사전자현미경 사진.

[49] 도 7은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유를 세포배양용 지지체로 사용하여 세포를 배양 했을 때의 배양 시간 별 형광현미경, 광학현미경, 주사전자현미경 사진.

[50] 도 8은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유를 세포배양용 지지체로 사용하여 세포를 배양 했을 때 배양 시간 별로 다공성 구조의 표면과 비다공성 구조의 표면에서 각각 세포가 차지하는 면적 비율을 나타낸 그래프.

[51] 도 9는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유를 세포배양용 지지체로 사용하여 세포를 배양 했을 때 배양 시간별로 세포의 생존율을 나타낸 그래프.

[52] 도 10은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유를 세포배양용 지지체로 사용하여 세포를 장기간 배양 했을 때의 각 배양 시간별 광학현미경

사진.

- [53] 도 11은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 마이크로 섬유를 세포배양용 지지체로 사용하여 세포를 배양 했을 때 마이크로 섬유가 교차되는 부분에 세포가 성장하여 형성한 막의 최대 거리를 배양 시간별로 나타낸 그래프.

[54]

- [55] **도면 중 주요부분에 대한 부호의 설명**

- [56] 100 : 마이크로 섬유 제조장치

- [57] 1a : 모노머 주입구 1b : 연속상 주입구

- [58] 2 : 미세 유로

- [59] 2a : 연속상과 모노머의 접합점 2b : 배출구

- [60] 3 : 고분자 마이크로 섬유

- [61] 4 : 연속상

- [62] 5 : 수조

- [63] 6 : 자외선 조사 수단

[64]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [65] 이하 첨부된 도면 및 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[66]

- [67] 실시예 1 : 마이크로 섬유 제조장치의 제작

- [68] 미세유체 장비는 도 2와 같이 두개의 주입구(1a, 1b)와 하나의 배출구(2b)를 갖는 미세유로를 갖도록 고안되었다. 실리콘 웨이퍼 위에 네가티브형 감광제(SU-8, Microchem Co., USA)를 고르게 도포한 후, 1,000rpm으로 스핀 코팅하여 100 μm 높이의 감광제를 올려주었다. 폭이 200 μm 인 미세유로 형상이 있는 마스크를 통해 UV를 조사하여 채널과 반대 형상을 갖는 마스터 몰드를 제작하였다. 이후, PDMS(Polydimethylsiloxane) (Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI)를 제작된 마스터 몰드에 부어준 후 65°C에서 4시간경화시켜 원하는 형상의 미세유로를 가진 PDMS 몰드를 제작하였다. 이렇게 만들어진 PDMS 몰드에 유리 기판을 산소 플라즈마 처리를 통해 붙여 마이크로 섬유 제조용 미세유체 칩(100)을 제작하였다. 두개의 주입구에는 구멍을 통해 타이곤튜브(Tygon tube)가 삽입되어 있으며, 각각의 튜브에는 마이크로시린지(Norm-Ject, Germany)가 연결되어 각각 시린지 펌프(Harvard Apparatus, USA)를 사용하여 해당 용액을 미세유로로 펌핑할 수 있도록 한다. 상기 미세유체 칩(100)을 미리 준비된 연속상(4)이 차있는 수조(5)에 넣었다. 자외선 조사 장치로 형광현미경에 연결된 자외선 램프를 이용하기 위하여 상기

수조를 현미경(NIKON, T2000-U, Japan) 스테이지위에 올려 놓고 연속상과 모노머의 흐름이 교차되어 모노머 제트스트림이 형성되는 부분에 자외선이 조사될 수 있도록 위치시켜 마이크로 섬유 제조장치를 완성하였다.

[69]

[70] 실시예 2 : 다공성 표면을 갖는 고분자 마이크로 섬유의 제조

[71] 실시예 1에서 제조한 미세유체 장비를 사용하여 현미경에 장착된 365nm의 자외선 램프(Osram, Germany)에 의해 자외선을 조사하면서 주입구 중 한 곳(1a)으로, 5% SDS 수용액을 시린지 펌프를 이용하여 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 주입하였다. 미세유로(2)가 SDS 수용액으로 완전히 채워지면 SDS 수용액을 계속 주입하면서 다른 쪽 주입구(1b)로 NOA63(Norland optical adhesive 63)을 별개의 시린지 펌프를 이용하여 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 동시에 주입하였다. NOA63은 모노머로서 폴리우레탄의 전구체가 주성분을 이루며 자외선에 의해 고형화되는 접착제이다.

[72] 도 4는 상기 방법에 의해 제조된 폴리우레탄 마이크로 섬유의 현미경(NIKON, T2000-U, Japan) 사진으로, 섬유간 유착이 발생하지 않고 약 50 μm 직경의 균일한 두께를 갖는 마이크로 섬유가 제조된 것을 확인할 수 있었다.

[73] 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, TOPCON SM-500, Japan)으로 제조된 마이크로 섬유의 표면구조와 내부 단면을 관측하고 도 5 및 도 6에 그 사진을 각각 도시하였다. 도 5에서 확인할 수 있듯이 제조된 섬유의 사진을 통하여 본 발명에 의해 제조된 폴리우레탄 마이크로 섬유의 표면구조와 내부 단면 구조를 확인하였다(도 5, 6). 그 결과, 본 발명에 의해 제조된 섬유의 길이 방향에 대해 수직인 단면의 절반은 다공성 구조, 나머지 절반은 구멍이 없는 매끈한 표면을 가지는 마이크로 섬유라는 것을 확인하였다.

[74]

[75] 실시예 3 : 마이크로 섬유를 지지체로 한 세포 배양

[76] 실시예 2에서 제조한 폴리우레탄 마이크로 섬유를 지지체로 NIH3T3 세포를 배양하여 조직공학용 지지체로서 적합한 특성을 갖는지 확인하였다.

