



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0052467
(43) 공개일자 2020년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/54 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61L 27/54 (2013.01)
A61F 2/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0132443

(22) 출원일자 2018년10월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사 바이오잉크솔루션

대구광역시 북구 호국로 807, 1동4층4108-2호(학정동, 칠곡경북대학교병원)

(72) 발명자

최영도

대구광역시 북구 호국로 807, 1동 4층 4108-2호
주식회사 바이오잉크솔루션 (학정동, 칠곡 경북대학교병원)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **전환성장인자-β를 포함하며 연골 생성을 유도하는 기능성 바이오 잉크 조성물**

(57) 요약

본 발명은 전환성장인자-β(transforming growth factor, TGF-β)를 포함하며 연골 생성을 유도하는 기능성 바이오 잉크 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포적합성을 가지며 프린팅이 용이한 높은 점성 및 탄성, 우수한 구조 안정성 및 프린팅 후 적절한 기계적 특성을 가지며 전환성장인자를 포함하여 연골 생성을 유도하는 효과가 우수한 기능성 바이오 잉크 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 바이오 잉크 조성물은 높은 점탄성, 강한 구조 안정성, 우수한 프린팅성, 생체적합성 및 프린팅 후 적절한 기계적 특성과 함께 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진하는 효과를 나타내기 때문에 삼차원적 바이오 프린팅을 이용한 조직 유사기관의 제조 및 연골 관련 질환의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/3629 (2013.01)

A61L 27/3654 (2013.01)

A61L 27/3804 (2013.01)

B33Y 10/00 (2013.01)

A61L 2300/414 (2013.01)

A61L 2430/06 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 운반물질, 점성 증강제, 윤활제 및 구조물질을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 있어서, 전환성장인자- β (transforming growth factor, TGF- β)를 추가로 포함하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전환성장인자- β 는 전환성장인자- β 3인 것을 특징으로 하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포 운반물질이 0.1-10 w/v%, 점성 증강제가 0.01-1 w/v%, 윤활제가 1-30 w/v%, 구조물질이 0.1-10 w/v% 및 전환성장인자- β 가 0.01-1 w/v% 포함된 것을 특징으로 하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 세포 $0.05-60 \times 10^6$ /mL이 추가로 포함된 것을 특징으로 하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포 운반물질은 소장점막하조직, 소장점막하조직 유도체, 젤라틴 또는 콜라겐, 상기 점성 증강제는 히알루론산 또는 텍스트란, 상기 윤활제는 글리세롤 및 상기 구조물질은 피브리노겐 또는 젤라틴 메타아크릴레이트인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

- (a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 삼차원 프린터에 충전하는 단계;
- (b) 목적하는 조직 유사기관을 삼차원 프린팅 하는 단계; 및
- (c) 삼차원 프린팅된 바이오 잉크 조성물을 가교결합 시키는 단계를 포함하는 조직 유사기관 제조방법.

청구항 7

제6항의 방법에 따라 제조된 조직 유사기관(organoid).

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 전환성장인자- β (transforming growth factor, TGF- β)를 포함하며 연골 생성을 유도하는 기능성 바이오 잉크 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포적합성을 가지며 프린팅이 용이한 높은 점성 및 탄성, 우수한 구조 안정성 및 프린팅 후 적절한 기계적 특성을 가지며 전환성장인자를 포함하여 연골 생성을 유도하는 효과가 우수한 기능성 바이오 잉크 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0003] 삼차원적인 세포 배양기술은 실험실 내(in vitro)에서 생체조직과 유사한 환경에서 세포 및 조직을 제조할 수 있는 기술로 발달하여 세포의 성장과 분화, 조직 및 기관의 형성과 관련된 여러 연구 분야에 적용되어지고 있다. 이러한 조직 유사기관은 실제 조직이나 장기를 대신하여 약물의 독성 및 약물 동력학 연구에서 유용하게 사용되어 질 수 있으며, 이에 따라 인간 검체 및 기타 포유동물에의 직접적인 실험 적용을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 손상된 조직 및 장기를 대체 또는 치료하기 위한 목적인 조직공학(tissue engineering) 기법의 중요한 요소로 조직 및 장기의 공학적 설계에 기여하고 있다.

[0005] 삼차원 바이오 프린팅 기술은 이러한 조직 유사기관 및 이식 가능한 구조체를 정밀하게 제조하기 위한 유용한 장치가 되었다. 이러한 기술은 실제 인간의 조직을 거의 그대로 모방한 미세 및 거대 조직 구조체를 생성하는 것을 가능하게 하고 있다. 하지만 바이오 프린팅시 살아있는 세포를 운반하는 생체재료, 즉, 바이오 잉크(bio-ink)는 그 활용도에 있어서 많은 한계점을 나타내고 있다. 바이오 프린팅에 적용되기 위한 바이오 잉크는 우수한 생체적합성이 요구되고, 미세구경의 디스펜싱 노즐(dispensing nozzle)을 원활히 통과하여 원하는 패턴으로 프린팅이 될 수 있는 우수한 프린팅성을 가져야 하며, 프린팅 후 세포-특이적 신호를 제공하면서 기계적인 지지체 역할을 유지할 수 있는 구조 안정성을 갖아야 한다. 비록, 삼차원 바이오 프린팅 분야에서 천연 유래 또는 합성 하이드로겔 바이오 잉크가 개발되어 현재 사용되고 있지만, 이러한 기존 하이드로겔을 바탕으로 한 바이오 잉크는 생체적합성, 프린팅 적합성, 기하학적 정밀성, 정밀도와 같은 물리적 및 생물학적 측면에서 상당한 한계점을 보이고 있다.

