



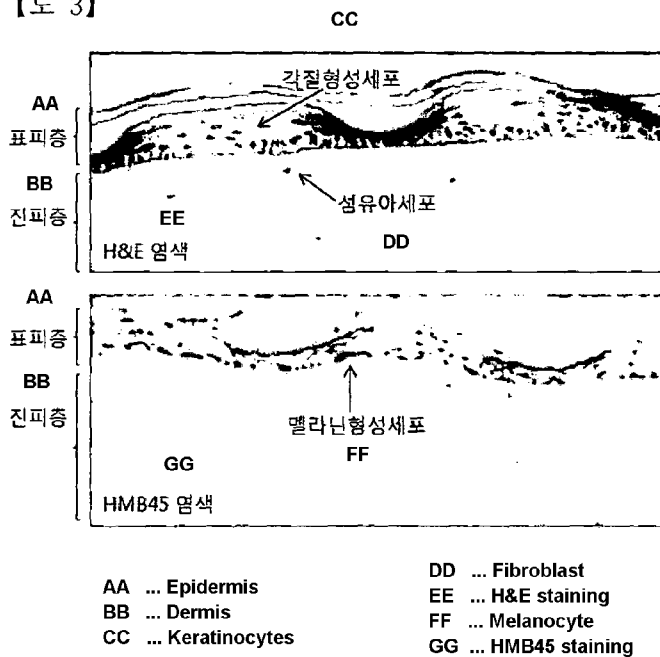
- (51) 국제특허분류: A61L 27/38 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
A61F 2/10 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009710
- (22) 국제출원일: 2012년 11월 16일 (16.11.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0122623 2011년 11월 23일 (23.11.2011) KR
- (71) 출원인: 주식회사 아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강로 2가 181 번지, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 민대진 (MIN, Dae Jin); 446-904 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, Gyeonggi-do (KR). 이성훈 (LEE, Sung Hoon); 446-904 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, Gyeonggi-do (KR). 나용주 (NA, Yong Joo); 446-904 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, Gyeonggi-do (KR). 배지현 (BAE, Ji Hyun); 446-904 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, Gyeonggi-do (KR). 조준철 (CHO, Jun Cheol); 446-904 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 윤동열 (YOON, Dong Yol); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 226 에이스 하이엔드타워 5차 3층 윤앤리 특허 법률 사무소, Seoul (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ARTIFICIAL SKIN CONTAINING MELANIN PRODUCING CELLS, AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭 : 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부 및 이의 제조방법

[도 3]



(57) Abstract: The present invention relates to artificial skin containing fibroblasts, keratinocytes, and melanin producing cells, and can provide an artificial skin model that contains melanin producing cells, in order to simultaneously perform research in various areas such as the irritation, whitening, and ageing of skin. Also, the artificial skin of the present invention provides an artificial skin characterized by comprising a dermis including at least two layers and which has little histological change due to dermal contraction, so that no physiological side effects can occur, thereby providing an artificial skin model having high correlation with the human body.

(57) 요약서: 본 발명은 섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부에 관한 것으로, 멜라닌형성세포를 함유함으로써 피부 연구에 대하여 자극, 미백 및 노화와 같은 다양한 영역의 연구를 동시에 행할 수 있는 인공피부 모델을 제공할 수 있다. 또한 본 발명의 인공피부는 진피층을 2 이상의 층을 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부를 제공하여 진피 수축 현상으로 인한 조직학적 변형이 적어 생리적 부작용이 없으며, 인체 상관성이 높은 인공피부 모델을 제공할 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】**【발명의 명칭】**

멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부 및 이의 제조방법

【기술분야】

본 발명은 섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부에 관한 것으로, 멜라닌형성세포를 함유함으로써 피부 연구에 대하여 자극, 미백 및 노화와 같은 다양한 영역의 연구를 동시에 행할 수 있는 인공피부 모델을 제공할 수 있다. 또한 본 발명의 인공피부는 진피층이 2 이상의 층을 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부를 제공하여 진피 수축 현상으로 인한 조직학적 변형이 적어 생리적 부작용이 없으며, 인체 상관성이 높은 인공피부 모델을 제공할 수 있다.

【배경기술】

인간의 피부는 크게 진피층과 표피층으로 나눌 수 있으며, 진피층은 콜라겐과 섬유아세포로 표피층은 각질형성세포와 멜라닌형성세포(melanocyte)로 구성되어 있다

섬유아세포는 콜라겐을 생성하여 진피층의 유지와 보수에 중요한 역할을 하고, 각질형성세포는 각질층으로 둘러싸인 표피층을 생성함으로써 피부의 장벽기능 유지에 핵심적인 역할을 한다. 또한 멜라닌형성세포는 자외선을 흡수함으로써 피부를 자외선에 의한 손상에서 보호하고, 특정한 피부톤을 나타내는 역할을 한다.

