(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0147957
(43) 공개일자 2021년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61F 2/06 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61F 2/062 (2013.01)
A61L 27/3808 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0068221
(22) 출원일자 2021년05월27일
심사청구일자 2021년05월27일
(30) 우선권주장
1020200063857 2020년05월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국재료연구원
경상남도 창원시 성산구 창원대로 797 (상남동)
(72) 발명자
최영진
경상남도 창원시 성산구 상남로 35 (상남동)
윤희숙
경상남도 창원시 진해구 경화로21번길 37 The Avenue (경화동)
박홍현
경상남도 창원시 성산구 가음동
(74) 대리인
이원희

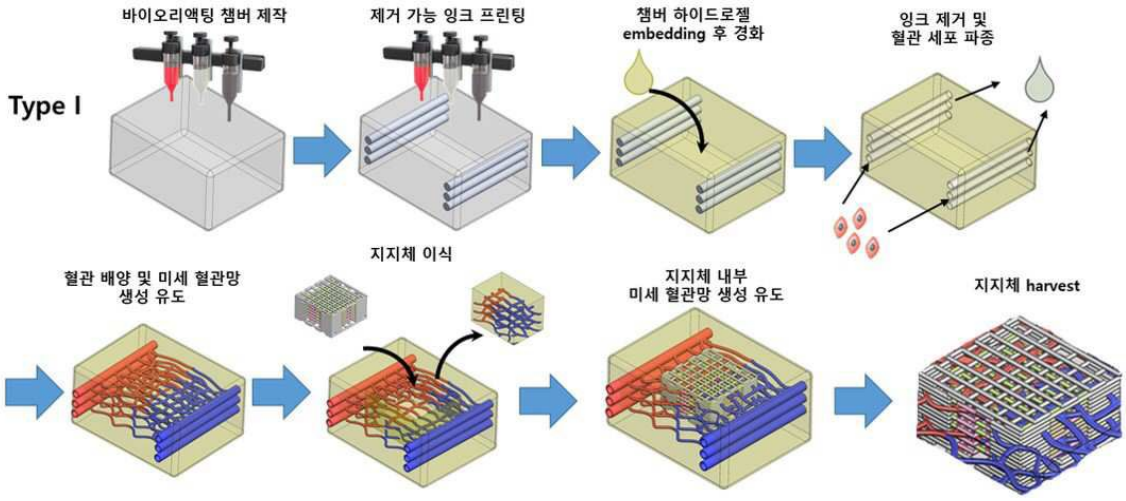
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **3차원 구조체 내부 관류 가능 미세 혈관 생성을 위한 바이오리액팅 시스템**

(57) 요 약

바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계; 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계; 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계; 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계; 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계; 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계; 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계; 및 상기 지지체 내부에 미세혈관 생성을 유도하여 지지체에 미세혈관을 생성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법이 개시된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61L 27/507 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2533/10 (2013.01)
C12N 2533/30 (2013.01)
C12N 2533/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711120189
과제번호	PNK7490
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	국가과학기술연구회
연구사업명	한국재료연구원 운영비지원사업
연구과제명	(생체소재) 생체 세라믹기반 세포 적층조형 기술(2/5)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국재료연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;

지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계; 및

상기 지지체 내부에 미세혈관 생성을 유도하여 지지체에 미세혈관을 생성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오리액팅 챔버는 3D 프린팅으로 준비되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이오리액팅 챔버는 폴리디메틸실록세인 (PDMS, Polydimethylsiloxane), 아가로즈 (Agarose), 폴리카프로락톤 (PCL, Polycaprolactone) 및 에틸렌비닐아세테이트 (PEVA, Poly (ethylene-vinyl acetate))로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 소재로 준비되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크는 온도 감응성 하이드로젤을 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 온도 감응성 하이드로젤은 Pluronic, 젤라틴 및 아가로즈로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크는 혈관세포를 포함하는 첨가제를 더 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 도관을 형성하기 위한 구조의 3D 프린팅 시 사용되는 노즐의 직경은 200 ㎛ 내지 700 ㎛인 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤은 젤라틴(Gelatin), 피브린(fibrin), 알지네이트(alginate), 히알루론산(hyaluronic acid), 키토산(chitosan), 실크 피브로인(silk fibroin) 및 탈세포화 세포외기질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 물질을 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 하이드로젤은 상기 물질을 10 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤은 혈관성장인자, 기본 섬유 아세포 성장 인자, 혈관성장인자 펩타이드, RGD 펩타이드, laminin, fibronectin, vitronectin, 섬유아세포, 골수줄기세포, 치수줄기세포 및 주피세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제를 더 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하는 방법은,

바이오리액팅 챔버의 온도를 5℃ 내지 30℃의 온도 범위로 조절하여 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 졸화시킨 후, 졸화된 잉크를 제거하는 것인 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 도관은 바이오리액팅 챔버 내에 서로 마주보며 위치하고,

서로 마주보며 위치하는 도관과 도관 사이의 거리는 500 ㎛ 내지 5 ㎜인 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 관류는 5 ㎕/min 내지 50 ㎕/min의 관류 속도로 수행되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 지지체는 생체 합성 고분자, 생체 천연 고분자, 금속 및 세라믹으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 물질로 형성된 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 지지체는 혈관성장인자, 기본 섬유 아세포 성장 인자, 혈관성장인자 펩타이드, RGD 펩타이드, laminin, fibronectin 및 vitronectin로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제를 더 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계는,

바이오리액팅 챔버의 하이드로젤 부분을 일부 제거하고, 준비된 지지체를 위치시킨 후, 하이드로젤을 이용하여 제거된 부분을 채워 가교시키는 것인 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 17

바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 위치시키는 단계; 및

바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법.

