



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월25일
(11) 등록번호 10-1366454
(24) 등록일자 2014년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0153524
(22) 출원일자 2012년12월26일
심사청구일자 2012년12월26일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008536539 A
JP07148243 A
JP2010531683 A
US20120141558 A1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
한양대학교 산학협력단
서울 성동구 왕십리로 222, 내 (행당동, 한양대학교)
(72) 발명자
이동윤
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 공과대학 생명공학과
이상훈
서울특별시 성북구 정릉동 산1번지 고려대학교 보건과학대학 생체의공학과
김민준
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 공과대학 생명공학과
(74) 대리인
특허법인이상

전체 청구항 수 : 총 11 항

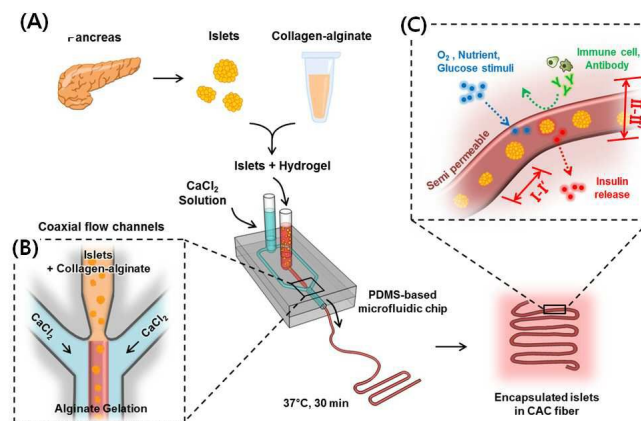
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 이식용 마이크로파이버 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버(Collagen-Alginate Composite Microfiber) 및 그의 제조 방법에 관한 것으로서, 알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질을 혼합하여 CAC 용액(collagen-alginate composite solution)을 제조하는 단계; 2가 금속 양이온이 포함된 가교제 용액을 제조하는 단계; 상기 CAC 용액을 미세채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 코어 흐름(core flow)의 형태로 주입하는 단계; 및 상기 가교제 용액을 미세유체 채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 주입하는 단계를 포함하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버의 제조방법 및 상기 제조방법에 의하여 제조된 CAC 마이크로파이버를 제공한다. 본 발명의 CAC 마이크로파이버는 선택적 투과성을 지녀 내부에 봉입된 이식 대상 물질을 이식 수용체의 면역 시스템으로부터 보호할 수 있으면서도, 내부에 봉입된 이식 대상 물질의 기능과 생존률을 높은 수준으로 유지할 수 있는 효과가 있는 바, 이식 대상 물질을 이식하기 위한 지지체 또는 스캐폴드(scaffold)로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 3201200000000922

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업(중견연구자지원사업)

연구과제명 나노 하이브리드 시스템을 이용한 면역반응 조절형 세포의약 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한양대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질을 혼합하여 CAC 용액(collagen-alginate composite solution)을 제조하는 단계;

2가 금속 양이온이 포함된 가교제 용액을 제조하는 단계;

상기 CAC 용액을 미세채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 코어 흐름(core flow)의 형태로 주입하는 단계; 및

상기 가교제 용액을 미세유체 채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 주입하는 단계를 포함하며,

상기 이식 대상 물질은 줄기세포, 간세포 및 췌장 소도(pancreatic islet)로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC(Collagen-Alginate Composite) 마이크로파이버(microfiber)의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 콜라겐 섬유는 상기 알지네이트 하이드로젤 1 ml에 대하여 1 ml 내지 3 ml의 부피 비율로 첨가되고, 상기 췌장 소도는 상기 알지네이트 하이드로젤 1 ml에 대하여 3000 IEQ(Islet Equivalents) 내지 7000 IEQ(Islet Equivalents)의 비율로 첨가되는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2가 금속 양이온은 Mg^{2+} , Ca^{2+} 및 Sr^{2+} 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2가 금속 양이온은 가교제 용액 전체 부피를 기준으로 1 %(w/v) 내지 5 %(w/v)의 비율로 첨가되는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CAC 용액과 상기 가교제 용액의 유속을 조절하여, 상기 CAC 마이크로파이버의 선폴을 조절하는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 CAC 용액은 1.0 ml/hr 내지 1.5 ml/hr의 유속으로 주입하는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 가교제 용액은 20 ml/hr 내지 40 ml/hr의 유속으로 주입하는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 CAC 마이크로파이버는 직경이 200 μm 내지 1000 μm 인 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버 제조방법.

청구항 10

직경이 200 μm 내지 300 μm 인 파이버 형상의 알지네이트 지지체;

상기 알지네이트 지지체의 내부에 고정된 콜라겐(collagen) 섬유; 및

상기 콜라겐 섬유에 부착된 이식 대상 물질을 포함하며,

상기 이식 대상 물질은 줄기세포, 간세포 및 췌장 소도(pancreatic islet)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC(Collagen-Alginate Composite) 마이크로파이버(microfiber).

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 파이버 형상의 알지네이트 지지체는 표면과 내부가 모두 젤화된 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버.

청구항 12

삭제

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 CAC 마이크로파이버는 제1항의 제조방법에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 이식용 마이크로파이버 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버(Collagen-Alginate Composite Microfiber) 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 보건 의료분야에서 최선진국인 미국에서는 매년 10만 명의 환자들이 몸의 일부분인 장기 등을 필요로 하나, 단 2만 건의 장기만이 기증되고 있다. 장기 이식을 위한 조건을 갖춘 약 3만 6천여 명이 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.

[0003] 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 생체 조직의 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.

[0004] 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 재료로서 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 코팅 하는 등의 방법이 이용되는데, 이 역시도 지지체의 표면을 균일하게 코팅하기 어렵고, 공정

과정이 복잡해지기 때문에 시간, 비용적인 측면에서 단점을 가지고 있다.

[0005] 이에, 높은 생체적합성을 지니면서도 세포나 조직 등의 이식 대상 물질이 잘 부착되어 지지될 수 있는 섬유 형태의 지지체의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 이식 대상 물질을 이식 수용체의 면역 시스템으로부터 보호할 수 있으면서도, 이식 대상 물질이 높은 생존률로 유지될 수 있는 이식용 마이크로파이버 및 상기 이식용 마이크로파이버의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질을 혼합하여 CAC 용액(collagen-alginate composite solution)을 제조하는 단계; 2가 금속 양이온이 포함된 가교제 용액을 제조하는 단계; 상기 CAC 용액을 미세채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 코어 흐름(core flow)의 형태로 주입하는 단계; 및 상기 가교제 용액을 미세유체 채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 주입하는 단계를 포함하는 이식 대상 물질 이식용 CAC(Collagen-Alginate Composite) 마이크로파이버(microfiber)의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 직경이 200 μm 내지 300 μm 인 파이버 형상의 알지네이트 지지체; 상기 알지네이트 지지체의 내부에 고정된 콜라겐(collagen) 섬유; 및 상기 콜라겐 섬유에 부착된 이식 대상 물질을 포함하는 이식 대상 물질 이식용 CAC(Collagen-Alginate Composite) 마이크로파이버(microfiber)를 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 CAC 마이크로파이버는 선택적 투과성을 지녀 내부에 봉입된 이식 대상 물질을 이식 수용체의 면역 시스템으로부터 보호할 수 있으면서도, 내부에 봉입된 이식 대상 물질의 기능과 생존률을 높은 수준으로 유지할 수 있는 효과가 있는 바, 이식 대상 물질을 이식하기 위한 지지체 또는 스캐폴드(scaffold)로서 유용하게 이용될 수 있다.

[0010] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 제조방법을 개략적으로 도시한 개략도이다.

도 2는 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 단면을 나타내는 단면도로서, (A)는 마이크로파이버의 I-I' 방향 단면을, (B)는 마이크로파이버의 II-II' 방향 단면을 각각 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 CAC 마이크로파이버를 제조하기 위한 미세유체 칩을 제작하는 과정을 나타낸 흐름도이다.

도 4는 알지네이트 하이드로젤과 콜라겐 섬유의 '혼합'에 의하여 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 직경이 축소되는 원리를 설명하는 도면으로서, (A) 및 (C)는 알지네이트 하이드로젤과 콜라겐 섬유를 혼합하여 코어 흐름의 형태로 주입하는 경우의 마이크로파이버 제조 과정 및 마이크로파이버 단면을 각각 도식화한 것이고, (B) 및 (D)는 콜라겐 섬유와 알지네이트 하이드로젤을 분리하여 각각 코어 흐름 및 시스 흐름의 형태로 주입하는 경우의 마이크로파이버 제조 과정 및 마이크로파이버 단면을 각각 도식화한 것이다.

도 5는 본 발명의 CAC 마이크로파이버를 현미경을 관찰한 결과를 나타내는 사진이므로써, (A)와 (B)는 각각 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버의 SEM(Scanning Electron Microscope) 사진이고, (C) 및 (D)는 상기 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버의 표면을 보다 확대한 SEM 사진이다.

도 6의 (A)는 상기 CAC 마이크로파이버를 광학현미경으로 관찰한 사진이고, 도 6의 (B) 및 (C)는 상기 CAC 마이크로파이버 내의 채널 소도를 공초점 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 7은 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 인 비트로(in vitro) 특성을 확인한 결과로서, (A)는 유리 췌장 소도(free islet), 알지네이트 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도 및 CAC 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도의 시간 경과에 따른 생존율을 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, (B)는 유리 췌장 소도(free islet), 알지네이트 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도 및 CAC 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도의 시간 경과에 따른 생존율 및 인슐린 단백질 합성 여부를 나타내는 공초점 현미경 사진이며, (C)는 유리 췌장 소도(free islet), 알지네이트 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도 및 CAC 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도의 시간 경과에 따른 당-자극 반응 정도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, (D)는 유리 췌장 소도(free islet), 알지네이트 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도 및 CAC 마이크로파이버에 봉입된 췌장 소도의 산소 소비율을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 인 비보(in vivo) 특성을 확인한 결과로서, (A) 및 (B)는 각각 유리 췌장 소도(free islet) 및 췌장 소도가 봉입된 CAC 마이크로파이버를 이식한 당뇨병 동물 모델에서 4주 동안의 혈당량 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, (C) 및 (D)는 유리 췌장 소도(free islet) 및 췌장 소도가 봉입된 CAC 마이크로파이버를 이식한 당뇨병 동물 모델에서 혈중 포도당 제거 효능을 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, (E)는 유리 췌장 소도(free islet) 및 췌장 소도가 봉입된 CAC 마이크로파이버를 이식한 당뇨병 동물 모델에서 이식 거부 면역 반응이 일어나는지 여부와 인슐린 단백질이 합성되는지 여부를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 마이크로파이버(microfiber)의 제조방법

본 발명의 일 측면은 CAC 마이크로파이버(Collagen-Alginate Composite Microfiber)의 제조방법을 제공한다.

