



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0081739
(43) 공개일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)
C12N 5/0081 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0184485
(22) 출원일자 2017년12월29일
심사청구일자 2017년12월29일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
경북대학교병원
대구광역시 중구 동덕로 130 (삼덕동2가)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
강현욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
김민경
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지원

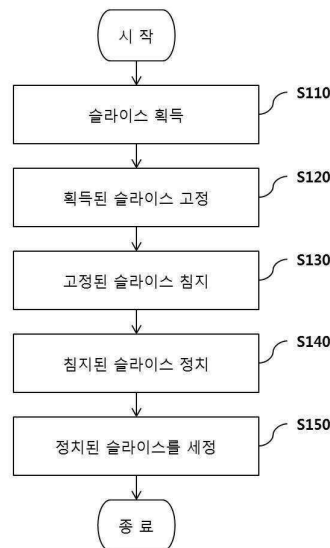
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 탈세포화된 조직의 제조방법 및 제조된 탈세포화된 조직

(57) 요약

본 발명은 세포배양, 바이오 잉크용 재료, 의료용 등으로 사용되는 탈세포화된 조직의 제조방법 및 제조된 탈세포화된 조직에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

정원우

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

김홍균

대구광역시 수성구 달구벌대로 2260, 101동 1201호
(수성동1가, 태왕아너스클럽)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9C6033135

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 세포재생기술개발사업

연구과제명 미세 혈관 내재형 간 조직 모사체 프린팅 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M3A9B3028685

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 조식재생기술개발

연구과제명 바이오프린팅 기반 생체모방 첼로 제작 및 최적화 기술개발

기 여 율 1/3

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2015.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HC15C0001

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원

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

기 여 율 1/3

주관기관 경북대학교병원

연구기간 2015.01.16 ~ 2024.01.15

명세서

청구범위

청구항 1

생체조직을 절단하여 미리 설정된 두께를 갖는 시트형태의 슬라이스를 획득하는 단계;
상기 획득된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시키는 단계; 및
상기 침지된 슬라이스를 일정 조건 하에 정치하는 단계;
를 포함하는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 정치하는 단계는,
상기 침지된 슬라이스를 미리 설정된 시간 동안 정치하는 단계;
를 포함하며,
상기 미리 설정된 시간은,
상기 침지된 슬라이스에 포함된 디엔에이(Deoxyribonucleic acid : DNA) 가 일정 농도 이하가 되는 시간인,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 미리 설정된 시간은,
상기 생체조직의 종류에 따라 다르게 설정되는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 침지시키는 단계는,
상기 획득된 슬라이스의 표면이 고정판의 표면에 밀착되도록, 상기 획득된 슬라이스를 상기 고정판에 고정시키는 단계; 및
상기 슬라이스가 고정된 고정판과 상기 고정된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시키는 단계;
를 포함하는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 고정판은,
상기 고정된 슬라이스로부터 제거된 세포가 상기 탈세포화 용액으로 이동할 수 있도록 투과성을 갖는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,
상기 고정판은,
다공성 물질 또는 흡수성 물질로 이루어지거나, 복수의 구멍들을 포함한 그물망 형태인,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 탈세포화된 조직의 제조방법은,
상기 정치하는 단계 이후,
상기 정치된 슬라이스를 세정액으로 세정하는 단계;
를 더 포함하는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 탈세포화된 조직의 제조방법은,
상기 세정하는 단계 이후,
상기 세정된 슬라이스를 분쇄하여 입자상 탈세포화된 조직을 획득하는 단계;
를 더 포함하는,
탈세포화된 조직의 제조방법.

청구항 9

제1항에 따른 제조방법으로 제조된 탈세포화된 조직.

청구항 10

제1항에 따른 제조방법으로 제조된 탈세포화된 조직을 포함하는 바이오 잉크.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 세포배양, 바이오 잉크용 재료, 의료용 등으로 사용되는 탈세포화된 조직의 제조방법 및 제조된 탈세포화된 조직에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생체조직으로부터 세포를 제거해서 잔존하는 지지조직인 탈세포화된 조직을 제조하는 기술이 개발되어 왔다.

[0003] 생체조직을 탈세포화 하는 방법으로는, 생체조직을 작게 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법(Cube type decellularization : 생체조직을 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법)과, 생체조직 전체를 탈세포화 하는 방법(Whole organ decellularization)이 알려져 있다.

