

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2022 년 7 월 21 일 (21.07.2022) WIPO | PCT

WO 2022/154245 A1

(51) 국제특허분류:

A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01) A61F 2/14 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

Jin Ah); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 창의IT 융합공학과, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 임상엽 (LIM, Sang Yeob); 06300 서울시 강남구 양재천로 191, 504호, Seoul (KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/017390

(22) 국제출원일: 2021 년 11 월 24 일 (24.11.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0005008 2021 년 1 월 14 일 (14.01.2021) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동), Gyeongsangbuk-do (KR).

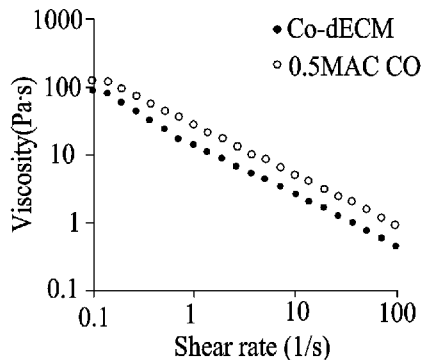
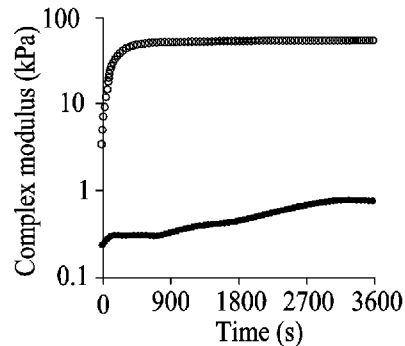
(72) 발명자: 김현지 (KIM, Hyeon Ji); 51642 경상남도 창원시 진해구 진해대로989번길 17, Gyeongsangnam-do (KR). 조동우 (CHO, Dong Woo); 05065 서울시 광진구 아차산로 262, B동 1404호, Seoul (KR). 장진아 (JANG,

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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,

(54) Title: MODIFIED-EXTRACELLULAR MATRIX-BASED HYDROGEL, METHOD OF PREPARING SAME, AND USE OF SAME

(54) 발명의 명칭: 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이의 용도



(57) Abstract: A modified-extracellular matrix-based hydrogel according to one example of the present invention comprises an extracellular matrix-modified collagen complex formed by a Michael addition reaction between an extracellular matrix having an amine group, and a modified collagen having an ethylenically unsaturated bond functional group introduced therein. The modified-extracellular matrix-based hydrogel according to the present invention exhibits enhanced mechanical properties (e.g. viscoelasticity). In addition, the preparation of a bio ink by encapsulating cells in the modified-extracellular matrix-based hydrogel according to the present invention exhibits high cell viability. In addition, transplantable artificial biological tissues (e.g. artificial corneal tissues) fabricated by 3-D printing the bio ink according to the present invention, when transplanted in a damaged cornea, can be sutured and have a transparency similar to a real cornea, and due to enhanced mechanical properties, are capable of reconstructing corneal tissues without other adverse side effects.

(57) 요약서: 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔은 아민기를 가지는 세포외기질 및 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐 간의 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)에 의해 형성된 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함한다. 본 발명에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔은 개질된 세포외기질 하이드로겔에 비해 강화된 기계적 물성(예를 들어, 점탄성)을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에 세포를 캡슐화하여 바이오잉크를 제조하는 경우 높은 세포 생존율을 보인다. 또한, 본 발명에 따른 바이오잉크를 3-D 프린팅하여 제조한 이식용 인공생체조직(예를 들어, 인공각막조직)을 손상된 각막에 이식하는 경우 봉합이 가능하고 실제 각막과 유사한 투명도를 가지며 강화된 기계적 물성으로 인해 기타 부작용 없이 각막 조직을 재건할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 세포외기질 기반 하이드로겔 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 점탄성 등과 같은 기계적 물성이 강화되도록 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 조직 공학은 (줄기)세포, 세포가 부착되어 자랄 수 있는 지지체, 그리고 세포의 성장 및 분화를 조절할 수 있는 각종 인자를 적절히 이용하여 여러 조직 재생, 및 나아가 장기복원을 목표로 하는 연구를 통칭하는 학문이다. 조직 공학 분야에서는 조직과 기관의 재생을 위한 적절한 환경을 제공하기 위해 다공성 3-D 스캐폴드의 사용에 의존하며, 스캐폴드를 구성하는 많은 물질들(천연 및 합성 물질, 생분해성 및 영구 물질 등) 역시 연구되었다. 조직 공학 분야의 초창기에는 고분자로 이루어진 스캐폴드를 제작하여 조직/기관을 대체하였으나, 최근에는 살아있는 세포를 스캐폴드 내에 직접 봉입하여 생체 내에 전달하는 방식으로 발전하였다. 이 때, 세포를 봉입하는 물질은 주로 콜라겐, 알지네이트 등 같은 수분이 많이 함유되어 있는 하이드로겔이다. 하지만, 이러한 하이드로겔은 그 자체의 기계적 물성이 약해 인체 내에 전달되어 실제 조직/기관을 대체하기에는 어려움이 있었다. 이에, 많은 연구자들이 고분자와 하이드로겔이 혼합되어 있는 하이브리드 형태의 스캐폴드를 제작하거나, 하이드로겔 광 경화제, 광 개시제 등의 추가 물질을 섞어주는 등 다양한 방식으로 하이드로겔 및 하이드로겔 기반 스캐폴드의 물성을 강화할 수 있는 방안을 연구하고 있다.
- [3] 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-2146682호에는 탈세포된 조직의 세포외기질을 액상화한 제1 바이오 잉크; 및 알지네이트 또는 피브리노젠을 포함하는 제2 바이오 잉크;를 포함하고, 상기 제1 바이오 잉크와 제2 바이오 잉크를 1.5 ~ 9 : 1의 부피비(v/v)로 혼합되며, 상기 제1 바이오 잉크는, 상기 탈세포된 조직의 세포외기질이 pH 1 ~ 3, 15 ~ 25°C의 온도에서 펩신(pepsin)에 의해 소화되어 액상화된 것이고, 상기 제1 바이오 잉크 및 제2 바이오 잉크는, 각각 1.5 ~ 4.0 %(wt/v)의 농도인 것을 특징으로 하는, 하이브리드 바이오 잉크가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허 10-2019-0070922호에는 1 mg/ml보다 큰 농도의 비변성 중성화 콜라겐 및 가교제를 포함하는 바이오 잉크가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제2020-0132741호에는 구조물질로서 메타크릴화된 젤라틴(methacrylated gelatin) 및 피브리노젠, 세포 운반물질로서 메타크릴화된 저분자 콜라겐(methacrylated low molecular weight collagen), 점성