[0007] 한편, 본 발명자는 선행연구를 통해 특정한 함량의 세포 운반물질, 점성 증강제, 윤활제 및 구조물질을 포함하는 바이오 잉크 조성물을 공개한 바 있다(한국공개특허 제10-2017-0012099). 이를 통해, 전술한 종래기술의 문제점을 해결하여 물리적 및 생물학적 특성이 개선된 바이오 잉크 조성물을 얻을 있었으나, 이는 손상된 조직 및 장기를 대체 또는 치료하기 위한 목적인 조직공학에는 적합하지 않은 구조 안정성, 정교한 생체조직을 모사하기 위한 프린팅 정밀성 등에서 여전히 한계점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자는 손상된 조직 및 장기의 치료에 활용이 될 수 있는 기능성 바이오 잉크 조성물을 개발하기 위하여 연구를 거듭하였다. 그 결과, 특정 구성성분을 특정 함량으로 포함하는 바이오 잉크 조성물에 특정 함량의 전환성장인자를 첨가할 경우 물리적 및 생리학적 특성이 향상됨은 물론, 연골 생성이 유도되고, 세포외기질 생산이 촉진되는 기능성 바이오 잉크를 제조할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 세포 운반물질, 점성 증강제, 윤활제 및 구조물질을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 있어서, 전환성장인자- β (transforming growth factor- β , TGF- β)를 추가로 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 (a) 상기 바이오 잉크 조성물을 삼차원 프린터에 충전하는 단계; (b) 목적하는 조직 유사기관을 삼차원 프린팅 하는 단계; 및 (c) 삼차원 프린팅된 바이오 잉크 조성물을 가교결합 시키는 단계를 포함하는 조직 유사기관 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 따라 제조된 방법에 따라 제조된 조직 유사기관(organoid)을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포 운반물질, 점성 증강제, 윤활제 및 구조물질을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 있어서, 전환성장인자- β (transforming growth factor- β TGF- β)를 추가로 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 상기 바이오 잉크 조성물을 삼차원 프린터에 충전하는 단계; (b) 목적하는 조직 유사기관을 삼차원 프린팅 하는 단계; 및 (c) 삼차원 프린팅된 바이오 잉크 조성물을 가교결합 시키는 단계를 포함하는 조직 유사기관 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 방법에 따라 제조된 조직 유사기관(organoid)을 제공한다.
- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 세포 운반물질, 점성 증강제, 윤활제 및 구조물질을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 있어서, 전환성장인자- β (transforming growth factor- β TGF- β)을 추가로 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 상기 전환성장인자- β (Transforming growth factor- β)는 생체내에서 세포의 증식, 분화, 세포사멸, 이동, 그리고 세포외기질(ECM)의 생산, 혈관형성, 발생 등 다양한 생리적 과정을 조절하는 사이토카인이다. 활성형의 TGF- β 는 25kDa의 다이머 형태로 존재한다. 세포에 의해 분비되어 활성화되면 세포막의 세린/쓰레오닌 수용체 카이네이즈(serine/threonine receptor kinase)에 결합하여 신호의 전달이 이루어진다. 세포막의 TGF- β 수용체는 type I 과 type II로 이루어져 있는데 TGF- β 가 결합하면 이 두 가지 타입의 수용체가 헤테로 4량체(heterotetrameric complex)를 이루게 되고 항상 활성적인 type II 수용체는 type I 수용체를 인산화시켜서 카이네이즈의 활성화가 일어난다. TGF- β 의 신호전달에 있어서 세포외의 신호를 핵내까지 전달하는 매개체 역할을 하는 것이 Smad라고 하는 전사인자인데 type II 수용체에 의해 인산화된 type I 수용체는 Smad 단백질을 인산화시키고 활성화시킨다. 인산화된 Smad 단백질은 핵내로 들어가서 다른 전사인자와 협력하여 다양한 유전자의 발현을 조절한다 (Masague J, Seoane J, Wotton D. Genes Dev 19:2783-2810, 2005). 또한, 상기 TGF- β 는 정상세포를 형질전환세포로의 증식을 촉진하여 연골 생성을 유도하며 콜라겐 등 세포외기질의 생성도 촉진시키는 작용을 한다.
- [0029] 상기 TGF- β 는 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 및 TGF- β 4의 네 가지 isoform으로 존재하며, 본 발명에서의 상기 TGF- β 는 바람직하게는 TGF- β 3일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 TGF- β 의 아미노산 서열은 Genebank 등 공지의 데이터베이스를 통하여 통상의 기술자가 용이하게 확인할 수 있으며, 현재 당업계에 공지된 TGF- β 뿐만 아니라, 향후 새롭게 밝혀질 신규한 TGF- β 또한 본 발명의 상기 TGF- β 에 포함될 수 있음은 통상의 기술자에게 자명한 것이다.
- [0033] 본 발명의 TGF- β 는 천연으로부터 유래될 수도 있으며, 공지의 펩티드 합성 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 당업계에 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다(Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

[0035] 또한 본 발명의 TGF- β 는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 하기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 단백질을 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 단백질'이라 함은 본 발명에 따른 단백질이 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 단백질 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: (Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Edition; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink (eds.)).

