



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0125776
(43) 공개일자 2018년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) B33Y 40/00 (2015.01)
B33Y 70/00 (2015.01) B33Y 80/00 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/225 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0060510

(22) 출원일자 2017년05월16일

심사청구일자 2017년05월16일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

강현욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김민경

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

정원우

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 17 항

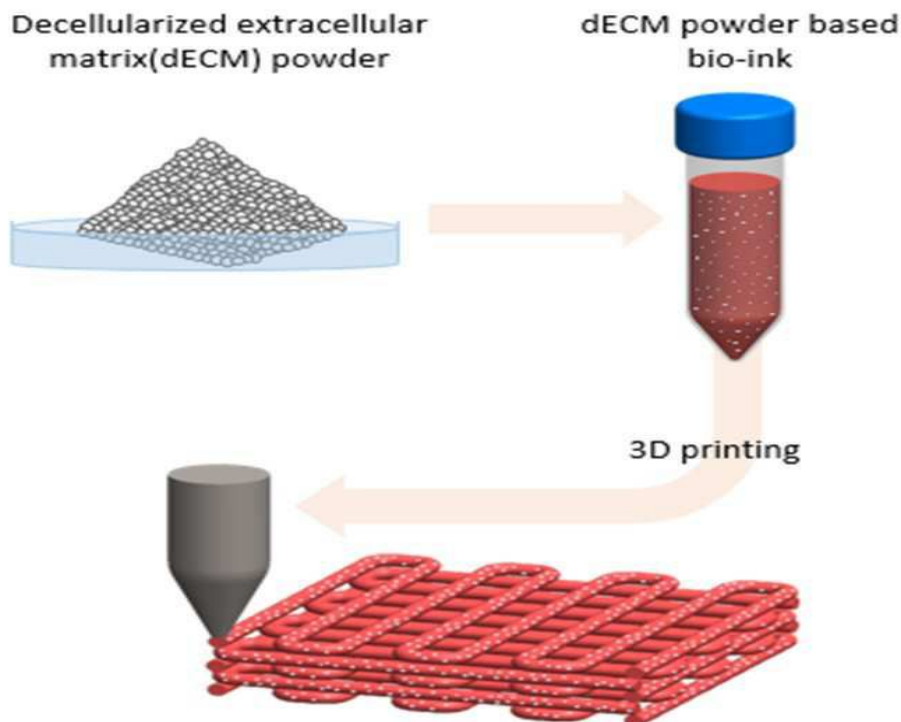
(54) 발명의 명칭 3차원 프린팅용 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 3차원 프린팅용 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물, 이의 제조방법, 상기 바이오 잉크 조성물을 이용한 인공 조직 제조방법 및 상기 방법에 따라 제조된 인공 조직에

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



관한 것이다.

본 발명의 바이오 잉크 조성물은 인쇄성(printability) 향상, 프린팅에 따른 물리적 스트레스에 대한 세포 생존률(viability) 및 증식능(proliferation) 향상, 온도감응성(temperature-responsive) 특성에 따른 빠른 가교결합 형성 등의 물리적 및 생물학적 특성이 개선되었기 때문에, 3D 바이오 프린팅을 이용한 인공 조직 또는 종양 모델의 제조에 매우 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 조직 공학 스캐폴드(tissue-engineering scaffolds), 세포-기반 센서(cell-based sensors), 약물/독성 스크리닝에도 유용하게 적용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/3683 (2013.01)
A61L 27/38 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
B33Y 40/00 (2013.01)
B33Y 70/00 (2013.01)
B33Y 80/00 (2013.01)
A61L 2300/22 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HC15C0001
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원

연구과제명 심뇌혈관질환 환경을 구현한 조직공학 기반 3차원 바이오칩 개발과 신약후보물질 검증 플랫폼 구축

기 여 율 33/100
 주관기관 경북대학교병원
 연구기간 2015.01.16 ~ 2024.01.15

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0190-15-2072
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 정보통신기술진흥센터

연구사업명 IT·SW융합산업원천기술개발

연구과제명 직접교차 분화방식 줄기세포 기반의 바이오잉크를 활용한 신경계 환자 맞춤형 조직 재건용 바이오 3D프린팅 기술 개발

기 여 율 34/100
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2015.07.01 ~ 2020.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M3A9B3028685
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 조직재생기술개발
 연구과제명 바이오프린팅 기반 생체모방 체도 제작 및 최적화 기술개발
 기 여 율 33/100
 주관기관 한국과학기술원
 연구기간 2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤(hydrogel)을 포함하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은 사람 또는 동물로부터 적출된 간 조직, 심장 조직, 연골 조직, 골 조직, 지방 조직, 근육 조직, 피부 조직, 점막 상피 조직, 양막 조직, 또는 각막 조직을 탈세포화하고 분말화함으로써 얻어지는 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은 0.05 내지 100 μ m의 입자 크기를 가지는 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

제1항에서 있어서, 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은 조성물 총 중량에 대하여 10 중량% 이하로 포함되는 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤은 젤라틴, 히알루론산, 텍스트란 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 포함되어 제조된 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤은 30 내지 40 $^{\circ}$ C에서 졸(sol) 상태이며, 4 내지 25 $^{\circ}$ C에서 겔(gel) 상태인 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포, 세포 배양액, 생리활성물질 및 첨가제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 함유하는 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포, 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte),

신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬 세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 생리활성물질은 전환 성장인자(transforming growth factor-beta, TGF- β), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 골 형태발생 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 태반 성장인자(placental growth factor, PIGF), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 및 아스코르베이트 2-포스페이트(ascorbate 2-phosphate)와 같은 세포 배양액 첨가물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 첨가제는 피브리노겐(fibrinogen) 및 글리세롤인 것인 바이오 잉크 조성물.

청구항 11

- (a) 하이드로젤(hydrogel)을 제조하는 단계;
- (b) 체외로 적출된 조직을 탈세포화하고 분말화하여 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말을 제조하는 단계;
- (c) 단계 (a)에서 얻어진 하이드로젤을 30 내지 40℃에서 졸(sol)화 하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)의 졸(sol) 상태의 하이드로젤에 단계 (b)에서 얻어진 탈세포화된 세포외 기질 분말을 교반하여 혼합하는 단계;를 포함하는 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단계 (a)의 하이드로젤은 젤라틴, 히알루론산, 텍스트란 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 포함되어 제조된 것인 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 단계 (b)의 상기 체외로 적출된 조직은 간 조직, 심장 조직, 연골 조직, 골 조직, 지방 조직, 근육 조직, 피부 조직, 점막 상피 조직, 양막 조직, 또는 각막 조직인 것인 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 14

제11항에서 있어서, 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은 조성물 총 중량에 대하여 10 중량% 이하로 포함되는 것인 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 15

- (a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 바이오 잉크 조성물 및 목적하는 조직 유래 세포를 혼합하여 3D

바이오 프린터용 카트리지(cartridge)에 주입하고, 4 내지 25℃에서 1차 가교(cross-linking) 시키는 단계;

(b) 상기 단계 (a)에서 1차 가교 시킨 세포 및 바이오 잉크 조성물이 주입되어 있는 3D 바이오 프린터용 카트리지를 이용하여 목적하는 인공 조직을 3D 바이오 프린팅하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)에서 3D 바이오 프린팅된 목적하는 인공 조직에 트롬빈(thrombin solution)을 처리하고, 4 내지 25℃에서 2차 가교(cross-linking) 시키는 단계;를 포함하는 인공 조직 제조 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, (d) 상기 인공 조직을 배양액에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는 인공 조직 제조 방법.