청구항 18

바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계; 및

상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;를 포함하는 혈관화된 세포 구조체 제조를 위한 시스템 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우기 전에 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 위치시키는 것을 포함하는 혈관화된 세포 구조체 제조를 위한 시스템 제조방법.

청구항 20

제1항 또는 제17항의 제조방법으로 제조된 혈관화된 세포 구조체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 3차원 구조체 내부 관류 가능 혈관 생성을 위한 바이오리액팅 시스템에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3차원 바이오 프린팅 방식에 의해 제작되는 관류 가능 미세 혈관 생성을 위한 바이오리액팅 시스템 제작 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 조직공학에서는 지지체에 세포를 파종하고 결손부위에 이식하여 조직 재생을 유도하고 있음. 지지체 내부의 세포는 영양소와 산소의 공급을 확산에 의존하고 있음. 지지체의 크기가 커질경우 세포는 확산범위의 한계 (<500 ㎛)로 인해 저산소증으로 사멸하게 됨. 이로 인해 대면적의 지지체를 제작할 수 없는 한계가 존재함. 인체 조직의 세포는 혈관을 통해 영양소와 산소의 공급을 받고있기 때문에, 효과적인 조직 재생을 위해서는 혈관 도입이 필수적이다 (도 1 참조).

[0004] 현재까지는 지지체의 혈관화를 위해서 단순히 혈관세포의 혈관 생성을 유도하고 있다.

[0005] 혈관세포는 모세혈관 like 한 구조를 형성하지만, open-lumen을 형성할 수 없기 때문에 지지체 내부의 세포에게 영양소와 산소의 공급 기능을 수행할 수 없다 (도 2 참조).

[0006] 이러한 문제점을 극복하기 위해, 미세 공극 (micro pore)을 인공 지지체 내부에 도입하는 방법 등이 시도되고 있으나, 구조체 내부의 세포는 영양소와 산소의 공급을 여전히 확산에 의존하고 있기 때문에 대면적의 구조체 제작은 어려운 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 생체 외 혈관 생성 장치 (KR 10-2012-0040613)

(특허문헌 0002) 신경혈관단위-온-칩 및 그 칩의 제조방법 (KR 10-2017-0012464)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 측면에서의 목적은 3차원 지지체 내부에 형성이 어려운 모세혈관 생성 및 그를 통한 3차원 지지체 구조물 내 세포에 영양소 및 산소 공급이 어려운 상기한 문제점을 해결하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면에서

[0011] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0012] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

[0013] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

[0014] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

[0015] 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

[0016] 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;

[0017] 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계; 및

[0018] 상기 지지체 내부에 미세혈관 생성을 유도하여 지지체에 미세혈관을 생성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법이 제공된다.

[0020] 또한, 본 발명의 다른 측면에서

[0021] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0022] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

[0023] 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 위치시키는 단계; 및

[0024] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

[0025] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

[0026] 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

[0027] 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법이 제공된다.

[0029] 나아가, 본 발명의 또 다른 측면에서

[0030] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0031] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

[0032] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계; 및

[0033] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;를 포함하는 혈관화된 세포 구조체 제조

를 위한 시스템 제조방법이 제공된다.

[0035] 더욱 나아가, 본 발명의 다른 일 측면에서

[0036] 상기의 제조방법으로 제조된 혈관화된 세포 구조체가 제공된다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 일 측면에서 제공되는 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에 의하면, 혈관화된 세포 구조체 제작이 가능함으로, 실제 조직과 유사한 특성을 갖는 3차원 지지체를 제작할 수 있다.

[0039] 고온 후처리 된 세라믹 소재, 금속 소재로 이루어진 지지체에도 미세혈관망 생성을 유도할 수 있다.

[0040] 미세혈관망이 구현된 3차원 세포 구조체 제작이 가능하기 때문에, 신약 개발 및 질병 model test를 위한 in vitro model로써 활용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 조직공학에서 지지체에 세포를 파종하고 결손부위에 이식하여 조직 재생을 유도하는 모식도를 나타낸 것이고;

도 2는 지지체의 혈관화를 위해 혈관세포의 혈관 생성을 유도하는 모식도를 나타낸 것이고;

도 3은 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법의 일례를 모식도로 나타낸 것이고;

도 4는 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법의 일례를 모식도로 나타낸 것이고;

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라, 혈관세포 파종 공정을 나타낸 사진이고;

도 6은 본 발명의 일 실험예에 따라, 생성된 혈관 이미지를 나타낸 것이고;

도 7은 본 발명의 일 실험예에 따라, 생성된 혈관의 장벽기능성 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면을 참조하여 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0044] 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 발명에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0045] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0046] 명세서 및 청구범위 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 포함한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0048] 본 발명의 일 측면에서

[0049] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0050] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

[0051] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

[0052] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

[0053] 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

[0054] 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;

[0055] 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계; 및

[0056] 상기 지지체 내부에 미세혈관 생성을 유도하여 지지체에 미세혈관을 생성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법이 제공된다.

[0058] 이때, 도 1의 모식도를 통해 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법을 나타내었으며,

[0059] 이하, 도 1의 모식도를 참조하여 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에 대하여 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0061] 먼저, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계를 포함한다.