피부는 이와 같은 다양한 세포들과 구성물질들의 복합체이며, 이 세포들의 끊임 없는 상호작용에 의해서 그 형태와 기능을 유지한다. 이와 같은 피부의 구조적, 기능적인 복잡성 때문에 한 종류의 피부세포를 이용한 피부 연구는 한계를 가지게 되며 이를 극복하고자 개발한 3차원적 구조의 피부 모델이 인공피부이다.

본 발명에서의 인공피부는 피부세포와 피부 구성물질(콜라겐, 엘라스틴 등)을 이용하여 3차원적으로 피부를 재구성한 것으로서, 살아있는 섬유아세포와 각질형성세포로 구성되어 실제 피부와 유사한 형태학적, 생리학적 특성을 나타내기 때문에 피부 모사체(skin equivalent 또는 reconstructed skin)라고도 불린다. 우리말로 인공피부로 혼용되고 있는 artificial skin은 주로 피부와 비슷한 물성(탄력, 강도, 물질 투과 등)을 나타내는 고분자 복합체들을 일컫는 것으로서, 본 발명의 인공피부와 달리 피부와 같은 생명현상을 나타내지 않는다는 점에서 차이가 있다.

인공피부는 1980년대 심한 화상으로 피부 이식이 필요하지만, 화상의 정도가 너무 심하거나 환부가 너무 넓어서 자신의 피부만으로는 이식이 불가능한 환자들의 치료 목적으로 개발되었으며, 지속적인 개량과 연구를 통해서 현재는 피부 생리현

구, 피부 자극 평가, 피부 효능평가 등 다양한 영역에서 활용되고 있다.

현재 대부분의 실험실에서 사용하는 인공피부 모델은 진피-표피구조의 인공피부 모델로써, 제작의 복잡성 때문에 멜라닌형성세포(melanocyte) 없이 주로 진피 섬유아세포와 표피 각질형성세포로 구성되어 있다. 또한 현재 세계 인공피부 시장을 지배하고 있는 인공피부 제작, 판매 전문회사인 MatT다사의 모델들도 섬유아세포, 멜라닌형성세포, 각질형성세포를 모두 포함하고 있는 인공피부 모델은 보유하고 있지 않으며, 그 결과 모델의 사용 용도가 제한되어 자극, 미백, 노화의 영역에서 각기 다른 모델을 구입하여 사용해야 하는 한계가 있었다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이와 같은 문제점들을 해결하고자 본 발명자들은 진피-표피 구조에 섬유아세포, 멜라닌형성세포, 각질형성세포를 모두 포함한 인공피부 모델을 이용하면 진피 수축 현상이 개선되어 조직 변형에 의한 생리학적 부작용이 적으며, 인체 상관성이 높고, 피부의 자극, 미백 및 노화 등에 대한 통합적인 연구 수행을 동시에 할 수 있는 인공피부를 제공할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부를 제공하는 것이다. 보다 구체적으로는 본 발명의 목적은 섬유아세포를 포함하는 진피층; 및 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 포함하는 표피층을 함유하는 인공피부를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 1) 콜라겐을 함유하는 제1진피층을 제조하는 단계;

2) 상기 제1진피층에 접촉하여 섬유아세포를 함유하는 제2진피층을 제조하는 단계; 및 3) 상기 제2진피층의 상부에 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제조하는 단계; 를 포함하는 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부의 제조 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부를 제공한다.

또한 본 발명은

1) 콜라겐을 함유하는 제1진피층을 제조하는 단계;

2) 상기 제1진피층에 접촉하여 섬유아세포를 함유하는 제2진피층을 제조하는

단계; 및

3) 상기 제2진피층의 상부에 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제조하는 단계를 포함하는 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부의 제조 방법을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 인공피부는 실제 인체 피부의 3대 구성세포인 섬유아세포, 멜라닌형성세포 및 각질형성세포를 모두 포함함으로써 인공피부 모델의 인체상관성을 높일 수 있으며, 2층 이상의 진피층을 함유함으로써 조직 배양과정에서 나타나는 진피 수축을 억제하여 모델의 안정성 확보함으로써 조직적 변형으로 인한 생리적 변형이나 부작용을 최소화한 인공피부를 제공할 수 있다. 또한 멜라닌형성세포를 함유함으로써 일반 피부 생리 연구뿐 아니라 기존 모델에서는 불가능한 미백과 노화 연구의 동시 수행이 가능하며, 광노화에 대한 연구에 적합한 인공피부를 제공할 수 있다. 따라서 이러한 인공피부 모델을 이용함으로써 피부활성물질의 종합적인 효능평가가 가능한 장점을 갖는다.

또한 본 발명에 의한 인공피부는 멜라닌형성세포층을 별도로 만드는 번거로운 과정 없이 적절한 증식 및 분화 유도 과정을 통해 실제 피부와 유사한 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제작할 수 있으며, 이로 인해 제조방법의 단순화 및 결과물인 인공피부의 인체 상관성도 높아지는 장점을 갖는다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 일반적인 인공피부(skin equivalent)의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 기존 인공피부 모델의 종류와 사용 용도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 인공피부의 단면을 염색한 조직학적 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1 및 비교예 1의 진피 수축 여부를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 1 및 비교예 2에 UVB를 조사한 후 MMP-1의 발현변화 여부를 나타낸 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부에 관한 것이다.