청구항 17

제15항의 방법에 따라 제조된 인공 조직.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 프린팅용 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물, 이의 제조방법, 상기 바이오 잉크 조성물을 이용한 인공 조직 제조방법 및 상기 방법에 따라 제조된 인공 조직에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 3D 바이오 프린팅 기술은 세포 프린팅 혹은 장기 프린팅으로도 불리어지고 있는 기술로써, 다종의 세포, 생체 재료 및 바이오 분자를 이용하여 컴퓨터 디자인된 3차원 구조물의 제작을 가능하게 한다(Murphy, SV *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2014; 32: 773-785). 이 기술은 인공 조직 혹은 장기 재생을 목적으로 하는 조직 공학 분야에서 크게 각광을 받고 있다. 인체를 구성하는 장기 혹은 조직은 다종의 세포와 세포 외 기질을 구성하는 생체 재료로 구성되어 있다 할 수 있다. 3D 바이오 프린팅 기술을 이용하여 인체를 구성하는 조직과 유사한 세포 구조체의 제작을 통하여 필요로 하는 기능성 조직을 재생하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 들어, 이 기술은 신약의 독성 및 효능 테스트를 위한 인공 생체 모델의 개발로도 큰 주목을 받고 있다(Poliniab, A *et al.*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2014; 9(4): 335-352). 이 프린팅 공정에서 바이오 잉크는 바이오 프린팅 공정에서 세포의 정밀한 패턴링과 생존률 보장에 가장 중요한 핵심 요소이며, 잉크의 특성은 공정과 직접적으로 연결되어 있다.

[0003] '바이오 잉크(bio-ink)'는 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 통칭하는 용어이다. 따라서 바이오 잉크는 3차원 가공을 위한 물리적 성질과 세포가 목적된 기능을 수행하게 하기 위한 생물학적 환경을 제공하여 주어야 한다. 바이오 잉크는 우선 우수한 세포 친화성을 가져야 한다. 인공 조직 및 장기 재생의 경우는 프린팅된 세포의 증식 및 분화에 유리한 생물학적 환경이 바이오 잉크로부터 주어져야 하는 것이다. 프린팅 공정이 길어질 때에는 카트리지 내에서 세포의 생존에 필요한 영양분과 산소의 공급이 적절히 이루어져야 한다. 또한 프린팅 과정에서 발생하는 물리적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있어야 한다. 그 외에도 바이오 잉크는 3차원 패턴링의 반복성, 생산성, 노즐의 막힘이 없어야 하는 등 프린팅 공정상에서 필요로 하는 물리적 성질을 가져야 한다. 이와 같이 살아 있는 세포를 이용하는 3D 바이오 프린팅 기술이 요구하는 잉크가 가져야 할 특성은 매우 다양하며 서로 복잡하게 얽혀 있다. 우수한 바이오 잉크 기술의 개발은 우수한 바이오 프린팅 기술 개발의 핵심이라 할 수 있다.

[0004] 한편, 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 세포의 외부에 둘러싸고 있는 기질로서, 세포와 세포 사이를 차지하고 있으며, 주로 단백질과 다당류로 이루어진 망상 구조를 가지고 있다. 세포외 기질의 성분으로는 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 구조체(structural component), 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 및 테나신 등의 접착성 단백질, 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)이나 황산헤파란(heparan sulfate) 그리고 주단백질로부터 생성되는 프로테오글리칸, 및 다당류로만 이루어진 히알루론산 등으로 구분하고 있다. 이러한 세포외 기질 성분은 세

포가 집합하여 구성하는 조직의 형태를 결정할 뿐만 아니라 세포가 정상적인 기능을 할 수 있는 환경을 제공하며, 세포분화에도 관여하는 주요물질이다(한국등록특허 제10-1135709호).

[0005] 탈세포(decellularization) 과정이라는 것은 생체 조직에서 포함된 세포 외 기질 성분을 화학적 처리를 통하여 분리하는 기술이다. 탈세포 공정을 통하여 얻어지는 다수의 콜라겐(collagen)과 해당 생체 조직의 구성 및 기능 구현에 관여하는 다양한 단백질 또한 다수 포함하고 있다. 이러한 성분들이 인공 장기 재생에 보다 특화된 생물학적 환경을 줄 수 있을 것으로 기대하고 있다.

[0006] 바이오 프린팅시 살아있는 세포를 운반하는 생체재료, 즉, 바이오 잉크는 그 활용도에 있어서 여전히 많은 한계점을 나타내고 있는 실정이다. 바이오 프린팅에 적용되기 위해 요구되는 바이오 잉크의 특성으로는 우수한 생체 적합성이 요구되고, 미세구경의 디스펜싱 노즐(dispensing nozzle)을 원활히 통과하여 원하는 패턴으로 프린팅이 될 수 있는 물리적 성질을 가져야 하며, 프린팅 후 세포-특이적 신호를 제공하면서 기계적인 지지체 역할을 유지할 수 있어야 한다는 것 등이다. 비록, 3D 바이오 프린팅 분야에서 천연 유래 또는 합성 하이드로젤을 이용한 하이드로젤 바이오 잉크가 개발되어 현재 사용되고 있지만, 이러한 기존 하이드로젤을 바탕으로 한 바이오 잉크는 생체적합성, 프린팅 적합성, 기하학적 정밀성, 정밀도와 같은 물리적 및 생물학적 측면에서 상당한 한계점을 보이고 있다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 물리적 및 생물학적 특성이 개선된 바이오 잉크를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 마이크로미터(μm) 수준의 입자 크기를 가진 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤(hydrogel)을 포함하는 바이오 잉크 조성물의 인쇄성(printability)이 향상되고, 세포에 대한 적합성(cytocompatibility)이 우수, 즉 세포 생존률(viability) 및 증식(proliferation)이 현저하게 향상됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1135709호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Murphy, SV et al., Nature Biotechnology, 2014; 32: 773-785

(비특허문헌 0002) Poliniab, A et al., Expert Opinion on Drug Discovery, 2014; 9(4): 335-352

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오 잉크 조성물을 제조하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오 잉크 조성물을 사용한 인공 조직 제조 방법 및 이의 방법에 따라 제조된 인공 조직을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물, 상기 바이오 잉크 조성물을 제조하는 방법, 상기 바이오 잉크 조성물을 사용한 인공 조직 제조 방법 및 이의 방법에 따라 제조된 인공 조직을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0015] 하나의 양태로서, 본 발명은 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말 및 하

이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공한다.