증강제 및 윤활제를 포함하는 제1액과; 트롬빈을 포함하는 제2액을 포함하는 2액형 바이오 잉크 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제2020-0066218호에는 미세입자화된 인체 조직 유래 성분 및 생체적합성 고분자를 포함하는 3-D 프린팅용 바이오 잉크 조성물이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 점탄성 등과 같은 기계적 물성이 강화되고 생체 적합성이 우수하여 세포의 생존에 유리하고 이식 후에도 물성 변화가 적어 손상된 조직 재건에 이용될 수 있는 하이드로겔 및 이의 제조방법을 제공하는데에 있다.
- [5] 또한, 본 발명의 목적은 신규 하이드로겔의 다양한 용도로서 바이오잉크, 이식용 인공생체조직 등을 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 발명자들은 세포외기질 하이드로겔의 기계적 물성을 강화하기 위해 하이드로겔에 함유된 세포외기질을 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 통해 메타크릴기가 도입된 변성 콜라겐과 결합시켜 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 생성하고, 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔의 물성 및 인공조직 소재로서의 특성을 평가하였다. 그 결과, 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔은 점탄성이 강화되었고, 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔을 이용하여 세포를 캡슐화하는 경우 높은 세포 생존율을 보였다. 또한, 본 발명의 발명자들은 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔에 각막기질세포를 캡슐화하여 바이오잉크를 제조하고, 상기 바이오잉크로부터 인공각막조직을 제작하였으며, 상기 인공각막조직은 이식 후 봉합이 가능하고 실제 각막과 유사한 투명도를 가지며 기타 부작용 없이 각막 조직을 재건할 수 있다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [7]
- [8] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 아민기를 가지는 세포외기질 및 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐 간의 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)에 의해 형성된 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔을 제공한다.
- [9] 본 발명에서 사용되는 용어인 '세포외기질(Extracellular matrix, ECM)'은 동물세포에 구조적인 지지를 통상 제공함과 동시에, 다른 다양한 중요한 기능을 수행하는 동물 조직의 세포외 부분이다. 세포외기질은 동물에 있어서 결합 조직을 규정하는 특징으로서, 콜라겐(Collagen), 글리코사미노글리칸(Glycosaminoglycan, GAG) 등을 포함하는 다양한 형태의 단백질로 이루어져 있다. 이러한 세포외기질은 돼지, 소와 같은 동물의 조직일

수 있고 다양한 기관으로부터 추출이 가능하다. 상기 각막 유래 세포외기질은 바람직하게는 각막 기질 조직에서 유래한다. 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에서, 상기 세포외기질은 생체 이식 용도 등을 고려할 때 탈세포화 세포외기질인 것이 바람직하다. 이에 따라 면역반응을 유도하는 항원으로서 작용할 수 있는 세포를 제거함으로써 동종이식 (allograft) 또는 이종이식 (xenograft)시 면역반응을 최소화하는 효과가 있다. 조직에 따라 세포의 종류와 수, 조직 자체의 물리적 특성이 다르기 때문에 산, 염기, 저장액, 고장액, 세제 등 다양한 화학물질을 이용하여 탈세포화가 이루어진다. 또한, 상기 세포외기질은 탈세포화 과정만을 거쳐 조직 자체의 구조를 유지한 채로 사용하기 도 하지만, 동결건조와 분쇄과정을 거쳐 산성 용액에 녹이거나, 이를 다시 중화과정을 거쳐 하이드로겔 형태로 만들어 사용하기 도 한다. 또한, 상기 세포외기질은 주로 적용되는 용도 등을 고려할 때 각막 유래 탈세포화 세포외기질인 것이 더 바람직하다. 상기 각막 유래 탈세포화 세포외기질은 각막 기질 조직에서 유래한 것으로서, 세포 주변을 둘러싸는 물리적인 구조 이외에 세포의 부착을 돕는 단백질이나 세포의 성장 및 기능의 발현에 도움이 되는 단백질들을 포함하고 있다. 상기 각막 유래 탈세포화 세포외기질은 바람직하게는 텔로펩티드가 제거된 콜라겐 섬유를 포함한다.

- [10] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에서 상기 변성 콜라겐에 도입된 에틸렌성 불포화 결합 관능기는 세포외기질에 존재하는 아민기와 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어, 비닐기, 알릴기, 아크릴기, 메타크릴기 등에서 선택될 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에서 상기 변성 콜라겐은 바람직하게는 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen) 또는 아크릴레이트화된 콜라겐(Acrylated collagen)에서 선택될 수 있다. 상기 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen)은 콜라겐에 존재하는 아민기에 메타크릴기가 펩티드 결합을 통해 연결된 변성 콜라겐이고, 아크릴레이트화된 콜라겐(Acrylated collagen)은 콜라겐에 존재하는 아민기에 아크릴기가 펩티드 결합을 통해 연결된 변성 콜라겐이다. 상기 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen) 또는 아크릴레이트화된 콜라겐(Acrylated collagen)의 구조 및 제조방법은 공지된 다양한 문헌(예를 들어 미국등록특허공보 제8658711호; He Liang et al., Journal of Materials Chemistry B, 2018, 6, 3703-3715 등)에 개시되어 있다.
- [11] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에서 변성 콜라겐에 도입된 에틸렌성 불포화 결합 관능기는 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 통해 세포외기질에 존재하는 아민기와 단일 결합 형태로 연결되고 세포외기질-변성 콜라겐 접합체가 생성된다.
- [12] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에서 하이드로겔 내에 함유된 세포외기질 대 변성 콜라겐의 중량비는 마이클 부가 반응(Michael

