

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 4월 4일 (04.04.2019)



(10) 국제공개번호

WO 2019/066488 A2

(51) 국제특허분류:

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

B33Y 10/00 (2015.01)

B33Y 70/00 (2015.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/011420

(22) 국제출원일:

2018년 9월 27일 (27.09.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0124934 2017년 9월 27일 (27.09.2017) KR

(71) 출원인:

한양대학교

산학협력단

(IN-

DUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763
서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자:

이동윤 (LEE, Dong Yun); 06000 서울시 강남구 압구정로 113, 28동 1701호(압구정동, 미성아파트), Seoul (KR). 이선재 (LEE, Seon Jae); 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 공과대학 생명공학과 ITBT관 11층 1110호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM);

06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국

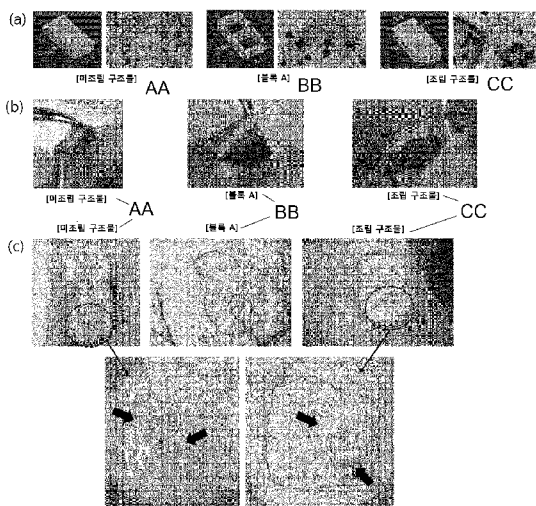
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역

내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: CELL-ENCAPSULATED HYDROGEL BLOCK PREPARATION FOR 3D BIOPRINTING-BASED TISSUE ENGINEERING AND MACROSTRUCTURE ASSEMBLY TECHNOLOGY THEREOF

(54) 발명의 명칭: 3D 바이오프린팅 기반 조직공학을 위한 세포-봉입한 하이드로젤 블록 제작 및 이의 거대구조체 조립화 기술



AA ... Non-assembly structure
BB ... Block A
CC ... Assembly structure

(57) Abstract: A three-dimensional hydrogel scaffold of the present invention contains a cell to be transplanted in vivo and comprises a first hydrogel block on which a plurality of holes are formed and one or more second hydrogel blocks which are assembled to the holes and are biodegradable. A large hydrogel scaffold can be prepared by means of the assembly of the blocks. The survivability of the cell being transplanted is high and the biodegradability of the blocks varies, and thus the risk of hypoxia is reduced.

(57) 요약서: 본 발명의 3차원 하이드로젤 지지체(scaffold)는 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하고, 복수개의 구멍이 형성되어 있는 제1 하이드로젤 블록과 상기 구멍에 조립되고, 생분해성을 갖는 하나 이상의 제2 하이드로젤 블록을 포함하며, 블록의 조립을 통하여 큰 크기의 하이드로젤 지지체를 제작할 수 있고, 이식되는 세포의 생존율이 우수하며, 블록들의 생분해성이 상이하므로 저산소증 발생 위험이 감소한다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/066488 A2



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 흑백; 출원 시의 국제출원에 색상 또는 회색 톤이 포함되어 있으며 PATENTSCOPE에서 다운로드 가능

명세서

발명의 명칭: 3D 바이오프린팅 기반 조직공학을 위한 세포-봉입한 하이드로젤 블록 제작 및 이의 거대구조체 조립화 기술

기술분야

- [1] 본 발명은 3D 바이오 프린팅 기반 조직공학을 위한 세포-봉입한 하이드로젤 블록 제작 및 이의 거대구조체 조립화 기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 우리나라를 포함한 전 세계적으로 체내에 손상된 장기나 조직을 재생 및 대체하기 위하여 장기 및 조직 이식이 증가하고 있는 추세이다. 하지만, 장기이식을 위한 기증자 부족은 점점 증가하고 있고, 이로 인해 장기 및 조직 이식이 원활하게 진행되지 못하고 있다. 따라서 이를 해결하기 위하여 인공 조직 및 장기를 개발하려는 연구가 수행되고 있다. 일반적으로 인공 조직 및 장기를 개발하기 위하여 세포 봉입화(Cell macro-encapsulation), 전기방사법(electrospinning), 마이크로몰딩(Micromolding), 리소그래피(lithography) 등을 사용한 3차원 지지체(scaffold)를 제작하고 있다. 또한, 제작하고자 하는 조직 및 장기에 적합한 세포를 3차원 지지체에 주입하고, 주입된 세포에 적절한 배양 환경을 제공하여 최종적인 인공 조직 및 장기를 제작하는 방법이 사용되고 있다.
- [3] 3D 바이오프린팅(bioprinting)은 적층형식을 통해 세포 및 이와 상호작용을 하는 생체 적합한 물질을 특정한 곳에 위치시켜 3차원 구조물(construct)을 제작할 수 있다. 복잡하고 세밀한 3차원 구조물 제작에 한계가 있는 기존의 제작법들과 달리, 3D 바이오프린팅은 본 한계점을 극복할 수 있는 기술로서 인공 조직 및 장기 개발의 차세대 선두주자로 대두되고 있다.
- [4] 3D 바이오프린팅을 통해 제작된 인공 조직 및 장기를 실제 임상에 적용시키기 위해서는 3차원 구조물의 크기를 증가시켜야 한다. 그러나 3차원 구조물의 크기가 커지면 제작 공정이 길어지고, 3D 바이오 프린팅 내에 세포의 머무름 시간이 길어진다. 이에 따라 세포의 생존율 및 기능성이 저하될 우려가 있고, 제작하고자 하는 인공 조직 및 장기의 기능이 원활하지 못하게 된다. 또한, 인공 조직 및 장기를 만들기 위해 보편적으로 사용되는 기술인 세포 봉입화 방법의 경우, 생체 적합한 하이드로젤(hydrogel)에 봉입된 세포에 저산소증(hypoxia)이 발생할 수 있다는 문제가 있다.
- [5] 따라서, 인공 조직 및 장기 문제를 해결하기 위해서는 구조물의 크기는 증가시키면서 세포에 저산소증을 발생시키지 않는 3차원 구조물을 개발하는 것이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하는 제1 하이드로젤 블록 및 제2 하이드로젤 블록을 포함하고, 상기 제1 하이드로젤 블록과 제2 하이드로젤 블록은 서로 조립되고, 생분해성이 상이한 3차원 하이드로젤 지지체(scaffold) 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하는 제1 하이드로젤 블록; 및 제2 하이드로젤 블록을 포함하고, 상기 제1 하이드로젤 블록과 상기 제2 하이드로젤 블록은 서로 조립되고, 생분해성이 상이한 3차원 하이드로젤 지지체(scaffold)를 제공한다.
- [8] 본 명세서에 사용된 용어, '하이드로젤(hydrogel)'은 수화젤이라고도 하며, 수용성 고분자가 물리적, 예를 들어 수소결합, 반데르 발스 힘, 소수성 상호작용, 고분자의 결정 또는 화학적(공유결합)인 결합에 3차원의 친수성 고분자 망상 구조를 가진 물질을 의미한다. 하이드로젤의 재료로 사용되는 천연고분자는 천연물질, 동물, 인체에서 유래한 고분자로서 매우 우수한 생체적합성을 갖고 있다. 따라서 천연고분자로 제작된 하이드로젤은 생체에 이식 후 염증반응이 적을 뿐만 아니라 뛰어난 생체 기능성과 생분해성을 제공할 수 있다.
- [9] 본 명세서에 사용된 용어, '하이드로젤 블록'은 3차원 하이드로젤 지지체를 조립하기 위하여 하이드로젤로 만들어진 구성 단위를 말하며, 제작하고자하는 3차원 하이드로젤 지지체의 디자인, 크기 및 형태 등에 따라 다양한 형태 및 크기를 갖는 하이드로젤 블록이 복수개 존재할 수 있다.
- [10] 본 명세서에 사용된 용어, '제1 하이드로젤 블록' 또는 '제2 하이드로젤 블록'은 서로 다른 특성을 갖는 하이드로젤 블록을 구분하기 위하여 명명한 것으로, 상기 명칭에 의하여 본 발명의 실시가 제한되지 아니한다. 또한, 하이드로젤 블록을 구성하는 물질, 하이드로젤 블록 내부에 봉입되는 물질에 따라 '제1' 또는 '제2' 등의 용어는 상호 변경되어 사용될 수 있다.
- [11] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록은 홀(hole)이 형성된 것일 수 있으며, 상기 홀은 복수 개 형성될 수 있고, 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록을 관통하여 형성될 수 있다. 상기 홀은 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록이 다른 하이드로젤 블록에 조립되는 공간을 제공한다.
- [12] 본 명세서에 사용된 용어, '홀(hole)'은 하이드로젤 블록에 함입되어 형성된 오목한 공간 또는 하이드로젤 블록에 관통되어 형성된 빈 공간을 의미한다.
- [13] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록은 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하고 있으며, 함유된 세포가 생체 내에 생착할 때까지 세포를 지지하는 역할을 한다. 상기 제1 하이드로젤 블록은 알지네이트, 헤파린, 히알루론산, 콜라겐 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 고분자 또는 이들의 혼합물로 이루어질 수 있으며, 예를 들어 알지네이트로 이루어질 수

있다.

- [14] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록에 함유되는 세포는 이식 목적에 부합하는 것이면 제한없이 사용할 수 있고, 세포 스페로이드(spheroid, 구상체) 형태로 함유될 수 있다. 또한, 하이드로젤 블록에 함유되는 세포의 부피에 비하여 하이드로젤 블록의 부피가 현저히 크기 때문에 상기 세포는 농도와 무관하게 하이드로젤 블록에 함유될 수 있다.
- [15] 한편, 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록은 성장인자를 함유할 수 있다. 하이드로젤 내에 성장인자를 단순히 봉입시키는 경우, 하이드로젤 내부의 기공으로 성장인자가 방출되므로 하이드로젤과 성장인자를 접합시켜 성장인자의 방출을 방지할 수 있다. 예를 들어 콜라겐 결합 도메인(collagen binding domain, CBD)을 포함하는 콜라겐(type 1) 하이드로젤 블록을 제작하고, CBD와 결합할 수 있는 링커(linker)와 연결된 성장인자를 접착시킴으로써 제1 또는 제2 하이드로젤 블록 내부에 성장인자를 봉입시킬 수 있다.
- [16] 본 발명에서, 상기 성장인자는 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 섬유아세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, FGF), 전환성장인자(Transforming growth factor beta, TGFbeta), 혈소판유래증식인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 혈관내피세포증식인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 인슐린 유사 성장인자(Insulin-like growth factor 1, IGF-1), 티오레독신(Thioredoxin, TRX), 줄기세포인자(Stem cell factor, SCF), 간세포 증식인자(Hepatocyte growth factorHGF), 인간 성장 호르몬(Human Growth Hormone, GH) 및 엔지오제닌(Angiogenin)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [17] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제2 하이드로젤 블록은 제1 하이드로젤 블록과 조립되어 3차원 하이드로젤 지지체의 기계적 물성을 향상시키는 역할을 한다. 제1 하이드로젤 블록의 홀에 상응하는 돌출부를 통하여 제1 하이드로젤과 조립되거나 또는 제2 하이드로젤 블록 자체가 제1 하이드로젤 블록의 홀에 상응하는 형태를 가짐으로써 제1 하이드로젤과 조립될 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 구체예에서, 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록은 도넛 형태 또는 격자 형태를 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 하이드로젤 블록이 도넛 형태이면, 제2 하이드로젤 블록은 도넛 형태의 빈 공간에 조립되는 형태를 가질 수 있다. 제1 하이드로젤 블록이 격자(lattice) 형태이면, 제2 하이드로젤 블록은 격자 사이의 빈 공간에 조립되는 형태를 가질 수 있으며, 제1 하이드로젤 블록에 복수 개 조립될 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제2 하이드로젤 블록은 알지네이트, 헤파린, 히알루론산, 콜라겐 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 고분자 또는 이들의 혼합물로 이루어질 수 있으며, 예를 들어 알지네이트와 콜라겐의 혼합물로 이루어질 수 있다.

- [20] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록과 제2 하이드로젤 블록은 상이한 생분해성을 가질 수 있으며, 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하는 제1 하이드로젤 블록이 늦게 분해되고, 제2 하이드로젤 블록이 먼저 분해될 수 있다. 예를 들어, 제1 하이드로젤 블록은 함유하고 있는 세포가 생체 내에 생착할 수 있도록 30일 이상 구조가 유지될 수 있고, 제2 하이드로젤 블록은 제1 하이드로젤 블록으로의 혈관 생성 및 산소 공급을 촉진할 수 있도록 2일 내지 14일 이내에 분해될 수 있다.
- [21] 따라서, 상기 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤은 생분해성을 조절하기 위하여 하이드로젤의 성분 및/또는 농도가 상이할 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 홀은 제1 하이드로젤 블록에 함입되어 형성되거나 또는 관통하여 형성될 수 있고, 하나 이상 형성될 수 있다. 상기 홀은 제2 하이드로젤 블록이 조립될 수 있는 공간을 제공하며, 제1 하이드로젤 블록의 표면적을 넓힘으로써 블록 내부로 산소가 통할 수 있도록 한다.
- [23] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 3차원 하이드로젤 지지체를 생체 내에 이식하는 경우 제1 하이드로젤 블록과 제2 하이드로젤 블록의 생분해성이 상이하므로 제2 하이드로젤 블록이 먼저 분해되고, 제1 하이드로젤 블록으로 혈관 생성 및 산소 공급이 촉진되어 결과적으로 이식된 세포의 생착율 및 생존율을 증가시킬 수 있다.
- [24]
- [25] 본 발명의 다른 양상은 (a) 생분해성 제1 하이드로젤 용액과 세포의 혼합액을 3차원 바이오프린팅으로 출력하여 제1 하이드로젤 블록을 제작하는 단계; (b) 생분해성 제2 하이드로젤 용액을 3차원 바이오프린팅으로 출력하여 제2 하이드로젤 블록을 제작하는 단계; 및 (c) 제1 하이드로젤 블록과 제2 하이드로젤 블록을 조립하는 단계를 포함하는 3차원 하이드로젤 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [26] 본 명세서에 사용된 용어, '3차원 바이오프린팅(bioprinting)'은 3차원 프린팅의 기술의 하나로 적층형식을 통해 세포 및 이와 상호작용을 하는 생체 적합한 물질을 특정한 곳에 위치시켜 3차원 구조물을 제작하는 기술이다. 현재 피부나 장기, 뼈 이식의 경우 대부분 기증을 받아서 사용하나, 이식의 경우 적합한 조직이나 장기를 찾기가 어려우며 이식 받더라도 자가면역 반응에 의한 문제점이 많다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 생분해성, 생체적합성을 가진 고분자 물질을 이용하여 인공 뼈, 인공 혈관, 인공 피부, 인공 장기 등 다양한 인공 대체물을 제작하는 연구가 이루어지고 있다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법은 (a) 및 (b) 단계 이후에 출력된 하이드로젤 블록을 경화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 경화시키는 단계는 출력된 하이드로젤 블록을 마그네슘 이온(Mg^{2+}), 칼슘 이온(Ca^{2+})과 같은 2가 양이온을 포함하는 용액에 담궈 수행할 수 있으며, 예를 들어 염화칼슘 용액을 사용할 수 있다.

- [28] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액은 알지네이트, 헤파린, 히알루론산, 콜라겐 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 고분자가 용해된 용액으로, 고분자들의 혼합 용액을 포함한다.
- [29] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 용액과 제2 하이드로젤 용액은 성분이 서로 상이한 것이 바람직하다. 예를 들어 제1 하이드로젤 용액으로는 알지네이트 용액(0.5 내지 5%(w/w))을 사용할 수 있고, 제2 하이드로젤 용액으로는 알지네이트 용액(0.5 내지 5%(w/w))과 콜라겐 용액(0.5 내지 5 mg/ml)을 1:1(v/v)로 혼합한 용액을 사용할 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록은 홀(hole)이 형성된 것일 수 있으며, 상기 홀은 복수 개 형성될 수 있고, 제1 하이드로젤 블록 및/또는 제2 하이드로젤 블록을 관통하여 형성될 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제1 하이드로젤 블록 및 제2 하이드로젤 블록을 3차원 바이오프린팅으로 출력하는 단계는 제1 및 제2 하이드로젤 블록의 디자인, 성분, 농도 등에 따라 구체적인 출력 조건이 변경될 수 있다. 변경할 수 있는 출력 조건으로는 출력 속도, 압출량, 채움 밀도, 하이드로젤 용액이 출력되는 주사기 노즐의 크기 등이 있다. 예를 들어, 상기 제1 및 제2 하이드로젤 블록은 출력 속도 5 내지 20 mm/s, 압출량 50 내지 100% 및 채움 밀도 50 내지 100% 조건으로 출력될 수 있다.

발명의 효과

- [32] 본 발명의 3차원 하이드로젤 지지체는 블록의 조립을 통하여 큰 크기의 하이드로젤 지지체로 제작될 수 있고, 이식되는 세포의 생존율이 우수하며, 블록들의 생분해성이 상이하므로 세포에 대한 저산소증 발생 위험이 감소한다.

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 (a) 주사기 고정틀의 부품 구조, (b) 주사기 고정틀에 일회용 주사기가 장착된 형태, (c) 배양 접시 고정용 프린팅 베드의 디자인, (d) 제작된 프린팅 베드 및 (e) 프린팅 베드의 사용 모습을 나타낸다.
- [34] 도 2는 (a) 제작된 젤라틴 슬러시 및 (b) 이의 점탄성을 레오미터로 확인한 결과를 나타낸다.
- [35] 도 3은 (a) 격자(lattice) 형태의 3차원 구조물 디자인 및 (b) 이에 따라 제작된 알지네이트 하이드로젤을 나타낸다.
- [36] 도 4a는 오토케드로 디자인한 3차원 구조물을 나타낸다.
- [37] 도 4b는 출력 속도에 따른 3차원 구조물의 형태와 상대적 규격을 확인한 결과를 나타낸다.
- [38] 도 4c는 출력 속도에 따른 3차원 구조물의 절대 규격을 측정한 결과를 나타낸다.