- [0016] 본 발명에서 용어 "세포외 기질(extracellular matrix, ECM)"은 세포의 외부를 둘러싸고 있는 기질로서, 세포와 세포 사이를 차지하고 있으며, 주로 단백질과 다당류로 이루어진 망상 구조를 가지고 있다. 세포외 기질의 성분으로는 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 구조체(structural component), 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 및 테나신 등의 접착성 단백질, 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)이나 황산헤파란(heparan sulfate) 그리고 주단백질로부터 생성되는 프로테오글리칸, 및 다당류로만 이루어진 히알루론산 등으로 구분하고 있다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "탈세포화(decellularization)"는 생체 조직에서 포함된 세포외 기질 성분을 화학적 처리를 통하여 분리하는 과정으로, 체외로 적출된 조직을 인산완충용액(Phosphate Buffered Saline, PBS)으로 세척하고 탈세포화 용액에 담궈 세포핵을 제거하고 세포외 기질만 남겨 탈세포화한다.
- [0018] 상기 탈세포화 용액은 용해 용액(lysis solution), 저장성 용액(hypotonic solution), 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 리보핵산가수분해효소 A(Ribonuclease A, RNase A) 및 디옥시리보핵산가수분해효소(Deoxyribonuclease I, DNase I)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 특히, 본 발명에서 사용된 상기 탈세포화 용액은 1% SDS(sodium dodecyl sulfate) 및 1% Triton X-100을 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] "탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM)"은 인간, 돼지, 소, 토끼, 개, 염소, 양, 닭, 말 등의 포유동물로부터 적출된 조직을 탈세포화 함으로써 얻어질 수 있다.
- [0020] 상기 조직은, 이에 제한되지 않으나, 간 조직, 심장 조직, 연골 조직, 골 조직, 지방 조직, 근육 조직, 피부 조직, 점막 상피 조직(mucosal epithelial tissue), 양막 조직, 또는 각막 조직 등을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 탈세포화는 공지의 방법, 예를 들어 Ott, H. C. *et al.*, *Nat. Med.*, 14: 213-221 (2008), Yang, Z. *et al.*, *Tissue Eng. Part C Methods*, 16: 865-876 (2010), Falguni Pati, *et al.*, *Nat Commun.*, 5: 3935 (2014) 등에 개시된 탈세포화 방법을 사용하여 혹은 약간 변형하여 수행될 수 있다.
- [0022] 상기 얻어진 탈세포화된 세포외 기질은, 이에 제한되지는 않으나, 동결건조하여 분말 형태로 사용할 수 있으며, 탈세포화된 세포외 기질 분말은 0.05 내지 100 μ m, 0.1 내지 50 μ m, 0.5 내지 45 μ m, 1 내지 40 μ m, 3 내지 35 μ m, 5 내지 30 μ m, 7 내지 25 μ m, 10 내지 20 μ m 또는 15 내지 18 μ m의 입자 크기를 가지는 것일 수 있다. 또한, 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은, 이에 제한되지는 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 10 중량% 이하, 0.01 내지 8 중량%, 0.5 내지 6 중량%, 0.7 내지 5 중량%, 1 내지 3 중량%로 포함되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 용어 "하이드로젤(hydrogel)"은 고분자 사슬이 삼차원 구조를 이루는 친수성 망상구조 물질로, 신체의 일부가 손상되거나 기능을 잃었을 때 조직이나 장기를 대체하기 위한 조직재생용 지지체로 사용이 가능하다. 하이드로젤은 수용액 상에서 물을 비롯한 친수성 성분들의 흡수를 통해 팽윤되면서 투명하게 되고, 또한 적당한 기계적 물성을 가진다. 이러한 팽윤도와 고분자의 기계적 물성은 주로 고분자 네트워크 구조의 물성에 의존한다. 이러한 하이드로젤을 만들 수 있는 소재로는 주로 고분자가 많이 사용되며, 이 고분자는 그 소재의 기원에 따라 천연고분자와 합성고분자로 나뉘어진다.
- [0024] 본 발명의 "하이드로젤"은, 이에 제한되지는 않으나, 온도감응성 하이드로젤(temperature-responsive hydrogel)일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "온도감응성 하이드로젤(temperature-responsive hydrogel)"은 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 하이드로젤로, 특정 온도에서 가역적인 졸-겔 상전이(sol-gel phase transition)가 일어난다.
- [0026] 상기 온도감응성 하이드로젤은 세포를 배양할 수 있는 생체 재료일 수 있으며, 구체적으로, 이에 제한되지는 않으나, 젤라틴, 히알루론산, 텍스트란 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 포함되어 제조되는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 젤라틴, 히알루론산, 텍스트란 및 콜라겐은 온도감응성 천연고분자로, 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 고분자이며, 온도로 인해 물리적으로 하이드로젤을 형성하고, 온도 변화에 따라서 팽창-응축 현상을 보일 수 있다.
- [0028] 상기 온도감응성 하이드로젤은 30 내지 40 $^{\circ}$ C에서 졸(sol) 상태이며, 4 내지 25 $^{\circ}$ C에서 겔(gel)화 될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "졸(sol)"은 액체 내에 고체 입자가 분산되어 있는 것이며, "겔(gel)"은 졸을 가열 또는 냉각했을 때 고체 또는 반고체 상태의 일정한 형태를 갖춘 것을 의미한다.

- [0030] 본 발명에서 용어 "바이오 잉크(bio-ink)"는 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 총칭한다. 바이오 잉크는 3차원 가공을 위한 물리적 성질과 세포가 목적된 기능을 수행하게 하기 위한 생물학적 환경을 제공하며, 우수한 세포 친화성을 가지는 소재이다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 온도감응성 천연고분자인 젤라틴 기반 하이드로젤을 제조하고, 돼지 간 조직을 탈세포화하고 동결건조함으로써 수득한 탈세포화된 세포외 기질(dECM) 분말과 졸(sol) 상태의 상기 젤라틴 기반 하이드로젤을 혼합하여, 탈세포화된 세포외 기질 기반 바이오 잉크 조성물을 제조하였다(실시예 1).
- [0032] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에는 세포, 세포 배양액, 생리활성물질 및 첨가제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 함유될 수 있다.
- [0033] 상기 세포는, 이에 제한되지는 않으나, 줄기세포, 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 상기 세포는 당업계에서 공지된 임의의 방식으로 배양될 수 있다. 세포 배양 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures; Freshney (1987), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다. 일반적인 포유동물 세포 배양 기술, 세포주, 및 본 발명과 함께 사용될 수 있는 세포 배양액, 세포 배양 시스템 또한 문헌 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Wiley (1998)에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다.
- [0035] 상기 세포 배양액은, 이에 제한되지는 않으나, 목적하는 세포에 적합한 임의의 배지를 포함하는 것으로, 당업계에 세포주에 적합한 임의의 배지들이 공지되어 있고, 예를 들어, MEM 배지, RPMI1640 배지, DMEM 배지, IMDM 배지 등일 수 있다. 또한, 상기 세포 배양액에는 이에 제한되지는 않으나, 비타민, 성장 인자, 사이토카인, 항생 물질 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0036] 상기 생리활성물질은, 이에 제한되지는 않으나, 세포를 증식시키거나 세포외 기질 분비를 촉진시키기 위하여, 전환 성장인자(transforming growth factor-beta, TGF- β), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 골 형태발생 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 태반 성장인자(placental growth factor, PIGF), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 및 아스코르베이트 2-포스페이트(ascorbate 2-phosphate)와 같은 세포 배양액 첨가물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 첨가제는, 이에 제한되지는 않으나, 피브리노겐(fibrinogen) 및 글리세롤일 수 있다. 상기 '피브리노겐(fibrinogen)'은 글로불린에 속하는 단백질로, 세포의 부착 및 분화에 적합한 미세환경을 조성할 수 있으며, 상기 '글리세롤'은 $C_3H_5(OH)_3$ 의 분자식을 가진 지방족 3가 알코올의 하나로서, 바이오 프린팅 적용시 막힘 방지효과 측면에서 본 발명의 조성물에 적합하게 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 있어서, MEM 배양 배지에 젤라틴을 비롯하여 히알루론산, 피브리노겐, 글리세롤을 첨가하여 제조한 온도감응성 하이드로젤을 제조하고, 졸(sol) 상태의 상기 젤라틴 기반 하이드로젤과 탈세포화된 세포외 기질(dECM) 분말을 혼합하여, 탈세포화된 세포외 기질 기반 바이오 잉크 조성물을 제조하였으며, 상기 제조한 본 발명의 바이오 잉크 조성물에 섬유아세포를 혼합하여 3D 바이오 프린팅하였다. 3D 바이오 프린터의 노즐(nozzle)의 막힘 없이 프린팅이 균일하게 이루어졌으며, 시간 흐름에 따라 세포가 현저하게 증식, 즉 프린팅에 따른 물리적 스트레스 없이 세포 생존률이 우수함을 확인할 수 있었다(실시예 1 내지 실시예 3, 도 6 내지 도 9).
- [0039] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 바이오 잉크 조성물의 제조방법을 제공한다:

- [0040] (a) 하이드로젤(hydrogel)을 제조하는 단계;
- [0041] (b) 체외로 적출된 조직을 탈세포화하고 분말화하여 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말을 제조하는 단계;
- [0042] (c) 단계 (a)에서 얻어진 하이드로젤을 30 내지 40℃에서 졸(sol)화 하는 단계; 및
- [0043] (d) 단계 (c)의 졸(sol) 상태의 하이드로젤에 단계 (b)에서 얻어진 탈세포화된 세포외 기질 분말을 교반하여 혼합하는 단계.
- [0044] 상기 단계 (a)의 하이드로젤은, 이에 제한되지는 않으나, 온도감응성 천연고분자인 젤라틴, 히알루론산, 텍스트란 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 포함되어 제조된 것일 수 있으며, 30 내지 40℃에서 졸(sol) 상태이며, 4 내지 25℃에서 젤(gel)화 될 수 있다.
- [0045] 상기 단계 (b)의 상기 체외로 적출된 조직은, 이에 제한되지는 않으나, 인간, 돼지, 소, 토끼, 개, 염소, 양, 닭, 말 등의 포유동물로부터 적출된 간 조직, 심장 조직, 연골 조직, 골 조직, 지방 조직, 근육 조직, 피부 조직, 점막 상피 조직, 양막 조직, 또는 각막 조직일 수 있다.
- [0046] 상기 체외로 적출된 조직을 탈세포화하고 동결건조 함으로써, 탈세포화된 세포외 기질 분말을 제조할 수 있다. 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은 0.05 내지 100 μ m, 0.1 내지 50 μ m, 0.5 내지 45 μ m, 1 내지 40 μ m, 3 내지 35 μ m, 5 내지 30 μ m, 7 내지 25 μ m, 10 내지 20 μ m 또는 15 내지 18 μ m의 입자 크기를 가지는 것일 수 있다.
- [0047] 상기 단계 (c)의 하이드로젤을 졸(sol)화 하는 단계는, 이에 제한되지는 않으나, 30 내지 40℃에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0048] 상기 단계 (d)의 졸(sol) 상태의 하이드로젤과 탈세포화된 세포외 기질 분말을 교반하여 혼합하는 단계 또한, 이에 제한되지는 않으나, 30 내지 40℃에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 탈세포화된 세포외 기질 분말은, 이에 제한되지는 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 10 중량% 이하, 0.01 내지 8 중량%, 0.5 내지 6 중량%, 0.7 내지 5 중량%, 1 내지 3 중량%로 포함되는 것일 수 있다.
- [0049] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 인공 조직 제조 방법을 제공한다:
- [0050] (a) 본 발명의 바이오 잉크 조성물 및 목적하는 조직 유래 세포를 혼합하여 3D 바이오 프린터용 카트리지(cartridge)에 주입하고, 4 내지 25℃에서 1차 가교(cross-linking) 시키는 단계;
- [0051] (b) 상기 단계 (a)에서 1차 가교 시킨 세포 및 바이오 잉크 조성물이 주입되어 있는 3D 바이오 프린터용 카트리지를 이용하여 목적하는 인공 조직을 3D 바이오 프린팅하는 단계; 및
- [0052] (c) 상기 단계 (b)에서 3D 바이오 프린팅된 목적하는 인공 조직에 트롬빈(thrombin solution)을 처리하고, 4 내지 25℃에서 2차 가교(cross-linking) 시키는 단계.
- [0053] 본 발명에서 용어 "3D 바이오 프린팅(three-dimensional bio printing)"은 3D 프린팅을 이용해 인공 생체조직 및 장기를 만들어내는 것으로, 인체 조직에서 추출한 세포를 포함한 바이오 잉크를 3D 프린터에 넣고, 3차원 공간에서 세포 구조물을 만드는 것이다.
- [0054] 본 발명에서 용어 "인공 조직"은 인공장기 유사체로, 줄기세포나 장기 기원세포로부터 분리한 세포를 3D 배양법으로 다시 응집, 재조합하여 만든 장기 특이적 세포집합체이다. 상기 인공 조직은 장기가 지닌 특정 기능 재현이 가능하며, 실제 장기와 유사한 형태로 공간적 조직화가 가능하다. 또한, 이는 조직 및 장기 재생과 신약 개발용 생체 모델 제작에 활용 가능하다.
- [0055] 상기 단계 (a)의 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 탈세포화된 세포외 기질(dECM) 분말 및 하이드로젤을 포함할 수 있으며, 추가로 목적하는 조직 유래 세포를 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 세포는, 이에 제한되지는 않으나, 줄기세포, 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0057] 한편, 본 발명의 바이오 잉크는 온도 감응성 성질을 지니며, 30 내지 40℃에서 졸(sol) 상태이며, 4 내지 25℃에서 젤(gel)화 될 수 있다. 따라서, 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말 및 온도감응성 하이드로젤을 포함하는 본 발명의 바이오 잉크는, 이에 제한되지는 않으나, 4 내지 25℃에서 1차 가교 결합(cross-linking) 시킬 수 있다.
- [0058] 상기 단계 (b)의 3D 바이오 프린팅은 본 발명의 바이오 잉크 조성물을 적층하는 패턴이나 적층 배열은 제조하고자 하는 인공 조직의 크기 및 직경 등에 의해 결정될 수 있다. 또한, 인공 조직을 제조하기 위해 사용되는 바이오 잉크에 포함되는 세포의 개수는 세포의 종류, 바이오 잉크 조성물에 포함된 세포 영양성분의 함량 등에 따라 조절될 수 있다. 또한 바이오 잉크 조성물에 포함되는 세포의 종류는 상기 방법에 따라 제조하고자 하는 인공 조직의 종류에 따라 변경될 수 있다.
- [0059] 상기 단계 (c)의 2차 가교(cross-linking)는, 이에 제한되지는 않으나, 가교 결합 촉매용액으로서 트롬빈(thrombin solution)을 처리할 수 있으며, 4 내지 25℃에서 추가적으로 2차 가교 결합(cross-linking) 시킬 수 있다. 상기 2차 가교 결합을 통해, 적층된 바이오 잉크 조성물이 보다 단단한 구조물로 완성될 수 있다.
- [0060] 한편, 상기 인공 조직 제조 방법은 (d) 상기 인공 조직을 배양액에서 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 배양 및 배양액에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0061] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 인공 조직을 제공한다.
- [0062] 상기 방법에 따라 제조된 인공 조직은 체내 이식 가능한 단일 조직 구조체일 수 있으며, 여러 가지 세포를 동시에 프린팅하여 조직과 조직간의 연계를 재연할 수 있는, 기능성이 향상된 조직 구조체일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 바이오 잉크 조성물에 NIH3T3(fibroblast)를 혼합하여 1차 가교 시키고, 3D 바이오 프린팅하였다. 상기 세포가 혼합된 본 발명의 바이오 잉크 조성물을 프린팅하여 제조하고자 하는 패턴, 유니스트(UNIST)로 적층하고, 2차 가교 시켜 3차 구조체를 제조하였다(실시예 4 및 도 10).

발명의 효과

- [0064] 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 인쇄성(printability) 향상, 프린팅에 따른 물리적 스트레스에 대한 세포 생존률(viability) 및 증식능(proliferation) 향상, 온도감응성(temperature-responsive) 특성에 따른 빠른 가교결합 형성 등의 물리적 및 생물학적 특성이 개선되었기 때문에, 3D 바이오 프린팅을 이용한 인공 조직 또는 중앙모델의 제조에 매우 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 조직 공학 스캐폴드(tissue-engineering scaffolds), 세포-기반 센서(cell-based sensors), 약물/독성 스크리닝에도 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(decellularized extracellular matrix based bio-ink)를 이용하여 삼차원적 구조체를 제조하는 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 돼지 간 조직으로부터 얻어진 (A) 천연형 조직(native tissue) 및 (B) 탈세포화된 세포의 기질(dECM)의 H&E(haematoxylin & eosin) 염색 결과를 현미경으로 촬영하여 나타낸 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 돼지 간 조직으로부터 얻어진 (A) 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말(powder)의 이미지 사진, (B) dECM 분말의 SEM(Scanning Electron Microscope, 300×) 이미지 사진, 및 (C) dECM 분말 입자(particle)의 크기 분포(distribution) 그래프를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 돼지 간 조직으로부터 얻어진 탈세포화된 세포의 기질(dECM)의 생화학적 특성을 나타낸 그래프로, (A) DNA 함량, (B) 콜라겐 함량, 및 (C) GAGs 함량을 측정하여 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 점도(viscosity)를 측정하여 나타낸 도이다.
- 도 6은 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 인쇄성(printability) 정도를 분석한 결과를 나타낸 도로, 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크를 한 개(1 layer) 또는 다섯 개의 층(5 layer)으로 스택킹(stacking) 한 후 촬영한 현미경 사진(A)과, 프린팅된 라인의 너비(B) 및 이의 표준편차(C)를 분석하여 나타내었다. 이때, 대조군으로 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크와 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)를 사용하였다.

