



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0081481
(43) 공개일자 2025년06월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0653 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0169863
(22) 출원일자 2023년11월29일
심사청구일자 2023년11월29일
- (71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
강현욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
- 정원우
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인지원

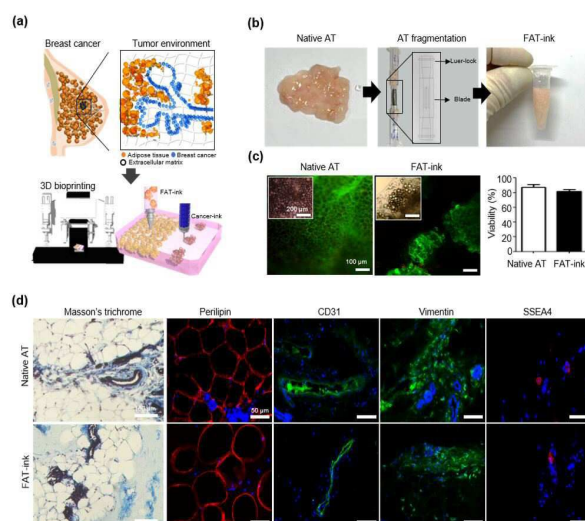
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 바이오 잉크를 이용한 암-지방 조직 복합 모델 제조방법

(57) 요약

본 발명은 바이오 잉크를 이용한 암-지방 조직 복합 모델 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 상기 제조방법은 생분해성 플라스틱을 압출시켜 프레임을 제조하는 단계; 미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계 및 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계를 포함하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

(72) 발명자

한중혁

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

최정환

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 9991008160

과제번호 22-CM-BR-12

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 국방과학연구소

연구사업명 민군기술협력(R&D)(산업부, 방사청)

연구과제명 소형 바이오프린팅 시스템 및 복합조직 제작기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711186836

과제번호 2021R1A2C2012808

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 정밀 3차원 줄기세포-스페로이드 프린팅 기술을 이용한 고효율 이중 체도 이식체 제작 기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

생분해성 플라스틱을 압출시켜 프레임을 제조하는 단계;

미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계; 및

상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계를 포함하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생분해성 플라스틱은 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리락타이드(poly(lactic acid; PLA), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol; PVA), 폴리부틸렌숙시네이트(Polybutylene succinate; PBS) 폴리부틸렌 아디페이트 테레프탈레이트(polybutylene adipate-co-terephthalate; PBAT), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate; PHA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리오쏘에스터(polyorthoester), 포스파진(phosphagene), 폴리펩타이드(polypeptide) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세화된 지방 조직 바이오 잉크는

미세화된 지방 조직을 콜라겐/알긴산 혼합 용액과 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 미세화된 지방 조직은 10% ~ 20%v/v으로 혼합되는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 콜라겐/알긴산 혼합 용액은 콜라겐 용액과 알긴산 용액이 1~5:1의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 미세화된 지방 조직은 조직 마이크로나이저 (tissue micronizer)에 의해서 제조되며, 상기 조직 마이크로나이저 (tissue micronizer)는 내부에 유체 경로를 포함하는 본체; 일단부는 상기 유체 경로에 연결되고, 상기

유체 경로의 양 말단에 위치하는 유체 유입구 및 소정의 간격으로 이격되어 상기 유체 경로 내부 원주면으로부터 중심을 향하여 돌출된 복수의 분쇄날을 포함하는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암 세포 바이오 잉크는 젤라틴, 히알루론산, 배지 및 암 세포주를 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 배지는 MEM-알파(Minimum Essential Medium alpha), MSCGM(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 젤라틴 농도는 30 ~ 50 mg/ml인 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 암 세포주는 $100 \times 10^6 \sim 200 \times 10^6$ cells/ml의 농도로 혼합되는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

암 스페로이드를 형성시키는 단계는 암 세포 바이오 잉크를 압출된 암-지방 조직 복합 모델을 CaCl_2 용액에서 인큐베이션하는 단계 및 $35 \sim 38^\circ\text{C}$ 오븐에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)인 것을 특징으로 하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 제조방법에 의하여 제조된 암-지방 조직 복합 모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 잉크를 이용한 암-지방 조직 복합 모델 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 상기 제조방법은 생분해성 플라스틱을 압출시켜 프레임을 제조하는 단계; 미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계 및 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계를 포함하는 암-지방 조직 복합 모델 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유방암은 서구 여성 8명 중 1명의 비율로 발병하고 있으며, 암 관련 사망률이 2위에 이르는 심각한 질병이다. 이러한 유방암의 치료를 위해 다양한 약물들이 개발되고 있다. 그러나, 환자별로 나타나는 상이한 약물 반응은 표준화된 치료기술의 구현을 어렵게 하고 있다. 그러한 원인들 중 하나가 유방암 주변 조직의 구성 및 형태가 환자 개인별로 상이하기 때문이다. 유방암과 주변의 조직들은 긴밀한 상호작용을 하며, 이러한 작용은 암세포의 약물 저항성, 전이 및 유전적 변이에 큰 영향을 미친다. 유방암 주변에는 다양한 조직들로 구성되어 있으며, 그 조직들 중 최대 56%를 차지하는 지방조직은 유방암과 매우 활발한 파라크린 간섭(paracrine interaction)을 한다고 알려져 있다. 지방조직을 구성하는 지방세포, 기질혈관분획세포 등은 다양한 종류의 호르몬과 사이토카인을 분비한다. 그 중, 아디포카인(adipokines)은 유방암 세포의 증식(proliferation) 및 침윤(invasion)을 활성화시키며, 약물 방출 단백질 중 하나인 MVP(major vault protein)를 높게 발현하여, 유방암의 약물 저항성을 크게 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이때 유방암과 지방 조직 사이의 거리는 파라크린 간섭(paracrine interaction)의 활성화에 가장 큰 영향을 주는 요소이다. 보고된 연구결과들에 따르면 유방암이 지방 조직에 침투되어 있거나 근접된 환자는 그렇지 않은 환자보다 크게 높은 약물 저항성과 암 전이율을 지니고 있으며, 환자의 생존율이 유의하게 낮아진다고 알려져 있다. 이러한 관점에서 유방암과 지방조직 사이의 거리에 따른 상호작용은 유방암 치료제의 개발에서 꼭 고려되어야 할 요소이다.