- [39] 도 5a는 서로 다른 압출량으로 출력된 3차원 구조물의 형태를 나타낸다.
- [40] 도 5b는 서로 다른 압출량으로 출력된 구조물의 상대 규격을 측정한 결과를 나타낸다.
- [41] 도 5c는 서로 다른 압출량으로 출력된 구조물의 절대 규격을 측정한 결과를 나타낸다.
- [42] 도 5d는 서로 다른 압출량으로 출력된 구조물의 길이를 측정한 결과를 나타낸다.
- [43] 도 6은 (a) 서로 다른 압출량으로 출력된 3차원 구조물의 모서리 형태 및 (b) 모서리의 규격을 측정한 결과를 나타낸다.
- [44] 도 7a는 오토캐드로 디자인한 3차원 구조물을 나타낸다.
- [45] 도 7b는 서로 다른 채움 밀도 조건으로 출력된 3차원 구조물의 형태를 나타낸다.
- [46] 도 7c는 출력된 구조물의 절대 규격을 측정한 결과를 보여준다.
- [47] 도 8은 (a) 서로 다른 형태로 제작된 3종의 블록, (b) 블록을 조립 구조물로 제작하는 과정 및 (c) 조립 구조물을 서로 다른 RPM으로 진동시킨 결과를 보여준다.
- [48] 도 9는 (a) 서로 다른 형태로 제작된 4종의 블록, (b) 블록을 조립 구조물로 제작하는 과정 및 (c) 조립 구조물을 서로 다른 RPM으로 진동시킨 결과를 보여준다.
- [49] 도 10a는 기계적 물성 측정을 위해 디자인한 3차원 구조물의 형태를 나타낸다.
- [50] 도 10b는 디자인한 구조물에 변형율을 가하여 탄성/점탄성 계수를 측정한 결과를 나타낸다.
- [51] 도 10c는 각 구조물에서 시간에 따른 탄성/점탄성 계수를 측정한 결과를 나타낸다.
- [52] 도 11a는 서로 다른 성분으로 제작한 3차원 구조물의 형태를 나타낸다.
- [53] 도 11b는 시간 경과에 따른 미조립 구조물과 블록 A의 붕괴 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.
- [54] 도 11c는 시간 경과에 따른 조립 구조물의 붕괴 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.
- [55] 도 12는 콜라겐 처리 농도에 따른 조립 구조물의 붕괴 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.
- [56] 도 13은 (a) 오토캐드로 디자인한 3차원 구조물의 형태, (b) 서로 다른 크기의 주사기 노즐로 출력한 구조물의 형태 및 (c) 출력된 구조물의 절대 규격을 측정한 결과를 나타낸다.
- [57] 도 14a는 27G 주사기 노즐로 출력한 3차원 구조물에 포함된 세포의 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.
- [58] 도 14b는 27G 주사기 노즐로 출력한 3차원 구조물에 포함된 세포를 형광 현미경으로 확인한 결과를 나타낸다.

- [59] 도 14c는 7G 주사기 노즐로 출력한 3차원 구조물에 포함된 세포의 생존율을 측정한 결과를 나타낸다.
- [60] 도 15는 (a) 복수의 홀이 형성되어 있는 3차원 구조물의 형태 및 (b) 출력된 3차원 구조물 내에 포함된 세포의 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.
- [61] 도 16a는 세포의 저산소증 발생을 평가하기 위해 디자인한 3차원 구조물의 형태를 나타낸다.
- [62] 도 16b는 출력된 3차원 구조물 내에 포함된 세포의 형태를 확인한 결과를 나타낸다.
- [63] 도 16c 및 도 16d는 출력된 3차원 구조물 내에 포함된 세포에서 활성산소 생성 수준을 확인한 결과를 나타낸다.
- [64] 도 17은 (a) 누드 마우스에 이식한 3차원 구조물의 형태, (b) 누드 마우스에 이식된 3차원 구조물의 모습 및 (c) 이식 30일 후 관찰한 3차원 구조물의 모습을 나타낸다.
- [65] 도 18은 이식한 3차원 구조물을 포함하는 마우스 조직을 분리하여 헤마토실린&에오신 용액으로 염색한 결과를 나타낸다.
- [66] 도 19는 이식한 3차원 구조물을 포함하는 마우스 조직을 분리하여 CD34 항체로 염색한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [67] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [68]
- [69] 실시예 1: 3차원 구조물 제작을 위한 3D 바이오프린팅 기기 부품 제작
- [70] 3D 바이오프린팅 기기에 일회용 1 ml 주사기를 고정시킬 수 있는 고정틀을 오토캐드(AutoCAD)로 디자인하였다. 폴리 락틱산(Poly lactic acid, PLA) 필라멘트를 열처리한 후 고온에서 압출시키고, 상온에서 냉각시켜 최종적으로 PLA로 구성된 주사기 고정틀을 제작하였다.
- [71] 3D 바이오프린팅 기기에 35Φ, 60Φ 및 100Φ 배양 접시를 고정시킬 수 있는 프린팅 베드를 디자인하여 규격에 따라 맞춤 제작하였다. 제작된 주사기 고정틀과 배양 접시 고정용 프린팅 베드(이하, 프린팅 베드로 기재함)를 3D 바이오프린팅 기기에 부착시킨 후 임의의 3차원 구조물을 제작하였다. 그 결과, 상기 주사기 고정틀과 프린팅 베드가 정상적으로 작동하는 것을 확인하였다.
- [72] 도 1은 주사기 고정틀의 부품 구조(a)와 주사기 고정틀에 주사기가 장착된 형태(b), 배양 접시 고정용 프린팅 베드의 디자인(c), 제작된 프린팅 베드(d) 및 프린팅 베드의 사용 모습(e)을 보여준다.
- [73]
- [74] 실시예 2: 젤라틴 슬러시 제작 및 이를 사용한 3차원 구조물 제작

[75] **2-1. 젤라틴 슬러시 제작**

[76] 3차 증류수에 염화칼슘(calcium chloride) 10 mM, 헤페스(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid, HEPES) 10 mM을 첨가하여 용액 I을 제조하였다. 용액 I에 젤라틴(gelatin type A from porcine skin)을 4.5%(w/v) 농도로 용해시켜 젤라틴 용액을 제조하고, 24시간 동안 냉장보관하여 응고시켰다. 응고된 젤라틴 용액에 용액 I을 150 ml 첨가하고, 블랜더(BL311E, Tefal)로 2단계 속도에서 30초 동안 분쇄하였다. 분쇄된 젤라틴 용액을 4°C에서 4000 RPM으로 3분 동안 원심분리하여 상층부의 용액 I을 제거하였다. 펠렛으로 형성된 젤라틴 슬러시에 용액 I을 첨가하고, 볼텍스(vortex)로 젤라틴 슬러시를 다시 풀어주었다. 젤라틴 슬러시 사이의 기포를 제거하기 위하여 소니케이터를 MAX로 설정한 뒤, 25°C에서 3분 동안 젤라틴 슬러시를 소니케이션하였다. 상기 과정을 4번 반복한 후 젤라틴 슬러시를 4°C에 보관하였다. 이후 레오미터(rheometer)의 진동수(frequency)를 1에서 100Hz로 설정하여 상기에서 제조한 젤라틴 슬러시의 점탄성(Viscoelasticity)을 확인하였다.

[77] 그 결과, 도 2의 (b)에 나타난 바와 같이 특정 진동수 이하에서는 탄성 계수(elastic modulus)가 점탄성 계수(viscous modulus)보다 높으므로 젤라틴 슬러시가 고체의 거동을 나타는 것을 알 수 있었다. 그러나 특정 진동수 이상에서는 탄성 계수와 점탄성 계수의 역전이 일어나 액체의 거동을 보였으며, 젤라틴 슬러시의 점탄성을 확인할 수 있었다.

[78]

[79] **2-2. 젤라틴 슬러시를 사용하여 3차원 구조물 출력**

[80] 실시예 2-1에서 제작한 젤라틴 슬러시의 특성을 확인하기 위하여 하기 방법으로 3차원 구조물을 출력하였다.

[81] 3차 증류수에 염화나트륨(sodium chloride) 0.9%(w/w)와 알지네이트 2%(w/w)를 용해시켜 용액 II를 제조하였다. 유동성을 부여하기 위해 젤라틴 슬러시를 37°C 항온 수조에서 2분 동안 보관하고, 젤라틴 슬러시를 배양 접시에 평평하게 옮긴 후 배양 접시를 프린팅 베드에 고정시켰다. 1 ml 일회용 주사기와 3D 프린팅 전용 주사기에 용액 II를 채우고, 주사기 고정틀에 고정시킨 후 주사기 고정 부품을 3D 프린터 내에 고정시켰다. 젤라틴 슬러시가 담긴 배양 접시로 용액 II를 출력시키면 용액 II에 포함된 알지네이트와 젤라틴 슬러시의 칼슘 이온(Ca^{2+})이 반응하여 알지네이트 하이드로젤이 형성된다. 배양 접시를 37°C에서 20분 동안 배양하여 젤라틴 슬러시를 액화시키고, 젤라틴 슬러시 내에 있는 알지네이트 하이드로젤의 3차원 구조물을 회수하였다. 3차원 구조물의 강도 향상을 위해 염화칼슘 100 mM과 헤페스 10 mM이 포함된 용액에 3분 동안 넣어두었다. 최종적으로 3차원 구조물을 헤페스 버퍼로 세척하여 구조물 주변의 칼슘이온을 제거하였다.

[82] 제조된 알지네이트 하이드로젤 3차원 구조물의 형상을 육안으로 확인하였다.

또한, 3차원 구조물을 서로 다른 방향으로 인장시켜 충분한 강도를 갖는 안정된 구조물이 형성되는 것을 확인하였다.

[83] 도 3은 격자(lattice) 형태의 3차원 구조물 디자인(a)과 이에 따라 제작된 알지네이드 하이드로젤(b)을 나타낸다.

[84]

[85] 실시예 3: 3D 바이오프린팅 설정 최적화

[86] **3-1. 출력 속도 최적화**

[87] 3D 바이오프린팅 기기의 출력 속도(printing speed)를 각각 10, 12, 14 및 16 mm/s로 설정하는 것을 제외하고, 실시예 2-2와 동일한 방법으로 같은 디자인의 3차원 구조물을 각각 출력하였다. 출력된 3차원 구조물의 규격을 이미지 분석 프로그램으로 비교 분석하였다.

[88] 그 결과, 도 4b 및 4c에 나타난 바와 같이 출력 속도가 12 mm/s인 경우 3차원 구조물이 오토캐드로 설계한 도면과 가장 유사한 규격으로 제작되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 출력 속도가 16 mm/s인 경우 제작된 구조물의 높이가 불규칙적인 형상을 보였으므로 출력 시간이 8분 정도 소요되는 12 mm/s를 출력 속도로 결정하였다. 이후의 3차원 구조물은 출력 속도 12 mm/s로 제작하였다.

[89] [표1]

프린팅 속도 (mm/s)	프린팅 시간 (s)
10	9:09
12	8:07
14	7:29
16	6:53

[90]

[91] **3-2. 압출량 최적화**

[92] 오토캐드에서 디자인한 규격과 유사하게 3차원 구조물을 제작하고, 디자인한 구조물의 부피와 유사한 양의 하이드로젤 전구체 용액이 사용되는지 확인하기 위하여 압출량을 최적화하는 실험을 수행하였다. 압출량(input flow)은 주사기로부터 하이드로젤 전구체 용액을 압출하는 양을 결정하는 설정값이다.

[93] 3D 바이오프린팅 내 설정값에서 압출량을 각각 100, 90, 80, 70, 65 및 60%로 설정하고, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 같은 디자인의 3차원 구조물을 각각 출력하였다. 출력된 3차원 구조물의 규격을 이미지 분석 프로그램으로 비교 분석하였다.

[94] 그 결과, 도 5b 내지 5d에 나타난 바와 같이 압출량이 60%일 때 하이드로젤 전구체 용액의 소모량이 오토캐드로 디자인된 3차원 구조물의 부피와 거의 유사하였다. 또한, 도 6에 나타난 바와 같이 출력된 3차원 구조물에서 모서리 부분의 규격이 다른 압출량에 비해 오토캐드로 설계된 도면에 가장

유사하였으므로 60%를 압출량으로 결정하였다. 이후의 3차원 구조물은 압출량 60%로 제작하였다.

[95]

[96] **3-3. 채움 밀도 최적화**

[97] 3D 바이오프린팅은 기기 내 노즐이 움직이면서 라인(line)을 그리고, 그려진 라인들이 적층되면서 3차원 구조물을 제작하는 방법이다. 채움 밀도(filling density)는 라인 사이의 빈 공간을 설정하는 값으로 채움 밀도에 따라 라인 사이의 빈 공간을 조절하여 제작되는 3차원 구조물의 높이를 변경시킬 수 있다.

[98] 3D 바이오프린팅 내 설정값인 채움 밀도를 100, 90, 80, 70%로 설정하여 같은 디자인의 3차원 구조물을 각각 출력하고, 출력된 3차원 구조물의 높이를 이미지 분석 프로그램으로 비교 분석하였다.

[99] 그 결과, 도 7b 및 7c에 나타난 바와 같이 채움 밀도가 70%일 때 3차원 구조물의 높이가 오토케드로 설계된 값인 3 mm와 유사한 약 3.2 mm로 나타났다. 따라서 이후의 3차원 구조물은 채움 밀도를 70%로 하여 제작하였다.

[100]

[101] 실시예 4: 최적화 조건을 사용한 조립 구조물 제작 및 특성 평가

[102] **4-1. 조립 구조물 제작 및 안정성 평가**

[103] 오토케드로 다양한 형태의 블록(block)을 설계하여 실시예 3에서 최적화한 조건으로 출력하고, 출력된 블록들을 형태에 맞게 조립하여 거대 구조물(super-structure)을 제작하였다. 이하에서는 조립 방법에 의하여 제작된 거대 구조물을 조립 구조물로 기재한다. 조립 구조물의 안정성을 확인하기 위하여 3차 증류수에 거대구조물을 넣고, RPM(rotation per minute)을 각각 100, 200 및 300으로 설정하여 진동시켰다.

[104] 그 결과, 도 8의 (c)와 도 9의 (c)에 나타난 바와 같이 RPM과 무관하게 조립 구조물이 블록으로 분리되지 않았으며, 블록을 조립하는 방식만으로도 안정적인 조립 구조물을 형성할 수 있음을 알 수 있었다.

[105] 도 8는 3종 형태로 제작된 블록의 모습(a), 블록을 조립 구조물로 제작하는 과정(b) 및 조립 구조물을 서로 다른 RPM으로 진동시킨 결과(c)를 보여준다.

[106] 도 9는 4종 형태로 제작된 블록의 모습(a), 블록을 조립 구조물로 제작하는 과정(b) 및 조립 구조물을 서로 다른 RPM으로 진동시킨 결과(c)를 보여준다.

[107]

[108] **4-2. 기계적 물성(mechanical properties) 측정**

[109] 블록 조립 방식으로 제작한 거대 구조물(조립 구조물)과 조립 방식으로 제작하지 않은 거대 구조물(미조립 구조물)의 기계적 물성을 비교하였다. 단일 블록은 각각 블록 A와 블록 B로 명명하고, 조립 구조물과 미조립 구조물은 동일한 규격으로 제작하였다.

[110] 각각의 블록과 거대 구조물을 오토케드로 설계한 후 출력하였다. 이때 구조물들의 분해성을 다르게 하기 위하여 블록의 구성 성분에 차이를 두었다.

미조립 구조물과 블록 A는 알지네이트 2.6%(w/w) 용액으로 출력하고, 조립 구조물은 알지네이트 2.6%(w/w) 용액으로 블록 A와 블록 B를 출력하여 조립하였다. 블록 B는 알지네이트 2.6%(w/w) 용액과 콜라겐(collagen type 1 from rat tail) 용액(3.6 mg/ml)을 1:1 부피비로 혼합한 용액으로 출력하였다.

[111] 레오미터의 평행 플레이트에서 출력된 각각의 구조물에 변형률(strain) 1 내지 500%로 압력을 가하여 구조물들을 파괴하고, 구조물이 파괴될 때 변형률과 탄성/점탄성 계수(elastic/viscous modulus)를 측정하였다. 또한, 각 구조물에 60초 동안 1 Hz의 진동수를 가하면서 탄성/점탄성 계수를 측정하였다.

[112] 그 결과, 도 10b에 나타난 바와 같이 블록 A 및 블록 B의 변형률과 탄성/점탄성 계수가 조립 구조물보다 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 조립 구조물과 미조립 구조물은 변형률과 탄성/점탄성 계수가 서로 유사한 것을 알 수 있었다. 이는 블록들을 하나의 구조물로 조립하면 기계적 물성이 향상되는 것을 의미한다.

[113] 또한, 도 10c에 나타난 바와 같이 각 구조물들의 시간에 따른 탄성/점탄성 계수를 측정한 결과, 블록 A는 계수가 각각 약 200 Pa, 30 Pa를 나타내지만, 블록 A와 블록 B가 결합된 조립 거대구조물은 계수가 각각 약 1000 Pa과 150 Pa로 나타나 기계적 물성이 향상된 것을 알 수 있었다. 이는 블록을 조립하여 물성이 향상된 거대구조물을 제작할 수 있음을 의미한다.

[114]

[115] 실시예 5: 다른 성분 및 농도로 구성된 조립 구조물의 특성 확인

[116] 다른 성분 및 농도로 구성된 블록 B를 제작하고, 이를 다른 블록 A와 결합시켜 조립 구조물을 제작한 후 블록의 성질에 따른 조립 구조물의 거동 변화를 확인하였다.

[117] 미조립 구조물을 대조군으로 설정하고, 블록 B는 알지네이트와 콜라겐을 혼합하여 제작하였다. 구체적으로, 콜라겐 용액(2 mg/ml)과 알지네이트 용액(2, 1.5 및 1%(w/w))을 1:1의 부피비로 혼합하여 콜라겐 1 mg/ml과 알지네이트가 각각 1, 0.75 및 0.5%(w/w) 혼합된 3종의 혼합 용액을 제조하였다. 동일한 방법으로 혼합 후의 최종 농도가 콜라겐 2 mg/ml, 알지네이트가 각각 1, 0.75 및 0.5%(w/w) 혼합된 3종의 혼합 용액을 추가로 제조하였다. 총 6종의 혼합용액으로 블록 B를 제작하고, 블록 A와 미조립 거대구조물은 모두 알지네이트 2%(w/w) 용액으로 제작하였다. 조립 구조물은 1개의 블록 A에 2개의 블록 B를 조립하여 제작하였다. 제작된 각각의 구조물들을 30일 이상 배지에서 보관하면서 관찰하고, RPMI-1640 배지(Invitrogen, 미국)는 2일 간격으로 교체하였다.

