



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090519
(43) 공개일자 2017년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0671 (2013.01)
C12N 5/0656 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7021033(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7029208
원출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2015년10월14일
(85) 번역문제출일자 2017년07월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026679
(87) 국제공개번호 WO 2014/151921
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
13/841,430 2013년03월15일 미국(US)

(71) 출원인
오가노보, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 스윗 110 낸
시 리지 드라이브 6275
(72) 발명자
셰퍼드 벤자민 알.
미국 92131 캘리포니아주 샌디에고 골든 버치 웨
이 11248
로빈 저스틴 비.
미국 92116 캘리포니아주 샌디에고 유니트 12 오
하이오 스트리트 4655
(74) 대리인
김진희, 김태홍

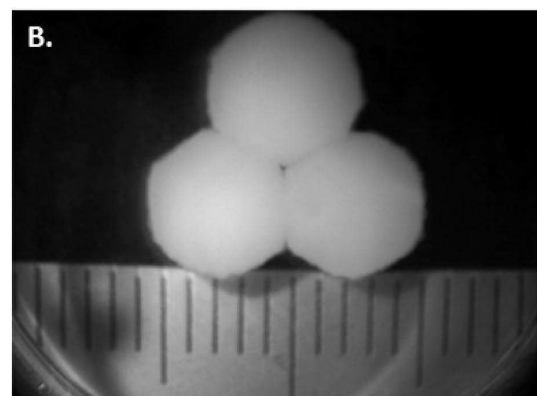
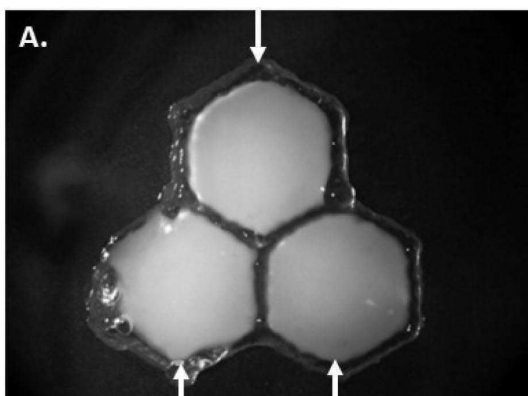
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 조작된 간 조직, 그의 어레이, 및 그의 제조 방법

(57) 요약

각 층은 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물. 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 층은 복수의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 하나 이상의 층; 및 하나 이상의 층은 하나 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 한다. 어레이 및 그의 제조 방법 또한 개시한다. 조직의 생체내 전달에 의해 또는 체외 장치에서의 조직 사용에 의해 하나 이상의 간 기능을 강화 또는 회복시키는 데 사용하기 위한 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

C12N 2502/14 (2013.01)

C12N 2502/28 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2535/10 (2013.01)

(72) 발명자

고르젠 비비안 에이.

미국 92128 캘리포니아주 샌디에고 샤르망 드라이브 7025 아파트 256

프레스넬 샤론 씨.

미국 92128 캘리포니아주 샌디에고 뉴포터 웨이 14023

명세서

청구범위

청구항 1

조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 평면 기하학적 구조를 정하는 하나 이상의 구획을 포함하고, 상기 구획은 경계에 의해 정해지는 내부를 포함하고, 상기 내부는 실질 세포를 포함하고, 상기 경계는 비실질 세포를 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 구성물의 하나 이상의 성분은 바이오프린트된 것인 간 조직 구성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 구성물은 제조 시점에, 사용 시점에 또는 둘 다에 미리 형성된 스캐폴드를 포함하지 않는 것인 간 조직 구성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 실질 세포가 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상으로부터 유래된 것인 간 조직 구성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 비실질 세포가 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관(sinusoidal) 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 비-간 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상을 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 복수의 층을 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 하나 이상의 층이 하나 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하여 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 인간에서의 하나 이상의 간 기능 강화에 사용하기 위한 것인 간 조직 구성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 피험체에서의 손상, 질환 또는 변성 부위에서의 이식을 위한 것인 간 조직 구성물.

청구항 10

시험관내 검정에 사용하기 위한 어레이로 배열된, 복수의 제1항의 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK); 질환 모델링; 감염성 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상에 사용하기 위한 것인, 어레이로 배열된 복수의 조작된, 살아 있는,

3차원의 간 조직 구성물.

청구항 12

조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은

- a. 복수의 세포 유형을 포함하는 하나 이상의 층으로서, 상기 세포 유형이 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 하나 이상의 층; 또는
 - b. 복수의 층으로서, 하나 이상의 층이 하나 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하여 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수의 층
- 을 포함하고,

상기 구성물은 평면 기하학적 구조를 정하는 하나 이상의 구획을 포함하고, 상기 구획은 경계에 의해 정해지는 내부를 포함하고, 상기 내부는 실질 세포를 포함하고, 상기 경계는 비실질 세포를 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 구성물의 하나 이상의 성분은 바이오프린트된 것인 간 조직 구성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 구성물은 제조 시점에, 사용 시점에 또는 둘 다에 미리 형성된 스캐폴드를 포함하지 않는 것인 간 조직 구성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 실질 세포가 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상으로부터 유래된 것인 간 조직 구성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 비실질 세포가 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 비-간 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상을 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 인간에서의 하나 이상의 간 기능 강화에 사용하기 위한 것인 간 조직 구성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 피험체에서의 손상, 질환 또는 변성 부위에의 이식을 위한 것인 간 조직 구성물.

청구항 19

시험관내 검정에 사용하기 위한 어레이로 배열된, 복수의 제12항의 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK); 질환 모델링; 감염성 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상에 사용하기 위한 것인, 어레이로 배열된 복수의 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물.

청구항 21

살아 있는 3차원의 간 조직 구성물을 제조하는 방법으로서,

- a. 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계;
- b. 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계;
- c. 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시켜 평면 기하학적 구조를 정하는 하나 이상의 구획을 형성하는 단계로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인 단계; 및
- d. 침적된 바이오 잉크를 1시간 내지 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 살아 있는 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 구성물의 하나 이상의 성분은 바이오프린트된 것인 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 구성물은 제조 시점에, 사용 시점에 또는 둘 다에 미리 형성된 스캐폴드를 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 비실질 세포가 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 정상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 비-간 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 실질 세포가 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포 (ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 26

제21항에 있어서, 구성물이 신경 지배성이 아닌(non-innervated) 것인 방법.

청구항 27

살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제조하는 방법으로서, 지지체 상에 침적된, 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크 및 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 1시간 내지 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜, 살아 있는 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하고, 상기 간 조직 구성물은 평면 기하학적 구조를 정하는 하나 이상의 구획을 포함하며, 상기 구획이 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 구성물의 하나 이상의 성분은 바이오프린트된 것인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 구성물은 제조 시점에, 사용 시점에 또는 둘 다에 미리 형성된 스캐폴드를 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 30

하나 이상의 층을 포함하고, 조작된 살아 있는 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 평면 기하학적 구조를 정하는 하나 이상의 구획을 포함하고, 상기 구획은 경계에 의해 정해지는 내부를 포함하고, 상기 내부는 실질 세포를 포함하고, 상기 경계는 비실질 세포를 포함하고, 단, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물은 7일 이상

동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물로 유지되고, 하기의 간 특징들:

- a. 콜레스테롤 합성;
 - b. 지질 저장;
 - c. 글리코겐 저장;
 - d. 알부민, 피브리노겐, 트랜스페린, CYP450, 알파-1-안티트립신, 오르니틴 트랜스카바밀라제, 글리코겐 신타제, 인자 VIII, 및 인자 IX 중 2 이상을 포함한, 간 특이 단백질의 발현;
 - e. 호르몬, 유도제, 독물, 약물, 항체, 간접 RNA, 소형 RNA, 잠금형 핵산, 바이러스, 박테리아, 기생충, 및 염증성 유도제 중 하나 이상을 포함한, 간 조절 인자에 대한 반응성;
 - f. 아세트아미노펜, 알콜, 트로바플록사신, 메토크세이트, 디클로페낙, 트로글리타존, 발프로산, 및 아미오다론 중 하나 이상을 포함한, 간 독물에 대한 반응성;
 - g. BSEP, OATP1B1, NTCP, PGP, BCRP, OATP1B3, ABCB4, ATP8B1, 다제내성 수송체(MDR) 중 하나 이상을 포함한, 수송체 단백질의 발현;
 - h. 제조 후 적어도 일부의 휴지 성장 세포 유지; 및
 - i. 미세혈관 구조 포함
- 중 2 이상의 특징을 가지는 것인 간 조직 구성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 구성물의 하나 이상의 성분은 바이오프린트된 것인 간 조직 구성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 구성물은 제조 시점에, 사용 시점에 또는 둘 다에 미리 형성된 스캐폴드를 포함하지 않는 것인 간 조직 구성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 구성물이 14일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물로 유지되는 것인 간 조직 구성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 구성물이 28일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물로 유지되는 것인 간 조직 구성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 구성물이 40일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물로 유지되는 것인 간 조직 구성물.

청구항 36

제30항에 있어서, 2 이상의 세포 유형이 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 유래된 세포를 포함하는 것인 간 조직 구성물.

청구항 37

제30항에 있어서, 2 이상의 세포 유형이 단핵구 또는 대식세포로부터 유래된 골수성 세포를 포함하는 것인 간 조직 구성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2013년 3월 15일 출원된 미국 출원 시리얼 번호 13/841,430의 이점을 주장하고, 그의 부분 계속 출원이고, 상기 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 다수의 긴급한 문제가 건강 관리 산업에 직면해 있다. 2012년 6월 현재 기관 이식을 필요로 하는 환자 114,636명이 미국 장기 이식 센터(UNOS: United Network for Organ Sharing)에 등록되어 있다. UNOS에 따르면, 2012년 1월부터 3월 사이에 단지 6,838건의 이식만이 실행되었다. 매년 이식 실행 건수보다 더 많은 환자수가 UNOS 목록에 추가되고 있으며, 이로써 이식 대기 중인 순 환자수가 증가하고 있다.

[0004] 추가로, 새로운 제약 화합물의 연구 및 개발 비용은 대략 18억 달러에 달한다. 문헌 [Paul, et al. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 9(3):203-214] 참조할 수 있다. 신약 개발은 신약을 개발하고/거나, 고안하는 과정이다. 신약 개발 과정은 일반적으로 적어도 후보물질 확인 단계, 합성 단계, 특징 규명 단계, 스크리닝 단계, 및 치료 효능 검증 단계를 포함한다. 기술이 진보하였고, 생물학적 시스템을 이해함에도 불구하고, 신약 개발은 여전히 신규한 치료제 개발 속도가 느린, 장황하고, 고가이며, 비효율적인 과정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 재생 의학 및 조직 및/또는 기관 조작 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 조작된(engineered) 간 조직 구성물, 그의 어레이, 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 한 측면에서, 본원에서는 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 평면 기하학적 구조를 정의하는 1 이상의 구획을 포함하고, 상기 구획은 경계에 의해 정의되는 내부를 포함하고, 상기 내부는 실질 세포를 포함하고, 상기 경계는 비실질 세포를 포함하고; 세포는 응집하여 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하되; 단, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이고, 사용 시점에는 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스케폴드가 없는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 실질 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 확립된 간 유래 세포주 또는 주(strains), 배아 줄기 세포(ESC: embryonic stem cell); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC: induced pluripotent stem cell); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구(progenitor) 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 비실질 세포는 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 쿠퍼(Kupffer) 세포, 성상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 분화 신호에 노출된 줄기/전구 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분화 신호는 생체역학적 신호, 가용성 신호, 및 물리적 신호중 하나 이상의 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이전에 하나 이상의 분화 신호에 노출된 것이다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 동안 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이후에 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 층을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 복수 개의 층들을 포함하며, 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 시험관내 검증에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME: absorption, distribution, metabolism and excretion); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK: drug metabolism and pharmacokinetics testing); 질환 모델링; 감염 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상의 것에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 세포 기반 스크리닝에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 스크리닝은 하나 이상의 감염성 질환, 간 섬유증(예컨대, 간경변), 간암, 간 지방증(예컨대, 지방 간), 하나 이상의 대사 결핍, 또는 하나 이상의 단백질 결핍에

대한 것이다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염 또는 기생충 감염(예컨대, 플라스모디움(*Plasmodium*) 감염 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 장기간의 조직 독성 연구에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 분석은 >3일 내지 최대 6개월간의 기간 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 인간에서의 하나 이상의 간 기능 강화에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 시험체에서의 손상, 질환 또는 변성 부위에의 이식을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 간 기능을 강화 또는 회복시키기 위해 디자인된 체외 장치에서 임상적으로 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0007]

또 다른 측면에서, 본원에서는 각 층은 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다. 일부 실시양태에서, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직의 각 층은 조작된 X, Y, 및 Z축으로 다중 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직의 각 층의 두께는 X, Y, 및 Z축으로 약 50 μm 이상이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 시점에는 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 간 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 분화 신호에 노출된 줄기/전구 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분화 신호는 생체역학적 신호, 가용성 신호, 및 물리적 신호중 하나 이상의 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이전에 하나 이상의 분화 신호에 노출된 것이다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 동안 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이후에 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 시험관내 검정에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK); 질환 모델링; 감염성 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상의 것에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 세포 기반 스크리닝에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 스크리닝은 하나 이상의 감염성 질환, 간 섬유증(예컨대, 간경변), 간암, 간 지방증(예컨대, 지방 간), 하나 이상의 대사 결핍, 또는 하나 이상의 단백질 결핍에 대한 것이다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염 또는 기생충 감염(예컨대, 플라스모디움 감염 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 장기간의 조직 독성 연구에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 분석은 >3일 내지 최대 6개월간의 기간 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 인간에서의 하나 이상의 간 기능 강화에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 시험체에서의 손상, 질환 또는 변성 부위에의 이식을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 간 기능을 강화 또는 회복시키기 위해 디자인된 체외 장치에서 임상적으로 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0008]

또 다른 측면에서, 본원에서는 복수 개의 층을 포함하는 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 각 층은 실린더형 바이오 잉크를 포함하고, 바이오 잉크는 축 방향으로 실질적으로 평행하게 정렬되어 있고, 바이오 잉크는 실린더형 바이오 잉크 내에 또는 그 사이에 실질 간 세포; 및 임의적으로, 비실질 세포; 및 임의적으로, 실린더형 바이오 잉크 사이에 빈 공간(void space)을 포함하는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다. 일부 실시양태에서, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 실질 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 비실질 세포는 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의

다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 층을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 복수 개의 층들을 포함하며, 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 인간에서의 하나 이상의 간 기능 강화에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 피험체에서의 손상, 질환 또는 변성 부위에의 이식을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 간 기능을 강화 또는 회복시키기 위해 디자인된 체외 장치에서 임상적으로 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0009]

또 다른 측면에서, 본원에서는 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이로서, 각 구성물은 각 층은 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것이고, 각 구성물은 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는 것인, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이를 개시한다. 일부 실시양태에서, 각 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 각 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 시점에는 각 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 간 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 각 구성물 하나 이상의 분화 신호에 노출된 줄기/전구 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분화 신호는 생체역학적 신호, 가용성 신호, 및 물리적 신호중 하나 이상의 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이전에 하나 이상의 분화 신호에 노출된 것이다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 동안 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이후에 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 일부 실시양태에서, 각 구성물은 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 어레이는 시험관내 검정에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 어레이는 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK); 질환 모델링; 감염성 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상의 것에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 어레이는 세포 기반 스크리닝에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 스크리닝은 하나 이상의 감염성 질환, 간 섬유증(예컨대, 간경변), 간암, 간 지방증(예컨대, 지방 간), 하나 이상의 대사 결핍, 또는 하나 이상의 단백질 결핍에 대한 것이다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염 또는 기생충 감염(예컨대, 플라스모디움 감염 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어레이는 장기간의 조직 독성 연구에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 분석은 >3일 내지 최대 6개월간의 기간 동안 수행된다.

[0010]

또 다른 측면에서, 본원에서는 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이로서, 여기서, 1 이상의 구성물은 간 조직 구성물이고, 각각의 간 조직 구성물은 각 층이 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것이고, 간 조직 구성물은 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는 것인, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이를 개시한다. 일부 실시양태에서, 각각의 간 조직 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 각각의 간 조직 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 시점에는 각각의 간 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없었다. 일부 실시양태에서, 간 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 각각의 간 조직 구성물 하나 이상의 분화 신호에 노출된 줄기/전구 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분화 신호는 생체역학적 신호, 가용성 신호, 및 물리적 신호중 하나 이상의 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작

이전에 하나 이상의 분화 신호에 노출된 것이다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 동안 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 추가의 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이후에 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 일부 실시양태에서, 각각의 간 조직 구성물은 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 골모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 어레이는 시험관내 검정에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 어레이는 하기: 조직-조직 상호작용; 신약 개발; 약물 검사; 임상전 연구; 독성 검사; 흡수, 분포, 대사, 및 배출 검사(ADME); 약물 대사 및 약동학적 성질 검사(DMPK); 질환 모델링; 감염성 질환 모델링; 숙주 질환 모델링; 3차원의 생물학적 연구; 및 세포 기반 스크리닝 중 하나 이상의 것에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 어레이는 세포 기반 스크리닝에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 스크리닝은 하나 이상의 감염성 질환, 간 섬유증(예컨대, 간경변), 간암, 간 지방증(예컨대, 지방 간), 하나 이상의 대사 결핍, 또는 하나 이상의 단백질 결핍에 대한 것이다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염 또는 기생충 감염(예컨대, 플라스모디움 감염 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어레이는 장기간의 조직 독성 연구에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서, 분석은 >3일 내지 최대 6개월간의 기간 동안 수행된다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본원에서는 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시키는 단계; 및 침적된 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 1 이상의 구획을 포함하는 것으로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 비실질 세포는 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 골모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 실질 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 시점에는 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본원에서는 간 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 하나 이상의 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시키는 단계; 및 하나 이상의 침적된 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하는, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법으로서, 여기서, 구성물은 각 층이 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것인 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 간 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 골모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 시점에는 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본원에서는 포유동물 간 세포를 포함하는 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계; 상기 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하여 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 형성하는 단계; 및 상기 하나 이상의 다세포 응집물을 약 1시간 내지 약 30일의

지속 기간 동안 인큐베이션시켜 그가 응집되고, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성할 수 있게 하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 구성하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 간 세포는 하기 공급원: 성체 포유동물 간 조직; 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); ESC 유래 간세포 유사 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC); iPSC 유래 간세포 유사 세포; 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것으로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 간 조직 구성물은 하기 세포 유형: 혈관 세포, 내피 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 섬유아세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 암 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 및 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포 중 하나 이상의 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물은 바이오프린팅을 위한 세포의 적합성을 개선시키는 압출 화합물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 구성물에 바이오프린팅 시점에 또는 사용 시점에 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 구성물은 신경 지배성이 아니다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본원에서는 지지체 상에 침적된, 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크 및 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 1 이상의 구획을 포함하는 것으로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법을 개시한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본원에서는 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 하나 이상의 층을 포함하고, 1 이상의 층은 2개 이상의 세포 유형을 포함하고, 2개 이상의 세포 유형은 실질 간 세포 유형 및 비실질 간 세포 유형을 포함하고, 2개 이상의 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하고, 평면 기하학적 구조는 1 이상의 실질 간 세포 구획 및 1 이상의 비실질 간 세포 구획을 포함하고, 하나 이상의 층은 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하되; 단, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물은 7일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지되고, 하기의 간 특징들: 콜레스테롤 합성; 지질 저장; 글리코겐 저장; 알부민, 피브리노겐, 트랜스페린, CYP450, 알파-1-안티트립신, 오르니틴 트랜스카바미라제, 글리코겐 신타제, 인자 VIII, 및 인자 IX 중 둘 이상의 것을 비롯한, 간 특이 단백질 발현; 호르몬, 유도제, 독물, 약물, 항체, 간접 RNA, 소형 RNA, 잠금형 핵산, 바이러스, 박테리아, 기생충, 및 염증성 유도제 중 하나 이상의 것을 비롯한, 간 조절 인자에의 반응; 아세트아미노펜, 알콜, 트로바플록사신, 메토트렉세이트, 디클로페낙, 트로글리타존, 발프로산, 및 아미오다론 중 하나 이상의 것을 비롯한, 간 독물에의 반응; BSEP, OATP1B1, NTCP, PGP, BCRP, OATP1B3, ABCB4, ATP8B1, 다중 약물 저항 수송체(MDR: Multi-Drug Resistance Transporter) 중 하나 이상의 것을 비롯한, 수송체 단백질 발현; 제작 후 적어도 일부의 휴지 성상 세포 유지; 및 미세혈관 구조 포함 중 2개 이상을 가지는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다. 일부 실시양태에서, 구성물은 14일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 28일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지된다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 40일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지된다. 다양한 실시양태에서, 구성물은 적어도 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지된다. 일부 실시양태에서, 구성물은 바이오프린터를 사용하여 전자동 방법으로 제조된다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 세포 유형은 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 유래된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 세포 유형은 단핵구 또는 대식세포로부터 유래된 골수성 세포를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 구성물은 간 특징들 중 3, 4, 5, 또는 6, 7, 8개 이상, 또는 그들 모두를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에 특별히 기술되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점은 본 발명의 원리가 사용되는 예시적인 실시양태를 기술하는 하기의 상세한 설명 및 하기의 첨부된 도면을 참조로 하여 더욱 잘 이해될 것이다.

도 1은 천연 간 조직 기하학적 구조의 비제한적인, 예시적인 도해이다.

도 2는 헤파RG(HepaRG) 세포를 함유하는 바이오프린트된 간 구성물의 성숙화 및 생화학적 특징 규명에 대한 비제한적인, 예시적인 입증이다. 헤파RG 세포를 주변 박스 중심부에 침적시킨 후, 96시간 동안 성숙화시켰다(A-C). 바이오프린트된 간 구성물은 96시간째에 알부민(D) 및 콜레스테롤(E)을 생산하는 데 있어 대사적으로 활성을 띤다. 텍사메타손 처리 후, 시토크롬 P450(CYP3A4) 활성은 비처리된 대조군(F)보다 5배 초과로 더 높다.

도 3은 2D 배양물 대조군보다 조작된, 바이오프린트된 구성물 중에서 유의적으로 더 높은 알부민 수준(D)(10^6 개의 입력 세포당)을 합성하는 iPSC 유래 간세포(C)를 함유하는 정의된 기하학적 패턴(A, B)을 가지는 바이오프린트된 구조의 비제한적인 일례이다.

도 4는 비실질 세포의 분리성 회전 타원체(B)를 함유하는 바이오프린트된 간 구성물(A)의 성숙화에 대한 비제한적인, 예시적인 입증이다. 바이오프린트된 구성물은 인큐베이션시 추가의 24시간 동안 융합되고, 안정한 상태로 유지되었다(C, D).

도 5는 간 세포의 프린팅 공정 동안에 걸쳐 시공간적 제어를 허용하고, 이로써 x, y, 및 z축으로 정의된 형상 및 크기의 사용자 지정 구획을 생성하는, 공동 프린트된 몰드의 분해에 대한 비제한적인, 예시적인 입증이다. 화살표 표시는 공동 프린트된 몰드가 프린트 후 24시간째에 분해된 영역, 및 추가의 세포 입력이 첨가된 영역을 나타내는 것이다.