- addition reaction)의 최적 조건을 고려할 때 1:0.05 내지 1:0.8인 것이 바람직하고, 1:0.1 내지 1:0.7인 것이 더 바람직하고, 1:0.2 내지 1:0.6인 것이 가장 바람직하다.
- [13] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔은 바람직하게는 비뉴턴 점성(non-Newtonian viscosity)을 가지며 전단박하(shear thinning)의 흐름 특성을 가진다.
- [14]
- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 예는 아민기를 가지는 세포외기질을 산 용액에 용해시켜 pH가 2~5인 세포외기질 하이드로겔을 준비하는 단계; 상기 세포외기질 하이드로겔에 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐을 첨가하고 균일하게 혼합시킨 후 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 유도하여 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 형성하는 단계; 및 상기 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔을 5.5~8의 pH로 중화하는 단계를 포함하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법에서, 아민기를 가지는 세포외기질, 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐, 마이클 부가 반응(Michael addition reaction), 세포외기질-변성 콜라겐 접합체 등의 기술적 특징은 전술한 내용을 참조하며, 구체적인 설명을 생략한다.
- [16] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법에서, 세포외기질을 용해시키기 위해 사용되는 산 용액은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 생체 이식 용도 등을 고려할 때 약산 용액인 것이 바람직하다. 상기 약산은 아세트산, 구연산, 뷰티르산, 팔미트산, 옥살산, 타타르산, 사과산, 호박산 등에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 세포외기질 하이드로겔의 pH는 세포외기질의 용해 최적 조건 또는 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 최적 조건 등을 고려할 때 2.5~4.5인 것이 바람직하다. 또한, 상기 세포외기질 하이드로겔 내 세포외기질 함량은 크게 제한되지 않으며, 세포외기질의 용해 최적 조건 또는 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 최적 조건 등을 고려할 때 1~4% (w/v)인 것이 바람직하고 1.5~3% (w/v)인 것이 더 바람직하다.
- [17] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법에서, 변성 콜라겐의 첨가량은 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 최적 조건을 고려할 때 하이드로겔 내에 함유된 세포외기질 100 중량부 대비 5~80 중량부인 것이 바람직하고 세포외기질 100 중량부 대비 10~70 중량부인 것이 더 바람직하고 세포외기질 100 중량부 대비 20~60 중량부인 것이 가장 바람직하다.
- [18] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법에서 상기 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 온도 조건은 하이드로겔의 변성 방지 또는 반응 효율 등을 고려할 때 0~15°C인 것이 바람직하고 1~10°C인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 시간 조건은 반응 효율 등을 고려할 때 5~30 hr인 것이 바람직하고, 10~20 hr인

것이 더 바람직하다.

- [19] 본 발명의 일 예에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법에서, 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔은 생체 이식 용도 등을 고려할 때 바람직하게는 6.1~7.6의 pH로 중화된다.

[20]

- [21] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 전술한 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔로 이루어지거나 이를 포함하는 바이오잉크를 제공한다. 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 바이오잉크는 세포 및 전술한 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔을 포함하는 조성물 형태를 가지며, 상기 세포는 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에 캡슐화된 형태로 존재한다.

- [22] 본 발명에서 사용되는 용어인 '바이오잉크(bioink)'는 3-D 프린팅이 가능한 세포 적합성(cell compatible) 재료로 정의된다. 바이오잉크는 0 내지 37°C에서 바늘을 통해 압출될 수 있고, 그 후에는 겔화되거나 고화될(solidified) 수 있다. 바이오잉크는 잉크젯, 레이저 보조(laser-assisted), 또는 마이크로밸브 3-D 프린팅 장비에 적합하도록 제제(formulate)될 수 있다.

- [23] 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 바이오잉크 내에서 세포의 농도는 크게 제한되지 않으며, 3-D 프린팅에 의한 성형의 용이성, 이식 후 조직 재건 효과 등을 고려할 때 1×10^6 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml인 것이 바람직하고 3×10^6 cells/ml 내지 8×10^6 cells/ml인 것이 더 바람직하다.

- [24] 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 바이오잉크에서 상기 세포는 다양한 조직에서 유래된 세포에서 선택될 수 있고, 주로 적용되는 용도 등을 고려할 때 각막 유래 세포인 것이 바람직하다. 상기 각막 유래 세포는 각막내피세포, 각막상피세포 및 각막기질세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 이중 각막기질세포인 것이 바람직하다

[25]

- [26] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 3-D 프린팅에 의해 전술한 바이오잉크로부터 성형한, 이식용 인공생체조직을 제공한다. 상기 이식용 인공생체조직은 바이오잉크를 구성하는 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔 또는 세포의 유래에 따라 이식되는 생체조직의 종류나 범위가 다양하며, 바람직하게는 조직 재건 효과 등을 고려할 때 손상된 각막에 이식되는 이식용 인공생체조직이다.

발명의 효과

- [27] 본 발명에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔은 개질전 세포외기질 하이드로겔에 비해 강화된 기계적 물성(예를 들어, 점탄성)을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에 세포를 캡슐화하여 바이오잉크를 제조하는 경우 높은 세포 생존율을 보인다. 또한, 본 발명에 따른 바이오잉크를 3-D 프린팅하여 제조한 이식용 인공생체조직(예들 들어,

인공각막조직)을 손상된 각막에 이식하는 경우 봉합이 가능하고 실제 각막과 유사한 투명도를 가지며 강화된 기계적 물성으로 인해 기타 부작용 없이 각막 조직을 재건할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔은 물성 향상이 필요한 조직 공학 분야 및 유관 분야에서 응용될 수 있고, 특히 각막 이식체 소재로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 본 발명의 실시예에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔의 FT-IR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 2는 본 발명의 실시예에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔의 점탄성 변화를 분석한 결과이다.
- [30] 도 3은 본 발명의 실시예에서 제조한 바이오잉크 내의 세포 생존률을 광학 현미경으로 측정한 결과이다.
- [31] 도 4는 본 발명의 실시예에서 수행한 생체내(In-vivo) 평가 결과 중 틸트등(slit lamp) 이미지와 OCT(Optical Coherence Tomography) 이미지를 나타낸 것이다.
- [32] 도 5는 본 발명의 실시예에서 수행한 생체내(In-vivo) 평가 결과 중 행동 검안 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [33] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.
- [34]
- [35] **1. 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 및 이를 포함하는 하이드로겔의 제조**
- [36] 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM)을 다음과 같이 준비하였다[Kim H, Park MN, Kim J, Jang J, Kim HK and Cho DW 2019 Characterization of cornea-specific bioink: high transparency, improved in vivo safety J. Tissue Eng. 10 참조]. 먼저, 송아지 눈에서 절개한 전체 각막을 100 units/ml 페니실린 및 0.1 mg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 PBS 완충용액으로 세척하였다. 이후, 각막 조직에서 상피와 내피를 제거하고 순수한 각막 기질층(Stromal layer)을 얻었다. 이후, 기질 조직을 0.5% Triton X-100을 포함하는 20mM 수산화암모늄 용액(NH₄OH; 4.98 N 수용액)에 넣고 약 4 hr 동안 교반하였다. 이후, 기질 조직을 증류수로 세척하고, Tris-HCl(hypotonic Tris hydrochloride; pH 7.4) 완충용액으로 약 24 hr 동안 처리하였다. 이후, 기질 조직을 1% (v/v) Triton X-100을 포함하는 10mM Tris-HCl 용액에 넣고 37°C에서 약 24 hr 동안 교반하여 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 조직을 수득하였다. 이후, 각막 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 조직을 50% 에탄올 내의 1% 과산화아세트산 용액으로 약 10 hr 동안 처리하여 살균하였다. 탈세포화 과정을 완료한 후, 각막 유래

탈세포화 세포외기질(Co-dECM)을 하룻밤동안 동결건조하고 액상 질소 및 분쇄 장치를 이용하여 미세한 분말로 분쇄하였다. 0.2g Co-dECM 분말을 0.02g 펩신이 보충된 10ml 아세트산 용액(0.5M)에 첨가하고 볼텍싱(vortexing)을 통해 균일하게 교반한 후 약 3일 동안 처리하여 콜라겐 분자 내의 텔로펩타이드(telopeptides)를 제거하고 완전히 용해시켜 pH가 약 3~4이고 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM)의 농도가 2%(w/v)인 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로젤을 수득하였다. 상기 2%(w/v) Co-dECM 하이드로젤을 10 μ m 메쉬를 통해 여과하고 4°C에서 보관하면서 이후의 실험에 사용하였다.