도 1은 본 발명의 마이크로파이버의 제조방법을 개략적으로 도시한 개략도이다. 도 1을 참조하면, 본 발명의 마이크로파이버의 제조방법은 1)알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질을 혼합하여 CAC 용액(collagen-alginate composite solution)을 제조하는 단계; 2)가교제 용액을 제조하는 단계; 3)상기 단계 1)의 CAC 용액을 미세채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 코어 흐름(core flow)의 형태로 주입하는 단계; 및 4)상기 단계 2)의 가교제 용액을 미세유체 채널이 형성된 미세유체 칩 상에서 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 주입하는 단계를 포함한다.

상기 단계 1)은 알지네이트 하이드로젤(alginate hydrogel), 콜라겐 섬유(collagen fiber) 및 이식 대상 물질을 적정 비율로 혼합하여 CAC(Collagen-Alginate Composite) 용액을 제조하는 단계이고, 상기 단계 2)는 상기 단계 1)의 CAC 용액 내에 포함된 알지네이트 하이드로젤을 젤화시키는 가교제를 준비하는 단계이다. 상기 단계 1)과 상기 단계 2)는 서로 독립된 단계로서, 어느 단계가 먼저 수행되어도 상관없고, 순차적으로 또는 동시에 수행될 수 있다.

상기 단계 1)의 이식 대상 물질은 줄기세포(stem cell), 간세포(liver cell) 및 췌장 소도(pancreatic islet)로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 어느 하나일 수 있다.

상기 단계 1)의 콜라겐 섬유는 상기 이식 대상 물질이 부착되어 안정화(stabilization)될 수 있는 미세환경(microenvironment)을 제공하는 역할을 수행하는 구성이다.

상기 콜라겐은 ECM(Extracellular Matrix)을 구성하는 주된 물질로서, 이식 대상 세포나 조직이 원래의 인 비보(in vivo) 환경에서 존재하던 미세환경을 재현 또는 미믹(mimicking)한다. 따라서, 상기 이식 대상 세포나 조직이 상기 콜라겐 섬유를 ECM으로 인식하여 안정화된다.

또한, 상기 콜라겐은 후술되는 알지네이트 하이드로젤이 젤화될 때, 다공성(porosity)을 더욱 향상시키는 역할을 수행한다. 상기 콜라겐이 알지네이트의 다공성을 향상시키는 원리에 대해서는 후술한다.

상기 단계 1)의 알지네이트 하이드로젤은 후술되는 단계 2)의 가교제에 의해 파이버 형상으로 젤화(gelation)되어 상기 콜라겐 섬유와 상기 콜라겐 섬유에 부착된 이식 대상 물질을 봉입하고, 상기 콜라겐 섬유와 이식 대상 물질이 상기 파이버 형상으로 젤화된 알지네이트의 내부에 고정되어 외부로 새어나오지 않도록 하는 지지체로 형성된다. 상기 젤화된 알지네이트는 다공성을 가지므로, 물질을 선택적으로 투과시킬 수 있는 특성이 있다. 즉, 산소, 이산화탄소와 같은 가스나 인슐린이나 각종 사이토카인 등의 저분자 물질들은 상기 젤화된 알지네이트

트를 자유롭게 투과할 수 있는 반면, 면역세포나 항체 등과 같이 크기가 큰 물질들은 상기 젤화된 알지네이트를 투과할 수 없다. 따라서, 상기 알지네이트 하이드로젤이 젤화되어, 표면과 내부가 모두 젤화된 알지네이트로 충전된 파이버로 형성되면, 상기 젤화된 알지네이트 내부로는 각종 세포나 항체 등과 같은 크기가 큰 물질들이 도입될 수 없게 되고, 상기 젤화된 알지네이트 내에 봉입 및 고정된 이식 대상 물질은 외부의 물질로부터 보호될 수 있다.

- [0022] 상기 단계 1)의 CAC(Collagen-Alginate Composite) 용액은 상기 알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질들을 '혼합'함으로써 제조된다.
- [0023] 상기 CAC 용액은 1 mg/ml 내지 4 mg/ml 농도, 바람직하게는 1.5 mg/ml 내지 2.5 mg/ml 농도의 콜라겐 용액과 1 %(w/v) 내지 5 %(w/v) 농도, 바람직하게는 2 %(w/v) 내지 4 %(w/v) 농도의 알지네이트 하이드로젤 용액이 1 : 1 내지 1 : 3의 부피비, 바람직하게는 1 : 2의 부피비로 혼합되어 제조되는 것이 바람직하다. 상기와 같이 제조된 CAC 용액에는 당업자의 선택에 따라 적절한 비율의 이식 대상 물질이 포함될 수 있다. 특히, 상기 이식 대상 물질이 췌장 소도(pancreatic islet)인 경우 상기 췌장 소도는 상기 CAC 용액 1 ml 당 3000 IEQ(Islet Equivalents) 내지 7000 IEQ(Islet Equivalents)의 비율로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 '혼합'에 의하여, 상기 CAC 용액 내에는 상기 이식 대상 물질들이 부착된 콜라겐 섬유가 알지네이트 하이드로젤과 골고루 균일하게 섞인 채로 존재하게 된다. 상기와 같이 알지네이트 하이드로젤에 균일하게 혼합된 콜라겐 섬유가 상기 알지네이트 하이드로젤이 젤화될 때 영향을 미쳐 상기 젤화된 알지네이트의 다공성이 더욱 향상된다.
- [0025] 상기 단계 2)의 가교제는 상기 단계 1)의 알지네이트 하이드로젤을 젤화시키는 구성으로서, 2가 금속 양이온을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 단계 1)의 알지네이트 하이드로젤은 상기 2가 금속 양이온에 의하여 가교(crosslinking)되어 젤화된다. 상기 알지네이트 하이드로젤을 가교시키는 상기 2가 금속 양이온은 Mg^{2+} , Ca^{2+} 및 Sr^{2+} 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있고, 특히 상기 2가 금속 양이온은 Ca^{2+} 인 것이 바람직하다. 따라서, 상기 단계 2)의 가교제 용액은 Ca^{2+} 을 포함하는 염, 예를 들어 $CaCl_2$, $CaSO_4$ 등을 종류수에 이온화시킴으로써 준비될 수 있다.
- [0026] 상기 단계 3) 및 상기 단계 4)는 미세채널(microchannel)이 형성된 미세유체 칩(microfluidic chip)을 이용하여 CAC 마이크로파이버를 제조하는 단계로서, 도 3에 도시된 바와 같은 구조의 미세유체 칩 상에서 수행될 수 있다.
- [0027] 도 3을 참조하면, 상기 단계 3) 및 단계 4)의 미세유체 칩은 CAC 용액이 주입되는 CAC 용액 주입구(10); 상기 CAC 용액 주입구(10)를 통해 주입된 CAC 용액이 코어 흐름(core flow)의 형태로 흐르는 코어 미세채널(20); 가교제 용액이 주입되는 가교제 용액 주입구(30); 상기 가교제 용액 주입구(30)를 통해 주입된 가교제 용액이 상기 코어 미세채널(20)을 중심으로 두 갈래로 갈라져 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 흐르는 시스 미세채널(40); 상기 코어 미세채널(30)과 시스 미세채널(40)이 만나는 합류점(50); 및 상기 접합점(50)에서 상기 코어 미세채널(20)과 동축 방향으로 연장되는 배출채널(60)을 포함한다. 상기 도 3에 도시된 형태의 미세유체 칩은 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 제조에 이용될 수 있는 미세유체 칩의 일 예로서, 상기 단계 3) 및 상기 단계 4)에서 이용되는 미세유체 칩은 이에 한정되지 아니한다. 따라서, CAC 용액이 코어 흐름(core flow)의 형태로 흐르는 코어 미세채널(20), 상기 가교제 용액 주입구(30)를 통해 주입된 가교제 용액이 상기 코어 미세채널(20)을 중심으로 두 갈래로 갈라져 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 흐르는 시스 미세채널(40) 및 상기 코어 미세채널(30)과 시스 미세채널(40)이 만나는 합류점(50)이 형성된 미세유체 칩이라면 특별히 제한되지 아니하고 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 제조에 이용될 수 있다.
- [0028] 상기 단계 3)은 상기 단계 1)에서 제조한 CAC 용액을 미세유체 칩 상에서 코어 흐름(core flow)의 형태로 주입하고, 상기 단계 4)는 상기 단계 2)에서 준비한 가교제 용액을 미세유체 칩 상에서 시스 흐름(sheath flow)의 형태로 주입한다.
- [0029] 상기 단계 3) 및 상기 단계 4)는 동시에 수행되는 단계로서, 미세유체 칩 상에서, 상기 단계 1)에서 제조한 CAC 용액이 코어 흐름으로 주입되는 동안 상기 단계 2)에서 준비한 가교제 용액이 시스 흐름으로 주입된다. 상기 단계 4)에서 시스 흐름의 형태로 주입된 가교제 용액은 상기 단계 3)에서 주입된 CAC 용액의 코어 흐름을 중심으로 두 갈래로 갈라졌다가, 상기 미세유체 칩 상에서 외부로 배출되기 전에 상기 코어 흐름에 합류된다. 상기 시스 흐름 형태의 가교제 용액이 코어 흐름 형태의 CAC 용액에 합류되면, 유체역학 플로우-포커싱(hydrodynamic

flow-focusing)에 의하여 가교제 용액이 CAC 용액의 주위를 흐르는 층류 형태의 흐름이 형성된다. 상기와 같이 층류를 형성한 두 용액이 미세유체 칩 상의 채널을 통과하는 동안, 경계면을 따라서 분자량이 작고 확산율이 큰 가교제 용액이 CAC 용액 내부로 확산되면서 상기 CAC 용액 내에 포함된 알지네이트 하이드로젤을 내부까지 모두 가교(crosslinking)시켜 젤화(gelation)한다. 상기와 같은 젤화에 의하여, 상기 미세유체 칩 상에서는 상기 두 용액이 합류되어 층류를 형성하면서 흐르는 채널과 동일한 형상 및 크기를 갖도록 알지네이트 하이드로젤이 표면과 내부에서 모두 젤화된 CAC 마이크로파이버가 형성되어 미세유체 칩 외부의 용기에 계속적으로 모이게 된다.