[0004] 예를 들어, 종래기술로써, 동물유래 조직을 분말화 하고, 분말화 이전, 이후 또는 동시에 탈세포화 하는 과정을 포함한 탈세포화 방법이 개시되었다. [특허문헌 1]

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 일본등록특허공보 JP5483035B9, 2014. 02. 28.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 생체조직을 시트(Sheet) 형태로 분할한 후 탈세포화 하는 새로운 탈세포화된 조직의 제조방법 및 제조된 탈세포화된 조직을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 목적들은 상술된 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은, 생체조직을 절단하여 미리 설정된 두께를 갖는 시트형태의 슬라이스를 획득하는 단계; 상기 획득된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시키는 단계; 및 상기 침지된 슬라이스를 일정 조건 하에 정치하는 단계; 를 포함한다.

[0009] 실시예에서, 상기 정치하는 단계는, 상기 침지된 슬라이스를 미리 설정된 시간 동안 정치하는 단계; 를 포함한다.

[0010] 실시예에서, 상기 미리 설정된 시간은, 상기 침지된 슬라이스에 포함된 디엔에이(Deoxyribonucleic acid : DNA)가 일정 농도 이하가 되는 시간이다.

[0011] 실시예에서, 상기 미리 설정된 시간은, 상기 생체조직의 종류에 따라 다르게 설정된다.

[0012] 실시예에서, 상기 침지시키는 단계는, 상기 획득된 슬라이스의 표면이 고정판의 표면에 밀착되도록, 상기 획득된 슬라이스를 상기 고정판에 고정시키는 단계; 및 상기 슬라이스가 고정된 고정판과 상기 고정된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시키는 단계; 를 포함한다.

[0013] 실시예에서, 상기 고정판은, 상기 고정된 슬라이스로부터 빠져 나온 세포가 상기 탈세포화 용액으로 이동할 수 있도록 투과성을 갖는다.

[0014] 실시예에서, 상기 고정판은, 다공성 물질 또는 흡수성 물질로 이루어지거나, 복수의 구멍들을 포함한 그물망 형태이다.

[0015] 실시예에서, 상기 탈세포화된 조직의 제조방법은, 상기 정치하는 단계 이후, 상기 정치된 슬라이스를 세정액으로 세정하는 단계; 를 더 포함한다.

- [0016] 실시예에서, 상기 탈세포화된 조직의 제조방법은, 상기 세정하는 단계 이후, 상기 세정된 슬라이스를 분쇄하여 입자상 탈세포화된 조직을 획득하는 단계;를 더 포함한다.
- [0017] 본 발명의 다른 실시예에 따른 탈세포화된 조직은, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 바이오 잉크는, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직을 포함한다.
- [0019] 상기한 목적들을 달성하기 위한 구체적인 사항들은 첨부된 도면들과 함께 상세하게 후술될 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.
- [0020] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자(이하, "통상의 기술자")에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해서 제공되는 것이다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 다음과 같은 우수한 효과들을 가진다.
- [0022] 우선, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 세포배양이나 바이오 잉크용 재료 등으로 더욱 효과적으로 사용될 수 있는 탈세포화된 조직을 제조할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 종래기술에 따른 제조방법에 의한 경우보다 염증을 유발하는 세포 유래 물질을 더욱 빠르고 안전하게 제거할 수 있어, 보다 효과적으로 탈세포화된 조직을 제조할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 종래기술에 따른 제조방법에 의한 경우보다 세포 유래 물질을 제외한 세포의 기질(Extra cellular matrix) 재료들이 더욱 잘 보존된 탈세포화된 조직을 제조할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 효과들은 상술된 효과들로 제한되지 않으며, 본 발명의 기술적 특징들에 의하여 기대되는 잠정적인 효과들은 아래의 기재로부터 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법의 흐름도이다.
- 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법을 종래기술과 비교 설명하기 위한 도면이다.
- 도 3a 내지 도 4b는 생체조직의 탈세포화 과정을 시계열적으로 나타낸 도면이다.
- 도 5a 내지 도 5d는 본 발명의 다른 실시예에 따른 실험예를 설명하기 위한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고, 여러 가지 실시예들을 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 이를 상세히 설명하고자 한다.
- [0028] 청구범위에 개시된 발명의 다양한 특징들은 도면 및 상세한 설명을 고려하여 더 잘 이해될 수 있을 것이다. 명세서에 개시된 장치, 방법, 제법 및 다양한 실시예들은 예시를 위해서 제공되는 것이다. 개시된 구조 및 기능상의 특징들은 통상의 기술자로 하여금 다양한 실시예들을 구체적으로 실시할 수 있도록 하기 위한 것이고, 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 개시된 용어 및 문장들은 개시된 발명의 다양한 특징들을 이해하기 쉽게 설명하기 위한 것이고, 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.
- [0029] 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우, 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0030] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여, 본 발명에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법 및 제조된 탈세포화된 조직에 대하여 상세하게 설명한다.