상기 인공피부는 진피층 및 표피층으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 실제 피부와의 인체 상관성의 관점에서 섬유아세포는 진피층에 포함되며, 상기 각질형성세포 및 멜라닌형성세포는 표피층에 포함될 수 있다.

상기 진피층은 인공피부의 진피 수축 현상을 개선하기 위하여 2층 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 콜라겐을 함유하는 제1진피층 및 섬유아세포를 함유하는 제2진피층을 포함할 수 있다. 이러한 진피층을 2층 이상으로 형성함으로써 본 발명의 인공피부는 기존의 인공피부 모델에서 나타나는 진피 수축 현상을 개선함으로써, 조직의 변형에 의해 나타나는 생리학적인 부작용들을 극복하여 더욱 피부연구에 적합한 인공피부를 제공할 수 있다.

상기 제1진피층은 콜라겐을 함유할 수 있으며, 엘라스틴(Elastin), 키토산(Chitosan), 글리코사미노글루칸(GAGs; glycosaminoglycans), 히알루론산(HA; hyaluronic acid)과 같은 진피를 구성하는 세포외기질(extracellular matrix)을 더 함유할 수 있다.

상기 제2진피층은 상기 제1진피층의 상부에 위치할 수 있으며, 섬유아세포를 함유하고, 엘라스틴(Elastin), 키토산(Chitosan), 글리코사미노글루칸(GAGs; glycosaminoglycans), 히알루론산(HA; hyaluronic acid)과 같은 진피를 구성하는 세포외기질(extracellular matrix)을 더 함유할 수 있다.

상기 표피층은 상기 제2진피층의 상부에 위치할 수 있으며, 각질형성세포를 함유하며, 멜라닌형성세포를 함께 함유할 수 있다. 이는 실제 피부와의 인체상관성을 높이며, 표피 및 진피로 이루어진 기존의 인공피부 모델에서 멜라닌형성세포를 포함하지 않음으로 인하여 자극, 미백, 노화 등의 각 영역별 연구에 있어서 각기 다른 모델을 구입하여 사용해야 하는 문제점을 극복하여 미백 및 광노화 연구를 동시에 수행할 수 있는 인공피부를 제공할 수 있다.

또한 본 발명은

- 1) 콜라겐을 함유하는 제1진피층을 제조하는 단계;
- 2) 상기 제1진피층에 접촉하여 섬유아세포를 함유하는 제2진피층을 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 제2진피층의 상부에 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제조하는 단계를 포함하는 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부의 제조방법에 관한 것이다.

상기 1) 단계에 있어서, 상기 제1진피층은 콜라겐만을 함유하는 층으로 제조할 수 있으며, 이는 진피 수축을 억제하는 데에 기여할 수 있고, 엘라스틴(Elastin), 키토산(Chitosan), 글리코사미노글루칸(GAGs; glycosaminoglycans), 히알루론산(HA; hyaluronic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 함유할 수 있다.

상기 2) 단계에 있어서, 상기 제2진피층은 상기 제1진피층의 상부에 형성되며 섬유아세포를 함유하고, 콜라겐 수용액을 이용하여 굳힘으로써 제조할 수 있으며, 엘라스틴(Elastin), 키토산(Chitosan), 글리코사미노글루칸(GAGs; glycosaminoglycans), 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 함유할 수 있다.

상기 3) 단계에 있어서, 상기 표피층은 상기 제2진피층의 상부에 형성될 수 있으며, 각질형성세포와 멜라닌형성세포를 함유할 수 있다.

본 발명의 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부 제조방법은 상기 3) 단계에서 진피층의 상부에 각질형성세포와 멜라닌형성세포를 혼합하여 동시에 seeding하여 표피층에 멜라닌형성세포를 포함시킴을 특징으로 한다. 이 후 각질형성세포는 증식, 분화하면서 여러층으로 구성된 표피층을 형성하게 되지만, 멜라닌형성세포는 표피의 기저부에 남아서 도 3과 같이 실제 피부와 유사한 형태의 멜라닌형성세포를 함유한 표피층을 형성하게 된다. 즉 본 발명에 의한 인공피부는 멜라닌형성세포층을 별도로 만드는 번거로운 과정 없이 적절한 증식 및 분화 유도 과정을 통해 실제 피부와 유사한 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제작할 수 있으며, 이로 인해 제조방법의 단순화 및 결과물인 인공피부의 인체 상관성도 높아지는 장점을 갖는다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예 및 시험예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하나, 본 발명의 권리범위가 이들에 한정하는 것은 아니다.