[0062] 상기 단계에서는 바이오리액팅 시스템을 둘러싸고 있는 챔버 벽을 제작하기 위해, 3D 프린팅 등의 공정을 통해서 실리콘 계열 등의 소재를 적층하여 바이오리액팅 챔버를 준비한다.

[0063] 상기 바이오리액팅 챔버는 3D 프린팅으로 준비될 수 있다.

[0064] 상기 바이오리액팅 챔버는 폴리디메틸실록세인 (PDMS, Polydimethylsiloxane), 아가로즈 (Agarose), 폴리카프로락톤 (PCL, Polycaprolactone) 및 에틸렌비닐아세테이트 (PEVA, Poly (ethylene-vinyl acetate)) 등의 소재를 사용하여 준비될 수 있으나, 이에 국한하지 않으며, 바람직한 일례로 폴리디메틸실록세인 소재를 사용하여 준비될 수 있다.

[0066] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계를 포함한다.

[0067] 상기 단계에서는 바이오리액팅 챔버에 관류 가능한 도관을 형성시키기 위해 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 구조를 프린팅한다.

[0068] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크는 온도 감응성 하이드로젤을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 온도 감응성 하이드로젤은 Pluronic, 젤라틴 및 아가로즈 등이 사용될 수 있으며, 바람직한 일례로 Pluronic을 사용할 수 있다.

[0069] 도관의 직경은 3D 프린팅 시 사용되는 노즐의 크기에 의해 결정될 수 있다. 상기 도관을 형성하기 위한 구조의 3D 프린팅 시 사용되는 노즐의 직경은 200 ㎛ 내지 700 ㎛일 수 있고, 200 ㎛ 내지 600 ㎛일 수 있고, 200 ㎛ 내지 500 ㎛일 수 있고, 250 ㎛ 내지 500 ㎛일 수 있고, 250 ㎛ 내지 650 ㎛일 수 있고, 300 ㎛ 내지 600 ㎛일 수 있고, 400 ㎛ 내지 600 ㎛일 수 있고, 450 ㎛ 내지 550 ㎛일 수 있다.

[0070] 또한, 사기 도관을 형성하기 위한 구조는 서로 마주하며 위치할 수 있으며, 구조와 구조 사이의 거리는 500 ㎛ 내지 5 ㎜일 수 있고, 600 ㎛ 내지 4 ㎜일 수 있고, 700 ㎛ 내지 3 ㎜일 수 있고, 800 ㎛ 내지 2 ㎜일 수

있고, 900 ㎛ 내지 1 ㎜일 수 있고, 500 ㎛ 내지 4 ㎜일 수 있고, 500 ㎛ 내지 3 ㎜일 수 있고, 500 ㎛ 내지 2 ㎜일 수 있고, 500 ㎛ 내지 1 ㎜일 수 있고, 500 ㎛ 내지 800 ㎛일 수 있고, 500 ㎛ 내지 700 ㎛일 수 있고, 500 ㎛ 내지 600 ㎛일 수 있다.

[0071] 나아가, 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크는 혈관세포를 포함하는 첨가제를 더 포함할 수 있다. 일례로, 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크는 혈관세포를 1×10^6 cells/ml 내지 5×10^7 cells/ml 농도로 포함할 수 있고, 5×10^6 cells/ml 내지 3×10^7 cells/ml 농도로 포함할 수 있고, 7×10^6 cells/ml 내지 2×10^7 cells/ml 농도로 포함할 수 있다.

[0073] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계를 포함한다.

[0074] 상기 단계에서는 상기에서 준비된 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채운 후 경화시킨다.

[0075] 상기 하이드로젤은 젤라틴(Gelatin), 피브린(fibrin), 알지네이트(alginate), 히알루론산(hyaluronic acid), 키토산(chitosan), 실크 피브로인(silk fibroin) 및 탈세포화 세포외기질 등의 물질이 사용될 수 있으며, 바람직한 일례로 피브린을 사용할 수 있다.

[0076] 상기 하이드로젤은 상기 물질을 10 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로 포함할 수 있고, 10 mg/ml 내지 70 mg/ml의 농도로 포함할 수 있고, 바람직하게는 10 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 포함할 수 있다. 상기 물질이 10 mg/ml 미만으로 포함되는 경우, 하이드로젤의 기계적 물성이 낮아 배양액 관류 시, 관류 압력에 의해 도관 손상이 일어날 수 있다. 상기 물질이 50 mg/ml 초과하여 포함되는 경우, 하이드로젤의 기계적 물성이 높아, 혈관 세포가 내부에서 뻗어 성장할 수 없는 문제점이 발생할 수 있다. 만약, 젤라틴을 사용하는 경우, 5 wt% 내지 10 wt%의 농도로 사용할 수 있다.

[0077] 또한, 상기 하이드로젤은 세포의 성장 및 부착을 증진시키는 혈관성장인자, 기본 섬유 아세포 성장 인자, 혈관성장인자 펩타이드, RGD 펩타이드, laminin, fibronectin, vitronectin 등의 첨가제를 더 포함할 수 있고, 혈관세포가 미세혈관망의 생성을 촉진할 수 있게 도와주는 섬유아세포, 골수줄기세포, 치수줄기세포 및 주피세포 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[0078] 나아가, 상기 첨가제는 1×10^6 cells/ml 내지 5×10^7 cells/ml 농도로 포함할 수 있고, 구체적인 일례로 섬유아세포를 첨가제로 사용하여 1×10^7 cells/ml 농도로 포함할 수 있다.