- [0031] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법의 흐름도이다.
- [0032] 도 1a를 참조하면, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은, 슬라이스 획득 단계(S110), 슬라이스 고정 단계(S120), 슬라이스 침지 단계(S130), 슬라이스 정치 단계(S140) 및 슬라이스 세정 단계(S150)를 포함한다.
- [0033] 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법의 수행 주체는 탈세포화된 조직의 제조를 위한 제조장치일 수 있다. 제조장치는 절단부, 투입부, 세정부 등을 포함할 수 있다. 여기서, 절단부, 투입부, 세정부는 각각의 공정을 수행할 수 있는 모든 기계, 장치 및 기구 등을 포함하는 의미이다.
- [0034] 슬라이스 획득 단계(S110)는, 생체조직을 절단하여 슬라이스를 획득하는 단계이다.
- [0035] 생체조직은 인체 또는 동물로부터 유래된 생체조직이다. 생체조직은 인체 또는 동물의 어느 부위에서 유래된 것 인지는 특정되지 않으며, 다양한 종류의 생체조직 중 하나의 생체조직일 수 있다. 예를 들어, 생체조직은 간, 심장, 신장, 뼈 등 일 수 있다. 생체조직의 종류에 따라 생체조직 내에 포함된 콜라겐(Collagen), 글리코사미노글리칸(Glycosaminoglycans : GAGs), 성장인자(Growth factor) 등의 세포외 기질 재료의 함유량이 상이하다.
- [0036] 슬라이스는 미리 설정된 두께를 갖는 시트형태로써, 슬라이스 획득 단계(S110)에서 하나의 슬라이스가 획득될 수도 있고, 복수의 슬라이스들이 획득될 수도 있다.
- [0037] 슬라이스의 두께가 두꺼울수록, 탈세포화가 이루어지기 어렵기 때문에, 슬라이스의 두께는, 탈세포화가 쉽게 이루어질 수 있도록 충분히 얇은 두께로 설정된다. 예를 들어, 슬라이스의 두께는 2 mm 이하로 설정될 수 있다.
- [0038] 슬라이스 고정 단계(S120)는, 슬라이스 획득 단계(S110)에서 획득된 슬라이스를 고정판에 고정시키는 단계이다. 획득된 슬라이스의 표면이 고정판의 표면과 밀착 되도록 하고, 슬라이스를 고정판에 고정시킨다.
- [0039] 획득된 슬라이스를 고정판에 고정시켜 획득된 슬라이스와 고정판을 일체화 시키는 이유는 크게 두 가지가 있다.
- [0040] 우선, 획득된 슬라이스는 매우 얇은 두께를 갖고 비중이 작기 때문에, 획득된 슬라이스는 후술할 탈세포화 용액 내에 침지되기 어렵다. 즉, 획득된 슬라이스를 탈세포화 용액에 담그면, 탈세포화 용액의 표면으로 떠오르게 된다. 따라서, 이러한 문제점이 발생하지 않도록, 획득된 슬라이스보다 큰 비중을 갖는 고정판에 획득된 슬라이스를 고정시킨 이후, 이를 탈세포화 용액에 침지시켜, 획득된 슬라이스가 탈세포화 용액 내에 침지되도록 하는 것이다.
- [0041] 또한, 획득된 슬라이스는 탈세포화 용액의 표면으로 쉽게 떠오르고, 유동이 가능하기 때문에, 획득된 슬라이스가 접혀, 꺾이는 부분이 생길 수 있다. 전술한 바와 같이 슬라이스의 두께가 두꺼울수록 탈세포화가 이루어지기 어려운데, 꺾이는 부분은 결과적으로 두께가 두 배로 두꺼워진 것이므로, 꺾이는 부분에선 탈세포화가 용이하게 이루어지지 못한다. 반면, 본 발명은 획득된 슬라이스의 일부가 꺾여지지 않도록 고정판의 표면과 밀착시키고, 밀착된 슬라이스를 고정판에 고정시켜, 슬라이스가 유동하지 못하도록 하여, 이러한 문제가 발생하는 것을 방지하였다.
- [0042] 한편, 획득된 슬라이스의 표면을 고정판의 표면과 밀착시키는 것은, 슬라이스의 일부가 꺾이지 않도록 하여, 탈세포화가 쉽게 이루어지도록 하기 위함이다.
- [0043] 고정판은 투과성을 갖는다. 즉, 고정판은 슬라이스로 탈세포화 용액이 잘 전달될 수 있도록 투과성을 가진다. 후술할 바와 같이, 슬라이스가 탈세포화 용액 내에 침지되면, 슬라이스 내에 포함된 세포가 슬라이스에서 탈세포화 용액에 의하여 파괴되어, 슬라이스 외부로 빠져 나오게 된다. 이때, 만약 고정판이 투과성을 갖지 않는다면, 고정판의 표면과 맞닿은 슬라이스의 표면으로부터는 슬라이스에서 제거된 세포가 탈세포화 용액으로 이동하지 못한다. 결과적으로 탈세포화 효율이 감소하게 된다. 본 발명은 투과성을 갖는 고정판을 통하여 슬라이스에서 빠져 나온 세포가 탈세포화 용액으로 쉽게 이동할 수 있도록 하여 이러한 문제가 발생하는 것을 방지하였다.
- [0044] 예를 들어, 고정판은 복수의 구멍들을 포함한 그물망 형태를 가질 수 있다. 보다 구체적으로는 고정판은 스테인리스로 이루어진 철망일 수 있다. 또는, 고정판은 다공성 물질 또는 흡수성 물질로 이루어질 수 있다. 한편, 고정판 또한 시트형태를 가질 수 있다. 획득된 슬라이스의 표면 전체가 고정판의 표면에 밀착될 수 있도록, 고정판은 획득된 슬라이스보다 큰 크기를 가질 수 있다. 한편, 전술한 바와 같이 슬라이스 획득 단계(S110)에서 복수의 슬라이스들이 획득될 수도 있다. 이 경우, 복수의 슬라이스들을 한번에 탈세포화 시키기 위하여, 고정판은 복수의 슬라이스들을 함친 넓이 보다 큰 넓이를 가질 수도 있다. 한편, 고정판은 탈세포화 용액 내에 쉽게 가라앉을 수 있도록, 탈세포화 용액보다 큰 비중을 갖는 것이 바람직하다.
- [0045] 슬라이스 침지 단계(S130)는 슬라이스 고정 단계(S120)에서 획득된 슬라이스가 고정된 고정판과, 고정판에 고정