[참고예 1] 각질형성세포, 멜라닌형성세포 및 섬유아세포의 배양

실험에 사용한 각질형성세포(neonatal human epidermal keratinocyte, HEKn), 멜라닌형성세포(neonatal human epidermal melanocyte, HEMn), 섬유아세포(neonatal human dermal fibroblast, HDFn)들은 모두 Cascade Biologics (USA)에서 구매하여 사용하였으며, 판매회사에서 권장하는 배양 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂

인큐베이터에서 배양하였다. 사용한 배지는 판매사가 제공하는 첨가제(supplement)가 첨가된 EpiLife(각질형성세포), M254(멜라닌형성세포), M106(섬유아세포) 배지이며 모두 GIBCO (Invitrogen, USA)에서 구매하였다.

[실시에 1] 멜라닌형성세포를 포함하는 인공피부의 제조

단계 1. 진피층의 제조

DMEM(Dulbeccos' s Modified Eagle Medium(DMEM 분말, Gibco, USA) 3개, Ham' s F-12 영양분 혼합물(F-12 분말, Gibco, USA) 1개, 항생제-항진균제(PSF, Gibco, USA) 4ml를 멸균한 증류수 400ml에 넣고 용해시켜 제조한 10X P 버퍼 40 μ l 와 0.05M NaOH 100ml에 2.2g의 NaHCO_3 와 4.77g의 HEPES를 녹인 후 여과하여 제조한 재구성 버퍼(Reconstitution buffer) 40 μ l를 에피튜브(Epi tube)에 넣고 혼합한 후, 콜라겐 수용액(Sigma, USA) 320 μ l를 넣고 파이펫을 이용하여 혼합한다. 12웰 세포배양접시의 내부에 배양삽입체(culture insert, 12mm Transwell®, Corning, USA)를 장착하고, 상기 혼합액을 배양삽입체 내부에 넣어준 후, 37°C CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켜 굳혀 섬유아세포가 없는 진피층을 제조한다.

단계 2. 섬유아세포가 있는 진피층의 제조

DMEM(Dulbeccos' s Modified Eagle Medium(DMEM 분말, Gibco, USA) 3개, Ham' s F-12 영양분 혼합물(F-12 분말, Gibco, USA) 1개, 항생제-항진균제(PSF, Gibco, USA) 4ml를 멸균한 증류수 400ml에 넣고 용해시켜 제조한 10X P 버퍼 40 μ l 와 0.05M NaOH 100ml에 2.2g의 NaHCO_3 와 4.77g의 HEPES를 녹인 후 여과하여 제조한 재구성 버퍼(Reconstitution buffer) 40 μ l를 에피튜브(Epi tube)에 넣고 혼합한 후, 콜라겐 수용액(Sigma, USA) 320 μ l를 넣고 파이펫을 이용하여 혼합한다. 혼합물에 10⁴개의 섬유아세포를 넣고 파이펫으로 잘 혼합하여 섬유아세포가 용액 중에 균일하게 분포하도록 한다.

상기 단계 1에서 제조한 진피층을 포함하는 배양삽입체의 내부에 상기에서 혼합한 섬유아세포 혼합물을 400ul 넣어주고, 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 굳힌다.

콜라겐이 완전히 굳으면 배양삽입체의 내부와 외부에 모두 섬유아세포 배양 배지(M106; GIBCO, Invitrogen, USA)를 넣어주고 하루 밤 동안 배양한다. 이후 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 일주일간 배양하여 섬유아세포가 있는 진피층을 제조하였다.

단계 3. 표피층의 제조

상기 단계 2에서 제조한 섬유아세포가 있는 진피층의 상부에 1.5×10^5 개의 각질형성세포와 5×10^4 개의 멜라닌형성세포를 혼합하여 seeding한다. 배양삽입체의 내부와 외부에 모두 각질형성세포 배양배지(EpiLife; GIBCO, Invitrogen, USA)를 넣어주고 하루 밤 동안 배양 후 세포의 부착상태를 확인한다. 이후 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 일주일간 배양하여 표피세포의 증식을 유도한다.

증식된 표피세포가 진피층의 상부를 모두 덮었을 때, 배지에 1.2mM Ca^{2+} 를 첨가하여 이틀간 5% CO_2 , 37°C 인큐베이터에서 배양하여 각질형성세포의 분화를 유도한다. 이틀간의 분화 유도과정이 끝나면, 배지를 모두 제거하고 배양삽입체의 외부에만 배지(1.2mM Ca^{2+} 가 첨가된 각질형성세포 배양배지)를 넣어주어 각질형성세포를 공기중에 노출시킨다. 일주일간 매일 배지를 갈아주면서 공기노출배양을 진행하여 표피층을 생성시킨다.

[비교예 1] 기존 인공피부의 배양

본 발명의 인공피부에 대응하여, 기존의 인공피부 모델로서 섬유아세포를 포함한 하나의 진피층으로 제작된 비교예 1의 인공피부를 하기와 같이 제조하였다.