[0030] 상기 단계 1)의 '혼합'에 의하여, 상기 단계 3)에서 주입되는 CAC 용액 내에는 상기 이식 대상 물질들이 부착된 콜라겐 섬유가 알지네이트 하이드로젤과 골고루 균일하게 섞인 채로 존재하게 된다. 상기와 같이 알지네이트 하이드로젤과 콜라겐 섬유가 균일하게 혼합된 CAC 용액에 상기 가교제 용액이 가해지면, 상기 CAC 용액 내의 알지네이트 하이드로젤은 상기 콜라겐 섬유와 혼합된 채로 가교된다. 따라서, 상기 CAC 용액은 알지네이트 하이드로젤의 사이사이에는 상기 콜라겐 섬유가 혼합되어 박혀 있는 형태로 젤화된다. 상기와 같이 젤화된 알지네이트 하이드로젤의 사이사이에 콜라겐 섬유가 혼합되어 박힘으로써, 상기 젤화된 알지네이트 하이드로젤의 다공성이 더욱 향상되게 된다. 즉, 상기 단계 1)에서 알지네이트 하이드로젤과 콜라겐 섬유가 서로 '혼합'하여 CAC 용액을 제조함으로써, 상기 젤화된 알지네이트 하이드로젤의 다공성을 더욱 향상시킬 수 있는 것이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 알지네이트 하이드로젤만으로 제조한 마이크로파이버와 콜라겐 섬유가 혼합된 CAC 용액으로 제조한 마이크로파이버를 비교한 결과, CAC 마이크로파이버가 알지네이트 마이크로파이버에 비하여 다공성이 더욱 향상됨을 확인하였다(도 5의 (C) 및 (D) 참조).

[0031] 또한, 상기 단계 1)의 '혼합'에 의하여, 상기 CAC 마이크로파이버의 직경이 최소화된다.

[0032] 도 4는 상기 단계 1)의 '혼합'에 의하여 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 직경이 축소되는 원리를 설명하는 도면이다.

[0033] 도 4의 (A)를 참조하면, 상기 단계 3)에서 알지네이트 하이드로젤이 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질들과 함께 코어 흐름의 형태로 주입된다. 상기와 같이 젤화되어 지지체를 형성하는 알지네이트 하이드로젤이 상기 CAC 용액에 포함되어 코어 흐름의 형태로 주입되기 때문에, 알지네이트 하이드로젤이 코어 흐름의 직경 크기로 젤화되어 최종적으로 제조되는 CAC 마이크로파이버의 직경이 도 4의 (C)에 도시된 바와 같이 코어 흐름의 직경 크기로 최소화된다. 그러나, 도 4의 (B)와 같이 상기 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질의 혼합물과 알지네이트 하이드로젤을 각각 분리하여, 상기 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질의 혼합물을 코어 흐름의 형태로 주입하고, 상기 알지네이트 하이드로젤을 시스 흐름의 형태로 주입하여 마이크로파이버를 형성하는 경우, 상기 알지네이트 하이드로젤은 코어 흐름인 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질의 혼합물을 둘러싸는 튜브 형상으로 젤화되기 때문에, 최종적으로 제조되는 마이크로파이버의 직경이 도 4의 (D)에 도시된 바와 같이 코어 흐름의 직경보다 커지게 된다. 따라서, 상기 단계 1)에서와 같이 알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 이식 대상 물질을 모두 '혼합'하여 하나의 CAC 용액으로 제조한 후, 상기 단계 3)에서와 같이 코어 흐름의 형태로 주입시켜 젤화시킴으로써, 최종적으로 제조되는 마이크로파이버의 직경을 더욱 축소시킬 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 상기 알지네이트 하이드로젤, 콜라겐 섬유 및 체장 소도를 혼합한 CAC 용액을 코어 흐름의 형태로 주입함으로써, 직경이 250 μm 까지 축소된 크기의 CAC 마이크로파이버를 제조하였다.

[0034] 상기 단계 3) 및 상기 단계 4)에서 상기 코어 흐름을 형성하는 CAC 용액과 상기 시스 흐름을 형성하는 가교제 용액의 유속을 조절함으로써, 상기 CAC 마이크로파이버의 선폴을 조절할 수 있다. 즉, 상기 가교제 용액의 유속이 상기 CAC 용액의 유속보다 상대적으로 크면 클수록 상기 가교제 용액의 유압이 커져 상기 CAC 용액의 흐름의 두께가 얇아지게 되어 상기 CAC 마이크로파이버의 선폴이 얇아진다. 상기와 같은 유속의 조절에 의하여, CAC 마이크로파이버의 선폴을 200 μm 이상의 범위, 보다 바람직하게는 200 μm 내지 1000 μm , 가장 바람직하게는 200 μm 내지 500 μm 의 범위에서 조절할 수 있다. 따라서, 상기 CAC 마이크로파이버 내에 봉입되는 이식 대상 물질의 크기나 양에 따라, 당업자는 적절한 유속으로 상기 두 용액을 주입시킴으로써 CAC 마이크로파이버의 선폴을 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어, 상기 CAC 마이크로파이버 내에 포함되는 이식 대상 물체가 80 μm 내지 200 μm 크기의 체장 소도인 경우, 상기 CAC 마이크로파이버는 200 μm 내지 300 μm 의 선폴을 갖도록 형성되는 것이 바람직하고, 상기 CAC 마이크로파이버의 선폴을 200 μm 내지 300 μm 로 형성하기 위해 상기 CAC 용액과 상기 가교제 용액은 각각 1.0 ml/hr 내지 1.5 ml/hr 및 20 ml/hr 내지 40 ml/hr의 유속으로 주입되는 것이 바람직하다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 CAC 용액과 상기 가교제 용액은 각각 1.2 ml/hr 및 30 ml/hr의 유속으로 주입하여, 250 μm 의 선폴을 갖는 CAC 마이크로파이버를 제조하였다.

- [0035] 상기와 같은 방법에 의하여, 하기 "2. 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버"에서 후술할 CAC 마이크로파이버가 제조된다. 상기 CAC 마이크로파이버에 관해서는 하기 "2. 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버"에서 상술한다.
- [0036] **2. 이식 대상 물질 이식용 CAC 마이크로파이버(Collagen-Alginate Composite microfiber)**
- [0037] 본 발명의 다른 측면은 CAC 마이크로파이버(collagen-alginate composite microfiber)를 제공한다.
- [0038] 도 2는 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 단면을 나타내는 단면도로서, (A)는 CAC 마이크로파이버의 I-I' 방향 단면을, (B)는 CAC 마이크로파이버의 II-II' 방향 단면을 각각 나타낸 것이다.
- [0039] 도 2를 참조하면, 본 발명의 CAC 마이크로파이버는 직경이 200 μm 내지 300 μm 인 파이버 형상의 알지네이트 지지체(scaffold)(100); 상기 알지네이트 지지체(100)의 내부에 고정된 콜라겐(collagen) 섬유(200); 및 상기 콜라겐 섬유(200)에 부착된 이식 대상 물질(300)을 포함한다.
- [0040] 상기 이식 대상 물질(300)은 줄기세포, 간세포 및 췌장 소도(pancreatic islet)로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0041] 상기 알지네이트 지지체(100)는 상기 이식 대상 물질을 봉입하는 지지체로서, 알지네이트 하이드로젤(alginate hydrogel)이 가교되어 속이 꽉 찬 튜브 형상으로, 표면과 내부가 모두 젤화된 것이다. 상기 젤화된 알지네이트 하이드로젤은 다공성을 가진다. 따라서, 물질을 선택적으로 투과시킬 수 있는 특성이 있다. 즉, 산소, 이산화탄소와 같은 가스나 인슐린이나 각종 사이토카인 등의 저분자 물질들은 상기 젤화된 알지네이트를 자유롭게 투과할 수 있는 반면, 면역세포나 항체 등과 같이 크기가 큰 물질들은 상기 젤화된 알지네이트를 투과할 수 없다. 따라서, 상기 알지네이트 하이드로젤이 젤화되어 콜라겐 섬유(200) 및 이식 대상 물질(300)을 모두 둘러싸게 되면, 상기 알지네이트 지지체(100) 내부로는 각종 세포나 항체 등과 같은 크기가 큰 물질들이 도입될 수 없게 되고, 상기 알지네이트 지지체(100) 내에 봉입 및 고정된 이식 대상 물질(300)은 외부의 물질로부터 보호될 수 있다.
- [0042] 상기 콜라겐 섬유(200)는 상기 알지네이트 지지체(100)의 다공성을 향상시키고 동시에 상기 이식 대상 물질(300)을 안정화시키는 구성으로서, 상기 콜라겐 섬유(200) 전체가 상기 알지네이트 지지체(100)의 내부에 박혀 고정된 형태로 봉입된다. 상기 알지네이트 지지체(100)의 내부에 고정된 콜라겐 섬유는 서로 네트워크(network) 구조로 얽혀 있는 망상형의 구조를 가진다.
- [0043] 상기 콜라겐 섬유(200)가 상기 알지네이트 지지체(100)의 내부에 박힘으로 인하여, 상기 알지네이트 지지체(100)를 구성하는 알지네이트 하이드로젤의 표면에 더욱 많은 포어(pore)가 형성되고, 결국 상기 알지네이트 지지체(100)의 다공성이 향상된다.
- [0044] 또한, 상기 알지네이트 지지체(100) 내부에 고정된 형태로 존재하는 콜라겐 섬유(200)에는 이식 대상 물질(300)이 부착된다. 상기 콜라겐 섬유(200)에 부착된 이식 대상 물질(300)은 상기 콜라겐 섬유(200)를 ECM(Extracellular Matrix) 즉, 상기 이식 대상 세포나 조직이 원래의 인 비보(*in vivo*) 환경에서 존재하던 미세환경으로 인식하여 안정화된다.
- [0045] 상기 CAC 마이크로파이버의 직경은 내부에 봉입되는 이식 대상 물질(300)의 크기나 양에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어, 상기 CAC 마이크로파이버 내에 포함되는 이식 대상 물체가 80 μm 내지 200 μm 크기의 췌장 소도인 경우, 상기 CAC 마이크로파이버는 200 μm 내지 300 μm 의 직경을 갖도록 형성되는 것이 바람직하다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 췌장 소도가 봉입된, 직경 250 μm 의 CAC 마이크로파이버를 제조하여, 상기 CAC 마이크로파이버 및 내부에 봉입된 췌장 소도의 특성을 분석하였다. 그 결과, 알지네이트 하이드로젤만으로 제조한 마이크로파이버에 비하여, 콜라겐 섬유를 혼합주입하여 제조한 CAC 마이크로파이버가 표면에 더욱 많은 포어(pore)가 형성되어 다공성이 더욱 향상됨을 확인하였다(도 5 참조). 또한, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 췌장 소도의 생존률이나 포도당에 대한 반응능 역시 향상됨을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조).
- [0047] 상기 CAC 마이크로파이버는 이식 대상 물질의 이식을 위한 용도로 이용될 수 있다. 상기 CAC 마이크로파이버는 다공성 알지네이트 튜브의 선택적 투과능으로 인하여, 이식 수용체의 면역 세포가 상기 CAC 마이크로파이버 내부로 투과되지 못하기 때문에 이식 수용체의 면역 반응에 의한 이식 거부 반응을 방지할 수 있다. 또한, 상기