된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시키는 단계이다.

- [0046] 슬라이스 고정 단계(S120)에서 획득된 슬라이스는 고정판에 고정되어 고정판과 일체화 되어, 탈세포화 용액 내에 쉽게 침지될 수 있다.
- [0047] 탈세포화 용액(detergent)은 슬라이스 내의 세포가 슬라이스 외부로 방출되도록 하는 용액이다. 탈세포화 용액의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 슬라이스가 유래된 생체조직의 종류에 따라 달라질 수 있다.
- [0048] 슬라이스 정치 단계(S140)는 탈세포화 용액 내에 침지된 슬라이스를 일정 조건 하에서 정치하는 단계이다. 침지된 슬라이스를 일정 조건 하에 놓아두면, 슬라이스에 포함된 세포가 빠져나와 탈세포화 용액으로 이동함으로써, 슬라이스의 탈세포화가 이루어진다.
- [0049] 일정 조건은 미리 설정되며, 탈세포화가 일어나는 시간에 대한 조건 및 탈세포화 용액의 온도에 대한 조건 등을 포함한다. 탈세포화 용액의 온도에 대한 조건은 종래기술에서의 탈세포화 과정에서의 온도로 설정될 수 있다.
- [0050] 탈세포화 일어나는 시간, 즉, 침지된 슬라이스를 정치시킬 시간은 슬라이스 내에 포함된 디엔에이(Deoxyribonucleic Acid : DNA)가 일정 농도 이하가 되는 시간이며, 슬라이스가 유래된 생체조직의 종류에 따라 달라진다.
- [0051] 탈세포화된 조직 내에 잔존하는 세포 유래 물질은 염증을 유발하는 물질이기 때문에, 제조된 탈세포화 조직 내에 함유된 양이 작을수록 바람직하다. 그리고, 디엔에이의 농도는 잔존하는 세포 유래 물질의 양을 나타내는 대표값이다. 따라서, 디엔에이의 농도가 낮을수록 탈세포화가 더 효과적으로 이루어졌다고 할 수 있다.
- [0052] 한편, 제조된 탈세포화된 조직 내의 디엔에이의 농도가 50ng/mg 이하인 경우에 효과적인 탈세포화가 이루어진 것으로 판단할 수 있다는 점이 알려져 있다. 이에, 침지된 슬라이스를 정치시킬 시간은, 슬라이스 내의 디엔에이의 농도가 50ng/mg 이하가 되는 시간으로 설정된다.
- [0053] 한편, 슬라이스 정치 단계(S140)에서, 바람직하게는, 탈세포화 용액은 일정 주기로 교체될 수 있다. 탈세포화 용액 내의 세포 농도가 높아질수록, 탈세포화의 효율이 감소하기 때문이다.
- [0054] 슬라이스 정치 단계(S140)에서 획득된 슬라이스는, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직일 수 있다. 제조된 탈세포화된 조직은 일정 두께를 갖는 시트 형태를 갖는다.
- [0055] 한편, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은 슬라이스 세정 단계(S150)를 더 포함한다. 슬라이스 세정 단계(S150)는 제조된 시트형태의 탈세포화된 조직을 세정액으로 세정하여, 제조된 시트형태의 탈세포화된 조직에 잔존한 탈세포화 용액을 제거하는 단계이다. 탈세포화 용액은 생체조직에 대하여 독성 물질로 작용하기 때문에, 탈세포화 용액은 조직 내의 콜라겐, 글리코사미노글리칸 등을 파괴할 수 있다. 따라서, 슬라이스 세정 단계(S150)에서 탈세포화된 조직에 잔존한 탈세포화 용액이 제거하여 이러한 문제점 발생을 방지한다.
- [0056] 한편, 도 1c를 참조하면, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은 슬라이스 분쇄 단계(S160)를 더 포함할 수 있다. 슬라이스 분쇄 단계(S160)는 세정된 슬라이스를 분쇄하여 파우더 형태를 갖는 입자상 탈세포화된 조직을 획득하는 단계이다. 슬라이스 분쇄 단계(S160)에서, 세정된 슬라이스는 동결 건조를 거쳐 건조된 후, 분쇄되어 입자상 탈세포화된 조직으로 바뀐다. 즉, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 시트형태의 탈세포화된 조직, 그리고 입자상 탈세포화된 조직 두 종류의 탈세포화된 조직을 제조할 수 있다.
- [0057] 한편, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직은, 바이오 잉크의 원료로 사용될 수 있다. 즉, 입자상 탈세포화된 조직으로부터 일정 공정을 거쳐 바이오 잉크를 제조할 수 있다.
- [0058] 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법을 종래기술과 비교 설명하기 위한 도면이다.
- [0059] 도 2a를 참조하면, 생체조직을 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법(Cube type decellularization)은, 생체조직을 복수의 조각들로 분할한 후, 분할된 복수의 조각들을 탈세포화 용액에 침지시켜 탈세포화 하는 방법이다.
- [0060] 반면, 도 2b를 참조하면, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은, 전술한 바와 같이 생체조직으로부터 슬라이스를 획득한 후, 획득된 슬라이스를 고정판에 고정시킨후, 고정된 슬라이스를 탈세포화 용액에 침지시켜 탈세포화 하는 방법이다. 따라서, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은 종래기술과는 전혀 다른 새로운 탈세포화된 조직의 제조방법이라는 것을 확인할 수 있다.
- [0061] 한편, 도 2a를 다시 참조하면, 복수의 조각들은 탈세포화 진행 과정에서 서로 뭉쳐지게 된다. 이러한 뭉침 현상

은 복수의 조각들 내부로 탈세포화 용액의 침투를 매우 어렵게 만든다. 결과적으로 탈세포화 효율이 저하되는 문제가 있다.

[0062] 반면, 도 2b를 다시 참조하면, 본 발명은 전술한 바와 같이 획득된 슬라이스를 고정판에 고정시켜, 슬라이스가 탈세포화 용액 내에 쉽게 침지되도록 하였다. 또한, 슬라이스의 두께가 얇게 설정되었기 때문에, 슬라이스 내부로 탈세포화 용액이 빠르게 침투할 수 있어, 높은 효율로 탈세포화가 이루어질 수 있다. 즉, 본 발명에 의하면 슬라이스 내에 포함된 염증을 유발하는 세포 유래 물질을 빠르게 제거할 수 있다. 또한, 본 발명은 슬라이스를 고정판에 고정시켰기 때문에, 종래기술과 달리, 뭉침 현상에 따른 탈세포화 효율 저하 문제가 발생하지 않는다.

