



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0090200
(43) 공개일자 2020년07월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01J 13/14 (2006.01) *A23P 10/30* (2016.01)
A61K 35/12 (2020.01) *A61K 8/04* (2006.01)
A61K 8/11 (2006.01) *A61K 8/20* (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
B01J 13/14 (2013.01)
A23P 10/30 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2020-7017483
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월20일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년06월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/081913
- (87) 국제공개번호 WO 2019/101734
 국제공개일자 2019년05월31일
- (30) 우선권주장
 1761018 2017년11월21일 프랑스(FR)

- (71) 출원인
유니베르시떼 드 보르도
 프랑스 에프-33000 보르도 블라스 빼이 베를랑 35
앵스띠뛰 도프띠끄 테오리끄 에 아플리끄
 프랑스 91127 팔레조 세텍스 아브뉴 오귀스탱 프
 레스넬 2
상뜨르 나쇼날 드 라 러쵸르쉬 상띠띠끄
 프랑스 에프-75016 파리 튀 미셸-앙즈 3
- (72) 발명자
페이유 막심
 프랑스 33400 딸링스 튀 페이다방 34
알렉상드리 케뱅
 프랑스 33000 보르도 튀 생 레미 40 비
나수아 피에르
 프랑스 33000 보르도 튀 보르다 25
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔의 외부 셸로 제작된 캡슐의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔 외부 셸을 각각 포함하는 복수의 캡슐을 제조하는 방법으로, 여기서 중심 코어를 형성하도록 설계된, 하이드로겔 용액 및 관심 조성물은 동심으로 공압출되어 관심 액체 조성물의 방울을 둘러싸는 하이드로겔 용액 층을 각각 포함하는 혼합된 방울을 형성하고, 공압출 단계가 가교 에어로졸 위에서 수행되어 혼합된 방울이 상기 가교 에어로졸을 통과하여, 하이드로겔 용액 층이 적어도 부분적으로 상기 에어로졸과 접촉하는 관심 액체 조성물의 방울 주위에 가교되도록 하는 것을 특징으로 하는, 캡슐 제조 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 8/042 (2013.01)

A61K 8/11 (2013.01)

A61K 8/20 (2013.01)

A61K 9/5036 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61K 2035/128 (2013.01)

A61K 2800/10 (2013.01)

A61K 2800/412 (2013.01)

A61K 2800/621 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔 외부 셸을 각각 포함하는 복수의 캡슐을 제조하는 방법으로, 여기서 중심 코어를 형성하도록 설계된, 하이드로겔 용액 및 수성의 관심 조성물은 동심으로 공압출되어 관심 조성물의 방울을 둘러싸는 하이드로겔 용액 층을 각각 포함하는 혼합된 방울을 형성하고, 공압출 단계가 가교 에어로졸 위에서 수행되어 혼합된 방울이 상기 가교 에어로졸을 통과하여, 하이드로겔 용액 층이 적어도 부분적으로 상기 에어로졸과 접촉하는 관심 조성물의 방울 주위에 가교되도록 하고, 상기 캡슐은 구형이며 50 내지 500 μm 의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는, 캡슐 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 가교 에어로졸은 가교 용액의 미세방울로부터 형성되고, 바람직하게는 0.5 내지 20 μm , 바람직하게는 1 내지 10 μm , 바람직하게는 5 $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ 의 직경인, 캡슐 제조 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 에어로졸을 형성하는 가교 용액의 미세방울은 혼합된 방울이 가교 에어로졸을 통한 압출 흐름에 의해 투영되는 속도보다 낮은 낙하 속도를 갖는, 캡슐 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐은 가교 에어로졸을 통과한 후 회수 바스에 침지되고, 상기 회수 바스는 유리하게는 가교 용액을 포함하는, 캡슐 제조 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합된 방울에 계면활성제가 없는, 캡슐 제조 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 가교 에어로졸의 삼투농도가 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물의 삼투농도의 0.1 내지 10 배, 바람직하게는 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물의 삼투농도의 0.3 내지 3 배이거나, 가교 에어로졸 및 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물이 등-삼투성인, 캡슐 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합된 방울이 분산되도록 하전되고 가교 에어로졸이 반대로 하전되거나 중성인, 캡슐 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 중심 코어를 형성하기 위한 관심 조성물이 세포 용액, 식품 조성물, 화장품 조성물 또는 약제학적 조성물로부터 선택되는, 캡슐 제조 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로겔 용액이 알지네이트 용액이고, 중심 코어를 형성하기 위한 관심 조성물이 세포를 포함하고 가교 에어로졸이 염화칼슘 용액의 미세방울을 포함하는, 캡슐 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 액체일 수 있는 중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔의 외부 셸로 형성된 캡슐의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 관심 조성물의 특성이 보존되는 캡슐을 형성하기 위해 관심 조성물을 캡슐화하기 위한 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 캡슐화 방법은 보통 액체인, 중앙 조성물을 함유하는 외부 셸로 이루어진 캡슐을 제조하기 위해 최근에 개발되었다. 이러한 캡슐은 특히 제약 및 화장품 분야에서 사용된다. 중앙 조성물은 외부 손상으로부터 보호되고 방출이 보다 잘 제어될 수 있는 활성제를 함유한다.