[118] 관찰 결과, 도 11b에 나타난 바와 같이 알지네이트만으로 제작된 미조립 구조물과 블록 A는 30일이 지나더라도 구조물이 붕괴되지 않는 것을 알 수 있었다. 알지네이트 하이드로젤은 일반적으로 내부의 칼슘이온과 배지의 1가 양이온(예, Na⁺)의 상호교환에 의해서 붕괴(용해)될 수 있다. 하지만 2%(w/w)의 알지네이트 하이드로젤은 외부 배지와 양이온 상호교환으로 인한 붕괴가 일어나지 않는 농도라고 판단된다. 이는 알지네이트의 농도를 조절하여 조립

구조물의 특징을 변화시킬 수 있음을 의미한다.

- [119] 조립 구조물의 경우, 도 11c에 나타난 바와 같이 블록 B의 알지네이트의 농도가 감소할수록 블록 A로부터 빨리 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 알지네이트 농도가 0.5%(w/w)일 때 배양 2주 후 블록 B가 블록 A로부터 분리되었고, 알지네이트 농도가 0.75 또는 1%(w/w)이면 30일 이상 조립 구조물의 형태가 유지되었다.
- [120] 또한, 알지네이트 농도가 0.5%(w/w)인 경우 콜라겐 농도가 낮을수록, 더 많은 수의 블록 B가 블록 A로부터 분리되는 것을 확인하였다. 이는 블록 B의 알지네이트의 농도가 너무 낮아 배지와 양이온 상호교환으로 인한 붕괴가 더욱 쉽게 일어나고, 콜라겐의 농도가 낮을수록 블록의 물성이 감소하므로 블록 B가 블록 A로부터 빠른 기간 내에 분리되는 것으로 생각된다.
- [121] 콜라겐이 함유된 구조물의 생체 내(*in vivo*) 거동을 재현하기 위하여 각각의 구조물에 콜라겐 분해효소(collagenase)를 처리하였다. 구체적으로 알지네이트 1%(w/w), 콜라겐 1 또는 2 mg/ml로 이루어진 블록 B로 조립 구조물을 제작하고, 콜라겐 분해효소를 1.2 U/well 농도로 처리하였다.
- [122] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 3일 후 조립 구조물이 붕괴되기 시작하였으며, 콜라겐 농도가 낮을수록 블록 B가 블록 A로부터 더 빠르게 분리되었다. 본 실시예를 통하여 블록의 성분이나 농도를 변화시킴으로써 거대구조물의 특성을 변경시킬 수 있음을 확인하였다.
- [123]
- [124] 실시예 6: 주사기의 노즐 크기에 따른 제작된 구조물의 크기 비교
- [125] 노즐 크기가 상이한 주사기를 사용하여 3차원 구조물을 출력하고, 출력된 구조물의 규격 정확성을 확인하였다. 먼저, 알지네이트 2%(w/w) 용액에 췌장세포(pancreatic islets)와 췌장 단일세포 스페로이드를 첨가하여 세포가 함유된 하이드로젤 전구체 용액을 제조하였다. 상기 전구체 용액을 일회용 주사기에 주입하고, 주사기를 주사기 고정틀에 장착시켰다. 주사기에 22G(직경 410 μm) 또는 27G(210 μm) 노즐을 결합시키고, 주사기를 3D 바이오프린팅 내에 고정시켰다. 실시예 3-2와 동일한 방법으로 젤라틴 슬러시를 프린팅 베드에 고정시킨 후 세포가 함유된 3차원 구조물을 출력하였다. 출력된 3차원 구조물을 회수하고, 현미경으로 x40 배율로 세포와 구조물의 규격을 촬영하고, 이미지 분석 프로그램을 통해서 구조물의 규격을 확인하였다. 오토캐드로 설계된 구조물은 직육면체 한 개의 너비가 600 μm 이다.
- [126] 확인 결과, 도 13의 (c)에 나타난 바와 같이 노즐 크기가 작은 27G의 경우 평균 너비가 793 μm 로 나타나고, 22G는 평균 너비가 920 μm 로 나타나 노즐 크기가 작을수록 제작되는 3차원 구조물의 규격이 정확해지는 것을 확인하였다. 그러나 노즐 크기가 지나치게 줄어들면 출력되는 세포가 노즐 끝에서 전단력(shear stress)을 많이 받아 세포 생존율이 급격히 감소될 수 있다. 따라서 세포의 직경보다 약간 큰 크기인 27G(210 μm)로 노즐 크기를 결정하였다.

[127]

[128] 실시예 7: 3차원 구조물로 출력된 세포의 생존율(viability) 평가

[129] 알지네이트 2%(w/w) 용액에 채장 단일세포 스페로이드(1.5×10^5 세포)를 첨가하여 세포가 함유된 하이드로젤 전구체 용액을 제조하였다. 상기 세포가 함유된 알지네이트 용액을 일회용 주사기에 주입하고, 주사기를 주사기 고정틀에 장착시켰다. 주사기에 27G($210 \mu\text{m}$) 노즐을 결합시킨 후 주사기를 3D 바이오프린팅 내에 고정시켰다. 실시예 3-2와 동일한 방법 및 최적화된 조건으로 세포가 함유된 3차원 구조물을 출력하여 회수하고, 출력 이후 구조물을 1시간 동안 배양하였다. 이후 100 mM EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) 용액(헤페스 버퍼에 용해)에 세포가 함유된 3차원 구조물을 7분 동안 보관하고, 알지네이트 하이드로젤을 인위적으로 분해시킨 후 세포를 회수하였다. 48 웰 플레이트(well plate)에 3D 바이오프린팅을 진행하지 않은 채장 단일세포 스페로이드(대조군) 또는 3D 바이오프린팅 후 회수한 세포(실험군)를 분주하였다. 세포가 분주된 각 웰에 배지를 분주하고, CCK-8 약물을 배지 부피의 1/10 농도로 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[130] 흡광도 측정 후 각 웰에 분주된 세포를 회수하여 RIPA 버퍼(Cell lysis buffer) 600 μl 를 처리하고, 소니케이터(Sonicator; Amplitude 22%, ON 3초, OFF 4초)로 세포에 17초 동안 진동을 가해 세포를 파쇄하였다. 이후 세포 파쇄물을 DNA assay kit(Invitrogen)에 포함된 TE buffer로 희석하고, DNA에 반응하는 PICOGREEN 용액을 첨가한 후 파장대 480-530 nm에서 형광값을 측정하였다.

[131] CCK-8 실험에서 측정한 흡광도를 상기 형광값으로 나누어 보정한 결과, 도 14b에 나타난 바와 같이 대조군과 실험군 사이에서 세포 생존율에 유의적 차이가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 27G($210 \mu\text{m}$) 노즐 크기로 출력하는 과정이 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않음을 의미한다.

[132] 또한, 세포의 생존율을 정성적으로 평가하기 위하여 Live/Dead assay(Sigma-Aldich)를 수행하였다. 48 웰 플레이트의 각 웰에 calcein-AM(Alive cell)과 ethidium homodimer-1(Dead cell)를 1 μM 농도로 첨가하여 15분 동안 배양하였다. 이후 형광 현미경으로 녹색(Alive cell)과 적색(Dead cell) 형광을 관찰하였다.

[133] 그 결과, 대조군과 실험군 모두 적색 형광이 녹색 형광보다 현저히 적은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 세포를 함유한 구조물을 제작하는 과정에서 세포의 생존율은 큰 영향을 받지 않음을 의미한다.

[134]

[135] 실시예 8: 세포가 함유된 다양한 형태의 블록 제작

[136] 선행 실험을 통해 최적화된 조건(프린팅 속도 12 mm/s, 압출량 60%, 채움 밀도 70%)과 프린팅 과정이 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않으므로 세포가 함유된 다양한 형태의 3차원 구조물을 제작하였다. 구체적으로 홀(hole)의 수가 각각 0,

1, 4 및 9개인 직육면체 블록을 설계하고, 알지네이트 2%(w/w) 용액 및 체장 단일 세포 스페로이드를 사용하여 실시예 8과 동일한 방법으로 3차원 구조물을 출력하였다. 출력된 3차원 구조물은 실시예 2-2와 동일한 방법으로 회수하였다.

- [137] 광학용 현미경으로 3차원 구조물의 모양과 내부에 봉입된 세포의 형상(morphology)을 관찰하였다. 그 결과, 도 15의 (b)에 나타난 바와 같이 블록의 형태와 무관하게 세포들이 블록 내에 골고루 분산되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 실험군(hole 0, 1, 4 및 9)의 세포 형상 또한 대조군(바이오프린팅을 수행하지 않은 세포, intact spheroid)과 비교하여 양호한 것을 알 수 있었다. 출력된 블록 자체의 형태 또한 설계된 도안과 유사하였으며, 이는 세포가 함유된 다양한 형태의 블록을 3D 바이오프린팅으로 제작할 수 있음을 의미한다.

[138]

- [139] 실시예 9: 3차원 구조물의 형태에 따른 세포의 저산소증 발생 정도

- [140] 27G 노즐로 세포가 함유된 블록을 출력하고, 블록의 내부에 함유된 세포에 발생하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 측정하여 저산소증(hypoxia) 발생 정도를 확인하였다.

- [141] 구체적으로 직육면체(6 mmX6 mmX2 mm)와 사각 도넛(6 mmX6 mmX2 mm, 내부 빈 공간은 4.8 mmX4.8 mmX2 mm) 형태의 3차원 구조물을 설계한 후 실시예 7과 동일한 방법으로 체장 단일세포 스페로이드(1.5×10^5 세포)가 함유된 3차원 구조물을 출력하였다.

- [142] 48 웰 플레이트에 3D 바이오프린팅을 진행하지 않은 체장 단일세포 스페로이드(대조군; intact spheroid), 직육면체 형태의 세포 함유 구조물(실험군 1; hole 0) 및 사각 도넛 형태의 세포 함유 구조물(실험군 2; hole 1)을 각각 분주하였다. 저산소증을 유도하기 위하여 각 샘플을 24시간 동안 배양하고, 10 μ M 농도의 H_2DCFDA (Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 용액(헤페스 버퍼에 용해)을 각 샘플에 첨가하여 30분 동안 배양하였다. 이후 H_2DCFDA 용액을 제거하고, 각 샘플에 배지를 첨가한 뒤, 485-530 nm 파장대에서 형광을 측정하였다. 공초점 현미경으로 3차원 구조물 내에 봉입된 세포의 형태와 H_2DCFDA 형광을 관찰하였다.

- [143] 그 결과, 도 16c 및 16d에 나타난 바와 같이 대조군 및 실험군 2와 비교하여 실험군 1의 형광값이 현저하게 높은 것을 알 수 있었다. 대조군과 실험군 2 사이에서는 형광값에 유의미한 차이가 없었다. 따라서 내부에 공간이 없는 형태의 3차원 구조물에서는 세포에 더 많은 활성산소가 발생하고, 이에 따라 저산소증이 더 활발하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[144]

- [145] 실시예 10: 세포가 함유된 3차원 구조물의 이식

- [146] 10-1. 3차원 구조물의 이종 이식

- [147] 미조립 구조물(대조군), 블록 A(단일 블록) 및 조립 구조물(블록 A+블록 B)을 제작하여 이식 전까지 배양하였다. 미조립 구조물과 블록 A는 알지네이트

2%(w/w) 용액을 사용하고, 블록 B는 알지네이트 2%(w/w)와 콜라겐(1 mg/ml)의 혼합 용액(1:1)으로 제작하였다. 세포는 랫트(rat)에서 분리한 체장세포를 사용하였다.

- [148] 생후 8주령의 누드 마우스 3마리를 마취하고, 각각 미조립 구조물(대조군), 블록 A 및 조립 구조물을 등쪽 피하에 이식하였다. 이식 30일 후 이식한 구조물이 포함된 등조직을 회수하고, 구조물의 생착(engraftment) 여부를 확인하였다.
- [149] 그 결과, 도 17의 (b)에 나타난 바와 같이 블록 A를 이식한 경우, 알지네이트 하이드로젤이 붕괴하여 구조물의 본래 형태가 유지되지 못한 것을 알 수 있었다. 이는 조립을 진행하지 않은 단일 블록이므로 기계적 물성이 약하기 때문인 것으로 생각된다. 반면 대조군은 단일 블록에 비해 기계적 물성이 강하므로 본래 형태를 유지하였고, 도 17의 (c)에 나타난 바와 같이 등 부위로부터 구조물 주변으로 혈관이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 조립 구조물을 이식한 경우 또한 대조군과 유사한 경향을 나타내어 등 부위에 구조물이 생착된 것을 확인할 수 있었으며, 블록 A와 블록 B가 조립된 경계 또한 확인할 수 있었다.
- [150] 상기 실험 결과를 통하여 조립 방식으로 제작된 구조물을 생체 내에 이식하여도 본래 형태를 유지할 수 있음을 확인하였다.

[151]

[152] **10-2. 이식된 3차원 구조물의 조직 검사**

- [153] 이식된 3차원 구조물의 생착 정도를 평가하기 위하여 상기 실시예 10-1에서 분리한 구조물을 포함하는 등조직에 대하여 면역조직염색(immunohistochemistry, IHC)과 헤마토실린&에오신(hematoxylin&eosin, H&E) 염색을 수행하였다.

- [154] 분리한 등조직을 Karnovsky 고정액에서 2일 동안 보관하고, 충분히 고정된 등조직을 수세하여 고정액을 제거하였다. 이후 등조직을 70, 80, 90 및 100% 에탄올에 순차적으로 담궈 재수화(dehydration) 과정을 수행하고, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록은 6 μ m 두께로 절단하고, 절단한 조직 절편은 슬라이드 글라스에 부착시켰다. 이후 슬라이드 글라스를 60°C 오븐에서 30분 동안 보관하고, 슬라이드 글라스를 자일렌에 담궈 파라핀을 제거하였다. 슬라이드 글라스를 100, 90, 80 및 70% 에탄올에 순차적으로 담궈 수화(hydration)시키고, 헤마토실린과 에오신 용액으로 조직 절편을 염색하였다. 등조직 부근의 염색 용액을 제거하기 위하여 슬라이드 글라스를 70, 80, 90 및 100% 에탄올에 순서대로 세척하였다. 염색된 등조직 절편 근처에 마운팅 용액(mounting solution)을 떨어뜨리고, 커버글라스를 덮어 염색된 조직 절편을 보호하였다.

- [155] H&E 염색 결과, 도 18에 나타난 바와 같이 미조립 구조물 또는 조립 구조물을 이식한 경우 구조물들의 원본 형태가 유지되고, 이식된 구조물 내부에 형성된 누드 마우스 조직(native tissue)과 구조물 내부로 이동한 누드 마우스 세포(migrated native cells)를 확인할 수 있었다. 반면 블록 A를 이식한 경우

구조물의 형태가 유지되지 못하고, 작은 파편으로 부서진 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 실시예 11-1의 결과와 유사하며, 블록 A는 다른 구조물과 비교하여 물성이 약하기 때문에 형태를 유지하지 못하는 것으로 판단된다.

- [156] IHC는 다음과 같이 진행하였다. 상기와 동일한 방법으로 파라핀을 제거하고, 100, 90, 80 및 70% 에탄올에 순차적으로 담궈 조직 절편을 수화시켰다. 이후 수화된 조직에서 항원 노출(antigen retrieval)을 위하여 슬라이드 글라스를 60°C 시트르산 나트륨(sodium citrate) 용액(pH 6.0)에서 30분 동안 보관하였다. PBS-Tween 20(PBS-T)으로 슬라이드 글라스의 시트르산 나트륨 용액을 제거하였다. PBS-T에 희석한 20% 염소 혈청(goat serum)을 조직 절편에 처리하여 30분 내지 1시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체인 anti-CD34 항체를 20% 염소 혈청에 1:100으로 희석하여 조직 절편에 처리하고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. CD34 항체를 사용한 것은 이식된 구조물이 누드 마우스의 조직에 생착되면서 형성된 혈관을 염색하기 위함이다.
- [157] 다음날 슬라이드 글라스를 PBS로 세척하여 일차 항체와 염소 혈청을 제거하였다. 2차 항체(goat-anti rat)를 PBS에 1:100으로 희석하여 슬라이드 글라스에 처리하고, 상온에서 60분 동안 보관하였다. 이후 DAPI 마운팅 용액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮어 염색된 조직을 외부로부터 보호하였다. 모든 염색이 끝난 후 광학 및 형광 현미경으로 염색한 조직들을 관찰하였다.
- [158] IHC 염색 결과, 도 19에 나타난 바와 같이 블록 A를 이식한 경우와 비교하여 미조립 구조물 또는 조립 구조물을 이식한 경우 CD34 형광 신호가 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 조립 구조물의 경우 콜레겐이 함유된 블록 B에서 더 많은 형광 신호가 관찰되는 것을 알 수 있었다.
- [159] 본 실험을 통하여 서로 다른 블록으로 조립된 구조물을 이식하는 경우에도 구조물의 형태를 유지할 수 있고, 블록의 성분을 변화시킴으로써 구조물의 특성을 변화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [160]
- [161] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