[0063] 결결과적으로, 본 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 종래기술의 생체조직을 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법 보다 효과적인 탈세포화가 가능하다.

[0064] 이하, 본 발명의 실험예들을 설명한다. 다만, 본 발명이 이하의 실험예들에 의하여 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 실험예들은 통상의 기술자에게 본 발명을 보다 명확하게 설명하기 위하여 제공되는 것이다.

[0065] 실험예 1 : 돼지 간 조직의 탈세포화

[0066] 도 3a 내지 도 4b는 본 발명의 다른 실시예에 따른 실험예를 설명하기 위한 도면이다. 본 실험예에서, 슬라이스는 돼지 간 조직으로부터 유래된 슬라이스이다. 본 실험예에서, 탈세포화 용액으로는 1% Triton X-100 + 0.1% ammonium solution 이 사용되었다.

[0067] 도 3a 내지 도 4b는 생체조직의 탈세포화 과정을 시계열적으로 나타낸 도면이다.

[0068] 도 3a 및 도 4a를 참조하면, 탈세포화 되지 않은 슬라이스는, 내부에 포함된 세포에 의하여 붉은 색 계열의 색상을 나타낸다. 도 3b는 탈세포화 용액에 침지된지 12시간이 경과된 슬라이스를 나타낸 도면으로, 탈세포화가 어느 정도 진행되어 흰색에 가까운 색상을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 도 3c 및 도 4b는 탈세포화가 완료된 슬라이스, 즉, 제조된 탈세포화된 조직을 나타낸 도면으로, 탈세포화가 완료되어, 세포외 기질(Extracellular matrix : ECM)만이 잔존하게 되어, 흰색을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0069] 실험예 2 : 탈세포화 방법에 따른 탈세포화된 조직 특성 비교

[0070] 도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 실험예를 설명하기 위한 도면이다. 본 실험예에서, 생체조직으로는 돼지 간이 사용되었다. 본 실험예에서, 탈세포화 용액으로는 1% Triton X-100 + 0.1% ammonium solution 이 사용되었다. 탈세포화를 거친 시간은 24시간이다.

[0071] 본 실험예에서, 돼지 간으로부터 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하여 탈세포화된 조직이 제조되었다. 전술한 슬라이스 세정 단계(S150)에서 세정액으로는 증류수가 사용되어, 36 시간 내지 48 시간 동안 슬라이스가 세정되었다. 이후, 동결건조를 거쳐 분쇄되어, 입자상 탈세포화된 조직이 제조되었다.

[0072] 비교를 위하여, 돼지 간으로부터 종래의 생체조직을 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법에 의하여 입자상 탈세포화된 조직이 제조되었다. 우선, 돼지 간을 복수의 조각들로 분할한 후, 분할된 복수의 조각들을 탈세포화 용액에 침지시켜 탈세포화 하였다. 이후, 증류수를 사용하여 36 시간 내지 48 시간 동안 복수의 조각들이 세정되었다. 이후, 동결건조를 거쳐 분쇄되어, 입자상 탈세포화된 조직이 제조되었다.

[0073] 전술한 바와 같이, 조직 내에 잔존하는 세포 유래 물질은 생체 내에서 염증을 유발하는 성분이기 때문에, 제조된 탈세포화된 조직 내의 디엔에이의 농도는 작을수록 바람직하며, 디엔에이의 농도가 작을수록 효과적으로 탈세포화가 되었다고 할 수 있다.

[0074] 도 5a를 참조하면, 탈세포화 되지 않은 돼지 간(native)의 디엔에이의 농도는 1258.92 ng/mg 이다.

[0075] 그리고, 종래의 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(cube)의 디엔에이의 농도는 140.889 ng/mg 으로, 약 88.80% 의 디엔에이가 제거된 것을 확인할 수 있다. 전술한 바와 같이, 제조된 탈세포화된 조직 내의 디엔에이의 농도가 50ng/mg 이하인 경우에 효과적인 탈세포화가 이루어졌다고 할 수 있는데, 종래의 방법에 의한 경우, 24시간에 거쳐 탈세포화가 이루어졌음에도 50ng/mg 보다 훨씬 높은 농도의 디엔에이가, 제조된 탈세포화된 조직에 포함되어 있는 것을 알 수 있다.