도 6은 조작된 간 조직, 이 경우, 다중 간 세포 유형 및 수용성 압출 화합물(예컨대, PF-127)로 구성된 바이오잉크를 사용하고, 연속 침적 기전을 이용한 다층 간 조직 바이오프린트의 비제한적인 일례를 도시하는 거시적 영상이다. (A)는 바이오 잉크를 패턴화하여 형성된 평면 기하학적 구조 및 네거티브 스페이스를 강조 표시하는 단일 기능적 단위에 대한 개략도를 보여주는 것이고; (B) 2×10^8 개의 세포를 함유하는, PF-127을 포함하는 모자이크식, 기능적 단위 바이오프린트를 보여주는 것이고; (C)는 배지 적용 후 20분 경과하였을 때의 구성물을 보여주는 것이고; (D) 구조에의 배지 적용 및 압출 화합물 용해 후 20분 경과하였을 때의 구성물을 보여주는 것이다. 시간이 경과함에 따라 평면 기하학적 구조가 유지된다는 점에 주의한다.

도 7은 모자이크식 구성물 중 예시적인 "스포크"를 도시하는, 도 6의 모자이크식 구성물의 비제한적인 현미경 사진이다. 본 현미경 사진은 다층 모자이크식 육각 구조에 연속 침적된 후, 16시간 동안 배양된 성상 세포, 내피 세포, 및 진피 섬유아세포 바이오프린트의 포르말린 고정된 파라핀 포매된 절편의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 입증하는 것이다.

도 8은 별개의 구획화된 간 세포 영역의 융합을 허용하는 공동 프린트된 몰드의 분해의 비제한적인 일례이다(화살표로 표시). 시간 경과에 따른 (B; T=24시간) 고정 바이오프린트된 조직으로의 영역 융합.

도 9는 MMX 바이오프린터(MMX Bioprinter)의 시린지 데포지션 모듈(SDM: Syringe Deposition Module)을 이용하여, 72시간 경과시 융합되고, 간 조직으로 성숙화되는(B) 구성물(A)을 제조하는 바이오프린트된 공동 프린트된 몰드(4% 젤라틴 및 2% 알기네이트)의 비제한적인 일례이다. 본 일례에서, 바이오프린트된 조직은 H 및 E 염색(C)에 의해 입증되는 바, 조밀하고, 증식성 세포(E)와 비교하여 상대적으로 더 적은 TUNEL 염색된 세포(D)에 의해 입증되는 바, 생존가능한 것이다.

도 10은 융합된 3차원의 간 조직 구성물을 제조하는 시린지 침적 모듈(SDM)을 이용하여 연속 침적시킴으로써 바이오프린트된 공동 프린트된 몰드(A; 4% 젤라틴 및 2% 알기네이트)의 비제한적인 일례이다. 구조의 중심부에 내피 바이오 잉크를 첨가하면 구성물의 복잡성은 증가된다(B). E-카드헤린(C) 및 CD31(D) 염색은 프린트 후 144시간째에 바이오프린트된 영역 전역에 걸쳐 상피 및 내피 세포가 존재함을 입증한다. TUNEL 염색은 144 h 인큐베이션 후, 조작된 간 조직의 코어 내의 제한된 세포 사멸을 입증한다(E).

도 11은 하이드로겔(4% 젤라틴:2% 알기네이트)으로 구성된 공동 프린트된 몰드(공동 몰드)(A) 또는 비실질 세포 및 하이드로겔 기반 압출 화합물로 구성된 바이오 잉크(B)의 비제한적인 일례이다. 바이오 잉크 공동 몰드 라인 은 하이드로겔 압출 화합물 1 ml당 150×10^6 개의 세포를 함유한다. HepG2 세포를 공동 몰드 구조에 첨가하고, 24 h 동안 인큐베이션시키면, 융합된 바이오프린트된 간 구조가 생성된다(C). 압출 화합물은 시간이 경과함에 따라 수성 매질 중에 용해된다.

도 12는 노보젠(NovoGen) MMX 바이오프린터 상에 2개의 시린지 침적 모듈(SDM)을 이용하여 연속 침적시킴으로써 제작된 조밀하고, 세포 간 조직의 비제한적인 일례이다. 제1 SDM 모듈에 이어서, 제2 SDM으로 HepG2 바이오 페이스트를 충전시킴으로써 4% 젤라틴 및 2% 알기네이트를 함유하는 공동 몰드 라인을 침적시켰다.

도 13은 판상 기하학적 구조를 가지는 바이오프린트된 신생 조직의 비제한적인 일례이다. 노보젤(NovoGel)TM 하이드로겔 기반의, 공동 프린트된 제한 박스를 바이오프린트한 후, 간 상피 세포 바이오 잉크(HepG2 세포)를 포함하는 제1층을 증착시킨 후, 그 위에 간 성상 세포 및 내피 세포로 구성된 제2층을 바이오프린트하였다. 본 일례에서, 하이드로겔 압출 화합물을 함유하는 바이오 잉크를 연속 침적시켜 성상:EC 층을 바이오프린트하였다

(A). 2개의 상이한 바이오 잉크 층을 입증하는, 제작 직후의 구성물의 육안 영상(B). 48시간 동안 배양한 후의 포르말린 고정된 파라핀 포매된 구성물의 절편의 헤마톡실린 및 에오신 염색(C) 결과, 2개 층의 상이한 형태 및 관상 기하학적 구조의 확립이 나타났다. CD31 양성 세포는 내피 세포 및 간 정상 세포의 현탁액이 바이오프린트된 구성물의 상부 층에 국한된 반면(D), IGF-2 양성 HepG2는 하부 층에서만 오직 관찰된다(E).

도 14는 바이오프린트된 간 조직 중의 세포 패턴화 및 적응의 비제한적인 일례이다. 파라핀 포매된 조직 절편의 헤마톡실린 및 에오신 염색은 혈관 내피 세포 및 간 정상 세포를 함유하는 다형 세포 집단을 바이오프린트하여 형성된 인접한 신생 조직(A)을 나타낸다. CD31에 대한 항체를 이용한 조직 절편 염색은 중심에 위치하는 EC가 정렬된 미세혈관, 및 CD31 양성 EC의 외부 층이 존재함을 나타낸다(B).

도 15는 TGF- β 1에 의한 바이오프린트된 간 정상 세포 조직의 자극에 대한 비제한적인 일례이다. TGF- β 1의 농도를 증가시키면서(0, 1, 10, 50 ng/mL) 바이오프린트된 간 정상 세포 시트와 함께 인큐베이션시키면, 사이토카인 농도 증가가 조직 증식물 형성을 증가시키기 때문에(A-D, 0-50 ng/mL), 바이오프린트된 조직의 육안상 관찰 결과가 변화하게 된다. 바이오프린트된 간 정상 함유 조직으로부터의 조직 절편의 트리크롬 염색은 콜라겐 침적 및 구성물 크기의 증가, 및 세포 밀도의 현저한 감소를 나타낸다(E-H, 0-50 ng/mL).

도 16은 다중 웰 포맷의 바이오프린팅의 비제한적인 일례이다. 바이오프린트된 조직 구성물은 다중 웰 플레이트(A)에 또는 장기간 유지 및 성숙화를 위해, 임의적으로 적절한 다중 웰 플레이트에 배치된 다중 웰 배양 인서트(B) 내에서 생성된다. 여기서, 조직 구성물은 48 웰 폴리스티렌 플레이트에(A) 및 6 웰 세포 배양 인서트의 다공성 막 상에(B) 바이오프린트되었다.

도 17은 체외 지지체용으로 고안되고, 프린트된 바이오프린트된 간 관상 구조의 비제한적인 일례이다. 70% HepG2/25% HUVEC/5% 간 성상을 포함하는 40 mm 길이의 바이오 잉크 실린더를 바이오프린트하고, 조절하였다. 제거가능한 바이오 인서트 하이드로겔을 사용하여 구조의 중심부에 채널을 생성하였다.

도 18은 본원에 기술된 구성 방법과 화합성이고, 천연 조직 구조 및 생물학적 성질의 구조적 또는 공간적 요소를 재현하는 평면 및 관상 기하학적 구조(그의 조합 포함)에 대한 일련의 비제한적인 일례이다. 예시적인 기하학적 구조로는 혈관망 구조를 가지는 구조상 정확한 조직(A), 구역 조직(B), 분엽 조직(C), 관류된/어레이된 조직(D), 고체 + 액체/액체 계면을 포함하는 조직(E), 장벽 조직(F), 및 관상 기하학적 구조를 포함하는 적층된 조직(G)을 포함한다.

도 19는 조작된 간 조직 간의 및/또는 그를 통한 관류가 이루어질 수 있도록 허용하는 규칙적인 간격으로 빈 공간(임시 충전체로 점유된 것으로 표시: 검은색 동그라미)이 존재하는 반복형 관상 구조를 포함하는 체외 간 장치를 나타내는 비제한적인 개략도이다.

도 20은 바이오프린트된 인간 간 조직의 비제한적인 일례이다.

도 21은 프린트된 인간 간 조직을 조직학적으로 특징 규명한 것을 입증하는 일련의 비제한적인 현미경 사진이고; 이 경우, 현미경 사진은 고밀도 조직(A), ECM 생산(B), 지질 생산(C), 및 글리코젠 생산(D)을 보여주는 것이다.

도 22는 프린트된 인간 간 조직을 조직학적으로 특징 규명한 것을 입증하는 일련의 비제한적인 현미경 사진이고; 이 경우, 현미경 사진은 비실질 간질로 둘러싸인 간 세포의 영역 및 천연 간 조직을 모방하는 소엽형 구조로의 뚜렷한 자가 조직화를 보여주는 것이다.

도 23은 프린트된 인간 간 조직에 의한 알부민(A) 및 콜레스테롤(B) 생산을 입증하는 데이터의 비제한적인 일례이다.

도 24는 프린트된 인간 간 조직에 의한 트랜스페린(A) 및 피브리노겐(B) 생산을 입증하는 데이터의 비제한적인 일례이다.

도 25는 제작 후 10일째 프린트된 인간 간 조직에서의 하우스키핑 유전자 RNA(18s RNA)에 대해 상대적인, 담즙 산염 외수송 단백질 mRNA의 상대량을 입증하는 데이터의 비제한적인 일례이다.

도 26은 베라파밀에 의해 억제될 수 있는 (B), 바이오프린트된 간 조직에서의 리팜피신 처리(A)에 의한 활성 CYP3A4 효소의 지속적인 유도를 입증하는 데이터의 비제한적인 일례이다.

도 27은 바이오프린트된 간 조직에서 디클로페낙 처리에 의한 CYP3A4 유도, 이어서, 락테이트 데하이드로게나제(LDH: lactate dehydrogenase)에 의해 측정된 보다 고용량에서의 조직 손상을 입증하는 데이터의 비제한적인 일

레이다.

도 28은 바이오프린트된 간 조직에서의 다중 용량의 트로바플록사신 대 레보플록사신에 대한 연구에서 알부민의 감소(A) 및 LDH의 증가(B)를 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 29는 바이오프린트된 간 조직에서의 다중 용량의 메토크세이트에 대한 연구에서 ATP에 의해 측정된 생존능 감소(A), 알부민 감소(B), 및 LDH 증가(C)를 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 30은 CYP 유도에 의해 측정되는, 비타민 D에 대한 바이오프린트된 간 조직의 반응을 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 31은 쿠퍼 세포 함유 바이오프린트된 간 조직 중 IL-6 생산으로 측정되는, LPS 자극에 대한 반응을 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 32는 쿠퍼 세포 함유 바이오프린트된 간 조직 중 사이토카인 생산(IL-10, IL-1b, 및 TNF- α)으로 측정되는, LPS(10 μ g/ml(a) 및 100 μ g/ml(b))에 대한 용량 의존성 반응을 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 33은 약 90% 컨플루언스 상태의 간 굴모양혈관 내피 세포(HSEC: hepatic sinusoidal endothelial 세포)의 단일층의 비제한적인 일레이다.

도 34는 2차원적인 배양물에서 IL-6 생산에 의해 측정되는 LPS에 대한 HSEC 반응을 입증하는 데이터의 비제한적인 일레이다.

도 35는 비실질 분획 중 HSEC를 혼입하는 융합된 3차원의 바이오프린트된 간 조직의 비제한적인 일레이다.

도 36은 동결절편된 3차원의 바이오프린트된 간 조직을 통한 소형 분자 투과를 도시하는 현미경 사진(FITC; 5 X)의 비제한적인 일레이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 다수의 간 부전 환자의 경우, 건강한 세포 또는 조직의 전달을 통한 심지어는 부분적인 간 매스의 회복이 생존 및 간 기간에 대하여 중요한 영향을 미칠 수 있다. 2011년 UNOS 데이터베이스에 따르면, 미국에는 간 이식 대기 환자는 >10,000명으로 존재하고, 이 환자 중 <50%가 실제로 이식된 간을 받았다. 이식 목록 상의 성공한 것보다 훨씬 더 많은 환자가 이식된 간으로부터 이익을 얻을 수 있으며, 전형적으로 이는 가장 중증인 환자를 위해 보존된다. 추가로, 많은 개체는 이식이 현 건강관리상 패러다임은 아닌 것인 만성 변성 질환을 앓고 있다. 따라서, 살아 있는, 기능성 간 조직이 임상적으로 큰 가치가 있을 것이다. 미국에서는 현재 통상적으로 분절형, 또는 부분적인 간 이식이 실시되고 있는데, 이는 단일 기관을 2-3개의 절편 또는 소엽으로 분할하고, 각 조각을 대기 환자 내로 이식하는 것이다. 건강한 간 조직은 그의 크기 대사 요구량에 따라 성장하고, 개체에게 제공할 수 있는 독특한 능력을 가지고 있기 때문에, 부분적인 매스 이식 접근법이 임상적으로 실현가능하다.
- [0018] 추가로, 예측 밖의 독성으로 인해 많은 화합물이 임상 시험 중 최종 단계에서 또는 시판 이후에 실패하였고, 이는 III상에서 화합물 실패의 35%를 차지한다(문헌 [Curr. Pharm. Des. 2005 11:3545]). 예측 밖의 간 독성은 상기 실패의 대다수의 원인이 되며, 그 다음은 심장 독성 및 신장 독성이 원인이 된다. 따라서, 인간 생체내 성능을 더욱 잘 예측할 수 있는 더욱 우수한 시스템이 요구되고 있다.
- [0019] 지속 불가능한 R&D 비용은 초래하지 않으면서, 혁신적이고, 비용면에서 효과적인 새로운 의약의 개수 및 품질을 실질적으로 증가시킬 수 있는 물질, 도구, 및 기법이 요구되고 있다. 따라서, 본 발명자들은 본원에서 조직 및 기관 조작, 시험관내 검정, 신약 개발 및 다른 분야에서의 유용성을 가지는 조작된 간 조직 구성물, 그의 어레이, 및 그의 제조 방법을 기술한다.
- [0020] 종래 간 조직 모델은 용도를 제공할 수 있도록 미리 형성되고 성형화된 3차원 스캐폴드 물질 상에 세포를 시딩하거나, 또는 무작위적인 조립을 통해 간 세포가 다세포 회전 타원체를 형성할 수 있도록 함으로써(여기서, 세포의 구형 응집물이 생성되지만, 응집물 내에 방향성을 띠는 구조는 존재하지 않는다) 조작된 조직 구성물을 제공하는 것에 초점을 맞추었다. 스캐폴드 물질 상에 시딩된 세포는 일차 세포, 세포주, 조작된 세포, 및/또는 줄기/전구 세포였다. 다능성 줄기 또는 전구 세포가 사용될 때, 이는 3차원의 스캐폴드 물질 상에 시딩시키기 이전에 2차원적인 단일층 배양물 중에서 분화 프로그램을 거치게 되거나, 또는 먼저 스캐폴드 물질 상에 시딩된 후, 이어서, 계내에서 또는 시험관내에서 분화 프로그램을 거쳐 원하는 조직을 생성하게 된다. 전통적인 접근법은 세포 수율, 구성물 내에서의 세포의 최종 분화에 소요되는 시간, 및 생성된 3차원의 구조의 전체 세포질 및

구조면에 있어서 고되고, 비효율적이다.

- [0021] 중요하게는, 이전 노력 및 기술로는 구조 내의 특정 위치에 존재하는 특정 세포 유형을 가지고, 한 번에 수일 또는 수주 동안(최대 40일) 구성물 중에서 지속되는 정의된 조직 구획을 생성하지 못하였다. 또한, 이전 노력 및 기술로는 조직 수명에 기여하는, 미세혈관구조 및 밀착 연결부를 비롯한 천연 유사 구조를 입증하지 못하였다. 본원에 기술된 기술을 통해 구조를 미세 조정할 수 있고, 천연 조직과 유사한 고도로 정의된 기하학적 구조를 생성할 수 있다. 또한, 본 기술을 통해 상기 기하학적 구조를 유지하는 고밀도 세포 조직을 구성할 수 있으며, 이로써 조직의 유용한 수명을 연장시킬 수 있다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 본원에서는 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 평면 기하학적 구조를 정의하는 1 이상의 구획을 포함하고, 상기 구획은 경계에 의해 정의되는 내부를 포함하고, 상기 내부는 실질 세포를 포함하고, 상기 경계는 비실질 세포를 포함하고; 세포는 응집하여 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하되; 단, 구성물의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이고, 사용 시점에는 구성물에 실질적으로 미리 형성된 스캐폴드가 없는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 각 층은 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 복수 개의 층을 포함하는 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 각 층은 실린더형 바이오 잉크를 포함하고, 바이오 잉크는 축 방향으로 실질적으로 평행하게 정렬되어 있고, 바이오 잉크는 실린더형 바이오 잉크 내에 또는 그 사이에 실질 간 세포; 및 임의적으로, 비실질 세포; 및 임의적으로, 실린더형 바이오 잉크 사이에 빈 공간을 포함하는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이로서, 각 구성물은 각 층은 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것이고, 각 구성물은 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는 것인, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이를 개시한다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이로서, 여기서, 1 이상의 구성물은 간 조직 구성물이고, 각각의 간 조직 구성물은 각 층이 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것이고, 간 조직 구성물은 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 가지는 것을 특징으로 하는 것인, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물의 어레이를 개시한다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시키는 단계; 및 침적된 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 1 이상의 구획을 포함하는 것으로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법을 개시한다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 간 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 하나 이상의 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시키는 단계; 및 하나 이상의 침적된 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하는, 조작된 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법으로서, 여기서, 구성물은 각 층이 하나 이상의 간 세포 유형을 포함하고, 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 것인 하나 이상의 층을 포함하는 것인 방법을 개시한다.

- [0029] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 포유동물 간 세포를 포함하는 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계; 상기 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하여 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 형성하는 단계; 및 상기 하나 이상의 다세포 응집물을 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 그가 응집되고, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성할 수 있게 하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 구성하는 방법을 개시한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 지지체 상에 침적된, 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크 및 실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 1 이상의 구획을 포함하는 것으로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 제작하는 방법을 개시한다.
- [0031] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물로서, 상기 구성물은 하나 이상의 층을 포함하고, 1 이상의 층은 2개 이상의 세포 유형을 포함하고, 2개 이상의 세포 유형은 실질 간 세포 유형 및 비실질 간 세포 유형을 포함하고, 2개 이상의 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하고, 평면 기하학적 구조는 1 이상의 실질 간 세포 구획 및 1 이상의 비실질 간 세포 구획을 포함하고, 하나 이상의 층은 응집되어 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하되; 단, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물은 7일 이상 동안 실질적으로 생존가능한 시험관내 배양물 상태로 그대로 유지되고, 하기의 간 특징들: 콜레스테롤 합성; 지질 저장; 글리코겐 저장; 알부민, 피브리노겐, 트랜스페린, CYP450, 알파-1-안티트립신, 오르니틴 트랜스카바미라제, 글리코겐 신타제, 인자 VIII, 및 인자 IX 중 둘 이상의 것을 비롯한, 간 특이 단백질 발현; 호르몬, 유도제, 독물, 약물, 항체, 간섭 RNA, 소형 RNA, 잠금형 핵산, 바이러스, 박테리아, 기생충, 및 염증성 유도제 중 하나 이상의 것을 비롯한, 간 조절 인자에의 반응; 아세트아미노펜, 알콜, 트로바플록사신, 메토크세이트, 디클로페낙, 트로글리타존, 발프로산, 및 아미오다론 중 하나 이상의 것을 비롯한, 간 독물에의 반응; BSEP, OATP1B1, NTCP, PGP, BCRP, OATP1B3, ABCB4, ATP8B1, 다중 약물 저항 수송체(MDR) 중 하나 이상의 것을 비롯한, 수송체 단백질 발현; 제작 후 적어도 일부의 휴지 성상 세포 유지; 및 미세혈관 구조 포함 중 2개 이상을 가지는 것인, 조작된, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 개시한다.
- [0032] 특정 정의
- [0033] 달리 정의되지 않은 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 숙련가가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0034] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바, "하나"("a," "an,") 및 "그"라는 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 복수 개의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 핵산"이라고 지칭하는 것은 본 개시내용 등의 판독시 당업자에게 자명해지게 되는 본원에 기술된 하나 이상의 핵산, 및/또는 상기 유형의 조성물을 포함한다. 본원에서 "또는"이라고 언급하는 것 또한 달리 언급되지 않는 한, "및/또는"을 포함하는 것으로 한다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바, "어레이(array)"란 복수 개의 테스트가 한 샘플에 대해 수행될 수 있도록, 하나 이상의 테스트가 복수 개의 샘플에 대해 수행될 수 있도록, 또는 그 둘 모두가 이루어질 수 있도록 다중 요소가 공간적으로 배열되어 결합되어 있는 것을 포함하는 과학적 도구를 의미한다.
- [0036] 본원에서 사용되는 바, "검정법(assay)"이란 유기 또는 생물학적 샘플(예컨대, 세포 응집물, 조직, 기관, 유기체 등) 중 물질(예컨대, 화학 물질, 분자, 생화학 물질, 단백질, 호르몬 또는 약물 등)의 존재 또는 활성을 테스트 또는 측정하는 방법을 의미한다.
- [0037] 본원에서 사용되는 바, "생체적합성"이라는 의미는 세포에 대하여 제한된 손상 또는 독성 위험을 제기한다는 것을 의미한다. 명세서 및 청구범위에 제시된 바와 같이, "생체적합성 다중 웰 용기" 및 ""생체적합성 막"은 포유동물 세포에 대하여 제한된 위험을 제기하지만, 상기 정의는 이러한 생체적합성 요소가 생체내에서 포유동물 내로 이식될 수 있다는 것을 암시하는 것으로 확장되지는 않는다.
- [0038] 본원에서 사용되는 바, "바이오 잉크(bio-ink)"란 바이오프린팅에 사용하기 위한 액체, 반고체, 또는 고체 조성물을 의미한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 세포 용액, 세포 응집물, 세포를 포함하는 겔, 다세포체, 또는 조직을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 지지체 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오

잉크는 추가로 바이오프린팅을 가능하게 하는 특이적인 생체역학적 특성을 제공하는 세포 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 압출 화합물을 포함한다.