[0003] 일반적으로, 캡슐은 캡슐화될 관심 조성물과 함께, 외부 셸을 형성하기 위해 가교 후에 의도된, 하이드로겔 용액을 중심으로 공압출함으로써 수득된다. 압출기의 출구에서, 관심 조성물의 한 방울을 둘러싸는 하이드로겔 용액 층으로 구성된, 혼합된 방울이 수득된다. 이어서, 혼합된 방울은 가교제를 포함하는 바스로 떨어지며, 여기서 하이드로겔 층의 가교가 발생한다.

[0004] 그러나, 혼합된 방울의 분해는 압출기에서 가교 바스로 떨어질 때 및/또는 혼합된 방울이 가교 바스와 충돌할 때 종종 관찰된다. 하이드로겔의 외부 층은 충격의 힘 하에서 부분적으로 또는 전체적으로 파괴되어, 가교 전에 관심 조성물의 방울을 하이드로겔의 액체 층과 부분적으로 혼합시키거나, 또는 심지어 하이드로겔의 가교 동안 혼합된 방울의 외부를 향하여 관심 조성물의 방울의 방출을 초래한다. 또한, 회수된 캡슐은 규칙적인 형태 또는 크기 및/또는 제어된 토폴로지가 아니다.

[0005] 결과적으로, 혼합된 방울이 가교 바스와 충격에 파열되는 것을 방지하기 위해 하이드로겔 용액에 계면활성제를 첨가하는 것이 종종 필요하다. 계면활성제는 캡슐의 내용물과 접촉하여 그 특성을 변경시킬 수 있다. 따라서, 캡슐이 활성제 또는 세포를 함유하는 경우, 이는 활성제의 효과를 감소시키거나 세포 사멸을 초래하는 것과 같은 현저한 부정적인 결과를 가질 수 있다. 유사하게, 캡슐이 농식품 조성물을 함유하는 경우, 그 조성물의 감각 작용 특성은 계면활성제와의 상호작용에 의해 변경될 수 있다.

[0006] 또한, 가교제의 농도는 충격에 대한 낙하의 구조를 동결시키기 위해 반드시 높다. 결과적으로, 가교제는 가교 동안 하이드로겔 용액 층을 통과하고 캡슐 내부로 침투한다. 계면활성제와의 상호작용뿐만 아니라, 가교제의 캡슐 내부와의 접촉은 그 함량의 특성을 변경시킬 수 있다.

[0007] 이들 가교제 및 계면활성제는 또한 인체에 자극적일 수 있다. 따라서, 특히 캡슐의 의도된 용도에 따라, 표면 및/또는 캡슐 내에서 모든 미량의 가교제 및/또는 계면활성제를 제거하기 위해 철저한 세정 단계를 수행하는 것이 때때로 필요하다. 이러한 세정 단계는 이러한 캡슐의 수율을 현저히 감소시키고 생산 비용을 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 관심 조성물, 특히 액체 조성물을 함유하는 하이드로겔 캡슐의 제조 방법이 필요하며, 이는 높은 처리량으로, 과도한 비용없이, 제어된 형상 및 구조의 캡슐을 수득할 수 있도록 허용한다.