[0003] 유방암과 지방조직간 상호작용을 분석할 수 있는 다양한 종류의 체외 암 모델들이 개발되었다. Watzling et al.은 2차원 공동 배양 기술을 이용한 모델을 선보였다. 그들은 그 모델을 이용하여 지방유래 줄기세포(ADSC)와의 상호작용이 유방암의 면역조절과 염증 반응을 증가시킨다는 것을 보여주었다. Wang et al.은 Transwell 배양 시스템을 이용한 공동 배양 모델을 소개하였으며, 그 모델을 이용하여 ADSC에서 분비된 케모카인(chemokines)이 유방암 세포의 전이를 활성화시킨다는 것을 검증하였다. 하이드로젤을 이용한 3차원 공동 배양 기술을 이용하여 지방조직 유래 세포와 유방암세포 사이의 근거리 상호작용을 분석할 수 있는 모델들도 개발되었다. Nikitha et al.은 Matrigel을 이용한 성숙 지방 세포(mature adipocyte)와 유방암 세포의 공동배양을 통하여, 두 세포들 간의 근거리 상호작용이 암세포의 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition; EMT)를 유발한다는 것을 발견하였다. Dance et al.은 콜라겐으로 제작된 micro-channel 구조를 이용하여, 약 20 μ m 거리에 위치한 ADSC와 유방세포가 암세포의 interstitial invasion을 촉진시킨다는 것을 보여 주었다. 이와 같이 유방암과 지방조직 간의 상호 작용이 암세포의 형질 및 전이 등에 미치는 영향을 분석할 수 있는 다양한 복합조직 모델들이 개발되었다. 하지만, 유방암과 지방 조직 간의 거리는 개별 환자에 따라 달라지며, 이는 두 조직간 상호작용의 활성화도에 직접적인 영향을 미친다. 기존에 소개된 유방암 모델들은 근거리 혹은 원거리 상호작용의 분석만 가능하며, 실제 환자의 유방암과 지방조직의 상호작용을 정밀 모사하기에는 한계가 있었다. 그래서 기존의 모델들로 실효성이 높은 암 침습 평가, 약물치료법과 표적치료법에 대한 연구가 어려웠다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2156310호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 유방암은 지방조직과 가까워질수록 상호작용이 활성화되며, 이는 환자의 예후를 악화시키는 주요 원인이 된다. 하지만, 지금까지 소개된 유방암 모델들은 이 상호작용을 구현하는데 한계가 있었다. 이에 본 발명자는 바이오프린팅 기술을 이용하여 유방암 스페로이드(breast cancer spheroid)와 지방조직 간의 거리를 정교하게 조절할 수 있는 유방암-지방 조직 복합 모델(breast cancer-adipose tissue composite model)을 개발하였다. 또한, 정교한 거리 조절을 통하여 암 조직과 지방 조직간 상호작용의 조절이 가능한지를 살펴보았다. 이를 위하여 실제 지방조직의 이종 세포 군집(heterogeneous cell population)과 native ECMs 이 보존되어 있는 조각난 지방조직 유래 바이오잉크(fragmented adipose tissue-derived bio-ink; FAT-ink)가 개발되었다. 그 후, FAT-ink와 유방암 스페로이드의 정밀 공동-프린팅(co-printing) 공정이 구축되었으며, 이 기술을 이용하여 지방조직과 암 스페로이드의 위치가 정밀하게 디자인된 유방암 복합 모델(breast cancer composite models)이 개발되었다. 개발된 모델을 이용한 거리 의존적 파라크린 간섭(distance-dependent paracrine interaction)을 평가하기 위해, 다양한 모델들을 제작한 후 지방 조직(adipose tissue) 유래 아디포카인 분비, 유방암의 약물 저항성과 침윤 영역의 분석이 이루어졌다. 마지막으로, 아디포카인-표적 치료법(adipokines-targeted therapies)를 이용한 암 모델의 거리에 따른 민감도(distance-dependent sensitivity)를 분석하여, 개발된 복합조직 모델이 표적치료 모델로써 높은 효용성을 지니고 있음을 확인하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 암-지방 조직 복합 모델 제조방법을 제공하며, 상기 제조방법은 생분해성 플라스틱을 압출시켜 프레임을 제조하는 단계; 미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계; 및 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0007] 상기 생분해성 플라스틱은 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리락틱애시드(polylactic acid; PLA), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol; PVA), 폴리부틸렌숙시네이트(Polybutylene succinate; PBS) 폴리부틸렌 아디페이트 테레프탈레이트(polybutylene adipate-co-terephthalate; PBAT), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate; PHA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리오쏘에스터(polyorthoester), 포스파진(phosphagene), 폴리펩타이드(polypeptide) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0008] 상기 미세화된 지방 조직 바이오 잉크는 미세화된 지방 조직을 콜라겐/알긴산 혼합 용액과 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0009] 상기 미세화된 지방 조직은 10% ~ 20%v/v으로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0010] 상기 콜라겐/알긴산 혼합 용액은 콜라겐 용액과 알긴산 용액이 1~5:1의 비율로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 상기 미세화된 지방 조직은 조직 마이크로나이저 (tissue micronizer)에 의해서 제조되며, 상기 조직 마이크로나이저 (tissue micronizer)는 내부에 유체 경로를 포함하는 본체; 일단부는 상기 유체 경로에 연결되고, 상기 유체 경로의 양 말단에 위치하는 유체 유입구 및 소정의 간격으로 이격되어 상기 유체 경로 내부 원주면으로부터 중심을 향하여 돌출된 복수의 분쇄날을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 암 세포 바이오 잉크는 젤라틴, 히알루론산, 배지 및 암 세포주를 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 배지는 MEM-알파(Minimum Essential Medium alpha), MSCGM(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 상기 젤라틴 농도는 30 ~ 50 mg/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 상기 암 세포주는 $100 \times 10^6 \sim 200 \times 10^6$ cells/ml의 농도로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 암 스페로이드를 형성시키는 단계는 암 세포 바이오 잉크를 압출된 암-지방 조직 복합 모델을 CaCl_2 용액에서 인큐베이션하는 단계 및 $35 \sim 38^\circ\text{C}$ 오븐에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0017] 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암,

위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 제조방법에 의하여 제조된 암-지방 조직 복합 모델을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 지방조직의 모사를 위해, 지방조직의 ECMs(extracellular matrices)과 세포가 보존된 단편화된 지방 조직-잉크(fragmented adipose tissue-ink; FAT-ink)가 개발되었다. 이를 이용하여 유방암 세포(MCF7) 스펜로이드와 지방 조직 간의 거리가 정교하게 조절된 복합조직 모델이 프린팅 되었다. 그 결과, 지방 조직-암 복합 모델은 only-암 스펜로이드 모델에 비해 암세포 침습면적과 약물저항 유전자가 각각 1.92배 그리고 3.69배 증가되었다. 또한, 상기 복합 모델의 지방 세포는 암 관련 지방세포와 유사한 표현형을 보였다. 무엇보다도 지방조직과 암 스펜로이드사이의 거리가 가까워질수록, 렙틴과 레지스틴 등의 아디포카인 분비가 증가하였으며, 독소루비신 저항성과 암 이동(cancer migration)이 유의성 있게 증가되는 것이 관찰되었다. 마지막으로, 아디포카인 표적 치료법(C-compound/SC600125, AG490, and Metformin)를 이용하여 개발된 모델의 효용성이 검증되었다. 그 결과 매우 흥미롭게도, 두 조직간의 거리가 가까워질수록 아디포카인 표적 약물에 대한 암모델의 증식 및 침입이 최대 2배 가까이 유의미하게 억제되었으며, 이러한 경향성은 환자의 유방암 조직과 지방조직 사이의 거리가 가까울수록 아디포카인 표적 요법의 효과가 증가한다는 것을 의미한다. 이러한 결과들을 바탕으로 본 발명에서 개발된 복합조직 모델은 지방조직과 유방암 스펜로이드간의 상호연관(crosstalk)을 정밀하게 조절 가능하며, 표적치료를 포함한 다양한 유방암 치료법의 평가에 높은 활용성을 지님을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1. 지방 조직(AT) 모델 프린팅을 위한 미세화된 지방 조직 잉크

(a) 3D 바이오프린팅을 통한 생체모방 유방암/지방조직 복합 모델의 개략도; (b) 집에서 만든 조직 마이크로노즐을 사용하여 기본 지방 조직(AT)을 조각화했다. 그런 다음 미세화된 AT를 콜라겐/알긴산 기반 바이오 잉크와 혼합하여 FAT 잉크를 제조했다; (c) 천연 AT 및 준비된 FAT 잉크의 라이브/데드 염색 결과(왼쪽) 및 측정된 세포 생존력(오른쪽); (d) 천연 AT 및 FAT-잉크의 Masson 트리코메 염색 및 면역 염색 결과: Masson 트리코메 염색(스케일 바: 100 μ m), 페리리핀(지방세포), CD31(내피 세포), 비멘틴(섬유아세포) 및 SSEA4(지방 유래 중간엽 줄기세포) 면역염색 (스케일 바: 50 μ m).

도 2. FAT잉크와 암잉크의 유변학적 성질과 공동 프린트 과정.

(a) 유방암/지방 복합 조직 모델을 생성하기 위한 바이오프린팅 과정의 개략도; (b) 젤라틴 농도에 따른 암 잉크의 점도(전단율; 0.5-50 s^{-1} ; n = 5); (c) 지방 조직 입자의 농도에 따른 FAT 잉크의 점도(전단율; 0.5-50 s^{-1} ; n = 5); (d) 암 잉크의 젤라틴 농도와 FAT 잉크의 지방 조직 입자 농도 (스케일 바 200mm)의 변화에서 생체 인쇄 된 암 스펜로이드의 형광 현미경 이미지. 측정된 진원도(n = 10)(e) 및 계산된 변동 계수(n = 10); (f) 진원도 데이터를 사용하여 변동 계수를 계산했다; (g) RFP 표지 암 스펜로이드(빨간색) 및 BODIPY 염색된 FAT 잉크(녹색)(눈금 막대: 500 μ m)가 있는 생체 인쇄 마이크로 패턴. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다(*p<0.05, **p<0.01, ***p <0.005).

도 3. 바이오프린팅된 복합 조직 모델을 이용한 지방 조직과 MCF7 유방암 타원체 사이의 상호 작용 특성 분석.

(a) 복합 조직 모델에서 지방 조직과 유방암 스펜로이드 사이의 파라크린 간섭을 조사하기 위해 인쇄된 단일/공동 배양 모델의 개략도; (b, c) 단일/공동 배양 모델의 생존/사멸 염색 및 정량화 결과; (d) 복합 모델에서 BODIPY (녹색) 및 DAPI (청색) 염색된 지방 세포의 형광 이미지 및 지방 세포의 지질 액적 직경에 대한 정량화된 결과 (스케일 바 : 100 μ m, n = 10); (e) UCP-1, Resistin 및 IL-6(모두 빨간색)를 사용한 모델의 면역 염색 결과(f) 복합 모델에서 분비된 아디포넥틴, 렙틴 및 레지스틴의 정량 결과(n = 3); (g) 지방 조직이 있거나 없는 3D 유방암 모델에서 이동된 MCF7(빨간색)의 형광 이미지(왼쪽)와 이동 영역을 측정했습니다(오른쪽, n = 8). 48시간 MCF7 스펜로이드의 이동 영역은 0시간의 이동 영역으로 정규화되었다; (h) 독소루비신 처리 후 단일/공동배양 모델의 상대적 세포 증식(n=5). 증식 정도를 측정하면서 6일간 독소루비신 처리를 진행하였다; (i) MCF7 세포의 상대 mRNA 발현 수준(ABCB1, ABCC2 및 ABCG2)을 RT-qPCR(n=3)로 측정했다. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다(*p<0.05, **p<0.01, ***p <0.005).

도 4. 생체 인쇄 복합 조직 모델에서 암 회전 타원체와 지방 조직 사이의 거리 의존적 측분비 상호 작용의 특성

분석.