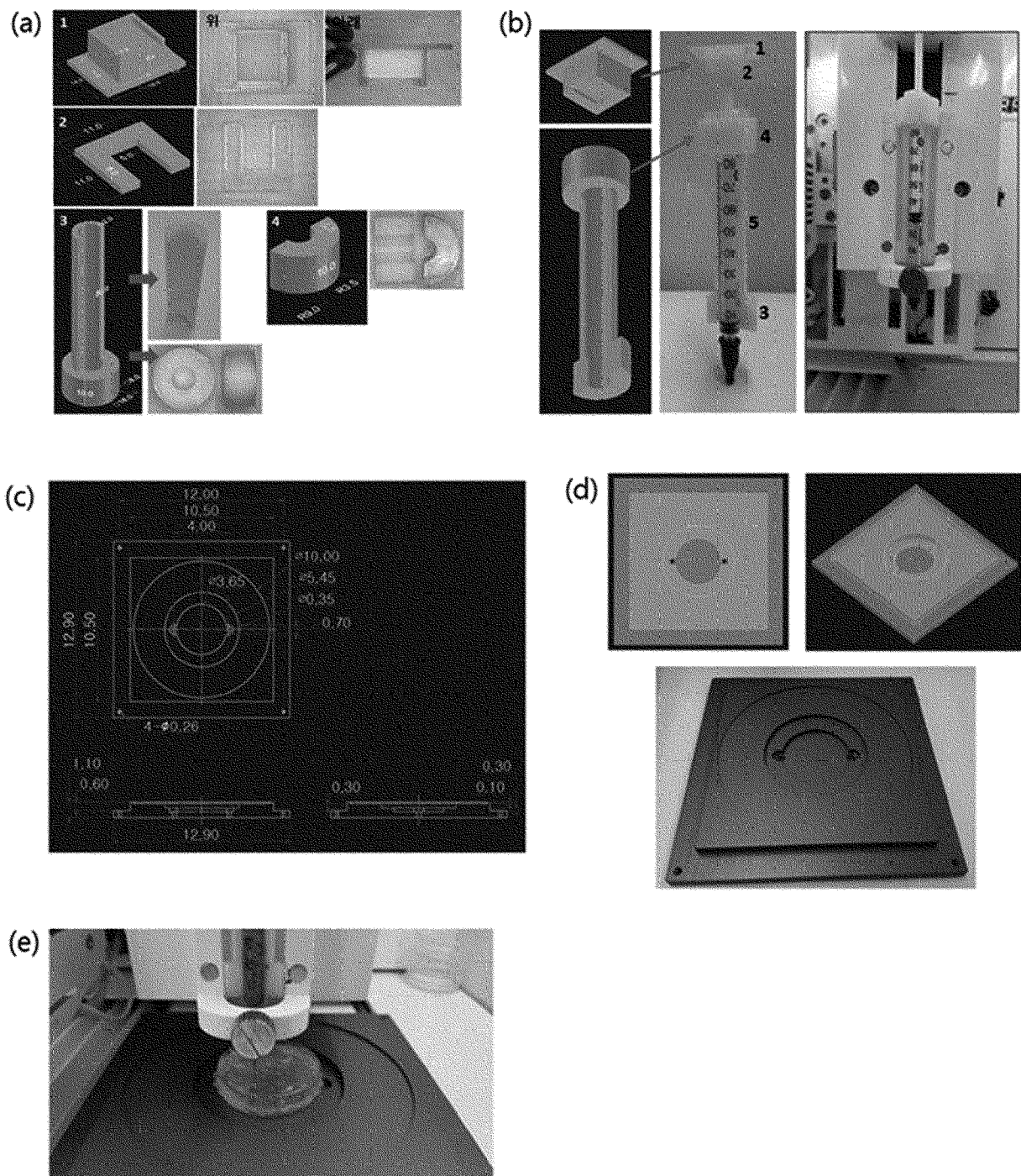
청구범위

- [청구항 1] 생체 내에 이식하고자 하는 세포를 함유하는 제1 하이드로젤 블록; 및 제2 하이드로젤 블록을 포함하는 3차원 하이드로젤 지지체로서, 상기 제1 하이드로젤 블록과 상기 제2 하이드로젤 블록은 서로 조립되고, 생분해성이 상이한 것인 3차원 하이드로젤 지지체(scaffold).
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록은 홀(hole)이 형성된 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 홀은 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록을 관통하는 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 홀은 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록이 조립되는 공간인 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 블록, 제2 하이드로젤 블록 각각 또는 제1 하이드로젤 블록 및 제2 하이드로젤 블록은 내부에 성장인자를 추가로 포함하는 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 성장인자는 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 섬유아세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, FGF), 전환성장인자(Transforming growth factor beta, TGFbeta), 혈소판유래증식인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 혈관내피세포증식인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 인슐린 유사 성장인자(Insulin-like growth factor 1, IGF-1), 티오레독신(Thioredoxin, TRX), 줄기세포인자(Stem cell factor, SCF), 간세포 증식인자(Hepatocyte growth factorHGF), 인간 성장 호르몬(Human Growth Hormone, HGH) 및 엔지오제닌(Angiogenin)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 블록, 제2 하이드로젤 블록 각각 또는 제1 하이드로젤 블록 및 제2 하이드로젤 블록은 도넛 형태인 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 블록, 제2 하이드로젤 블록 각각 또는 제1 하이드로젤 블록 및 제2 하이드로젤 블록은 격자 형태인 것인 3차원 하이드로젤 지지체.
- [청구항 9] 생분해성 제1 하이드로젤 용액과 세포의 혼합액을 3차원 바이오프린팅으로 출력하여 제1 하이드로젤 블록을 제작하는 단계; 생분해성 제2 하이드로젤 용액을 3차원 바이오프린팅으로 출력하여 제2 하이드로젤 블록을 제작하는 단계; 및 제1 하이드로젤 블록과 제2 하이드로젤 블록을 조립하는 단계를 포함하는 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액은

알지네이트, 헤파린, 히알루론산, 콜라겐 및 젤라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 고분자가 용해된 용액으로, 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액은 고분자의 성분 또는 농도가 상이한 것인 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.

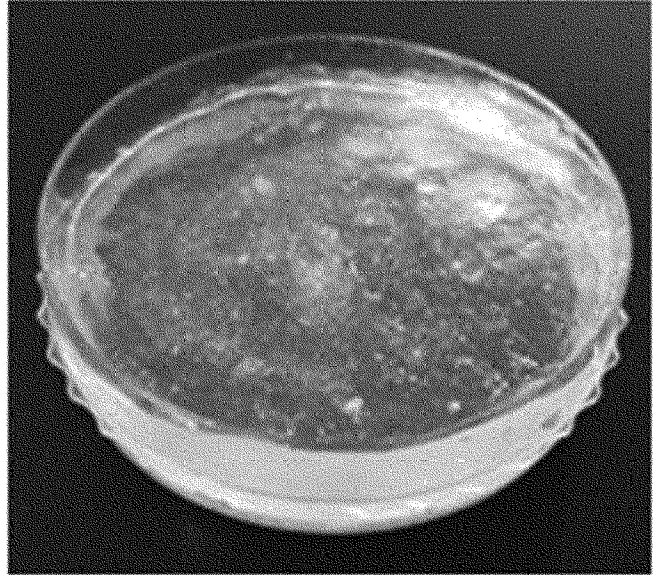
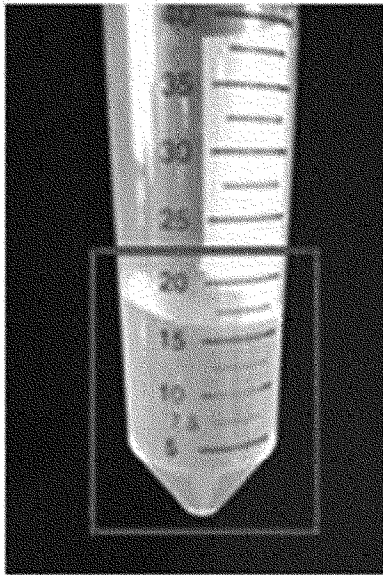
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 용액은 알지네이트 용액이고, 제2 하이드로젤 용액은 알지네이트와 콜라겐의 혼합 용액인 것인 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록은 홀(hole)이 형성된 것인 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 홀은 제1 하이드로젤 블록 또는 제2 하이드로젤 블록을 관통하는 것인 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 3차원 바이오프린팅으로 출력하는 것은 출력 속도 5 내지 20 mm/s, 압출량 50 내지 100% 및 채움 밀도 50 내지 100% 조건으로 수행되는 것인 3차원 하이드로젤 지지체 제조방법.

[도1]

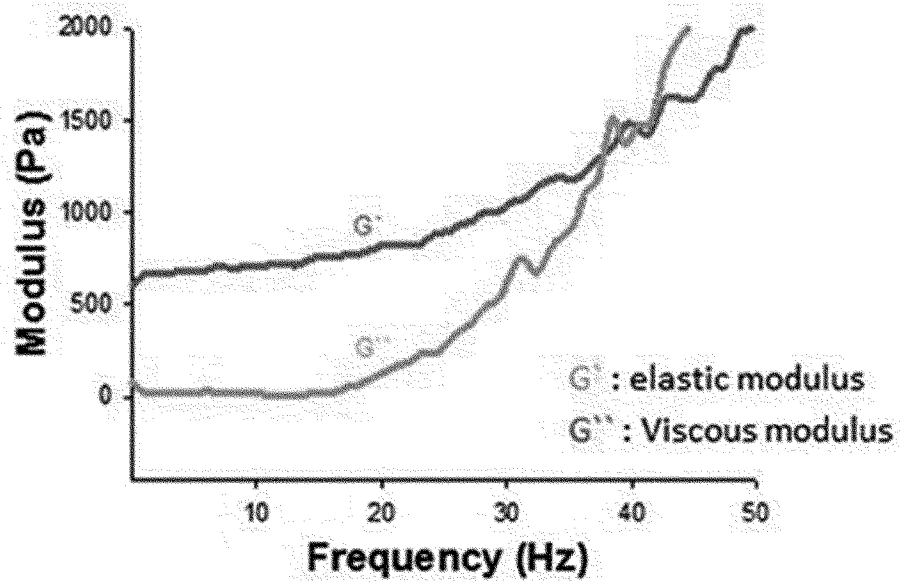


[도2]

(a)

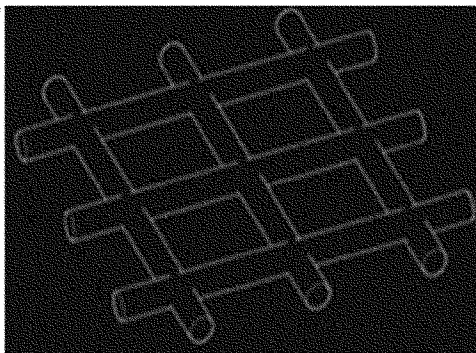


(b)

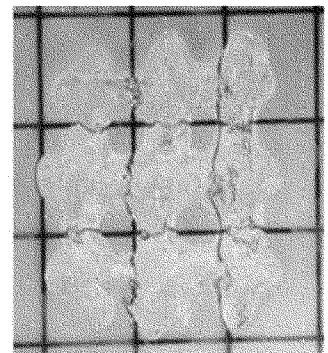
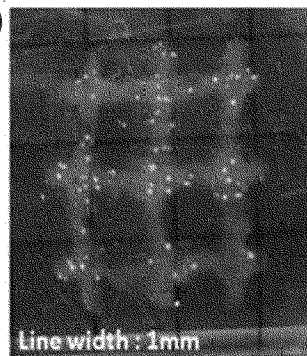


[도3]

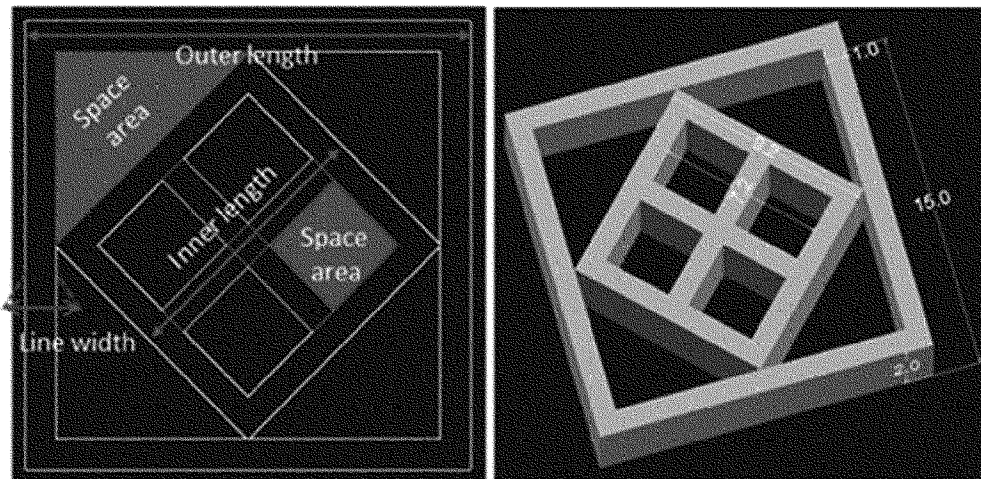
(a)



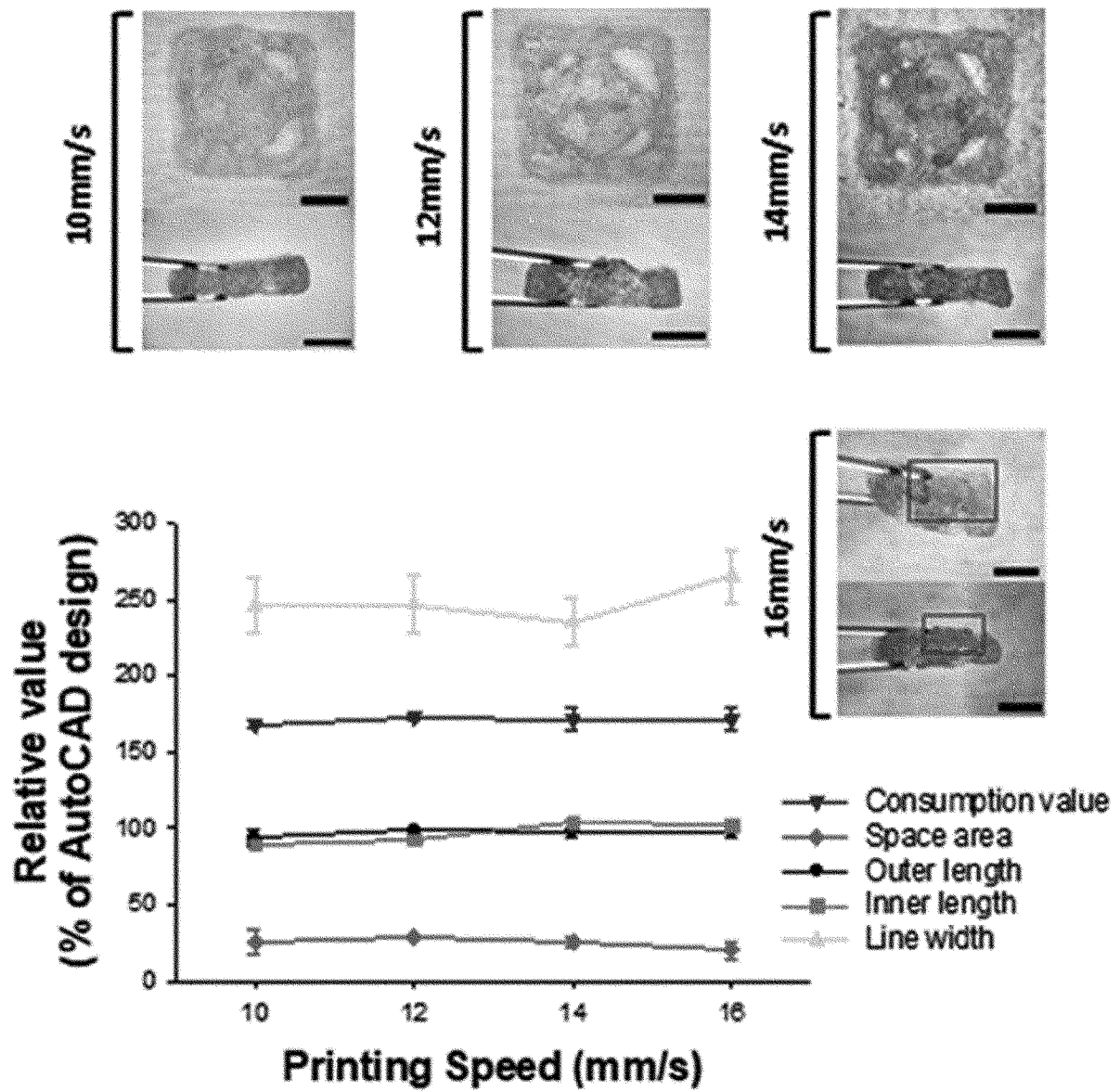
(b)



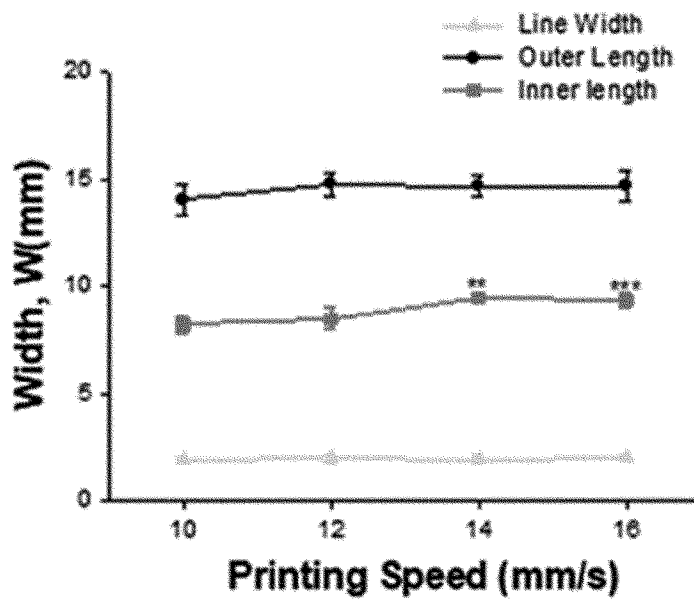
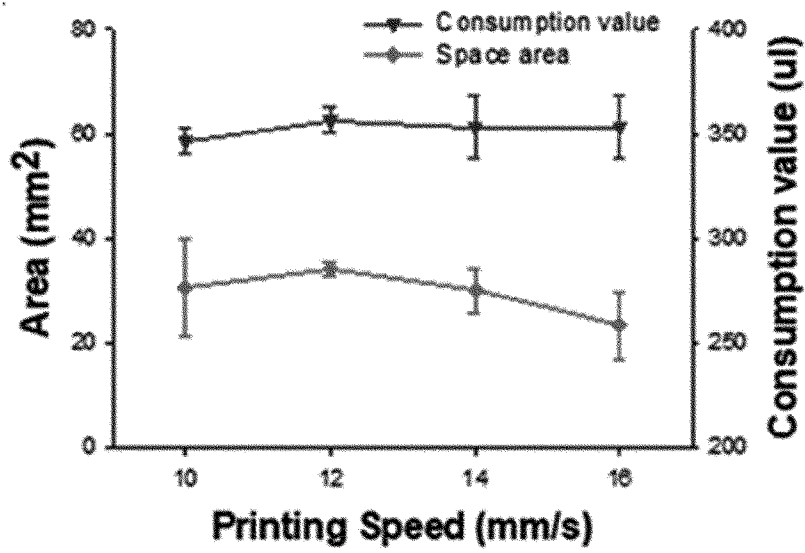
[도4a]