[0080] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계를 포함한다.

[0081] 상기 단계에서는 바이오리액팅 챔버에 프린팅했던 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성한다.

[0082] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하는 방법은 바이오리액팅 챔버의 온도를 5℃ 내지 30℃의 온도 범위로 조절하여 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 졸화시킨 후, 졸화된 잉크를 제거하는 공정을 통해 수행될 수 있다.

[0083] 일례로, 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크로 Pluronic을 적용하는 경우, 5℃ 내지 20℃, 바람직하게는 20℃ 미만의 온도 범위로 조절하여 졸화시킨 후, 졸화된 잉크를 제거할 수 있다. 여기서 상기 Pluronic은 20℃ 이상의 온도에서 젤 상태이며, 20℃ 미만의 온도에서 졸 상태로 존재할 수 있어 졸화를 유도할 수 있다. 이때, 상기 Pluronic은 20 wt% 내지 40 wt% 농도로 사용되는 것이 바람직하다.

[0084] 다른 일례로, 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크로 Gelatin을 적용하는 경우, 20℃ 내지 30℃, 바람직하게는 20℃ 이상의 온도 범위로 조절하여 졸화시킨 후, 졸화된 잉크를 제거할 수 있다. 여기서 상기 Gelatin은 20℃ 미만의 온도에서 젤 상태이며, 20℃ 이상의 온도에서 졸 상태로 존재할 수 있어 졸화를 유도할 수 있다. 이때, 상기 Gelatin은 하이드로젤 내에 5 wt% 내지 20 wt% 농도로 포함되는 것이 바람직하다.

[0085] 상기 단계를 통해 도관은 바이오리액팅 챔버 내에 서로 마주보며 위치하고, 서로 마주보며 위치하는 도관과 도관 사이의 거리는 500 ㎛ 내지 5 ㎜일 수 있다.

[0087] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계를 포함한다.

[0088] 상기 단계에서는 전단계를 통해 형성된 도관에 혈관세포를 파종한다.

[0089] 상기 혈관세포는 1×10^{6} cells/ml 내지 5×10^{7} cells/ml 농도를 사용할 수 있고, 구체적인 일례로, 1×10^{7} cells/ml 농도를 사용할 수 있다. 배양액에 분산되어 있는 혈관세포를 도관에 주입하여 30분 내지 2시간 동안 파종을 실시한다. 이때, 도관에 골고루 파종하기 위해, 5분 내지 15분, 바람직하게는 7분 내지 12분, 구체적인 일례로 10분 간격으로 바이오리액팅 챔버를 회전시킬 수 있다. 바이오리액팅 챔버의 회전은 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 도관을 형성하기 위한 구조를 형성하는 공정에서 잉크에 혈관세포를 첨가제로서 봉입하여 프린팅 할 시에 생략될 수 있다.

[0091] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계를 포함한다.

[0092] 상기 단계에서는 혈관세포를 배양하여 미세혈관을 형성하고자 도관에 혈관세포 배양액을 관류 시키고, 배양하여 미세혈관망을 형성한다.

[0093] 상기 관류는 5 ㎕/min 내지 50 ㎕/min의 관류 속도로 수행되는 바람직하고, 10 ㎕/min 내지 40 ㎕/min의 관류 속도로 수행되는 것이 더욱 바람직하고, 15 ㎕/min 30 ㎕/min의 관류 속도로 수행되는 것이 가장 바람직하고, 20 ㎕/min 30 ㎕/min의 관류 속도로 수행되는 것이 더욱 바람직하다.

[0095] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계를 포함한다.

[0096] 상기 단계에서는 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 것으로 바이오리액팅 챔버의 하이드로젤 부분을 부분적으로 제거한 후, 지지체를 이식할 수 있다.

[0097] 구체적으로, 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 이식하는 단계는, 바이오리액팅 챔버의 하이드로젤 부분을 일부 제거하고, 준비된 지지체를 위치시킨 후, 하이드로젤을 이용하여 제거된 부분을 채워 가교시키는 것일 수 있다.

[0098] 일례로, 미세혈관망이 형성된 바이오리액팅 챔버의 하이드로젤 부분 일부를 바이옵시펀치로 제거하고, 그 자리에 지지체를 위치시킨다. 지지체 위치 후, 하이드로젤을 이용하여 제거된 부분을 채워 가교 시킬 수 있다.

[0099] 이때, 지지체는 PCL, PLGA, PLA, PLLA 등의 생체 합성 고분자, Alginate, gelatin, silk fibroin, chitosan, hyaluronic acid, fibrin 등의 생체 천연 고분자, Magnesium, Titanium 등의 금속, hydroxyapatite, tricalcium phosphate 등의 세라믹 등으로 제작된 지지체를 사용할 수 있으며, 이미 세포가 파종되어 배양된 지지체를 사용할 수 있다.

[0100] 미세혈관망 형성 촉진을 위해 상기 지지체에 혈관성장인자, 기본 섬유 아세포 성장 인자, 혈관성장인자 펩타이드, RGD 펩타이드, laminin, fibronectin, vitronectin 등의 첨가제를 더 포함시킬 수 있다.

[0102] 다음으로, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 상기 지지체 내부에 미세혈관 생성을 유도하여 지지체에 미세혈관을 생성하는 단계를 포함한다.