(a) 거리 의존적 측분비 상호작용을 조사하기 위한 인쇄된 복합 모델의 개략도; (b) 복합 모델에서 인쇄된 지방 조직(녹색) 및 MCF7 회전 타원체(빨간색)의 형광 이미지(스케일 바: 200 μm); 지방 조직 사이의 거리에 따른 MCF7 유방암 세포의 약물 저항성을 조사하기 위해, (c) 유방암 타원체의 상대적 세포 증식을 독소루비신 처리로 6일 동안 측정하였다($n = 4$); (d) 거리에 따라 3D 모델에서 이동된 MCF7(빨간색)의 형광(상단) 및 컴퓨터 처리 이미지(하단); (e) MCF7 세포의 이동 영역 정량 결과($n=3$); (f) 지방 및 반대 방향에 따른 MCF7 세포의 이동 영역 ($n = 3$). 48시간 MCF7 세포의 이동 영역은 0시간의 이동 영역으로 정규화되었다; (g) 거리 의존적 아디포카인 분비를 조사하기 위해 복합 모델에서 분비된 아디포넥틴, 렙틴 및 레지스틴을 ELISA 분석으로 평가했다($n=4$). 모든 값은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p <0.005$).

도 5. 암/지방 복합 조직 모델의 아디포카인 표적 약물 반응.

(a) 아디포카인 표적 치료법의 대표적인 표적 경로에 대한 개략도; (b, c) 아디포카인 표적 약물(C-화합물/SC600125, AG490 및 Metformin)로 48시간 처리한 후 2mm 거리 및 침윤군에서 이동한 MCF7 세포(빨간색)의 형광 이미지(b) (스케일 바: 500 μm) 및 정량화된 이동 영역(c); 48시간 MCF7 세포의 이동 영역은 0시간의 이동 영역으로 정규화되었다($n=4$); (d) 아디포카인 표적 약물 치료로 복합 조직 모델의 상대적 세포 증식을 측정했다. ($n=4$) 모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p <0.005$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명자는 바이오 프린팅 기술을 이용하여 암 스페로이드(breast cancer spheroid)와 지방조직 간의 거리를 정교하게 조절할 수 있는 암-지방 조직 복합 모델을 개발하였다.
- [0022] 상기 암-지방 조직 복합 모델은 생분해성 플라스틱을 압출시켜 프레임을 제조하는 단계; 미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계; 및 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계로 제조될 수 있다.
- [0023] 첫번째 단계는 프레임을 제조하는 단계로 상기 프레임은 생분해성 플라스틱을 압출시켜 제조될 수 있다. 상기 프레임의 형태는 제한적이지 않지만, 큐브 형태인 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 생분해성 플라스틱은 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리락타이드(poly(lactic acid; PLA), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol; PVA), 폴리부틸렌숙시네이트(Polybutylene succinate; PBS) 폴리부틸렌 아디페이트 테레프탈레이트(polybutylene adipate-co-terephthalate; PBAT), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate; PHA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리오쏘에스터(polyorthoester), 포스파진(phosphagene), 폴리펩타이드(polypeptide) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 두번째 단계는 미세화된 지방 조직 바이오 잉크를 압출시켜 상기 프레임 내부를 채우는 단계이다.
- [0026] 상기 미세화된 지방 조직 바이오 잉크는 미세화된 지방 조직을 콜라겐/알긴산 혼합 용액과 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 상기 미세화된 지방 조직은 10% ~ 20%v/v으로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 10% v/v 및 20% v/v의 지방 조직 입자를 지닌 FAT-ink 그룹들을 이용한 스페로이드 프린팅 결과, 40 mg/ml 젤라틴 농도에서는 유방암 세포가 둥근 스페로이드 형태로 프린팅 되는 것이 관찰되었다. 그러나 40 %v/v의 지방 조직 입자 그룹에서는 적용된 모든 젤라틴 농도 조건에서 원형의 암 스페로이드가 형성되지 못하였다.
- [0028] 상기 콜라겐/알긴산 혼합 용액은 콜라겐 용액과 알긴산 용액이 1~5:1의 비율로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 콜라겐 용액과 알긴산 용액은 3:1의 비율로 혼합될 수 있다.
- [0029] 상기 미세화된 지방 조직 바이오 잉크에서 상기 지방 조직은 지방 조직의 이종(heterogeneous) 세포 구성과 ECM이 잘 보존되어 있는 것을 특징으로 하고, 결합 조직(connective tissue)이 원시 지방 조직과 유사한 형태로 잘 보존되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상기 미세화된 지방 조직은 조직 마이크로나이저(tissue micronizer)에 의해서 제조되며, 상기 조직 마이크로나이저(tissue micronizer)는 내부에 유체 경로를 포함하는 본체; 일단부는 상기 유체 경로에 연결되고, 상기 유체 경로의 양 말단에 위치하는 유체 유입구 및 소정의 간격으로 이격되어 상기 유체 경로 내부 원주면으로부터 중심을 향하여 돌출된 복수의 분쇄날을 포함하는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적인 조직 마이크로나이저

(tissue micronizer)에 대한 기술적 특징은 대한민국 특허등록 제10-2422646호를 참고한다.

- [0031] 세번째 단계는 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하여 암 스페로이드를 형성시키는 단계로, 일명 스페로이드 프린팅을 수행하는 단계이다. 상기 스페로이드 프린팅은 구(求) 형태로 배양된 세포 덩어리인 세포 스페로이드를 원하는 위치에 바로 찍어 낼 수 있는 정밀 프린팅 기법으로, 구체적인 프린팅 방법은 대한민국 등록특허 제10-2156310호를 참고한다.
- [0032] 구체적으로 암 스페로이드를 형성시키는 단계는 상기 압출된 미세화된 지방 조직 바이오 잉크 내부에, 암 세포 바이오 잉크를 압출하는 단계; 암 세포 바이오 잉크가 압출된 암-지방 조직 복합 모델을 CaCl_2 용액에서 인큐베이션하는 단계 및 $35 \sim 38^\circ\text{C}$ 오븐에서 인큐베이션하는 단계로 수행될 수 있다. CaCl_2 용액에서 인큐베이션하는 단계는 알지네이트의 가교를 위하여, $35 \sim 38^\circ\text{C}$ 오븐에서 인큐베이션하는 단계는 콜라겐 성분의 가교를 위한 것이다.
- [0033] 상기 암 세포 바이오 잉크는 젤라틴, 히알루론산, 배지 및 암 세포주를 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 한다. 구체적으로 젤라틴, 히알루론산, 배지를 37°C 오븐에서 혼합하고, 암세포주를 추가로 혼합한다.
- [0034] 상기 배지는 MEM-알파(Minimum Essential Medium alpha), MSCGM(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 젤라틴 농도는 $30 \sim 50 \text{ mg/ml}$ 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 젤라틴 농도가 30 mg/ml 에서 50 mg/ml 로 증가할수록 점도도 점차적으로 증가하였다. 50 mg/ml 젤라틴을 포함하는 바이오잉크는 30 mg/ml 의 잉크보다 약 2.6-6.8배 높은 점도를 보여주었다. 10% v/v 및 20% v/v의 지방 조직 입자를 지닌 FAT-ink 그룹들을 이용한 스페로이드 프린팅 결과, 40 mg/ml 젤라틴 농도에서는 유방암 세포가 둥근 스페로이드 형태로 프린팅되는 것이 관찰되었다.
- [0036] 상기 암 세포주는 $100 \times 10^6 \sim 200 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 의 농도로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 $150 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 의 농도로 혼합된다.
- [0037] 암 스페로이드를 형성시키는 단계는 암 세포 바이오 잉크를 압출된 암-지방 조직 복합 모델을 CaCl_2 용액에서 인큐베이션하는 단계 및 $35 \sim 38^\circ\text{C}$ 오븐에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 제조방법에 의하여 제조된 암-지방 조직 복합 모델을 제공한다.
- [0040] 구체적으로 상기 암은 유방암이고, 본 발명에서 개발된 복합조직 모델은 지방조직과 유방암 스페로이드간의 상호연관(crosstalk)을 정밀하게 조절 가능하며, 표적치료를 포함한 다양한 유방암 치료법의 평가에 높은 활용성을 지닐 수 있다.
- [0042] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0044] <실험예>

[0045] 1. Cell culture

[0046] 대표적인 유방암 세포주인 RFP-발현 MCF7 세포(Cellomics Technology, Halethorpe, MD, USA)는 RPMI 1640 배지(LM 011-03, Welgene, Kyungsan, Korea)에 10% v/v 소 태아 혈청(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)과 1% v/v 페니실린/스트렙토마이신(P/S; Capricorn, Hesse, Germany)을 보충하여 37°C 에서 5% CO_2 환경에서 배양되었다. 배지는 2-3일마다 교체되었으며, 세포 증식이 70-80% confluency에 이르면 0.25% trypsin-

EDTA(Thermo Fisher Scientific Inc)로 계대배양 되었다.