[77] 먼저 실시예 2에서 제조한 마이크로 섬유를 70% 에탄올로 세척하여 살균한 후 건조하였다. 세포배양용 dish 안에 마이크로 섬유를 넣고, 그 위에 NIH3T3 세포가 분산되어 있는 배지 용액을 부어 섬유 표면에 세포가 부착이 되도록 하였다. 여기서 배지는 FBS (fetal bovine serum), 페니실린(penicillin), 그리고 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하고 있는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)을 사용하였다. 세포는 5% 이산화탄소와 37°C 온도조건이 유지되는 세포배양용 인큐베이터(Sanyo CO₂ incubator MCD-18AIC, Japan)에서 배양하였다.

[78] 배양 시간대 별로 세포가 마이크로 섬유에 부착되어 성장하는 과정과 세포의 생존 여부를 광학 및 형광현미경(NIKON, T2000-U, Japan) 및 주사전자현미경(TOPCON SM-500, Japan)으로 관측하고 그 사진을 도 7에

도시하였다. 또한, 배양 시간에 따른 세포의 부착 면적 비율을 마이크로 섬유의 다공성 영역과 비다공성 영역으로 나누어 계산하고 그 결과를 도 8의 그래프에 나타내었다. 도 7과 도 8에서 확인할 수 있듯이, 세포 배양 초기에는 세포가 마이크로 섬유의 다공성 표면에 부착하여 성장하다가 배양 36시간 이후부터 다공성 구조가 없는 표면까지 옮겨가 성장이 일어나고, 108시간 이후부터는 마이크로 섬유의 대부분의 표면에 세포가 부착되어 성장하였다. 도 9는 형광현미경을 이용한 세포의 Live/Dead Assay를 통해 계산한 세포의 생존율을 배양시간에 따라 나타낸 그래프로, 생존해 있는 세포가 녹색으로 형광을 띄는 것을 확인함으로써 120시간 후에도 90% 이상의 대부분의 세포가 생존해 있음을 확인하였다.

- [79] 배양기간을 장기화하여 배양하며 광학현미경을 통해 성장을 확인한 결과, 배양 15일 동안 세포가 지지체 위에서 잘 성장하는 것을 확인하였고, 고분자 마이크로 섬유가 교차되는 부분에서는 얇은 막 형태로 뻗어서 성장하는 것을 볼 수 있었다(도 9). 도 10은 배양 기간에 따라 고분자 마이크로 섬유 사이에 형성되는 막의 거리를 측정한 그래프로 막의 거리 역시 15일의 배양기간 동안 점점 넓어지는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명으로 만들어진 고분자 마이크로 섬유 지지체가 2D 형태의 세포 배양 뿐 아니라 3D 형태의 세포 배양과 연구에 응용될 수 있음을 확인하였다.

[80]

산업상 이용가능성

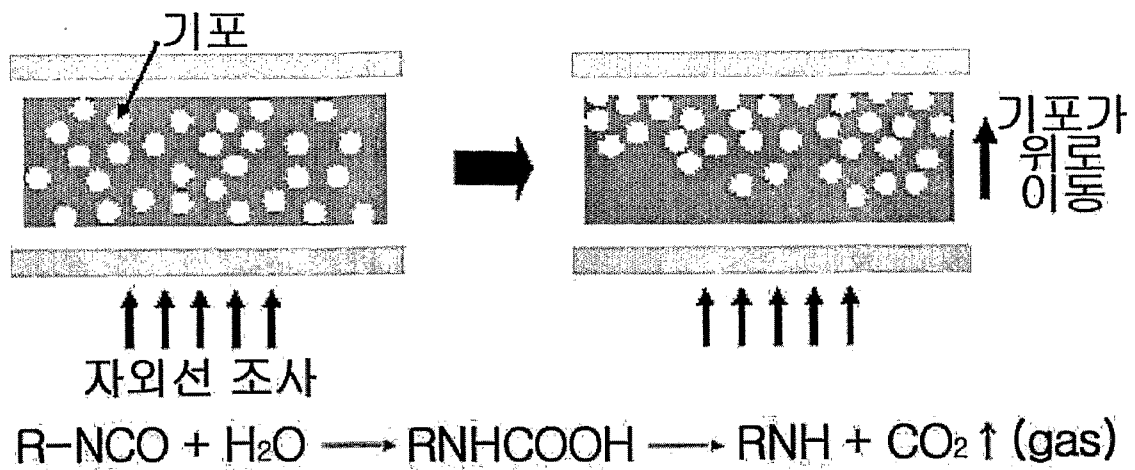
- [81] 본 발명의 제조방법 및 제조장치에 의해 제조된 고분자 마이크로 섬유는 폴리우레탄의 우수한 기계적 강도를 유지하며 세포에 독성을 미치는 용매가 잔류하지 않고 다공성 표면 구조로 인해 세포의 부착 및 성장이 용이하여 별도의 표면처리를 하지 않아도 조직공학 분야의 세포배양 지지체로 이용될 수 있다.