[0103] 상기 단계에서는 이미 형성된 미세혈관망이 지지체 내부로 뻗어 지지체 내부로 미세혈관망이 형성될 수 있다.

[0105] 또한, 본 발명의 다른 측면에서

[0106] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0107] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로

형성하는 단계;

[0108] 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 위치시키는 단계; 및

[0109] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계;

[0110] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;

[0111] 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계;

[0112] 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;를 포함하는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법이 제공된다.

[0114] 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 도 2의 모식도를 통해 나타내었으며, 도 2의 모식도를 참조하여 상세히 설명한다.

[0116] 먼저, 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에서 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계; 및 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;는 전술한 바와 동일하게 수행할 수 있으므로 이하에서 상세한 설명은 생략한다.

[0118] 다음으로, 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 지지체를 준비하여, 준비된 지지체를 바이오리액팅 챔버 내에 위치시키는 단계를 포함한다.

[0119] 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 바이오리액팅 챔버 내부를 하이드로젤로 채우기 전에 지지체를 도입한다.

[0120] 상기에서 사용되는 지지체는 전술한 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에서 사용된 지지체와 동일하다.

[0122] 다음으로, 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계를 포함한다.

[0123] 본 발명의 다른 측면에서 제공되는 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법은 지지체를 위치시킨 바이오리액팅 챔버 내부를 하이드로젤로 채우고 경화시킨다.

[0124] 상기에서 사용되는 하이드로젤 및 경화 방법은 전술한 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법과 동일하다.

[0126] 이후, 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계; 상기 도관에 혈관세포를 파종하는 단계; 및 상기 도관에 혈관세포 배양액을 관류시켜 배양하여 미세혈관을 형성하는 단계;를 수행하여 혈관화된 세포 구조체를 제조할 수 있다.

[0128] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에서

[0129] 바이오리액팅 챔버를 준비하는 단계;

[0130] 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 바이오리액팅 챔버 내에 도관을 형성하기 위한 구조를 3D 프린팅으로 형성하는 단계;

[0131] 바이오리액팅 챔버를 하이드로젤로 채우고 경화시키는 단계; 및

[0132] 상기 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 제거하여 도관을 형성하는 단계;를 포함하는 혈관화된 세포 구조체 제조

를 위한 시스템 제조방법이 제공된다.

[0133] 상기와 같은 공정을 통해 혈관화된 세포 구조체 제조를 위한 시스템을 형성할 수 있다.

[0134] 상기 혈관화된 세포 구조체 제조를 위한 시스템 제조방법은, 전술한 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에서 도관을 형성하는 단계까지 수행한 것으로, 전술한 바와 같은 공정을 사용하여 수행할 수 있다.

[0136] 나아가, 본 발명의 또 다른 일 측면에서

[0137] 상기의 제조방법으로 제조된 혈관화된 세포 구조체가 제공된다.

[0138] 본 발명의 일 측면에서 제공되는 혈관화된 세포 구조체의 제조방법에 의하면, 혈관화된 세포 구조체 제작이 가능함으로, 실제 조직과 유사한 특성을 갖는 3차원 지지체를 제작할 수 있다. 고온 후처리 된 세라믹 소재, 금속 소재로 이루어진 지지체에도 미세혈관망 생성을 유도할 수 있다. 미세혈관망이 구현된 3차원 세포 구조체 제작이 가능하기 때문에, 신약 개발 및 질병 model test를 위한 in vitro model로써 활용가능하다.

[0140] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다.

[0141] 단, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0143] **<제조예 1> 바이오리액팅 챔버 준비**

[0144] 바이오리액팅 챔버를 제조하기 위해 폴리디메틸실록세인 (PDMS, Polydimethylsiloxane)의 종류인 SE1700, Sylgard 184를 10:0 내지 7:3 비율로 혼합하고 각각의 curing agent를 10:1 비율로 혼합한다. 바이오리액팅 챔버를 제조하기 위한 잉크가 준비되면, 500 ㎛ 내지 1 ㎛의 직경을 갖는 노즐을 이용하여 5℃ 내지 15℃의 온도에서 50 mm/s 내지 500 mm/s의 속도 및 200 kPa 내지 600 kPa의 압력으로 잉크를 토출하여 챔버를 프린팅한다. 프린팅이 완료되면, 챔버를 60도에서 12시간 이상 큐어링을 실시한다.

[0146] **<제조예 2> 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크 준비**

[0147] 도관을 형성하기 위한 제거 가능한 잉크로 Pluronic-F127을 사용하였으며, 1X PBS에 Pluronic-F127을 30 wt% 첨가하여 준비하였다.

[0149] **<제조예 3> 하이드로젤 준비**

[0150] 바이오리액팅 챔버를 채우기 위한 하이드로젤로, fibrin을 사용하였으며, 1X PBS에 fibrinogen, thrombin 및 aprotinin을 각각 10 mg/ml, 1.25 U/ml 및 0.15 U/ml 첨가하여 하이드로젤을 준비하였다.

[0152] **<제조예 4> 지지체 준비**

[0153] 미세혈관망을 구축하기 위한 지지체로, tricalcium phosphate로 제작된 지지체를 사용하였다.