2. 바이오 잉크 제조(Preparation of bio-ink)

FAT-ink(Fragmented adipose tissue bio-ink)는 미세화 지방 조직 입자(micronized adipose tissue particle)을 콜라겐/알긴산염 혼합물(collagen/alginate mixture)과 섞어서 제작되었다. 먼저, 지방 조직(Adipose tissue; AT)의 미세화(micronization)을 위해 10-weeks old Sprague-Dawley rat (SD rat; Male, rientBio, Gyeong-gi, Korea)의 피하 지방(subcutaneous fat)이 획득되었다. SD rat을 CO₂ 로 안락사 시킨 후, 피하 층(subcutaneous layer)을 절개하고 후방 지방 패드(posterior fat pad)가 획득되었다. 가위로 찹핑(chopping) 이후, 지방 패드(fat pad)는 1% v/v의 penicillin/streptomycin 포함 PBS(phosphate buffer saline) 용액과 1:1 비율로 섞고, 30 mL luer-lock syringe (Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany)에 넣어 졌다. 시린지는 조직 마이크로나이저 (tissue micronizer) (TULIP 1.4mm Micro kit, Tulip Aesthetics, SD, USA)와 체결되어, 20회 셔플링(shuffling)되었다. 미세화된 지방 조직을 1300 rpm에서 3분간 원심분리하고, 상단에 분리된 지질과 부스러기가 흡인기로 제거되었다. 살아 있는 지방 조직 입자를 사용하기 위해 실험 직전에 준비되었다. 동물실험은 Institutional Animal Care 및 Use Committee of the UNIST에 승인 받았다(IACUC protocol number: UNISTIACUC-21-20).

콜라겐/알긴산염 혼합물은 이전에 본 발명자가 보고했던 대로 준비되었다. 먼저, 20 mg/ml의 콜라겐 용액이 다음과 같이 준비되었다. 100 mg의 콜라겐(type I atellocollagen, Darim Tissen, Korea)은 10 mg의 펩신(Sigma Aldrich Inc., Darmstadt, Germany)이 포함된 0.1N HCl 용액에서 48h 동안 분해(digestion)하였다. 펩신 분해(Pepsin digestion) 이 후, 5N NaOH(Sigma)를 이용하여 분해된 콜라겐 용액의 pH를 7.4로 조절하고, 그 용액에 10X PBS (Sigma)를 10 % v/v의 농도 섞어 콜라겐 용액이 준비되었다. 준비된 콜라겐 용액은 사용 전까지 4℃ 에서 보관되었다. 알긴산 용액(Alginate solution)은 40 mg/ml의 알지네이트(Sigma), 6 mg/ml의 히알루론산(HA, Sigma), 60 mg/ml의 젤라틴(gelatin, Sigma)를 serum free Eagle's minimum essential medium(α -MEM, Corning, NY, USA)에 넣고 37℃ 오븐에서 용해시켜 준비되었다. 마지막으로 콜라겐 용액과 알긴산 용액을 3:1 비율로 섞어 콜라겐/알긴산염 혼합물이 준비되었다.

Cancer-ink는 30, 40, 및 50 mg/ml의 젤라틴(Sigma)과 3 mg/ml의 HA (Sigma)를 α -MEM (Corning, NY, USA)에 넣고 37℃ 오븐에서 부드러운 회전을 통하여 준비되었다. Cancer-ink에 MCF-7 유방암 세포주를 150×10^6 cells/ml의 농도로 혼합한 후, 암세포 로딩된 cancer-ink는 1 ml 시린지에 로딩되었다. Cancer-ink내에 있는 젤라틴의 열 가교(thermal crosslinking)를 위하여 그 잉크가 로딩된 시린지는 4℃에서 10분간 인큐베이션 되었으며, 그리고 바이오 프린터에 설치되었다. 프린팅 후 알지네이트 성분의 가교를 위해 CaCl₂ 40 mM 용액에서 10 분 그리고 콜라겐 성분의 가교를 위해 37℃ 오븐에서 30분간 인큐베이션 되었다.

3. 유변학적 거동(Rheological behavior)

Bio-ink의 점도(viscosity)를 측정하기 위해 shear sweep analysis 가 진행되었다. Bio-ink에 포함된 gelatin의 열가교를 위해 4℃에서 10분간 인큐베이션 후 400 μ L의 ink가 스테이지에 로딩 되었다. 점도는 HAAKE MARS III Rheometer (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE)를 사용하여 상온에서 측정되었다.

4. 3D bioprinting

유방암 복합 모델(the breast cancer composite model) 제작을 위해, 압출(extrusion) 기반 바이오프린팅 시스템이 활용되었다. 바이오프린팅 시스템은 3- 축 스테이지, 압출 디스펜서, 온도 및 습도 조절이 가능한 인클로저(enclosure)로 구성되어 있다. XY축과 Z축 stages (Samick THK, Daegu, South Korea)는 각각 250nm 및 500nm의 resolution을 지니고 있으며, delta programmable muti-axis controller(PMAC, Omron, Osaka, Japan)으로 작동되었다. Bio-inks와 thermoplastic의 프린팅을 위하여 SMP-III 기계식 디스펜서(Musashi Engineering Inc., Tokyo, Japan)와 TCD-200 가열 유닛이 장착된 금속 시린지(Musashi Engineering Inc.) ML-808GX 공압 디스펜서(Musashi Engineering, Inc.)가 사용되었다. 암 스페로이드(Cancer spheroid)에 대한 인쇄 적적성

(printability) 평가를 위해, PCL(pressure: 150 kPa, nozzle diameter: 200 μm)로 5 X 5 X 0.6 mm^2 크기의 프레임 및 FAT-ink (dispensing speed: 0.046 ml/sec, nozzle diameter: 300 μm)가 순차적으로 프린팅 되었다. 그 후, cancer-ink의 spheroid printing(dispensing time: 3s, dispensing speed: 0.011 $\mu\text{l/sec}$, nozzle diameter: 120 μm)이 수행되었다. 프린팅 후 얻어지는 현미경 이미지를 이용하여 암 스페로이드의 지름이 측정되었으며, 프린팅된 스페로이드의 roundness는 아래의 식을 이용하여 계산되었다.

$$\text{Roundness} = \frac{4 \times \text{area of spheroid}}{\pi \times \text{major axis length of spheroid}^2}$$

[0058]

[0059]

[0060]

프린팅 되는 암 스페로이드 및 지방 세포 조직 간의 거리에 따른 파라크린 간섭, 약물 반응 및 암 이동(paracrine interaction, drug response, cancer migration)을 분석하기 위하여, 지방 조직과 암 스페로이드의 위치들이 정밀하게 조절된 유방암 복합 조직 모델이 제작되었다. 유방암 스페로이드 중심으로부터 지방 조직 간의 거리에 따라 네가지 복합 조직 모델(침투, 접촉 (0 mm), 1-mm, 및 2-mm groups) 준비되었다. 침투 그룹(Infiltration group)에서는 20% v/v FAT-ink 프린팅된 지방 조직 내에 암 스페로이드가 프린팅 되었으며, 다른 그룹들에서는 FAT-ink의 프린팅 후 AT 파티클이 없는 콜라겐/알긴산염 혼합물에 암 스페로이드가 패터닝 되었다.

[0062]

5. Cell viability assay

[0063]

Live/dead staining kit (Thermofisher)를 사용하여, 프린팅된 암 스페로이드와 지방 세포의 세포 생존율이 평가되었다. 염색 용액은 Calcein AM (2 μM) 과 ethidium homodimer-1 (4 μM) 를 PBS에 희석하여 준비되었다. 각 샘플들을 준비된 염색 용액에 immerse 시킨 후, 상온에서 30분간 인큐베이션 되었다. PBS 세척 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(FV-1000SPD, Olympus, Tokyo, Japan)으로 염색 결과가 관찰되었다. 생존율(Viability)은 전체 세포 수 대비 살아있는 세포 수의 비율로 계산되었다.

[0065]

6. 아디포카인 정량화 (Adipokines quantification)

[0066]

지방 조직(Adipose tissue)으로부터 분리된 아디포카인 분석을 위해, 렙틴(leptin)(CSB-E07433r), 아디포넥틴(adiponectin) (CSB-E07271r) 그리고 레지스틴(resistin) (CSB-E06885r) ELISA kit (Cusabio, Huston, TX, USA)가 활용되었다. 프린팅 후 세포배양 미디어는 48시간 마다 샘플링 되었고, -80°C 에 보관되었다. Adipokines ELISA는 배양 미디어는 희석되어, instructor's manual에 따라 시행되었다(rat adiponectin; 1:200 ratio, rat leptin; 1:10 ratio, 및 rat resistin; 1:2 ratio).

[0068]

7. Immunostaining

[0069]

Immunostaining을 위해 모든 sample은 4% paraformaldehyde 용액(diluted in 0.9% saline with 2.5mM CaCl_2 , Junsei Chemical, Tokyo, Japan)으로 고정되었다. 지방조직 모델의 지질 방울이 있는 지방세포(adipocyte with lipid droplet)를 염색하기 위해 각 샘플은 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 BODIPY 용액(D3922, Invitrogen, diluted in PBS)로 30분간 상온에서 염색되었다. BODIPY positive area(μm^2)는 ImageJ (Adipocyte tool, NIH, Bethesda MD, USA) 통해 측정되었다. Lipid droplet은 원형으로 가정하여, diameter로 다음 식과 같이 계산되었다;

[0070]

$$\text{Lipid droplet diameter } (\mu\text{m}) = \text{BODIPY positive area } (\mu\text{m}^2)^{\frac{1}{2}}$$

[0071]

지방세포(Adipocyte)의 cancer-associated phenotype 발현을 관찰하기 위해, 페리리핀-1(1:200 dilution, PA1-1051, Thermofisher), UCP-1(1:200 dilution, ab10983, abcam), 레지스틴(1:100 dilution, ab216840, abcam), IL-6(1:10 dilution, ab9324, abcam) 항체를 이용한 immunostaining이 이루어졌다. Nucleus는 DAPI(1:1000 dilution, Thermofisher)를 사용하여 염색되었다. 모든 immunostaining 결과는 공초점 현미경(LSM700, ZEISS, BW, Germany)로 관찰되었다.