- [0039] 본원에서 사용되는 바, "바이오프린팅"이란 자동화 또는 반자동화, 컴퓨터 지원, 3차원 프로토타이핑 장치(예컨대, 바이오프린터)와 호환되는 방법을 통한 세포(예컨대, 세포 용액, 세포 함유 겔, 세포 현탁액, 세포 농축물, 다세포 응집물, 다세포체 등)의 3차원의 정밀 침적을 이용하는 것을 의미한다.
- [0040] 본원에서 사용되는 바, "응집하다," "응집된," 및 "응집"이란 세포, 세포 응집물, 다세포 응집물, 다세포체, 및/또는 그의 층에 결합하는 세포-세포 부착 특성을 의미한다. 상기 용어는 "융합하다", "융합된", 및 "융합"과 상호교환적으로 사용된다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바, "실린더형"이란 실질적으로 실린더 형태를 가지는 것을 의미한다. 다양한 실시양태에서, 실린더형 바이오 잉크는 실질적으로 실린더 형태를 가지고, 형태상 약 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 또는 60%(그 안의 증분을 포함)의 실린더형이다. 추가의 다양한 실시양태에서, 실린더형 바이오 잉크는 그의 길이의 약 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 또는 50%(그 안의 증분을 포함)를 따라 실린더 형태를 가진다. 일부 실시양태에서, "실린더형"이란 제작 시점에 실질적으로 실린더 형태를 가지는 것을 의미한다.
- [0042] 본원에서 사용되는 바, "판상(laminar)"이란 둘 이상의 평면 층들이 조합되어 z면에서 조직의 전체 두께를 증가시키는 다층화 바이오프린트된 조직을 의미한다. 일부 실시양태에서, 각각의 평면 층은 구조 및/또는 구성에 있어 실질적으로 유사하다. 다른 실시양태들에서, 각각의 평면 층은 구조 및/또는 구성에 있어서 실질적으로 상이하다.
- [0043] 본원에서 사용되는 바, "층"이란 두께가 다중 세포로 된 X 및 Y면으로 이루어진 세포의 결합을 의미한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 기술된 조작된 간 조직은 단층을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본원에서 기술된 조작된 간 조직은 복수 개의 층을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 층은 인접한, 실질적으로 인접한, 또는 비인접한 세포 시트를 형성한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 기술된 조작된 간 조직의 각 층은 X, Y, 및 Z축으로 다중 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직의 각 층의 두께는 X, Y, 및 Z축으로 약 50 μm 이상이다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바, "다층화"란 둘 이상의 조직 층으로 이루어진 것을 의미하며, 여기서, 각 조직 층의 두께는 하나 이상의 세포 층이다. 일부 실시양태에서, 조직 층들은 한 번에 침적된다. 다른 실시양태에서, 다중 층들이 동시에 침적다. 임의적으로, 각 층은 다중 세포 유형으로 이루어진다. 추가로, 각 층 내의 다중 세포 유형은 X-Y면(즉, 수평면)에서 공간적으로 정의된 구조로 서로에 대해 임의적으로 배열된다. 추가로, 일부 경우들에서 Z면(즉, 수직면)의 층 추가는 공간적으로 정의된 구조가 Z면에서 연속되도록 서로에 대해 층 내의 세포의 제어된 공간적 배치를 이룬다.
- [0045] 본원에서 사용되는 바, "다분화능 세포"란 2가지 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 세포를 의미한다. 다분화능 세포로는 예를 들어, 간엽 줄기/간질 세포, 유도 만능 줄기 세포, 및 배아 줄기 세포를 포함한다.
- [0046] 본원에서 사용되는 바, "실질 세포"란 간세포 또는 간세포 유사 세포를 의미하는 반면, "비실질 세포"란 간세포 또는 간세포 유사 세포가 아닌 간 세포를 의미한다.
- [0047] 본원에서 사용되는 바, "평면"이란 다중 바이오 잉크 조성물 및/또는 빈 공간이 실질적으로 조직 층의 X-Y 면 내에서 서로에 대해 정의된 패턴으로 공간적으로 배열되어 있는 다세포성 바이오프린트된 조직의 층을 의미한다. 예컨대, 도 18A-E를 참조할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 평면 층은 실질적으로 조직 층의 X-Y 면 내에서 정의된 패턴으로 공간적으로 배열되어 있는, 예를 들어, 약 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 또는 60%(그 안의 증분을 포함) 평면이다.
- [0048] 본원에서 사용되는 바, "스캐폴드"란 합성 스캐폴드, 예컨대, 중합체 스캐폴드 및 다공성 하이드로겔, 비합성 스캐폴드, 예컨대, 미리 형성된 세포의 기질 층, 사멸 세포 층, 및 탈세포화 조직, 및 조작된 조직 및/또는 기관의 물리적 구조에 통합되고, 상기 조직 및/또는 기관의 손상/파괴 없이는 조직 및/또는 기관에서 제거될 수 없는 임의 다른 유형의 미리 형성된 스캐폴드를 의미한다. 추가의 실시양태에서, 탈세포화 조직 스캐폴드로는 임의 방식으로 배양된 세포에 의해 생성된 탈세포화 천연 조직 또는 탈세포화된 세포 물질; 예를 들어, 사멸되거나, 탈세포화되면서, 살아 있는 동안에 생성한 ECM을 남기는 세포 층을 포함한다. 그러므로, "스캐폴드가 없는"이라는 용어는 제거되거나, 또는 조작된 조직의 불활성 성분으로 그대로 유지되는, 사용시 조작된 조직의 필수 부분은 아니라는 것을 암시하는 것으로 한다. "스캐폴드가 없는"은 "스캐폴드 무함유" 및 "미리 형성된 스캐

폴드가 없는"과 상호 교환적으로 사용된다.

- [0049] 본원에서 사용되는 바, "피험체"란 인간, 비인간 동물, 임의의 포유동물 또는 임의의 척추동물인, 임의의 개체를 의미한다. 상기 용어는 "환자," "수혜자" 및 "기증자"와 상호 교환적으로 사용된다.
- [0050] 본원에서 사용되는 바, "지지체"란 침적되는 바이오 잉크를 받을 수 있는 임의의 생체적합성 표면을 의미한다.
- [0051] 본원에서 사용되는 바, "조직"이란 세포의 응집물을 의미한다. 조직의 예로는 결합 조직(예컨대, 윤상 결합 조직, 치밀 결합 조직, 탄성 조직, 세망 결합 조직, 및 지방 조직), 근육 조직(예컨대, 골격근, 평활근 및 심장근), 비뇨 생식기 조직, 위장관 조직, 폐 조직, 골 조직, 신경 조직, 및 상피 조직(예컨대, 단층 상피 및 중층 상피), 내배엽 유래 조직, 중배엽 유래 조직, 및 외배엽 유래 조직을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] **조직 조작(Tissue Engineering)**
- [0053] 조직 조작은 기관 또는 조직의 강화, 수복, 또는 대체를 통해 조직 기능을 회복, 유지 또는 개선시키는 생물학적 대체체들의 개발을 위해 조작 및 생명 과학 원칙들을 적용하고 조합하는 학문간 분야이다. 고전적인 조직 조작에 대한 기본 접근법은 살아 있는 세포를 생체적합성이고, 궁극적으로는 생분해성인 환경(예컨대, 스캐폴드) 내로 시딩한 후, 이어서, 초기 세포 집단이 이식시에 추가로 증식되고 성숙화되어 표적 조직을 생성하도록 상기 구성물을 생체반응기에서 배양하는 것이다. 생물학적 세포의 기질(ECM: extracellular matrix)을 모방하는 적절한 스캐폴드의 경우, 이 경우에 발생 조직은 시험관내 및 생체내 성숙화 이후 원하는 기관의 형태 및 기능, 둘 모두를 채용한다. 그러나, 천연 조직과 유사한 구조를 가지며, 충분히 높은 세포 밀도를 달성하는 것은 스캐폴드 전역에 걸쳐 있는 세포의 분포 및 공간적 배열을 조절할 수 있는 능력이 제한되어 있기 때문에 도전 과제가 된다. 이러한 제한들은 종종 조직 또는 기관이 불량한 기계적 특성 및/또는 불충분한 기능을 가지게 한다. 스캐폴드의 생분해, 잔류성 중합체의 포획, 및 제조 공정의 산업적 규모 확장과 관련된 추가의 도전 과제가 존재한다. 스캐폴드가 없는 접근법들이 시도되고 있다. 스캐폴드가 없는 현 접근법들이 여러 제약을 받고 있다:
- [0054] · 복잡한 평면 및/또는 관상 기하학적 구조, 예컨대, 하나 이상의 층이 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하거나, 또는 하나 이상의 층이 서로에 대하여 공간상 정의된 위치에 다중 세포 유형을 포함하고, 종종 천연 조직 유사 결과를 재현적으로 달성하기 위해 특정 구조 내에 세포 유형의 결정적인 고해상 배치를 필요로 하는 것인 다층 구조.
- [0055] · 크기 및 기하학적 구조는 영양소 공급을 위한 기능적 혈관망을 위한 요건 및/또는 확산에 의해 제한된다.
- [0056] · 일부 경우에서, 조직의 생존능은 확산을 제한하고, 영양소에의 세포의 접근을 제한하는 구속 물질에 의해 손상된다.
- [0057] 특정 실시양태에서 본원에서는 조작된 포유동물 조직, 조작된 간 조직/구성물, 그의 어레이, 및 제작 방법을 개시한다. 본원에 개시된 조직 조작 방법은 하기 이점을 가진다:
- [0058] · 이는 세포 포함 조직 및/또는 기관을 생환할 수 있다.
- [0059] · 이는 천연 조직 유사 세포간 상호작용을 재생성함으로써 천연 조직의 발생, 항상성, 및/또는 발병 내에서 발견되는 환경 조건들을 모방한다.
- [0060] · 이는 임의적으로 광범위한 복잡한 위상 및 기하학적 구조(예컨대, 다층화 구조, 세그먼트, 시트, 관, 낭들 등)를 가지는 살아 있는, 3차원의 조직 및 화합물 조직을 달성한다.
- [0061] · 이는 자동화 또는 반자동화 제조 수단들과 상용성이고, 확장 가능하다.
- [0062] 바이오프린팅은 시험관내 검정법에 유용한 것을 포함하는, 미세규모 조직 유사체를 생성하는 개선된 방법을 가능하게 한다(하기 참조).
- [0063] **바이오프린팅**
- [0064] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물, 및 그의 어레이의 1 이상의 성분은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 바이오프린트된 구성물은 3차원 전달 장치(예컨대, 바이오프린터)에 의한 세포 용액, 세포 현탁액, 세포 포함 겔 또는 페이스트, 세포 농축물, 다세포체(예컨대, 실린더, 회전 타원체, 리본 등)를 비롯한, 세포 및 임의적으로, 구속 물질의 (예컨대, 하이드로겔 및/또는 다공성 막으로 구성된) 생체적합성 지지체 표면 상에의 3차원, 자동, 컴퓨터 지원 침적에 기초한 신속한 프로토타이핑 기술을 사용하는 방법으로 제작된다. 본원에서 사용되는 바, 일부 실시양태에서, 조직 및/기관을 언급하는 데 사용될 때, "조작된"이라는 용어는 세

포, 세포 용액, 세포 현탁액, 세포 포함 겔 또는 페이스트, 세포 농축물, 다세포 응집물, 및 그의 층이 컴퓨터 스크립트에 따라 컴퓨터 지원 장치(예컨대, 바이오프린터)에 의해 배치되어 3차원의 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 추가의 실시양태에서, 컴퓨터 스크립트는 예를 들어, 하나 이상의 컴퓨터 프로그램, 컴퓨터 어플리케이션, 또는 컴퓨터 모듈이다. 추가의 다른 실시양태에서, 3차원의 조직 구조는 일부 경우에 형태발생 초기의 자가 조직 현상과 유사한 세포 또는 다세포체의 프린팅 후 융합을 통해 형성된다.

[0065] 수동 배치를 비롯한, 다수의 방법이 세포, 다세포 응집물, 및/또는 그의 층들을 생체적합성 표면에 배열하여 3차원의 구조를 생성하는 데 이용가능하지만, 자동 컴퓨터 지원 기계, 예컨대, 바이오프린터에 의한 배치하는 것이 이롭다. 이 기술을 이용한 세포 또는 다세포체 전달의 이점으로는 세포 또는 다세포체를 신속하고, 정확하며, 재현가능하게 배치함으로써 다양한 조성을 가진 세포, 다세포 응집물 및/또는 층으로 된 계획된 또는 미리 결정된 배향 또는 패턴을 보이는 구성물을 제조할 수 있다는 것을 포함한다. 이점으로는 또한 세포 손상을 최소화하면서 높은 세포 밀도를 보장한다는 점을 포함한다. 간의 실질 세포는 특히 전단력 및 다른 생체역학적 스트레스에 의해 손상되기 쉽다; 따라서, 본원에 기술된 바이오 잉크 및 바이오프린팅 공정의 조합된 사용은 도 9에 강조 표시된 바와 같이 바이오프린팅 후 실질 세포의 바람직한 생존능으로 강조되는 것과 같이, 대안 기술보다 우수한 별개의 이점을 제공한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 바이오프린팅 방법은 연속적이고/거나 실질적으로 연속적이다. 연속적인 바이오프린팅 방법의 비제한적인 일례는 바이오 잉크의 저장소에 연결된 분배 팁(예컨대, 시린지, 니들, 모세관 등)을 통해 바이오프린터로부터 바이오 잉크(즉, 세포, 부형제 또는 압출 화합물과 조합된 세포, 또는 세포의 응집물)를 분배하는 것이다. 추가적인 비제한적인 실시양태에서, 연속적인 바이오프린팅 방법은 기능적 단위의 반복 패턴으로 바이오 잉크를 분배하는 것이다. 다양한 실시양태에서, 반복 기능적 단위는, 예를 들어, 원형, 사각형, 직사각형, 삼각형, 다각형 및 불규칙 기하학적 구조를 비롯한, 임의의 적합한 기하학적 구조를 가짐으로써 별개의 바이오 잉크 및/또는 빈 공간의 공간적 패턴화를 통해 달성되는 평면 기하학적 구조를 가지는 하나 이상의 조직 층이 생성된다. 추가의 실시양태에서, 바이오프린트된 기능적 단위의 반복 패턴은 하나의 층을 포함하며, 복수 개의 층은 인접하게(예컨대, 적층되어) 바이오프린트되어 판상 기하학적 구조를 가지는 조작된 조직 또는 기관을 형성한다. 다양한 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 층이 인접하게(예컨대, 적층되어) 바이오프린트되어 조작된 조직 또는 기관을 형성한다. 추가의 실시양태에서, 판상 기하학적 구조를 가지는 조직의 하나 이상의 층은 또한 평면 기하학적 구조를 가진다.

[0067] 일부 실시양태에서, 기능적 단위는 수평 및 수직 차원, 둘 모두로 배열된 다수의 융합된 또는 응집된 판상 구조로 구성되고, 이로써 조작된 간 조직 간의 및/또는 그를 통한 관류가 이루어질 수 있도록 허용하는 규칙적인 간격으로 빈 공간 또는 채널을 포함하는 인접한 간 조직 구조를 형성한다. 도 17 및 19를 참조할 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 바이오프린트된 기능적 단위는 모자이크식 패턴으로 반복된다. "모자이크식 패턴"이란 중첩 및 겹이 없이 평면을 채우는 그림으로 이루어진 평면이다. 도 6A는 임의적으로 반복됨으로써 도 6B-D 및 7에 도시된 모자이크식 패턴을 형성하는 기능적 단위의 일례를 보여주는 것이다. 연속적인 및/또는 모자이크식 바이오프린팅의 이점으로는 비제한적인 일례로 바이오프린트된 조직의 생산성 증가를 포함한다. 또 다른 비제한적인, 예시적인 이점은 바이오프린터를 앞서 침적된 바이오 잉크의 요소에 맞게 조정할 필요가 소거되었다는 점이다. 일부 실시양태에서, 연속적인 바이오프린팅은 임의적으로 시린지 기전을 이용하여 큰 바이오 잉크 저장소로부터 더 큰 조직들의 프린팅을 촉진한다. 연속적인 바이오프린팅은 또한 압출 화합물, 하이드로겔, 중합체, 바이오 잉크, 또는 프린팅 이후 그의 형상을 유지할 수 있는 임의의 프린트가능한 물질을 사용하여 공간상 정의된 경계를 공동으로 프린트할 수 있는 편리한 방법이고; 여기서, 형성된 경계는 임의적으로 하나 이상의 바이오 잉크의 바이오프린팅을 통해 충전되고, 이로써, 공간상 정의된 평면 기하학적 구조를 가지는 모자이크식 조직이 생성되고, 예를 들어, 도 3A, 5A, 5B, 6, 8, 및 11에 도시된 실시양태를 참조할 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 연속적인 바이오프린팅 방법은 독립적으로 또는 서로에 대해 상대적으로 예컨대, 프린트 높이, 펌프 속도, 로봇 속도, 또는 그의 조합과 같은 파라미터를 최적화하고/거나, 균형을 맞추는 것을 포함한다. 특정 경우에서, 침적을 위한 바이오프린터 헤드 속도는 3 mm/s였고, 제1층에 대한 분배 높이는 0.5 mm이며, 각각의 후속 층에 대한 분배 높이는 0.4 mm씩 증가되었다. 일부 실시양태에서, 분배 높이는 대략적으로 바이오프린터 분배 팁의 직경과 같다. 제한 없이, 적합하고/거나, 최적인 분배 거리는 분배 니들로의 물질 평탄화 또는 부착을 야기하지 않는다. 다양한 실시양태에서, 바이오프린터 분배 팁의 내경은 약 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000 μm 이상(그 안의 증분을 포함)이다. 다양한 실시양태에서, 바이오프린터의 바이오 잉크 저장소의 부피는 약 0.05, 0.1, .5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 cm^3 이상

(그 안의 증분을 포함)이다. 일부 경우에서, 펌프 속도는 시스템에서의 잔여 압력 축적이 낮을 때 적합하고/거나, 최적이다. 일부 경우에서, 바람직한 펌프 속도는 저장소 및 분배 니들의 단면적 간의 비에 의존하며, 비가 클수록 더 낮은 펌프 속도가 요구된다. 일부 실시양태에서, 적합하고/거나, 최적인 프린트 속도는 물질의 기계적 완전성에 영향을 미치지 않으면서, 라인을 균일하게 침적시킬 수 있다.

[0070] 본원에 개시된 발명은 사업 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 기법 및 방법의 속도 및 확장성은 이식을 위한 조작된 간 조직 및/기관의 생산을 위해, 또는 예컨대, 시험관내 검정법과 같이 연구 및 개발을 위한 세포 기반 도구의 생성에서 사용하기 위해 산업적 및/또는 상업적 설비를 고안, 구축 및 작동시키는 데 사용된다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직 및/또는 기관 및 그의 어레이는 예를 들어, 세포 어레이(예컨대, 마이크로어레이 또는 칩), 조직 어레이(예컨대, 마이크로어레이 또는 칩), 및 생물학적 검정법 및 고처리량 약물 스크리닝을 위한 키트로서 제조되고, 저장되고, 배포되고, 시판되고, 광고되고, 판매된다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 및/또는 기관 및 그의 어레이가 제조되고, 서비스로 생물학적 검정법 및/또는 약물 스크리닝을 수행하는 데 사용된다.

[0071] 조작된 간 조직

[0072] 도 1을 참조하면, 천연 간 조직은 서로에 대하여 상이한, 공간상 패턴화된 구조로 배열된 다중 세포 유형으로 구성된다. 각각의 간 소엽은 간의 작동하는 기능적 단위를 구성하고, 이의 형상은 대략적으로 육각형을 띤다. 실질 세포, 또는 간세포는 대개 소엽 주변의 인접한 위치에, 및 (소엽 중심부의) 중심 정맥 쪽으로 (소엽 주변부를 따라) 담관과 간문맥 사이에 방사형으로 존재하는 각종의 비실질 세포(담관 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 성상 세포, 및 쿠퍼 세포)를 포함하는 소엽을 구성한다. 비실질 세포, 및 굴모양혈관 및 담소관을 따른 혈액 및 담즙의 유동을 각각 배치하는 것은 함께 작용하여 간세포에 대하여 적절한 미세환경을 형성하고, 이로써, 상기 세포의 기능 및 건강 상태에 영향을 미치게 된다. 간에서 간경변 또는 섬유증과 같은 각종의 병적 상태로 인해 간세포 미세환경이 파괴되고, 간의 구조가 세포의 기질의 과다생산, 염증, 및 병원성 사이토카인 및 성장 인자의 생산에 기인하여 계속해서 파괴되는 바, 중요한 대사 기능이 손실될 수 있다.

[0073] 바이오프린팅을 통해 구현화된 간 조직은 3차원의 다중 세포 입력으로부터 생성될 수 있으며, 이로써, 천연 조직 구조 및 기능의 중요한 요소를 재현시킬 수 있다. 분엽 조직은 본원에 기술된 실시예에 따라 생성될 수 있으며, 여기서, 실질 및 비실질 세포는 서로에 대해 상대적으로 공간상 배열되고, 이로써, 제작되는 각 조직 층 내에서 평면 기하학적 구조를 형성한다. 정밀하게 제1층의 기하학적 구조를 재현하거나, 또는 추가의 특징, 예컨대, 빈 공간 또는 채널 또는 추가의 생물학적 요소, 예컨대, 종양 세포 또는 병원성 또는 수복/재생 과정과 관련된 다른 생물학적 또는 생화학적 성분을 도입하는 후속 층이 첨가될 수 있다. 분엽 패턴 이외에도, 혈관/실질; 혈관/간세포; 간세포/담관; 섬유증 조직/혈관구조; 섬유증 조직/간세포; 간세포/면역 세포; 실질/비실질, 간 굴모양혈관/혈액 또는 혈액 대용물을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 조직 내의 특정 공간상의 관계를 재현하는 바이오프린트된 조직이 생성될 수 있다는 것을 이해하기 위해 첨부된 도면을 이용할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 간 조직 유사체로는 간세포 또는 간세포 유사 세포 및 임의적으로 담관 상피 세포 및 임의적으로, 성상 세포, 내피 세포, 쿠퍼 세포, 면역 세포, 또는 근섬유아세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 비실질 세포 유형을 포함한다.