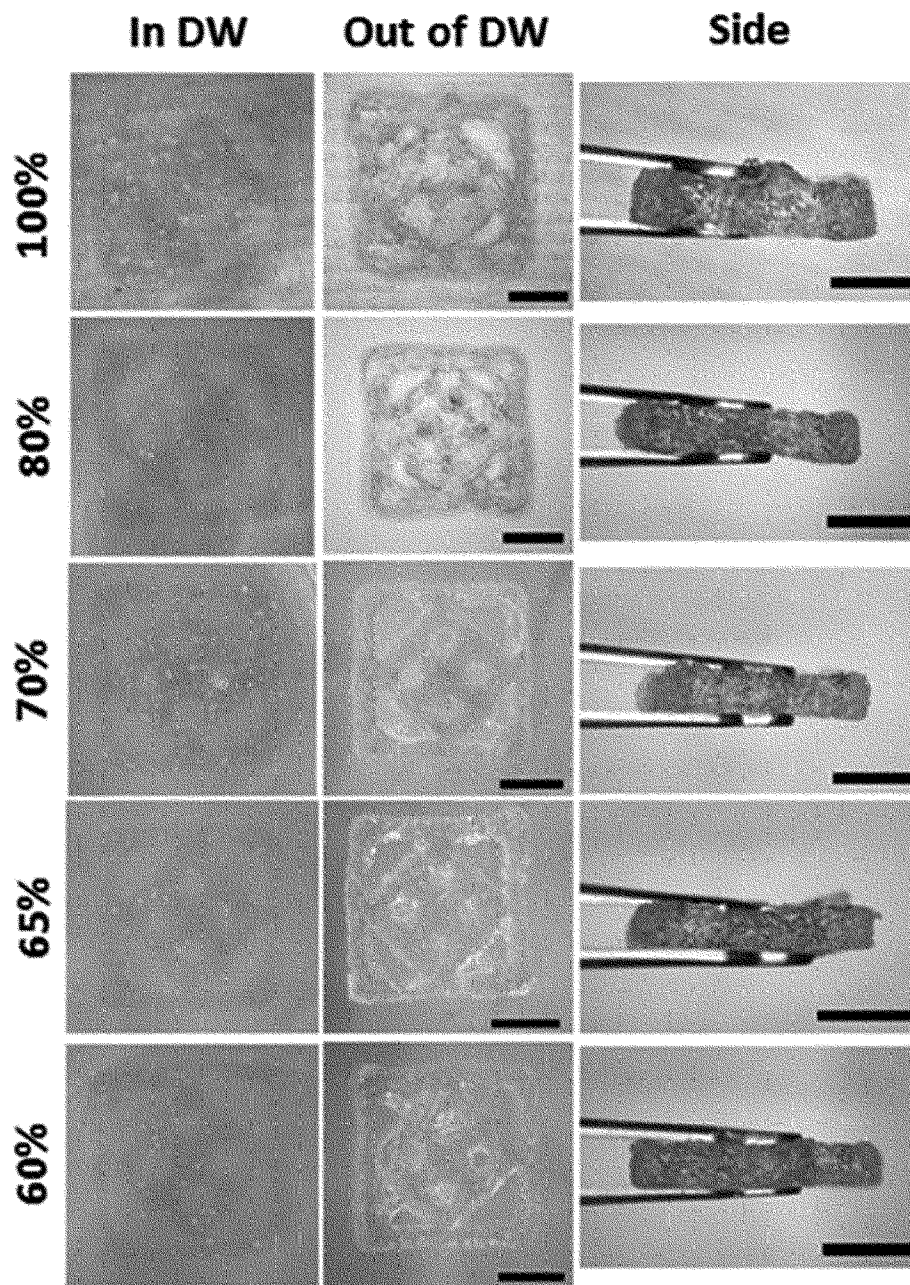
[도4b]



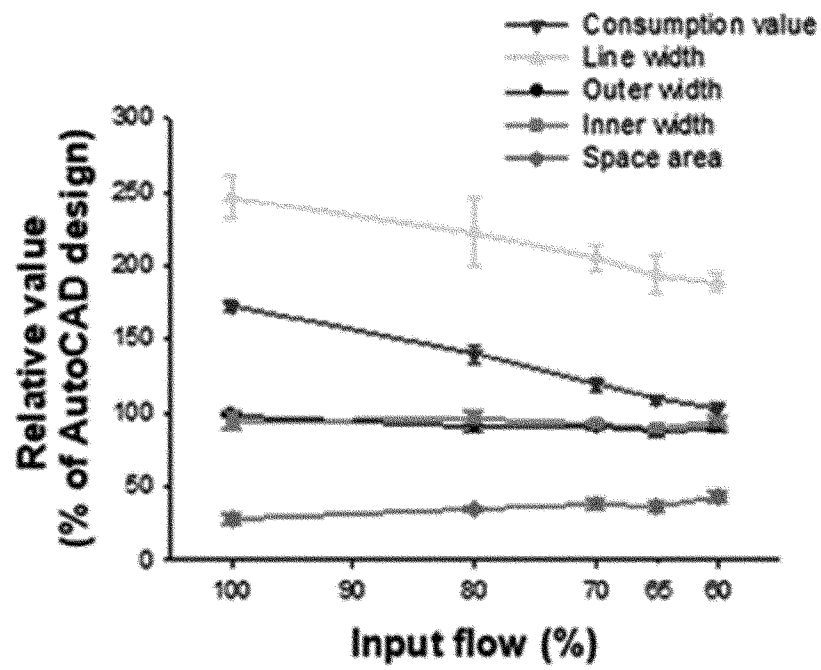
[도4c]



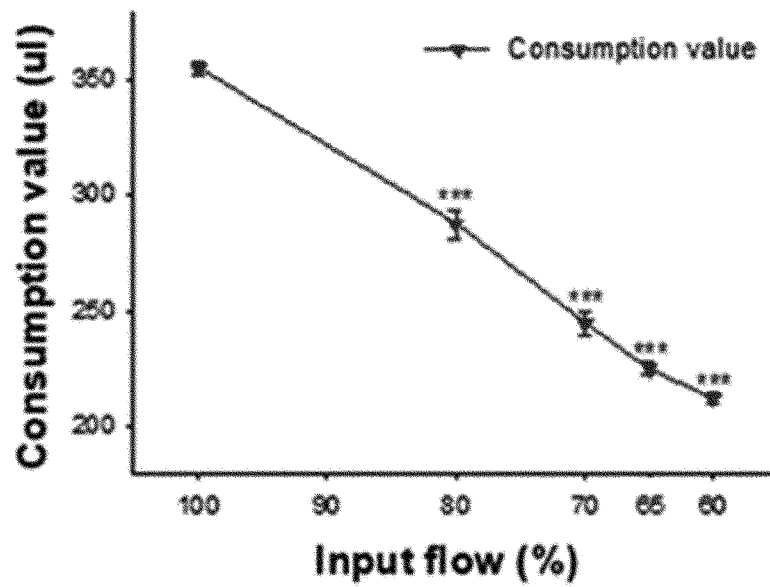
[도5a]



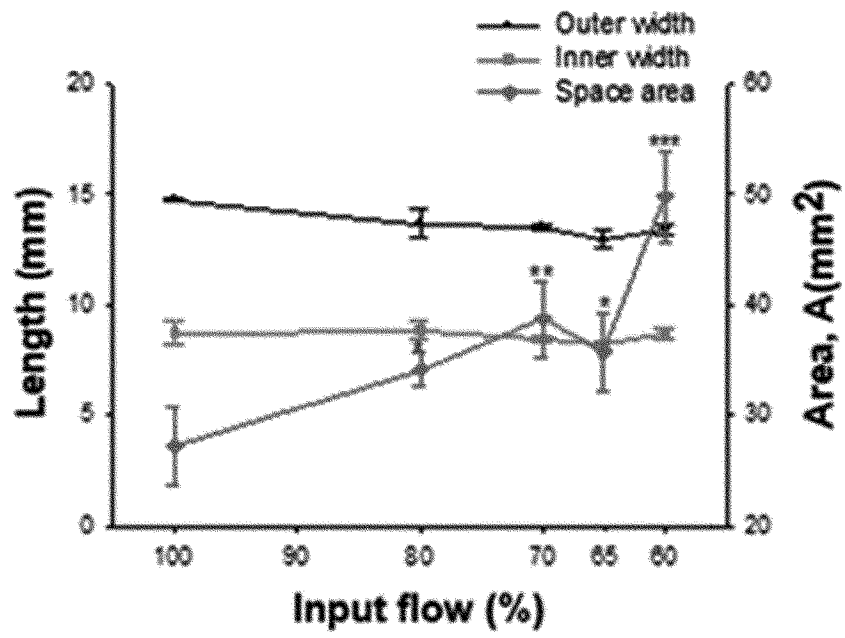
[도5b]



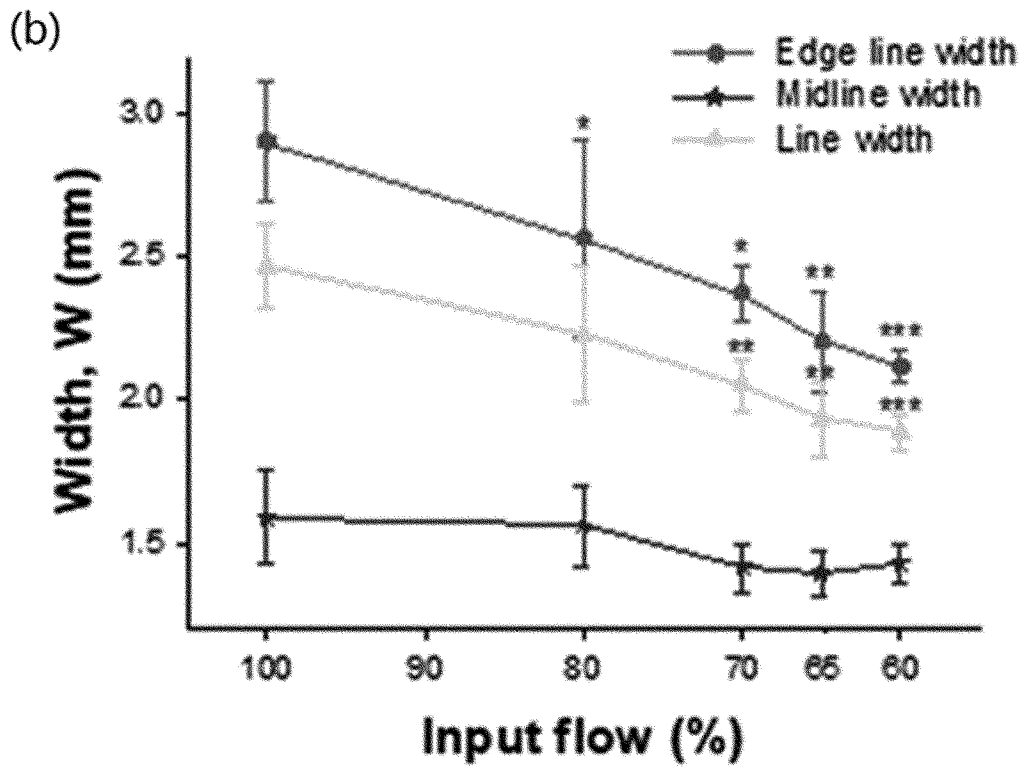
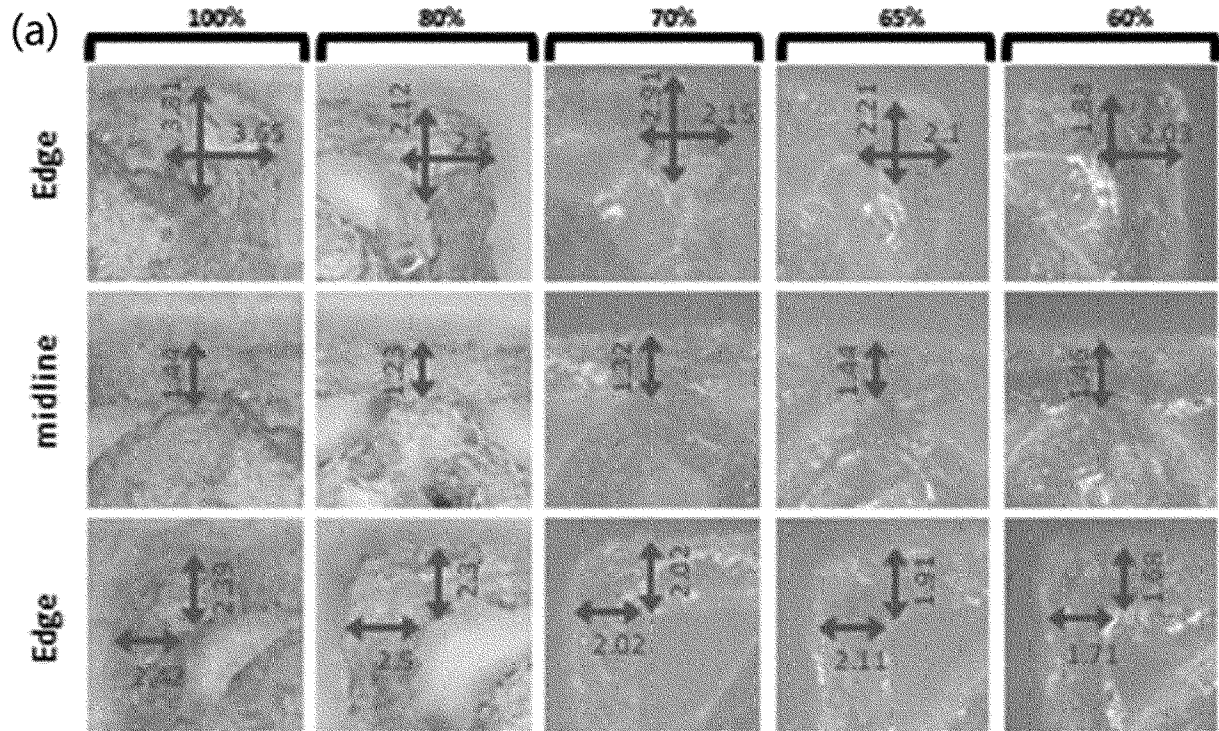
[도5c]



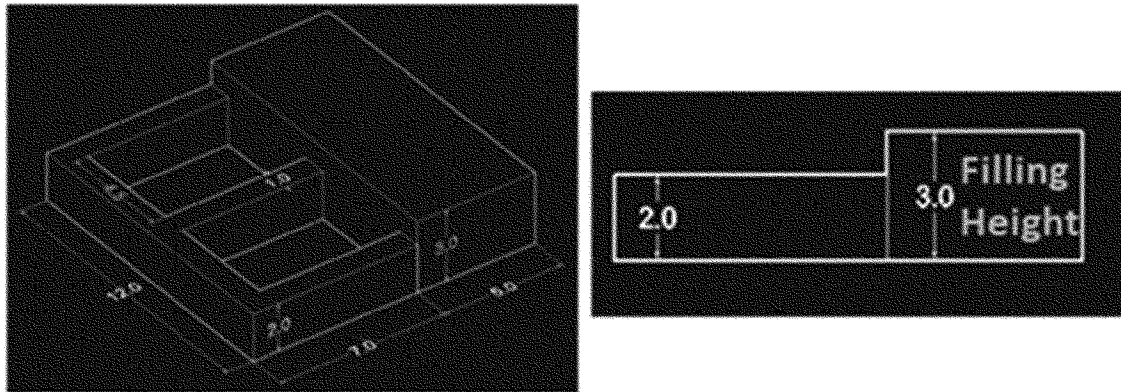
[도5d]



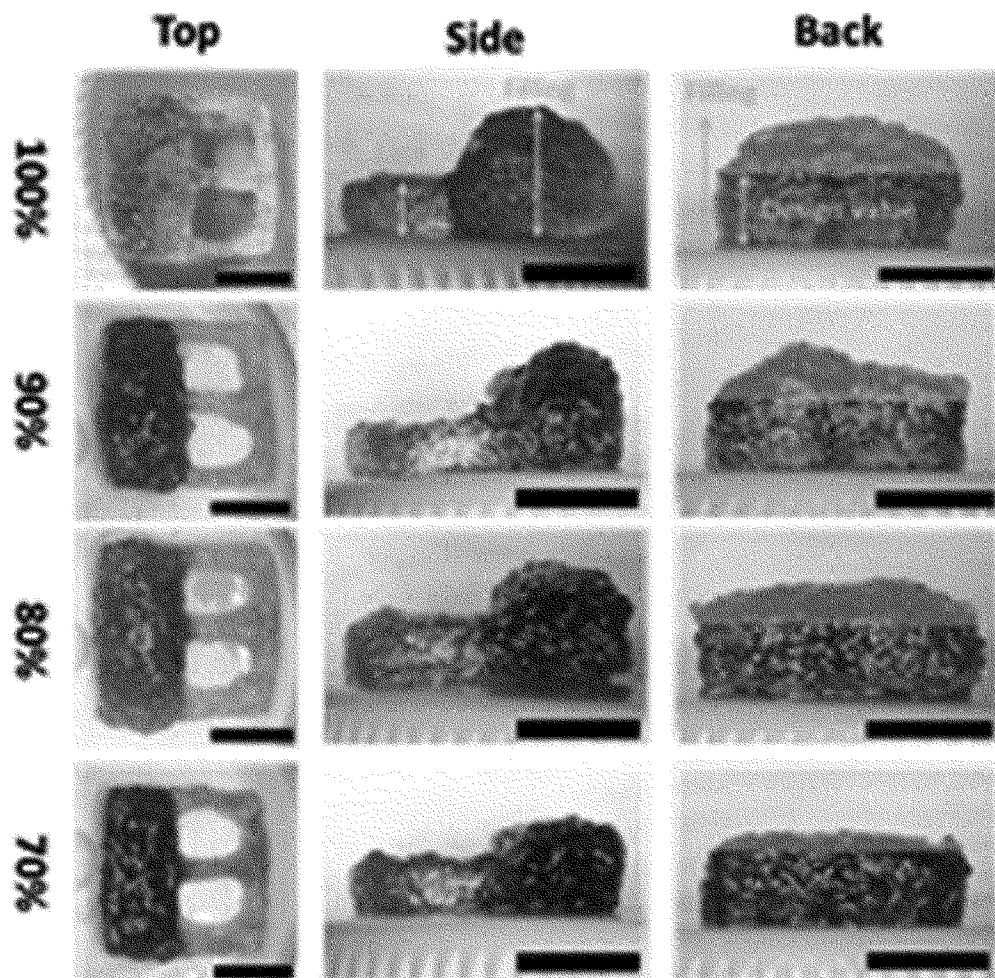
[도6]