[0073] **8. Three-dimensional migration assay**

[0074] 본 발명자는 현미경(Leica Microsystems GmbH)을 사용하여 얻어진 1일과 3일차에 Breast cancer composite tissue model의 이미지들을 분석하여 3D invasion assay가 수행되었다. 아래의 식과 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 스페로이드 영역에서 부터의 세포 이동이 계산되었다.

[0075]
$$\text{migration area (\%)} = \frac{\text{Area of a spheroid on day 3} - \text{Area of a spheroid on day 1}}{\text{Area of a spheroid on day 1}} \times 100$$

[0077] **9. Drug toxicity test**

[0078] 0.1%v/v 디메틸 설펡사이드(DMSO, Sigma- Aldrich Corp.) 용액에 약물 평가를 위해, 디메틸 설펡사이드(DMSO, Sigma- Aldrich Corp.) 용액에 약물을 녹이고, 세포배양 미디엄에 독소루비신 (1 uM, HY-15142, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA), SP600125 (10 uM, Sigma), Compound-C (5 uM, Sigma), AG490 (10 uM, Sigma), 및 메트포르민 (1 uM, Sigma) solution이 준비되었다. 약물이 없는 DMSO solution (0.1% v/v) 이 대조군으로 사용되었다. 웰에서 배양 배지를 제거한 후, 각 샘플에 500 μl의 alamarBlue(10% v/v in culture medium, Thermo Fisher Scientific Inc.)가 주입되었다. 37℃에서 3시간 인큐베이션 후, Synergy NEO2 Hybrid Multi-Mode microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 반응 용액의 형광 강도가 540/595 nm (excitation/emission)의 파장에서 측정되었다. 그 후, 다음의 식을 통해 상대적인 세포 증식 (relative cell proliferation)이 계산되었다.

[0079]
$$\text{Relative cell proliferation (\%)} = \frac{\text{Drug treated group (Day 3,6)} / \text{Drug treated group (Day 1)}}{\text{DMSO treated group (Day 3,6)} / \text{DMSO treated group (Day 1)}} \times 100$$

[0081] **10. Quantification of gene expression**

[0082] 프린팅된 유방암 복합 조직 모델(Breast cancer composite tissue model)의 약물 방출 특성을 분석하기 위하여 메신저 리보핵산(mRNA) 발현이 평가되었다. 샘플을 추출하기 위해 BioMasher-II (Optima, Tokyo, Japan)가 사용되었다. Grinded sample에 TRIsure (Bioline, London, UK)를 첨가한 후 혼합물을 격렬하게 흔들어 RNA가 추출되었다. HelixCriptTM Thermo Reverse Transcriptase (Nanohelix, Daejeon, South Korea) 및 Biometra Professional TRIO Thermo-cycler를 사용하여 각 RNA 샘플(Analytik Jena AG, Jena, Germany)의 cDNA가 생성되었다. Roche SYBR Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix, 프라이머(Roche Diagnostics GmbH), 및 light cycler 480 II를 사용하여 cDNA가 증폭되었다. mRNA 발현을 정량화 하기 위해, 참고 유전자인 human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)이 ΔΔCt 기법으로 정규화되었다.

[0084] **11. Statistical analysis**

[0085] The results are shown as means ± standard deviation (SD). Origin 2020 software (Origin lab, Northampton, MA, USA)를 사용하여 데이터가 분석되었으며, t-test 검정을 사용하여, 연구 결과가 분석되었다. 통계학적 유의미는 *p<0.05, **p<0.01, ***p <0.005으로 표기되었다.

[0087] **<실험 결과>**

[0088] **1. 조각난 지방조직 바이오잉크 제조(Preparation of fragmented adipose tissue bio-ink)**

[0089] 유방암 주변에 위치한 지방조직을 체외 모델로 구현하기 위해, 지방조직 유래 세포들과 ECM으로 구성된 FAT-ink가 개발되었다(도 1(a)). Home-made 조직 마이크로노아저를 이용하여 SD rat 유래 지방 조직이 약 280 μm 크기의 입자로 소형화되었다(도 1(b)). 이후, 미분화된 지방 조직 입자를 콜라젠/알긴산염 기반 bio-ink와 섞어 FAT-ink가 준비되었다. Live/dead staining 결과 FAT-ink는 미세화(micronization) 공정을 거쳤음에도 원시 지방 조직과 유사하게 약 82%의 세포 생존율을 보여주었다(도 1(c)). 또한, FAT-ink에는 지방 조직의 이종(heterogeneous) 세포 구성과 ECM이 잘 보존되어 있음이 확인되었다(도 1(d)). Masson's trichrome staining

결과, FAT-ink에는 지방세포와 혈관조직 그리고 콜라겐이 포함된 결합 조직(connective tissue)이 원시 지방 조직과 유사한 형태로 잘 보존되어 있는 것이 관찰되었다. Immunostaining 결과에서는 FAT-ink에 원시 조직(native tissue)과 유사하게 지방 조직을 구성하는 대표적인 cell type인 페리리핀 발현 지방세포, CD31 발현 내피세포, 비멘틴 발현 섬유아세포 및 SSEA4 발현 지방유래 줄기세포(perilipin-expressing adipocytes, CD31-expressing endothelial cells, vimentin-expressing fibroblasts, 및 SSEA4 expressing adipose-derived stem cells)가 잘 보존되어 있는 것이 확인되었다. 이러한 결과들을 통해, 본 발명에서 개발된 the FAT-ink에는 원시 지방 조직의 ECM과 이종 세포 집단(heterogeneous cell population)을 잘 보존하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] **2. 유방암 스페로이드와 지방 조직 구조물의 공동-인쇄 공정(Co-printing process of breast cancer spheroid 및 adipose tissue construct)**

[0092] 복합 조직 모델의 제작을 위해 FAT-ink 및 cancer-ink의 공동-프린팅(co-printing) 공정이 구축되었다(도 2(a)). 먼저, FAT-ink와 cancer-ink의 유변학적 성질(rheological property)이 측정되었다. 그 결과, 두 잉크 모두 shear rate가 증가할수록 점도가 감소되는 전단 묽어짐 특성(shear thinning property)을 지닌 것이 관찰되었다(도 2(b) 및 (c)). Cancer-ink는 젤라틴 농도가 30 mg/ml에서 50 mg/ml로 증가할수록 점도도 점차적으로 증가하였다(도 2(b)). 50 mg/ml 젤라틴을 포함하는 Cancer-ink는 30 mg/ml의 잉크보다 약 2.6-6.8배 높은 점도를 보여주었다. FAT-ink의 주요 성분인 AT micro-particles의 농도도 점도에 직접적인 영향을 주었다. AT micro-particles의 농도가 높아질수록 FAT-ink의 점도도 점차적으로 상승하였다(도 2(c)).

[0093] 암 스페로이드의 가공 공정 구축을 위해, 본 발명자는 cancer-ink의 젤라틴 농도와 FAT-ink의 지방 조직 입자 농도 변화가 프린팅 되는 암 스페로이드의 형태에 미치는 영향을 살펴보았다. 10% v/v 및 20% v/v의 지방 조직 입자를 지닌 FAT-ink 그룹들을 이용한 스페로이드 프린팅 결과, 40 mg/ml 젤라틴 농도에서는 유방암 세포가 둥근 스페로이드 형태로 프린팅 되는 것이 관찰되었다(도 2(d)). 반면, 30 mg/ml 및 50 mg/ml의 젤라틴 농도 조건에서는 원형의 암 스페로이드가 프린팅 되지 못하였다. 40 %v/v의 지방 조직 입자 그룹에서는 적용된 모든 젤라틴 농도 조건에서 원형의 암 스페로이드가 형성되지 못하였다. Roundness of printed spheroid를 측정한 결과, 20% v/v 지방 조직 입자 이하의 농도 조건에서는 젤라틴 농도가 40 mg/ml일 때 가장 높은 roundness를 보였다(도 2(e)). 반면, 40% v/v의 AT particle 농도를 지닌 잉크에서는 젤라틴 농도 변화가 roundness에 큰 영향을 주지는 못했다. 실험된 그룹들 중 20% v/v 지방 조직 입자와 40 mg/ml 젤라틴 농도 조건의 바이오 잉크에서 가장 우수한 spherical 형태의 스페로이드가 프린팅 되었다. 도 2(f)는 roundness 데이터를 이용하여 계산된 CoV(coefficient of variation)을 보여주고 있다. CoV는 가공반복성을 대변하며, CoV가 높다는 것은 낮은 반복성을 의미한다. 그래프에서 볼 수 있는 것처럼, FAT-ink 내 지방 조직 입자의 농도가 높아질수록 CoV가 높아졌으며, 50 mg/ml의 젤라틴을 함유한 잉크 그룹들이 가장 높은 수치를 보여주었다. 이러한 결과들을 바탕으로 Cancer-ink 중 40 mg/ml의 젤라틴과 FAT-ink 중 20 %v/v의 지방 조직 입자가 후속 실험을 위하여 선정되었다. 마지막으로, 선정된 두 잉크를 통해 암 스페로이드로 구성된 freeform micro-pattern의 제작이 가능한지 살펴보았다. 도 2(g)는 선정된 FAT ink(Micronized fat tissues were labelled with BODIPY; Green) 및 MCF-7 함유 cancer-ink(MCF-7 cells were labelled with RFP; Red)로 제작된 'UNIST' letter를 보여주고 있다. 그림에서 볼 수 있는 것처럼, ~100 μm 스케일의 정밀도로 암 스페로이드와 지방 조직의 정밀 co-printing이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0095] **3. 바이오프린팅 복합모델을 이용한 암과 지방조직 모델의 상호작용 규명 (Investigation of the interaction between cancer 및 adipose tissue model with bioprinted composite model)**