[37]

[38] 2. 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 이용한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 기반 하이드로젤의 제조

[39] 개질 하이드로젤 제조예 1.

[40] 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC) 0.05g을 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로젤 10ml에 첨가하고 볼텍싱(vortexing)을 통해 균일하게 교반한 후 4°C에서 16 hr 동안 보관하면서 메타크릴레이트화된 콜라겐과 각막 유래 탈세포화 세포외기질 사이에 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 유도하여 각막 유래 탈세포화 세포외기질을 개질하였다. 이후, 하이드로젤에 10N 수산화나트륨 용액을 첨가하고 얼음상에서 pH를 약 7.0~7.4로 중화하여 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로젤을 수득하였다.

[41]

[42] 개질 하이드로젤 제조예 2.

[43] 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC) 0.01g을 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로젤 10ml에 첨가한 점을 제외하고는 개질 하이드로젤 제조예 1과 동일한 조건 및 동일한 방법으로 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로젤을 수득하였다.

[44]

[45] 개질 하이드로젤 제조예 3.

[46] 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC) 0.1g을 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로젤 10ml에 첨가한 점을 제외하고는 개질 하이드로젤 제조예 1과 동일한 조건 및 동일한 방법으로 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로젤을 수득하였다.

[47]

[48] 3. 개질 하이드로젤의 특성 분석

[49] (1) 개질 하이드로젤의 화학적 변화 분석

[50] 개질 하이드로젤 제조예 1 내지 3에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로젤의 화학적 변화를 FT-IR 분석을 통해 측정하였다.

[51] 도 1은 본 발명의 실시예에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질

하이드로겔의 FT-IR 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 1에서 용어 "Co-dECM"은 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔을 나타내고, "MAC"는 메타크릴레이트화된 콜라겐을 나타낸다. 또한, 도 1에서 용어 "0.5MACCO"는 개질 하이드로겔 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔을 나타내고, 용어 "0.1MACCO"는 개질 하이드로겔 제조예 2에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔을 나타내고, 용어 "1.0MACCO"는 개질 하이드로겔 제조예 3에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔을 나타낸다.

[52] 또한, 하기 표 1에 본 발명의 실시예에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔의 FT-IR 분석 결과 중 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합에 해당하는 피크의 값을 정리하였다.

[53] [표1]

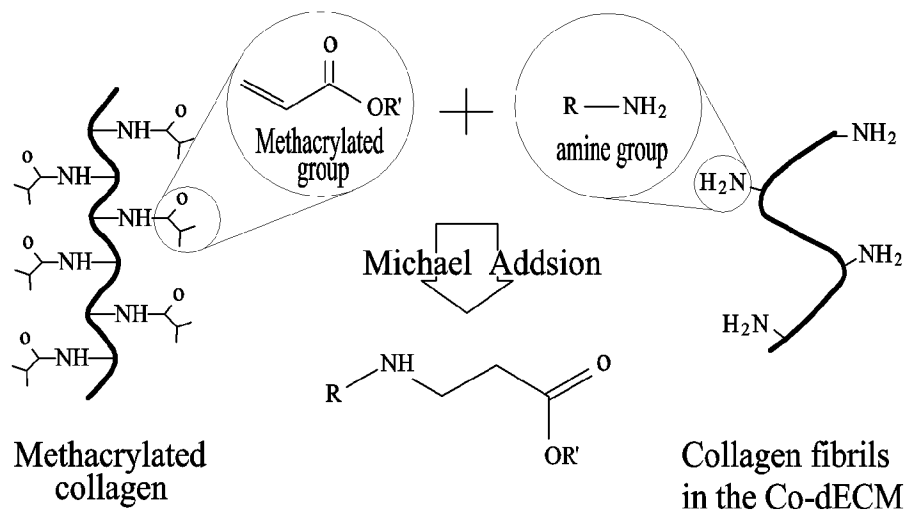
구분	MAC	1.0MACCO	0.5MACCO	0.1MACCO	Co-dECM
C=C 피크 값	-17.47	-2.92	-2.40	-1.87	-1.46
C-C 피크 값	-2.44	-5.81	-5.83	-5.42	-5.06

[54]

[55] 개질 하이드로겔 제조예 1 내지 3에서 메타크릴레이트화된 콜라겐과 각막 유래 탈세포화 세포외기질 간의 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)은 다음과 기작에 의해 의해 진행된다.

[56] [메타크릴레이트화된 콜라겐과 각막 유래 탈세포화 세포외기질 간의 마이클 부가 반응(Michael addition reaction) 기작]

[57]



[58]

[59] pH가 약 3~4인 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔 내에서 각막 유래 탈세포화 세포외기질 내에 존재하는 아민기는 반응성이 높아 프로톤(proton)을

쉽게 잃게 되고 메타크릴레이트화된 콜라겐에 존재하는 에틸렌성 불포화 결합은 프로톤(proton) 소스를 얻은 후 각막 유래 탈세포화 세포외기질 내에 존재하는 아민기와 단일 결합을 형성하게 된다.