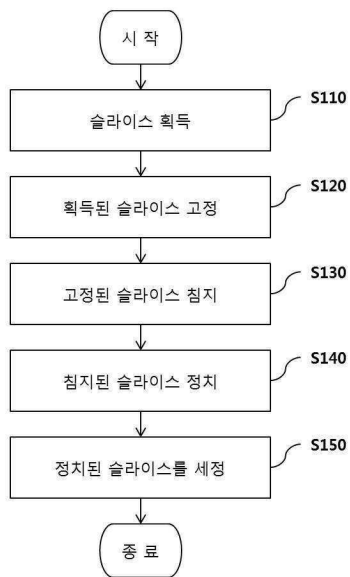
[0076] 이와 대조적으로, 본 발명에 따른 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(sheet)의 디엔에이의 농도는 47.9044 ng/mg 으로, 약 96.19% 의 디엔에이가 제거된 것을 확인할 수 있으며, 종래의 방법과 동일한 시간에 거쳐 탈세포화가 이루어졌음에도 불구하고, 50ng/mg 보다 낮은 농도의 디엔에이가 제조된 탈세포화된 조직에 포함되어 있

는 것을 알 수 있다.

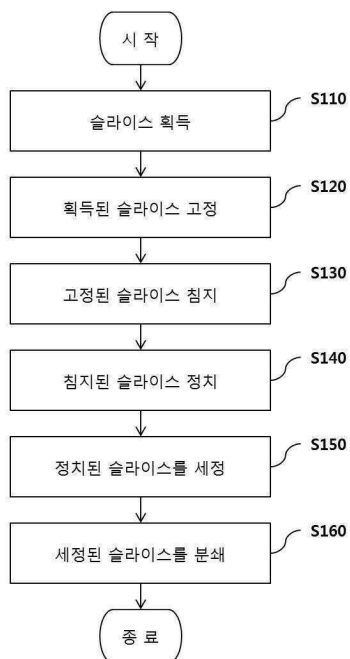
- [0077] 한편, 도 5b는 제조된 탈세포화된 조직 내의 콜라겐의 농도를 비교한 그래프이다.
- [0078] 도 5b를 참조하면, 본 발명에 따른 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(sheet)의 콜라겐 농도가, 탈세포화 되지 않은 돼지 간(Native)의 콜라겐 농도 대비 $464.4947 \pm 24.71228\%$ 이다. 한편, 종래기술에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(cube)의 콜라겐 농도는 $535.454 \pm 74.8906\%$ 로, 본 발명에 따른 방법에 의한 경우보다 약간 높게 나타났다. 그러나 두 결과의 차이에 대한 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 이 결과로부터, 통계적으로 볼 때 본 발명에 의한 경우와 종래기술 간의 탈세포화된 조직 내에 포함된 콜라겐 농도의 차이는 없다는 것을 확인할 수 있다.
- [0079] 한편, 도 5c는 제조된 탈세포화된 조직 내의 글리코사미노글리칸의 농도를 비교한 그래프이다. 제조된 탈세포화된 조직 내의 글리코사미노글리칸의 농도가 높을수록, 제조된 탈세포화된 조직이 세포배양이나 바이오 잉크용 재료 등으로 더욱 효과적으로 사용될 수 있음이 알려져 있다. 한편, 글리코사미노글리칸은, 콜라겐보다 결합력이 약한 단백질이기 때문에, 콜라겐 보다 쉽게 파괴되는 단백질이다. 이에, 제조된 탈세포화된 조직 내에 포함된 글리코사미노글리칸의 농도를 높이는 방법에 대한 연구가 지속되어 왔다.
- [0080] 도 5c를 참조하면, 종래기술에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(cube)의 글리코사미노글리칸의 농도를 확인하면, 종래기술에 의하여 제조된 탈세포화된 조직 내에는, 탈세포 되지 않은 돼지 간(Native) 대비 $11.39435 \pm 2.279006\%$ 의 글리코사미노글리칸 만이 남아있는 것을 확인할 수 있다.
- [0081] 반면, 본 발명에 따른 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(sheet)의 글리코사미노글리칸의 농도를 확인하면, 본 발명에 따른 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직 내에는, 세포 되지 않은 돼지 간(Native) 대비 $64.02756 \pm 16.4645\%$ 의 글리코사미노글리칸이 남아있는 것을 확인할 수 있다. 이는, 종래의 방법에 의하여 제조된 탈세포화된 조직의 글리코사미노글리칸의 농도 보다 약 5.6 배 증가한 것이다.