청구범위

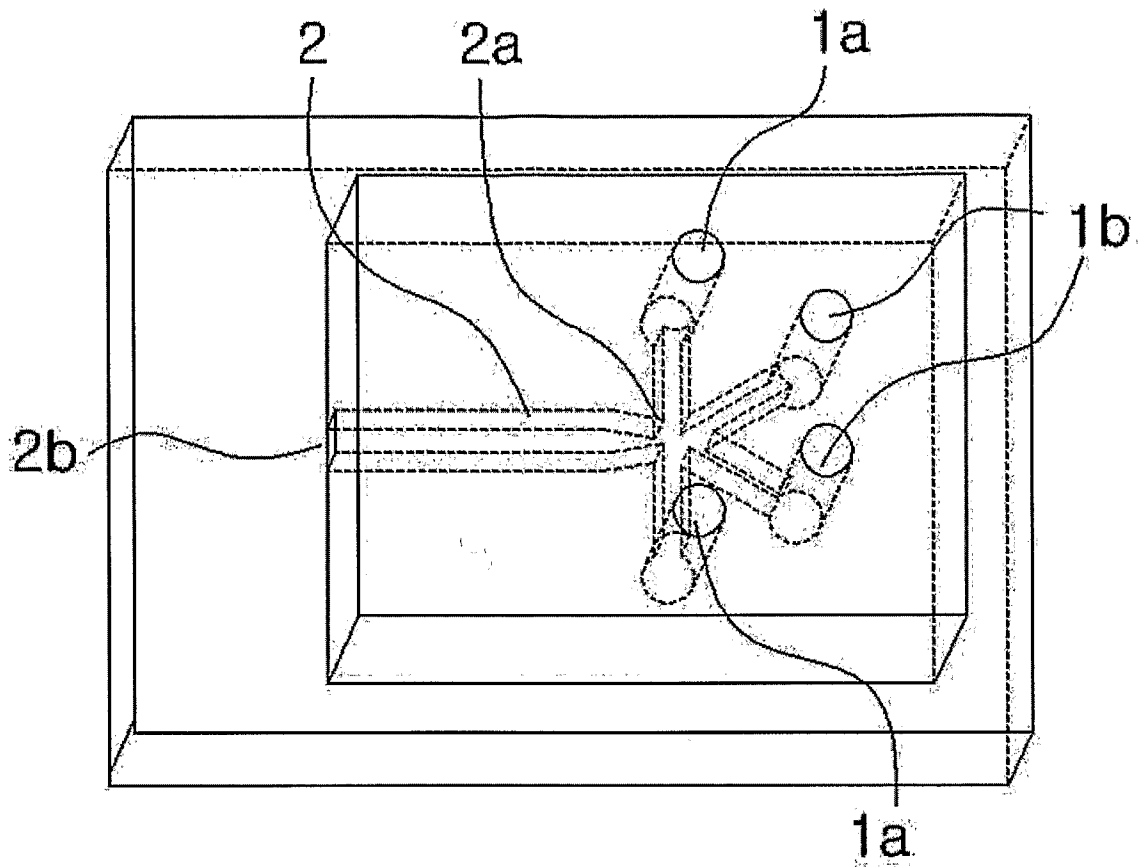
- [청구항 1] 광중합성 폴리우레탄 모노머와 상기 모노머와 혼합되지 않는 수용액 연속상을 미세유로에 모노머 제트 스트림이 형성되도록 동시에 연속 주입하면서, 미세유로에 자외선을 조사하여 광경화된 모노머가 연속상으로 배출되도록 하는 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 모노머의 주입 전에 상기 연속상 수용액으로 미세유로를 먼저 채우는 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 광중합성 폴리우레탄 모노머는 광개시제와 폴리우레탄 모노머의 혼합물인 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 4] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 광중합성 폴리우레탄 모노머는 NOA63(Norland optical adhesive 63)인 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 5] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 연속상은 계면활성제 수용액인 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 6] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 고분자 마이크로 섬유는 배출되는 위쪽 표면은 다공성 구조이고, 아래쪽 표면은 비다공성 구조인 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유의 제조방법.
- [청구항 7] 모노머가 주입되는 모노머 주입구(1a), 연속상이 주입되는 연속상 주입구(1b), 상기 모노머와 상기 연속상이 집속되는 집합점(2a), 집속된 모노머와 연속상이 흐르는 미세유로(2)와 미세유로의 말단에 형성되어 집속된 모노머와 연속상이 배출되는 배출구(2b)로 이루어진 미세유체 칩; 상기 미세유체 칩이 내부에 놓여지는 수조(5); 및 상기 미세유체 칩의 미세유로에 자외선을 조사하는 자외선 조사 수단(6); 으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제 1 항의 방법에 의해 고분자 마이크로 섬유를 제조하기 위한 마이크로 섬유 제조장치(100).

- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 수조에는 상기 연속상이 미리 채워지는 것을 특징으로 하는
마이크로 섬유 제조장치.
- [청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 모노머 주입구(1a) 및 연속상 주입구(1b)는 각각 2개로
구성되는 것을 특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유 제조 장치.
- [청구항 10] 제 7 항에 있어서,
상기 미세유체 칩의 배출구는 수평방향을 향해 있는 것을
특징으로 하는 고분자 마이크로 섬유 제조 장치.
- [청구항 11] 제 1 항의 방법에 의해 제조된 고분자 마이크로 섬유의 조직공학용
지지체로서의 용도.

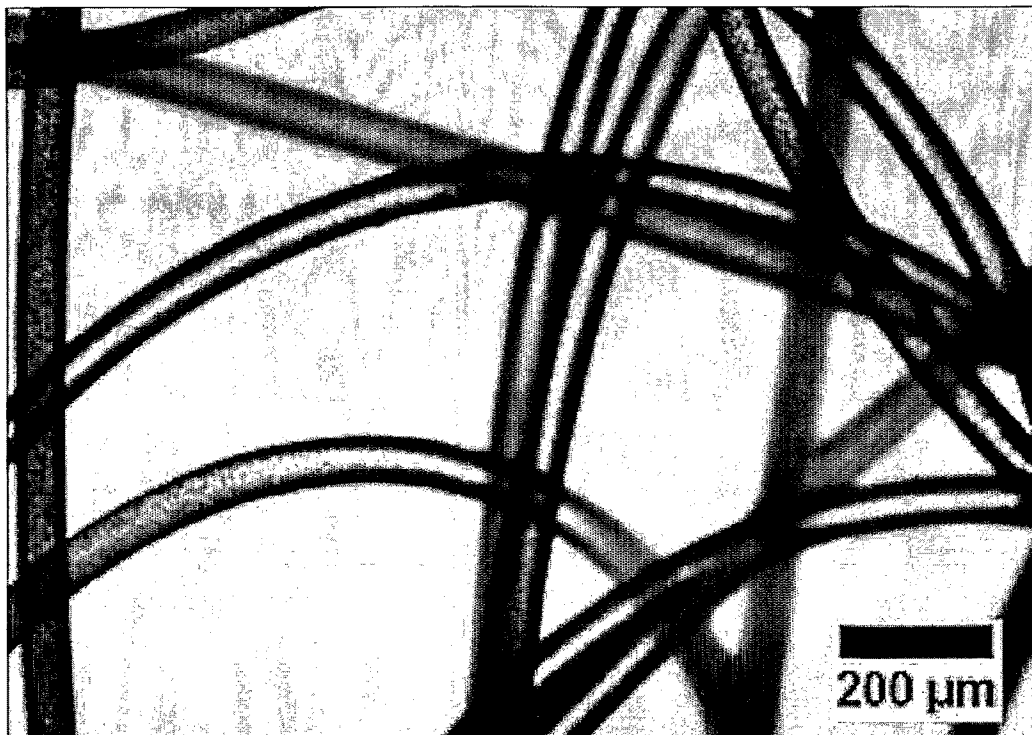
[Fig. 1]