[0074] 특정 실시양태에서, 본원에서는 또한 응집된, 포유동물 세포를 포함하고, 하나 이상의 포유동물 세포 층을 추가로 포함하며, 여기서, 조직의 1 이상의 성분이 바이오프린트된 것인 조작된 간 조직을 개시한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 조직 층은 평면 기하학적 구조인 것을 특징으로 하고, 여기서, 다중 세포 유형 또는 바이오잉크 유형 및/또는 빈 공간은 X-Y면에 공간상 적의된 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 1 이상의 층은 다른 층과 구조상 또는 조성상 상이하며, 이로써 조직에 특징적인 판상 기하학적 구조를 제공하는 것인 다층이다. 추가의 실시양태에서, 층의 두께는 Z면으로 유사하다. 추가의 다른 실시양태에서, 층의 두께는 Z면으로 상이하다. 추가의 실시양태에서, 임의의 단일 층은 두께가 하나의 세포인 층이다. 일부 실시양태에서, 조직은 간 유사체이다. 추가의 실시양태에서, 간 조직 유사체로는 간세포 또는 간세포 유사 세포 및 임의적으로 담관 상피 세포 및 임의적으로, 성상 세포, 내피 세포, 쿠퍼 세포, 면역 세포, 또는 근섬유아세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 비실질 세포 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생성된 간 조직 구성물의 두께는 x, y, 및 z 면으로 약 50 μm 이상이다.

[0075] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 본원에 기술된 방법으로 바이오프린트된다. 추가의 실시양태에서, 조작된 조직의 1 이상의 성분은 바이오프린트된다. 추가의 다른 실시양태에서, 조직의 추가의 성분은 바이오프린트된다. 일부 실시양태에서, 제조 시점에 또는 사용 시점에는 조직에 본원에 추가로 기술된 바와 같이 미리

형성된 스캐폴드가 없다. 일부 실시양태에서, 바이오프린팅을 비롯한, 조직 조작 기법에 의해 제작된 결과로서, 본 발명의 조직은 추가로 유기체의 일부로서, 생체내에서 발생된 조직과는 구별된다.

- [0076] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 임의 유형의 포유동물 세포를 포함한다. 다양한 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 세포 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직의 세포는 서로 "응집되거나" "부착된다." 추가의 실시양태에서, 응집 또는 부착이란 세포, 다세포 응집물, 다세포체, 및/또는 그의 층에 결합하는 세포-세포 부착 특성을 의미한다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 세포 층을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 층은 평면 기하학적 구조를 가지는 것을 특징으로 한다. 추가의 다른 실시양태에서, 조작된 조직의 다중 층은 평면 기하학적 구조를 가지며; 여기서, 평면 기하학적 구조는 층마다 다르거나, 또는 동일하다. 추가의 다른 실시양태에서, 개별 층내의 평면 기하학적 구조(X-Y면)는 추가의 기하학적 구조는 복합 조직에서 Z면으로 생성될 수 있도록 제작 동안 Z면으로 정렬된다. 일부 실시양태에서, 다층 구조 내의 층의 하나 이상의 층은 평면 기하학적 구조를 가지는 것을 추가로 특징으로 한다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 세포 층은 하나 이상의 세포 시트를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 세포 시트의 두께는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 이상의 세포(그 안의 증분을 포함)이다. 다른 다양한 실시양태에서, 세포 시트의 두께는 약 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 μm 이상(그 안의 증분을 포함)이다. 일부 실시양태에서, 조직 층은 세포의 융합된 응집물을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 융합 이전에, 세포의 응집물은 비제한적인 일례로, 실질적으로 구형, 장형, 실질적으로 실린더형 및 리본 유사 형상인, 정의된 형상 및/또는 구조를 가진다. 다양한 실시양태에서, 세포의 융합된 응집물은 두께가 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 μm 이상(그 안의 증분을 포함)인 층을 형성한다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 층은 임의 유형의 포유동물 세포를 포함한다. 다양한 추가의 실시양태에서, 각 층은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 세포 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 표면 상에 하나 이상의 내피 세포 층을 포함한다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 표면 상에 하나 이상의 상피 세포 층을 포함한다.
- [0080] 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직은 임의의 적합한 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 바이오프린트된 간 조직의 크기는 시간 경과에 따라 변한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 예를 들어, 세포 이동, 세포 사멸, 세포간 상호작용, 축소, 또는 다른 형태의 수축에 기인하여, 바이오프린팅 이후에 수축되거나, 축소된다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직은 예를 들어, 세포 이동, 세포 성장 및 증식, 천연 조직의 세포외 기질 또는 다른 세포 생산된 성분의 생산, 세포/조직 성숙화 또는 다른 형태의 확장에 기인하여 바이오프린팅 이후에 성장 또는 확대된다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직의 물리적인 크기는 구성물의 내부로 확산될 수 있는, 산소를 비롯한, 영양소의 능력에 의해 제한된다. 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물의 최소 크기는 바이오프린팅 시점에 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1,000 μm 이상이다. 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직의 최소 크기는 바이오프린팅 시점에 약 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.5, 3.75, 4.0, 4.25, 4.5, 4.75, 또는 5.0 mm 이상이다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물의 최소 크기는 바이오프린팅 시점에 약 25 μm 내지 약 500 μm 이다.
- [0082] 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직은 임의의 적합한 형상이다. 일부 실시양태에서, 특정의 천연 조직 또는 기관을 모방하는 형상이 선택된다. 추가의 실시양태에서, 특정 병적 상태, 병증, 또는 질환 상태를 모방하는 형상이 선택된다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 실질적으로 평면인 형상을 가진다. 추가의 실시양태에서, 평면 조직은 비제한적인 일례로, 사각형, 직사각형, 다각형, 원형, 타원형, 또는 불규칙형을 포함하는 임의의 적합한 평면 기하학적 구조를 가진다. 일부 실시양태에서, 평면 기하학적 구조는 서로에 대하여 X-Y면에 특정

세포 또는 바이오 잉크 성분 및/또는 빈 공간을 배치함으로써 조작된 간 조직에서 생성된다.

[0083] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 격납 베셀에 대해 상대적인 공간에 조직의 위치를 고정시키는 데 적합한 수단에 의해 격납 베셀에 고정된다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 하나 이상의 측면 상에 물리적 지지체를 제공하고, 조작된 간 조직이 점유하는 공간을 구속하는 생체적합성 물질에 의해 한정된다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 표면에 부착된다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 생체적합성 표면에 부착된다. 추가의 다른 실시양태에서, 복수 개의 조직은 본원에 기술된 바와 같이, 표면의 부착에 의해 결합되고, 공간적으로 배열되고, 이로써 어레이를 형성한다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 하나 이상의 측면 상에서 유체 흐름에 의해 유발된 전단력을 받게 된다. 추가의 실시양태에서, 전단력을 가하는 것은 조직의 성숙화 및 발생을 촉진시키고/거나, 세포외 기질의 이동, 분화, 증식, 침적, 또는 단백질 또는 분자의 조직내 세포 내로 또는 그 밖으로의 수송을 촉진시키는 역할을 한다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직은 하나 이상의 표면 상에서 액체 영양소의 연속적인 또는 주기적인 관류, 재순환 또는 교환을 받게 된다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 그의 어레이는 각 구성물에 대한 액체 배양 배지의 연속적인 또는 주기적인 재순환을 제공하는 다중 웰 생체반응기에 하우징된다.

[0084] 조직 기하학적 구조

[0085] 천연 조직은 조직의 세포 및 세포외(즉, 빈 공간, 세포외 기질, 단백질성 물질 등) 성분에 의해 유도되는 공간적 및 조성상의 패턴의 존재를 특징으로 한다. 3차원성을 달성하기 위해 합성 스캐폴딩을 이용하는 조직 조작 전략법에 대한 고유의 도전 과제는 천연 조직의 기하학적 및 생물학적 특성, 둘 모두를 재현할 수 없다는 점이다. 현재까지, 천연 조직을 모방하는 밀도로 세포를 혼입할 수 있으면서도 또한 스캐폴드 구조 내에 천연 조직 유사 판상 또는 평면 기하학적 구조를 생성하고자 한 시도는 기술상의 한계로 인해 제한이 있었다. 바이오프린팅으로 도 18A-E에 도시된 바와 같은 일례에 따라, 세포로 구성된 바이오 잉크의 공간상으로 정의된 침적을 통해 고유한 도전 과제 둘 모두(평면/판상 기하학적 구조 및 세포 밀도)를 극복하게 되었다. 일부 실시양태에서, 평면 기하학적 구조는 다중 바이오 잉크 체계로부터 생성되고, 이로써, 2개 이상의 조직 성분(즉, 간질, 상피, 혈관, 뼈, 연골, 실질, 피층, 수질, 유두, 소엽 등)은 각 조직 성분/세포 집단/바이오 잉크 체계를 X, Y, 및/또는 Z면으로 서로에 대하여 정의된 위치에 배치하는 방식으로 제작된다. 일부 실시양태에서, 평면 기하학적 구조는 빈 공간을 혼입한다. 추가의 실시양태에서, 평면 기하학적 구조 내의 빈 공간은 체액, 예컨대, 혈액, 림프, 담즙, 뇨, 분비물 등의 1 이상의 요소를 모방하는 유체를 수용한다. 추가의 실시양태에서, 빈 공간은 임의적으로 비부착성 세포 유형 또는 체액 유래 성분(예컨대, 혈액 세포, 골수 세포, 림프성 세포, 면역 세포, 암 세포, 혈소판, 단백질 등)을 함유한다. 추가의 다른 실시양태에서, 체액 유래 성분의 비부착성 세포 유형은 임의적으로 제작 이전, 그 동안 또는 그 이후에 평면 기하학적 구조의 세포 포함 성분으로 도입된 비빈 공간의 성분으로서 존재한다. 추가의 다른 실시양태에서, 비부착성 세포 성분 또는 체액 유래 성분은 세포간 상호작용 또는 분비된 인자의 반응의 결과로서 평면 기하학적 구조 내에서 빈 공간으로부터 세포 포함 공간 내로 동원된다.

[0086] 일부 실시양태에서, 유체 유동 또는 관류는 임의적으로 기하학적 구조 내의 빈 공간을 통해 개시된다. 일부 실시양태에서, 평면 기하학적 구조를 통해서 조직-조직 또는 조직-액체 계면이 생성될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 조직은 광학적으로 투명하고, 이로써 기하학적 구조에 의해 생성된 계면(들)에서 세포의 실시간 관찰이 가능한 용기로 제작된다.

[0087] 일부 실시양태에서, 조직은 다중 층을 포함하며, 여기서, 상기 층 중 1 이상의 층은 구성물 내의 다른 층과 구조상 또는 조성상 상이하며, 이로써 Z면으로 판상 구조를 생성한다. 판상 구조의 예로는 도 18F에 제시된 일례로 도시된 것과 같이, 기초 간질 조직에 대한 내피 또는 상피 장벽을 가지는 장벽 조직을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직의 하나 이상의 층은 혈관 또는 미세혈관 성분을 혼입한다. 추가의 실시양태에서, 혈관 또는 미세혈관 성분의 혼입으로 조작된 조직의 하나 이상의 성분 내에 미세혈관 또는 가상혈관망(pseudovascular)이 형성된다. 일부 실시양태에서, 판상 기하학적 구조를 가지는 조직의 하나 이상의 성분이 바이오프린트된다. 일부 실시양태에서, 판상 기하학적 구조를 가지는 하나 이상의 조직은 서로 인접하게 제작되고, 이로써, 조직 계면이 형성된다.

[0088] 일부 실시양태에서, 판상 기하학적 구조를 가지는 다층화 조작된 조직의 하나 이상의 층은 또한 도 18G에 제시된 비제한적인 일례에 따라 평면 기하학적 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각 층마다 같은 평면 기하학적 구조가 연속되며, 이로써, X, Y, 및 Z면에 연속된 구조를 가지는 3차원의 조직이 생성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 판상 층의 조성 또는 평면 기하학적 구조는 달라질 수 있고, 이로써, 생성된 3차원의 조직은 X, Y, 및 Z면에 복잡한 구조를 가지게 된다.

- [0089] **도 18A**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 혈관망 구조를 가지는 구조상 정확한 조직을 나타내는 평면 기하학적 구조로 제작된다. 본 실시양태에서, 조작된 간 조직은 실질 세포, 예컨대, 간 세포를 포함하는 제1 바이오 잉크로 제작된다. 각각의 실질 세포 층은 임의적으로 임의의 평면 패턴을 포함한다. 본 실시양태에서, 조작된 간 조직은 혈관망 형성을 위해 혈관 관련 세포, 예컨대, 내피 세포, 평활근 세포, 및 섬유아세포를 포함하는 제2 바이오 잉크로 제작된다. 임의적으로, 상기 구조는 먼저 바이오프린트하고, 혈관망을 확립시킴으로써, 이어서, 제2 단계의 혈관망 주변에 간 조직을 제작함으로써 생성될 수 있다.
- [0090] **도 18B**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 조직 구역 연결부를 나타내는 평면 기하학적 구조로 제작된다. 이는 예를 들어, 문맥 주위 영역에서부터 중심소엽 영역까지 간 중심소엽의 3개의 특정 구역을 복제시키는 데 사용될 수 있다.
- [0091] **도 18C**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 분엽 조직을 나타내는 평면 기하학적 구조로 제작된다. 본 실시양태에서, 조작된 간 조직은 소엽을 형성하기 위해 간 세포를 포함하는 제1 바이오 잉크로 제작된다. 각각의 기하학적 구조의 소엽은 임의적으로 그의 경계 내에 공간상 배향성 구조를 포함한다. 본 실시양태에서, 조작된 간 조직은 소엽 주변에 경계를 형성하기 위해 간질/혈관 세포를 포함하는 제2 바이오 잉크로 제작된다.
- [0092] **도 18D**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 관류된/어레이된 조직을 나타내는 평면 기하학적 구조로 제작된다. 본 실시양태에서, 제1 성분은 루멘이 있는 채널, 베셀, 또는 관을 형성한다. 본 실시양태에서, 제2 성분은 임의적으로 크기/형상이 동일하거나, 크기/형상이 상이하고, 임의적으로 한 세포 유형 또는 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 임의적으로, X, Y, 및/또는 Z면의 직접적인 패턴화에 의해 달성된 하나 이상의 공간상 패턴을 포함하는 조직 패치를 형성한다.
- [0093] **도 18E**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 고체+액체/액체 조직 계면을 나타내는 평면 기하학적 구조로 제작된다. 본 실시양태에서, 제1 바이오 잉크는 관강내 구조의 외벽을 형성하고, 제2 바이오 잉크는 관강내 구조의 내벽을 형성하고, 필요할 경우, 제3 성분은 임의적으로 세포 또는 다른 생물학상 관련된 성분을 함유하는 유체이다.
- [0094] **도 18F**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은 장벽 조직을 나타내는 판상 기하학적 구조로 제작된다. 본 실시양태에서, 장벽 층은 임의적으로 내피 또는 상피이고, 간질 층은 관강내 조직의 벽 및/또는 표면을 형성하고, 이는 다공성 메쉬 또는 막에 의존한다.
- [0095] **도 18G**를 참조하면, 특정 실시양태에서, 조작된 간 조직은, 각각이 평면 기하학적 구조를 가지고, 적층되어 판상 기하학적 구조를 가지는 조직을 형성하는 것인, 복수 개의 층으로 제작된다. 본 실시양태에서, X 및 Y축의 평면 기하학적 구조는 Z축까지 계속 이어져 제작된 조직을 형성한다. 기하학적 구조의 특징은 임의적으로 인접한 채널 또는 세포 구획을 포함한다.
- [0096] **세포**
- [0097] 일부 실시양태에서, 본원에서는 하나 이상의 포유동물 세포 유형을 포함하는 조작된 간 조직(예컨대, 간 유사체)을 개시한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 간세포 또는 간세포 유사 세포를 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 적합한 간세포 또는 간세포 유사 세포는 일차 간세포, 세포주 예컨대, HepG2 세포, 조직 특이 전구체, 예컨대, 헤파RG 세포, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 담관 상피 또는 담관 상피 유사 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 비실질 세포를 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 적합한 비실질 세포는 혈관 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 근섬유아세포, 지방 세포, 지방생성 세포, 중간엽 세포, 면역 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 담도 상피 세포, 담도 상피 유사 세포, 굴모양혈관 내피 세포, 간 유래 줄기/전구 세포, 간 이외의 다른 조직 유래 줄기/전구 세포, 및 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 임의의 포유동물 세포는 조작된 간 조직 및 그의 어레이에 포함시키는 데 적합하다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직의 1 이상의 성분은 부착성 세포 유형이다. 추가의 실시양태에서, 포유동물 세포는 비제한적인 일례로, 간 세포, 실질 세포, 비실질 세포, 수축성 또는 근육 세포(예컨대, 평활근 세포, 및 근아세포), 결합 조직 세포(예컨대, 섬유아세포), 골수 세포, 내피 세포, 상피 세포, 혈관 세포, 혈액 세포, 림프 세포, 혈관주위세포, 중피 세포, 간질 세포, 미분화 세포(예컨대, 배아 세포, 줄기 세포, 및 전구 세포), 내배엽 유래 세포, 중배엽 유래 세포, 외배엽 유래 세포, 및 그의 조합이다.

- [0099] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 내피 세포, 예컨대, 인간 내피 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적합한 내피 세포는 비제한적인 일례로, 간 조직, 혈액, 혈관, 림프관, 소화관 조직, 비뇨생식기 조직, 지방 조직, 호흡기 조직, 생식계 조직, 골수, 및 체대 조직을 비롯한 조직으로부터 기원하는 것이다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 세포는 성체, 분화된 세포이다. 추가의 실시양태에서, "분화된 세포"는 단리시 예를 들어, 간세포 또는 내피 세포와 일치하는 조직 특이 표현형을 가지는 세포이며, 여기서, 조직 특이 표현형(또는 이 표현형을 나타낼 잠재능)은 단리 시점에서부터 사용 시점까지 유지된다. 다른 실시양태에서, 세포는 성체, 미분화된 세포이다. 추가의 실시양태에서, "미분화된 세포"는 결정적인 조직 특이 특징을 가지지 않거나, 잃은 세포이다. 일부 실시양태에서, 미분화된 세포로는 줄기 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서 "줄기 세포"는 효능 및 자가 재생을 보이는 세포이다. 줄기 세포로는 분화전능성 세포, 만능 세포, 다분화능 세포, 소능성 세포, 단능성 세포, 및 전구 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다양한 실시양태에서, 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 양막 줄기 세포, 및 유도 만능 줄기 세포이다. 추가의 다른 실시양태에서, 세포는 성체, 분화된 세포 및 성체, 미분화된 세포의 혼합물이다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 다분화능 줄기/전구 세포로부터 유래된 실질 세포를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 실질 세포는 태아 포유동물 간 조직; 배아 줄기 세포(ESC); 유도 만능 줄기 세포(iPSC); 간으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포; 및 간 이외의 조직으로부터 유래된 성체 줄기/전구 세포로부터 적합하게 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 간 조직 구성물의 제작에 사용하기 이전에 부분적으로 또는 전체적으로 내피 또는 간 표현형으로 분화된 다분화능 줄기/전구 세포로부터 유래된 것이다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 구성물은 하나 이상의 분화 신호에 노출된 줄기/전구 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분화 신호는 생체역학적 신호, 가용성 신호(예컨대, 생화학적 신호), 및 물리적 신호 중 하나 이상의 것을 포함한다. 줄기/전구 세포는 조작된 간 조직 제작 과정에서 여러 시점에서 하나 이상의 분화 신호에 적합하게 노출된 것이다. 일부 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이전에 하나 이상의 분화 신호에 노출된 것이다. 다른 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 동안 하나 이상의 분화 신호에 노출된다. 추가의 다른 실시양태에서, 줄기/전구 세포는 구성물 제작 이후에 하나 이상의 분화 신호에 노출된다.
- [0103] 다양한 실시양태에서, 세포 유형 및/또는 세포 공급원은 구체적인 연구 목표 또는 목적에 기초하여 선택되거나, 구성되거나, 처리되거나, 또는 조절된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 특정 질환 또는 병증의 연구를 촉진시키기 위해 선택되거나, 구성되거나, 처리되거나, 또는 조절된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 특정 피험체의 특정 질환 또는 병증의 연구를 촉진시키기 위해 선택되거나, 구성되거나, 처리되거나, 또는 조절된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 2명 이상의 상이한 인간 기증자로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 특정 척추동물 피험체로부터 유래된 것이다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 특정 포유동물 피험체로부터 유래된 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 특정 인간 피험체로부터 유래된 것이다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 특정 세포 유형은 질환 또는 조직 기능성과 관련된 특정 표현형을 가지는 특정 피험체로부터 유래된 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 피험체 특이 세포는 생검 또는 조직 샘플링에 의해 관심 표적 조직으로부터 단리된 것이다. 추가의 실시양태에서, 피험체 특이 세포는 단리 즉시 조직을 제작하는 데 사용된다. 다른 실시양태에서, 피험체 특이 세포는 3차원의 조직의 제작에서의 사용 이전에 시험관내에서 조작되고; 여기서, 조작은 확장, 분화, 직접적인 분화, 증식, 단백질 또는 핵산에의 노출, 유전자 벡터의 혼입, 유전적 또는 비유전적 세포 추적 모이어티의 혼입, 탈분화(즉, 유도 만능 줄기 세포 또는 등가물 생성), 냉동보존 중 하나 이상의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 피험체 특이 세포는 표적 조직 이외의 조직으로부터 단리된다. 추가의 실시양태에서, 피험체 특이 세포는 표적 조직 내에서의 관심 세포 유형으로의 분화를 필요로 한다. 추가의 다른 실시양태에서, 분화를 필요로 하는 피험체 특이 세포는 3차원 구조로의 제작 이전, 그 동안, 또는 그 이후에 분화된다.
- [0104] **세포 배양 방법**
- [0105] 본 발명의 조작된 간 조직에 사용되는 세포 유형은 당업계에 공지된 임의의 방식으로 적합하게 배양된다. 세포 및 조직 배양 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Freshney, R., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, Wiley (1987)](상기 문헌의 내용은 상기 정보를 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다. 본 발명과 함께 적합하게 사용되는 일반 포유동물 세포 배양 기법, 세포주, 및 세포 배양 시스템 또한 문헌 [Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G., (eds.) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Wiley (1998)](상기 문헌의 내용은 상기 정보를 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 기

술되어 있다.

[0106] 배양에서 포유동물 세포에 대해 적절한 성장 조건은 당업계에 주지되어 있다. 세포 배양 배지는 일반적으로 필수 영양소 및 임의적으로 배양되는 세포 유형(들)에 따라 선택되는 추가의 요소, 예컨대, 성장 인자, 염, 미네랄, 비타민, 혈소판이 풍부한 혈장 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 특정 성분은 세포 성장, 분화, 특정 단백질의 분비 등을 증강시키기 위해 선택된다. 일반적으로, 표준 성장 배지로는 1-20% 우태아 혈청(FBS: fetal bovine serum), 소 혈청, 또는 인간 혈청, 인슐린(4 $\mu\text{g/mL}$), 텍사메타손(1.0 μM), 암포테리신 B(0.25 $\mu\text{g/mL}$) 및 글루타맥스(1x)로 보충된, 4 g/L 글루코스를 포함하는 돌베코스 변형된 이글 배지(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium), 인슐린(1 g/L), 소듐 셀레나이트(0.0067 g/L), 트랜스페린(0.55 g/L), 텍사메타손(1 μM), 페니실린 (100 U/mL), 스트렙토마이신(0.1 mg/mL), 암포테리신 B(0.25 $\mu\text{g/mL}$) 및 글루타맥스(1x)로 보충된 윌리엄스 E(Williams E) 배지, 또는 당업계에 공지된 각종의 다른 배지를 포함한다. 바람직하게, 세포는 세포의 기원 동물의 체온에서 또는 그 근처 온도에서 1-21% O_2 및 바람직하게는 3-5% CO_2 의 대기에서 멸균 조건하에서 배양된다. 예를 들어, 인간 세포는 바람직하게는 대략 37°C에서 배양된다.