배양삽입체 DMEM(Dulbeccos' s Modified Eagle Medium(DMEM 분말, Gibco, USA) 3개, Ham' s F-12 영양분 혼합물(F-12 분말, Gibco, USA) 1개, 항생제-항진균제(PSF, Gibco, USA) 4ml를 멸균한 증류수 400ml에 넣고 용해시켜 제조한 10X P 버퍼 40 μl 와 0.05M NaOH 100ml에 2.2g의 NaHCO_3 와 4.77g의 HEPES를 녹인 후 여과하여 제조한 재구성 버퍼(Reconstitution buffer) 40 μl 를 에피튜브(Epi tube)에 넣고 혼합한 후, 콜라겐 수용액(Sigma, USA) 320 μl 를 넣고 파이펫을 이용하여 혼합한다. 혼합물에 10^4 개의 섬유아세포를 넣고 파이펫으로 잘 혼합하여 섬유아세포가 용액 중에 균일하게 분포하도록 한다. 12웰 세포배양접시의 내부에 배양삽입체(culture insert, 12mm Transwell®, Corning, USA)를 장착하고, 상기 혼합액을 배양삽입체 내부에 넣어준 후, 5% CO_2 , 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 콜라겐 수용액을 굳혀 진피층을 제조하였다.

상기 진피층의 상부에 1.5×10^5 개의 각질형성세포와 5×10^4 개의 멜라닌형성세포를 혼합하여 seeding한다. 배양삽입체의 내부와 외부에 모두 각질형성세포 배양

배지(EpiLife; GIBCO, Invitrogen, USA)를 넣어주고 하루 밤 동안 배양 후 세포의 부착상태를 확인한다. 이후 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 일주일간 배양하여 표피세포의 증식을 유도한다.

증식된 표피세포가 진피층의 상부를 모두 덮었을 때, 배지에 1.2mM Ca^{2+} 를 첨가하여 이틀간 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 인큐베이터에서 배양하여 각질형성세포의 분화를 유도한다. 이틀간의 분화 유도과정이 끝나면, 배지를 모두 제거하고 배양삽입체의 외부에만 배지(1.2mM Ca^{2+} 가 첨가된 각질형성세포 배양배지)를 넣어주어 각질형성세포를 공기중에 노출시킨다. 일주일간 매일 배지를 갈아주면서 공기노출배양을 진행하여 표피층을 생성시켜 섬유아세포를 포함한 하나의 진피층으로 제작된 이루어진 기존 인공피부를 제조하였다.

[비교예 2] 멜라닌형성세포를 함유하지 않는 인공피부의 배양

비교예 2의 멜라닌 형성세포를 함유하지 않는 인공피부는 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 배양한 두 층의 진피로 구성되는 인공피부를 배양하였으며, 다만 멜라닌형성세포를 seeding하는 단계를 제외하고 제작하였다.

[시험예 1] 인공피부의 조직학적 관찰

상기 실시예 1에서 제조된 멜라닌형성세포를 포함하는 인공피부의 단면을 Hematoxylin-Eosin(H&E) staining에 의해 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과와 멜라노마 세포 마커인 HMB45를 조직면역염색법으로 염색하여 관찰한 결과를 하기도 3에 나타내었다.

도 3에서 보여지는 바와 같이 본 발명의 인공피부는 실제 피부와 같이 진피층과 표피층으로 구성되며, 진피층에 섬유아세포가 관찰되며, 증식 및 분화하는 각질형성세포로 이루어진 표피층과 표피 기저부에 멜라닌형성세포가 관찰됨을 알 수 있어, 본 발명의 인공피부는 조직학적으로 실제 피부와 매우 유사함을 알 수 있다.

[시험예 2] 인공피부의 진피수축 개선효과

본 발명에 의한 인공피부의 인체상관성이 높은 효과를 확인하기 위하여 상기 실시예 1 및 비교예 1의 진피수축여부를 관찰하였다.

상기 실시예 1에서 제조한 인공피부와 비교예 1의 인공피부를 배양이 모두 끝난 시점에서 육안으로 관찰하였으며, 결과 사진을 도 4에 나타내었다.

도 4에서 나타나는 바와 같이 기존의 인공피부에 해당하는 비교예 1은 실시예 1에 비하여 진피 수축이 심하게 나타났으며, 이로 인해 인공피부 모델의 형태적 변형이 일어나는 것을 알 수 있다. 본 발명의 인공피부는 진피층을 두 층으로 제작함으로써 진피층 수축을 억제하였으며, 이를 통해 인공피부 모델의 형태학적, 조직학적 안정성 확보를 통해 인체 상관성 증진 효능을 나타냄을 알 수 있다.

[시험예 3] UVB에 대한 광노화 반응성 평가

상기 실시예 1에서 제조된 인공피부와 상기 비교예 2의 인공피부의 상부에 UVB 조사기(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 60mJ의 UVB를 조사한 후, 48시간 후 배양배지를 수거하고, MMP-1 ELISA kit(Amersham, GE, USA)으로 배지 내 MMP-1의 변화를 측정하였다. 세부 실험방법은 제조사가 제공하는 프로토콜에 따랐으며, 통계 프로그램 (MINITAB, Minitab Inc., USA)을 이용하여 결과의 유의성을 분석하여 MMP-1 발현 정도의 결과를 대조군에 대한 발현 정도를 %로 계산하여 도 5에 나타내었다. 대조군으로는 UVB를 조사하지 않는 것을 제외하고는 동일 조건에서 실시예 1 및 비교예 2의 인공피부를 48시간 동안 배양한 것을 사용하였다.