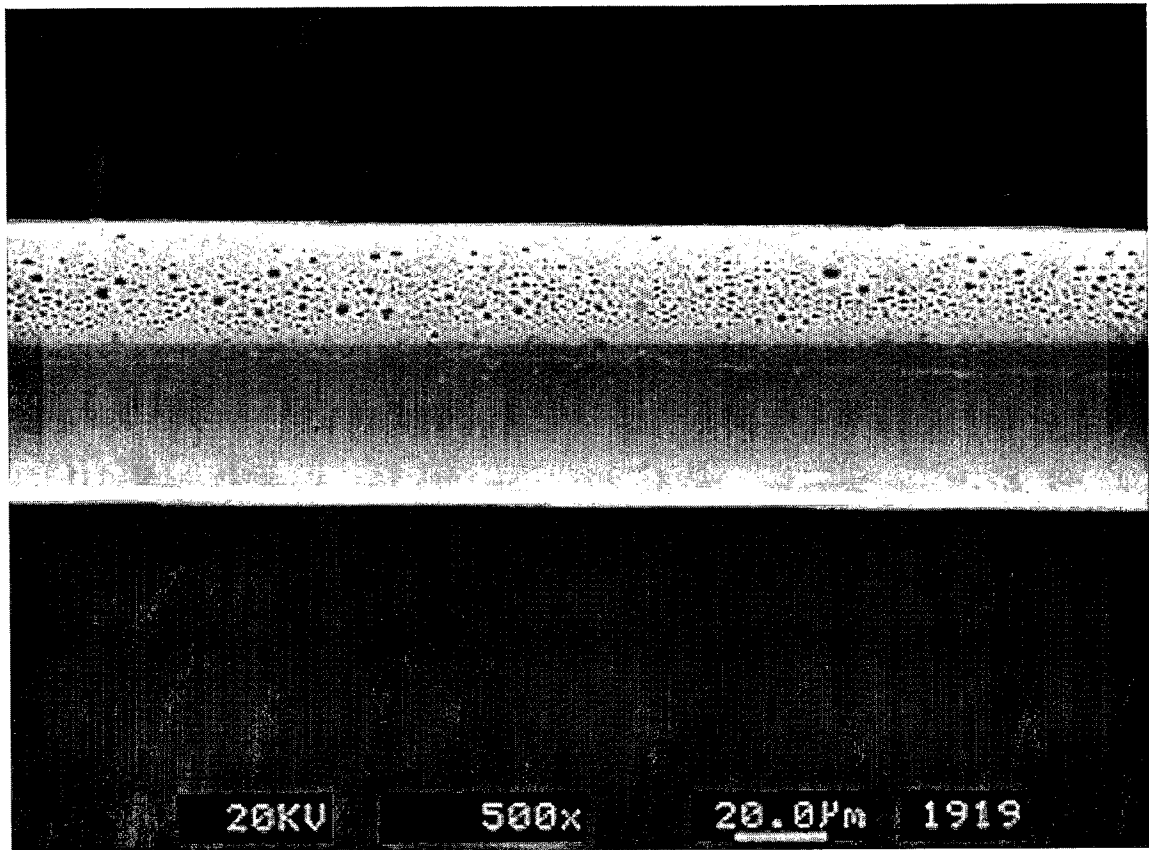
[Fig. 3]



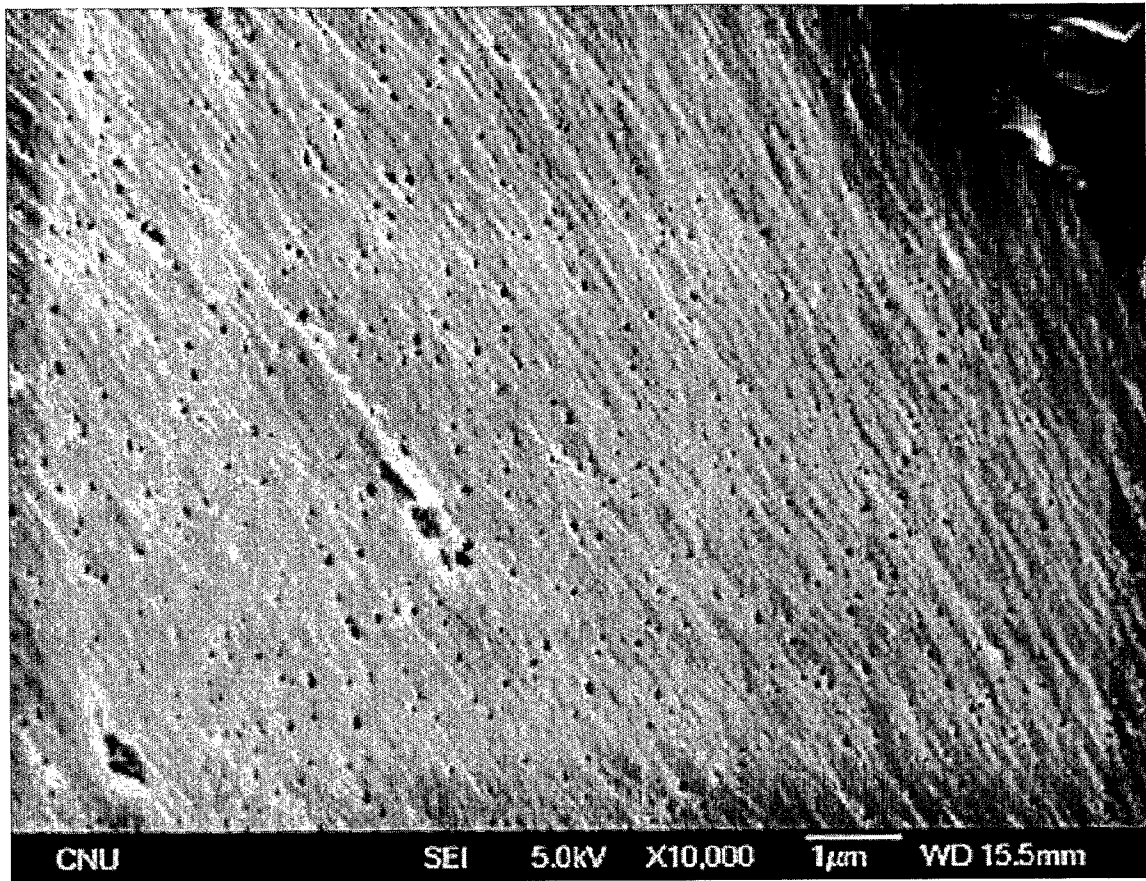
[Fig. 4]