[0037] 상기 유전공학적 방법에 의해 제조된 단백질 또는 화학적으로 합성된 단백질은 예를 들면 추출법, 재결정법, 다양한 크로마토그래피(겔 여과법, 이온 교환, 침전, 흡착, 역전상), 전기영동, 역류 분배법 등 당업계에 공지된 방법으로 분리 및 정제할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 조성물의 TGF- β 는 그 자체 또는 염, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에서 '약학적으로 허용가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0041] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 TGF- β 는 포유류로부터 얻어진 것일 수 있으며, 포유류로부터 목적하는 단백질을 수득하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0043] 가장 바람직하게는, 상기 TGF- β 는 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 제조된 것일 수 있다:

[0044] (a) TGF- β 를 증류수, 소 혈청 알부민과 혼합하여 TGF- β 용액을 제조하는 단계;

[0045] (b) 상기 (a)에서 얻어진 용액을 0.45마이크로 필터를 사용하여 걸러내는 단계; 및

[0046] (c) 상기 (b)에서 얻어진 용액을 동결 건조하여 분말화 하는 단계.

[0048] 한편, 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 세포 운반물질은 균일한 세포 현탁액의 제조 및 우수한 프린팅 경향성을 나타내는데 적합한 것을 선택할 수 있으며, 이의 비제한적인 예시로는 젤라틴, 콜라겐, 알기네이트, 아가(agar), 아가로스, 플루로닉(pluronic), 소장점막하조직, 소장점막하조직 유도체 및 폴리비닐알콜로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 소장점막하조직, 소장점막하조직 유도체, 젤라틴 또는 콜라겐일 수 있으며, 가장 바람직하게는 소장점막하조직 또는 이의 유도체일 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 상기 소장점막하조직은 세포가 존재하지 않는 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며 90% 이상이 피부에 있는 콜라겐 I, II 형으로 구성되어 있고 그 외에는 소량의 콜라겐 V, VI형 등이 존재한다. 또한 소장점막하조직은 세포외기질(ECM)로서 글리코사아미노글리칸 및 피브로넥틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 하이아루론산과 염기성 섬유아세포 성장인자-2 (base fibroblast growth factor - 2; FGF-2), 신경성장인자 (nerve growth factor; NGF), 변환성장인자- β (transforming growth factor- β ; TGF- β), 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF), 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 및 인슐린 성장인자 (insulin-like growth factor-1; IGF-1) 등의 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있다. 이와 같이 소장점막하조직 내에는 ECM 및 사이토카인이 존재하기 때문에 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 줌으로써 조직 재생 이외에도 많은 분야에 응용이 되고 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 소장점막하조직은 인간을 제외한 포유류로부터 얻어진 것이라면 제한없이 이용이 될 수 있으며, 바람직하게는 돼지 소장점막하조직을 이용할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 사용되는 상기 소장점막하조직은 당업계에서 이용되고 있는 제조방법에 따라 제조된 것이라면 제한 없이 이용될 수 있으며, 예를 들면 한국등록특허 제1288088호, 한국공개특허 제20060100430호, 한국등록특허 제1364591호 등을 참조하여 분말화한 것을 이용할 수 있다. 바람직하게는, 상기 소장점막하조직은 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 제조될 수 있다:
- [0055] (1) 소장점막하조직을 산성 용액 및 펩신과 혼합하여 소장점막하조직 용액을 제조하는 단계; (2) 상기 (1)에서 얻어진 용액을 염기성 용액을 이용하여 생체 적합성 pH로 조절하는 단계; 및 (3) 상기 (2)에서 얻어진 용액을 동결건조하여 분말화하는 단계.
- [0057] 상기 산성 용액은 pH 2.5 ~ 4.5로 조절할 수 있는 용액이면 가능하고, 바람직하게는 아세트산, 파라톨루엔설폰산 및 말레인산 중에서 선택된 산을 1 ~ 5 중량% 농도로 포함된 수용액을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0059] 상기 염기성 용액은 산성을 적정시켜주고, 조직공학용 지지체로써 사용되어 질 때 주변의 세포들의 염증반응을 줄이기 위하여 사용되며, 예를 들어 수산화나트륨(NaOH), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 인산수소나트륨(Na_2HPO_4), 탄산수소칼슘($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$), 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화질산칼슘($\text{Ca}(\text{OH})\text{NO}_3$), 수산화염화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})\text{Cl}$), 수산화시아나이드($\text{Ca}(\text{OH})\text{CN}$), 수산화칼륨(KOH), 수산화암모늄(NH_4OH) 및 아세트산나트륨(CH_3COONa) 중에서 선택된 1종 또는 2종 이상을 사용할 수 있다. 이러한 염기성 용액을 적정시켜 pH 5.5 ~ 7.8 의 생체내 pH와 유사하게 조절한다.
- [0061] 한편, 상기 (1) 단계 이전에 (a) 인간을 제외한 포유류로부터 수득한 소장점막하조직에서 장간 막, 점막층 및 근육층을 제거하는 전처리 단계; 및 (b) 상기 전처리된 소장점막하조직을 동결건조 후 분쇄하여 분말화하는 단계를 포함하는 소장점막하조직 전처리 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 상기 소장점막하조직 유도체란 화학적 변형을 통하여 가교할 수 있도록 변형된 형태의 소장점막하조직을 의미하는 것으로서, 가교제 또는 광개시제 등을 통하여 가교반응이 유도될 수 있는 유도체라면 그 종류가 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 메타크릴화 소장점막하조직(methacrylated SIS), 아크릴화 소장점막하조직(acrylated SIS) 또는 사이올화 소장점막하조직(thiolated SIS)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 메타크릴화 소장점막하조직(methacrylated SIS)일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 세포 운반물질은 소장점막하조직 또는 이의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하지만, 바람직하게는 상기 세포 운반물질은 소장점막하조직 유도체를 30 내지 100 w/w%, 더 바람직하게는 50 내지 100 w/w%, 더 바람직하게는 70 내지 100 w/w%, 가장 바람직하게는 100 w/w%로 포함할 수 있다.