[0009] 이러한 문제를 해결하면서, 본 발명자들은 캡슐이 그들이 수용되는 회수 바스에 충격 전에 관심 조성물의 방울 주위에서 하이드로겔 층을 적어도 부분적으로 가교시키는 것이 가능함을 발견했다. 관심 조성물의 방울 주위에서 하이드로겔의 이러한 사전-가교는 캡슐의 파괴 위험을 방지한다. 더욱이, 캡슐 내용물과 가교제 및/또는 가능한 계면활성제의 접촉 위험이 또한 감소된다. 이러한 조기 가교를 허용하기 위해, 본 발명자들은 통상적으로 하이드로겔 용액과 관심 조성물의 공압출에 의해 수득된, 혼합된 방울이 가교제를 포함하는 미세입자 (액체 또는 고체)로 형성된 에어로졸을 통과하는 방법을 개발하였다. 미세입자는 상기 에어로졸을 통한 이들의 낙하 동안 혼합된 방울의 표면에서 합체되고, 하이드로겔의 적어도 부분적인 가교를 허용한다. 유리하게는, 하이드로겔의 최외곽 층은 가교되어, 관심 조성물의 방울 주위에 양성 또는 반-양성 셸을 형성한다. 반대로, 제트에 의한 분무 또는 김서림은, 가교제의 미세입자가 혼합된 방울의 내부로 침투하는 것을 선호하여, 혼합된 방울의 구조를 변경하기 위해, 하이드로겔의 외부 층이 혼합된 방울의 코어를 형성하는 관심 조성물의 방울과 혼합되게 한다. 제트에 의한 분무와는 반대로, 미세입자가 공기 중에 현탁되는 미스트 또는 에어로졸의 사용은, 혼합된 방울 주위에 얇은 층의 가교제의 침착을 촉진시켜, 하이드로겔 층의 표면의 적어도 부분적인 가교를 야기한다. 이러한 방법은 유리하게는 계면활성제의 사용을 생략할 수 있게 하며, 이는 세포를

함유하는 캡슐의 제조에 특히 흥미로울 수 있다. 필요한 경우, 가교가 충분하지 않다면, 가교 바스에서 계속할 수 있다. 본 발명에 따르면, 사전-가교된 하이드로겔 층은 캡슐이 낙하 후 수용되는 액체와의 충격에 대해 캡슐을 보호한다. 더욱이, 이들 캡슐이 가교 바스에 침지될 때, 사전-가교된 층의 존재는, 심지어 매우 얇더라도, 캡슐의 구조를 보호하고 그의 변형을 방지하기에 충분하다. 또한, 임의의 가교 바스에서의 침지 시간이 감소될 수 있고 후속 세정 단계가 또한 감소될 수 있다.

[0010] 따라서 본 발명은 중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔의 외부 셸을 각각 포함하는 복수의 캡슐을 제조하는 방법에 관한 것으로, 여기서 중심 코어를 형성하도록 설계된, 하이드로겔 용액 및 수성의 관심 조성물은 동심으로 공압출되어 관심 조성물의 방울을 둘러싸는 하이드로겔 용액 층을 각각 포함하는 혼합된 방울을 형성하고, 공압출 단계가 가교 에어로졸 위에서 수행되어 혼합된 방울이 상기 가교 에어로졸을 통과하여, 하이드로겔 용액 층이 적어도 부분적으로 상기 에어로졸과 접촉하는 관심 조성물의 방울 주위에 가교되도록 하는 것을 특징으로 하는 캡슐 제조 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 또한 하이드로겔 층의 외부 표면이 충격에 의해 야기되는 표면 불규칙 형태의 가교 에어로졸과의 접촉 흔적을 갖는 이러한 방법에 의해 수득가능한, 캡슐에 관한 것이다. 따라서 이러한 캡슐은 관심 조성물의 한 방울로 이루어진 중심 코어를 둘러싸는 가교된 하이드로겔의 외부 층을 특징으로 하며, 여기서 하이드로겔 층의 외부 표면은 별집 모양, 즉 별집으로 덮여있다.

[0012] 본 발명은 또한 중심 코어가 20 % 미만, 바람직하게는 10 % 미만의 캡슐화로 인한 과잉 사망률을 갖는 세포를 포함하는, 상기 기재된 캡슐에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명에 따른 방법은 가교 에어로졸에 의해 중심 코어 주위에서 하이드로겔 층을 적어도 부분적으로 가교시키는 단계를 특징으로 하며, 미세입자는 하이드로겔 층의 표면에서 합체된다.

[0014] 구체적으로, 압출기 유출구에 형성된 혼합된 방울은 압출 흐름에 의해 수용 표면을 향해 돌출되고 압출기 유출구와 수용 표면 사이에 배열된 에어로졸을 통과한다.