[0155] **<실시예 1> 바이오리액팅 시스템을 이용한 혈관화된 세포 구조체 제조**

[0156] 상기 제조예 1에서 준비된 바이오리액팅 챔버에 상기 제조예 2에서 준비된 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 사용하여 프린팅 하였다. 3D 프린팅의 노즐은 직경이 500 ㎛인 것으로 사용하였다. 미세혈관망을 생성하기 위한 도관과 도관 사이의 거리는 500 ㎛로 제조되도록 구조 사이의 거리를 형성하였다.

[0157] 이후, 상기 제조예 3에서 준비된 하이드로젤을 이용하여 바이오리액팅 챔버를 채웠으며, 37℃의 온도에서 30분

간 경화하였다.

[0158] 이후, 바이오리액팅 챔버의 온도를 20℃ 이하로 조정하여 30분 동안 노출시킴으로써 제거 가능한 3D 프린팅용 잉크를 졸화시켰으며, 졸화된 잉크를 제거함으로써 도관을 형성하였다.

[0159] 생성된 도관에 혈관세포를 1×10^{7} cells/ml 농도로 파종하였고 37℃의 온도에서 30분 동안 파종을 수행하였다. 이때, 도관에 혈관세포를 골고루 파종하기 위해, 10분 간격으로 바이오리액팅 챔버를 회전하였다.

[0160] 이후, 혈관세포가 파종된 도관에 혈관세포 배양액을 25 ㎕/min의 속도로 관류시켜 배양하였다.

[0161] 미세혈관망 생성 후, 미세혈관망이 형성된 바이오리액팅 시스템의 하이드로젤 부분 일부를 바이옵시펀치로 제거하였다. 하이드로젤이 제거된 부분에 상기 제조예 4에서 준비된 지지체를 위치시키고, 상기 제조예 3의 하이드로젤을 이용하여 제거된 부분을 채워 37℃의 온도에서 30분간 경화하였다.

[0162] 이후, 도관에 혈관세포 배양액을 25 ㎕/min의 속도로 관류시켜 지지체 내부에 미세혈관망 형성을 유도하였다.

[0164] **<실험예 1> 관류 채널에 생성된 혈관**

[0165] 상기 실시예 1을 통해 생성된 혈관 채널에 혈관 내피세포 마커 염색을 통해 성숙한 혈관 생성 확인 여부를 분석하였다.

[0166] 도 6은 혈관세포가 파종된 채널에 형성된 혈관 생성유무를 확인한 것이다.

[0167] 성숙한 혈관의 내피세포 마커인 CD31이 도관 전체에 나타남으로써 성숙한 혈관이 생성됨을 의미한다.

[0169] **<실험예 2> 생성된 혈관의 장벽기능성 분석**

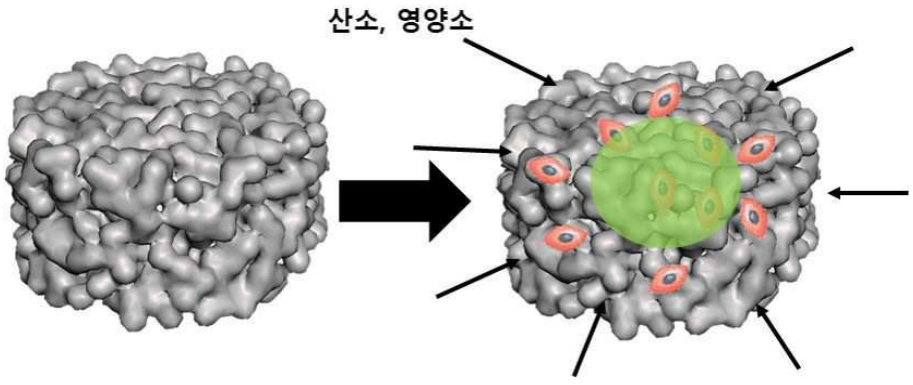
[0170] 상기 실시예 1을 통해 생성된 혈관의 장벽 기능성 분석을 통해 실제 혈관기능을 수행하는 지 여부를 분석하였다.

[0171] 도 10은 혈관의 장벽기능 유무를 확인한 것이다.