[0096] 프링트된 암 스페로이드 및 지방 조직 사이의 상호작용을 조사하기 위하여, 두 가지 mono-culture models(adipose tissue 및 cancer spheroid models, respectively)과 co-culture model이 제작되었다(도 3(a)). FAT-ink와 cancer-ink의 co-printing을 통하여 모델들을 제작한 후, live/dead staining이 수행되었다(도 3(b) 및 (c)). 그 결과 7일을 기준으로 제작된 모델들이 보유한 지방 조직과 암 스페로이드가 모두 90%이상은 높은 생존율을 지니고 있음이 확인되었다. 그 후, 지방 조직에 대한 지방분해, 암관련지방세포(CAA) 마커 발현, 아디포카인 분비lipolysis, cancer-associated adipocyte (CAA) marker expression, adipokines secretion)의 분석을 통하여 유방암 스페로이드(breast cancer spheroid)가 복합조직 모델에 미치는 영향을 분석하였다. 모델에 대한 BODIPY staining 결과 mono-culture 모델에서는 지방세포가 7일동안 형태 및 크기가 비교적 잘 유지되

는 반면, adipose tissue-cancer spheroid co-culture 모델에서는 7일동안 lipid 사이즈가 약 28.6% 감소된 것이 확인되었다(도 3(d)). 이러한 결과들은 co-culture 모델에서 암 스페로이드에 의하여 지방세포의 지방 분해(lipolysis)가 유의미하게 진행되고 있음이 나타난다. 암-관련 지방세포 마커(UCP-1, resistin, 및 IL-6)와 페리리핀 마커를 이용한 면역 염색(immunostaining)이 수행되었다. 그 결과, co-culture 모델에서는 지방세포에 UCP-1, 레지스틴, 및 IL-6 marker 들이 잘 발현되는 것이 확인되었다(도 3(e)). 반면, 지방 조직 mono-culture 모델 내 지방세포에서는 암-관련 지방세포 마커들이 발현이 관찰되지 않았다. 마지막으로 ELISA를 이용하여 각 모델들의 아디포카인(adiponectin, resistin 및 leptin) 분비가 측정되었다. 그 결과 배양 7일차를 기준으로 지방 조직 및 cancer spheroid co-culture model은 지방 조직 mono-culture 모델에 비하여 아디포넥틴 분비는 8% 감소한 반면, 렙틴과 레지스틴 분비는 각각 2.3- 및 1.5-배 증가하였다(도 3(f)). 분석을 통하여 알게 된 지방 세포의 지방분해, CAA-마커 발현, 변화된 아디포카인 분비는 co-culture 모델에서 지방조직과 암 스페로이드 간에 활발한 상호작용이 있음을 나타낸다. 흥미롭게도, 그러한 변화들은 cancer-associated adipocyte에 나타내는 대표적인 특징들과 매우 유사했다.

[0097]

유방암 표준 함암제인 독소루비신을 이용하여 제작된 mono- 및 co-culture models의 약물 반응을 살펴보았다. 독소루비신을 처리한 후, 암 세포(cancer cells)들의 이동 영역(migration area)을 측정한 결과 지방 조직 및 cancer spheroid co-culture model은 mono-culture 모델 대비 약 1.92배 증가된 이동 영역을 보여주었다(도 3(g)). 세포 증식 측정에서도 이동 영역과 유사한 결과가 관찰되었다. 7일차를 기준으로 relative cell proliferation이 co-culture model이 mono-culture model에 비하여 약 2.4배 높게 나타났으며, 통계적 유의성도 확인되었다(도 3(h)). 이러한 결과는 co-culture model이 mono-culture model 보다 더 높은 독소루비신 저항성을 지니고 있음을 나타낸다. 이러한 경향성은 RT-qPCR 결과에서도 확인되었다. Co-culture 모델은 mono-culture 모델 대비 ABCB1, ABCG2, ABCG2와 같은 약물 배출 관련 유전자의 발현이 각각 2.51배, 6.45배, 3.69배 높게 나타났다(도 3(i)). 이 결과들을 통하여 지방 조직 및 암 모델 사이의 파라크린 간섭(paracrine interaction)을 통해, 암세포의 이동과 독소루비신 저항성이 증가된다는 을 확인할 수 있었다.

[0099]

4. 암과 지방조직 모델 사이의 거리 효과(Effect of distance between cancer 및 adipose tissue model)

[0100]

바이오 프린팅을 통해 지방 조직과 암 스페로이드 사이의 거리가 조절된 복합 조직 모델들이 제작되었다(도 4(a)). 암 스페로이드가 지방 조직 내에 위치한 침투 그룹(infiltration group) 그리고 두 모델 사이에 거리가 조절된 접촉, 1 mm, 및 2 mm groups이 제작되었다(도 4(b)). 먼저, 제작된 복합 조직 모델들의 독소루비신 저항성(resistance)을 살펴보았다. 흥미롭게도 도 4(c)에서 보는 것처럼 두 조직들이 가까워질수록 상대적인 세포 증식(relative cell proliferation)이 증가하였다. 배양 7일차를 기준으로 침투 그룹은 2 mm 그룹대비 약 1.9 배 높은 상대적인 세포 증식을 나타내고, 통계적 유의성 또한 확인되었다. 이는 독소루비신 저항성이 크게 높다는 것을 나타낸다. 이러한 경향성은 3D migration assay 결과에서도 확인되었다. 두 조직 사이에 거리가 좁아질수록 이동 영역이 증가하는 것이 형광 이미지 및 정량 평가 결과에서도 관찰되었다(도 4(d) 및 (e)). 배양 48 hours를 기준으로 침투 그룹은 2 mm 그룹대비 약 1.82배 높은 이동 영역을 보여주었다. 뿐만 아니라 이동(migration)이 되는 방향에서도 유의미한 결과가 관찰되었다(도 4(f)). 암 스페로이드가 지방 조직 내에 위치한 침투 그룹에서는 이동 방향성에 대한 경향성이 없었지만, 다른 그룹에서는 조직 간 사이 거리가 좁아질수록 지방 조직 방향으로의 편향 이동(skewed migration)이 크게 활성화되는 것이 확인되었다.

[0101]

제작된 모델들의 아디포카인 분비 측정에서도 약물 반응/3D 이동 분석 결과와 유사한 경향성들이 관찰되었다. 복합 모델들에서 분비된 아디포카인(leptin, adiponectin, 및 resistin)의 양을 측정되었다(도 4(g)). 암 스페로이드와 지방 세포 사이에 거리가 멀어질수록 아디포넥틴 분비가 증가하였으며, leptin과 resistin은 두 조직 간 거리가 가까울수록 유의미하게 증가하였다(도 4(g)). Infiltration과 contact 그룹은 1 mm와 2 mm 그룹보다 각각 1.35-배 높은 렙틴(leptin) 및 1.69-배 높은 레지스틴(resistin) 분비를 보여주었다. 아디포카인 분비 특성과 암 모델의 약물 반응 및 이동 양상 사이의 상관관계는 지방 조직에서 분비되는 아디포카인에 의하여 암세포 행동 특성이 조절된 것으로 사료된다. 이러한 결과들을 통하여 지방 조직과 암 스페로이드 사이의 거리 조절을 통하여 두 조직 사이의 파라크린 간섭(paracrine interaction)의 활성 정도를 조절할 수 있다는 것이 확인되었다.