[0015] 수용 표면은 가교 에어로졸을 통과한 후 캡슐이 떨어지거나 떨어지는 성분을 의미한다. 일 구체예에서, 수용 표면은 임의로 가교 용액을 포함하는, 회수 바스로 이루어진다.

[0016] 본 발명에 따르면, 하이드로겔 용액 및 관심 조성물을 동심으로 공압출하기 위한 임의의 압출 방법이 사용될 수 있다. 특히, 용액이 가교 에어로졸을 통해 공압출되도록, Alessandri *et al* (PNAS, September 10, 2013 vol. 110 no.37 14843-14848; Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604) 또는 Onoe *et al.*, (Nat Material 2013, 12(6):584-90) 에 기재된 방법 및 미소유체 장치를 적용함으로써 혼합된 방울을 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어, 본 발명에 따른 방법은 특허 FR2986165에 기재된 바와 같이 이중 또는 삼중 동심 셸을 갖는 압출 장치에 의해 수행된다.

[0017] 본 발명에 따르면, “혼합된 방울”은 말초 하이드로겔 용액 및 중심 관심 조성물이 동심 방식으로 공압출되는 압출기의 출구에서 수득된 방울을 의미한다. 따라서 혼합된 방울은 관심 조성물의 한 방울을 둘러싸는 비-가교된 하이드로겔 용액 층으로 구성된다. “관심 조성물의 방울”은 소량의 관심 조성물로 정의되며, 이는 겔, 크립 등과 같은 액체, 용액, 콜로이드 또는 현탁액일 수 있다. 일반적으로, 관심 조성물은 유리하게는 수성이다. 따라서 이는 겔, 크립, 액체 형태의 수성 조성물 등일 수 있다. 겔 형태의 관심 조성물의 경우에, 상기 겔은 유리하게도 혼합된 방울의 외층을 형성하는데 사용되는 하이드로겔과 상이하다. 바람직하게는, 관심 조성물은 알지네이트를 포함하지 않으며, 보다 일반적으로 가교성 화합물을 포함하지 않는다.

[0018] 반대로, “캡슐”은 하이드로겔 층의 적어도 부분적인 가교 후에, 혼합된 방울로부터 유래된 생성물을 의미한다. 따라서 캡슐은 관심 조성물의 방울 주위에서 가교에 의해 적어도 부분적으로 강화된 외부 하이드로겔 셸로 구성된다.

[0019] 캡슐과 같은 혼합된 방울은 유리하게는 형태상으로 구형이다.

[0020] 본 발명의 문맥에서, “가교된 하이드로겔 외부 셸”은 액체, 바람직하게는 물에 의해 팽윤된 중합체 사슬의 매트릭스로부터 형성된 3차원 구조를 의미한다. 이러한 가교된 하이드로겔 외부 셸은 하이드로겔 용액을 가교시킴으로써 수득된다. 유리하게는, 하이드로겔 용액의 중합체(들)은 온도, pH, 이온 등과 같은 자극을 받을 때 가교될 수 있는 중합체이다. 유리하게는, 사용되는 하이드로겔 용액은 세포에 유독하지 않다는 의미에서,

생체적합성이다. 캡슐화될 관심 조성물이 세포를 포함하는 경우, 하이드로겔 층은 유리하게는 산소 및 영양소의 확산뿐만 아니라 이산화탄소 및 대사 폐기물을 세포에 공급하고 그들의 생존을 허용할 수 있게 한다. 하이드로겔 용액에서 중합체는 천연 또는 합성 기원일 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔 용액은 셀포네이트계 중합체, 예컨대 소듐 폴리스티렌 셀포네이트, 아크릴레이트계 중합체, 예컨대 소듐 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트, 화합물 젤라틴 메타크릴레이트, 다당류, 박테리아 기원의 다당류, 예컨대 겔란검, 또는 식물성 기원의 다당류, 예컨대 펙틴 또는 알지네이트를 포함하는, 다당류 중에서 하나 이상의 중합체를 포함한다.

[0021] 일 구체예에서, 하이드로겔 용액은 적어도 알지네이트를 포함한다. 바람직하게는, 하이드로겔 용액은 단지 알지네이트만을 포함한다. 본 발명의 문맥에서, “알지네이트”는 β -D-만누로네이트 (M) 및 α -L-글루루로네이트 (G), 이들의 염 및 유도체로부터 형성된 선형 다당류를 의미한다. 유리하게는, 알지네이트는 80% 초과 G 및 20% 미만의 M으로 구성된 소듐 알지네이트로서, 평균 분자 질량이 100 내지 400 KDa (예를 들어, PRONOVA® SLG100)이고 총 농도는 밀도 (질량/부피)에 의한 0.5 % 내지 5 % 이다.