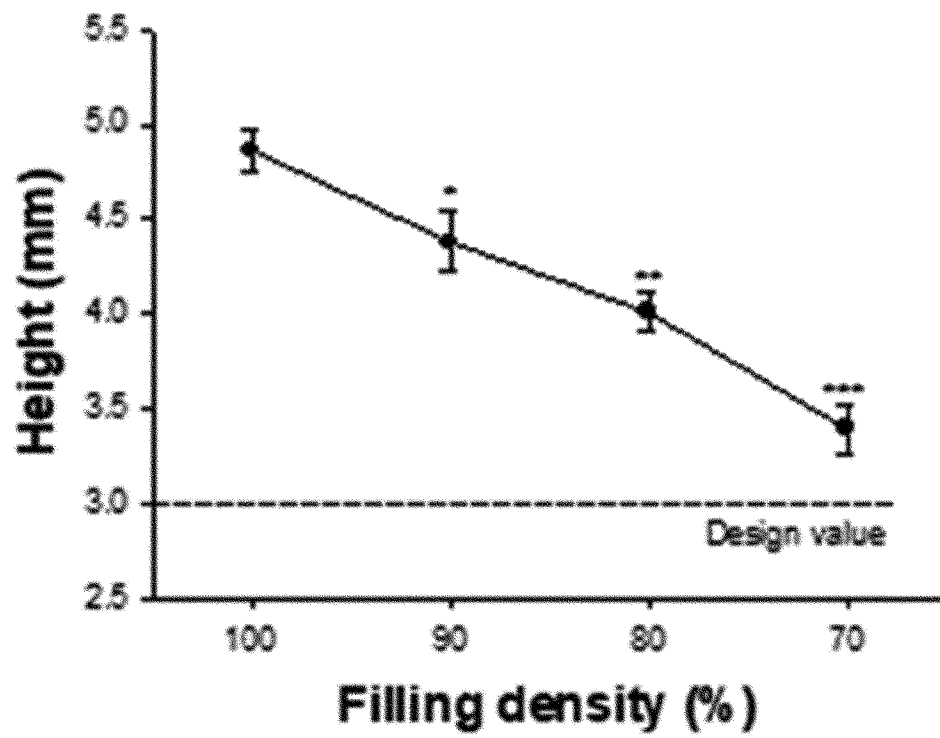
[도7a]



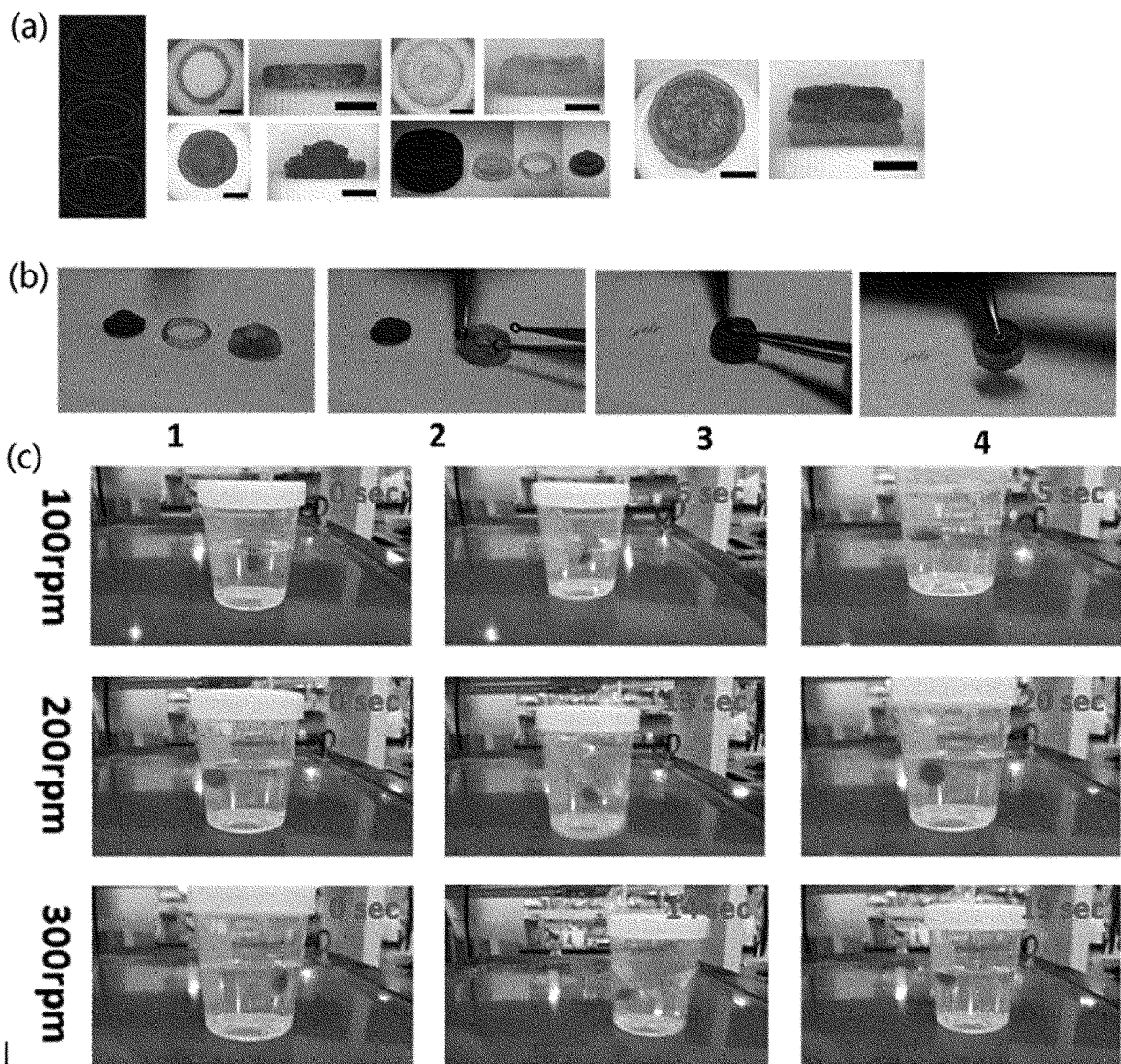
[도7b]



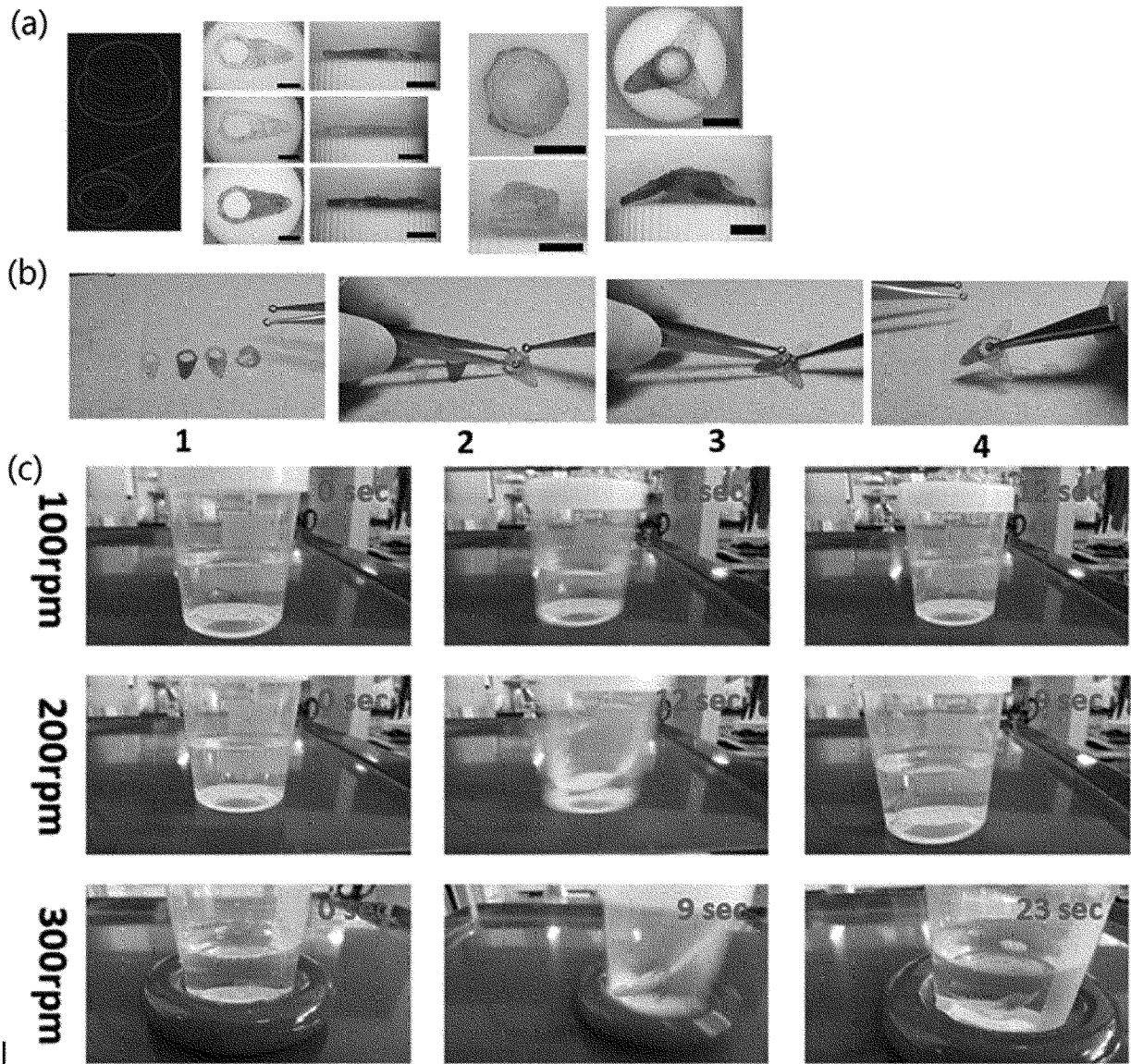
[도7c]



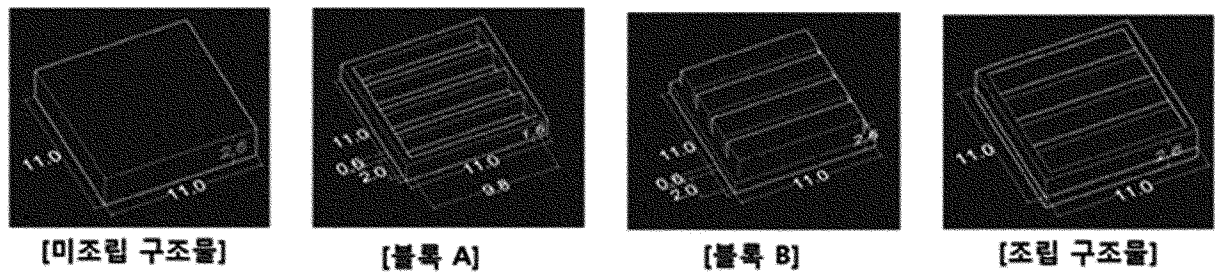
[도8]



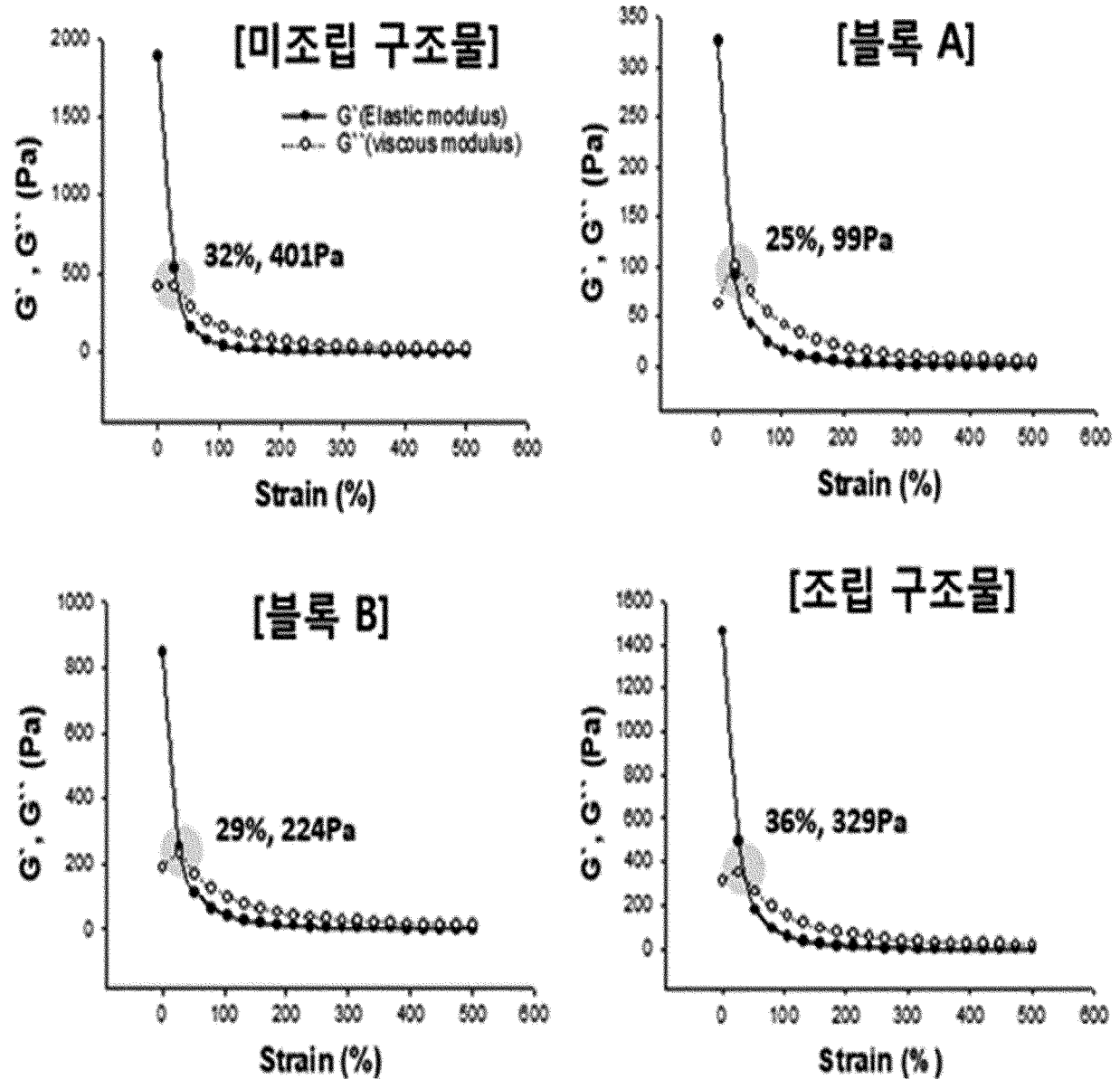
[도9]



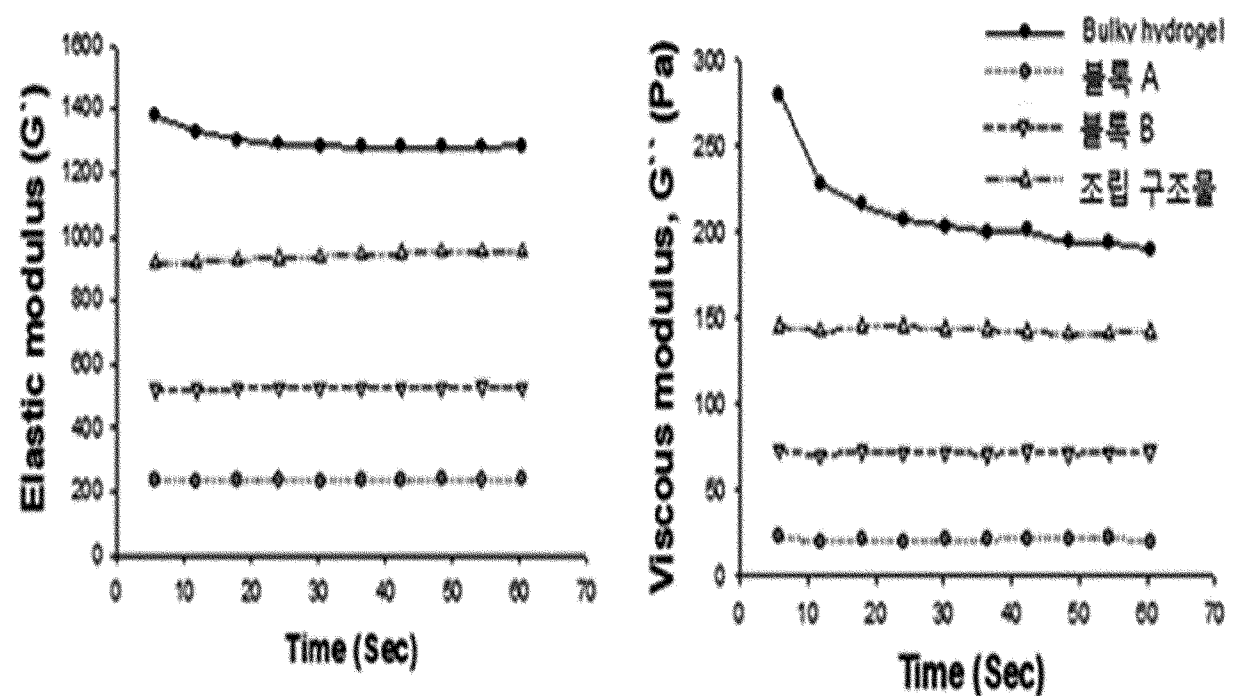
[도10a]



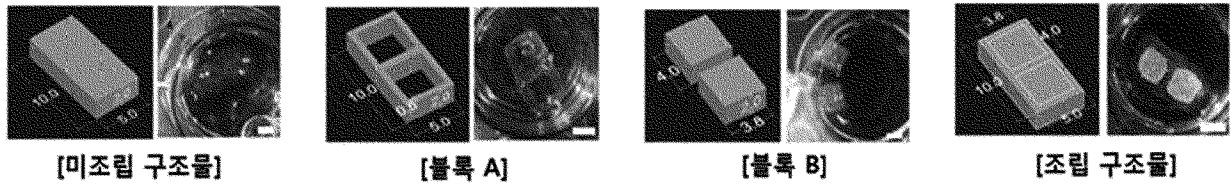
[도10b]