- [0082] 전술한 바와 같이, 제조된 탈세포화된 조직 내의 글리코사미노글리칸의 농도가 높을수록, 제조된 탈세포화된 조직이 세포배양이나 바이오 잉크용 재료 등으로 더욱 효과적으로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면 세포배양이나 바이오 잉크용 재료 등으로 더욱 효과적으로 사용될 수 있는 탈세포화된 조직을 제조할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [0083] 도 5d는 탈세포화 되지 않은 돼지 간(Native)과, 본 발명에 의하여 제조된 탈세포화된 조직(dECM)에 각각 포함된 단백질 인자들의 분자량 분포를 보여주는 SDS-PAGE 결과이다.
- [0084] 도 5d를 참조하면, 탈세포화 되지 않은 돼지 간과, 탈세포화된 조직 간에 분자량에 따른 단백질 분포 간에 차이가 없는 것을 확인할 수 있다. 즉, 탈세포화 되지 않은 돼지 간과, 탈세포화된 조직 간에 단백질 인자들의 차이가 보이지 않음을 확인할 수 있다.
- [0085] 도 5d로부터, 본 발명에 의한 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 생체조직 내의 세포외 기질을 구성하는 재료를 잘 보존하고 있는 탈세포화된 조직을 제조할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0086] 실험예 2로부터, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 제조된 탈세포화된 조직 내의 디엔에이의 농도를 낮출 수 있다는 것을 확인할 수 있다. 동시에, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법에 의하면, 제조된 탈세포화된 조직 내에 콜라겐은 종래의 방법과 유사한 수준을 가지며 글리코사미노글리칸 등의 세포외 기질들의 농도를 크게 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [0087] 즉, 실험예 2로부터, 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화된 조직의 제조방법은, 종래의 생체조직을 조각 낸 후 탈세포화 하는 방법에 의하는 경우보다 생화학적 특성(biochemical characteristic)이 향상된 탈세포화된 조직을 제조할 수 있는 방법이라는 것을 확인할 수 있다.
- [0088] 이상의 설명은 본 발명의 기술적 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 통상의 기술자라면 본 발명의 본질적인 특성이 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변경 및 수정이 가능할 것이다.
- [0089] 따라서, 본 명세서에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 한정하기 위한 것이 아니라, 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예들에 의하여 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명의 보호범위는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