[0022] 본 발명에 따르면, 가교 에어로졸은 접촉할 때, 알지네이트와 같은, 적어도 하나의 친수성 중합체를 포함하는 하이드로겔을 가교시키도록 조정된 적어도 하나의 가교제를 포함한다. 바람직하게는, 가교 에어로졸은 계면활성제가 없다.

[0023] 일 구체예에서, 가교 에어로졸은 가교 용액의 미세방울로부터 형성된다. 이러한 에어로졸은 액체 용액, 특히 막 미스터로부터 에어로졸을 형성하기 위해 통상적으로 사용되는 임의의 수단에 의해 수득될 수 있다. 다른 구체예에서, 가교 에어로졸은 예를 들어 카보네이트 및/또는 염화칼슘 미세분말 형태의 가교제의 고체 미세입자로 구성된다.

[0024] 가교 용액은 유리하게는 적어도 하나의 2가 양이온을 함유한다. 가교 용액은 또한 알지네이트 또는 친수성 중합체의 다른 공지된 가교제, 또는 용매, 예를 들어 조사에 의해 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 기술에 의해 가교를 허용하도록 조정된, 물 또는 알코올을 포함하는 용액일 수 있다. 유리하게는, 가교 용액은 적어도 하나의 2가 양이온을 포함하는 용액이다. 바람직하게는, 2가 양이온은 용액에서 알지네이트가 가교될 수 있도록 하는 양이온이다. 예를 들어, 2가 양이온은 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} 및 Sr^{2+} 또는 이들의 2가 양이온 중 둘 이상의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된다. 2가 양이온, 예를 들어 Ca^{2+} 은, 예를 들어 CaCl_2 또는 CaCO_3 유형의 용액을 형성하기 위해 반대 이온과 결합될 수 있고, 이는 당업자에게 잘 알려져 있다. 가교 용액은 또한 글루코노 델타-락톤 (GDL)과 결합하여 CaCO_3 -GDL 용액을 형성하는 CaCO_3 를 포함하는 용액일 수 있다. 가교 용액은 또한 CaCO_3 - CaSO_4 -GDL의 혼합물일 수 있다. 본 발명에 따른 방법의 특정 구체예에서, 가교 에어로졸은 특히 Ca^{2+} 형태의 칼슘을 포함하는 가교 용액의 미세방울로 이루어진다. 당업자는 2가 양이온 및/또는 반대 이온의 성질뿐만 아니라 본 발명의 방법의 다른 파라미터, 특히 사용되는 중합체의 성질 및 원하는 속도 및/또는 가교도에 대한 이의 농도를 조절할 수 있다. 예를 들어, 가교 용액 중 2가 양이온의 농도는 10 내지 1000 mM이다. 가교 용액은 특정 조건, 특히 시간 및/또는 온도 하에서 하이드로겔 시스의 가교를 개선시키기 위해, 상기 기재된 것 이외에, 당업자에게 잘 알려진, 다른 성분을 포함할 수 있다.

[0025] 유리하게는, 가교 에어로졸은 바람직하게는 0.5 내지 20 μm , 바람직하게는 1 내지 10 μm , 보다 바람직하게는 5 $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ 인, 가교 용액의 미세방울로 형성된다.

[0026] 일 구체예에서, 에어로졸을 형성하는 고체 미세입자 또는 가교 용액의 미세방울은 혼합된 방울이 가교 에어로졸을 통한 압출 흐름에 의해 투영되는 속도보다 낮은 낙하 속도를 갖는다. 바람직하게는, 에어로졸을 형성하는 고체 미세입자 또는 가교 용액의 미세방울은 공중에 정적으로 매달려 있다. 일 구체예에서, 혼합된 방울은 가교 에어로졸을 통해 중력에 의해 떨어지고, 가교 에어로졸을 통한 혼합된 방울의 낙하 속도는 가교 미세방울 또는 고체 미세입자의 낙하 속도보다 높다.

[0027] 일 구체예에서, 가교 용액의 미세방울의 에어로졸은 3×10^3 미세방울/ cm^3 의 밀도를 갖는다.