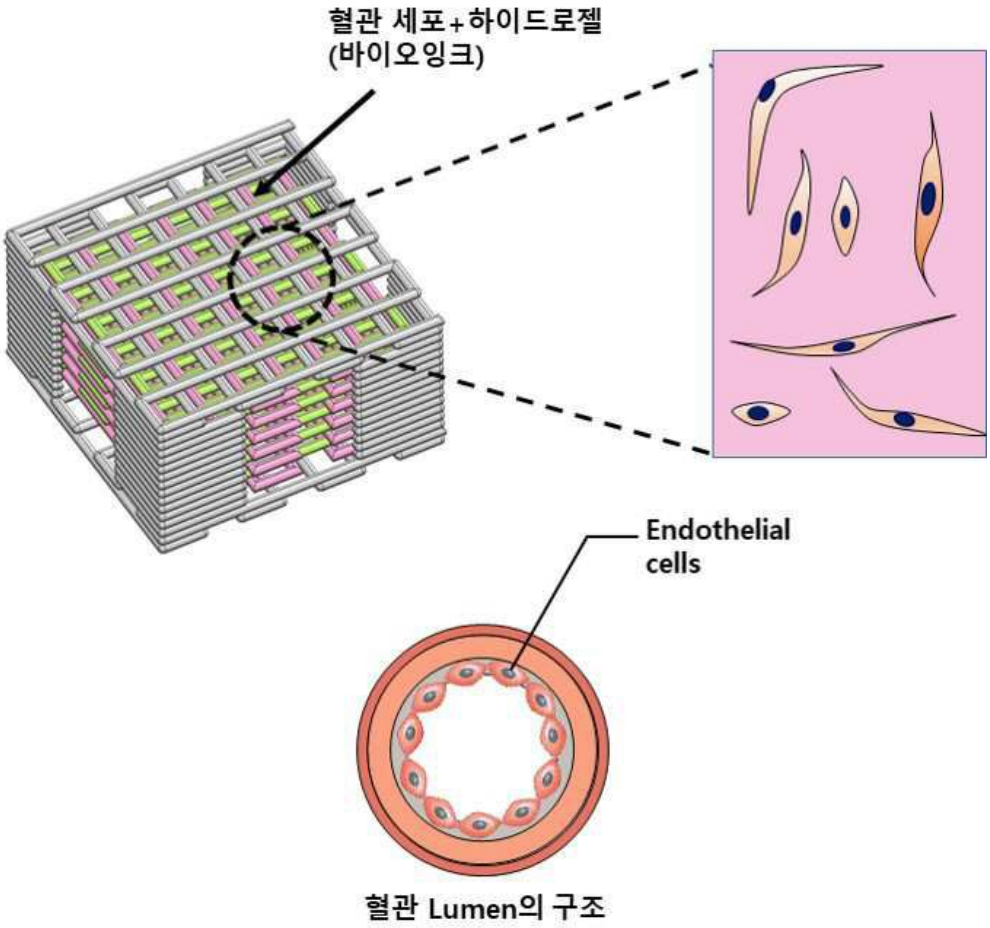
[0172] 혈관 세포를 파종하지 않은 채널과 혈관 세포를 파종한 채널에 형광물질을 관류시킴으로써 혈관 세포를 파종하지 않은 채널에서는 시간이 지남에 따라 형광물질이 확산에 의해 투과되지만, 혈관 세포를 파종한 채널에서는 시간이 지남에도 투과되는 형광물질이 매우 적게 검출됨을 확인함으로써, 장벽기능을 갖춘 혈관의 생성을 확인하였다.