도 7은 *in vitro* 상에서, 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(decellularized extracellular matrix based bio-ink)의 세포에 대한 적합성(cytocompatibility)을 평가한 결과를 나타낸 도로, (A) dECM 잉크 내 NIH3T3 세포의 1일째의 생존율을 나타낸 현미경 사진, (B) dECM 잉크 내 NIH3T3 세포의 7일째의 생존율을 나타낸 현미경 사진, (C) 상기 (A) 및 (B)의 현미경 사진의 NIH3T3 세포 생존율을 수치화한 그래프, 및 (D) dECM 잉크 내 NIH3T3 세포의 1일, 4일 및 7일째의 세포 증식율을 수치화하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 *in vitro* 상에서, 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(decellularized extracellular matrix based bio-ink)의 세포에 대한 적합성(cytocompatibility)을 평가한 결과를 나타낸 도로, dECM 잉크 내 HUVEC 세포의 1일 및 7일째의 세포 생존율을 수치화하여 나타낸 그래프이다. 이때, 대조군으로 탈세포화된 세포와 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크와 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)를 사용하였다.

도 9는 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 인쇄성(printability) 정도 및 프린팅에 따른 세포 생존율을 평가한 결과를 나타낸 도로, 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크를 네 개의 층(4 layer)으로 스택킹(stack)한 후, 전체(A), 확대(B 및 C) 촬영한 현미경 사진 및, 프린팅 후 세포 생존율을 촬영한 형광 현미경 사진(D)을 나타내었다. 또한, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 바이오 잉크를 네 개의 층으로 스택킹한 후, 전체(E) 및 확대(F 및 G) 촬영한 현미경 사진 및 프린팅 후 세포 생존율을 촬영한 형광 현미경 사진(H)을 나타내었다. 한편, 프린팅 후 1일째의 세포 생존율을 수치화하여 그래프(I)로 나타내었다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따라 제조한 3차원 구조체를 나타낸 도로, (A) 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 바이오 잉크를 이용하여 제조한 3차원 구조체의 현미경 사진 및, (B) 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)를 이용하여 제조한 3차원 구조체의 현미경 사진이다. 또한, (C) 젤라틴 기반 바이오 잉크를 이용하여 제조한 3차원 구조체 일부를 확대하여 촬영한 현미경 사진 및, (D) 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크를 이용하여 제조한 3차원 구조체 일부를 확대하여 촬영한 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **실시예 1: 3차원 프린팅용 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(decellularized extracellular matrix based bio-ink)의 제조**
- [0068] 탈세포화된 세포의 기질(decellularized extracellular matrix, dECM)을 기반으로 한, 인쇄성(printability)이 향상된 3차원 프린팅용 바이오 잉크를 제조하고자 하였다.
- [0069] **실시예 1-1: 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)의 제조**
- [0070] 인쇄성(printability)이 향상된, 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 기반 바이오 잉크를 제조하기 위해, 먼저 젤라틴 기반 바이오 잉크를 제작하였다.
- [0071] 구체적으로, MEM(Menimum Essential Medium)에 3mg/ml의 히알루론산(hyaluronic acid)을 첨가한 후, 37℃ 오븐(oven)에서 로테이터(rotator)를 이용하여 오버나이트(overnight) 동안 녹였다. 완전히 녹인 후, 37.5mg/ml의 젤라틴(geletin)과 15mg/ml의 피브리노젠(fibrinogen)을 첨가하고 오븐(oven)에서 상기와 같은 방식으로 37℃의 온도 조건하에서 로테이터를 이용하여 1시간 동안 녹였다. 이후, 10%(v/v)의 글리세롤(glycerol)을 넣어 30분 동안 더 녹이고, 0.45μm 기공 크기의 필터(filter)를 이용하여 멸균하였다. 멸균 후, 최종적으로 만들어진 젤라틴 기반 바이오 잉크는 사용시까지 -20℃에서 보관하였다.
- [0072] **실시예 1-2: 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말의 제조**
- [0073] 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 기반 바이오 잉크를 제조하기 위한, 주재료인 탈세포화된 세포의 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 분말(powder)을 제조하였다.
- [0074] 구체적으로, 돼지(porcine) 간(liver) 조직을 약 2~3 mm 두께로 잘게 조각낸 후, 계면활성제(detergent)인 1% SDS(sodium dodecyl sulfate) 및 1% Triton X-100을 이용하여 탈세포(decellularization) 시켰다. 탈세포화 후, 조직(tissue)은 인산완충용액(Phosphate Buffered Saline, PBS)와 증류수(distilled water, DW)를 이용하여 남은 계면활성제를 제거하였다. 계면활성제를 제거 후, 최종적으로 수득한 탈세포화된 세포의 기질을 동결건

조하고, 동결분쇄기(freezer mill)을 이용하여 마이크로(micro) 단위의 분말로 분쇄시켰다. 분쇄시킨 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말은 EO(ethylene oxide) 소독기를 이용하여 멸균하였다.

[0075] 최종적으로 멸균하여 수득한, 탈세포화된 세포의 기질 분말의 이미지 및 입자 크기를 측정해 본 결과, 하기 도 3에 나타낸 바와 같이, 평균 $17.82 \mu\text{m}$ 수준의 입자 크기를 나타냄을 확인하였다.

[0076] **실시예 1-3: 탈세포화된 세포의 기질(dECM)의 생화학적 특성 평가**

[0077] 상기 실시예 1-2에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질의 생화학적 특성을 평가하고자, 즉, 세포의 기질의 탈세포화 정도를 확인하기 위해, Pati. F. *et.al.*, *Nat. Commun.*, 5:3925, p.1~11 (2014)에 기재되어 있는 방법에 따라, DNA, 콜라겐(collagen) 및 GAGs(glycosaminoglycans)의 함량(content)을 측정하였다.

[0078] 구체적으로, DNA 함량은 Hoechst33258 assay를 수행하여 측정하였으며, 콜라겐 함량은 QuickZyme collagen assay kit(QuickZyme Biosciences B.V., Netherlands)를 사용하여 측정하였다. 또한, GAG 함량은 BlyscanTM GAGs assay kit(Biocolour Ltd. United Kingdom)를 사용하여 측정하였다. 이때, 모든 assay는 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였다.

[0079] 탈세포화(decellularization) 후, 하기 도 4에 나타낸 바와 같이, 천연형 간 조직(native liver tissue)과 비교하여, DNA는 약 98.0%가 제거되었으며, 건조된 조직(dried native tissue)의 mg 당 $50.7 \pm 15 \text{ ng}$ 수준인 것으로 확인되었다. 또한, 콜라겐(collagen) 및 GAGs(glycosaminoglycans)는 각각 건조된 dECM(dried dECM)의 mg 당 $343.7 \pm 4.5 \mu\text{g}$ 및 $6.3 \pm 2.1 \mu\text{g}$ 존재하는 것으로 확인되었다. 즉, 천연형 간 조직(native liver tissue)과 비교하여, 조직 내 특이적인 콜라겐(collagen) 및 GAGs(glycosaminoglycans)는 존재하면서 탈세포화는 잘 이루어짐을 알 수 있었다.

[0080] **실시예 1-4: 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 제조 및 점도(viscosity) 분석**

[0081] 인쇄성(printability)이 향상된 3차원 프린팅용 바이오 잉크를 제조하고자, 상기 실시예 1-1에서 제조한 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)와 상기 실시예 1-2에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말을 혼합하였다.

[0082] 구체적으로, 먼저 -20°C 에 보관해 둔 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)를 37°C 항온수조(water bath)에서 완전히 녹이고, 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말을 젤라틴 기반 바이오 잉크 3ml 당 90mg (3% w/v)을 첨가하여 약 30분 동안 혼합하였다. 이때, 로테이터(rotator) 및 유리 막대를 이용하여 혼합하였으며, 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말과의 혼합이 용이하도록 37°C 를 유지하여 혼합하였다.

[0083] 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)와 탈세포화된 세포의 기질(dECM) 분말을 혼합하여 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)는 사용시까지 -20°C 에서 보관하였다.