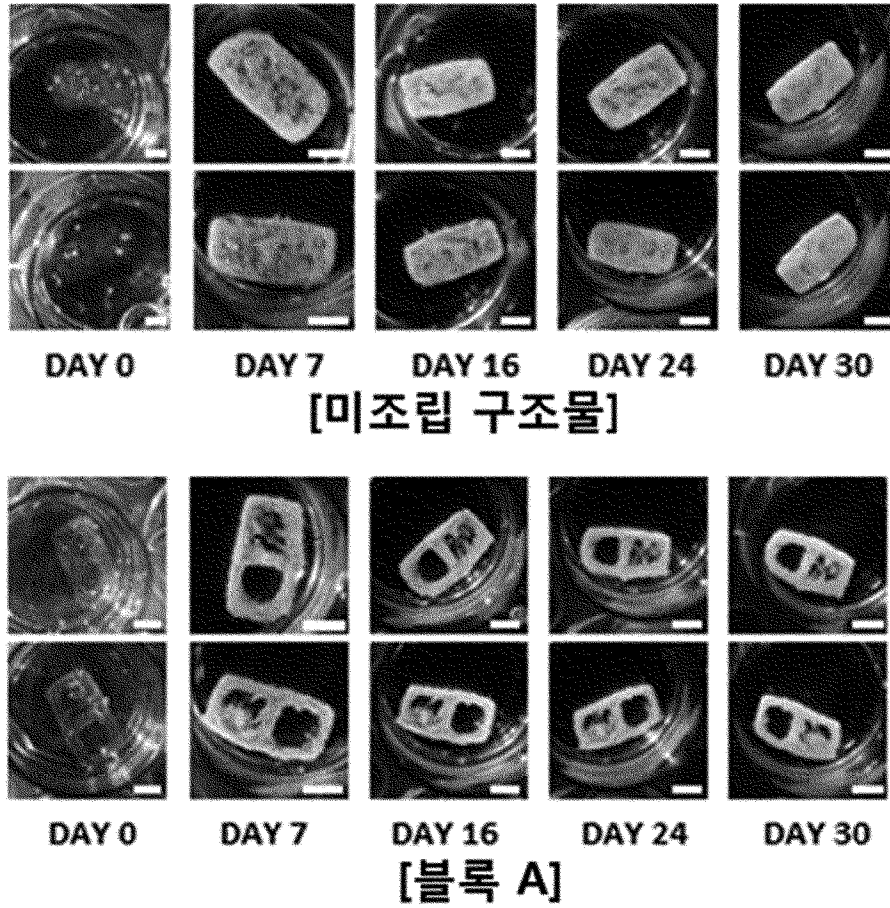
[도10c]



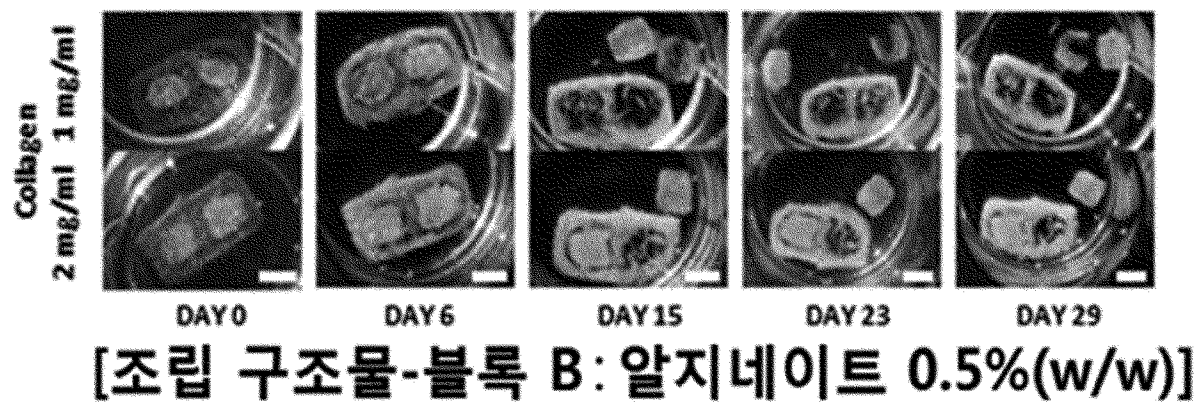
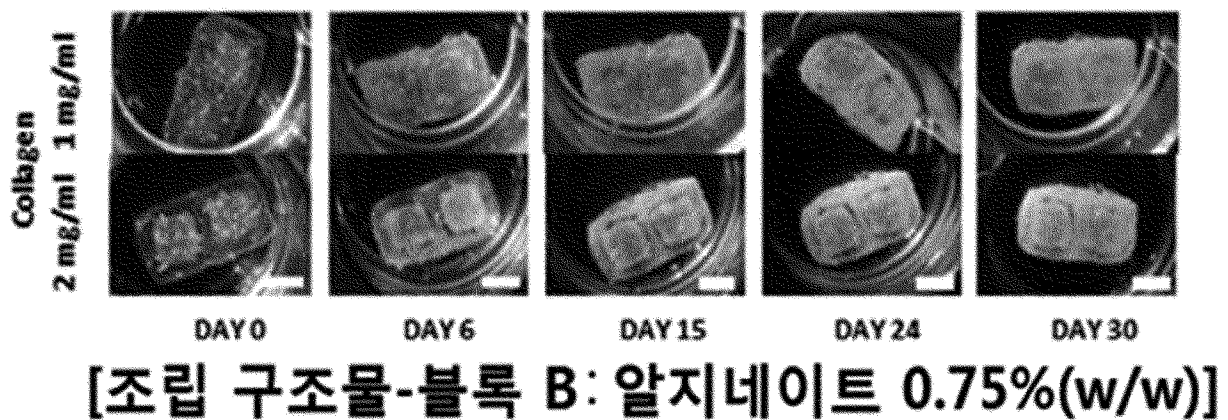
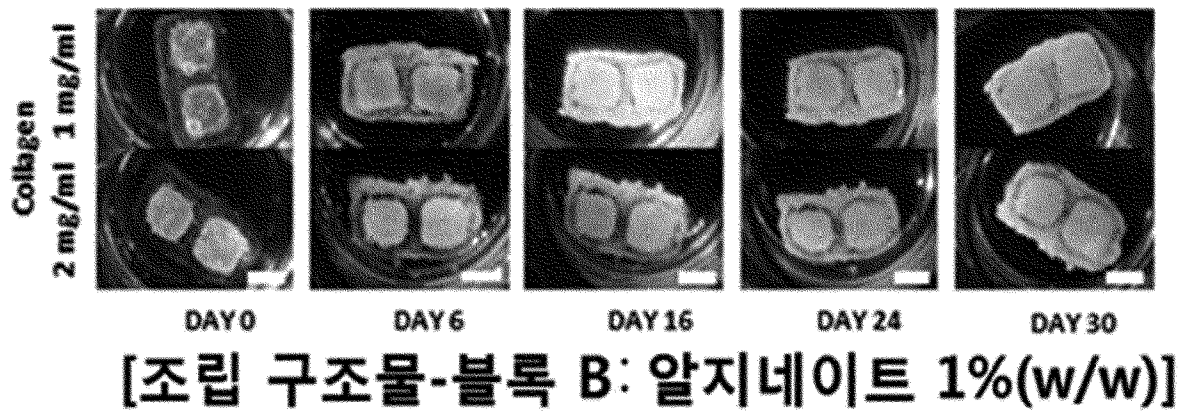
[도11a]



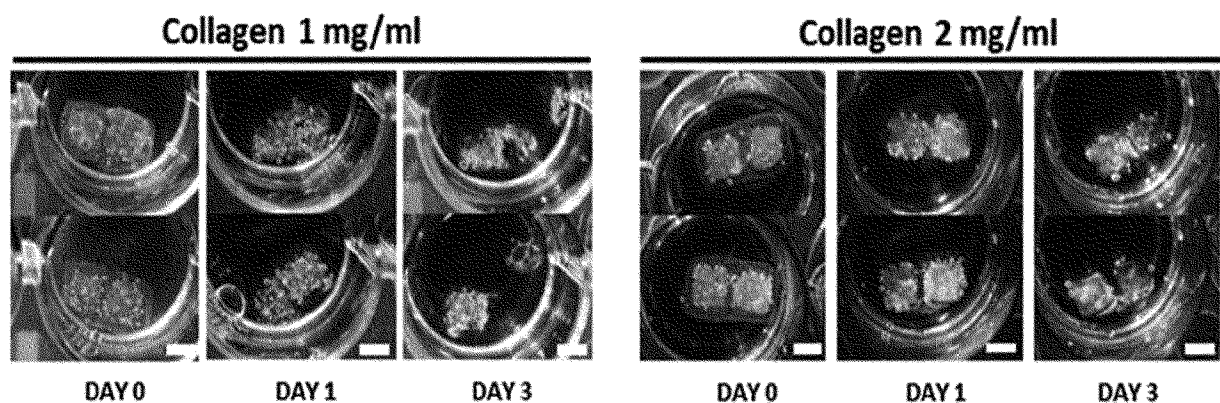
[도11b]



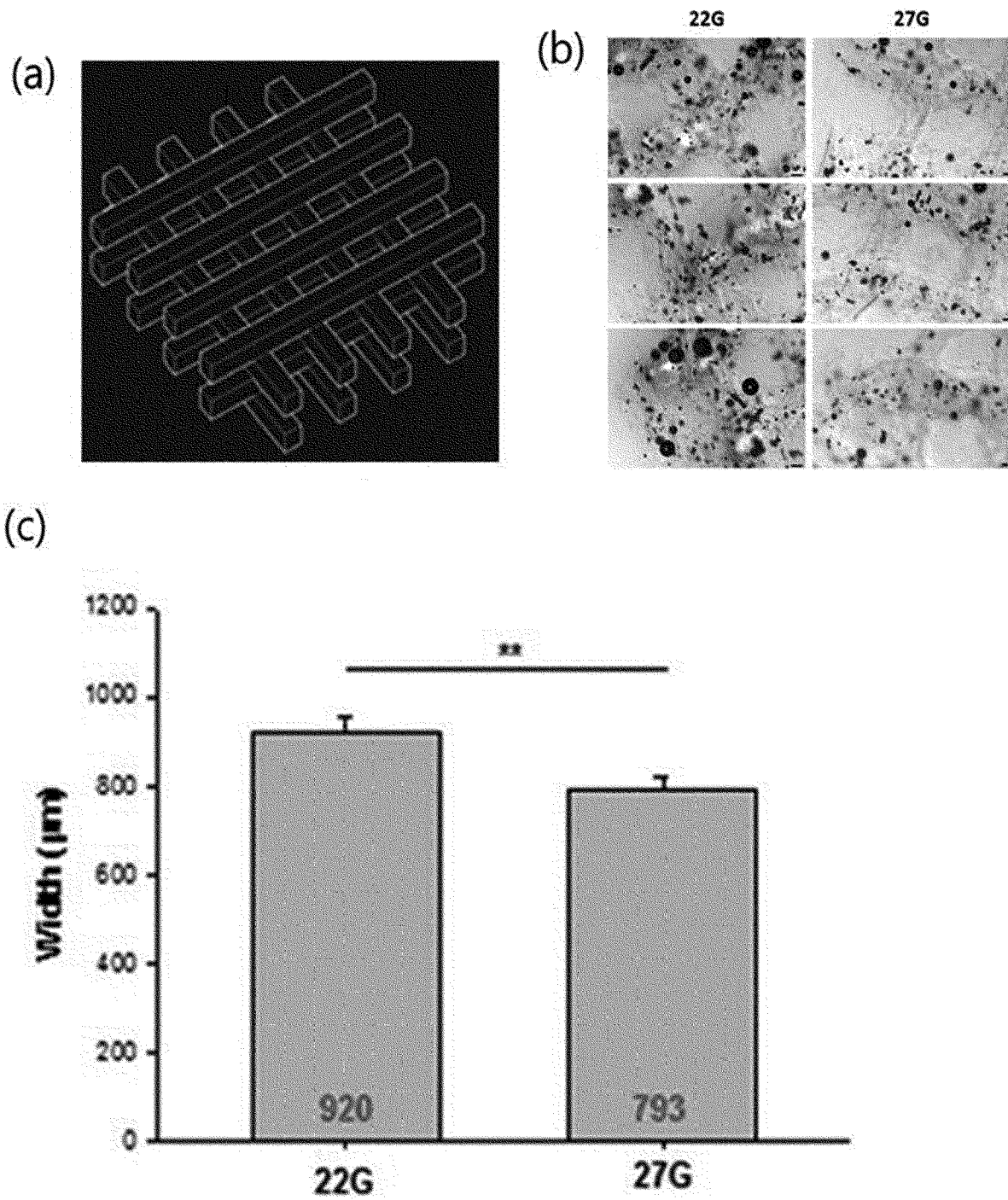
[도11c]



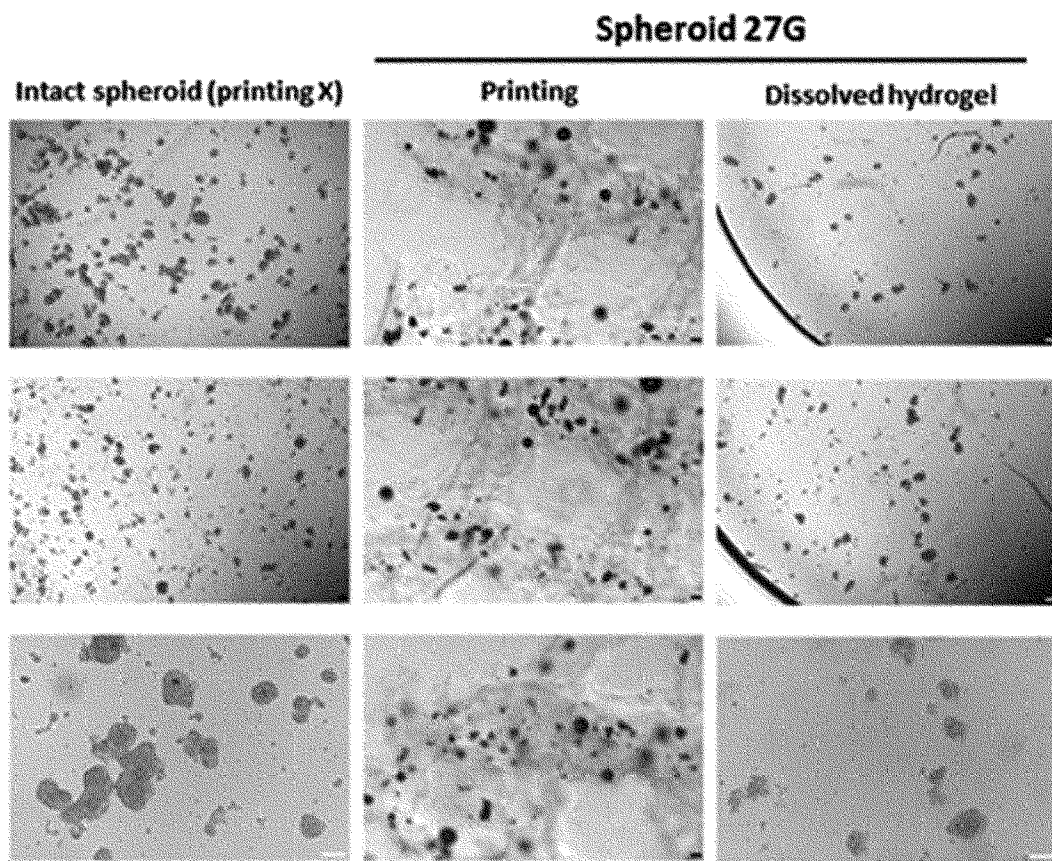
[도12]



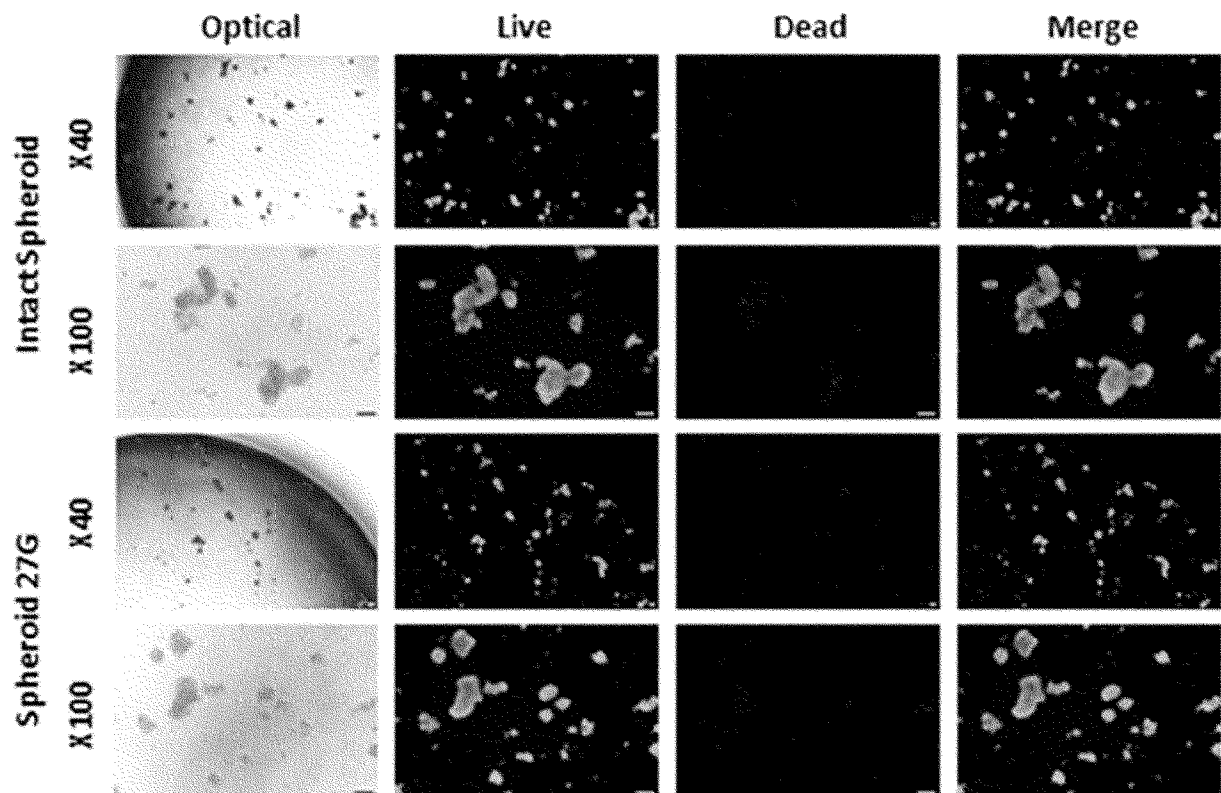
[도13]