도면

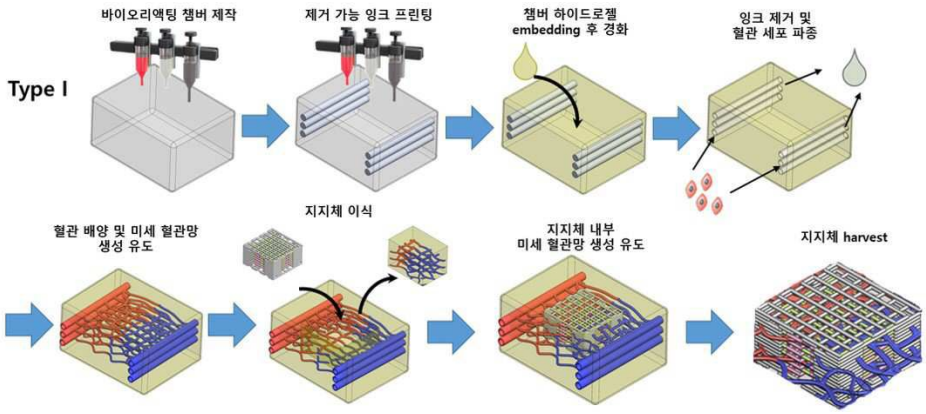
도면1



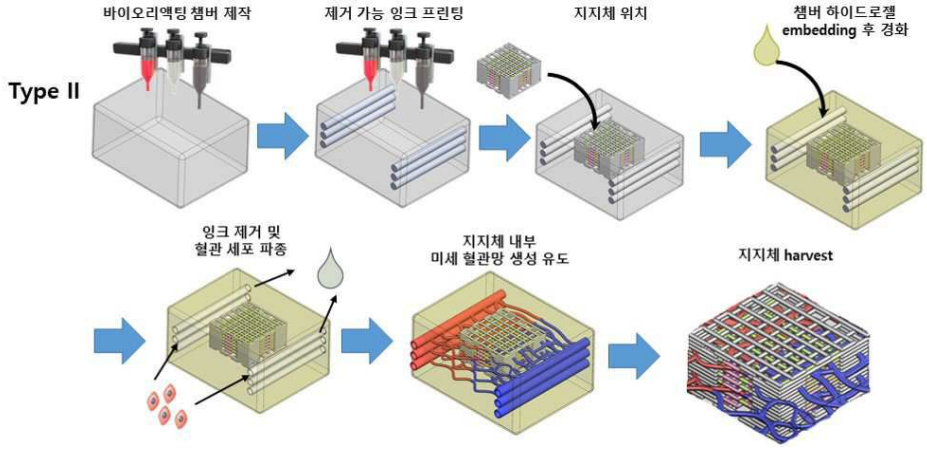
도면2


혈관 세포+하이드로젤
(바이오잉크)
Endothelial
cells
혈관 Lumen의 구조

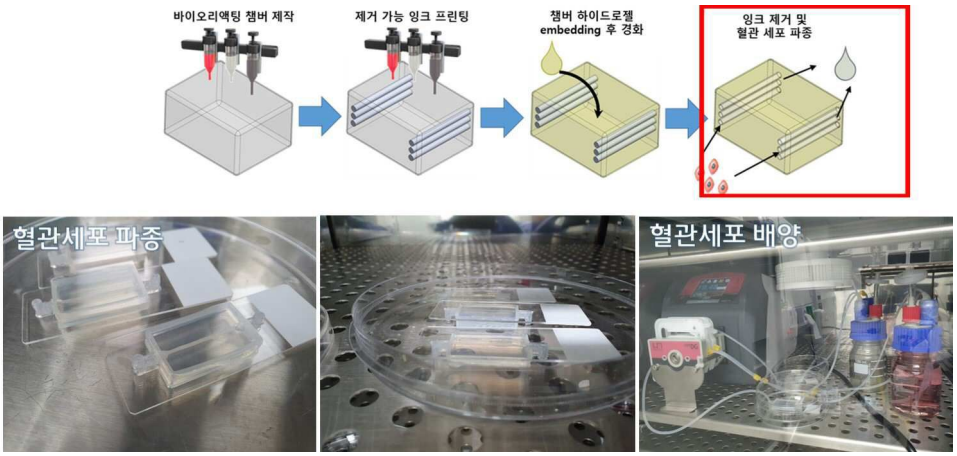
도면3


Type I
바이오리액팅 챔버 제작
제거 가능 잉크 프린팅
챔버 하이드로젤
embedding 후 경화
잉크 제거 및
혈관 세포 파종
혈관 배양 및 미세 혈관망
생성 유도
지지체 이식
지지체 내부
미세 혈관망 생성 유도
지지체 harvest

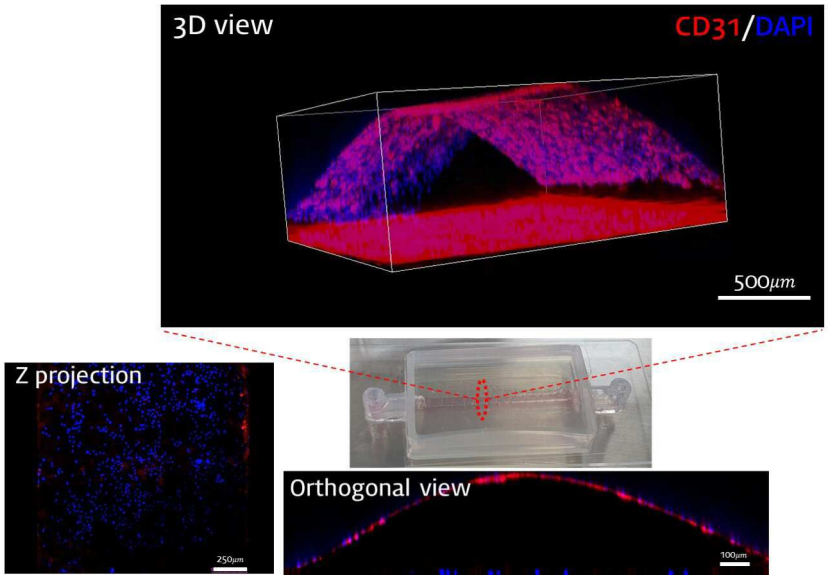
도면4


Type II
바이오리액팅 챔버 제작
제거 가능 잉크 프린팅
지지체 위치
챔버 하이드로젤
embedding 후 경화
잉크 제거 및
혈관 세포 파종
지지체 내부
미세 혈관망 생성 유도
지지체 harvest

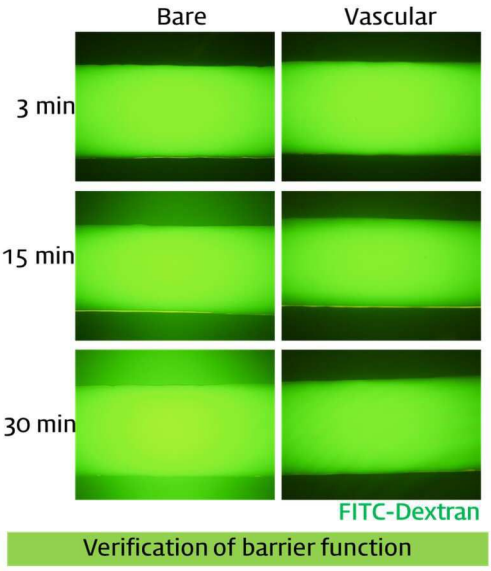
도면5

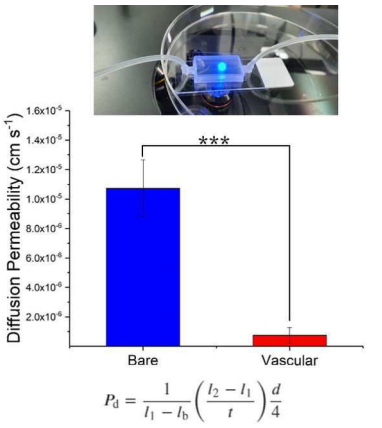

바이오리액팅 챔버 제작
제거 가능 잉크 프린팅
챔버 하이드로젤
embedding 후 경화
잉크 제거 및
혈관 세포 파종
혈관세포 파종
혈관세포 배양

도면6


3D view
CD31/DAPI
500μm
Z projection
250μm
Orthogonal view
100μm

도면7





$$P_d = \frac{1}{I_1 - I_b}\left(\frac{I_2 - I_1}{t}\right)\frac{d}{4}$$

P_d : diffusional permeability coefficient
I_1 : average intensity at an initial time point
I_2 : average intensity after certain time ($t \approx$ 30 min)
I_b : background intensity (before treating FITC-Dex)
d : channel diameter