[0084] 한편, 상온 상태, 즉 바이오 잉크를 프린팅할 때와 비슷한 온도 조건인 18°C 에서 레오미터(HAAKE MARS-III Rheometer, Thermo Electron (Karlsruhe) GmbH)를 이용하여 상기 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 점도를 측정해 본 결과, 잉크가 상온 상에 있을 때 전단율(shear rate)의 증가에 따라 점도(viscosity)가 감소함을 확인하였다. 이때, 대조군으로 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)와 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크를 사용하였다.

[0085] 즉, 상기 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)는 강한 전단 감소(shear-thinning) 경향을 나타내었으며, 이를 통해 프린팅시 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크와 세포가 노즐(nozzle)을 통과할 때 세포가 받는 스트레스를 줄일 수 있음을 알 수 있었다(도 5).

[0086] **실시예 1-5: 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 인쇄성(printability) 평가**

[0087] 상기 실시예 1-4에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink) 자체의 인쇄성(printability)을 우선 평가하고자, 상기 바이오 잉크에 세포를 적용하지 않고, 3-D 바이오 프린터(3-D bioprinter, 자체제작)를 사용하여 인쇄성을 측정하였다.

[0088] 구체적으로, 18°C 온도 조건하에서 $300 \mu\text{m}$ 노즐(nozzle)을 이용하여 $8 \times 8 \text{ mm}$ 패턴(pattern)으로 dECM 기반 바이오 잉크의 프린팅 테스트(printing test)를 진행하였다. 이때, 대조군으로는 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크와 탈세포화된 세포의 기질 분말을 혼합하지 않은 젤라틴 기반 바이오 잉크를 사용하였다.

- [0089] 한 개의 층(1 layer) 또는 다섯 개의 층(5 layer)으로 스택킹(stacking)한 후 이미지를 확인해 본 결과, 하기도 6의 A에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 잉크와 마찬가지로 dECM 기반 바이오 잉크의 인쇄성(printability)이 우수함을 확인하였다. 뿐만 아니라, 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크와 비교하여서는 dECM 기반 바이오 잉크의 인쇄성(printability)이 현저히 우수함을 확인하였다.
- [0090] 한편, 프린팅(printing) 이후 Image J(National Institutes of Health; NIH) 프로그램을 이용하여 하기도 6의 B 및 C에 나타낸 바와 같이, 라인(line)의 너비 및 이의 표준편차를 분석해 본 결과, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 잉크와 비교하여 dECM 기반 바이오 잉크의 경우에 라인 너비 표준편차 값이 낮음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크와 비교하여서는 dECM 기반 바이오 잉크의 라인 너비 표준편차 값이 현저히 낮음을 확인하였다.
- [0091] 즉, 상기 실시예 1-4에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)는 프린팅시 대조군으로 사용한 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크 및 젤라틴 기반 잉크와 비교하여 고르게 인쇄되며, 이를 통해 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크의 인쇄성이 우수함을 알 수 있었다.
- [0092] **실시예 2: 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 세포에 대한 적합성(cytocompatibility) 평가**
- [0093] 상기 실시예 1-4에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 세포에 대한 적합성(cytocompatibility)을 평가하고자, dECM 기반 바이오 잉크에 0.5×10^6 cells/ml의 NIH3T3 세포(섬유아세포)를 캡슐화(encapsulation) 하였다. 이후, LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity kit(Thermo Fisher) 및 Alamar blue[®] assay kit(Thermo Fisher)를 사용하여 dECM 기반 바이오 잉크 내 NIH3T3 세포의 생존률(viability) 및 증식률(proliferation)을 측정하였다. 이때, 상기 assay는 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였다.
- [0094] dECM 기반 바이오 잉크 내 NIH3T3 세포를 캡슐화하고 1일과 7일째 세포 생존률을 측정해 본 결과, 하기도 7의 A 내지 C에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 잉크와 비교하여 dECM 기반 바이오 잉크의 경우에도 세포 사멸 없이 세포 생존률(90% 이상)이 우수함을 확인하였다.
- [0095] 또한, 1일, 4일, 7일에 걸쳐 세포 증식 정도를 확인해 본 결과, 하기도 7의 D에 나타낸 바와 같이, 시간 흐름에 따라 세포가 현저하게 증식함을 확인하였으며, 특히, 7일째 젤라틴 기반 잉크에 비해 dECM 기반 바이오 잉크 내 세포가 두드러지게 증식함을 알 수 있었다.
- [0096] 한편, 1×10^6 cells/ml의 HUVEC(human umbilical vein denothelial cells) 세포를 dECM 기반 바이오 잉크에 캡슐화하여, 세포에 대한 적합성(cytocompatibility)을 추가적으로 평가해 보았다. 이때, 대조군으로 젤라틴 기반 바이오 잉크(gelatin based bio-ink)와 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크를 사용하였다.
- [0097] dECM 기반 바이오 잉크에 HUVEC 세포를 캡슐화한 후, 1일과 7일째 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity kit(Thermo Fisher)를 사용하여 dECM 기반 바이오 잉크 내 HUVEC 세포의 생존률(viability)을 측정해 본 결과, 하기도 8에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 탈세포화된 세포의 기질 하이드로젤(dECM hydrogel) 바이오 잉크 및 젤라틴 기반 잉크와 비교하여 1일째 dECM 기반 바이오 잉크의 경우에 세포 생존률(90% 이상)이 우수함을 확인하였으며, 7일째에도 세포 사멸 없이 정상적으로 세포가 증식함을 알 수 있었다.
- [0098] **실시예 3: 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 인쇄성(printability) 및 프린팅에 따른 세포 생존을 평가**
- [0099] 상기 실시예 1-4에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)의 인쇄성(printability) 및 프린팅에 따른 세포 생존률을 평가하고자, 3-D 바이오 프린터(3-D bioprinter, 자체제작)를 사용하여 인쇄성을 측정하고, 프린팅 후 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity kit(Thermo Fisher)를 사용하여 세포 생존률(viability) 측정하였다. 이때, 살아있는 세포는 녹색(green) 형광을 나타내며, 죽은 세포는 빨강(red) 형광을 나타낸다.
- [0100] 구체적으로, 18℃ 온도 조건하에서 250 μ m 노즐(nozzle)을 이용하여 8 $\times$ 4mm 패턴(pattern)으로 dECM 기반 바이오

잉크의 프린팅 테스트(printing test)를 진행하였다. 이때, 대조군으로는 탈세포화된 세포의 기질 분말을 혼합하지 않은 젤라틴 기반 바이오 잉크를 사용하였다.

[0101] 네 개의 층(4 layer)으로 스택킹(stack)한 후 이미지를 확인해 본 결과, 하기 도 9에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 잉크(도 9의 E 내지 G)와 마찬가지로 dECM 기반 바이오 잉크(도 9의 A 내지 C)의 인쇄성(printability)이 우수함을 확인하였다. 뿐만 아니라, 프린팅 후 1일째 dECM 기반 바이오 잉크 내 NIH3T3 세포의 생존률(viability)을 분석해 본 결과, 젤라틴 기반 바이오 잉크와 비교하여 프린팅 후 세포 생존률(viability)이 우수함을 확인하였다(도 9의 I).

[0102] 상기 일련의 결과를 통해, 본 발명의 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(decellularized extracellular matrix(dECM) based bio-ink)는 인쇄성(printability)이 우수할 뿐만 아니라, 프린팅에 따른 스트레스를 최소화하여 프린팅 과정 후에도 세포 생존률이 현저히 우수함을 알 수 있었다.