- [0066] 상기 세포 운반물질에 소장점막하조직 유도체가 30% 미만으로 포함이 되는 경우에는 바이오 잉크 조성물로 프린팅된 구조체의 구조 안정성이 낮아질 수 있다는 점에서 바람직하지 않다.
- [0068] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 점성 증강제는 우수한 프린팅 경향성 및 바이오 잉크의 초기 강성(strength)을 유지하는데 적합한 것을 선택할 수 있으며, 이의 비제한적인 예시로는 히알루론산 또는 텍스트란일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 윤활제는 전단률(shear rate)을 최소화 할 수 있고, 분배 속도(dispensing speed)를 개선할 수 있는 물질 중에서 선택되는 것이 바람직하며, 이의 비제한적인 예시로는 글리세롤을 들 수 있다.
- [0072] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 구조물질은 빠른 가교결합의 형성 및 기계적 강성을 유지할 수 있는 물질로부터 선택되는 것이 바람직하며, 이의 비제한적인 예시로는 피브리노겐, 화학적으로 가교할 수 있도록 변형된 히알루론산 (예, 메타아크릴레이티드 히알루론산, 사이올레이티드 히알루론산, 등), 화학적으로 가교할 수 있도록 변형된 젤라틴 (예, 젤라틴 메타아크릴레이티드, 사이올레이티드 젤라틴, 등), 콜라겐, 알기네이트, 메틸 셀룰로오스, 키토산, 키틴, 합성펩타이드 및 폴리에틸렌 글리콜 기초의 하이드로겔로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0074] 상기 피브리노겐은 겔의 안정성 측면에서 구조물질로서 적합할 뿐만 아니라, 세포가 프린팅된 이후에 세포의 부착 및 분화에 적합한 미세환경을 조성한다는 점에서 바람직한 구조물질로 선택될 수 있다. 히알루론산과 글리세롤은 각각 삼차원적 바이오 프린팅 적용시 분배 균일성(dispensing uniformity) 및 노즐의 막힘 방지효과 측면에서 본 발명의 조성물에 적합하게 사용될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 세포 운반물질은 0.01-10 w/v% , 0.05- 10 w/v%, 0.5-10 w/v%, 1-10 w/v%, 1.5-10 w/v%, 2-10 w/v%, 0.1-8 w/v%, 0.5-8 w/v%, 1-8 w/v%, 2-8 w/v%, 0.1-6 w/v%, 0.5-6 w/v%, 1-6 w/v%, 2-6 w/v%, 0.1-5 w/v%, 0.5-5 w/v%, 1-5 w/v% 또는 2-5 w/v% 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 2-4 w/v% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 점성 증강제는 0.01-1 w/v%, 0.05-1 w/v%, 0.1-1 w/v%, 0.2-1 w/v%, 0.01-0.8 w/v%, 0.05-0.8 w/v%, 0.1-0.8 w/v%, 0.2-0.8 w/v%, 0.01-0.5 w/v%, 0.05-0.5 w/v% 또는 0.1-0.5 w/v% 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.2-0.4 w/v% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 윤활제는 0.1-30 w/v%, 1-30 w/v%, 5-30 w/v%, 10-30 w/v%, 0.1-20 w/v%, 1-20 w/v%, 5-20 w/v%, 10-20 w/v%, 0.1-15 w/v%, 1-15 w/v%, 5-15 w/v% 또는 10-15 w/v% 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 10-13 w/v% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 구조물질은 0.1-10 w/v%, 0.5-10 w/v%, 1-10 w/v%, 0.1-8 w/v%, 0.5-8 w/v%, 1-8 w/v%, 0.1-5 w/v%, 0.5-5 w/v% 또는 1-5 w/v% 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 1-3 w/v% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명의 발명자들은 종래 연구를 통하여 삼차원적 바이오 프린팅에 적용되기에 적합한 물리적 및 생물학적 특성을 나타내는 바이오 잉크 조성물을 개발하기 위해 다양한 조합의 구성을 갖는 조성물의 물리적 및 생물학적

특성을 테스트하여 본 결과, 상기 조합 및 상기 함량의 구성성분의 조합으로 이루어진 바이오 잉크 조성물이 높은 구조 안정성, 우수한 프린팅 성능 및 프린팅 후 적절한 기계적 특성을 나타내어 조직 유사기관의 제조를 위한 삼차원적 바이오 프린팅에 특히 적합하다는 것을 확인한 바 있다.