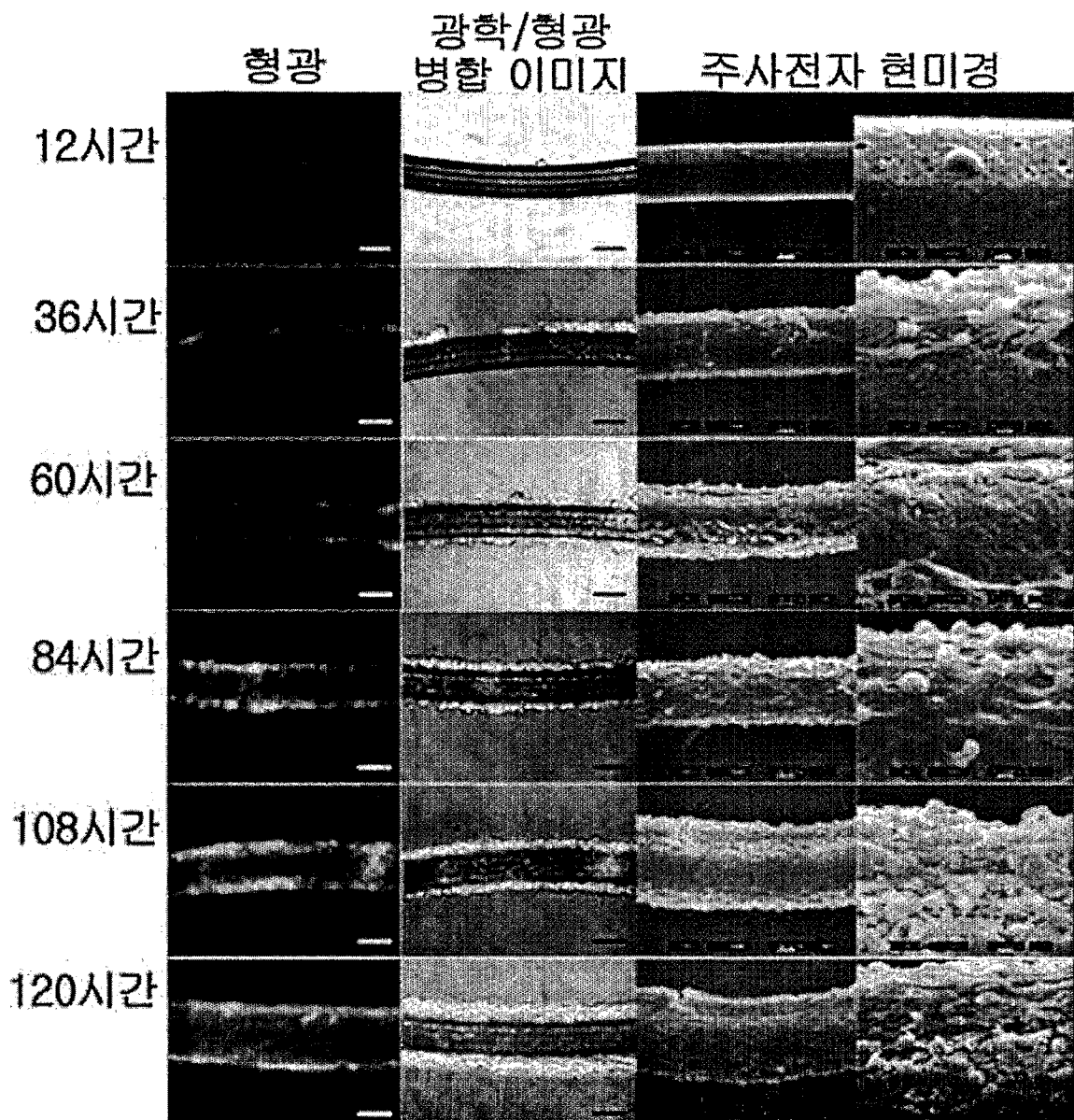
[Fig. 5]