CAC 마이크로파이버 내에 존재하는 콜라겐 섬유에 의해, 이식 대상 물질이 잘 부착되어 안정화될 수 있기 때문에 이식 대상 물질 자체의 생존률이 향상된다. 따라서, 상기 CAC 마이크로파이버는 이식 대상 물질이 면역 거부 반응없이 이식될 수 있도록 하면서, 이식 대상 물질 자체의 생존률 또한 높게 유지할 수 있는 효과가 있다.

[0048] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 Sprague-Dawley 랫의 췌장 소도가 봉입된 CAC 마이크로파이버를 제조하여, 이종인 BALB/c 제1형 당뇨병 마우스 모델의 복강에 이식하고, 혈당 조절 효과 및 면역 이식 거부 반응 여부를 분석하였다. 그 결과, 유리 췌장 소도(free pancreatic islet)를 이식한 경우에 비하여, CAC 마이크로파이버 내에 봉입시켜 이식한 경우에 더욱 오랜 기간 동안 혈당이 정상으로 유지되었다(도 8 참조). 또한, 유리 췌장 소도(free pancreatic islet)를 이식한 경우에는 BALB/c 마우스의 면역 세포에 의하여 췌장 소도가 공격을 받아 손상된 반면, CAC 마이크로파이버 내에 봉입시켜 이식한 경우에는 BALB/c 마우스의 면역 세포에 의해 전혀 공격을 받지 않았다(도 8 참조).

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0050] 단, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0051] CAC(Collagen-Alginate Composite) 마이크로파이버의 제작

[0052] 도 1은 본 발명의 CAC 마이크로파이버를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이고, 도 2는 본 발명의 CAC 마이크로파이버의 두 단면을 나타내는 단면도이다.

[0053] 상기 도 1에 도시된 바와 같은 방법에 의하여, 상기 도 2에 도시된 것과 같은 단면을 갖는 CAC 마이크로파이버를 제작하였다.

[0054] <1-1> 미세유체 칩의 제작

[0055] 도 3은 본 발명의 CAC 마이크로파이버를 제조하기 위한 미세유체 칩을 제작하는 과정을 나타낸 흐름도이다. CAC 마이크로파이버를 제작하기 위해, Kang 등(Lab on a chip 2010,10,1856) 및 Kang 등(Nature materials 2011,10,877)이 문헌에 보고된 바와 같이, 동축(coaxial) 방향으로 형성된 원통형(cylindrical)의 PDMS(polydimethylsiloxane) 유로가 형성되어 있는 미세유체 칩을 제작하였다. 먼저, 소프트-리소그래피(soft-lithography)로 제작한 PDMS 베이스 미세채널 몰드의 상부면에, 도 3의 (a) 및 (b)에 도시된 바와 같이 두께 10 μm 의 얇은 PDMS 막을 결합시키고, 도 3의 (c)에 도시된 바와 같이 -40 kPa의 압력을 가하여 상기 PDMS 막을 아래 방향으로 휘어지도록 하여 오목한 반원통형의 채널 구조를 형성하였다. 그런 다음, 도 3의 (d)에 도시된 바와 같이, SU-8을 이용하여 상기 반원통형 구조의 휘어진 PDMS 막을 복제하고, UV를 조사하여 상기 휘어진 PDMS 막의 형태로 복제된 SU-8을 경화시켰다. 그런 다음, 도 3의 (e)에 도시된 바와 같이, 상기 SU-8을 상기 PDMS 베이스 몰드에서 분리함으로써, 볼록한 반원통형의 SU-8 마스터 몰드를 제작하였다. 상기과 같이 제작된 SU-8 마스터 몰드를 이용하여, 도 3의 (f)에 도시된 바와 같이, PDMS 상에 반원통형의 미세채널을 형성하였다. 상기 두 개의 반원통형 PDMS 채널을 서로 맞닿도록 정렬시키고, 산소 플라즈마 처리를 통해 결합시킴으로써 원통형의 채널을 형성하였다.

[0056] 상기와 같은 방법을 통해, 동축 방향의 흐름을 생성하기 위하여 다양한 차원 및 기울어진 형상의 원통형 채널을 형성하였고, 상기 주입구(inlet), 기울어진 접합점(tapered junction) 및 배출구(outlet)에서 상기 원통형 채널의 직경이 각각 400 μm , 200 μm 및 600 μm 이었다. 상기 동축 방향이 흐름을 위한 채널은 상기 두 개의 반원통형 PDMS 채널을 서로 맞닿도록 정렬시키고, 산소 플라즈마 처리를 통해 결합시킴으로써 형성되었고, 세 채널의 접합점에 형성된 기울어진 구조는 동축 방향의 흐름을 생성하는데 필요하다. 상기 동축 방향 및 원통형 채널은 서로 다른 화학적 조성을 가진 파이버를 채널의 하류에서 막히지 않으면서, 동시에 제작하는데 이용될 수 있는 하나의 플랫폼으로 통합되었다.

[0057] <1-2> 췌장 소도의 분리

[0058] Lee 등(Biomaterials 2012,33,837)의 문헌에서와 같이, 췌장의 콜라게나제 P 다이제스션(collagenase P digestion)(1 mg/mL)(Roche, 스위스)을 통해, 한양대학교 동물 관리 및 이용 위원회(Institutional Animal

Care and Use Committee)의 규정에 따라, 7주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫(오리엔트 바이오, 한국)에서 췌장 소도(pancreatic islet)를 분리하였다. 상기와 같이 수득된 췌장은 37 °C 수조에서 15분 동안 배양한 다음, Medium 199(Sigma, 미국)으로 세척하였고, 불연속적인 Histopaque(Sigma, 미국)의 농도 구배 원심분리를 이용하여 소도(Islets)를 분리하였다. 상기와 같이 분리된 소도를 10%의 FBS(fetal bovine serum)(Sigma, 미국)과 1%의 항생제가 포함된 RPMI-1640((Invitrogen Inc., 미국)으로 37 °C의 5 % CO₂ 환경에서 밤새 배양하였다.

[0059] <1-3> 마이크로파이버의 제조

[0060] <1-3-1> CAC 용액(collagen-alginate composite solution)의 제조

[0061] CAC 마이크로파이버를 제조하기 위하여, 먼저 수컷 Sprague-Dawley 랫의 꼬리 건(tendon)에서 유래한 멸균된 산-용해성 타입 1 콜라겐(랫 꼬리: 3.87 mg/ml, 아세트 산: 0.02N(BD Biosciences, 미국))을 최종 농도 2 mg/ml 이 되도록 1 N NaOH가 포함된 10x PBS를 혼합함으로써 중화시킨 콜라겐 용액과 3 %(w/v)의 나트륨 알지네이트(Sigma, 미국)를 배양 배지에 용해시킨 알지네이트 용액을 1:2의 부피비로 혼합한 다음, 상기 콜라겐과 알지네이트의 혼합물에 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 췌장 소도를 5000 IEQ/ml 농도로 첨가하여 혼합함으로써, CAC 용액(collagen-alginate composite solution)을 제조하였다.

[0062] 상기와 같이 제조된 CAC 용액은 육안으로 쉽게 관찰할 수 있도록 로다민 B(Rhodamine B)로 염색되었다.