[0086] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에서 상기 TGF- β 는 0.01-1 w/v%, 0.05-1 w/v%, 0.1-1 w/v%, 0.2-1 w/v%, 0.01-0.8 w/v%, 0.05-0.8 w/v%, 0.1-0.8 w/v%, 0.2-0.8 w/v%, 0.01-0.5 w/v%, 0.05-0.5 w/v% 또는 0.1-0.5 w/v% 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.01-0.03 w/v% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0088] 한편, 본 발명의 상기 바이오 잉크 조성물은 세포 $0.05-60 \times 10^6/\text{mL}$ 을 포함할 수 있다.

[0090] 본 발명에서 상기 세포는 바람직하게는, 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(glia cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬 세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 줄기세포 또는 조골세포일 수 있으며, 가장 바람직하게는 줄기세포일 수 있다.

[0092] 본 발명에서 사용되는 상기 세포 및 바이오 프린팅된 조직 유사 구조체 내에 포함된 세포는 당업계에 공지된 임의의 방식으로 배양될 수 있다. 세포 및 조직 배양 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures; Freshney (1987), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques]에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다. 일반적인 포유동물 세포 배양 기술, 세포주, 및 본 발명과 함께 사용될 수 있는 세포 배양 시스템이 또한 문헌[Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G., (eds.) Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Wiley (1998)]에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다.

[0094] 본 발명에서 상기 세포는 삼차원적 바이오프린터로부터 바이오 잉크를 침착 또는 압출시킴으로써 바이오 프린팅될 수 있다. 본 발명의 바이오 잉크는 복수의 세포를 포함하는 액체, 반고체, 또는 고체 조성물의 형태일 수 있다. 바이오 잉크는 액체 또는 반고체 세포 용액, 세포 현탁액, 또는 세포 농축물을 포함한다. 상기 바이오 잉크 조성물은 1) 복수의 세포 또는 세포 응집체와 생체적합성 액체 또는 겔을 소정의 비율에서 혼합하여 바이오잉크를 제조하는 단계, 및 2) 바이오 잉크를 치밀화하여 원하는 세포 밀도 및 점도를 갖는 바이오 잉크를 제조하는 단계 등에 의해 제조될 수 있다. 구체적으로, 바이오 잉크의 치밀화는 원심분리, 점선류 여과("TFF"), 또는 이의 조합에 의해 실현되며 바이오 잉크의 치밀화는 압출가능한 조성물을 제조하여 다세포 응집체 또는 다세포체를 형성한다. 상기 "압출가능한"이란 노즐(nozzle) 또는 오리피스(예, 하나 이상의 구멍 또는 튜브)를 (예를 들어, 압력 하에서) 통과시킴으로써 성형될 수 있는 것을 의미한다. 또한 바이오 잉크의 치밀화는 적당한 밀도로 세포를 성장시키는 것으로부터 유도된다. 바이오 잉크에 필요한 세포 밀도는 사용할 세포 및 제조할 조직 또는 장기에 따라 달라진다.

[0096] 본 발명은 또한, 상기 바이오 잉크 조성물은 조직유래 성분이 추가로 포함될 수 있다.

[0098] 조직유래 성분은 연골, 신장, 심장, 간, 근육 등과 같은 동물의 특정조직이 탈세포화 되고 세포외기질을 주성분으로 하는 물질의 겔(gel)화 된 것을 의미하며, 이는 바이오 잉크 조성물의 조직특이성을 강화하기 위하여 포함될 수 있다.