- [60] 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 하이드로 겔에 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC)를 각각 0.1%(w/v), 0.5%(w/v) 및 1.0%(w/v)의 양으로 첨가하고 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 유도하면 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합의 양이 변화하였다. 도 1 및 표 1에서 보이는 바와 같이 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC)은 메타크릴기를 함유하고 있어서 가장 많은 C=C 이중 결합을 가지고 있는 반면, 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM)은 가장 적은 C=C 이중 결합을 가지고 있었다. 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC)이 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM)과 반응하면 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC)과 비교하였을 때 C=C 이중 결합이 줄어들고 C-C 단일 결합이 늘어나는 결과를 통해 마이클 부가 반응이 진행되었음을 알 수 있다. 0.1MACCO 하이드로 겔의 경우 Co-dECM 하이드로 겔과 비교할 때 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합이 늘어나는 결과를 보였다. 0.5MACCO 하이드로 겔의 경우 Co-dECM 하이드로 겔과 비교할 때 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합이 늘어나는 결과를 보였고 0.1MACCO 하이드로 겔과 비교하였을 때도 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합이 늘어나는 결과를 보였다. 이러한 결과는 0.5MACCO 하이드로 겔의 경우 0.1MACCO 하이드로 겔에 비해 Co-dECM과 MAC 간의 반응이 더 많이 진행되었음을 나타낸다. 한편, 1.0MACCO 하이드로 겔의 경우 Co-dECM 하이드로 겔과 비교할 때 C-C 단일 결합 및 C=C 이중 결합이 늘어나는 결과를 보였지만, 0.5MACCO 하이드로 겔과 비교하였을 때는 C-C 단일 결합이 거의 동일하였다. 이러한 결과는 0.5MACCO 하이드로 겔에서 반응이 가장 최대치에 가깝다는 것을 나타낸다.

- [61] 본 발명의 발명자는 도 1 및 표 1의 결과로부터 각막 유래 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 하이드로 겔의 개질을 위한 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen, MAC)의 농도는 0.5%(w/v)인 것으로 판단하였고, 이후의 바이오잉크(Bionink) 및 이식용 인공각막조직의 제조 실험에서 개질 하이드로 겔 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로 겔을 사용하였다.

[62]

- [63] (2) 개질 하이드로 겔의 점탄성 변화 분석

- [64] 개질 하이드로 겔의 점탄성 변화를 분석하기 위해 25mm 직경의 플레이트가 구비된 advanced hybrid rheometer를 사용하여 유변학적 특성을 측정하였다. 먼저, 하이드로 겔의 정상 전단 스윙 분석은 바이오제작(Biofabrication) 공정에 일반적으로 사용되는 온도 조건인 4°C에서 수행하였고 구체적으로, 전단속도에

따른 점도를 측정하였다. 또한, 하이드로겔의 시간 스윙 분석은 바이오제작(Biofabrication) 공정 이후 사용되는 온도 조건인 37°C에서 수행하였고 구체적으로 시간 경과에 따른 2% 변형에서의 복합 모듈러스(G^*)를 측정하였다. 상기 시간 스윙 분석은 하이드로겔의 겔화 역학을 연구하는데에 사용된다. 도 2는 본 발명의 실시예에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔의 점탄성 변화를 분석한 결과이다. 도 2의 왼쪽 그래프는 정상 전단 스윙 분석 결과이고 오른쪽 그래프는 시간 스윙 분석이다. 또한, 도 2에서 용어 "Co-dECM"은 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔을 나타내고, "0.5MACCO"는 개질 하이드로겔 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔을 나타낸다. 도 2의 정상 전단 스윙 분석 결과에서 보이는 바와 같이 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔 및 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔은 모두 전단박화(shear thinning) 특성을 가지며, 두 물질 간의 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었다. 그러나, 도 2의 시간 스윙 분석 결과에서 보이는 바와 같이 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔은 약 30분 경과 이후 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔에 비해 약 78배 이상의 높은 복합 모듈러스(G^*) 값을 보였다. 이러한 결과는 하이드로겔의 겔화 과정에서 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)의 효과가 나타남을 의미한다.

[65]

[66] **4. 바이오잉크(Bionink) 및 이식용 인공각막조직의 제조**

[67] 바이오잉크 제조예 1.

[68] 분화된 각막기질세포(Keratocyte)를 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔에 캡슐화하여 바이오잉크를 제조하였다.

[69] 분화된 각막기질세포를 다음과 같이 준비하였다[Park MN, Kim B, Kim H, Park SH, Lim MH, Choi YJ, Yi HG, Jang J, Kim SW and Cho DW 2017 Human turbinate-derived mesenchymal stem cells differentiated into keratocyte progenitor cells J. Clin. Exp. Ophthalmol. 8 627 참조]. 인간 비갑개 유래 중간엽 줄기세포(Human turbinate derived mesenchymal stem cells, hTMSCs; Catholic University of Korea, St.Mary's Hospital에서 입수함)를 10%(v/v) 소태아혈청 및 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 정상 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 넣고 가습된 5% 이산화탄소 분위기 및 37°C의 온도 조건에서 배양하였다. 이후 2번째 계대에서 정상 배지를 10 ng/ml KGF/EGF를 포함하는 분화배지로 교체하고 1일 동안 배양하여 분화된 각막기질세포(differentiated keratocytes)를 수득하였다. 이후, 제조예 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔에 2번째 또는 3번째 계대로부터 얻은 각막기질세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 캡슐화하여 세포가 캡슐화된 각막 탈세포화 세포외기질(Co-dECM) 하이드로겔 형태의 바이오잉크를 제조하였다.

상기 세포 캡슐화 과정은 얼음상에서 수행되었다. 또한, 3차원 세포 프린팅 시스템을 이용하여 상기 바이오잉크로부터 직경 4mm, 높이 200 μ m의 인공각막조직을 제작하였다.

[70]

[71] 바이오잉크 제조에 2.

[72] 분화된 각막기질세포(Keratocyte)를 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔에 캡슐화한 점을 제외하고는 바이오잉크 제조에 1과 동일한 조건 및 방법으로 바이오잉크를 제조하고 인공각막조직을 제작하였다.

[73]

[74] **5. 세포 생존률 분석**

[75] 도 3은 본 발명의 실시예에서 제조한 바이오잉크 내의 세포 생존률을 광학 현미경으로 측정한 결과이다. 도 3에서 용어 "0.5MACCO"는 바이오잉크 제조에 1에서 제조한 바이오잉크를 나타내고, 용어 "Co-dECM"은 바이오잉크 제조에 2에서 제조한 바이오잉크를 나타낸다. 도 3에서 보이는 바와 같이 세포를 봉입하기 위한 하이드로겔로 제조에 1에서 제조한 개질된 각막 유래 탈세포화 세포외기질 기반 하이드로겔을 사용하는 경우 및 개질전의 각막 유래 탈세포화 세포외기질 하이드로겔을 사용하는 경우 모두 95% 이상의 세포 생존율을 보였다.