[0063] <1-3-2> 가교제 용액의 제조

[0064] 다음으로, 멸균수에 3 %(w/v)의 염화칼슘(CaCl₂)(Sigma, 미국)을 용해하여 가교제 용액을 제조하였다.

[0065] <1-3-3> CAC 마이크로파이버의 제조

[0066] 상기 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 실시예 <1-3-1> 및 <1-3-2>에서 각각 제조된 CAC 용액 및 가교제 용액을 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 미세유체 칩의 코어 주입구 및 시스 주입구에 각각 1.2 ml/hr 및 30 ml/hr의 유속으로 주입하였다.

[0067] 상기 가교제 용액에 포함된 Ca²⁺가 시스 흐름(sheath flow)으로 상기 CAC 용액의 코어 흐름(core flow)에 합류되고, 알지네이트가 상기 가교제 용액의 Ca²⁺에 의하여 가교(crosslinking)되면서 원통형 채널의 모양에 따라 튜브 형태로 젤화되었다. 상기 채널을 통해 사출형성되어 나오는 마이크로파이버를 염화칼슘이 포함된 페트리디쉬에 모으고 37 °C의 배양배지에서 30분 동안 인큐베이션시켜, 도 2와 같은 형태의 단면을 갖는, 내부에 췌장 소도가 봉입된 CAC 마이크로파이버를 제조하였다.

[0068] <1-3-4> 알지네이트 마이크로파이버의 제조

[0069] 상기 실시예 <1-3-3>과 동일한 방법으로 마이크로파이버를 제조하되, 실시예 <1-3-1>에서 제조된 CAC 용액이 아니라, 3 %(w/v)의 나트륨 알지네이트(Sigma, 미국)를 배양 배지에 용해시킨 알지네이트 용액을 미세유체 칩의 코어 주입구에 1.2 ml/hr의 유속으로 주입하여, 알지네이트 마이크로파이버를 제조하였다.

실시예 2

[0070] 인 비트로(In vitro) 상에서의 특성 분석

[0071] <2-1> 현미경 관찰

[0072] 먼저, 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버에 25 %, 50 %, 75 %, 95 % 및 100 %의 에탄올을 순차적으로 처리한 후, 상온의 테트라 부틸 알콜(tetra butyl alcohol)에 30분 동안 침지시키기를 3회 반복하여 탈수시켰다. 그런 다음, 상기 마이크로파이버들을 -70 °C로 동결시키고, 상기 테트라 부틸 알콜이 모두 증발할 때까지 상기 마이크로파이버들을 동결건조시켰다. 상기와 같이 동결건조된 마이크로파이버들을 팔라듐 합금으로 코팅된 시료대(specimen stubs)에 그래파이트 페이스트(graphite paste)로 장착하고, SEM(Scanning Electron Microscope)(JEOL Ltd., 일본)으로 관찰하였다.

[0073] 그 결과, 약 250 μm 정도의 직경을 갖는 상기 알지네이트 마이크로파이버(도 5의 (A)) 및 CAC 마이크로파이버(도 5의 (B))가 균일하게 제조되었음을 확인하였다. 또한, 상기 마이크로파이버들의 표면을 더욱 확대하여 관찰한 결과, CAC 마이크로파이버의 표면(도 5의 (D))은 알지네이트 하이드로젤 분자들의 소섬유(fibrils)로 구성

되어 있고, 상기 알지네이트 하이드로젤 사이에 삽입된 콜라겐 섬유들에 의하여 알지네이트 마이크로파이버(도 5의 (C))보다 다공성이 더욱 향상되었음을 확인하였다.

[0074] 다음으로, 상기 실시예 <1-3-3>에서 제조한 CAC 마이크로파이버를 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0075] 그 결과, 상기 CAC 마이크로파이버의 내부에 채널 소도가 봉입되어 있음을 확인하였다(도 6의 (A)).

[0076] <2-2> 채널 소도의 생존률 분석

[0077] <2-2-1> 미세유체 칩을 이용한 제조 과정이 생존률에 미치는 영향 확인

[0078] 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 채널 소도, 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버에 각각 봉입된 채널 소도를 50 mM의 칼세인-AM(calcein-AM)과 25 mg/ml의 에티듐 호모다이머-1(ethidium homodimer-1, EthD-1)(Molecular Probes, 미국)이 포함된 37 °C의 배양 배지에서 40 분 동안 인큐베이션시킨 다음, 도립 형광 현미경(inverted fluorescence microscope)(EVOS)(AMG, 미국)과 공초점 현미경(confocal microscope)(Olympus, 일본)으로 세포들을 관찰하였다. 상기 칼세인-AM은 녹색의 형광을 내고 살아있는 세포들을 표지하는 반면, 상기 에티듐 호모다이머-1은 붉은 형광을 내고 죽은 세포들을 표지한다.

[0079] 그 결과, CAC 마이크로파이버 내의 모든 채널 소도는 녹색 형광을 나타내었다(도 6의 (B) 및 (C)).

[0080] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명과 같이 미세유체 칩을 이용하여 마이크로파이버를 제조하는 과정은 세포의 생존률에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0081] <2-2-2> 마이크로파이버 내 배양 시간이 생존률에 미치는 영향 확인

[0082] 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버를 각각 1일, 4일 및 7일 동안 배양 배지 내에서 인큐베이션한 후, 3 %의 시트르산삼나트륨(trisodium citrate solution)에 10분 동안 침지시켜 가교된 알지네이트 하이드로젤을 분해하고, 내부의 채널 소도를 100 μ l/웰의 비율로 배지가 분주된 96웰 플레이트(Corning, 미국)에 플레이트팅하고, 10 μ l의 CCK-8(Cell Counting Kit-8)(Dojindo Laboratories, 일본)를 각 웰에 첨가한 다음, 37 °C, 5%의 CO₂ 환경에서 4시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 96웰 플레이트를 마이크로플레이트 리더(microplate reader SpectraMax M2)(Molecular Devices, 미국)로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0083] 그 결과, 유리 채널 소도, 알지네이트 마이크로파이버 내의 채널 소도 및 CAC 마이크로파이버 내의 채널 소도 모두 시간이 지날수록 세포 생존률이 점점 감소하였으나, 유리 채널 소도나 알지네이트 마이크로파이버 내의 채널 소도에 비하여 CAC 마이크로파이버 내의 채널 소도가 시간의 경과에도 불구하고 훨씬 향상된 생존률을 나타내었다(도 7의 (A)). 특히, 7일 동안 배양하였을 때, 유리 채널 소도와 알지네이트 마이크로파이버 내의 채널 소도는 각각 61.8 ± 9.9 % 및 30.5 ± 4.8 %의 생존률을 나타내는 반면, CAC 마이크로파이버 내의 채널 소도는 75.2 ± 9.6 %의 생존률을 나타내었다.

[0084] 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 채널 소도, 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버에 각각 봉입된 채널 소도를 7일 동안 배양한 후, 4 % 파라포름알데히드로 4 °C에서 60분 동안 고정시키고, 20 % 수크로즈(sucrose)가 포함된 PBS에 밤새 침지시킨 후, OCT(Optimum Cutting Temperature) 화합물(Tissue-Tek, 일본)에 포매시켰다. 상기 포매된 채널 소도를 10 μ m의 냉동 박편(cryostat section)으로 절단하고, 접착성 현미경 슬라이드(Marientfeld, 독일)에 모아 PBS로 수차례 세척한 다음, 4 %의 Block Ace(Dainippon Pharma, 일본)으로 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 상기와 같이 준비된 박편에 인슐린에 대한 1차 마우스 단일클론 항체(1:1000 희석)(Abcam, 미국)를 처리하여 4 °C에서 밤새 반응시키고, PBS로 2차례 세척한 다음, 2차 항체(1:1000 희석)(Invitrogen, 미국)를 처리하여 상온에서 1.5시간 동안 반응시켰다. 핵은 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)(Invitrogen, 미국)로 염색하였고, 형광 이미지는 공초점 현미경(confocal microscope)(Olympus, 일본)으로 관찰하였다.

[0085] 그 결과, 7일 동안 배양하였을 때, 유리 채널 소도와 알지네이트 마이크로파이버 내의 채널 소도에서는 죽은 세포들을 나타내는 붉은 색 점들이 다수 관찰되는 반면, CAC 마이크로파이버 내의 채널 소도에서는 죽은 세포들이 거의 관찰되지 않았다(도 7의 (B)).

[0086] <2-3> GSIS(Glucose-Stimulated Insulin Secretion) 분석

[0087] 마이크로파이버 내에 봉입된 채널 소도가 당 자극(glucose stimulation)에 정상적으로 반응하는지 여부를 확인

하기 위하여, 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 채장 소도, 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버에 각각 봉입된 채장 소도를 각각 1일, 4일 및 7일 동안 배양 배지 내에서 인큐베이션한 후, GSIS(Glucose-Stimulated Insulin Secretion) 분석을 수행하였다.

[0088] 상기 유리 채장 소도, 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버를 0.1 % (w/v)의 BSA(bovine serum albumin) 및 2.8 mM의 포도당이 함유된 KRH 완충용액(Krebs-Ringer buffered HEPES)(pH 7.4)에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 유리 채장 소도, 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버를 저농도의 포도당(2.8 mM의 포도당) 용액 및 고농도의 포도당(16.8 mM의 포도당) 용액에서 각각 37 °C로 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음, ELISA 키트(Alpco Diagnostics, 미국)로 상기 저농도 포도당 용액 또는 고농도 포도당 용액으로 분비되어 나오는 인슐린의 양을 측정하였다. 상기와 같이 측정된 인슐린의 양을 CyQUANT 키트(Invitrogen, 미국)에 의하여 측정된 세포 내 DNA양으로 나누어 인슐린 농도로 산출하였고, 고농도 포도당 용액에서의 인슐린 농도를 저농도 포도당 용액에서의 인슐린 농도로 나누어 포도당에 대한 반응 정도를 나타내는 척도인 SI(Stimulation Index) 값을 산출하였다. 상기 SI 값이 2보다 큰 경우에, 채장 소도가 포도당의 농도 변화에 기능적으로 반응하는 것으로 판단한다.