- [0100] 바이오 잉크 조성물에 포함된 세포가 삼차원 프린팅된 조직 유사기관 내에서 정상적으로 성장, 분화하기 위해서는 신체 내 원 조직의 미세환경(microenvironment)과 유사한 자연적인 환경을 조성할 필요가 있다. 인위적으로 생성된 어떠한 조성물도 세포외기질(extracellular matrix)과 같은 자연적인 조직유래 성분이 갖고 있는 특성을 모두 재현하는 것이 사실상 불가능하며, 따라서 탈세포화된 조직유래 성분을 바이오 잉크 조성물에 추가함으로써, 세포가 정상적으로 성장하고 분화할 수 있는 미세환경을 조성해 줄 수 있다.
- [0102] 탈세포화된 조직유래 성분은 인체 내에서 세포와의 상호작용을 통해 조성된 각각의 조직 특화된 구성성분 및 위상을 갖고 있기 때문에, 세포의 성장 및 분화에 유리한 환경을 제공하여 줄 수 있다. 따라서, 본 발명의 바이오 잉크 조성물에 조직유래 성분을 추가함으로써, 세포가 정상적인 형태를 유지하며 그 기능을 원활히 보존할 수 있도록 할 수 있다.
- [0104] 본 발명에서의 상기 조직유래 성분을 얻을 수 있는 조직은 특별히 제한되지 않으며, 제조하고자 하는 조직 유사기관에 따라 선택하여 탈세포화한 후 겔(gel)화 하여 사용할 수 있다. 조직을 탈세포화 하는 방법 및 겔(gel)화 하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술자가 용이하게 선택하여 실시할 수 있을 것이다.
- [0106] 본 발명에 있어서 상기 바이오 잉크 조성물은 세포 배양 배지를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지는 목적하는 세포에 적합한 임의의 배지를 포함하는 개념이며, 세포 배양 배지의 비제한적인 예시로는 둘베코 인산 완충 식염수, 열 균형화 염, 행크 균형화 염, 티로드 염, 알시버 용액, 게이 균형화 염 용액, 크랩-헨젤라이트 변성 완충제, 크랩-링거 중탄산 완충제, 펙 식염수, 둘베코 변성 이글 배지, 둘베코 변성 이글 배지/영양소 F-12 Ham, 영양소 혼합물 F-10Ham(Ham's F-10), 배지 199, 이글 최소 필수 배지, RPMI-1640 배지, 에임즈 배지, BGJb 배지(Fitton-JacksonModification), 클릭 배지, CMRL-1066 배지, 피셔 배지, 글라스코우 최소 필수 배지(GMEM), 이스코브 변성 둘베코 배지(IMDM), L-15 배지(Leibovitz), 맥코이 5A 변성 배지, NCTC 배지, 스웬 S-77 배지, 웨이마우스 배지, 윌리엄 배지 E, 또는 이의 조합을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 세포 배양 배지는 알부민, 셀레늄, 트랜스페린, 페투인, 슈가, 아미노산, 비타민, 성장 인자, 사이토카인, 호르몬, 항생물질, 지질, 지질 담체, 시클로텍스트린, 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명에서 바이오 잉크 조성물은 세포 접착을 촉진하는 물질 및/또는 산화방지제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0110] 또한 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 세포사(예, 괴사, 세포사멸, 또는 자살흡수작용)를 억제하는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 세포사를 억제하는 물질의 비제한적 예로서, 소분자, 항체, 펩티드, 펩티바디, 항-TNF 물질, 인터류킨의 활성을 억제하는 물질, 인터페론의 활성을 억제하는 물질, GCSF(과립구 콜로니-자극 인자)의 활성을 억제하는 물질, 대식세포 염증성 단백질의 활성을 억제하는 물질, TGF-B(형질전환 성장 인자 B)의 활성을 억제하는 물질, MMP(매트릭스 메탈로프로티나제)의 활성을 억제하는 물질, 카스페이스의 활성을 억제하는 물질, MAPK/JNK 신호전달 캐스케이드의 활성을 억제하는 물질, Src 키나아제의 활성을 억제하는 물질, JAK(야누스 키나아제)의 활성을 억제하는 물질, 또는 이의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [0112] 본 발명은 또한, 상기 바이오 잉크 조성물은 구성성분의 가교결합을 촉진하기 위한 가교제 또는 광학개시제(photoinitiator)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0113] 상기 가교제는 통상적인 하이드로겔 조성물에 사용되는 다가 금속이온을 포함하는 화합물일 수 있다. 다가 금속이온 화합물은 알루미늄 화합물, 칼슘 화합물 및 마그네슘 화합물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 수산화알루미늄, 함수규산알루미늄, 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화알루미늄, 메타규산알루미늄산마그네슘, 아세트산알루미늄 및 규산알루미늄산마그네슘으로 구성되는 그룹으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [0114] 상기 광학개시제는 빛에 노출됨에 따라 신속한 가교결합을 유발하는 물질을 의미한다. 본 발명에서 상기 광학개

시제의 종류는 특별히 제한되는 것은 아니나, 자외선(UV)의 조사에 의해 가교반응이 일어나는 광학개시제 또는 가시광선의 조사에 의해 가교반응이 일어나는 광학개시제가 사용될 수 있다. 적절한 광학개시제의 비제한적인 예시로는, 아세토페논, 벤조인 메틸 에테르, 디에톡시아세토페논, 벤조일 포스핀 옥사이드 및 1-히드록시사이클로헥실 페닐 케톤, 에오신 등을 들 수 있다. 첨가되는 광학개시제의 양은 노출되는 빛의 파장 및 시간에 따라 달라질 수 있다.

[0116] 이상 살펴본 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 TGF- β 를 특정 함량으로 조성물에 포함함으로써, 줄기세포의 연골 세포로의 분화를 촉진하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0118] 본 발명의 상기 바이오 잉크 조성물이 연골세포로의 분화를 유도할 수 있는 줄기세포는, 동물의 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간의 중간엽 줄기세포일 수 있다. 또한 본 발명의 중간엽 줄기세포는 골수, 지방조직, 말초혈액, 간 유래 일 수 있다.