[0028] 유리하게는, 가교 용액의 미세방울의 에어로졸 부피는 인클로저에서 유지되며, 그 치수는 원하는 에어로졸 밀도 및/또는 농도를 유지하도록 조정된다. 이러한 밀도는 상기 에어로졸이 평균 상태로 유지될 수 있도록 한다.

[0029] 가교 용액의 미세방울은 바람직하게는 균일하게, 혼합된 방울의 표면에서 합쳐져서, 상기 혼합된 방울의 전체

표면에 걸쳐 하이드로겔 층의 적어도 부분적인 가교를 촉진시킨다. 예를 들어, 직경이 50 내지 500 μm 인 각각의 혼합된 방울은 캡슐 내에 적어도 부분적으로 가교된 혼합된 방울을 수용하기 위해 표면에 도달하기 전에 적어도 100개의 미세방울의 가교 용액으로 둘러싸여 있다. 당업자는 표면에 따라 각각의 혼합된 방울 주위에 미세방울의 층을 수득하기 위해 방울 높이, 에어로졸 내 미세방울의 밀도 및/또는 에어로졸 유량을 조절할 수 있다. 낙하 높이는 압출기 출구와 캡슐에서 상기 적어도 부분적으로 가교된 혼합된 방울의 수용면 사이의 에어로졸을 통해 혼합된 방울에 의해 이동한 거리로 정의된다.

- [0030] 특정한 예시적인 구체예에서, 3×10^3 미세방울/ cm^3 의 밀도를 갖는 가교 용액의 미세방울의 에어로졸이 사용되고, 상기 에어로졸은 직경이 약 20 cm 인 인클로저 내에 20 L/h의 유량으로 분무되어, 60cm의 에어로졸에서 혼합된 방울의 낙하 높이를 유지하는 동안, 에어로졸을 주위 공기로부터 격리시켜 에어로졸의 충분한 밀도를 유지할 수 있도록 한다.
- [0031] 특정한 구체예에서, 가교 용액의 미세방울은 서로 반발하도록 하전되어, 에어로졸에서 미세방울의 전기분산을 촉진시킨다. 이는, 예를 들어 에어로졸에서 분무 또는 김서림 전에 가교 용액에 직류를 인가함으로써 달성될 수 있다.
- [0032] 대안적으로 또는 추가적으로, 혼합된 방울, 및 보다 특히 하이드로겔 용액 층이, 충전된다. 이러한 방식으로, 혼합된 방울은 그들이 가교 에어로졸을 통과할 때 더 큰 횡단면 반경으로 분산된다. 이는 가교에 유용한 에어로졸의 양을 증가시킴으로써 필요한 방울 높이를 감소시킨다. 실제로, 이전의 것과 동일한 궤적을 통과하는 혼합된 방울은 더 적은 가교 미세방울을 만난다. 더욱이, 이는 또한 비행 중 및 충격에서 혼합된 방울의 응집/용융 위험을 감소시킨다.
- [0033] 가교 용액의 미세방울 및 혼합된 방울이 충전되는 경우, 혼합된 방울의 표면 주위에 미세방울의 침착을 적절하게 하기 위해, 전하가 유리하게 반대된다.
- [0034] 일 구체예에서, 가교 에어로졸은 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물의 삼투압보다 0.1 내지 10 배 더 큰 삼투압, 또는 삼투농도를 갖는다. 바람직하게는, 가교 에어로졸은 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물의 삼투압보다 0.3 내지 3 배 더 큰 삼투압, 또는 삼투농도를 갖는다. 다른 구체예에서, 가교 에어로졸 및 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물은 등-삼투성, 즉 실질적으로 동일한 삼투농도를 갖는다. 예를 들어, 관심 조성물이 세포의 조성물인 경우, 가교 에어로졸은 100 mM 칼슘 용액으로부터 형성된다. 일반적으로, 가교 에어로졸은 삼투압에 의해 생성된 혼합된 방울의 변형을 피하고 캡슐의 구조를 보존하기 위해 고-삼투성이어서는 안된다.
- [0035] 본 발명에 따르면, 회수 바스에서 가교 에어로졸을 통과한 후 사전-강화된 캡슐을 수용할 수 있다. 이 경우에, 회수 바스는 바람직하게는 캡슐의 중심 코어를 형성하는 관심 조성물과 등-삼투성이다.
- [0036] 일 구체예에서, 회수 바스는 필요한 경우 하이드로겔을 추가로 가교시키기 위한 가교 용액을 포함할 수 있다. 이러한 가교 용액은 필요한 경우, 계면활성제를 포함할 수 있다. 그렇지 않으면, 특히 가교 에어로졸을 통해 낙하하는 하이드로겔의 가교가 충분한 경우, 가교 바스는 간단한 식염수 용액을 포함할 수 있다.
- [0037] 유리하게는, 혼합된 방울에는 계면활성제가 없다. 특히, 하이드로겔 조성물은 유리하게는 계면활성제가 없다. 유사하게, 본 발명에 따른 캡슐은 유리하게는 가교된 하이드로겔 층 및 중심 코어 모두에서, 계면활성제가 없다.
- [0038] 유리하게는, 하이드로겔 용액 및 관심 조성물은 공압출되어 혼합된 방울을 형성한 다음, 직경이 50 내지 500 μm 인 구형 캡슐을 형성한다. 특정한 구체예에서, 외부 하이드로겔 쉼의 두께는 캡슐 반경의 5 내지 40%를 나타낸다. 본 발명의 문맥에서, “두께”는 캡슐의 중심으로부터 방사상으로 확장하는 치수이다. 당업자는 이러한 치수를 수득하기 위해 공압출 파라미터를 조정하는 방법을 알고 있다.
- [0039] 본 발명에 따르면, 관심 조성물은 하이드로겔 용액과 공압출되어 상기 관심 조성물의 한 방울을 함유하는 캡슐을 형성할 수 있는 임의의 조성물을 의미한다. 유리하게는, 관심 조성물은 액체, 수성 또는 겔화된 조성물이다. 일 구체예에서, 수성 조성물은 겔화된 수성 조성물이다. 특히, 세포를 포함하는 조성물, 식품 조성물, 화장품 조성물 또는 약제학적 조성물을 사용하는 것이 가능하다. 예를 들어, 관심 조성물은 단백질 겔 및/또는 세포 겔이다.
- [0040] 본 발명에 따라, 임의의 유형의 세포 조성물이 사용될 수 있다. 특히, 인간 다능성 줄기 세포를 둘러싸는 하이드로겔 캡슐을 제조하는 것이 가능하다. 다능성 줄기 세포, 또는 다능성 세포는 전체의 본래 유기체에