[0103]

5. 아디포카인 표적 약물에 대한 복합모델의 유효성(The effectiveness of the composite model on adipokine-targeted drugs)

[0104]

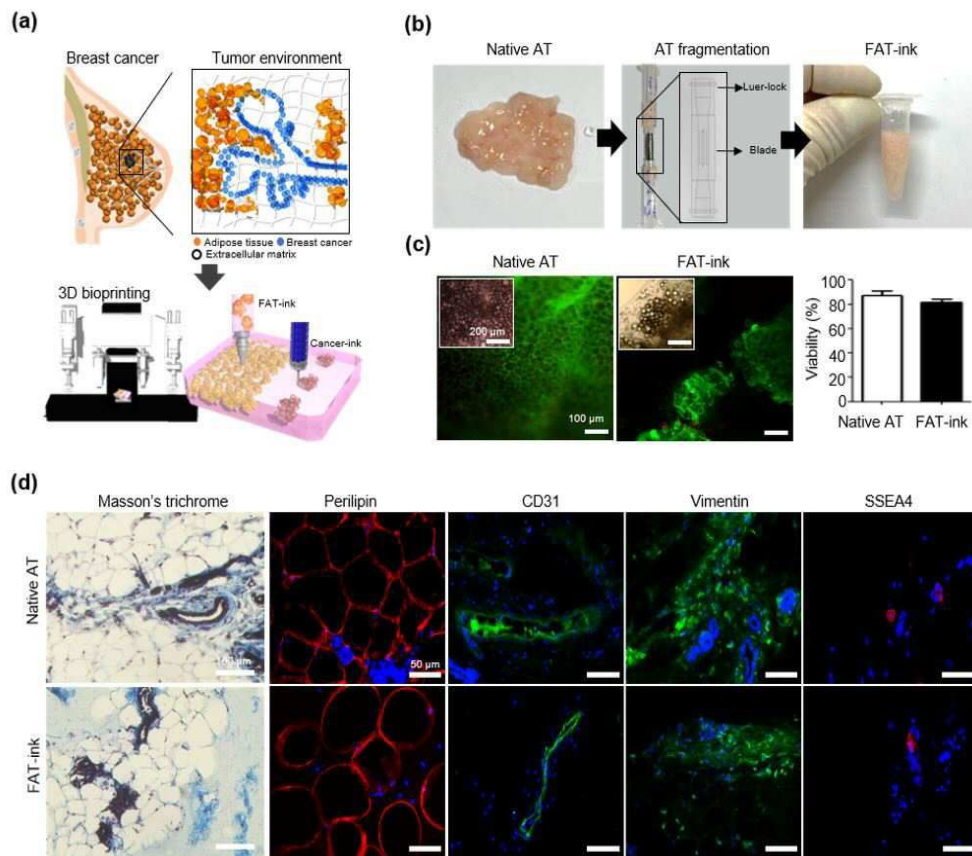
암 조직에 대하여 아디포카인-관련 경로(resistin, leptin, 및 adiponectin)를 표적 하는 대표적 세가지 약물들(C-compound/SC 600125, AG490, 및 Metformin) 이용하여 암/지방 복합 조직 모델의 효용성을 평가하였다(도 5(a)). 암 스펙트로이드가 지방 조직 내에 위치한 침투 그룹과 두 모델 사이의 거리가 2 mm 그룹에 세가지 약물들을 처리한 후, 복합 조직 모델로 3D 이동 분석과 세포 증식 평가가 수행되었다. 흥미롭게도 도 2(b)의 형광 이미지에서 보는 것처럼 세가지 아디포카인 표적 약물에 의한 암 이동의 억제 효과가 2 mm 모델 보다 침투 모델에서 높게 나타났다(도 5(b)). 그 형광 이미지를 바탕으로 측정된 이동 영역에서 그러한 경향성은 더욱 명확하게 관찰되었다(도 5(c)). 이동 영역 측면에서, 2 mm 그룹에서는 레지스틴 표적 약물인 C-compound/SC600125 (SC)에 의해 no drug group 대비 이동 영역이 약 30.3% 감소된 반면, AG와 MET에 의해서는 유의미한 감소가 관찰되지 않았다. 반면, 침투 그룹에서는 SC, AG, 및 MET에 의하여 no drug 그룹 대비 이동 영역이 각각 52.3%, 38%, 및 34.7% 감소하였으며, 통계적 유의성 또한 확인되었다. 이러한 3D 이동 분석 결과는 아디포카인 표적 약물에 의한 암 성장 억제 결과와도 일치하였다(도 5(d)). 그래프에서 볼 수 있는 것처럼, 아디포카인 표적 약물에 대한 암 성장 억제 효과가 2 mm 그룹 보다 침투 그룹에서 높게 나타났다. 2-mm-distance 복합 모델은 7일차를 기준으로 SC 약물에 의하여 증식이 약 18% 억제된 반면, AG 와 MET에 의해서는 증식 감소가 전혀 관찰되지 않았다. 반면, 침투 그룹에서는 증식이 비투여 그룹 대비 SC, AG, 및 MET 약물들에 대해 각각 약 32%, 16%, 및 23% 감소되었다. 이와 같이 침투 그룹에서는 모든 약물에 대하여 유의미한 증식 억제 효과를 보여주었을 뿐만 아니라, 그 감소 폭 또한 2 mm 그룹보다 더 컸다. 이러한 경향은 아디포카인 표적 약물이 지방 조직과 암 조직의 상대적 위치가 가까울수록 효과적일수 있음을 나타낸다. 이러한 결과들을 바탕으로 본 발명에서 개발된 암/지방 복합 조직 모델이 암 연구와 신약 평가를 위한 in-vitro model로써 높은 활용성을 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

[0106]

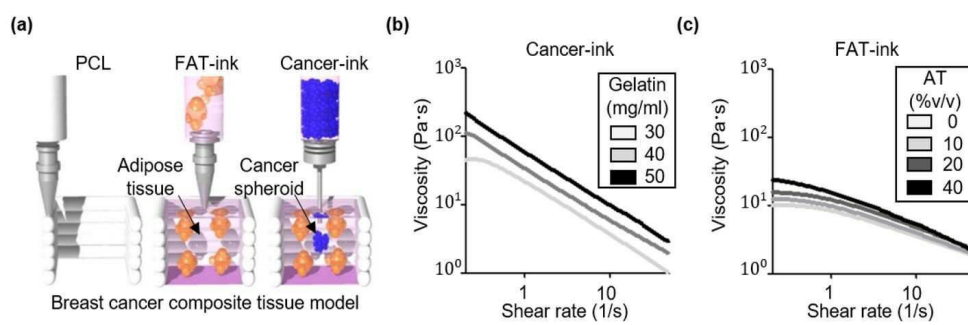
이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