[0089] 그 결과, 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 유리 채장 소도는 1일, 4일 및 7일에 각각 8.9 ± 1.5 , 6.2 ± 0.9 및 4.1 ± 0.9 의 SI 값을 나타내었고, 상기 실시예 <1-3-4>에서 제조한 알지네이트 마이크로파이버 내의 채장 소도는 1일, 4일 및 7일에 각각 3.6 ± 0.6 , 3.5 ± 0.4 및 3.0 ± 0.8 의 SI 값을 나타내었으며, 상기 실시예 <1-3-3>에서 제조한 CAC 마이크로파이버는 1일, 4일 및 7일에 각각 6.4 ± 0.9 , 6.2 ± 1.0 및 4.8 ± 1.2 의 SI 값을 나타내어, 모두 포도당의 농도 변화에 반응하는 것으로 확인되었다(도 7의 (C)).

[0090] 상기 알지네이트 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도의 경우, SI 값이 3.0 내지 3.6으로 낮게 측정되어, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도보다 포도당의 농도 변화에 민감하게 반응하지 못하는 것으로 확인되었다(도 7의 (C)). 또한, 상기 유리 채장 소도의 경우, 그 SI 값은 CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도와 비슷하게 측정되었으나 경과함에 따라 SI 값이 급격하게 감소하는 것으로 확인되어, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도에 비하여 그 기능이 빠르게 쇠퇴하는 것으로 확인되었다(도 7의 (C)).

[0091] <2-4> 산소 소비율(Oxygen Consumption Rate, OCR) 측정

[0092] 상기 실시예 <2-2> 및 <2-3>에서 확인한 알지네이트 마이크로파이버 내에 봉인된 채장 소도의 생존률 저하와 기능 감쇠가 산소 확산의 제한에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 채장 소도, 상기 실시예 <1-3-3> 및 <1-3-4>에서 각각 제조한 CAC 마이크로파이버와 알지네이트 마이크로파이버에 각각 봉입된 채장 소도를 각각 1일 동안 배양 배지 내에서 인큐베이션한 후, 교반형 티타늄 챔버(stirred titanium chamber)(MicroOxygen Uptake System FO/SYSZ-P250)(Instech Laboratories, 미국)를 이용하여 산소 소비율을 측정하였다. 먼저, 무처리 HBSS(Hank's balanced salt solution)와 아황산나트륨(Na_2SO_3)이 처리된 HBSS로 산소를 제거하여 각 챔버의 눈금을 바로잡고, 채장 소도와 200 μl 의 HBSS 용액을 37 °C로 유지된 상기 챔버에 첨가하였다. 그런 다음, 형광-기반 산소 센서(fluorescence-based oxygen sensor) Neofix(Ocean Optics, 미국)로 시간 경과에 따른 산소 분압을 측정하였다. 상기 측정된 산소 분압을 CyQUANT 키트(Invitrogen, 미국)에 의하여 측정된 세포 내 DNA양으로 나누어 산소 소비율을 산출하였다.

[0093] 그 결과, 유리 채장 소도, 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도의 산소 소비율이 통계적으로 유의한 차이가 없이 유사한 것으로 나타났다(도 7의 (D)). 상기와 같은 결과로부터, 알지네이트 마이크로파이버 및 CAC 마이크로파이버는 내부에 봉입된 채장 소도로의 산소 확산을 방해하지 않으며, 상기 알지네이트 및 CAC는 산소 투과도(oxygen permeability)가 우수하여 마이크로파이버의 소재로서 적합한 물질임을 알 수 있다. 또한, 상기 실시예 <2-2-2>에서 알지네이트 마이크로파이버 내 채장 소도의 생존률 저하 및 기능 감소는 산소 공급의 감소 때문이 아니라, 알지네이트와 채장 소도 세포 간의 상호작용 부재에 의한 것임을 알 수 있다.

[0094] <2-5> 소결 - 콜라겐 섬유와의 혼합에 의한 효과

[0095] 본 발명과 같이 상기 알지네이트 하이드로겔과 콜라겐 섬유를 혼합주입함으로써, 제조되는 마이크로파이버의 직경을 더욱 최소화할 수 있고, 제조되는 마이크로파이버 자체의 다공성을 더욱 향상시킬 수 있음을 알 수 있다(실시예 <2-1> 참조).

[0096] 또한, 생체적합성(biocompatibility)과 산소투과도(oxygen permeability)는 좋지만 세포와의 상호작용 능력이 떨어지는 알지네이트에, 콜라겐 섬유가 혼합됨으로써, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도는 생존률이

향상(실시에 <2-2> 참조)되고, 당 자극에 의한 인슐린 분비 기능이 잘 보존(실시에 <2-3> 참조)됨을 알 수 있다.

[0097] 상기와 같이 알지네이트 하이드로젤에 첨가되는 콜라겐 섬유는 체장 소도의 인 비보 미세환경(in vivo microenvironment)을 재현 또는 미믹(mimicking)한다. 따라서, 체장 소도의 막 수용체인 인테그린(integrin)과 ECM(Extracellular Matrix)의 RGD 펩티드 간의 상호 작용이 상기 콜라겐 섬유에 의하여 인 비트로(in vitro) 환경에서도 유지되고, 상기 인테그린과 RGD 펩티드 간의 상호작용에 의하여 PI3-kinase-PKB/AKT 및 ERK 신호전달 경로가 매개된다. 상기와 같은 신호 전달 경로에 의하여 체장 소도를 구성하는 세포들이 세포 자살(apoptosis)이 방지되는데, 이로 인하여 체장 소도의 생존률이 향상되고 기능 저하가 방지 되는 것으로 사료된다.

실시예 3

[0098] 인 비보(In vivo) 상에서의 특성 분석

[0099] <3-1> CAC 마이크로파이버의 이식

[0100] <3-1-1> 제1형 당뇨병 모델 동물의 준비

[0101] SZT(streptozotocin)(Sigma, 미국)이 용해된 시트레이트 완충용액(citrate buffer)(pH 4.5)을 한양대학교 동물 관리 및 이용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 규정에 따라 7주령의 수컷 BALB/c 마우스(나라-바이오, 한국)에 복강주사하고, 연속하여 3일 동안 혈당량을 300 mg/dl 이상으로 유지시켜, 제1형 당뇨병을 유발시켰다.

[0102] <3-1-2> CAC 마이크로파이버의 이종이식(xenotransplantation)

[0103] 상기 실시예 <3-1-1>과 같이 준비된 제1형 당뇨병 모델 동물의 복강(intraperitoneal cavity)에, 상기 실시예 <1-2>에서 분리한 유리 체장 소도(n=6) 또는 상기 실시예 <1-3-3>와 같은 방법으로 1200 IEQ의 소도가 봉입되도록 제조된 CAC 마이크로파이버(n=6)를 이종이식하였다.

[0104] <3-2> CAC 마이크로파이버의 혈당 강하 활성 및 면역보호 효과 확인

[0105] 상기 실시예 <3-1-2>에서 유리 체장 소도 또는 CAC 마이크로파이버를 이식한 모델 동물을 대상으로 4주 동안 비절식 혈당량(nonfasting blood glucose levels)을 측정하였고, 연속하여 2일 동안 혈당량을 200 mg/dl을 초과하는 경우에 고혈당증(hyperglycemia)인 것으로 정의하였다.

[0106] 그 결과, 유리 체장 소도를 이식한 마우스에서는 혈당량이 200 mg/dl 이하인 정상혈당 상태(normoglycemic condition)가 7.0±1.8일 동안만 유지된 반면(도 8의 (A)), CAC 마이크로파이버를 이식한 마우스에서는 혈당량이 200 mg/dl 이하인 정상혈당 상태(normoglycemic condition)가 4주(28±0.0일) 이상 유지되었다(도 8의 (B)). 또한, CAC 마이크로파이버를 이식한 마우스에서는 별도의 면역 억제제(immunosuppressive medication)를 병용투여하지 않았음에도 4주 이상의 기간 동안 아무런 이식 거부 반응이 나타나지 않았다.

[0107] <3-3> IPGTT(Intraperitoneal Glucose Tolerance Test) 분석

[0108] 정상 BALB/c 마우스(나라-바이오, 한국), 상기 실시예 <3-1-1>에서 제작한 제1형 당뇨병 모델 동물 및 상기 실시예 <3-1-2>에서 유리 체장 소도 또는 CAC 마이크로파이버를 이식한 모델 동물을 대상으로 복강내 포도당 내성 검사(IPGTT)를 수행하였다.

[0109] 상기 네 군의 마우스 군을 6시간 동안 단식시킨 후, 2 g/체중(kg)의 포도당을 복강으로 주입하였다. 상기 포도당의 주입 후, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 및 120분에 혈당량을 측정하였고, 상기 혈당량 커브면적(Area Under the Curve, AUC)을 측정하였다.

[0110] 그 결과, 알지네이트 마이크로파이버를 이식한 모델 동물의 혈당량 패턴은 제1형 당뇨병 모델 동물의 혈당량 패턴과 유사하게 측정된 반면, CAC 마이크로파이버를 이식한 모델 동물의 혈당량 패턴이 정상 BALB/c 마우스의 혈당량 패턴과 유사하게 측정되었다(도 8의 (C)). 또한, 상기 혈당량 곡선의 AUC 분석 결과, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 체장 소도가 혈당 제거(blood glucose clearance) 측면에서 정상 BALB/c 마우스의 체장 소도와 비슷한 약물동역학적 능력(pharmacokinetic ability)을 갖는 것으로 확인되었다(도 8의 (D)).