[0107] 세포는 임의적으로 원하는 세포주에 따라 세포 분화를 유도하는 세포 분화제와 함께 배양된다. 예를 들어, 세포는 임의적으로 성장 인자, 시토카인 등과 함께 배양된다. 일부 실시양태에서, "성장 인자"라는 용어는 세포에 의해 생산되고, 그 자신에 및/또는 각종의 다른 인접 또는 원위 세포에 영향을 미치는 사이토카인을 비롯한, 단백질, 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드들의 복합체를 의미한다. 전형적으로, 성장 인자는 발생학적으로 또는 다수의 생리학적 또는 환경 자극에 대한 반응으로 특정 유형의 세포의 성장 및/또는 분화에 영향을 미친다. 모두는 아니지만, 일부 성장 인자로는 호르몬이 있다. 예시적인 성장 인자는 인슐린, 인슐린 유사 성장 인자(IGF: insulin-like growth factor), 신경 성장 인자(NGF: nerve growth factor), 혈관 내피 성장 인자(VEGF: vascular endothelial growth factor), 각질세포 성장 인자(KGF: keratinocyte growth factor), 염기성 FGF(bFGF: basic FGF)를 비롯한, 섬유아세포 성장 인자들(FGF: fibroblast growth factor), PDGF-AA 및 PDGF-AB를 비롯한, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF: platelet-derived growth factor), 간세포 성장 인자(HGF: hepatocyte growth factor), 형질전환 성장 인자 알파(TGF- α : transforming growth factor alpha), TGF β 1 및 TGF β 3를 비롯한, 형질전환 성장 인자 베타(TGF- β), 상피 성장 인자(EGF: epidermal growth factor), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor), 인터루킨-6(IL-6), IL-8 등이 있다. 성장 인자는 다른 곳 중에서도 특히 문헌 [*Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Darnell et al., eds., 1986]; [*Principles of Tissue Engineering*, 2d ed., Lanza et al., eds., Academic Press, 2000]에서 논의된다. 당업자는 본원에 기술된 조절된 배지 중 임의의 및 모든 배양물 유래 성장 인자들이 본 발명의 범주 내에 포함됨을 이해할 것이다.

[0108] 바이오 잉크 및 다세포 응집물

[0109] 특정 실시양태에서, 본원에서는 바이오프린트된 세포를 포함하는, 간 조직/구성물을 비롯한, 3차원 살아 있는 조직, 그의 어레이, 및 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 세포는 바이오프린터로부터 바이오 잉크를 침적 또는 압출시킴으로써 바이오프린트된다. 일부 실시양태에서, "바이오 잉크"는 복수 개의 세포를 포함하는 액체, 반고체, 또는 고체 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 액체 또는 반고체 세포 용액, 세포 현탁액, 또는 세포 농축물을 포함한다. 추가의 실시양태에서, a 세포 용액, 현탁액, 또는 농축물은 액체 또는 반고체(예컨대, 점성) 담체 및 복수 개의 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 담체는 적합한 세포 영양 배지, 예컨대, 본원에 기술된 것이다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 임의적으로 바이오프린팅 이전에 다세포 응집물로 응집되는 복수 개의 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 바이오 잉크는 복수 개의 세포를 포함하고, 바이오프린트되고, 이로써 특이적인 평면 및/또는 관상 기하학적 구조가 제조되고; 여기서, 바이오 잉크 내의 개별 세포의 응집은 바이오프린팅 이전, 그 동안, 및/또는 그 이후에 이루어진다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 1) 복수 개의 세포를 고정된 부피로 수집함으로써 제조되고; 여기서, 세포 성분(들)은 전체 부피의 약 30% 이상 내지 100% 이하를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 반고체 또는 고체 다세포 응집물 또는 다세포체를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 바이오 잉크는 1) 미리 결정된 비로 복수 개의 세포 또는 세포 응집물 및 생체적합성 액체 또는 겔을 혼합하여 바이오 잉크를 수득하고, 2) 바이오 잉크를 압축하여 원하는 세포 밀도 및 점도를 가지는 바이오 잉크를 수득함으로써 제조한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크의 압축은 원심분리, 접선 유동 여과("TFF: Tangential flow filtration"), 또는 조합에 의해 달성된다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크의 압축으로 다세포 응집물 또는 다세포체가 형성될 수 있도록 허용하면서, 압출가능한 조성물이 생성된다. 일부 실시양태에서, "압출가능한"이란 노즐 또는 구멍(예컨대, 하나 이상의 홀 또는 관)을 통한

가압(예컨대, 압력하에서의 가압)에 의해 형성될 수 있음을 의미한다. 일부 실시양태에서, 바이오잉크의 압축은 세포가 적합한 밀도로 성장하는 것에서부터 이루어진다. 바이오 잉크에 필요한 세포 밀도는 사용되는 세포 및 생성되는 조직 또는 기관에 따라 변할 것이다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크의 세포는 응집되고/거나, 부착된다. 일부 실시양태에서, "응집하다," "응집된," 및 "응집"이란 세포, 세포 응집물, 다세포 응집물, 다세포체, 및/또는 그의 층에 결합하는 세포-세포 부착 특성을 의미한다. 추가의 실시양태에서, 상기 용어는 "융합하다", "융합된", 및 "융합"과 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 지지체 물질, 세포 배양 배지(또는 그의 보충물), 세포외 기질(또는 그의 성분), 세포 부착제, 세포 사멸 억제제, 항아포토시스제, 항산화제, 압출 화합물, 및 그의 조합을 추가로 포함한다.

[0110] 다양한 실시양태에서, 세포는 임의의 적합한 세포이다. 추가의 다양한 실시양태에서, 세포는 척추동물 세포, 포유동물 세포, 인간 세포, 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 세포 유형은 제조되는 구성물 또는 조직 유형에 의존한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 한 유형의 세포를 포함한다(이는 또한 "균질" 또는 "단형" 바이오 잉크로도 지칭된다). 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 1 초과 유형의 세포를 포함한다(또한 "비균질" 또는 "다형" 바이오 잉크로도 지칭된다).

[0111] 세포 배양 배지

[0112] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 세포 배양 배지를 포함한다. 세포 배양 배지는 임의의 적합한 배지이다. 다양한 실시양태에서, 적합한 세포 배양 배지로는 비제한적인 일례로, 둘베코스 포스페이이트 완충처리된 염수, 얼스 균형 염(Earle's Balanced Salts), 행크스 균형 염(Hanks' Balanced Salts), 타이로드즈 염(Tyrode's Salts), 알서버스 용액(Alsever's Solution), 게이스 균형 염(Gey's Balanced Salt Solution), 변형된 크레브스-헨셀레이트 완충제(Kreb's-Henseleit Buffer Modified), 크레브스-링거 비카보네이트 완충제(Kreb's-Ringer Bicarbonate Buffer), 펙스 염수(Puck's Saline), 둘베코스 변형 이글스 배지, 둘베코스 변형 이글스 배지/영양소 F-12 햄(Nutrient F-12 Ham), 영양소 혼합물 F-10 햄(Nutrient Mixture F-10 Ham: 햄스 F-10(Ham's F-10)), 배지 199, 최소 필수 배지 이글, RPMI-1640 배지, 아메스 배지(Ames' Media), BGJb 배지(피톤-잭슨 변형(Fitton-Jackson Modification)), 클릭스 배지(Click's Medium), CMRL-1066 배지, 피셔즈 배지(Fischer's Medium), 글라스코우 최소 필수 배지(GMEM: Glasgow Minimum Essential Medium), 이스코브 변형 둘베코스 배지(IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium), L-15 배지(레보비츠(Leibovitz)), 맥코이스 5A 변형 배지(McCoy's 5A Modified Medium), NCTC 배지, 스윙스 S-77 배지(Swim's S-77 Medium), 웨이마우스 배지(Waymouth Medium), 윌리엄스 배지 E, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 변형되거나, 보충된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 알부민, 셀레늄, 트랜스페린, 페투인, 당, 아미노산, 비타민, 성장 인자, 사이토카인, 호르몬, 항생제, 지질, 지질 담체, 사이클로텍스트린, 혈소판이 풍부한 혈장, 또는 그의 조합을 추가로 포함한다.

[0113] 세포외 기질

[0114] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 세포외 기질 또는 그의 유도체의 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, "세포외 기질"은 세포에 의해 생산되고, 세포 밖의 세포외 공간으로 수송되는 단백질을 포함하며, 여기서, 이는 조직을 함께 유지시키는 지지체로서의 역할을 하여 인장 강도를 제공하고/거나, 세포 신호전달을 촉진한다. 세포외 기질 성분의 예로는 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 하이알루로네이트, 엘라스틴, 및 프로테오글리칸을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 다양한 ECM 단백질(예컨대, 젤라틴, 피브리노젠, 피브린, 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 및/또는 프로테오글리칸)을 함유한다. ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 임의적으로 사용되는 세포 페이스트에 첨가되어 다세포 응집물을 형성한다. 세포 페이스트에 첨가되는 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 임의적으로 인간 또는 동물 공급원으로부터 정제되거나, 또는 당업계에 공지된 제조방법에 의해 제조된다. 별법으로, ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 장형 세포체 내의 세포에 의해 자연적으로 분비되거나, 또는 장형 세포체를 제조하는 데 사용되는 세포가 임의적으로 세포가 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 유전적으로 조작되어 하나 이상의 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체 및/또는 하나 이상의 세포 부착 분자 또는 세포-기관 부착 분자(예컨대, 셀렉틴, 인테그린, 면역글로불린, 및 어드헤린들)의 발현 수준을 변화시킨다. 일부 실시양태에서, ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 다세포 응집물에서 세포의 응집을 촉진한다. 예를 들어, 젤라틴 및/또는 피브리노젠은 다세포 응집물을 형성하는데 사용되는 세포 페이스트에 적합하게 첨가된다. 피브리노젠은 트롬빈의 첨가에 의해 피브린으로 전환된다.

[0115] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 세포 부착을 조장하는 작용제를 추가로 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 세포 사멸(예컨대, 괴사, 아포토시스, 또는 자가포식)을 억제시키는 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 항아포토시스제를 추가로 포함한다. 세포 사멸을 억제시키는 작용제로는 소형 분자, 항체, 펩티드, 펩티마이드, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포 사멸을 억제시키는 작용제는 항TNF 작용제, 인터루킨의 활성을 억제시키는 작용제, 인터페론의 활성을 억제시키는 작용제, GCSF(과립구 콜로니 자극 인자)의 활성을 억제시키는 작용제, 대식세포 염증성 단백질의 활성을 억제시키는 작용제, TGF-B(형질전환 성장 인자 B)의 활성을 억제시키는 작용제(도 15 및 16 참조), MMP(기질 메탈로프로테이나제: matrix metalloproteinase)의 활성을 억제시키는 작용제, 카스파제의 활성을 억제시키는 작용제, MAPK/JNK 신호전달 캐스케이드의 활성을 억제시키는 작용제, Src 키나제의 활성을 억제시키는 작용제, JAK(야누스(Janus) 키나제)의 활성을 억제시키는 작용제, 또는 그의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 항산화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 산소 운반체 또는 다른 세포 특이 영양소를 포함한다.

[0117] 압출 화합물

[0118] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 압출 화합물(즉, 바이오 잉크의 압출 특성을 변형시키는 화합물)을 추가로 포함한다. 압출 화합물의 예로는 겔, 하이드로겔, 펩티드 하이드로겔, 아미노산 기반 겔, 계면활성제 폴리올(예컨대, 플루로닉(Pluronic) F-127 또는 PF-127), 열반응성 중합체, 하이알루로네이트, 알기네이트, 세포외 기질 성분들(및 그의 유도체), 콜라겐, 젤라틴, 다른 생체적합성 천연 또는 합성 중합체, 나노섬유, 및 자가 조립 나노섬유를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 압출 화합물은 바이오프린팅 이후에 물리적, 화학적, 또는 효소적 수단에 의해 제거된다.

[0119] 젤리로도 지칭되는 겔은 다양한 방식으로 정의되었다. 예를 들어, 미국 약전(United States Pharmacopoeia)에서는 겔을 액체가 사이에 침투된 작은 무기 입자 또는 큰 유기 분자로 구성된 현탁액으로 이루어진 반고체 시스템으로 정의한다. 겔은 단일상 또는 2상 시스템을 포함한다. 단일상 겔은 분산된 거대분자 및 액체 사이에 뚜렷한 경계가 존재하지 않도록 하는 방식으로 액체 전역에 걸쳐 균일하게 분포된 유기 거대분자로 구성된다. 일부 단일상 겔은 합성 거대분자(예컨대, 카보머) 또는 천연 겔(예컨대, 트라가칸트)로부터 제조된다. 일부 실시양태에서, 단일상 겔은 일반적으로 수성이지만, 이는 또한 알콜 및 오일을 이용하여 제조될 것이다. 2상 겔은 작은 개별 입자의 네트워크로 구성된다.

[0120] 일부 경우에서, 겔은 소수성 또는 친수성인 것으로 분류된다. 특정 실시양태에서, 소수성 겔의 기재는 알루미늄 또는 아연 비누들 또는 콜로이드성 실리카로 겔화된 지방 오일 또는 폴리에틸렌을 포함하는 액체 파라핀으로 구성된다. 대조적으로, 소수성 겔의 기재는 보통 적합한 겔화제(예, 트라가칸트, 전분, 셀룰로스 유도체, 카복시비닐 중합체, 및 마그네슘-알루미늄 실리케이트)로 겔화된 물, 글리세롤, 또는 프로필렌 글리콜로 구성된다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물들 또는 장치들의 유동학은 위 가소성, 가소성, 요변성 또는 팽창성이다.

[0121] 적합한 하이드로겔로는 콜라겐, 하이알루로네이트, 피브린, 알기네이트, 아가로스, 키토산, 및 그의 조합에서 유래된 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 적합한 하이드로겔은 합성 중합체들이다. 추가의 실시양태에서, 적합한 하이드로겔로는 폴리(아크릴산) 및 그의 유도체, 폴리(에틸렌 옥사이드) 및 그의 공중합체, 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파젠, 및 그의 조합에서 유래된 것을 포함한다. 다양한 특정 실시양태에서, 구속 물질은 하이드로겔, 노보겔™, 아가로스, 알기네이트, 젤라틴, 매트릭겔(Matrigel)™, 하이알루로난, 폴록사머, 펩티드 하이드로겔, 폴리(이소프로필 n-폴리아크릴아미드), 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(PEG-DA), 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 폴리디메틸실록산, 폴리아크릴아미드, 폴리(락트산), 실리콘, 실크, 또는 그의 조합으로부터 선택된다.

[0122] 일부 실시양태에서, 하이드로겔 기반 압출 화합물은 열가역성 겔이다(이는 또한 열반응성 겔 또는 썬모겔로도 알려져 있다). 일부 실시양태에서, 적합한 열가역성 하이드로겔은 실온에서는 액체가 아니다. 구체적인 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 겔화 온도(T_겔)는 약 10℃, 11℃, 12℃, 13℃, 14℃, 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 20℃, 21℃, 22℃, 23℃, 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 30℃, 31℃, 32℃, 33℃, 34℃, 35℃, 36℃, 37℃, 38℃, 39℃, 40℃(그 안의 증분을 포함)이다. 특정 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 T_겔은 약 10℃ 내지 약 40℃이다. 추가의 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 T_겔은 약 20℃ 내지 약 30℃이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크(예컨대, 하이드로겔, 하나 이상의 세포 유형, 및 다른 첨가제 등을 포함하는 것)는 실온에서는 액체가 아니다. 일부 실시양태에서, 적합한 열가역성 하이드로겔은 포유동물의 체온에서는 액체가 아니다. 구체적인 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 겔화 온도(T_겔)는 약 22℃, 23℃, 24℃, 25

℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 30℃, 31℃, 32℃, 33℃, 34℃, 35℃, 36℃, 37℃, 38℃, 39℃, 40℃, 41℃, 41℃, 43℃, 44℃, 45℃, 46℃, 47℃, 48℃, 49℃, 50℃, 51℃, 52℃(그 안의 증분을 포함)이다. 특정 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 T겔은 약 22℃ 내지 약 52℃이다. 추가의 실시양태에서, 적합한 하이드로겔의 T겔은 약 32℃ 내지 약 42℃이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크(예컨대, 하이드로겔, 하나 이상의 세포 유형, 및 다른 첨가제 등을 포함하는 것)는 포유동물의 체온에서는 액체가 아니다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 겔화 온도(T겔)는 약 10℃, 약 15℃, 약 20℃, 약 25℃, 약 30℃, 약 35℃, 약 40℃, 약 45℃, 약 50℃, 약 55℃(그 안의 증분을 포함)이다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 10℃ 내지 약 15℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 15℃ 내지 약 20℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 20℃ 내지 약 25℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 25℃ 내지 약 30℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 30℃ 내지 약 35℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 35℃ 내지 약 40℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 40℃ 내지 약 45℃이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오 잉크의 T겔은 약 45℃ 내지 약 50℃이다.

[0123] 폴리옥시프로필렌 및 폴리옥시에틸렌으로 이루어진 중합체는 수용액 내로 혼입되는 경우 열가역성 겔을 형성한다. 상기 중합체는 바이오프린터 장치에서 유지 가능한 온도에서 액체 상태에서부터 겔 상태로 변화할 수 있는 능력을 가진다. 액체 상태에서 겔 상태로의 상 전이는 중합체 농도 및 용액 중 성분들에 의존한다.

[0124] 폴록사머 407(플루로닉 F-127 또는 PF-127 또는 루트롤(Lutrol))은 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체들로 이루어진 비이온성 계면활성제이다. 다른 폴록사머로는 188(F-68 등급), 237(F-87 등급), 338(F-108 등급)을 포함한다. 폴록사머의 수용액은 산, 알칼리, 및 금속 이온의 존재하에서 안정적이다. PF-127은 일반 화학식이 E106 P70 E106이고 평균 몰 질량이 13,000인, 상업적으로 이용가능한 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 트리블록 공중합체이다. 중합체는 임의적으로 중합체의 겔화 특성을 증강시킬 수 있는 적합한 방법에 의해 추가로 정제된다. 대략 70%의 에틸렌 옥시드를 함유하며, 이것이 그의 친수성의 원인이 된다. 이는 폴록사머 ABA 블록 공중합체 시리즈 중 하나이다. PF-127은 우수한 용해능, 낮은 독성을 가지는 바, 이에 적합한 압출 화합물로 간주된다.

[0125] 일부 실시양태에서, 본원에 제시된 하이드로겔 및 바이오 잉크의 점도는 기술된 임의의 수단들에 의해 측정된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, LVDV-II+CP 콘 플레이트(Cone Plate) 점도계 및 콘 스핀들(Cone Spindle) CPE-40을 사용하여 하이드로겔 및 바이오 잉크들의 점도를 계산한다. 다른 실시양태에서, 브루크필드(Brookfield)(스핀들 및 컵) 점도계를 사용하여 하이드로겔 및 바이오 잉크의 점도를 계산한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 언급된 점도 범위는 실온에서 측정된 것이다. 다른 실시양태에서, 본원에서 언급된 점도 범위는 체온에서(예컨대, 건강한 인간의 평균 체온에서) 측정된 것이다.

[0126] 추가의 실시양태에서, 하이드로겔 및/또는 바이오 잉크는 약 500 내지 1,000,000 센티푸아즈, 약 750 내지 1,000,000 센티푸아즈; 약 1,000 내지 1,000,000 센티푸아즈; 약 1,000 내지 400,000 센티푸아즈; 약 2,000 내지 100,000 센티푸아즈; 약 3,000 내지 50,000 센티푸아즈; 약 4,000 내지 25,000 센티푸아즈; 약 5,000 내지 20,000 센티푸아즈; 또는 약 6,000 내지 15,000 센티푸아즈의 점도를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 연속적인 바이오프린팅에 적합한 세포 및 압출 화합물을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 바이오 잉크의 점도는 1,500 mPa·s이다. 일부 실시양태에서, 플루로닉 F-127 및 세포 물질의 혼합물은 연속적인 바이오프린팅에 적합하다. 상기 바이오 잉크는 48시간에 걸쳐 냉(4℃) 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate buffered saline) 중에서의 연속 혼합에 의해 플루로닉 F-127 분말을 30%(w/v)로 용해시킴으로써 제조된다. 플루로닉 F-127은 또한 수중에서 적합하게 용해된다. 일부 실시양태에서, 세포는 배양되고, 표준 멸균 세포 배양 기법을 이용하여 증식된다. 추가의 실시양태에서, 세포를 예를 들어, 200 g로 펠릿화하고, 30% 플루로닉 F-127 중에 재현탁시키고, 그가 있는 바이오프린터에 고정된 저장소 내로 흡입시키고, 일부 실시양태에서, 약 10 내지 약 25℃의 겔화 온도에서 고정화시킨다. 바이오프린팅 이전에 바이오 잉크를 겔화하는 것은 임의적이다. 플루로닉 F-127을 포함하는 바이오 잉크를 포함하는 바이오 잉크는 임의적으로 액체로 분배된다.

[0128] 다양한 실시양태에서, 다양한 실시양태에서, 플루로닉 F-127의 농도는 적합한 점도 및/또는 세포독성 특성을 가지는 임의의 값이다. 일부 실시양태에서, 플루로닉 F-127의 적합한 농도는 바이오프린팅되는 경우에 그 형태를 유지하면서 중량을 지지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 플루로닉 F-127의 농도는 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약

25%, 약 30%), 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50%이다. 일부 실시양태에서, 플루로닉 F-127의 농도는 약 30% 내지 약 40%, 또는 약 30% 내지 약 35%이다.

[0129] 일부 실시양태에서, 압출 화합물 또는 부형제 중 젤라틴의 농도는 6%이고, 알기네이트의 농도는 0.5%이다. 다른 실시양태에서, 압출 화합물 또는 부형제 중 젤라틴의 농도는 4%이고, 알기네이트의 농도는 2%이다.

[0130] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크의 비세포 성분(예컨대, 압출 화합물 등)은 사용 전에 제거된다. 추가의 실시양태에서, 비세포 성분은 예를 들어, 하이드로겔, 펩티드 하이드로겔, 아미노산 기반 겔, 계면활성제 폴리올, 열 반응성 중합체, 하이알루로네이트, 알기네이트, 콜라겐, 또는 다른 생체적합성 천연 또는 합성 중합체이다. 추가의 다른 실시양태에서, 비세포 성분은 물리적, 화학적, 또는 효소적 수단들에 의해 제거된다. 일부 실시양태에서, 비세포 성분 중 일부는 사용시 세포 성분과 회합된 상태 그대로 남아 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, 세포는 세포 상호작용을 증가시키도록 전처리된다. 예를 들어, 세포는 바이오 잉크의 형상화 이전에 세포-세포 상호작용을 증강시키기 위해 원심분리 이후, 원심분리관 내부에서 적합하게 인큐베이션된다.