UVB는 세포와 인체 모두에서 진피 콜라겐을 분해하는 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 발현을 증가시켜 광노화 반응을 일으키는 것으로 널리 알려져 있다.

도 5에서 나타나는 바와 같이, 비교예 2의 모델에서는 UVB에 의한 MMP-1의 증가가 관찰되지 않은 반면, 멜라닌형성세포를 포함한 실시예 1에서는 UVB에 의한 유의적인 MMP-1의 증가가 관찰되었다. 이는 본 발명의 멜라닌형성세포를 포함한 인공피부 모델이 UVB 자극에 대한 생리학적 인체상관성을 확보했음을 보여주고 있으며, 본 발명의 인공피부 모델을 광노화 평가 등에 적용시 인체상관성이 더 높은 결과를 도출할 수 있음을 알 수 있다.

【산업상 이용가능성】

본 발명의 인공피부는 실제 인체 피부의 3대 구성세포인 섬유아세포, 멜라닌형성세포 및 각질형성세포를 모두 포함함으로써 인공피부 모델의 인체상관성을 높일 수 있으며, 2층 이상의 진피층을 함유함으로써 조직 배양과정에서 나타나는 진피 수축을 억제하여 모델의 안정성 확보함으로써 조직적 변형으로 인한 생리적 변형이나 부작용을 최소화한 인공피부를 제공할 수 있다. 또한 멜라닌형성세포를 함유함으로써 일반 피부 생리 연구뿐 아니라 기존 모델에서는 불가능한 미백과 노화

연구의 동시 수행이 가능하며, 광노화에 대한 연구에 적합한 인공피부를 제공할 수 있다. 따라서 이러한 인공피부 모델을 이용함으로써 피부활성물질의 종합적인 효능 평가가 가능하다.

또한 본 발명에 의한 인공피부는 멜라닌형성세포층을 별도로 만드는 번거로운 과정 없이 적절한 증식 및 분화 유도 과정을 통해 실제 피부와 유사한 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제작할 수 있으며, 이로 인해 제조방법의 단순화 및 결과물인 인공피부의 인체 상관성도 높아진다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

섬유아세포, 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 인공피부는 섬유아세포를 포함하는 진피층; 및 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 포함하는 표피층을 함유하는 것을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 진피층은 2 이상의 층을 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 진피층은 콜라겐을 함유하는 제1층과 섬유아세포를 함유하는 제2층을 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 5】

제 2항에 있어서, 상기 멜라닌형성세포는 상기 표피층의 기저부에 존재함을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 6】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인공피부는 피부 미백과 피부 노화의 동시 연구용인 것을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 7】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인공피부는 피부 미백, 피부 노화 및 피부 자극의 동시 연구용인 것을 특징으로 하는 인공피부.

【청구항 8】

- 1) 콜라겐을 함유하는 제1진피층을 제조하는 단계;
- 2) 상기 제1진피층 상에 섬유아세포를 함유하는 제2진피층을 형성하는 단계;

및

- 3) 상기 제2진피층의 상부에 각질형성세포 및 멜라닌형성세포를 함유하는 표피층을 제조하는 단계를 포함하는 멜라닌형성세포를 함유하는 인공피부의 제조방법.

【청구항 9】

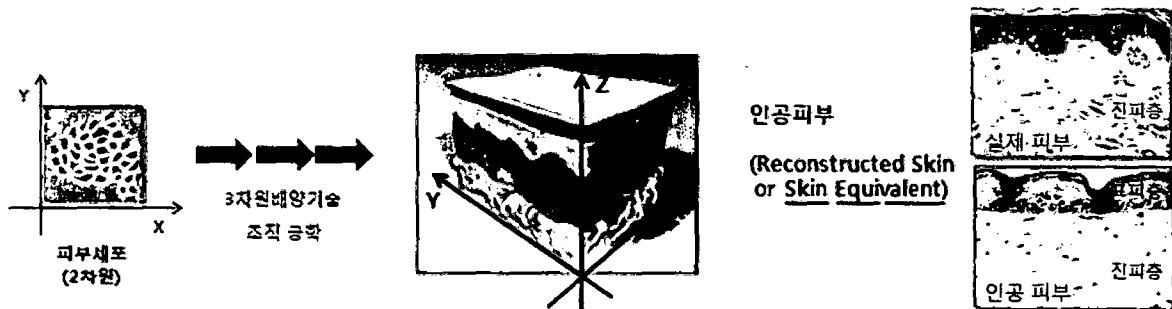
제 8항에 있어서, 상기 3) 단계는 상기 각질형성세포와 멜라닌형성세포를 동시에 혼합하여 배양하는 것을 특징으로 하는 인공피부의 제조방법.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 3) 단계 이후에 각질형성세포를 분화 및 증식하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인공피부의 제조방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】