[0111] <3-4> 면역조직화학법적 분석

[0112] 상기 실시예 <3-3>에서의 혈당량 변화 관찰 후, 유리 채장 소도 또는 CAC 마이크로파이버를 이식한 모델 동물에서 각각 유리 채장 소도 및 CAC 마이크로파이버 내의 채장 소도를 각각 회수하여 4 % 파라포름알데히드로 4 ℃에서 60분 동안 고정시키고, 20 % 수크로즈(sucrose)가 포함된 PBS에 밤새 침지시킨 후, OCT(Optimum Cutting Temperature) 화합물(Tissue-Tek, 일본)에 포매시켰다. 상기 포매된 채장 소도를 10 μ m의 냉동 박편(cryostat section)으로 절단하고, 접착성 현미경 슬라이드(Mariefeld, 독일)에 모아 PBS로 수차례 세척한 다음, 4 %의 Block Ace(Dainippon Pharma, 일본)으로 4 ℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 상기와 같이 준비된 박편에 CD45 및 인슐린에 대한 1차 마우스 단일클론 항체(1:100 희석)(Abcam, 미국)를 처리하여 4 ℃에서 밤새 반응시키고, PBS로 2차례 세척한 다음, 2차 항체(1:200 희석)(Invitrogen, 미국)를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 핵은 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)(Invitrogen, 미국)로 염색하였고, 형광 이미지는 공초점 현미경(confocal microscope)(Olympus, 일본)으로 관찰하였다.

[0113] 그 결과, 이중이식된 유리 채장 소도에서는 CD45 양성 세포들이 많이 검출되고 인슐린 양성 세포들은 거의 검출되지 않은 반면, CAC 마이크로파이버 내에 봉입되어 이식되었던 채장 소도에서는 인슐린 양성 세포들이 높게 검출되고 CD45 양성 세포들은 거의 검출되지 않았다(도 8의 (E)).

[0114] 상기와 같은 결과로부터, 이중이식된 유리 채장 소도는 이식 수여체의 면역 반응에 의하여 손상되는 반면, CAC 마이크로파이버 내에 봉입된 채장 소도는 이중이식에도 불구하고 4주가 넘는 기간 동안 이식 수여체의 면역 반응으로부터 보호됨을 알 수 있다.

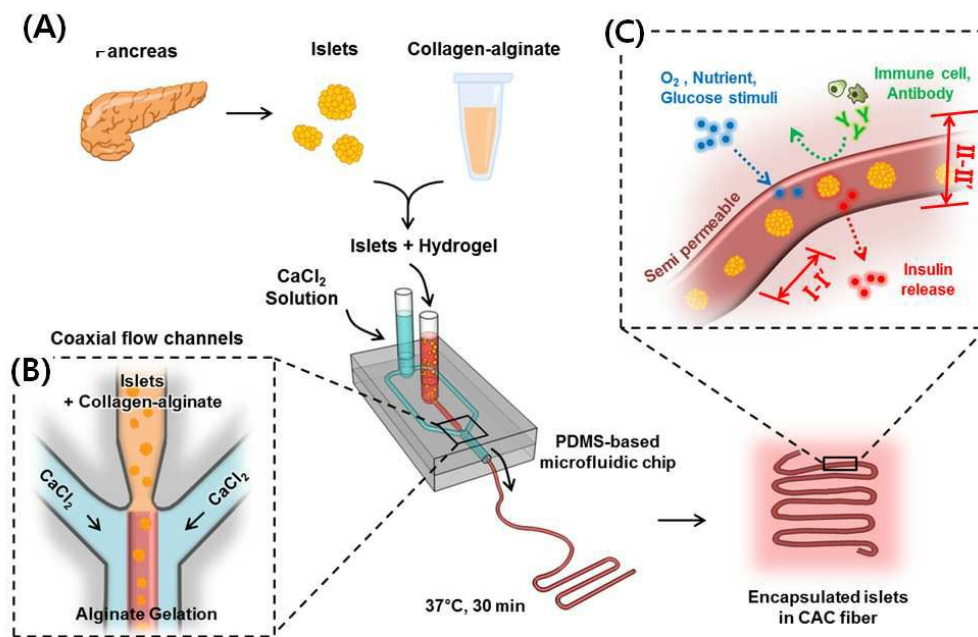
[0115] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 특허청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

부호의 설명

- [0116] 10 : CAC(Collagen-Alginate Composite) 용액 주입구
 20 : 코어(core) 미세채널
 30 : 가교제 용액 주입구
 40 : 시스(sheath) 미세채널
 50 : 접합점
 60 : 배출채널
 100 : 알지네이트 지지체
 200 : 콜라겐 섬유
 300 : 이식 대상 물질

도면

도면1



도면2

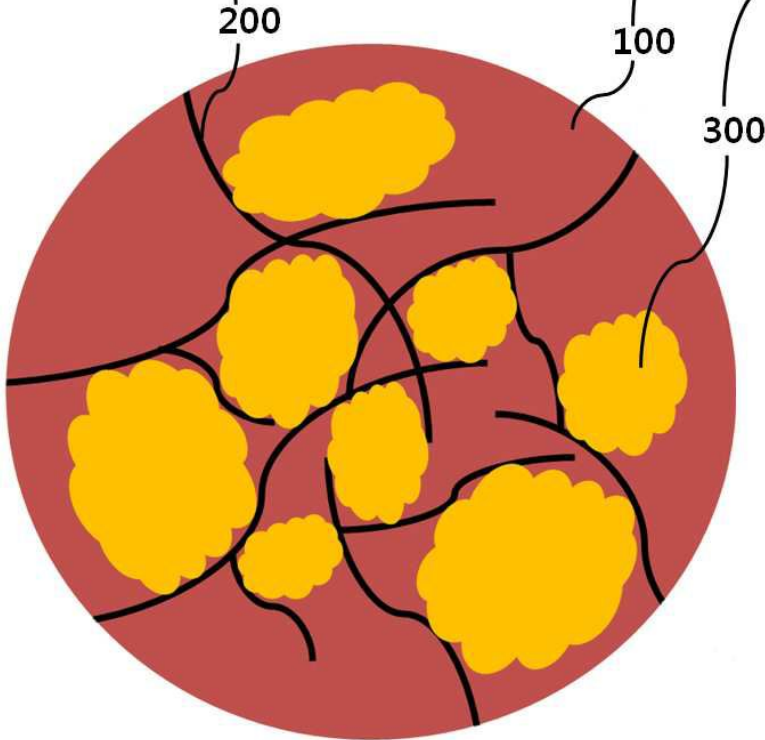
(A)

I-I'

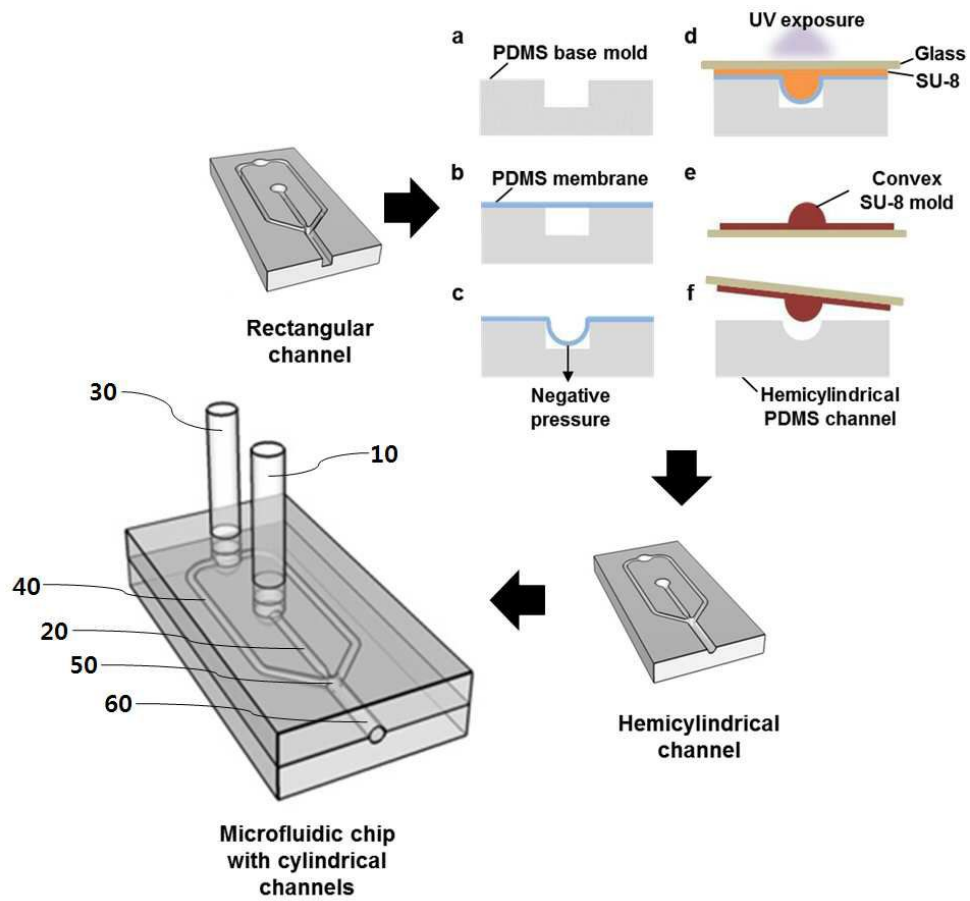


(B)