[76]

[77] **6. 생체내(In-vivo) 평가**

[78] 바이오잉크 제조에 1에서 제조한 인공각막조직의 생체 내 적합 가능성과, 이식 이후 시력 회복 수준을 관찰하기 위해 Ophthalmic and Vision Research의 동물 사용에 대한 ARVO 성명서에 의거하여 Daegu-Gyeongbuk Advanced Medical Industry Promotion Foundation(DGMIF, the approval number of protocol: DGMIF-17080801-00)에서 동물 실험을 수행하였다. 8마리의 건강의 비글견(수컷, 8주령, 평균 몸무게는 약 4kg)을 30 mg/ml 케타민(ketamine) 및 10 mg/ml 럼펜(rumpun)을 사용하여 마취시키고, 크레센트 나이프를 사용하여 5mm 직경의 3-쿼터 환상 절개를 제작하였다. 이후, 각막에 흡집을 낸 비글견을 음성 대조군 및 실험군과 같이 2개의 그룹으로 나누고, 음성 대조군에 해당하는 비글견에는 별도의 조치를 하지 않았고, 실험군에 해당하는 비글견의 각막 기질에 바이오잉크 제조에 1에서 제조한 인공각막조직을 이식하였다. 한편, 바이오잉크 제조에 2에서 조직한 인공각막조직을 이식하는 경우 사전 테스트 결과 절개 부위가 봉합이 원활하게 되지 않아 실험군에 포함시키지 않았다. 이후, 절개 부위를 10-0 ethilon nybond으로 봉합하고 수술을 받은 눈을 omyx B, neomycin 및 dexamethasone을 포함하는 점안액(Forus, Samil Pharm. Co., Ltd, Korea)으로 2주일 동안 하루에 1번 처리하였다.

[79]

실험 동물에 대해 이식 후 24주 동안 소정의 시간 간격으로 틸새등(slit lamp) 검사 및 OCT 검사를 진행하였다. 또한, 실험 동물에 대해 이식 후 5주가 경과한

후 시력 테스트를 하기 위해 절개한 쪽의 눈만 노출한 상태로 행동 검안을 평가하였다. 행동 검안 평가는 담당 수의사가 수행하였으며, 장애물을 피해가는지, 움직이는 사물을 눈으로 좇을 수 있는지 등을 평가함으로써 시력을 간접적으로 평가하는 동물 시력 평가 방법 중 하나로서, 만점은 5점이다.

- [80] 도 4는 본 발명의 실시예에서 수행한 생체내(In-vivo) 평가 결과 중 틸새등(slit lamp) 이미지와 OCT 이미지를 나타낸 것이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 음성 대조군의 경우 시간이 경과할 수록 각막 내 흡집낸 부위를 비롯하여 전체적으로 각막 부종이 발생하고 각막이 혼탁되었다. 반면, 실험군의 경우 각막을 봉합할 수 있었을 뿐만 아니라, 시간이 경과할 갈수록 점점 투명도를 회복하는 양상을 보였다. 도 5는 본 발명의 실시예에서 수행한 생체내(In-vivo) 평가 결과 중 행동 검안 평가 결과를 나타낸 그래프이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 음성 대조군은 시력이 크게 저하된 반면, 실험군은 행동 검안 만점인 5점에 가까운 수치를 기록하여 시력이 크게 회복되었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 바이오잉크 제조예 1에서 제조한 인공각막조직을 사용하면 절개된 각막 부위의 봉합이 가능할 뿐만 아니라 이식 이후에도 내부 안압을 잘 견디고 시력이 회복되는 등 각막 재건에 크게 도움이 되었음을 의미한다.

[81]

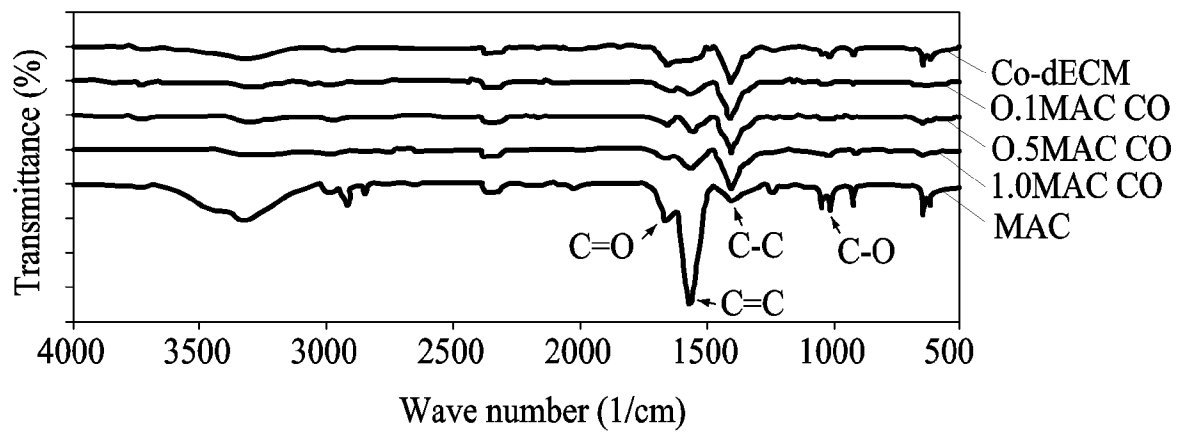
- [82] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명의 보호범위가 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 최상의 양식으로서 개시된 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

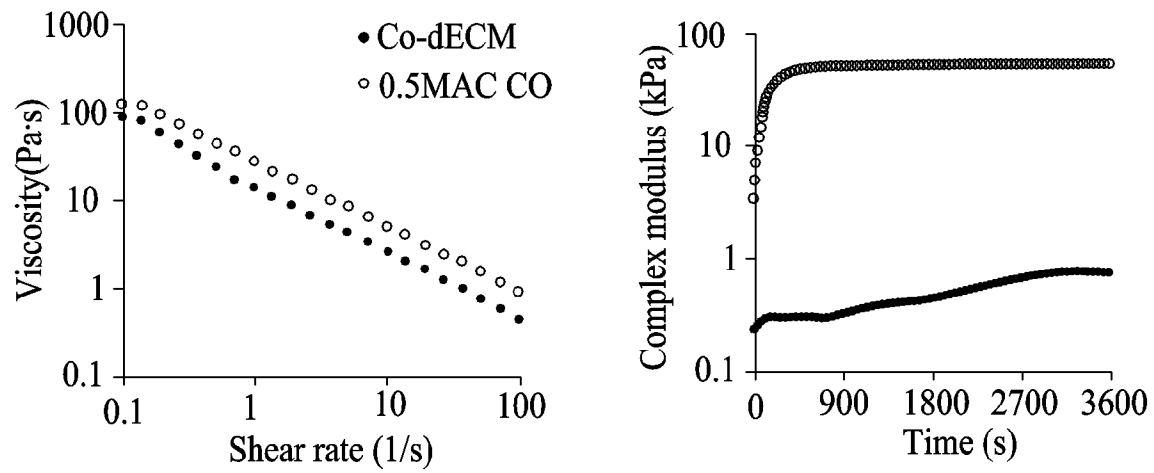
- [청구항 1] 아민기를 가지는 세포외기질 및 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐 간의 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)에 의해 형성된 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 세포외기질은 탈세포화 세포외기질인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 탈세포화 세포외기질은 각막 유래 탈세포화 세포외기질인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 에틸렌성 불포화 결합 관능기는 비닐기, 아크릴기 또는 메타크릴기에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 변성 콜라겐은 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen) 또는 아크릴레이트화된 콜라겐(Acrylated collagen)에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 하이드로겔 내에 함유된 세포외기질 대 변성 콜라겐의 중량비는 1:0.05 내지 1:0.8인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔.
- [청구항 7] 아민기를 가지는 세포외기질을 산 용액에 용해시켜 pH가 2~5인 세포외기질 하이드로겔을 준비하는 단계;
상기 세포외기질 하이드로겔에 에틸렌성 불포화 결합 관능기가 도입된 변성 콜라겐을 첨가하고 균일하게 혼합시킨 후 마이클 부가 반응(Michael addition reaction)을 유도하여 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 형성하는 단계; 및
상기 세포외기질-변성 콜라겐 접합체를 포함하는 하이드로겔을 5.5~8의 pH로 중화하는 단계를 포함하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 세포외기질은 각막 유래 탈세포화 세포외기질인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 변성 콜라겐은 메타크릴레이트화된 콜라겐(Methacrylated collagen) 또는 아크릴레이트화된 콜라겐(Acrylated collagen)에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 변성 콜라겐의 첨가량은 하이드로겔 내에 함유된 세포외기질 100 중량부 대비 5~80 중량부인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법.

- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 세포외기질 하이드로겔 내 세포외기질 함량은 1~4% (w/v)인 것을 특징으로 하는, 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 12] 세포 및 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔을 포함하는 바이오잉크로서, 상기 세포는 개질된 세포외기질 기반 하이드로겔에 캡슐화된 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 바이오잉크.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 바이오잉크 내에서 세포의 농도는 1×10^6 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml인 것을 특징으로 하는 바이오잉크.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 세포는 각막 유래 세포인 것을 특징으로 하는 바이오잉크.
- [청구항 15] 3-D 프린팅에 의해 제12항의 바이오잉크로부터 성형한, 이식용 인공생체조직.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 인공생체 조직은 인공각막조직인 것을 특징으로 하는, 이식용 인공생체조직.

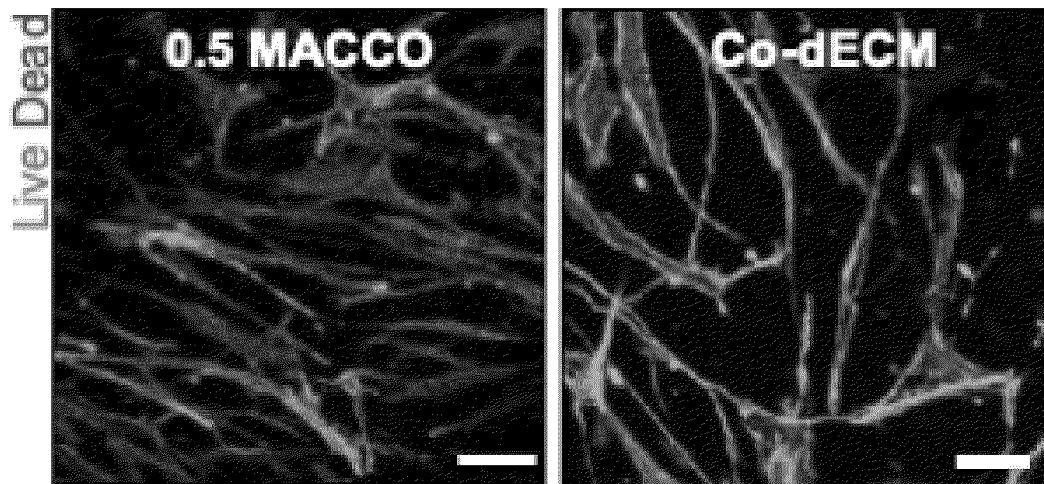
[도1]



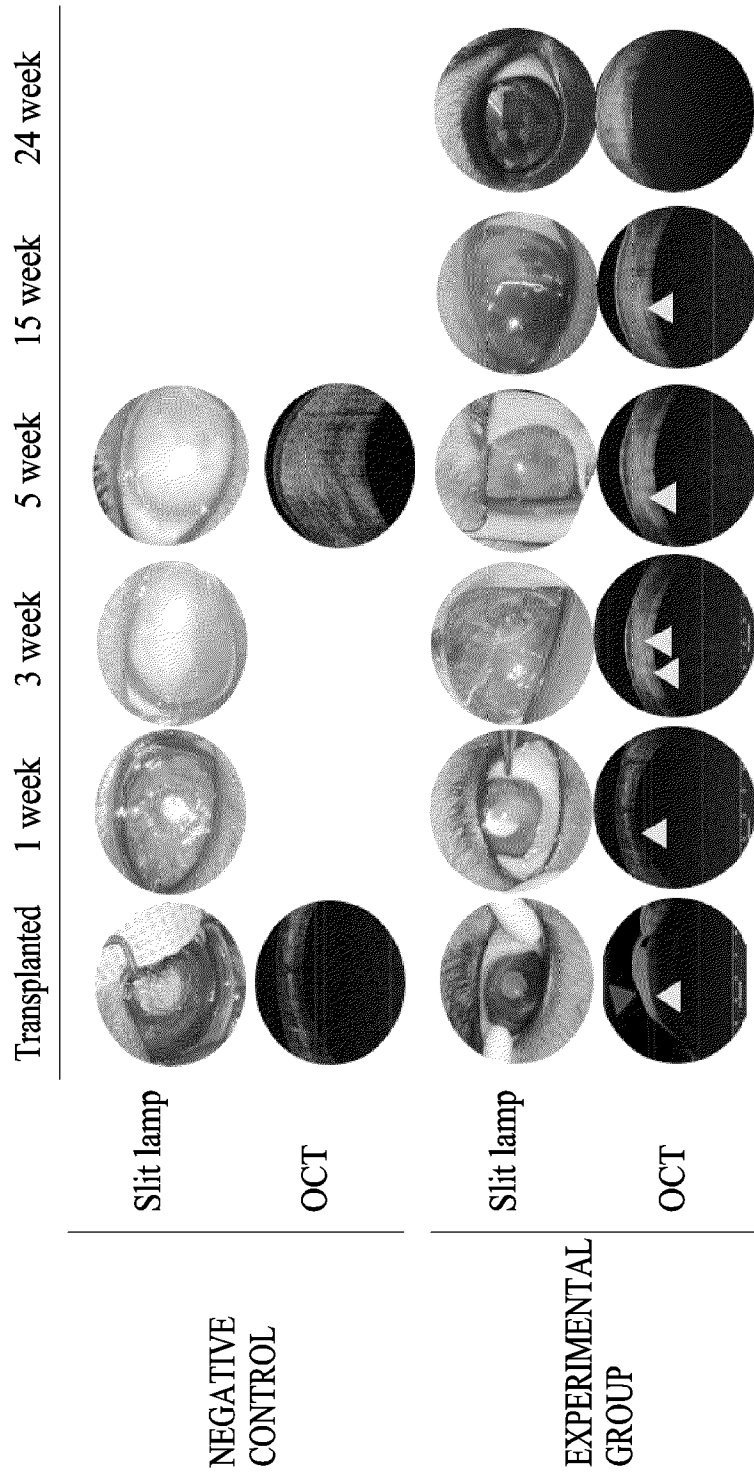
[도2]