*미국 MatTek社에서 판매중인 인공피부 모델들과 주 사용 영역

1. 표피 모델-1

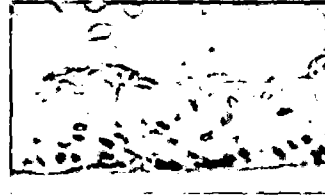
1) 멜라노사이트가 없는 표피 모델



→ 피부 자극 평가

2. 표피 모델-2

1) 멜라노사이트가 있는 표피 모델



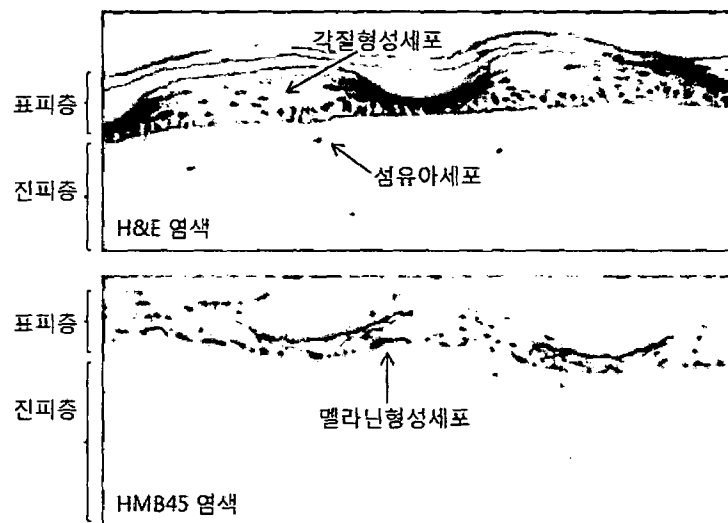
→ 미백 효능 평가

3. 진피-표피 모델

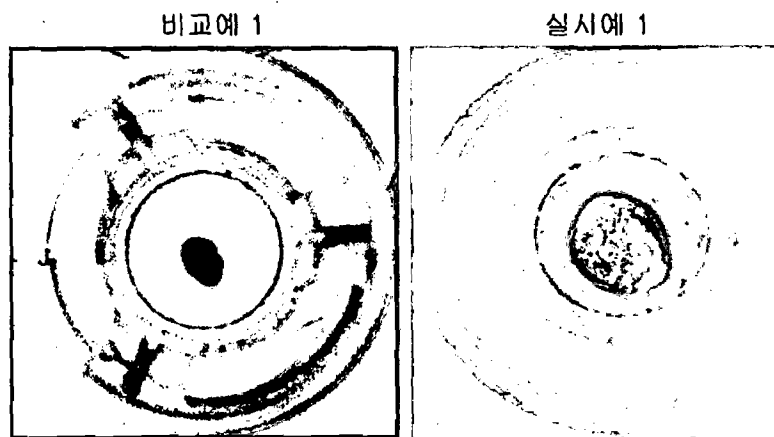


→ 노화 평가

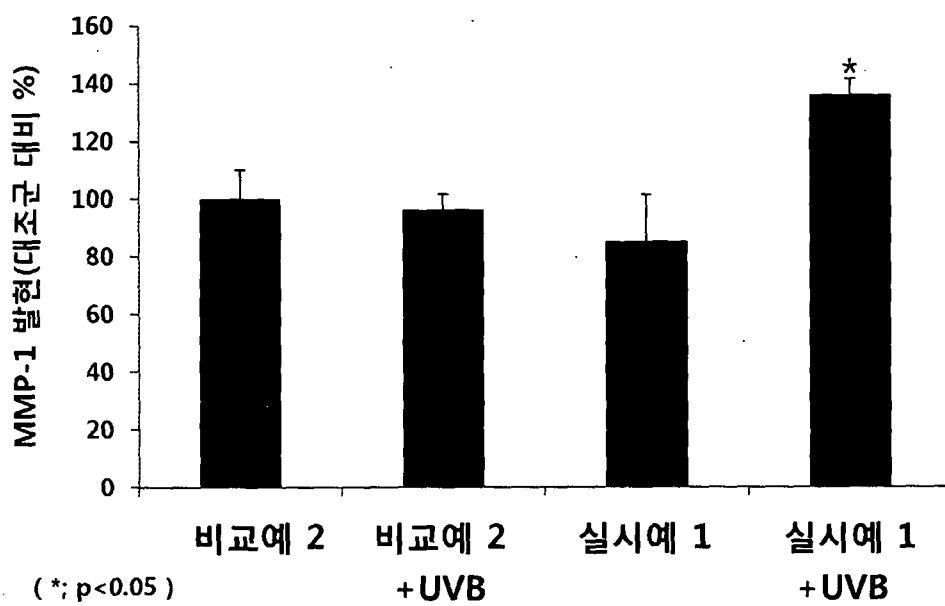
【도 3】



【도 4】



【도 5】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/009710**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61L 27/38(2006.01)i, A61F 2/10(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, A61L 27/24(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 27/38; A61L 27/60; C12N 5/071; A61L 27/00; A61L 27/24; A61P 17/00; C12N 11/04; A61K 38/17; A61L 27/54