[0132] *예시적인 세포비*

[0133] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 다세포체를 포함하고, 이는 추가로 비실질 간 세포(예컨대 내피 세포, 간 성상 세포, 쿠퍼 세포)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 내피 세포:간 성상 세포:쿠퍼 세포의 비는 임의의 적합한 비이다. 추가의 실시양태에서, 내피 세포:간 성상 세포:쿠퍼 세포의 비는 약 90:10:0 내지 약 10:90:0이다. 추가의 다른 실시양태에서, 내피 세포:간 성상 세포:쿠퍼 세포의 비는 45:45:10이다.

[0134] 일부 실시양태에서, 바이오 잉크는 다세포체를 포함하고, 이는 추가로 간세포(예컨대, 일차 간세포, HepG2 또는 헤파RG) 및 추가의 세포 유형을 100:0의 비로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 간세포 대 추가의 비실질 세포 유형(예컨대, 내피 세포)의 비는 95:5이다. 추가의 실시양태에서, 간세포 대 추가의 비실질 세포 유형(예컨대, 내피 세포, 성상 세포)의 비는 50:50이다. 추가의 다른 실시양태에서, 실질 대 비실질 세포(예컨대, 내피 세포, 성상 세포, 쿠퍼 세포)의 비는 50:35: 10:5이다.

[0135] *세포의 자가 분류*

[0136] 일부 실시양태에서, 구성물 또는 조직을 형성하는 데 사용되는 다세포 응집물은 조작된 조직에 포함되는 모든 세포 유형(예컨대, 간세포, 내피 세포, 간 성상 세포 및 쿠퍼 세포)을 포함한다; 상기 일례에서, 각 세포 유형은 (예컨대, 성숙화 동안에) 적절한 위치로 이동하여 조작된 조직, 예컨대, 조작된 간 조직을 형성한다. 다른 실시양태에서, 구조를 형성하는 데 사용되는 다세포 응집물은 조작된 조직에 포함되는 모든 세포 유형보다는 더 적게 포함한다. 일부 실시양태에서, 각 유형의 세포는 다세포 응집물, 또는 조직의 영역 또는 층 내에서 균일하게 분포한다. 다른 실시양태에서, 각 유형의 세포는 다세포 응집물, 또는 조직의 층 또는 영역 내의 특정 영역에 국재화된다.

[0137] 예를 들어, 적합한 비(예컨대, 70:15:10:5)로 간세포, 내피 세포, 간 성상 세포 및 쿠퍼 세포를 포함하는 조작된 간 조직의 경우, 이웃하는, 바이오프린트된, 응집된 다형 바이오 잉크 단위가 융합된다. 성숙화 동안, 내피 세포는 어느 정도까지는 구성물의 주변부 및 코어 둘 모두로 국재화되고, 미세혈관 구조로 조직화된다. 일부 실시양태에서, 구성물 내의 세포 유형의 국재화는 생체내 또는 생체의 포유동물 조직의 적층된 구조를 모방한다.

[0138] 미리 형성된 스캐폴드

[0139] 일부 실시양태에서, 본원에서는 임의의 미리 형성된 스캐폴드가 없거나, 또는 실질적으로 없는 조작된, 이식가능한 조직 및 기관을 개시한다. 추가의 실시양태에서, "스캐폴드"란 합성 스캐폴드, 예컨대, 중합체 스캐폴드 및 다공성 하이드로겔, 비합성 스캐폴드, 예컨대, 미리 형성된 세포의 기질 층, 사멸 세포 층, 및 탈세포화 조직, 및 조작된 조직 및/또는 기관의 물리적 구조에 통합되고, 상기 조직 및/또는 기관으로부터 제거되지 않는 임의의 다른 유형의 미리 형성된 스캐폴드를 의미한다. 추가의 다른 실시양태에서, 탈세포화 조직 스캐폴드로는 임의의 방식으로 배양된 세포에 의해 생성된 탈세포화 천연 조직 또는 탈세포화된 세포 물질; 예를 들어, 사멸되거나, 탈세포화되면서, 살아 있는 동안에 생성한 ECM을 남기는 세포 층을 포함한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물 및 그의 어레이는 예컨대, 조직, 조직의 임의의 층, 또는 조직 형상의 형성을 위해 임의의 미리 형성된 스캐폴드를 이용하지 않는다. 비제한적인 일례로서, 본 발명의 조작된 간 조직은 제조 시점에 또는 사용 시점에 임의의 미리 형성된 합성 스캐폴드, 예컨대, 중합체 스캐폴드, 미리 형성된 세포의 기질 층, 또는 임의의 다른 유형의 미리 형성된 스캐폴드를 이용하지 않는다. 일부 실시양태에서, 조

작된 간 조직에는 실질적으로 임의의 미리 형성된 스캐폴드가 없다. 추가의 실시양태에서, 조직의 세포 성분은 검출 가능하지만, 미량 또는 소량의, 예컨대, 전체 조성의 2.0% 미만, 1.0% 미만, 또는 0.5% 미만의 스캐폴드를 함유한다. 추가의 다른 실시양태에서, 미량 또는 소량의 스캐폴드는 조직, 또는 그의 어레이의 장기간의 거동에 영향을 미치기에는, 또는 그의 일차적 생물학적 기능을 방해하기에 충분하지 않다. 추가적인 실시양태에서, 스캐폴드 성분들은 인쇄 후 물리적, 화학적, 또는 효소적 방법들에 의해 제거되어, 스캐폴드 성분들이 없거나 필수적으로 없는 조작된 조직이 산출된다. 추가의 실시양태에서, 스캐폴드 성분은 프린팅 이후에 물리적, 화학적, 또는 효소적 수단에 의해 제거되고, 이로써, 스캐폴드 성분이 없거나, 또는 실질적으로 없는 조작된 조직이 수득된다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 미리 형성된 스캐폴드가 없거나, 또는 실질적으로 없는 조작된 간 조직은 예를 들어, 먼저 스캐폴딩 물질을 형성한 후, 이어서, 세포를 스캐폴드 상에 시딩하고, 이어서, 세포를 증식시켜 스캐폴드를 충전시키고, 그의 형상으로 만드는 특정의 다른 조직 조작 방법으로 개발된 것과 극명한 대조를 이룬다. 한 측면에서, 본원에 기술된 바이오프린팅 방법을 통해 미리 형성된 스캐폴드가 없거나, 또는 실질적으로 없는 생존가능하고, 유용한 조직을 제조할 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 세포는 일부 실시양태에서, 구축 물질을 이용하여 원하는 3차원의 형태로 유지된다. 구축 물질은 적어도 구축 물질이 일시적이고/거나, 세포 및/또는 조직으로부터 제거될 수 있다는 점에서 스캐폴드와 구별된다.

[0142] 어레이

[0143] 일부 실시양태에서, 본원에서는 조작된 간 조직/구성물의 어레이를 개시한다. 일부 실시양태에서, "어레이"란 복수 개의 테스트가 한 샘플에 대해 수행될 수 있도록, 하나 이상의 테스트가 복수 개의 샘플에 대해 수행될 수 있도록, 또는 그 둘 모두가 이루어질 수 있도록 다중 요소가 공간적으로 배열되어 결합되어 있는 것을 포함하는 과학적 도구를 의미한다. 일부 실시양태에서, 어레이는 중간 또는 고처리량 스크리닝과 관련된 것을 비롯한, 스크리닝 방법 및 장치를 위해 채택되거나, 또는 그와 상용성이다. 추가의 실시양태에서, 어레이를 통해 복수 개의 테스트가 동시에 수행될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 어레이를 통해 복수 개의 샘플이 동시에 테스트될 수 있다. 일부 실시양태에서, 어레이는 세포 마이크로어레이이다. 추가의 실시양태에서, 세포 마이크로어레이는 고체 지지체의 표면 상에서 살아 있는 세포를 다중으로 질의할 수 있는 실험용 도구이다. 다른 실시양태에서, 어레이는 조직 마이크로어레이이다. 추가의 실시양태에서, 조직 마이크로어레이는 다중의 생화학적, 대사적, 분자적, 또는 조직학적 분석 수행이 이루어질 수 있도록 허용하기 위해 어레이 중에 조립된 복수 개의 별개의 조직 또는 조직 샘플을 포함한다.

[0144] 일부 실시양태에서, 각각의 조작된 간 조직/구성물은 생체적합성 다중 웰 용액의 웰에 존재한다 (예컨대, 도 16 참조). 일부 실시양태에서, 각 조직은 웰 내에 배치된다. 다른 실시양태에서, 각 조직은 웰 내로 바이오프린트된다. 추가의 실시양태에서, 웰은 코팅된다. 다양한 추가의 실시양태에서, 웰은 생체적합성 하이드로겔, 하나 이상의 단백질, 하나 이상의 화학 물질, 하나 이상의 펩티드, 하나 이상의 항체, 및 하나 이상의 성장 인자(그의 조합 포함) 중 하나 이상의 것으로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 웰은 노보겔™로 코팅된다. 다른 실시양태에서, 웰은 아가로스로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 각 조직은 생체적합성 다중 웰 용기의 웰 내의 다공성, 생체적합성 막 상에 존재한다. 일부 실시양태에서, 다중 웰 용기의 각 웰은 2개 이상의 조직을 포함한다.

[0145] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 측면 상의 생체적합성 표면에 고정된다. 조직을 생체적합성 표면에 고정시키는 데 많은 방법들이 적합하다. 다양한 실시양태에서, 조직은 예를 들어, 하나 이상의 전체 측면을 따라, 하나 이상의 측면의 가장 자리에만 오직, 또는 하나 이상의 측면의 중심부에만 생체적합성 표면에 적합하게 고정된다. 다양한 추가의 실시양태에서, 조직은 표면 내로 통합된, 또는 표면과 결합된 홀더 또는 캐리어를 이용하여 생체적합성 표면에 적합하게 고정된다. 다양한 추가의 실시양태에서, 조직은 표면 내로 통합된, 또는 표면과 결합된 하나 이상의 핀치 클램프 또는 플라스틱 홀을 이용하여 생체적합성 표면에 적합하게 고정된다. 일부 실시양태에서, 조직은 다공성 막의 세포 부착에 의해 생체적합성 표면에 적합하게 고정된다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 측면 상의 생체적합성 표면에서의 부착에 의해 어레이 구조로 유지된다. 추가의 실시양태에서, 조직은 1, 2, 3, 4개 이상의 측면 상의 생체적합성 표면에 부착된다. 일부 실시양태에서, 생체적합성 표면은 조직, 또는 조직과 접촉하는 유기체에 대해 상당한 손상 또는 독성 위험을 제기하지 않는 임의의 표면이다. 추가의 실시양태에서, 생체적합성 표면은 전통적인 조직 배양 방법에 적합한 임의의 표면이다. 적합한 생체적합성 표면으로는 비제한적인 일례로, 처리된 플라스틱, 막, 다공성 막, 코팅된 막, 코팅된 플라스틱, 금속, 코팅된 금속, 유리, 처리된 유리, 및 코팅된 유리를 포함하며, 여기서, 적합한 코팅제로는 하이드로겔, ECM 성분, 화학 물질, 단백질 등을 포함하고, 코팅제 또는 처리는 세포를 자극시

키거나, 저지시키는 수단, 및 생체적합성 표면에서의 조직 부착 수단을 제공한다.

- [0146] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 측면 상의 생체적합성 표면에 조작된 조직을 고정시키는 것은 유체 흐름에 의해 유발된 전단력에 조직을 가하는 것을 촉진시킨다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물은 유체 흐름에 의해 유발된 전단력을 받게 된다. 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직은 1, 2, 3, 4개 이상의 측면 상에서 전단력을 받게 된다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직/구성물에 대해 하나 이상의 노출된 표면 상의 조직과 접촉하는 액체 영양소의 재순화, 관류 또는 교환이 이루어진다.
- [0147] 일부 실시양태에서, 간 조직/구성물을 비롯한, 조작된 조직의 어레이는 2개 이상의 요소의 결합을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 어레이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 또는 500개의 요소(그 안의 증분을 포함)의 결합을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 각 요소는 하나 이상의 세포, 다세포 응집물, 조직, 기관, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0148] 일부 실시양태에서, 간 조직/구성물을 비롯한, 조작된 조직의 어레이는 미리 결정된 패턴으로 공간적으로 배열된 다중 요소를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 패턴은 요소의 임의의 적합한 공간상의 배열이다. 다양한 실시양태에서, 배열 패턴으로 비제한적인 일례로, 2차원 그리드, 3차원 그리드, 하나 이상의 라인, 원호, 또는 동그라미, 일련의 행 또는 열 등을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 패턴은 중간 또는 고처리량의 생물학적 검정법 또는 스크리닝 방법 또는 장치와의 상용성을 위해 선택된다.
- [0149] 다양한 실시양태에서, 어레이 중의 하나 이상의 조직을 제작하는 데 사용되는 세포 유형 및/또는 세포 공급원은 구체적인 연구 목표 또는 목적에 기초하여 선택된다. 추가의 다양한 실시양태에서, 어레이 중의 특정 조직은 구체적인 연구 목표 또는 목적에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 특정 질환 또는 병증의 연구를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 특정의 조작된 간 조직이 어레이에 포함된다. 일부 실시양태에서, 특정 피험체의 질환 또는 병증의 연구를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 특정의 조작된 간 조직이 어레이에 포함된다. 추가의 실시양태에서, 어레이 내의 하나 이상의 특정 조작된 간 조직은 2명 이상의 상이한 인간 기증자로부터 유래된 하나 이상의 세포 유형으로 생성된 것이다. 일부 실시양태에서, 어레이 내의 각 조직은 세포 유형, 세포 공급원, 세포 층, 세포 비, 구성 방법, 크기, 형상 등과 관련하여 실질적으로 유사하다. 다른 실시양태에서, 어레이 내의 조직 중 하나 이상의 것은 세포 유형, 세포 공급원, 세포 층, 세포 비, 구성 방법, 크기, 형상 등과 관련하여 독특한 것이다. 다양한 실시양태에서, 어레이 내의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300개 이상의 조직(그 안의 증분을 포함)은 독특한 것이다. 다른 다양한 실시양태에서, 어레이 내의 조직 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%(그 안의 증분을 포함)가 독특한 것이다.
- [0150] 일부 실시양태에서, 어레이 내의 각 조직은 배양물 중에서 독립적으로 유지된다. 추가의 실시양태에서, 어레이 내의 각 조직의 배양 조건은 조직이 다른 조직으로부터 분리되도록, 및 배지 또는 배지 중에서 가용성인 인자를 교환할 수 없도록 하는 조건이다. 다른 실시양태에서, 어레이 내의 2개 이상의 개별 조직은 가용성 인자를 교환한다. 추가의 실시양태에서, 어레이 내의 2개 이상의 개별 조직의 배양 조건은 배지 또는 배지 중에서 가용성인 인자를 다른 조직과 교환할 수 있도록 하는 조건이다. 다양한 실시양태에서, 어레이 내의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300개 이상의 조직(그 안의 증분을 포함)은 배지 및/또는 가용성 인자를 교환한다. 다른 다양한 실시양태에서, 어레이 내의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%의 조직(그 안의 증분을 포함)은 배지 및/또는 가용성 인자를 교환한다.
- [0151] **시험관내 검정**
- [0152] 일부 실시양태에서, 본원에서 개시된 조작된 간 조직 및 어레이는 시험관내 검정에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, "검정법"이란 유기 또는 생물학적 샘플(예컨대, 세포 응집물, 조직, 기관, 유기체 등) 중 물질(예컨대, 화학 물질, 분자, 생화학 물질, 약물 등)의 존재 또는 활성을 테스트 또는 측정하는 방법을 의미한다. 추가의 실시양태에서, 검정법은 정질적 검정법 및 정량적 검정법을 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 정량적 검정법은 샘플 중 물질의 양을 측정한다.
- [0153] 다양한 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 비제한적인 일례로, 영상 기반 검정법, 분비된 단백질의 측

정, 마커 발현, 및 단백질 생산에서 사용하기 위한 것이다. 다양한 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 분자 결합(방사성 리간드 결합 포함), 분자 흡수, 활성(예컨대, 효소적 활성 및 수용체 활성 등), 유전자 발현, 단백질 발현, 수용체 효능 작용, 수용체 길항 작용, 세포 신호전달, 아포토시스, 화학민감성, 형질감염, 세포 이동, 화학주성, 세포 생존능, 세포 증식, 안전성, 효능, 대사, 독성, 감염성, 및 남용 경향성 중 하나 이상의 것을 검출 또는 측정하는 검정법에서 사용하기 위한 것이다.

[0154] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 면역검정법에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 면역검정법은 경쟁적 면역검정법 또는 비경쟁적 면역검정법이다. 경쟁적 면역검정법에서, 예를 들어, 샘플 중 항원은 항체와 결합하는 데 있어 표지화된 항원과 경쟁하고, 항체 부위에 결합된 표지화된 항원의 양을 측정한다. (또한 "샌드위치 검정법"으로도 지칭되는) 비경쟁적 면역검정법에서, 예를 들어, 샘플 중 항원은 항체 부위에 결합하고; 이어서, 표지화된 항체가 항원에 결합하고, 이어서, 상기 부위 상의 표지화된 항체의 양을 측정한다.

[0155] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 효소 결합 면역흡착 검정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, ELISA는 샘플 중 항체 또는 항원의 존재를 검출하기 위해 사용되는 생화학적 기법이다. ELISA에서, 예를 들어, 특정 항원에 대하여 특이성을 가지는 1 이상의 항체가 사용된다. 추가의 일례로서, 비공지된 양의 항원을 포함하는 샘플을 비특이적으로(표면의 흡착을 통해) 또는 특이적으로("샌드위치" ELISA에서 같은 항원에 대하여 특이적인 또 다른 항체에 의한 포획을 통해) 고체 지지체(예컨대, 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트) 상에 고정화시킨다. 추가의 다른 일례로서, 항원을 고정화시킨 후, 검출 항체를 첨가하여 항원과 복합체를 형성한다. 검출 항체는 예를 들어, 효소에 공유적으로 연결되거나, 또는 바이오컨쥬게이션을 통해 효소에 연결된 2차 항체에 의해서 그 자체가 검출된다.

[0156] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포, 다세포 응집물, 또는 조직의 어레이, 마이크로어레이, 또는 칩은 약물 스크리닝 또는 신약 개발을 위해 사용된다. 추가의 실시양태에서, 조직의 어레이, 마이크로어레이, 또는 칩은 약물 스크리닝 또는 신약 개발용 키트의 일부로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 각각의 조작된 간 조직/구성물은 하나 이상의 자동화 약물 스크리닝 방법 및/또는 장치와 상용성인 생체적합성 다중 웰 용기의 웰 내에 존재한다. 추가의 실시양태에서, 자동화 약물 스크리닝 방법 및/또는 장치로는 컴퓨터 또는 로봇트 지원인 임의의 적합한 방법 또는 장치를 포함한다.

[0157] 추가의 실시양태에서, 약물 스크리닝 검정법 또는 신약 개발 검정법용 어레이는 임의의 치료학적 분야에서 잠재적으로 유용한 약물을 연구 또는 개발하는 데 사용된다. 추가의 다른 실시양태에서, 적합한 치료학적 분야로는 비제한적인 일례로, 감염성 질환, 혈액학, 종양학, 소아과, 심장학, 중추 신경계 질환, 신경학, 위장병학, 간장학, 비뇨기과학, 불임, 안과학, 신장학, 정형외과학, 통증 조절, 정신과학, 기도학, 백신, 상처 치유, 생리학, 약리학, 피부과학, 유전자 요법, 독성학, 및 면역학을 포함한다.

[0158] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 세포 기반 스크리닝에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 하나 이상의 감염성 질환, 예컨대, 바이러스 감염 또는 기생충 감염(예컨대, 플라스모디움 감염 등)을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 간 섬유증(예컨대, 간경변)을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 간암을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 간 지방증(예컨대, 지방 간)을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 하나 이상의 대사 결핍을 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 세포 기반 스크리닝은 하나 이상의 단백질 결핍을 위한 것이다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 암 개시, 진행, 또는 전이 연구에서 사용하기 위한 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 다른 세포 유형, 예컨대, 암 세포, 병원체 포함 세포, 병원성 세포, 면역 세포, 혈액 유래 세포, 또는 줄기/전구 세포와, 간 조직 및 간 조직을 포함하는 세포와의 상호작용 연구에서 사용하기 위한 것이다.

[0159] 일부 실시양태에서, 구성물 또는 그의 어레이는 항체, 포유동물 세포, 박테리아, 생물학적으로 활성인 단백질, 호르몬 등을 비롯한, 생물 물질의 성능을 평가하는 데에서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서 구성물 또는 그의 어레이는 쿠퍼 또는 성상 세포로부터 경계 간세포로의 그람 음성 또는 그람 양성 항원 자극받은 신호전달(예컨대, 지질다당류(LPS)에 대한 반응)의 효과를 비롯한, 쿠퍼 및 성상 세포에 의한 면역학적 샘플링을 검출, 정량화, 및 연구하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 구성물 또는 그의 어레이는 HBV 및 HCV를 비롯한, 간염화성 바이러스 생산에 유용하다. 추가의 실시양태에서, 구성물 또는 그의 어레이는 적혈구의 형태로 플라스모디움 종(기생충)을 생산하기 위한 비히클로서 사용된다. 추가의 다른 실시양태에서, 간 구성물 유래 플라스모디움은 적혈구의 형태의 기생충에 대하여 효과적인 요법을 확인하기 위한 유사 시험관내 검정법에

서 사용된다. 다른 실시양태에서, 구성물 또는 그의 어레이는 항숙주 항체 연구 수행을 비롯한, C형 간염 바이러스(HCV: Hepatitis C Virus) 또는 플라스모디움에 대한 항숙주 요법으로서 사용된다. 다른 실시양태에서, 간 구성물 또는 그의 어레이는 암 개시, 진행, 또는 전이 연구에서 유용하다. 다른 실시양태에서, 간 구성물 또는 그의 어레이는 병원체 포함 세포, 살아 있는 병원성 세포, 암 세포, 면역 세포, 혈액 세포, 줄기/전구 세포, 또는 유전적으로 조작된 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 포유동물 간 세포/조직 포함 구성물 및 하나 이상의 추가의 세포 유형 사이의 세포-세포 및 세포-조직 상호작용 연구에서 유용하다.

[0160] 일부 실시양태에서, 어레이는 조작된 간 조직 구성물 및 추가의 조직 구성물을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 간 조직 구성물은 하나 이상의 표면 상의 추가의 조직 구성물과 직접 접촉하고 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 간 조직은 유로 또는 일반 유체 저장소를 통해 하나 이상의 추가의 조직 구성물 또는 세포에 연결된다. 추가의 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 구성물과 접촉하는 액체 배지는 살아 있는 포유동물 세포, 예컨대, 면역 세포, 혈액 유래 세포, 또는 종양 유래 세포를 함유한다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직 구성물과 접촉하는 액체 배지는 박테리아, 바이러스, 기생충, 또는 다른 병원체를 함유한다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직 및 어레이는 X선 또는 냉동 EM을 비롯한, 3차원 구조 연구를 위해 간친화성 바이러스를 증식시키기 위한 비히클로서 사용하기 위한 것이다.