도면

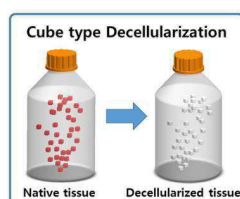
도면1a



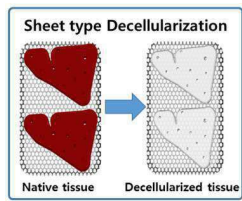
도면1b



도면2a



도면2b



도면3a



도면3b



도면3c



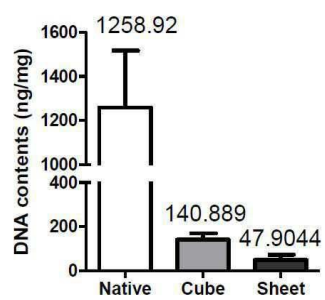
도면4a



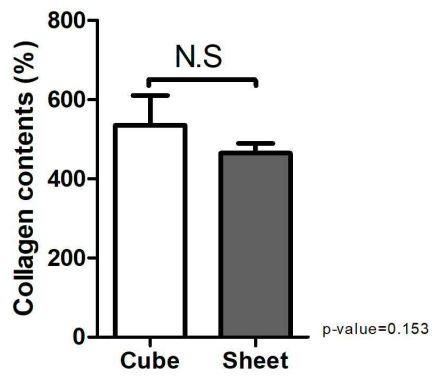
도면4b



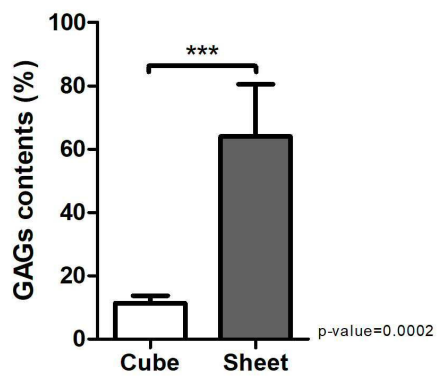
도면5a



도면5b



도면5c



도면5d