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: neonatal human dermal fibroblast, neonatal human epidermal keratinocyte, neonatal human epidermal melanocyte, artificial skin, dermis, epidermis, collagen, base unit, whitening, aging, cultivation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2009-0099491 A (L'OREAL) 22 September 2009 See abstract; claims 1-6.	1-10
X A	KR 10-2007-0108846 A (MODERN CELL & TISSUE TECHNOLOGIES INC.) 13 November 2007 See abstract; paragraphs [0066]-[0071].	1,2,6,7 3-5,8-10
X A	KR 10-0953849 B1 (L'OREAL) 20 April 2010 See abstract; claims 3-5,9,13.	1,2,6,7 3-5,8-10
A	KR 10-0386418 B1 (WELSKIN CO., LTD.) 02 June 2003 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2010-0102355 A (HANS BIOMED. COR) 24 September 2010 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2011-0032381 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 30 March 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-0760989 B1 (MODERN CELL & TISSUE TECHNOLOGIES INC.) 04 October 2007 See the entire document.	1-10



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

"T" 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

05 MARCH 2013 (05.03.2013)

Date of mailing of the international search report

08 MARCH 2013 (08.03.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 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/KR2012/009710

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0099491 A	22.09.2009	CA 2658074 A1 CN 101538555 A EP 2103687 A1 JP 2009-219491 A US 2009-0239254 A1	17.09.2009 23.09.2009 23.09.2009 01.10.2009 24.09.2009
KR 10-2007-0108846 A	13.11.2007	NONE	
KR 10-0953849 B1	20.04.2010	CA 2596599 A1 CN 101385871 A EP 1878790 A1 JP 2008-029342 A KR 10-2010-0068339 A US 2008-0097607 A1	13.01.2008 18.03.2009 16.01.2008 14.02.2008 23.06.2010 24.04.2008
KR 10-0386418 B1	02.06.2003	KR 10-2002-0008676 A	31.01.2002
KR 10-2010-0102355 A	24.09.2010	KR 10-1089205 B1	02.12.2011
KR 10-2011-0032381 A	30.03.2011	KR 10-1103571 B1	09.01.2012
KR 10-0760989 B1	04.10.2007	KR 10-2007-0082114 A	21.08.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/38(2006.01)i, A61F 2/10(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, A61L 27/24(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/38; A61L 27/60; C12N 5/071; A61L 27/00; A61L 27/24; A61P 17/00; C12N 11/04; A61K 38/17; A61L 27/54

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: 섬유아세포, 각질형성세포, 멜라닌형성세포, 인공피부, 진피층, 표피층, 콜라겐, 기저부, 미백, 노화, 배양

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2009-0099491 A (로레알) 2009.09.22 요약서; 청구항 1-6 참조.	1-10
X A	KR 10-2007-0108846 A (주식회사 엠씨티티) 2007.11.13 요약서; 문단번호 [0066]-[0071] 참조.	1,2,6,7 3-5,8-10
X A	KR 10-0953849 B1 (로레알) 2010.04.20 요약서; 청구항 3-5,9,13 참조.	1,2,6,7 3-5,8-10
A	KR 10-0386418 B1 (주식회사 웰스킨) 2003.06.02 전문 참조.	1-10
A	KR 10-2010-0102355 A (한스바이오메드 주식회사) 2010.09.24 전문 참조.	1-10
A	KR 10-2011-0032381 A (한림대학교 산학협력단) 2011.03.30 전문 참조.	1-10
A	KR 10-0760989 B1 (주식회사 엠씨티티) 2007.10.04 전문 참조.	1-10

☐ 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

2013년 03월 05일 (05.03.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 03월 08일 (08.03.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

정재철

전화번호 82-42-481-3479



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0099491 A	2009.09.22	CA 2658074 A1 CN 101538555 A EP 2103687 A1 JP 2009-219491 A US 2009-0239254 A1	2009.09.17 2009.09.23 2009.09.23 2009.10.01 2009.09.24
KR 10-2007-0108846 A	2007.11.13	없음	
KR 10-0953849 B1	2010.04.20	CA 2596599 A1 CN 101385871 A EP 1878790 A1 JP 2008-029342 A KR 10-2010-0068339 A US 2008-0097607 A1	2008.01.13 2009.03.18 2008.01.16 2008.02.14 2010.06.23 2008.04.24
KR 10-0386418 B1	2003.06.02	KR 10-2002-0008676 A	2002.01.31
KR 10-2010-0102355 A	2010.09.24	KR 10-1089205 B1	2011.12.02
KR 10-2011-0032381 A	2011.03.30	KR 10-1103571 B1	2012.01.09
KR 10-0760989 B1	2007.10.04	KR 10-2007-0082114 A	2007.08.21