[0161] 체외 지지체

[0162] 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 복수 개의 층을 포함하고, 각 층은 실린더형 바이오 잉크를 포함하고, 바이오 잉크는 축 방향으로 실질적으로 평행하게 정렬되어 있고, 바이오 잉크는 실린더형 바이오 잉크 사이에 실질 간 세포; 및 임의적으로, 비실질 세포; 및 임의적으로, 실린더형 바이오 잉크 사이에 빈 공간 또는 관류가능한 채널을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 조작된 간 조직은 체외 지지체를 그를 필요로 하는 피험체에게 제공하는 데 사용된다. 추가의 다른 실시양태에서, 혈액을 구성물 상에 또는 그를 통해 통과시켜 혈액을 여과하고, 피험체의 간 기능을 보충한다.

[0163] 도 17을 참조하면, 특정 실시양태에서, 바이오프린트된 간 구조는 체외 지지체를 제공하기 위한 디자인이다. 상기 실시양태에서, 바이오프린트된 간 구조는 복수 개의 실질 세포 실린더로 구성된다. 본 구조는 또한 그를 통해 관류 또는 유동이 이루어질 수 있는 구획 및/또는 채널을 형성하기 위해 비실질 세포 및 충전체를 포함한다.

[0164] 도 19를 참조하면, 특정 실시양태에서, 바이오프린트된 간 구조는 조작된 간 조직 간의 및/또는 그를 통한 관류가 이루어질 수 있도록 허용하는 규칙적인 간격으로 빈 공간(임시 충전체로 점유된 것으로 도시)이 존재하는 반복형 관상 구조를 포함하는 체외 간 장치로서 사용된다.

[0165] 방법

[0166] 일부 실시양태에서, 본원에서는 1 이상의 간 세포 유형을 포함하는 바이오 잉크를 한 형태 또는 형태 상에 바이오프린트하는 단계, 및 바이오 잉크를 살아 있는, 3차원의 조직 간 구성물로 융합시키는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 구성하는 방법을 개시한다. 추가의 실시양태에서, 조직 구성물은 시험관내에서 사용하기 위한 것이다.

[0167] 일부 실시양태에서, 본원에서는 또한 실질 세포 또는 실질 및 비실질 세포를 포함하는 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계; 상기 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하는 단계; 및 상기 다세포 응집물을 인큐베이션시켜 그를 응집시키고, 조작된 간 조직을 형성하는 단계로서; 여기서, 상기 인큐베이션은 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 이루어지는 것인, 조작된 간 조직을 비롯한, 조직을 구성하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 바이오프린팅을 사용한다. 추가의 실시양태에서, 본 방법은 사용 시점에 임의의 미리 형성된 스캐폴드가 없거나, 또는 실질적으로 없는 조작된 간 조직을 제조한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 본원에서는 또한 포유동물 간 세포를 포함하는 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계; 상기 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하는 단계; 상기 하나 이상의 응집된 다세포 응집물에, 하나 이상의 외부 표면 상의 제1 유형의 포유동물 세포 층; 하나 이상의 외부 표면 상의 제2 유형의 포유동물 세포 층 중 하나 이상의 것을 적용시키는 단계; 및 상기 하나 이상의 다세포 응집물을 인큐베이션시켜 그를 응집시키고, 조직을 형성하는 단계로서; 여기서, 상기 인큐베이션은 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 이루어지는 것인, 살아 있는, 3차원의 간 조직을 구성하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 바이오프린팅을 사용한다. 추가의 실시양태에서, 본 방법은 사용 시점에 임의의 미리 형성된 스캐폴드가 없거나, 또는 실질적으로 없는 조작된 간 조직을 제조한다.

[0169] 일부 실시양태에서, 본원에서는 또한 포유동물 세포를 포함하는 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 제조하는

단계; 상기 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하여 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 /또는 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 형성하는 단계; 및 상기 하나 이상의 다세포 응집물을 인큐베이션시켜 그 가 응집되고, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성할 수 있게 하는 단계를 포함하는, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 구성하는 방법을 개시한다.

[0170] **응집된 다세포 응집물 제조**

[0171] 일부 실시양태에서, 본 방법은 1 이상의 세포는 간 세포를 나타내는 것인, 하나 이상의 포유동물 세포 유형을 포함하는 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 실질 간 세포를 포함하는 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 비실질 세포를 추가로 포함하는 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 내피 세포, 성상 세포, 섬유아세포, 쿠퍼 세포, 면역 세포, 림프구, 암 세포, 바이러스 포함 세포, 병원성 세포, 지방 세포, 지방생성 세포, 평활근 세포, 또는 줄기/전구 유래 세포 군으로부터 선택되는, 하나 이상의 다른 세포 유형을 추가로 포함하는 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0172] 본원에 기술된 특징을 가지는 다세포 응집물을 제조하는 방법은 다수 존재한다. 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 복수 개의 살아 있는 세포를 함유하거나, 또는 원하는 세포 밀도 및 점도를 가지는 세포 페이스트로부터 제작된다. 추가의 실시양태에서, 세포 페이스트는 성숙화(예컨대, 인큐베이션)를 거쳐 형성되는 원하는 형상 및 다세포체로 형상화된다. 일부 실시양태에서, 다세포체의 형상은 주변 몰드 또는 프레임의 형상에 의해 결정된다. 추가의 실시양태에서, 몰드 또는 프레임은 자동화 장치에 의해 정의된 기하학적 구조로 제작된다. 추가의 다른 실시양태에서, 몰드 또는 프레임은 바이오 잉크로 구성되고, 간 유래 세포를 함유한다. 추가의 실시양태에서, 몰드 또는 프레임은 간 유래 비실질 세포를 포함하고, 및 프레임을 충전시키고, 다세포 응집물을 형성하는 데 사용되는 페이스트는 실질 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 실질적으로 실린더형이다. 다른 실시양태에서, 다세포 응집물은 육각형, 사각형, 입방형, 직사각형, 다면체형이다. 추가의 다른 실시양태에서, 다중 다세포 응집물은 반복형 기하학적 구조의 모자이크식 패턴으로 주변 몰드 또는 프레임을 제작한 후, 이어서 또는 동시에 몰드 또는 프레임을 세포 페이스트로 충전시킴으로써 형성된다. 추가의 실시양태에서, 세포가 서로 부착 및/또는 응집하여 장형 다세포체를 형성할 수 있도록 하는 제어식 환경에서 세포 페이스트를 인큐베이션시킨다. 또 다른 특정 실시양태에서, 세포 페이스트를 3차원 형상으로 유지하는 장치에서 복수 개의 살아 있는 세포를 포함하는 세포 페이스트를 형상화함으로써 다세포체를 제조한다. 추가의 실시양태에서, 평평한 표면 상에 지지체 그 자체에 충분히 응집되는 본체를 제조하는 데 충분한 시간 동안 3차원 형상으로 유지되면서 조절되는 환경하에서 세포 페이스트를 인큐베이션시킨다.

[0173] 다양한 실시양태에서, 1) (예컨대, 미리 결정된 비로) (하나 이상의 세포 유형의) 세포 또는 세포 응집물, 및 생체적합성 겔 또는 액체, 예컨대, 세포 배양 배지를 수집하여 세포 현탁액을 생성하고; 2) 세포 현탁액을 압축시켜 원하는 세포 밀도 및 점도를 가지는 세포 페이스트를 제조함으로써 세포 페이스트를 제조한다. 다양한 실시양태에서, 압축은 다수의 방법에 의해 달성되며, 예컨대, 세포 배양물로부터 생성된 특성의 세포 현탁액을 농축시켜 세포 페이스트에 요구되는 원하는 세포 농도(밀도), 점도, 및 점조도를 달성한다. 특정 실시양태에서, 세포 배양물로부터의 비교적 묽은 세포 현탁액을 결정된 시간 동안 원심분리하여 펠릿 중 몰드에서 형상화될 수 있도록 허용하는 세포 농도를 달성할 수 있다. 점선 유동 여과 ("TFF")는 세포의 농축 또는 압축의 또 다른 적합한 방법이다. 일부 실시양태에서, 화합물을 세포 현탁액과 조합하여 필요한 압출 특성을 얻는다. 적합한 화합물로는 비제한적인 일례로, 비제한적인 일례로, 계면활성제 폴리올, 콜라겐, 하이드로겔, 펩티드 하이드로겔, 아미노산 기반 겔, 매트릭스겔™, 나노섬유, 자가 조립 나노섬유, 젤라틴, 피브리노젠 등을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 세포 페이스트는 복수 개의 살아 있는 세포를 조직 배양 배지와 혼합하고, 살아 있는 세포를 압축하여(예컨대, 원심분리하여) 제조된다. 하나 이상의 ECM 성분(또는 ECM 성분의 유도체)은 임의적으로 세포 펠릿을 ECM 성분(들)(또는 ECM 성분(들)의 유도체(들))을 함유하는 하나 이상의 생리학상 허용되는 완충제 중에 재현탁시킴으로써 포함되며, 생성된 세포 현탁액을 다시 원심분리하여 세포 페이스트가 형성된다.

[0175] 일부 실시양태에서, 추가 가공을 위해 바람직한 세포 페이스트의 세포 밀도는 세포 유형들에 따라 변한다. 추가의 실시양태에서, 세포 간의 상호작용이 세포 페이스트의 특성을 결정하며, 상이한 세포 유형은 세포 밀도 및 세포-세포 상호작용 간의 상이한 관계를 가질 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 세포 페이스트의 형상화 이전에 세포를 전처리하여 세포 상호작용을 증가시킨다. 예를 들어, 일부 경우에서, 세포 페이스트의 형상화 이전에

세포-세포 상호작용을 증강시키기 위하여 원심분리 후 원심분리관 내부에서 세포 인큐베이션시킨다. 일부 실시양태에서, 세포 페이스트는 바이오프린팅과 함께 동시에 형상화되고; 여기서, 개별 세포의 서로에의 응집을 통해 이루어지는 바이오 잉크 형성은 바이오프린팅 동안에 또는 그 이후에 수행된다.

[0176] 다양한 실시양태에서, 세포 페이스트를 형상화하는 데 다수의 방법이 사용된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 세포 페이스트는 원하는 형태를 얻기 위해 수동으로 성형되거나 압착된다(예컨대, 농축/압축 후). 추가의 일례로, 세포 페이스트는 세포 페이스트를 장치의 내부 표면에 순응하도록 형상화하는 장치, 예컨대, 마이크로피펫 또는 시린지(예컨대, 모세관 피펫 또는 유리/플라스틱 시린지) 내로 흡수진다(예컨대, 흡인된다). 마이크로피펫(예컨대, 모세관 피펫)의 단면 형상은 별법으로 원형, 사각형, 직사각형, 삼각형 또는 다른 비원형 단면 형상이다. 일부 실시양태에서, 세포 페이스트는 이를 미리 형성된 몰드, 예컨대, 플라스틱 몰드, 금속 몰드, 또는 겔 몰드 내로 침적시킴으로써 형상화된다. 일부 실시양태에서, 원심 주조 또는 연속 주조가 세포 페이스트를 형상화하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 바이오 잉크의 형상화는 바이오프린팅과 동시에 또는 그 이후에 이루어진다. 추가의 실시양태에서, 바이오 잉크의 형상화는 공동 프린트된 몰드의 결과로서 이루어지며; 여기서, 몰드는 임의적으로 바이오프린팅을 통해 증착되고; 여기서, 몰드는 바이오 잉크, 압출 화합물, 겔, 하이드로겔, 합성 중합체, 탄수화물, 단백질, 또는 포유동물 세포, 또는 그의 조합을 추가로 포함하는 바이오 잉크 중 하나 이상의 것을 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 공동 프린트된 몰드의 하나 이상의 성분은 바이오프린팅 이후에 제거되고; 여기서, 제거 방법은 물리적 수단, 수성 매질을 이용한 가용화; 화학적 처리; 효소적 처리; 조절 온도 중 하나로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 공동 프린트된 몰드는 제작 이후 조직과 결합된 상태 그대로 유지된다. 추가의 다른 실시양태에서, 공동 프린트된 몰드의 세포 성분(들)만이 제작 이후 조직과 결합된 상태 그대로 유지된다.

[0177] 일부 실시양태에서, 정의된 형상의 다세포 응집물은 본원에 기술된 조작된 간 조직을 구축하는 데 적합하다. 구형 다세포 응집물은 임의적으로 세포 자가 조직, 모드 사용, 및 현적 방법을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 생성된다. 추가의 실시양태에서, 실질적으로 구형 다세포 응집물을 제조하는 방법은 1) 원하는 세포 밀도 및 점도를 가지는 복수 개의 미리 선택된 세포 또는 세포 응집물을 함유하는 세포 페이스트를 제공하는 단계, 2) 세포 페이스트를 실린더형 형상으로 조작하는 단계, 3) 실린더를 동일한 단편들로 절단하는 단계, 4) 임의적으로 단편을 회전 진탕기에서 밤새도록 회전시키는 단계, 및 5) 임의적으로 실질적으로 구형 다세포 응집물을 1시간 내지 7일간의 기간 동안 성숙화시키는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 다세포 응집물은 음향 집속 방법을 통해 생성된다.

[0178] 일부 실시양태에서, 부분적으로 부착된 및/또는 응집된 세포 페이스트는 바이오프린팅에 사용되고; 여기서, 응집 및 바이오 잉크 형성은 주로 프린팅 이후에 이루어진다. 다른 실시양태에서, 세포 페이스트는 바이오프린팅 이전 제1 단계에서 형상화된다. 추가의 실시양태에서, 세포 페이스트는 추가의 성숙화 기간 동안 제2 형상화 장치에 보유되는 동안, 제1 형상화 장치(예컨대, 모세관 피펫)로부터 영양소 및/또는 산소가 세포로 공급될 수 있도록 하는 허용하는 제2 형상화 장치(예컨대, 몰드)로 수송된다. 영양소 및 산소가 세포로 공급될 수 있도록 하는 적합한 형상화 장치의 일례로는 복수 개의 다세포 응집물(예컨대, 실질적으로 동일한 다세포 응집물)의 제조를 위한 몰드가 있다. 추가의 일례로서, 상기 몰드로는 세포의 기관으로의 이동 및 내성장에 저항성이고, 세포의 기관에의 부착에 저항성인 물질로 제조된 생체적합성 기관을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 기관은 적합하게 테플론(Teflon)[®](PTFE), 스테인리스 스틸, 노보겔™, 아가로스, 폴리에틸렌 글리콜, 유리, 금속, 플라스틱, 또는 겔 물질(예컨대, 아가로스 또는 다른 하이드로겔), 및 유사 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 몰드는 또한 세포 페이스트로 (예컨대, 몰드의 상부 상으로 조직 배양 배지를 분배하여) 조직 배양 배지를 공급할 수 있도록 적합하게 구성된다.

[0179] 따라서, 제2 형상화 장치가 사용되는 실시양태에서, 부분적으로 부착된 및/또는 응집된 세포 페이스트는 제1 형상화 장치(예컨대, 모세관 피펫)에서 제2 형상화 장치(예컨대, 주형)로 수송된다. 추가 실시양태에서, 부분적으로 부착된 및/또는 응집된 세포 페이스트는 제1 형상화 장치(예컨대, 모세관 피펫)에 의해 몰드의 홈 내로 수송된다. 추가의 다른 실시양태에서, 세포 페이스트의 세포가 서로 추가 부착하고/거나 응집하여 다세포 응집물을 형성하도록 하는 제어식 환경에서 몰드가 내부에 유지된 세포 페이스트와 함께 인큐베이션되는 성숙화 기간 후, 세포의 응집은 생성된 다세포 응집물을 기구(예컨대, 모세관 피펫)로 채취될 수 있도록 허용할 정도로 충분히 강력할 것이다. 추가의 실시양태에서, 모세관 피펫은 적합하게는 다세포 응집물을 3차원의 구성물 내로 자동 배치하도록 작동가능한 바이오프린터 또는 유사한 장치의 프린팅 헤드의 일부이다.

[0180] 일부 실시양태에서, 다세포 응집물의 단면 형상 및 크기는 실질적으로 다세포 응집물을 제조하는 데 사용되는

제1 형상화 장치 및 임의적으로 제2 형상화 장치의 단면 형상 및 크기에 상응할 것이며, 당업자는 상기 논의된 단면 형상, 단면적, 직경, 및 길이를 가지는 다세포 응집물을 생성하는 데 적합한 단면 형상, 단면적, 직경, 및 길이를 가지는 적합한 형상화 장치를 선택할 수 있을 것이다.

[0181] **응집된 다세포 응집물의 지지체 상에의 배치**

[0182] 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하여 원하는 3차원적 구조를 제조하는 데 다수의 방법이 적합하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 서로 접촉하도록 수동으로 배치되거나, 피펫, 노즐, 또는 니들로부터 압출에 의해 적소에 침적되거나, 또는 자동 컴퓨터 지원 장치, 예컨대, 바이오프린터에 의해 배치된다.

[0183] 본원에 기술된 바와 같이, 다양한 실시양태에서, 다세포 응집물은 다수의 적합한 형상 및 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 비제한적인 일례로, 원형, 타원형, 사각형, 삼각형, 다각형, 및 불규칙형을 비롯한, 수개의 적합한 단면 형상들 중 임의의 것을 가지는 장형이다. 추가의 실시양태에서, 다세포 응집물은 장형이고, 실린더 형태이다. 일부 실시양태에서, 장형 다세포 응집물의 길이 및/또는 직경은 유사하다. 다른 실시양태에서, 장형 다세포 응집물의 길이 및/또는 직경은 상이하다. 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 실질적으로 구형이다. 일부 실시양태에서, 조작된 간 조직은 크기가 실질적으로 유사한 실질적으로 구형 다세포 응집물을 포함한다. 다른 실시양태에서, 조작된 간 조직은 크기가 상이한 실질적으로 구형 다세포 응집물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상이한 형상 및 크기의 조작된 간 조직은 다양한 형상 및 크기의 다세포 응집물을 배열함으로써 형성된다.

[0184] 일부 실시양태에서, 응집된 다세포 응집물은 지지체 상에 배치된다. 다양한 실시양태에서, 지지체는 임의의 적합한 생체적합성 표면이다. 추가의 다른 실시양태에서, 적합한 생체적합성 표면은 비제한적인 일례로 중합체 물질, 다공성 막, 플라스틱, 유리, 금속, 하이드로겔, 및 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지지체는 비제한적인 일례로, 하이드로겔, 단백질, 화학 물질, 펩티드, 항체, 성장 인자, 또는 그의 조합을 비롯한, 생체적합성 물질로 코팅된다. 한 실시양태에서, 지지체는 노보겔™로 코팅된다. 또 다른 실시양태에서, 지지체는 아가로스로 코팅된다. 한 실시양태에서, 응집된 다세포 응집물은 생체적합성 다중 웰 용기의 웰 내로 배치된다.

[0185] 일단 응집된 다세포 응집물 배치를 완료하고 나면, 일부 실시양태에서, 조직 배양 배지를 구성물 상부에 붓는다. 추가의 실시양태에서, 조직 배양 배지는 다세포체 사이 공간으로 진입하여 다세포체에서 세포를 지지한다.

[0186] **제1 유형의 세포 층 및/또는 제2 유형의 세포 층 적용**

[0187] 응집된 포유동물 세포 구성물의 하나 이상의 외부 표면 상에 하나 이상의 세포 층을 적용시키는 데 다수의 방법이 적합하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포 층을 적용시키는 것은 상기 응집된 다세포 응집물의 하나 이상의 표면을 세포의 현탁액, 시트, 단층, 또는 융합된 응집물로 코팅하는 것을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 응집된 포유동물 세포 구성물의 1, 2, 3, 4개 이상의 표면이 코팅된다.

[0188] 일부 실시양태에서, 세포 층을 적용시키는 것은 융합된 다세포 응집물의 추가 층을 바이오프린트하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 세포 층을 적용시키는 것은 세포의 용액, 현탁액, 또는 액체 농축물을 바이오프린팅, 분무, 또는 잉크 젯팅하는 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 적합한 세포 현탁액은 약 1×10^4 내지 약 1×10^6 개의 세포/ μL 를 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 적합한 세포 현탁액은 약 1×10^5 내지 약 1.5×10^5 개의 세포/ μL 를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 세포 층을 적용시키는 것은 공간적으로 분포된 소적으로서 응집된 포유동물 세포 구성물의 하나 이상의 표면 상에 직접 세포의 현탁액을 분배하는 것을 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서, 세포 층을 적용시키는 것은 스프레이로서 응집된 포유동물 세포 구성물의 하나 이상의 표면 상에 직접 세포의 현탁액을 분배하는 것을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 세포의 층은 구성 공정에서 임의의 적합한 시점에 적용된다. 일부 실시양태에서, 세포의 하나 이상의 층은 바이오프린팅 직후(예컨대, 최대 10분) 응집된 포유동물 세포 구성물의 하나 이상의 외부 표면 상에 적용된다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 층은 바이오프린팅 후(예컨대, 10분 후) 적용된다. 추가의 다른 실시양태에서, 하나 이상의 층은 구성물의 성숙화 동안에 적용된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 본 방법은 지지체 상에서 세포 층을 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태에서, 일부 경우에서, 세포 층을 적용시키는 것은 조작된 간 조직 구성물의 하나 이상의 표면을 확립된 배양물과 직접 접촉하도록 배재하는 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 구성물은 세포의 배양된 층 또는 세포의 단층 상에 직접 바이오프린트된다. 생체적합성 지지체 상의 임의 유형의 배양된 세포 층이 적합하다. 일부 실시양태에서,

다세포성 응집물은 내피 세포 층 상에 바이오프린팅된다. 다른 실시양태에서, 다세포 응집물은 비실질 세포 층 상에 바이오프린팅된다. 추가의 실시양태에서, 세포 층은 바이오프린트된 구성물의 다세포 응집물과 부착하고/거나 응집한다. 일부 실시양태에서, 다층 구조의 각 층은 바이오프린트된 것이다. 추가의 실시양태에서, 개별 층은 응집된 세포 응집물, 세포 페이스트, 압출 화합물(들) 또는 다른 첨가제와 조합된 세포 페이스트, 세포 단층, 및 세포 시트를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 형태의 바이오 잉크를 포함한다.