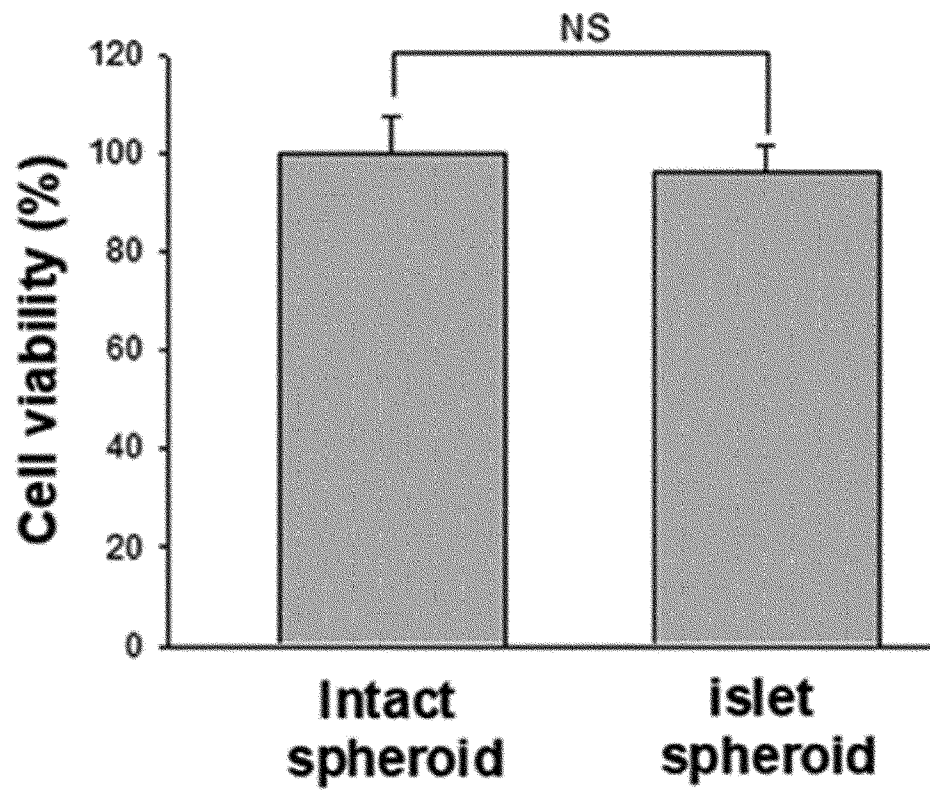
[도14a]



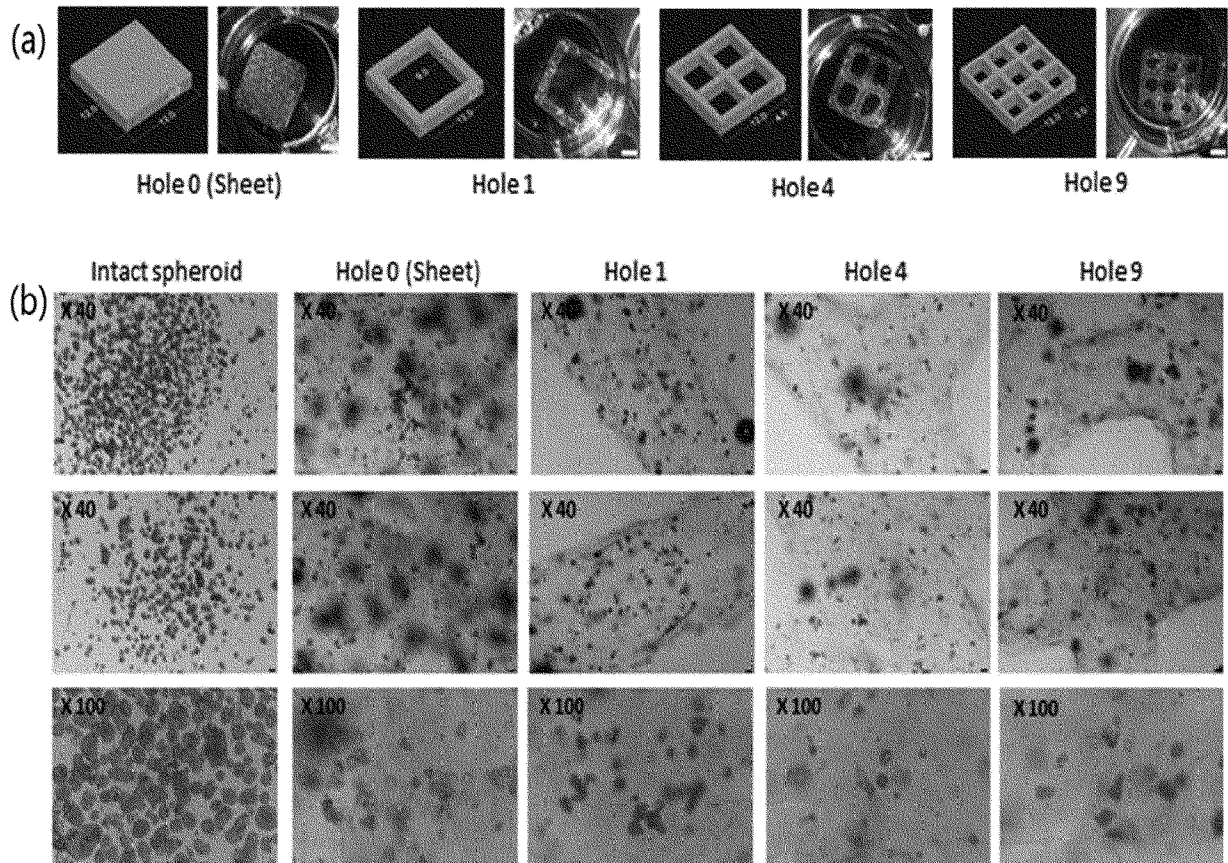
[도14b]



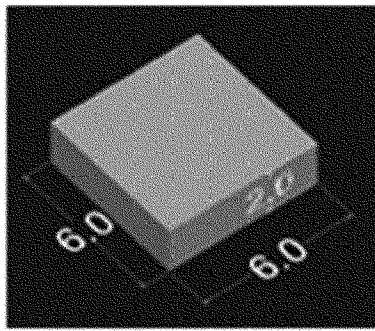
[도14c]



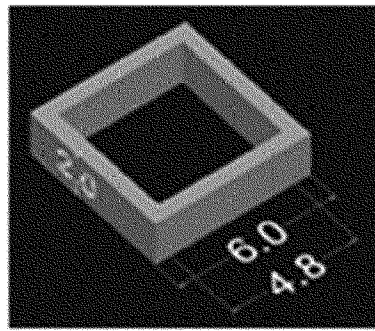
[도15]



[도16a]

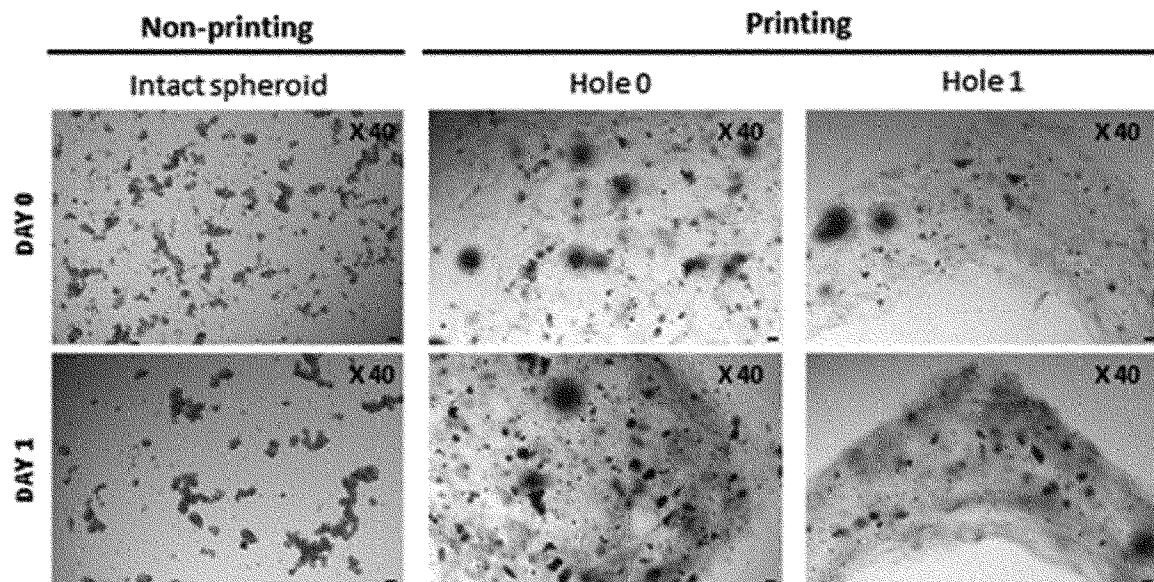


Hole 0

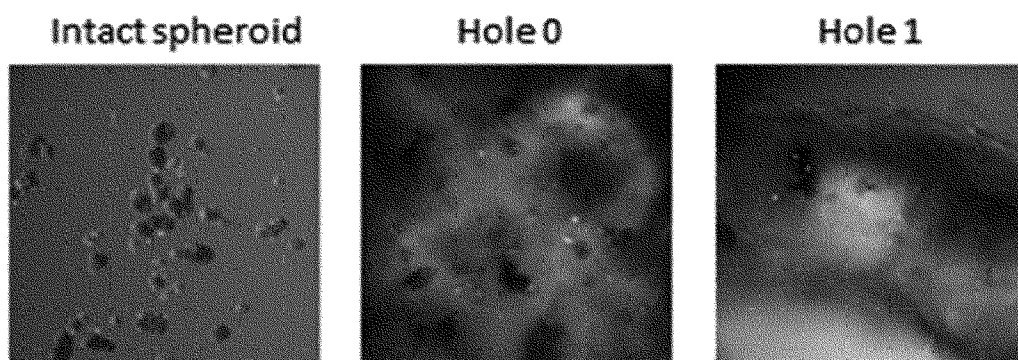


Hole 1

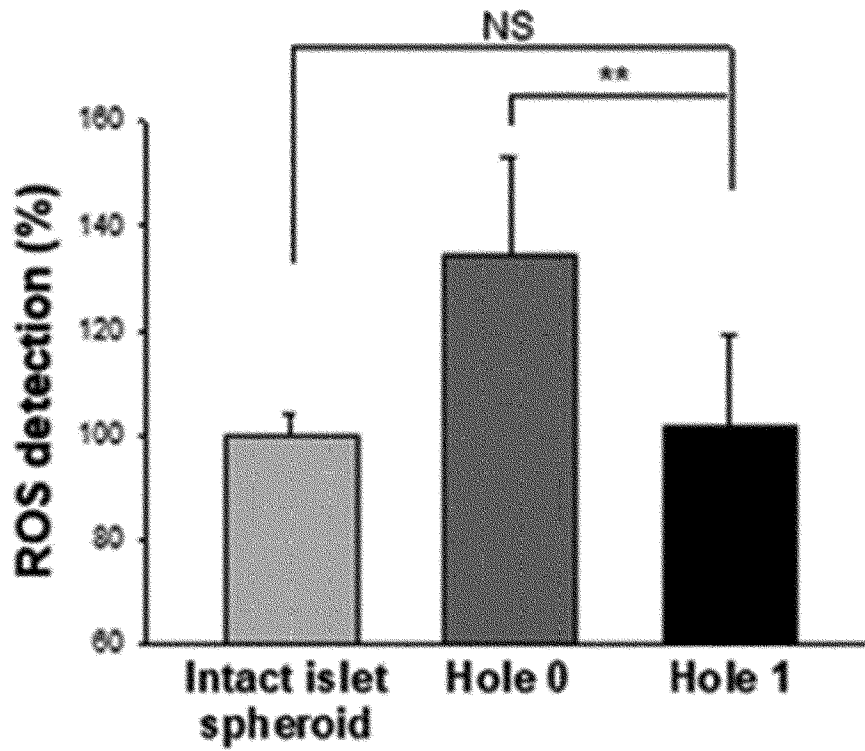
[도16b]



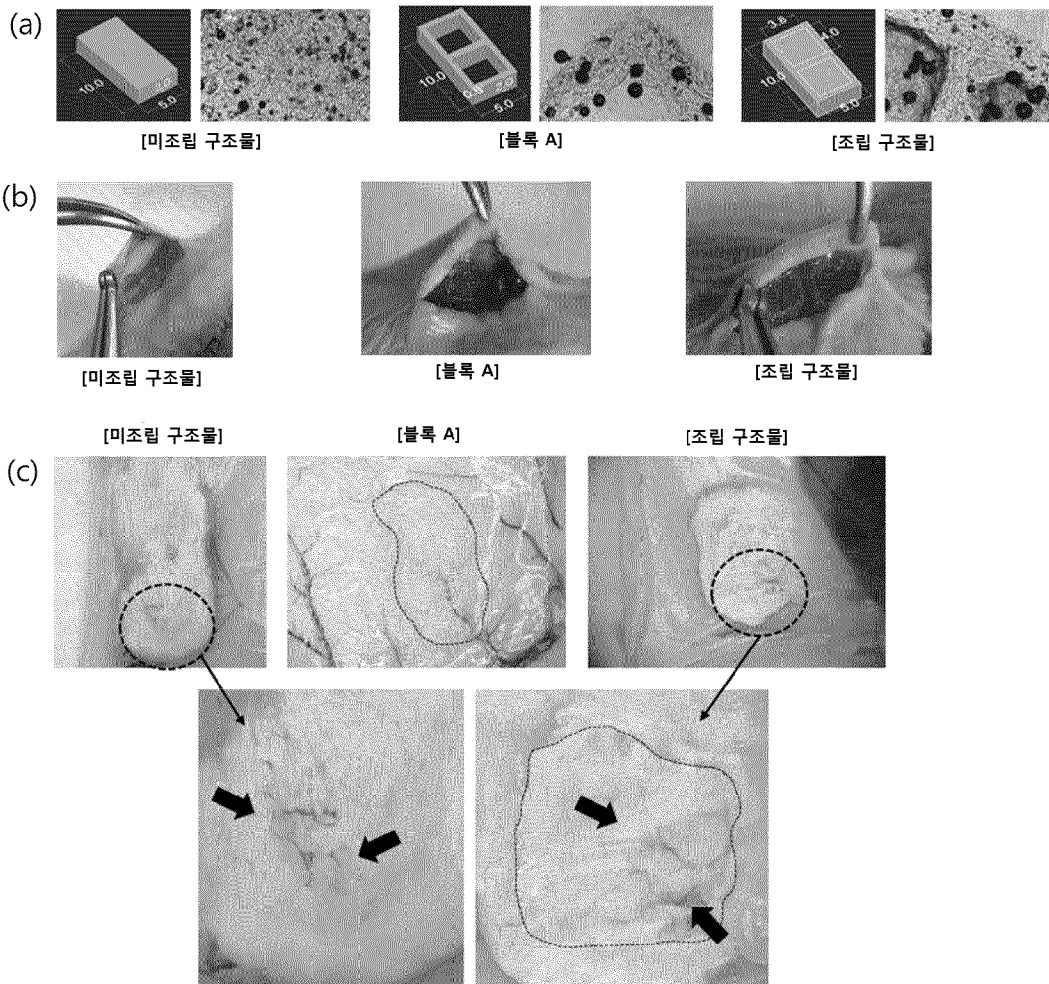
[도16c]



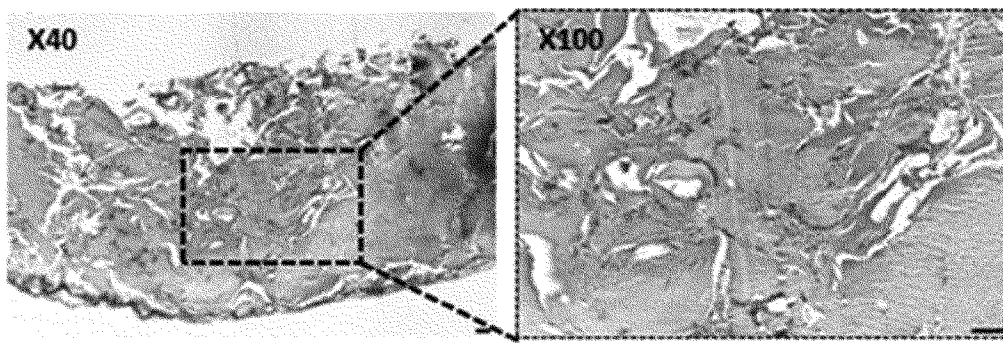
[도16d]



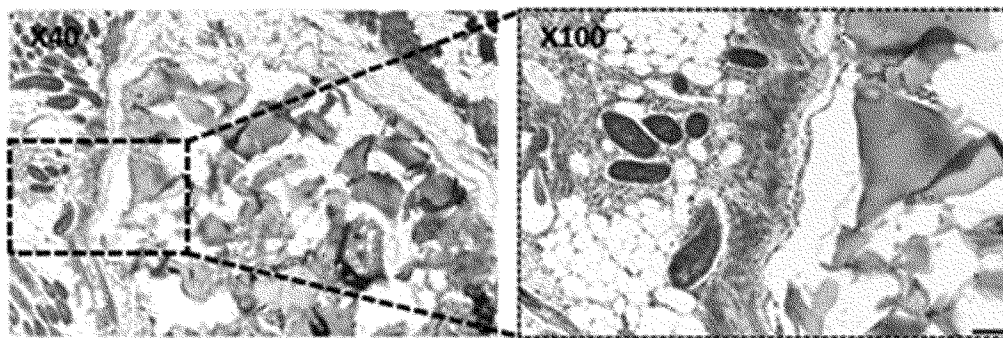
[도17]



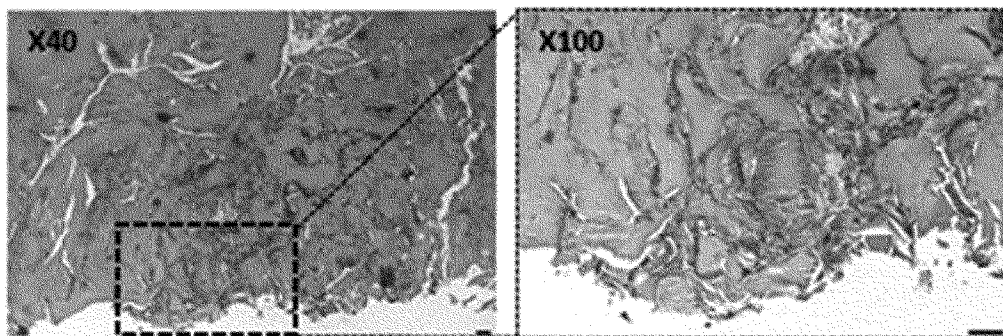
[도18]



[미조립 구조물]



[블록 A]



[조립 구조물]

[도 19]