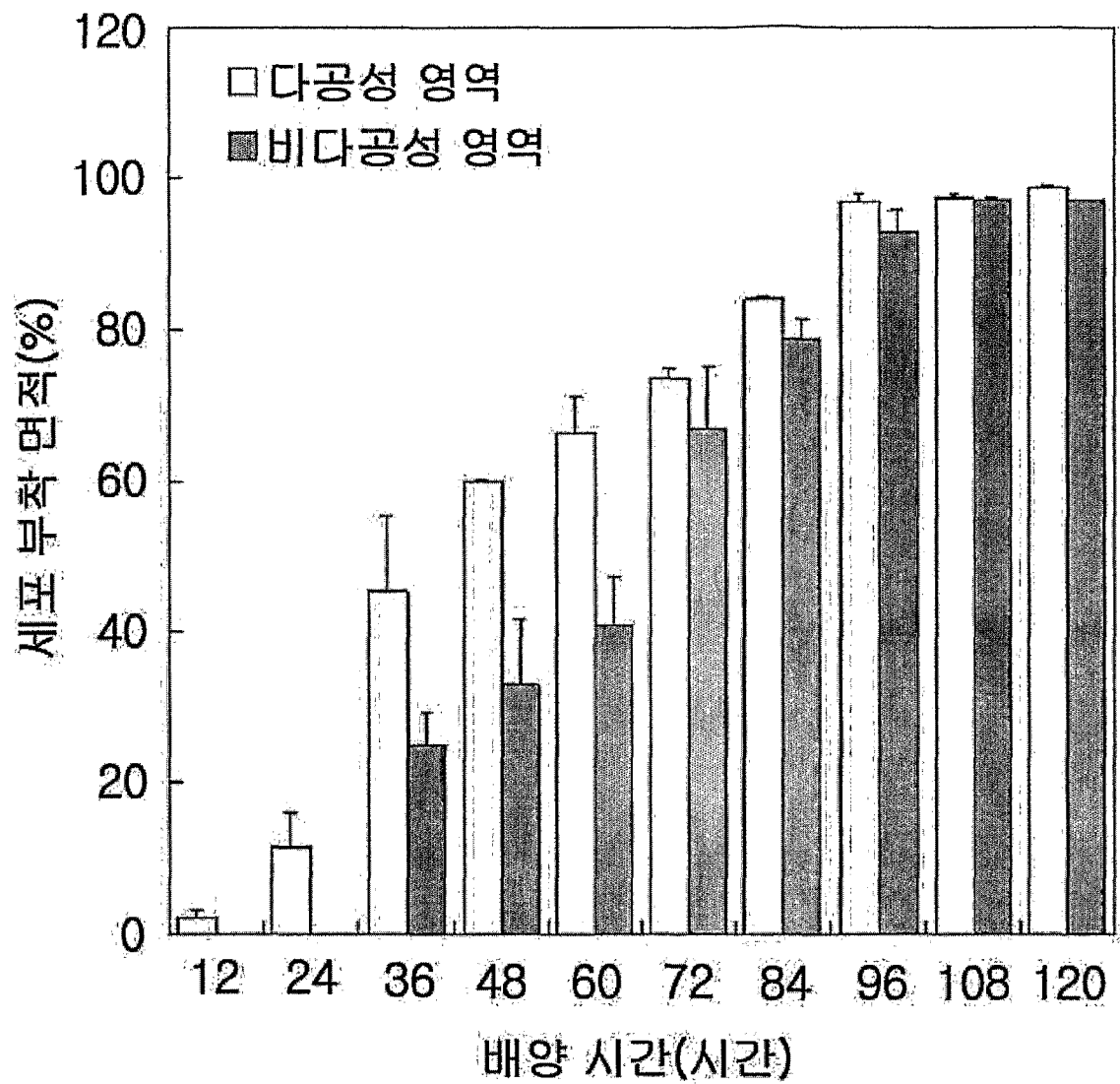
[Fig. 6]



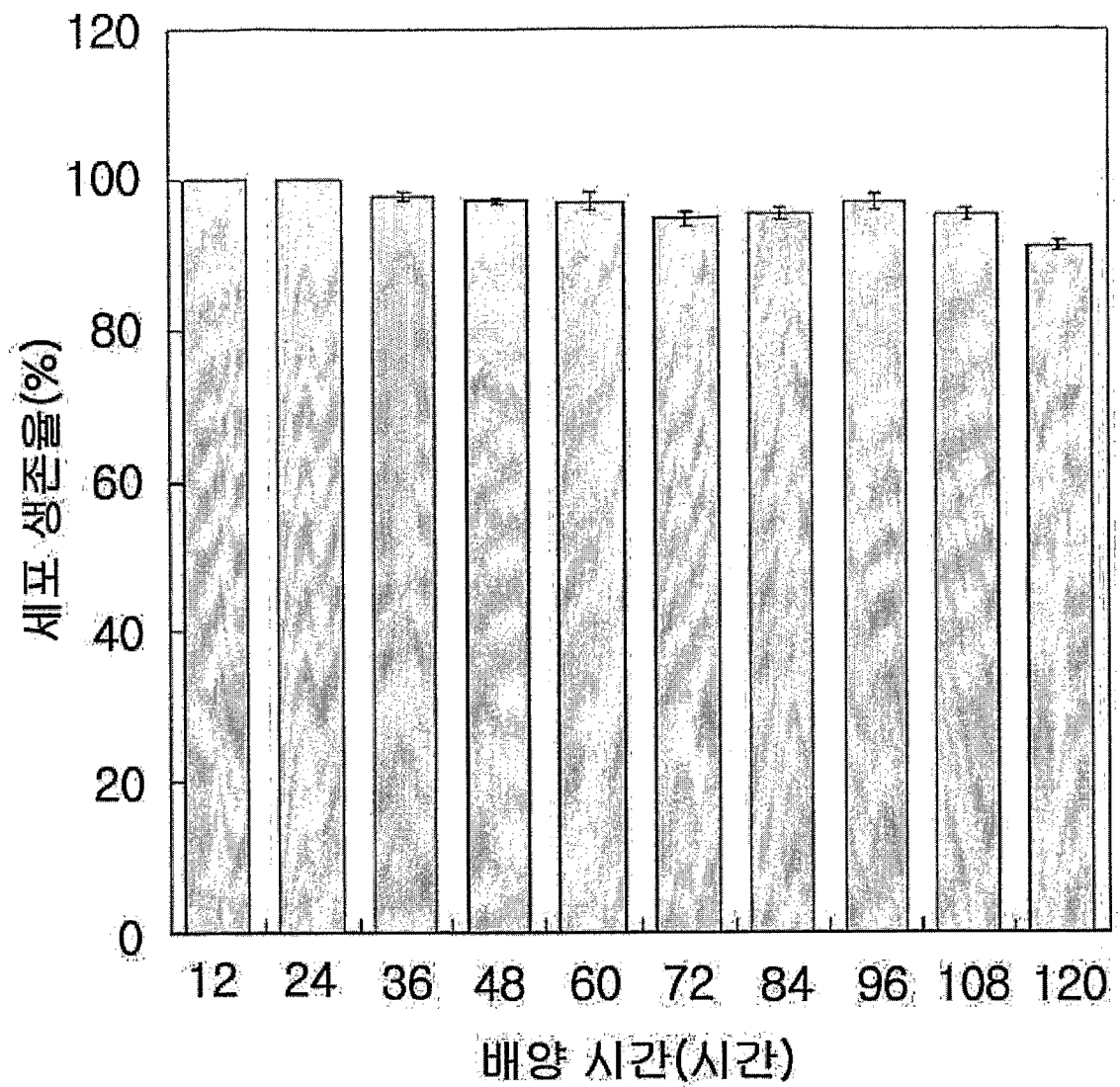
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