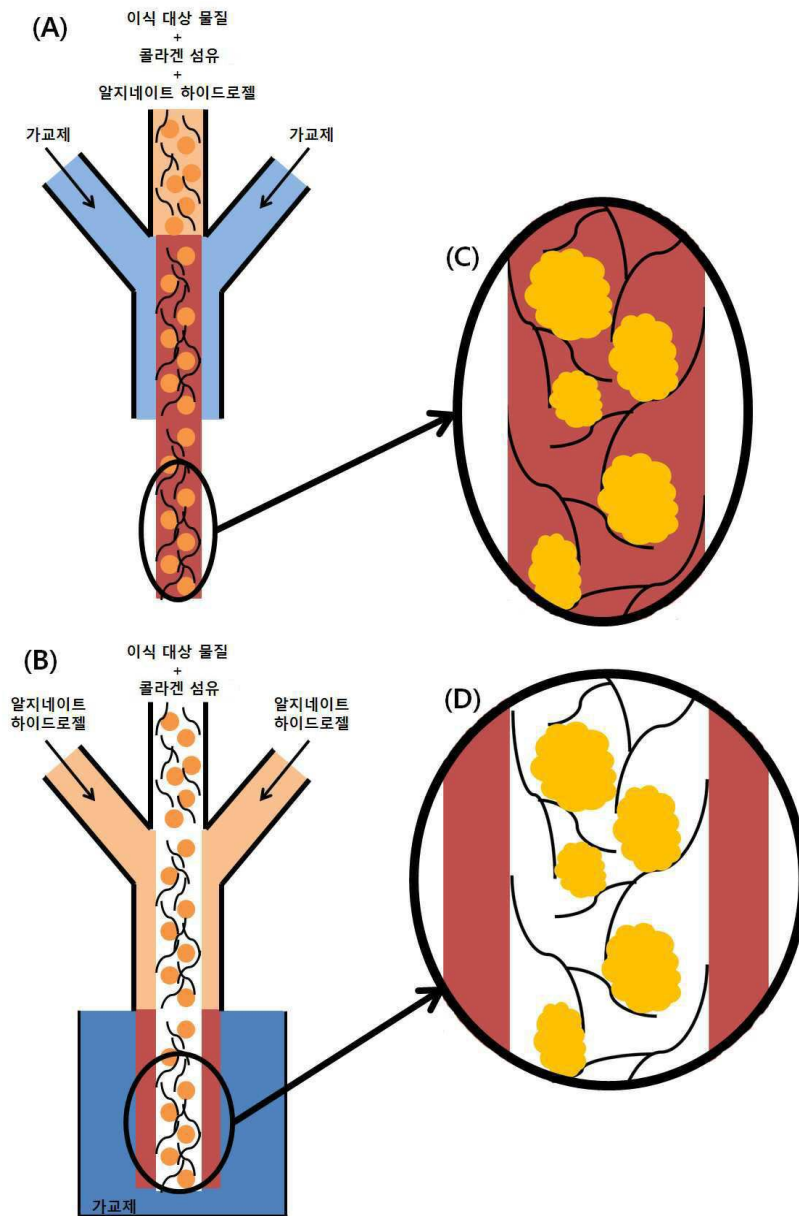
II-II'



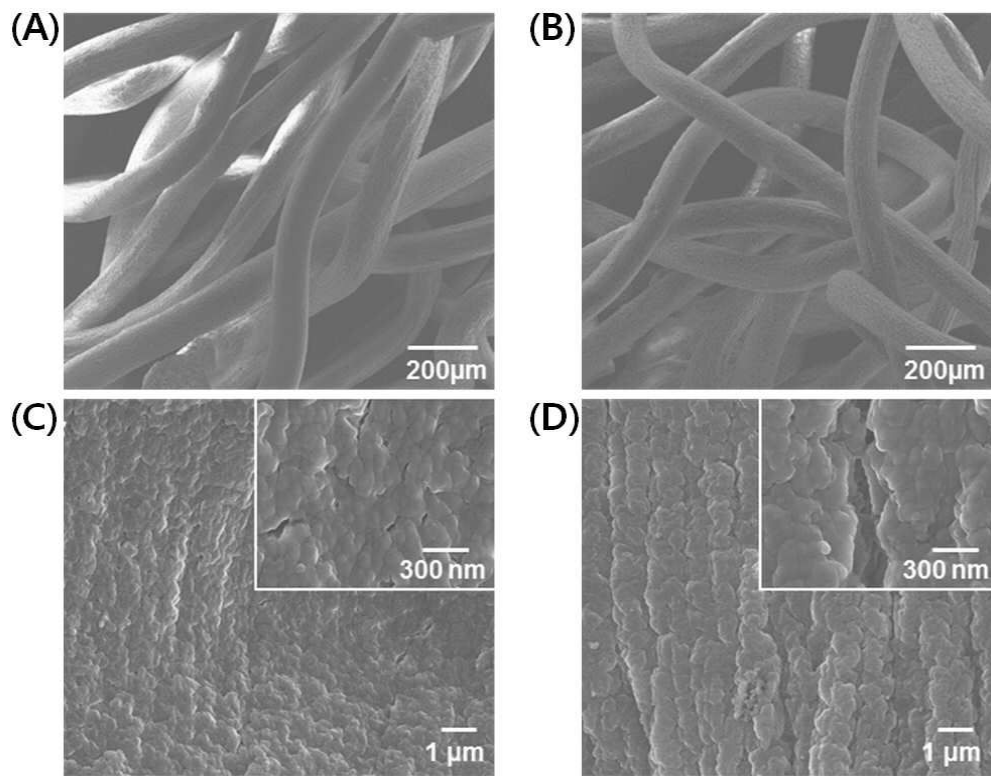
도면3



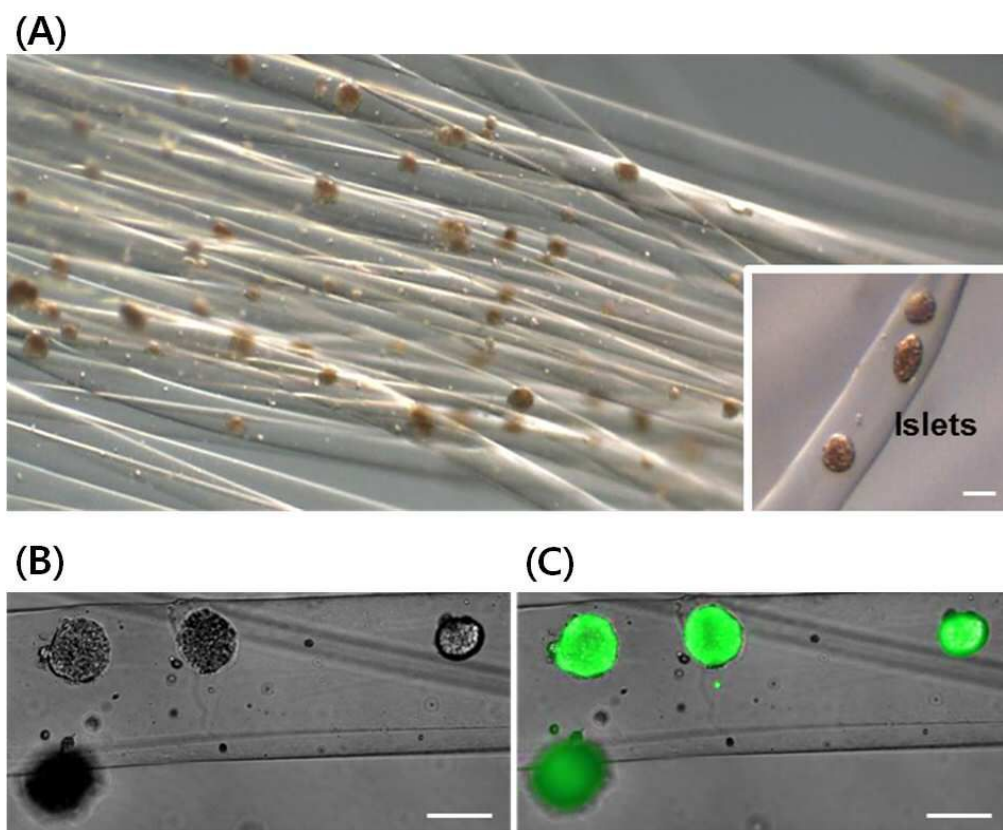
도면4



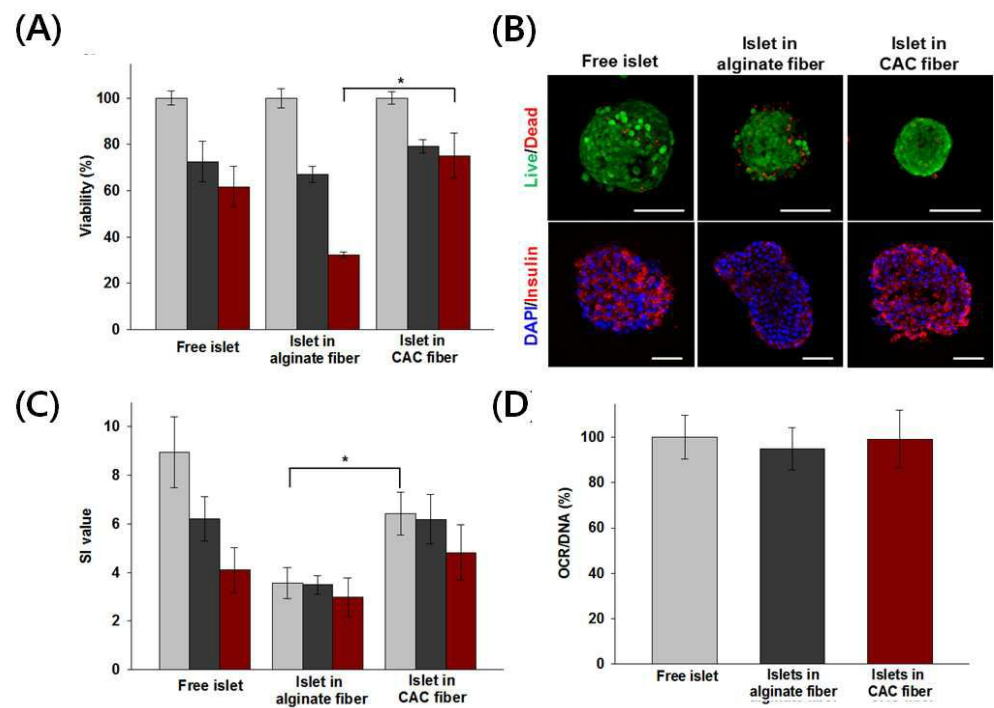
도면5



도면6



도면7



도면8