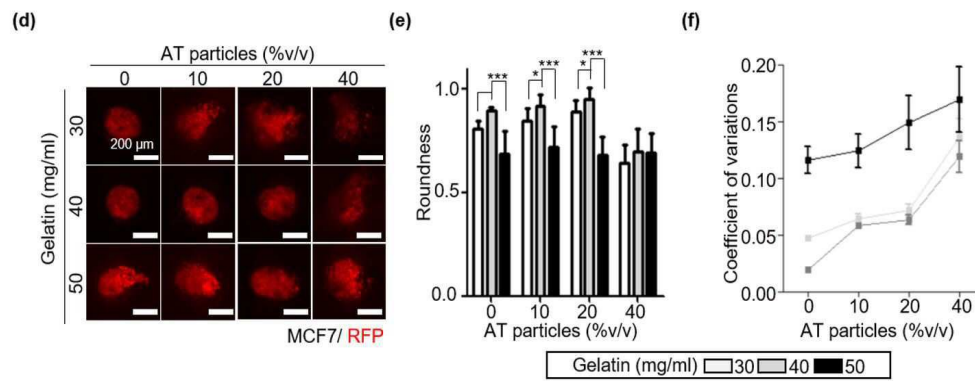
도면1



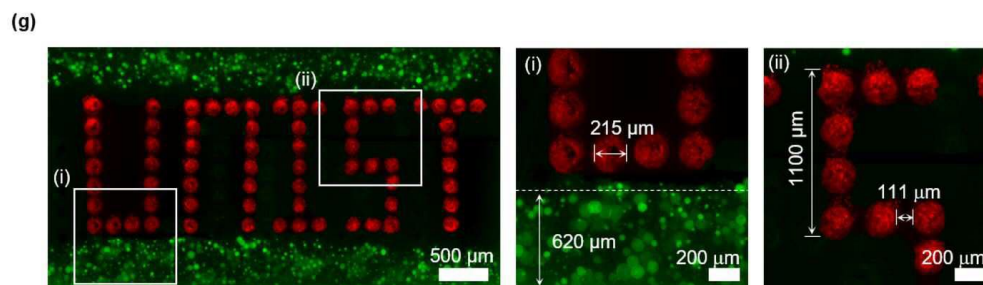
도면2abc



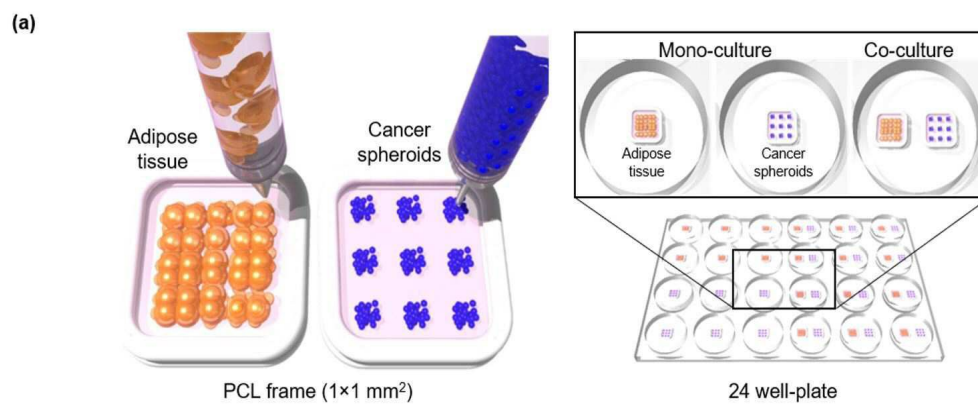
도면2def



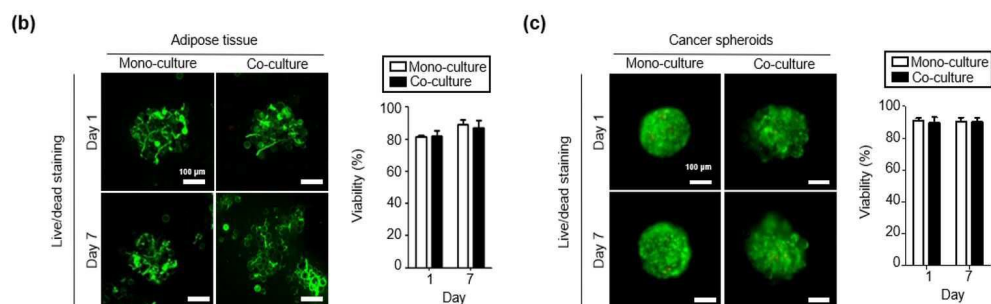
도면2g



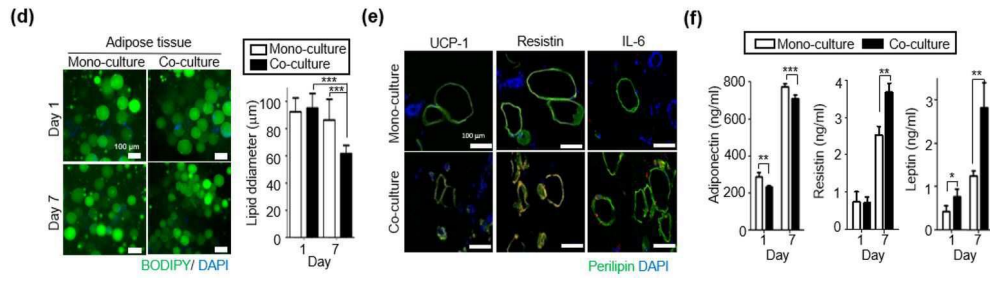
도면3a



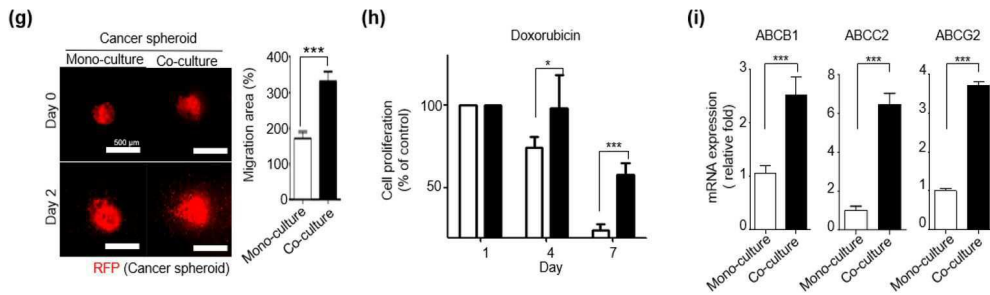
도면3bc



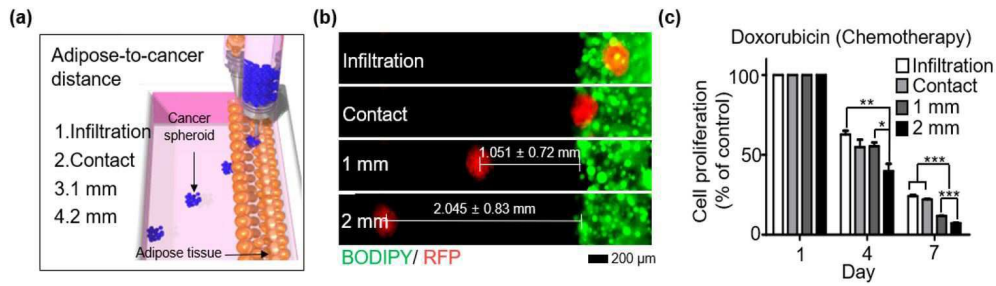
도면3def



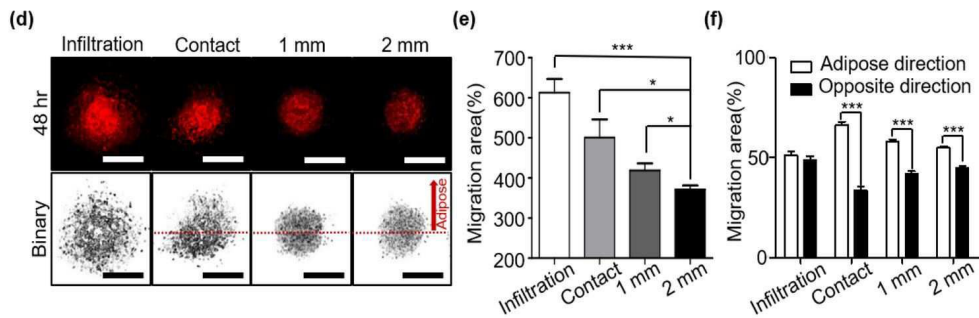
도면3ghi



도면4abc

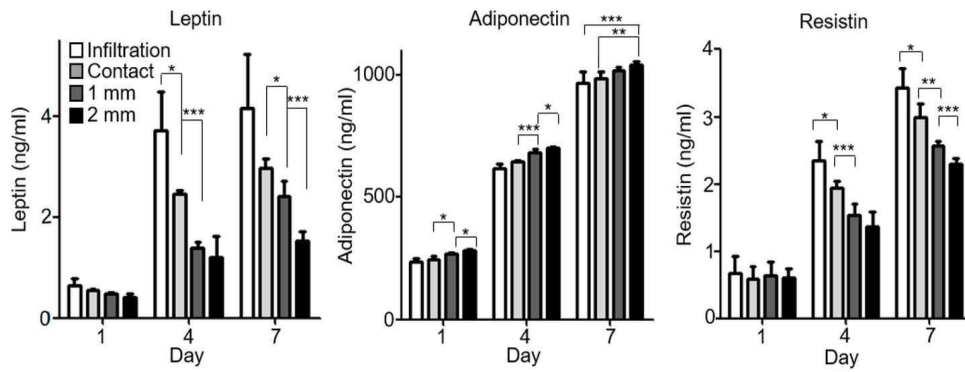


도면4def



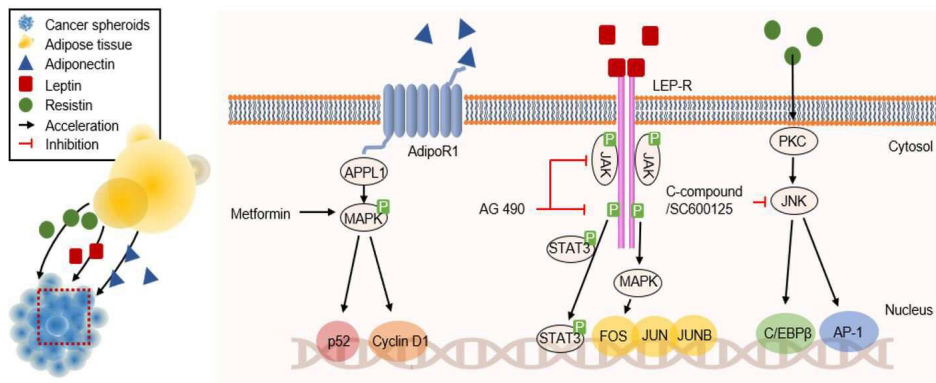
도면4g

(g)



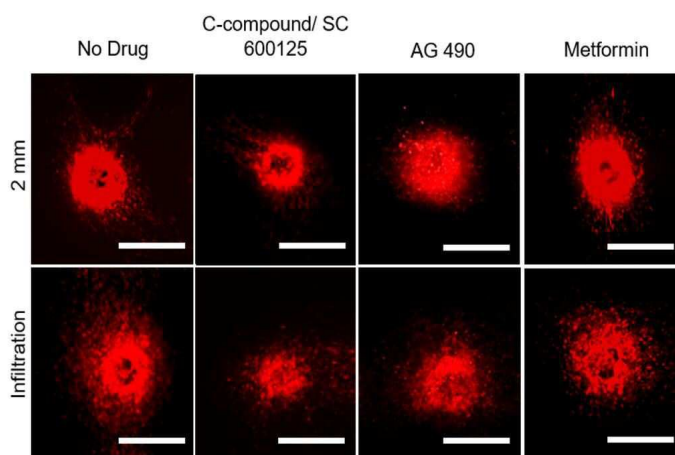
도면5a

(a)

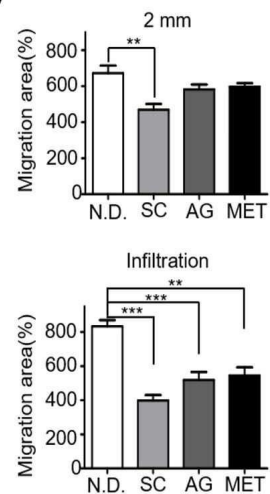


도면5bc

(b)



(c)



도면5d

(d)