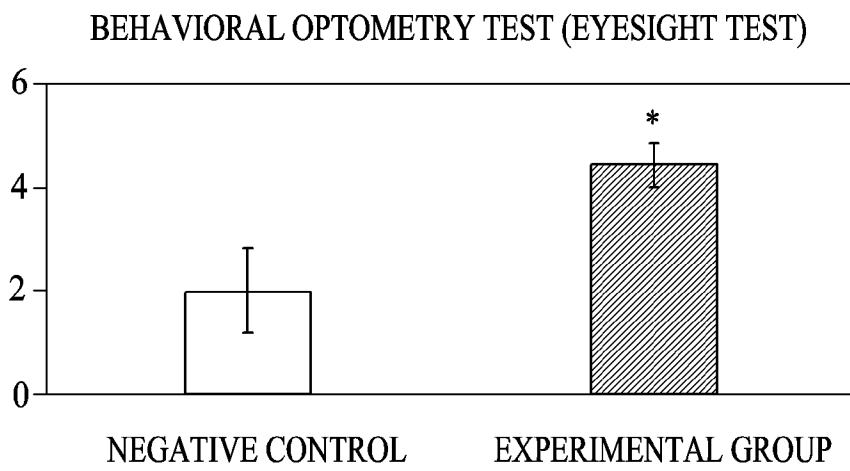
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/017390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61F 2/14(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/52(2006.01); A61F 2/14(2006.01); A61L 27/24(2006.01); A61L 27/26(2006.01); A61L 27/36(2006.01);
A61L 27/38(2006.01); B33Y 40/00(2015.01); B33Y 70/00(2015.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 아민기(amine group), 세포외기질(extracellular matrix), 메타크릴기(methacryl group), 콜라겐(collagen), 마이클 부가 반응(Michael addition reaction), 하이드로겔(hydrogel), 바이오잉크(bioink)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0140494 A (POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 07 December 2016 (2016-12-07) See paragraphs [0019]-[0020] and [0034]; and claims 1, 3, 9, 13 and 15.	1-16
Y	LEE, Ju Won et al. Michael-type addition of gelatin on electrospun nanofibrils for self-assembly of cell sheets composed of human dermal fibroblasts. ACS Omega. 2019, vol. 4, pp. 18677-18684. See abstract; page 18677, left column; page 18681, right column; and figure 1.	1-16
Y	KR 10-2018-0125776 A (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) 26 November 2018 (2018-11-26) See example 2; and claims 1, 5, 7, 15 and 17.	12-16
A	US 2016-0193384 A1 (UAB FERENTIS) 07 July 2016 (2016-07-07) See entire document.	1-16
A	US 2020-0179563 A1 (ADVANCED BIOMATRIX, INC.) 11 June 2020 (2020-06-11) See entire document.	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 March 2022

Date of mailing of the international search report

02 March 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/017390

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2016-0140494	A		07	December 2016	KR	10-1859654 B1	18	May 2018
KR	10-2018-0125776	A		26	November 2018	KR	10-1954953 B1	06	March 2019
US	2016-0193384	A1		07	July 2016	EP	3043835 A1	20	July 2016
						EP	3043835 B1	12	August 2020
						US	10039859 B2	07	August 2018
						WO	2015-032985 A1	12	March 2015
US	2020-0179563	A1		11	June 2020	EP	3526007 A1	21	August 2019
						EP	3526007 A4	27	May 2020
						JP	2019-530461 A	24	October 2019
						KR	10-2019-0070922 A	21	June 2019
						WO	2018-071639 A1	19	April 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61F 2/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61L 27/52(2006.01); A61F 2/14(2006.01); A61L 27/24(2006.01); A61L 27/26(2006.01); A61L 27/36(2006.01); A61L 27/38(2006.01); B33Y 40/00(2015.01); B33Y 70/00(2015.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아민기(amine group), 세포외기질(extracellular matrix), 메타크릴기(methacryl group), 콜라겐(collagen), 마이클 부가 반응(Michael addition reaction), 하이드로겔(hydrogel), 바이오잉크(bioink)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2016-0140494 A (포항공과대학교 산학협력단) 2016.12.07 단락 [0019]-[0020], [0034]; 및 청구항 1, 3, 9, 13, 15 참조.	1-16
Y	LEE, JU WON 등, "Michael-type addition of gelatin on electrospun nanofibrils for self-assembly of cell sheets composed of human dermal fibroblasts." ACS Omega, 2019, 4권, 페이지 18677-18684 요약; 페이지 18677, 좌측 컬럼; 페이지 18681, 우측 컬럼; 및 도면 1 참조.	1-16
Y	KR 10-2018-0125776 A (울산과학기술원) 2018.11.26 실시예 2; 및 청구항 1, 5, 7, 15, 17 참조.	12-16
A	US 2016-0193384 A1 (UAB FERENTIS) 2016.07.07 전체 문헌 참조.	1-16
A	US 2020-0179563 A1 (ADVANCED BIOMATRIX, INC.) 2020.06.11 전체 문헌 참조.	1-16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년03월02일(02.03.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년03월02일(02.03.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0140494 A	2016/12/07	KR 10-1859654 B1	2018/05/18
KR 10-2018-0125776 A	2018/11/26	KR 10-1954953 B1	2019/03/06
US 2016-0193384 A1	2016/07/07	EP 3043835 A1	2016/07/20
		EP 3043835 B1	2020/08/12
		US 10039859 B2	2018/08/07
		WO 2015-032985 A1	2015/03/12
US 2020-0179563 A1	2020/06/11	EP 3526007 A1	2019/08/21
		EP 3526007 A4	2020/05/27
		JP 2019-530461 A	2019/10/24
		KR 10-2019-0070922 A	2019/06/21
		WO 2018-071639 A1	2018/04/19