[0103] 실시예 4: 3차원 구조체의 제조

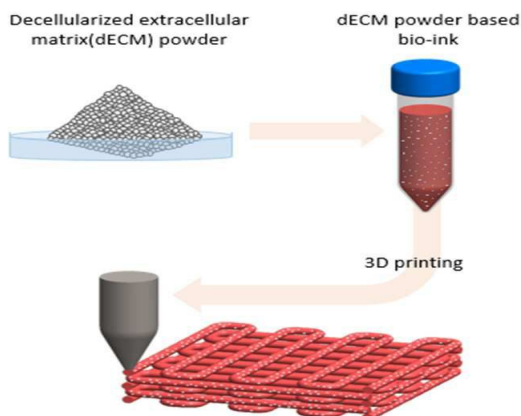
[0104] 상기 실시예 1-4에서 제조한 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)와 1×10^6 cells/ml의 NIH3T3 세포를 혼합한 뒤, 프린터용 카트리지(cartridge)에 주입하였다. 온도에 따른 가교결합을 시키기 위해, 상기 탈세포화된 세포의 기질 기반 바이오 잉크(dECM based bio-ink)와 세포가 주입되어 있는 카트리지를 얼음(ice) 상에 약 10분간 놓아두고 1차 가교결합(cross-linking) 시켰다. 3D 바이오 프린터(3D bioprinter, 자체제작)에 카트리지를 장착하고 프린팅하여 3차원 구조체를 제조하였다. 이때, 3D 바이오 프린터 내부는 상기 저온에 따른 1차 가교결합이 저해되지 않도록 온도를 낮게 유지시켰다. 프린팅(printing) 후, 3차원 구조체에 10 U/ml의 트롬빈 용액(thrombin solution)을 처리하고, 실온(room temperature, RT)에서 약 30분 정도 두어 2차 가교결합 시켰다. 이때, 대조군으로 젤라틴 기반 바이오 잉크를 사용하였다.

[0105] 프린팅(printing) 후, 3차원 구조체의 이미지를 확인해 본 결과, 하기 도 10에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용한 젤라틴 기반 잉크(도 10의 A 및 C)와 마찬가지로 dECM 기반 바이오 잉크(도 10의 B 및 D)를 이용하여 3차원 구조체를 제조할 수 있음을 확인하였다.

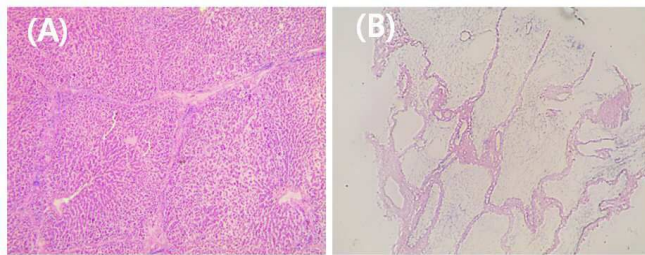
[0106] 상기 결과를 통해, 본 발명의 dECM 기반 바이오 잉크를 이용하여 인체 조직과 연관되는 다양한 구조의 기관을 프린팅할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