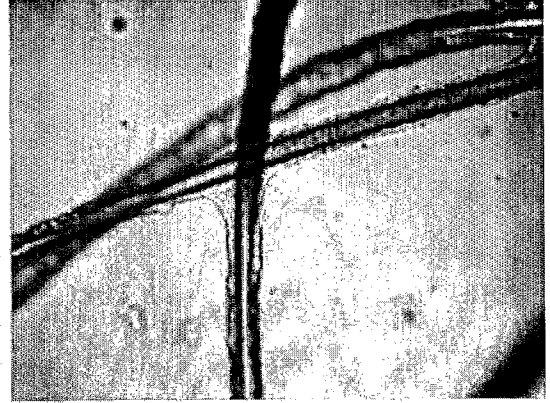


[Fig. 10]

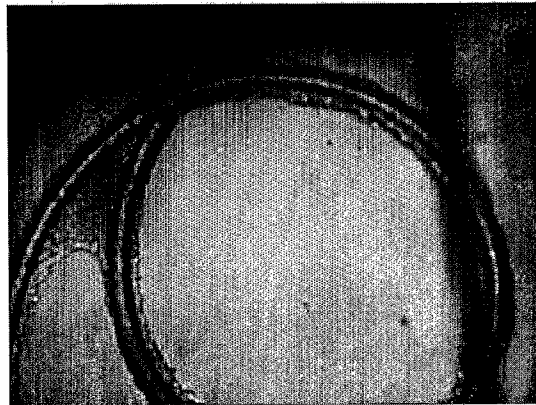
2일



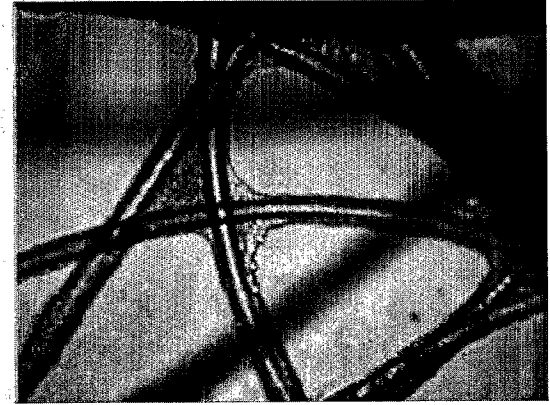
5일



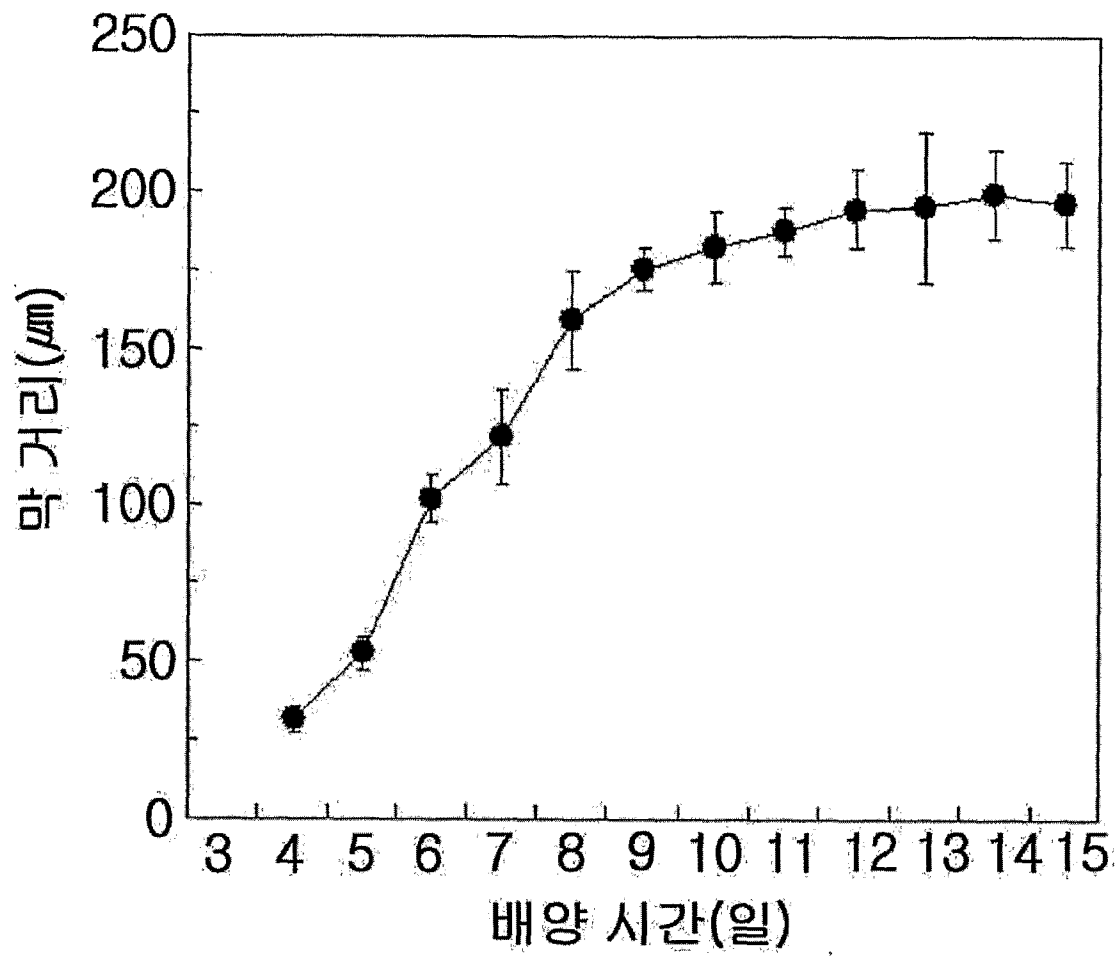
8일



15일



[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/005716**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61L 27/14(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/14; D01D 5/00; A61F 2/02; A61F 2/06; G03F 7/00; D01D 5/26; C01B 31/02; G03F 7/20; C01B 3/22; H05B 6/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: microchannel, ultraviolet rays, support member, polyurethane, jet stream

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lab Chip, 2004, 4, 576-580 See pages 1-3; figures 1-3.	1-11
A	KR 10-0740169 B1 (POSTECH FOUNDATION) 16 July 2007 See claims 1-12 and figures 1, 2, 4-6.	1-11
A	KR 10-2008-0070684 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 30 July 2008 See claims 1, 2 and figures 1, 2.	1-11
A	KR 10-2002-0060687 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 18 July 2002 See claim 1 and figures 1-7.	1-11
A	KR 10-2004-0016320 A (SAMSHIN CREATION CO., LTD.) 21 February 2004 See claim 1 and figures 1-3.	1-11
E	KR 10-2010-0016802 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 16 February 2010 See claims 1-13 and figures 1, 2.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 NOVEMBER 2010 (03.11.2010)

Date of mailing of the international search report

04 NOVEMBER 2010 (04.11.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/005716

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0740169 B1	16.07.2007	NONE	
KR 10-2008-0070684 A	30.07.2008	AU 2006-306204 A1 CA 2626799-A1 EP 1946186 A2 JP 2009-513789 A WO 2007-050704 A2 WO 2007-050704 A3	03.05.2007 03.05.2007 23.07.2008 02.04.2009 03.05.2007 03.05.2007
KR 10-2002-0060687 A	18.07.2002	AU 2000-61177 A1 CA 2380075 C CA 2380075-A1 EP 1214630 A2 JP 2003-505260 A WO 01-07506 A2 WO 01-07506 A3	13.02.2001 29.05.2007 01.02.2001 19.06.2002 12.02.2003 01.02.2001 01.02.2001