[0120] 중간엽 줄기세포는 골수 등에 적은 양으로 존재하지만, 이를 분리 및 배양하는 과정은 당업계에 잘 알려져 있으며 예를 들면 미국특허 제5,486,359호를 참조할 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 중간엽 줄기세포는 공지된 방법에 따라 골수의 조혈모세포로부터 부착특성에 의해 분리한 후 분화능력을 잃지 않은 상태에서 증식시켜 얻을 수 있다.

[0122] 본 발명은 또한 (a) 본 발명의 바이오 잉크 조성물을 삼차원 바이오 프린터에 충전하는 단계; (b) 목적하는 조직 유사기관을 삼차원 프린팅 하는 단계; 및 (c) 삼차원 프린팅된 바이오 잉크 조성물을 가교결합 시키는 단계를 포함하는 조직 유사기관 제조방법을 제공한다.

[0124] 본 발명에서 제공되는 바이오 잉크 조성물은 다양한 조직 유사기관의 제조에 용이하다. 바이오 프린팅 기술은 조직 유사기관을 제조하기 위한 유용한 도구로서 당업계에서 발전되고 있다. 한편, 바이오 프린팅에 사용되기 위한 종래의 바이오 잉크 조성물들은 액상 형태이기 때문에 충분한 물리적 강성을 갖기가 힘들거나, 또는 지나치게 물리적 강성이 강하여 프린팅 과정에서 세포의 생존이 충분히 보장되지 않는다는 문제점이 있었다. 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 삼차원적 바이오 프린팅에 적용하여 조직 유사기관을 제조함에 있어서, 충분한 물리적 강성은 유지하고 바이오 프린터에 의해 분사됨에 있어서 세포의 생존이 충분히 보장된다는 장점이 있어 조직 유사기관의 제조에 굉장히 적합한 물리적 및 생물학적 특성을 나타낸다. 또한, 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 종래 젤라틴만을 세포 운반물질로 사용한 바이오 잉크 조성물과 비교하여 정교한 프린팅 성능을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0126] 또한, 상기 세포 운반물질로 젤라틴만을 사용한 종래 바이오 잉크 조성물과 비교하여, 세포 운반물질로서 소장 점막하조직을 함께 포함할 경우 프린팅 후 구조 안정성이 현저히 우수하고, 보다 정밀한 프린팅성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 본 발명에서의 바이오 잉크 조성물은 삼차원적인 구조체의 적층을 가능하게 한다. 충분한 양의 세포가 포함된 본 발명의 바이오 잉크 조성물이 삼차원 바이오 프린터에 의해 적층됨으로써 조직 유사기관을 형성하는데 이용될 수 있다.

[0130] 본 발명에서의 "바이오 프린팅"이란 자동화된, 컴퓨터 보조의, 삼차원 시제품화 장치(예, 바이오프린터)와 상용되는 방법론을 통해 삼차원의 정확한 세포 침착(예, 세포 용액, 세포 함유 겔, 세포 현탁액, 세포 농축물, 다세포 응집체, 다세포체 등)을 이용하는 것을 의미한다.