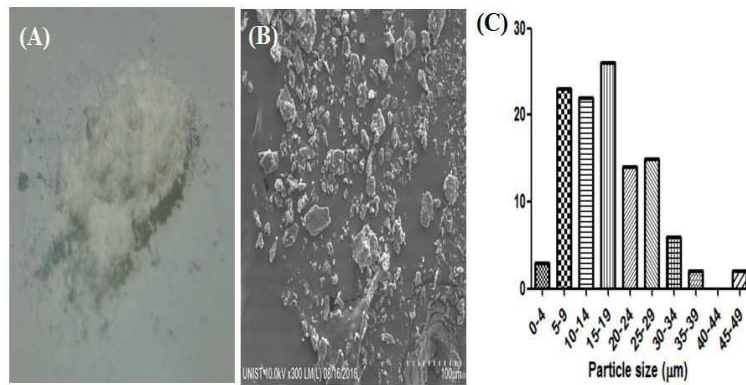
도면1



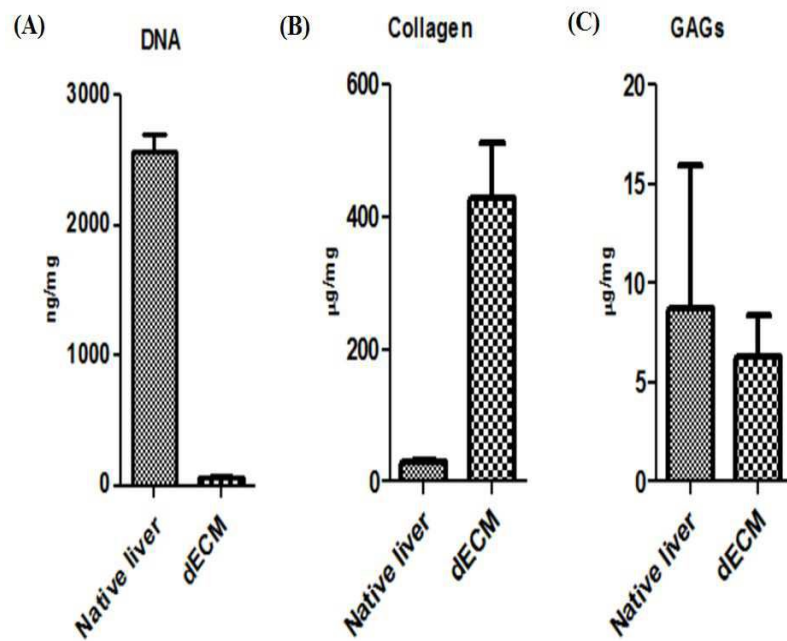
도면2



도면3



도면4

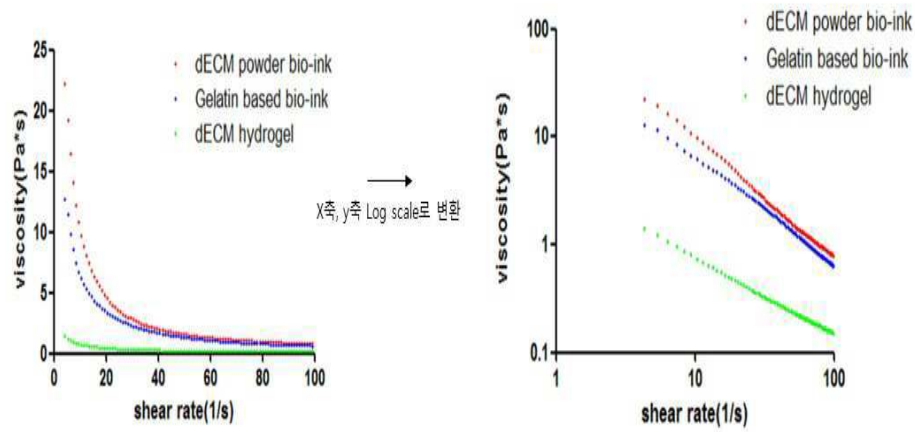


도면5

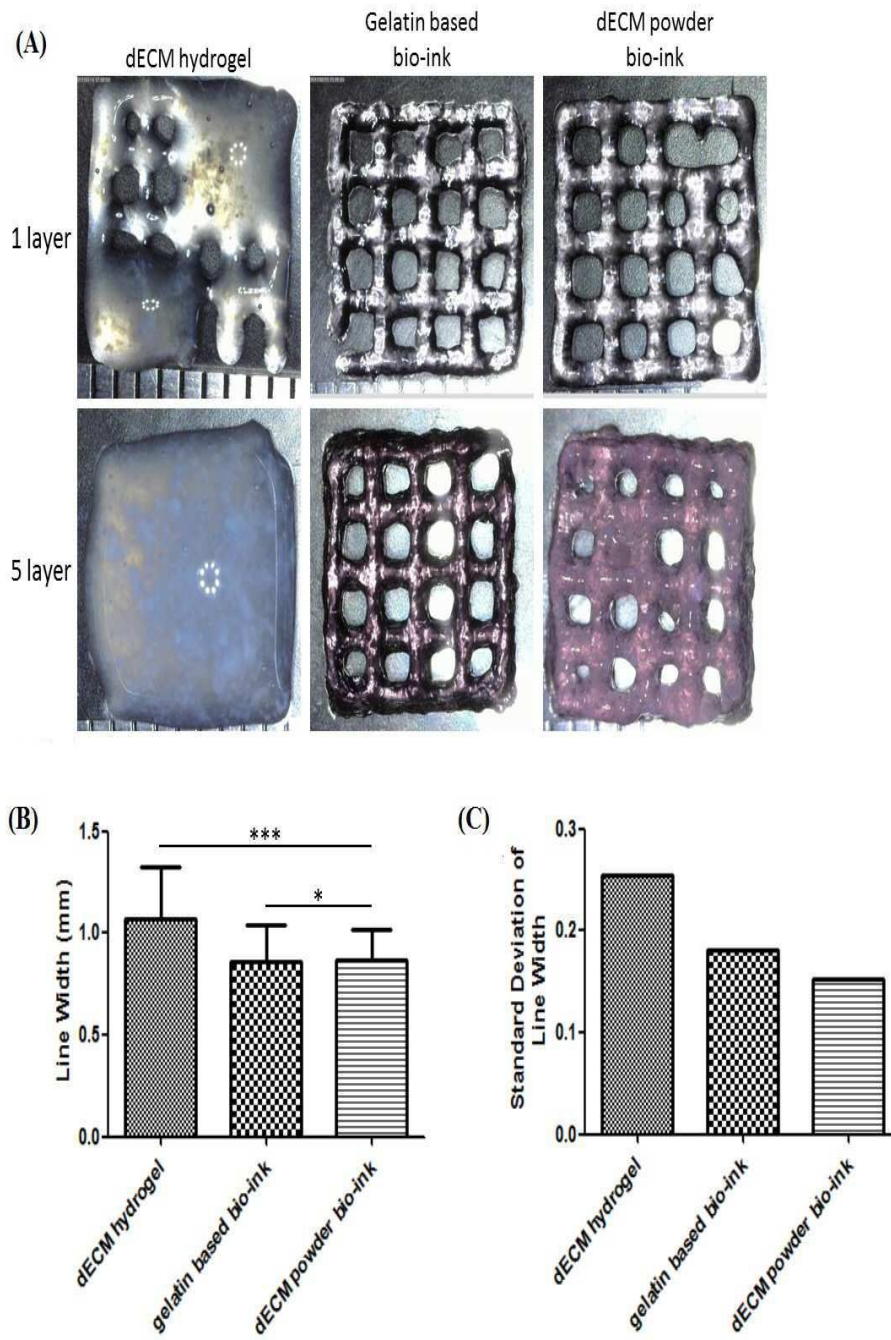
Haake MARS III - ORM Package

Plate: 20mm

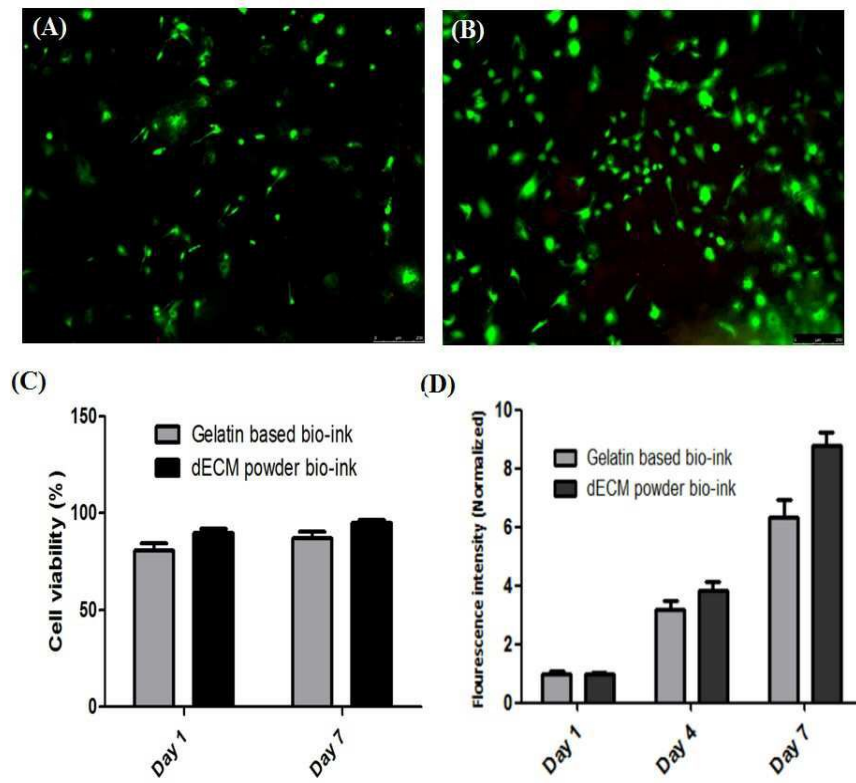
Shear sweep: 0.1~100s⁻¹



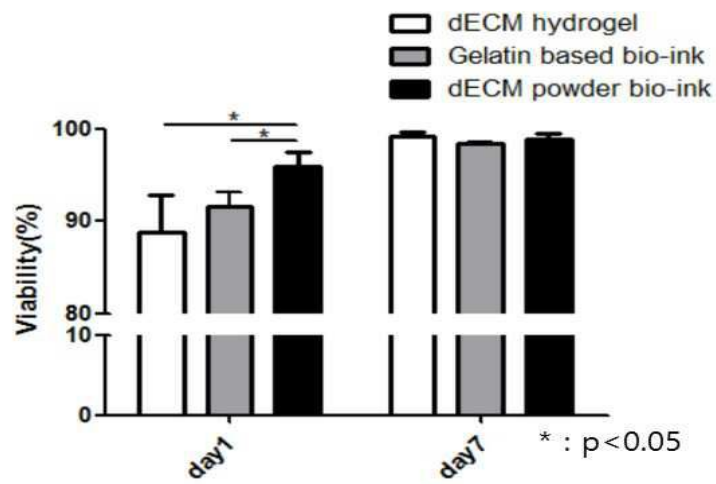
도면6



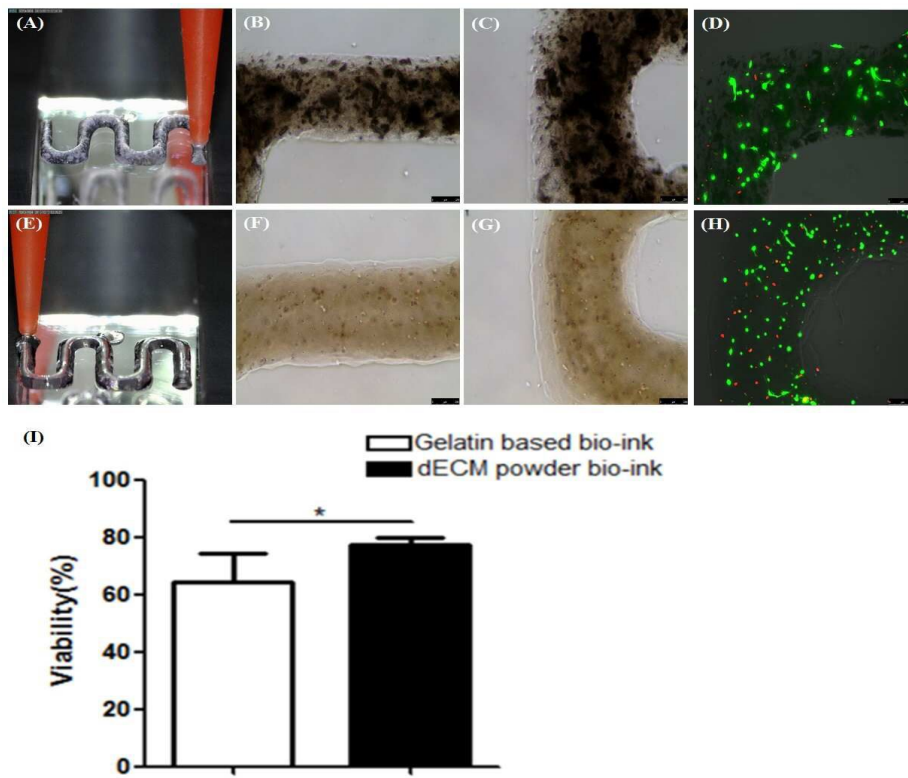
도면7



도면8



도면9



도면10