존재하는 모든 조직을 형성하는 능력을 갖지만, 그와 같은 전체의 유기체를 형성할 수는 없는 세포로 정의된다. 특히, 본 발명에 따른 캡슐은 예를 들어 체세포로부터, 유도된 다능성 줄기 (IPS) 세포를 함유할 수 있다. 보다 일반적으로, 본 발명의 문맥에서, 세포 조성물은 인간 배아로부터 유래된 세포를 포함하지 않는다.

[0041] 특정 구체예에서, 하이드로겔 용액은 알지네이트 용액 (예를 들어 SLG100)이고, 중심 코어를 형성하기 위한 관심 조성물은 세포 (예를 들어 Matrigel®에서 재현탁된 IPS 세포)를 포함하고, 가교 에어로졸은 염화칼슘 수용액의 미세방울을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 실시예 1: 인간 다능성 세포의 조성물을 함유하는 하이드로겔 캡슐을 제조하기 위한 프로토콜.

[0043] 사용된 용액:

[0044] 용액 1, 2 μM 티아조비딘이 보충된 DMEMF12 배지 베이스

[0045] 용액 2, 1 μM 티아조비딘이 보충된 마그네슘 및 무칼슘 PBS

[0046] 용액 3, 무효소 세포 탈착 완충액: 2 μM 티아조비딘이 보충된 RelesR™.

[0047] 용액 4, 다능성 줄기 세포 배양 배지: MTeSR1™ hES/hIPS 세포 배지 (STEMCELL™).

[0048] 용액 4+, 2 μM 티아조비딘이 보충된 용액 4.

[0049] 용액 5, Matrigel™.

[0050] 용액 6, 2 μM 티아조비딘이 포함된 300 mM 솔비톨.

[0051] 세포 용액:

[0052] 이어서, 90 % 컨플루언스에서 인간 IPS 세포의 25 cm² 페트리 접시는 권장량을 맞추기 위해 사용된다. 모든 후속 단계는 4 °C에서 압출기 출구에서 수행된다.