KR 10-2004-0016320 A	21.02.2004	AU 2003-247181 A1 JP 04-129261 B2 JP 2005-534828 A US 2005-0233021 A1 US 7351052 B2 WO 2004-016839 A1	03.03.2004 06.08.2008 17.11.2005 20.10.2005 01.04.2008 26.02.2004
KR 10-2010-0016802 A	16.02.2010	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/14; D01D 5/00; A61F 2/02; A61F 2/06; G03F 7/00; D01D 5/26; C01B 31/02; G03F 7/20; C01B 3/22; H05B 6/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세유로, 자외선, 지지체, 폴리우레탄, 제트 스트림

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Lab Chip, 2004, 4, 576-580 페이지 1-3; 도면 1-3 참조.	1-11
A	KR 10-0740169 B1 (학교법인 포항공과대학교) 2007.07.16 청구항 1-12 및 도면 1,2,4-6 참조.	1-11
A	KR 10-2008-0070684 A (메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지) 2008.07.30 청구항 1,2 및 도면 1,2 참조.	1-11
A	KR 10-2002-0060687 A (보드 오브 트러스티스 오브 유니버시티 오브 일리노이즈) 2002.07.18 청구항 1 및 도면 1-7 참조.	1-11
A	KR 10-2004-0016320 A ((주)삼신크리에이션) 2004.02.21 청구항 1 및 도면 1-3 참조.	1-11
E	KR 10-2010-0016802 A (충남대학교산학협력단) 2010.02.16 청구항 1-13 및 도면 1,2 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2010년 11월 03일 (03.11.2010)

국제조사보고서 발송일

2010년 11월 04일 (04.11.2010)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

고태욱

전화번호 82-42-481-8655



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-0740169 B1

2007.07.16

없음

KR 10-2008-0070684 A

2008.07.30

AU 2006-306204 A1

2007.05.03

CA 2626799-A1

2007.05.03

EP 1946186 A2

2008.07.23

JP 2009-513789 A

2009.04.02

WO 2007-050704 A2

2007.05.03

WO 2007-050704 A3

2007.05.03

KR 10-2002-0060687 A

2002.07.18

AU 2000-61177 A1

2001.02.13

CA 2380075 C

2007.05.29

CA 2380075-A1

2001.02.01

EP 1214630 A2

2002.06.19

JP 2003-505260 A

2003.02.12

WO 01-07506 A2

2001.02.01

WO 01-07506 A3

2001.02.01

KR 10-2004-0016320 A

2004.02.21

AU 2003-247181 A1

2004.03.03

JP 04-129261 B2

2008.08.06

JP 2005-534828 A

2005.11.17

US 2005-0233021 A1

2005.10.20

US 7351052 B2

2008.04.01

WO 2004-016839 A1

2004.02.26

KR 10-2010-0016802 A

2010.02.16

없음