- [0132] 본 발명에서의 바이오 프린팅 방법은 연속 및/또는 실질적으로 연속이다. 연속 바이오 프린팅 방법의 비제한적 예는 바이오 잉크의 저장소에 연결되는 분사 팁(dispense tip) (예, 주사기, 모세관 등)을 통해 바이오 프린터로부터 바이오 잉크를 분사하는 것이다. 연속 바이오 프린팅 방법은 기능 단위의 반복 패턴에서 바이오 잉크를 분사하는 것이다. 상기 반복 기능 단위는 예를 들어 원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형, 다각형, 및 불규칙 기하구조를 포함하는 임의의 적당한 기하구조를 갖는다. 또한, 바이오 프린팅된 기능 단위의 반복 패턴은 층을 포함하고 복수의 층이 조작된 조직 또는 장기를 형성하기 위해 인접하게 바이오 프린팅 될 수 있다. (예를 들면, 적층된다). 구체적으로, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 이상의 층이 조작된 조직 또는 장기를 형성하기 위해 인접하게 바이오 프린팅 될 수 있다.
- [0134] 바이오 프린팅된 기능 단위는 격자무늬(tessellated) 패턴으로 반복될 수 있다. "격자무늬 패턴"은 중첩되지 않고 갭이 없는 평면을 충전하는 평면 도형이다. 연속 및/또는 격자무늬 바이오프린팅의 이점은 바이오 프린팅된 조직의 증가된 생산성을 포함할 수 있다. 또 다른 비제한적 잠재적 이점은 이전에 침착된 바이오 잉크의 요소와 바이오 프린터를 정렬할 필요를 없앨 수 있다는 것이다. 연속 바이오프린팅은 또한 경우에 따라 시린지 메커니즘을 사용하여 바이오 잉크의 대형 저장소로부터 보다 큰 조직을 인쇄하는 것을 용이하게 할 수 있다.
- [0136] 바이오 프린터로부터 적당한 및/또는 최적의 분사 거리는 재료 편평화 또는 분사 바늘에의 부착화를 생성하지 않는다. 바이오 프린터 분사 팁은 약, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 μm 이상 및 이 범위 내의 증분의 내경을 갖는다. 또한, 바이오 프린터의 바이오 잉크 저장소는 약 .5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 입방 센티미터 이상 및 이 범위 내의 증분의 용적을 갖는다. 펌프 속도는 시스템에서의 잔류 압력 상승이 낮을 경우 적당하고/하거나 최적일 수 있다. 양호한 펌프 속도는 저장소의 단면적과 분사 바늘 사이의 비율에 의존할 수 있고, 보다 높은 비율은 보다 낮은 펌프 속도를 필요로 한다.
- [0138] 다양한 종류의 조직 유사기관이 상기한 방법에 의해 생성될 수 있다. 바이오 잉크 조성물을 적층하는 패턴이나 적층 배열은 제조하고자 하는 조직 유사기관의 크기 및 직경 등에 의해 결정될 수 있다. 또한, 조직 유사기관을 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 조직 유사기관의 종류에 따라 다양하게 변경이 가능하다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자라면, 삼차원 바이오 프린팅을 통해 제조하고자 하는 조직 유사기관의 종류에 따라 적절한 세포를 선택하여 이에 적용할 수 있을 것이다.
- [0140] 바이오 잉크 조성물이 삼차원 바이오 프린터에 의해 분사되어 적층된 이후에는 이를 광(자외선 또는 가시광선)에 노출시키거나 또는 가교 결합용액을 첨가함으로써 바이오 잉크 조성물의 가교결합을 촉진할 수 있다. 이러한 가교결합은 적층된 바이오 잉크 조성물이 보다 단단한 구조물로 완성될 수 있도록 해준다. 한편, 상기 광(자외선 또는 가시광선)은 적층된 바이오 잉크 조성물의 표면에 직접적으로 노출시킬 수 있으며, 예를 들어 광(자외선 또는 가시광선) 발생기로부터 발생된 300 nm 내지 800 nm 의 파장을 이용하여 적층된 바이오 잉크 조성물로부터 1~20 cm 거리에서 1초 내지는 1000초간 노출이 될 수 있고, 또는 20초 내지 500초, 또는 40초 내지 240초간 노출될 수 있다. 이러한 광(자외선 및 가시광선) 노출 거리 및 시간은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 기술자라면, 짧은 거리 및 강한 파장이면 짧은 시간 동안의 노출로도 충분한 가교결합을 형성할 수 있다는 것을 인지할 수 있을 것이다.
- [0142] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 체내 이식 가능한 조직 유사기관 또는 조직 구조체를 제공한다.
- [0144] 삼차원 바이오 프린팅 기술은 모양 및 크기 면에서 임상적으로 적용이 가능한 조직 또는 기관 구조물을 제작할

수 있는 가능성을 가지고 있다. 조직-특이적인 세포 종류 및 삼차원적 구조물에 적용된 바이오 잉크의 조합을 통하여, 세포에 내재된 재생산 능력을 이용할 수 있고, 이를 통해 필요한 조직 또는 장기를 생산해 내는 것이 가능할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물을 이용하여 바이오 프린팅된 조직 구조체들은, 포유류 조직 및 기관과 해부학적으로 및 기능학적으로 유사성을 지닌 구조체를 제공할 수 있다.

[0146] 본 발명의 조성물을 이용하면 조직 유사기관 또는 체내 이식 가능한 조직의 단일 구조체를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 여러 가지 세포를 동시에 프린팅하여 조직과 조직간의 연계를 재연할 수 있는, 기능성이 현저히 향상된 조직 구조체를 제조할 수도 있다.

발명의 효과

[0148] 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 높은 점탄성, 강한 구조 안정성, 우수한 프린팅성, 생체적합성 및 프린팅 후 적절한 기계적 특성과 함께 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진하는 효과를 나타내기 때문에 삼차원적 바이오 프린팅을 이용한 조직 유사기관의 제조 및 연골 관련 질환의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0150] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명을 상세히 설명한다.

[0151] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0153] <실시예 1>

[0154] 바이오 잉크 조성물의 제조

[0155] 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 세포가 균일하게 혼합된 형태로 프린팅이 수행될 수 있도록 충분한 점도를 가지며 온도에 민감한 젤라틴(35 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 프린팅시 바이오 잉크의 점도를 강화하고 패턴의 균일성을 향상시킬 수 있는 히알루론산(3 mg/mL, Sigma-Aldrich), 노즐 막힘 현상을 줄여주기 위한 윤활제로 글리세롤(10 v/v%, Sigma-Aldrich) 및 프린팅 후 가교에 의해 구조 안정성을 제공하는 화학적으로 변형된 젤라틴(20 mg/mL methacrylated gelatin)이다. 각 조성물은 37℃에서 하루동안 교반되어 균일하게 혼합되었다. 완전히 혼합되어 용해된 바이오 잉크 조성물을 0.45 μ m 주사형 필터를 이용하여 멸균하였다. 프린팅 후 가교가 이루어지도록 하기 위해 광학개시제인 메틸프로피오페논(1%, Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 바이오 프린팅된 줄기세포를 연골세포로 분화되도록 유도할 때 사용되는 TGF- β 3는 (0.1mg/mL, GenScript)는 화학적 결합을 통해 바이오 잉크 조성물에 포함시켰다.