[0053] 단계 1: 세포를 용액 1로 세정한다. 10분 내지 1시간 동안 대기한다.

[0054] 단계 2: 4 mL의 용액 2로 2회 세정한다.

[0055] 단계 3: 용액을 조심스럽게 흡입시킨다.

[0056] 단계 4: 세포를 4 mL의 용액 3과 5-10분 동안 인큐베이션시킨다.

[0057] 단계 5: 전단 응력을 감소시키기 위해서 와이드 팁 파이펫을 사용하여 2 mL의 용액 4+로 세포를 탈착시킨다.

[0058] 단계 6: 세포 현탁액을 360 g 에서 5분 동안 원심분리시킨다.

[0059] 단계 7: 상청액을 흡입시킨다.

[0060] 단계 8: 0.5 mL의 용액 4+로 재현탁시킨다.

[0061] 단계 9: 360 rcf 에서 다시 원심분리시키고 상청액을 흡입시킨다.

[0062] 단계 10: 세포 펠렛을 70 μL의 용액 5 및 100 μL의 용액 6에 재현탁시킨다 (펠렛 부피는 30 μL여야 함). 세포 용액이 준비된다.

[0063] 캡슐화:

[0064] 캡슐화 장치 (압출기)는 Alessandri et al., 2016 (“인간 신경 줄기 세포 (hNSC)의 배양 및 분화를 위한 기능화된 하이드로겔 마이크로캡슐 생산을 위한 3D 인쇄 미세 유체 장치” , Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604) 에 기재된 대로 준비되며, 하기 2가지 변형이 있다: 알지네이트 용액에 계면활성제가 없고 형성 바스 주위에 50cm 높이의 인클로저가 존재하여 가교 바스의 것 (300 mosmol CaCl₂)과 동일한 용액의 분무로부터 에어로졸을 함유한다.

[0065] 요약하면, 장치의 상이한 부분은 (오토 클레이브에 의해) 멸균되고; 3 개의 필요한 용액이 3 개의 시린지 배럴에 로딩된다, i) 알지네이트 용액 (증류수에서 2 질량%의 PRONOVA®SLG100), ii) 중간 용액 (300 mM 솔비톨), iii) 세포 용액 (이전 단계에서 제조됨). 3 개의 용액은 미세 유체 인젝터를 사용하여 동심 방식으로 공-주

입되어 방울로 분할되는 제트를 형성할 수 있으며, 외층은 알지네이트 용액이고 코어는 세포 용액이다.

- [0066] 방울을 전기분산시키기 위해, 알지네이트를 +2 kV에서 직류로 충전하였다. 직경이 2 cm인 접지 링이 전기장을 발생시키도록 미세 유체 인젝터를 빠져 나가는 제트의 축에 수직인 평면에 팁으로부터 2 mm 에 위치된다.
- [0067] 제트를 분할하고 방울을 전기 분산시킨 후, 그들은 인클로저에 함유된 가교 용액의 에어로졸을 통과한다 (약 3×10^9 방울/기체의 입방 미터, 각각의 방울은 1 내지 $10 \mu\text{m}$ 의 직경을 가지고 100mM의 수성 칼슘 용액을 함유 함). 혼합된 방울의 표면에서 가교 용액의 방울의 합체는 표면을 강화하고 내부 구조를 유지하면서 칼슘 바 스 (회수/가교 바스)로 침투할 수 있도록 한다. 이들 방울은 셸을 형성하도록 알지네이트 용액의 가교를 완 료하는 칼슘 바스 (100 mM)에서 수집된다.
- [0068] 이들 캡슐화 조건 하에서, 알지네이트 층의 가교는 자발적으로 일어난다는 점을 주목한다.
- [0069] 캡슐화 이후 처리:
- [0070] 단계 1: 캡슐을 $40 \mu\text{m}$ 세포 체로 수집하고 용액 1로 세정한 후 그들을 20 mL의 용액 4가 포함된 75 cm^2 플라 스크에 저장한다.
- [0071] 단계 2: 플라스크를 12시간 동안 37°C 및 5% CO_2 의 인큐베이터에서 유지시킨다.
- [0072] 단계 3: 낭포의 형성이 가능하도록 배지를 용액 4로 바꿔준다.
- [0073] 단계 4: 24시간 내지 72시간 이후에, 수십개 세포의 낭포가 캡슐에 형성된다. 세포 미소구획은 5일 내지 10 일 이후에 성숙된다.