[0190] **구획화된 조직을 제작하는 데 사용되는 공동 프린트된 몰드**

[0191] 일부 실시양태에서, 본 방법은 비실질 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 실질 세포, 예컨대, 간세포 또는 간세포 유사 세포를 포함하는 하나 이상의 바이오 잉크를 제조하는 단계; 바이오 잉크를 지지체 상에 침적시키는 단계; 및 침적된 바이오 잉크를 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 1 이상의 구획을 포함하는 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성하는 단계로서, 상기 구획은 비실질 세포를 포함하는 경계에 의해 한정되는, 실질 세포를 포함하는 내부를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0192] 일부 실시양태에서, 본 방법은 포유동물 간 세포를 포함하는 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 제조하는 단계; 하나 이상의 응집된 다세포 응집물을 지지체 상에 배치하여 1 이상의 층은 복수 개의 세포 유형을 포함하고, 세포 유형은 서로에 대해 공간적으로 배열되어 평면 기하학적 구조를 형성하는 것인 1 이상의 층; 및 1 이상의 층은 1 이상의 다른 층과 조성상 또는 구조상 상이하며, 이로써 판상 기하학적 구조를 생성하는 것인 복수 개의 층 중 적어도 하나를 형성하는 단계; 및 상기 하나 이상의 다세포 응집물을 약 1시간 내지 약 30일의 지속 기간 동안 인큐베이션시켜 그가 응집되고, 살아 있는, 3차원의 간 조직 구성물을 형성할 수 있게 하는 단계를 포함한다.

[0193] 도 2를 참조하면, 특정 실시양태에서, 헤파RG 세포를 함유하는 간 구성물을 바이오프린트하고, 성숙화시키고, 생화학적으로 특징을 규명하였다. 첫째로, 치수가 4 mm X 4 mm X 1 mm인 주변 박스를 내피 세포 및 간 성상을 함유하는 바이오 잉크로 프린트하였다. 둘째로, HepRG 세포를 주변 박스 중심부에 침적시켰다. 이어서, 37℃에서 96시간 동안 성숙화시켰다. 셋째로, 프린트 후 20시간째 바이오프린트된 구성물의 용해를 관찰하였다. 상기 실시양태에서, 바이오프린트된 간 구성물은 96시간째에 알부민 및 콜레스테롤을 생산하는 데 있어 대사적으로 활성을 띠었다.

[0194] 도 3을 참조하면, 특정 실시양태에서, 간 구성물은 비실질 세포로 된 경계 및 각각은 압출 화합물로 제조된 실질 세포로 된 필(fill)로 바이오프린트된다.

[0195] 도 4를 참조하면, 특정 실시양태에서, 간 구성물은 내피 세포 및 간 성상을 포함하는 경계, 일차 간세포를 포함하는 필, 및 필 내에 내피 세포 및 간 성상을 포함하는 공간적으로 분산되어 있는 회전 타원체로서 도입된 제3 조성 성분으로 바이오프린트된다.

[0196] 도 5를 참조하면, 특정 실시양태에서, 간 구성물은 세포를 함유하지 않고, 수성 매질(예컨대, PF-127) 중에 용해된 물질로부터 제작된 공동 몰드로 바이오프린트되고, 이로써 오직 필만이 남게 되고, 네거티브 스페이스가 확립된다.

[0197] 도 6을 참조하면, 특정 실시양태에서, 간 구성물은 수용성 압출 화합물(예컨대, PF-127)에 캡슐화된 다중 간 세포 유형으로 구성된 바이오 잉크를 사용하여 연속 침적 기법을 이용함으로써 바이오프린트되고, 이로써 모자이크식 기능적 단위의 패턴을 형성한다.

[0198] 도 8을 참조하면, 특정 실시양태에서, 구획화된 간 구성물은 다세포 응집물을 육각형으로 형상화하는 데 사용되는 세포를 함유하지 않는 공동 프린트된 몰드로 바이오프린트된다. 본 실시양태에서, 비세포 물질은 사용 시점에 제거되어 스캐폴드가 없는 조직을 얻게 된다.

[0199] 도 10을 참조하면, 특정 실시양태에서, 구획화된 간 구성물은 HepG2 세포로 충전된 경계로서 사용되는 공동 몰드로 바이오프린트된다.

[0200] 도 11을 참조하면, 특정 실시양태에서, 세포를 함유하는 공동 프린트된 몰드는 실질 세포가 필로서 사용된, 이 경우, HepG2 세포가 경계로서 바이오프린트된다.

[0201] 도 12를 참조하면, 특정 실시양태에서, 구획화된 간 구성물은 비실질 경계 및 실질 필을 사용하여 바이오프린트되고, 이로써 고도한 조직 유사 밀도를 얻게 된다.

[0202] **다세포 응집물 인큐베이션**

- [0203] 일부 실시양태에서, 다세포 응집물을 인큐베이션시킨다. 추가의 실시양태에서, 인큐베이션을 통해 다세포 응집물은 부착 및/또는 응집되고, 이로써 조직, 예컨대, 간 조직이 형성된다. 일부 실시양태에서, 다세포 응집물은 응집되어 세포 배양 환경(예컨대, 페트리 디쉬, 세포 배양 플라스크, 생체반응기 등)에서 조직을 형성한다. 추가의 실시양태에서, 다세포 응집물은 응집되어 다세포 응집물에 포함된 세포 유형의 성장을 촉진시키는 데 적합한 조건을 포함하는 환경에서 조직을 형성한다. 하나의 실시양태에서, 다세포 응집물은 부착 및/또는 응집을 촉진하는 인자들 및/또는 이온들을 함유하는 세포 배양 배지의 존재하에 약 5% CO₂를 함유하는 습윤화된 대기 중 약 37℃에서 인큐베이션된다. 다른 실시양태에서, 다세포 응집물은 0.1% 내지 21% O₂를 함유하는 환경에서 유지된다.
- [0204] 다양한 실시양태에서, 인큐베이션은 임의의 적합한 지속 기간을 가진다. 추가의 다양한 실시양태에서, 인큐베이션은 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180분 이상(그 안의 증분을 포함)의 지속 기간을 가진다. 추가의 다양한 실시양태에서, 인큐베이션은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48시간 이상(그 안의 증분을 포함)의 지속 기간을 가진다. 추가의 다양한 실시양태에서, 인큐베이션은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20일 이상(그 안의 증분을 포함)의 지속 기간을 가진다. 비제한적인 일례로, 세포 유형, 세포 유형 비, 배양 조건, 및 첨가제, 예컨대, 성장 인자의 존재를 비롯한, 수개의 인자는 다세포 응집물을 응집시켜 조직을 형성하는 데 소요되는 시간에 영향을 미친다.
- [0205] **조작된 조직의 생존능을 증가시키는 추가의 단계**
- [0206] 일부 실시양태에서, 본 방법은 조작된 조직의 생존능을 증가시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 단계는 구속 물질의 임시 또는 반영구적 격자를 통해 조직과 영양소 배지 사이의 직접적인 접촉을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직은 다공성 또는 겹화 물질에 구속된다. 조작된 조직의 세포 중 적어도 일부의 영양소에의 직접적인 접근은 조작된 조직의 생존능을 증가시킨다.
- [0207] 추가의 실시양태에서, 조작된 조직의 생존능을 증가시키기 위한 추가적인 및 임의적인 단계는 1) 임의적으로 응집된 다세포 응집물을 배치하기 이전에 구속 물질의 기체층을 분배하고; 2) 임의적으로 구속 물질의 주변을 분배하고; 3) 정의된 기하학적 구조 내에 조직의 세포를 바이오프린트하고; 4) 구속 물질에 겹을 도입하는 패턴으로, 예컨대, 격자, 메쉬, 또는 그리드로 초기 조직을 오버레이하여 구속 물질의 장형인 본체(예컨대, 실린더, 리본들 등)들을 분배하는 것을 포함한다.
- [0208] 다수의 구속 물질이 본원에 기술된 방법에서 사용하는 데 적합하다. 일부 실시양태에서, 하이드로겔은 비부착성, 생체적합성, 압축가능, 바이오프린트 가능, 비세포성, 적합한 강도 보유, 및 수성 조건에서의 비가용성인 것을 비롯한, 하나 이상의 이로운 특성을 가지는 예시적인 구속 물질이다. 일부 실시양태에서, 적합한 하이드로겔은 천연 중합체들이다. 한 실시양태에서, 구속 물질은 노보겔™로 구성된다. 추가의 실시양태에서, 적합한 하이드로겔로는 계면활성제 폴리올로부터 유도된 것, 예컨대, 플루로닉 F-127, 콜라겐, 하이알루로네이트, 피브린, 알기네이트, 아가로스, 키토산, 그의 유도체 또는 조합을 포함한다. 다른 실시양태에서, 적합한 하이드로겔은 합성 중합체이다. 추가의 실시양태에서, 적합한 하이드로겔로는 폴리(아크릴산) 및 그의 유도체, 폴리(에틸렌 옥사이드) 및 그의 공중합체, 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파젠, 및 그의 조합으로부터 유도된 것을 포함한다. 다양한 구체적인 실시양태에서, 구속 물질은 하이드로겔, 노보겔™, 아가로스, 알기네이트, 젤라틴, 매트릭스 겔™, 하이알루로난, 폴록사머, 펩티드 하이드로겔, 폴리(이소프로필 n-폴리아크릴아미드), 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(PEG-DA), 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 폴리디메틸실록산, 폴리아크릴아미드, 폴리(락트산), 실리콘, 실크, 및 그의 조합으로부터 선택된다.
- [0209] 일부 실시양태에서, 패턴을 오버레이하는 겹은 조직의 표면 주위에 균일하게 또는 실질적으로 균일하게 분포된다. 다른 실시양태에서, 겹은 비균일하게 분포되며, 여기서, 조직의 세포는 영양소에 비균일하게 노출된다. 비균일한 실시양태에서, 영양소에의 차별적인 접근은 임의적으로 조직의 하나 이상의 특성에 영향을 미치는데 이용된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 바이오프린트된 조직의 한 표면의 세포가 바이오프린트된 조직의 또 다른 표면의 세포보다 더 빠르게 증식하는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 조직의 다양한 부분의 영양소에의 노출은 원하는 종점으로서의 조직 발생에 영향을 미치도록 다양한 시점에 변화된다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 구속 물질은 바이오프린팅 직후(예컨대, 10분 이내), 바이오프린팅 후(예컨대, 10분 후), 세포가 실질적으로 서로 응집되기 이전에, 세포가 실질적으로 서로 응집된 이후에, 세포가 세포외 기질을 생산하기 이전에, 세포가 세포외 기질을 생산한 이후에, 사용 직전 등인 시점을 포함하나, 이에

한정되지 않는, 임의의 적합한 시점에 제거된다. 다양한 실시양태에서, 구속 물질은 임의의 적합한 방법에 의해 제거된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 구속 물질은 절제되거나, 세포에서 압출되거나, 분해되거나, 또는 용해된다.

[0211] 일부 실시양태에서, 본 방법은 조작된 간 조직을 하나 이상의 측면 상에서 유체 흐름에 의해 유발된 전단력, 교반, 또는 대류 재순환에 가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0212] 생물학적 특성

[0213] 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직은 인간 조직과 유사한 다세포 구조를 포함하였다. 천연 간 조직과 같이, 바이오프린트된 간 조직은 특정 구역에 풍부한 특정 세포 유형(예컨대, 간 성상 세포, 간세포, 내피 세포 등)을 포함함으로써 패턴화된 구획화된 구조를 수득하였다.

[0214] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직은 고도한 세포 밀도, 및 ECM, 지질, 및 글리코젠 생산을 비롯한, 천연 간의 중요한 특징을 포함한다. 도 21을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직의 세포 밀도는 30% 이상이다. 다양한 추가의 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직의 세포 밀도는 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이다. 다양한 추가의 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직의 세포 밀도는 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80% 또는 약 90%이다.

[0215] 일부 실시양태에서, 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 조직학적 특징, 예컨대, 밀착 연결부, 적어도 일부의 휴지 간 성상 세포의 유지, 및 미세혈관 구조의 발생을 포함한다. 일부 실시양태에서, 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 초기 제작을 훨씬 넘어 지속되는 구획화를 포함한다. 예를 들어, 추가의 실시양태에서, 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 7일 이상, 10일 이상, 20일 이상, 30일 이상, 또는 40일 이상 동안 지속되는 구획화를 포함한다. 다양한 추가의 실시양태에서, 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 약 7일, 약 10일, 약 20일, 약 30일, 또는 약 40일 동안 지속되는 구획화를 포함한다.

[0216] 일부 실시양태에서, 제작 후, 비실질 "간질"로 둘러싸인 간 세포의 영역을 확인할 수 있다. 도 22를 참조할 수 있다. 예상 밖으로, 바이오프린트된 간 조직은 소엽 유형의 구조로의 뚜렷한 자기 조직화를 보였고, 이는 천연 간과 매우 유사한 모방성을 띠었다. 관찰된 구조는 40+일 동안 기능 및 생존능을 유지시키고, 이로써 장기간의 검사, 예컨대, 저용량, 반복 노출 및 만성 병적 상태에 대한 검사가 가능할 수 있다.

[0217] 일부 실시양태에서, 간 특이 기능은 본원에 기술된 3차원의 바이오프린트된 간 조직에서 7, 10, 20, 30, 또는 40일 초과 기간 동안 지속된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트된 간 조직은 전통적인 2차원적인 기술에서 일차 간세포에 대한 공개된 시간적 추이를 훨씬 넘어, 6주(42일)까지 알부민을 계속해서 생산하는 것으로 나타났다. 도 23을 참조할 수 있다. 바이오프린트된 간 조직은 또한 예컨대, 콜레스테롤과 같은 다른 간세포 인자도 지속적으로 생산하는 것으로 나타났다. 도 23을 참조할 수 있다.

[0218] 3차원의 프린트된 인간 간 조직은 현 2차원적인 방법에서는 달성되지 못하는, 트랜스페린 및 피브리노겐을 비롯한, 추가의 관련 대사산물을 생산하는 것으로 나타났다. 도 24를 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 3차원의 프린트된 인간 간은 또한 담소관 형성의 마커를 보인다. 도 25를 참조할 수 있다.

[0219] 수일 경과 후 그 기능을 상실하는 2차원적인 일차 간세포와 달리, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바이오프린트 3차원의 간 조직 구성물은 활성 CYP3A4 효소를 지속적으로 유도할 수 있는 것으로 보이며, 여기서, 상기 유도가능성은 베라파밀에 의해 억제된다. 도 26을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 디클로페낙, 트로바플록사신, 및 메토타렉세이트를 비롯한, 공지된 간 독물에 대하여 천연 유사 반응을 보인다. 도 27-29를 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 생리학상 관련된 분자, 예컨대, 비타민 D에 대하여 천연 유사 반응을 보인다. 도 30을 참조할 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 3차원의 인간 간 조직은 실질 영역(간세포) 및 비실질 영역(내피 세포(EC: endothelial cell) 및 간 성상 세포(hSC: hepatic stellate cell))으로 패턴화된다. 추가의 실시양태에서, 일차 간세포에 대한 대안으로서, 패턴화되는 3차원의 간 조직으로는 iPSC 유래 간세포 유사 세포(iPSC-HC)(예컨대, i셀 헤파토사이트스(iCell Hepatocytes)), 셀룰라 다이내믹스 인크.(Cellular Dynamics Inc.))를 포함한다. iPSC를 사용함으로써 환자 및/또는 질환 특이 시험관내 시스템을 개발할 수 있고, 단리 또는 증식이 어려운 세포를 생성하는 수단을 제공할 수 있다.

- [0221] **실시예**
- [0222] 하기의 구체적인 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 어느 방식으로든 본 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0223] **실시예 1 - 연속 침적 및 모자이크식 기능적 단위 구조를 이용하여 바이오프린트된 간 조직**
- [0224] 조작된 간 조직을 연속 침적 기전을 이용하여 노보젠 MMX 바이오프린터(NovoGen MMX Bioprinter)TM(오르가노보 인크.(Organovo, Inc.: 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 이용하여 바이오프린트하였다. 간 조직의 3차원의 구조는 반복형 기능적 단위, 이 경우, 육각형인 것에 기초하였다. 바이오 잉크는 압출 화합물(계면활성제 폴리올 - PF-127)에 캡슐화된 간 정상 세포 및 내피 세포로 구성되었다.
- [0225] 30% PF-127 제조
- [0226] PBS를 사용하여 30% PF-127 용액(w/w)을 제조하였다. 4℃로 유지된 자기 교반 플레이트를 사용하여 빙냉 PBS와 PF-127 분말을 혼합하였다. 대략 48시간 경과 후 완전히 용해되었다.
- [0227] 세포 제조 및 바이오프린팅
- [0228] 원심분리 후 3개의 세포 농도: 50×10^6 개의 세포/ml, 100×10^6 개의 세포/ml, 및 200×10^6 개의 세포/mL를 달성하기 위해 82% 정상 세포(SC: stellate cell) 및 18% 인간 대동맥 내피 세포(HAEC: human aortic endothelial cell) 및 인간 성체 진피 섬유아세포(HDFa: human adult dermal fibroblast)로 구성된 세포 현탁액을 15 mL 튜브로 분리시켰다. 각 세포 펠릿을 30% PF-127 중에 재현탁시키고, 바이오프린터를 이용하여 3 cc 저장소 내로 흡입시켰다. $510 \mu\text{m}$ 분배 팁을 이용하여 캡슐화된 세포를 PDMS 기반 플레이트 상에 단일 육각형(도 6A 참조) 또는 육각형 모자이크 구조(도 6B 참조)로 바이오프린트하였다. 각 구성물에 대략 $200 \mu\text{L}$ 의 배지를 넣고, 이를 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켜 구성물의 완전성을 평가하였다.
- [0229] 다층 바이오프린팅
- [0230] 육각형 모자이크 실험에 있어서, 최대 (4)개의 후속 층들을 바이오프린트하여 더 많은 세포 물질이 존재하는 더 긴 구조를 생성하였다. 제작 후, 각각의 구성물에 처음에는 대략 $200 \mu\text{L}$ 의 완전 배지를 넣고, 구성물의 완전성을 평가하였다. 구성물을 실온에서 20분 동안 인큐베이션시킨 후, 20 mL의 완전 배지 중에 침지시켰다.
- [0231] 결과
- [0232] 10% 우태아 혈청이 함유된 성장 배지(PF127이 용해된 것) 중에서 18시간 배양한 후, 바이오프린트 기하학적 구조 내에 함유된 세포는 원 디자인의 기하학적 구조의 패턴화를 유지하는 온전한 인접 조직 시트를 생성하기 충분하게 서로 응집되었다(도 6d 참조). 10% 중성 완충처리된 포르말린에 고정시킨 이후의 모자이크식 구성물의 단일 세그먼트의 H&E 염색은 도 7에 제시되어 있다. 세포는 생존가능하고, 온전하며, 그의 원래 프린트된 기하학적 구조에 구속되는 것으로 나타났다.
- [0233] **실시예 2 - 가압식 적층(forced layering)**
- [0234] 세포 집단(균질 또는 비균질)을 바이오프린팅을 위해 플루로닉 F-127(루트볼, BASF) 중 세포 현탁액으로서 또는 실린더형 바이오 잉크로서 제조하였다. 간략하면, 바이오 잉크 제조를 위해, 제조용 인간 트립신($75 \mu\text{g/mL}$, 로슈(Roche)) 또는 0.05% 트립신(인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 표준 조직 배양 플라스틱으로부터 세포를 유리시켰다. 효소 유리 후, 세포를 세척하고, 수집하고, 계수하고, 원하는 비(즉, 50:50 간 정상 세포(hSC):내피 세포(EC))로 조합하고, 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 이어서, 세포 펠릿으로부터 상청액을 제거하고, 세포 혼합물을 원하는 직경의, 전형적으로, 내경이 $500 \mu\text{m}$ 내지 $250 \mu\text{m}$ 인 유리 미세모세관 내로 흡입시켰다. 이어서, 상기 실린더형 세포 시료를 바이오 잉크의 성숙화를 위해 채널이 있는 비세포 부착성 하이드로겔 물질로부터 생성된 몰드 내로 압출시켰다. 이어서, 생성된 바이오 잉크 실린더를 실험적으로 결정된 시간, 전형적으로 2 내지 24시간 동안 완전 세포 배양 배지 중에서 배양하였다.
- [0235] 간략하면, 하이드로겔 세포 현탁액 제조를 위해, 본원에 기술된 효소 매개 프로토콜 중 어느 것을 사용하여 세포를 표준 세포 배양 베셀로부터 유리시켰다. 이어서, 유리된 세포를 혈청 함유 배지로 세척하고, 수집하고, 계수하고, 원심분리하여 조밀한 세포 펠릿을 형성하였다. 생성된 세포 펠릿으로부터 상청액을 제거한 후, 세포를 50 내지 200×10^6 개의 세포/mL(10 내지 300×10^6 개의 세포/mL 범위) 농도로 냉 PF-127(4℃)에 재현탁시켰다. 이어서, 노보젠 MMX 바이오프린터TM(오르가노보 인크., 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 이용하여 상기 세포 현

탁액을 시린지 내로 흡인시켰다.

[0236] 바이오프린터를 이용하여 가압식 세포 패턴화, 적층 또는 연신시켜 조직 구성물을 제작하였다. 실린더형 바이오 잉크, 수용성 겔 중 세포 현탁액, 또는 그의 조합을 이용하여 3차원의 조직 구성물의 바이오프린팅을 수행하였다. 정의된 세포 패턴화 또는 적층을 달성하기 위해, 관련된 세포 집단의 조합을 바이오 잉크 또는 세포 현탁액 시료에 포함시킨 후, 세포 용액을 지지하는 겔 물질이 용해되어 침적된 바이오 잉크 주변에 정의된 세포 적층을 이룰 수 있도록 하는 방식으로 바이오프린트하였다(도 13 참조). 세포 패턴화, 조직화, 또는 적층은 정의된 별개의 세포 집단(예컨대, hSC 및 EC)을 이용하고 혼입함으로써 바이오프린트된 조직 내의 세포 및 세포 구조의 예측가능하고, 반복가능한 조직화를 이룸으로써 달성하였다(도 14 참조).

[0237] 일부 실험에서, 성숙화 또는 배양 기간 이후 바이오프린트 신생 조직 내의 최종 세포 조직화가 관찰되었다. 구성물을 표준 실험실용 인큐베이터(37℃, 5% CO₂로 보충된 습윤화된 챔버)에 유지시키고, 시간 경과에 따라 평가하였다.

[0238] 결과

[0239] 바이오프린팅을 사용하여 세포 패턴화, 적층, 또는 배열하였다. 비균질(즉, 다형) 세포 집단을 함유하는 바이오 잉크로 바이오프린트함으로써, 또는 고밀도 세포 겔 또는 세포 현탁액과 바이오 잉크(균질 또는 비균질 세포 집단)를 조합함으로써 별개의 세포 조직화를 관찰하였다. 습윤화된 챔버(인큐베이터)에서 상기 신생 조직 구성물을 성숙화시킴으로써 상기 바이오프린트 신생 조직에서의 별개의 세포 배열, 조직화 및/또는 격리를 추가로 확립시켰다.

[0240] 예를 들어, HepG2 세포를 포함하는 바이오프린트 바이오 잉크의 상부 상에의 EC:hSC가 가득한 PF-127의 바이오프린팅을 통해 별개의 세포 집단을 포함하고, 분별성 조직 형태를 가지는 구성물의 별개의 층이 확립되었다. hSC 및 EC를 함유하는 바이오 잉크 구성물의 경우, 완전 배지 중에서 3일 초과 기간 동안 성숙화시킨 바이오프린트된 구성물은 주변부에 별개의 EC 층, 및 구성물 코어 내에 조직화된 미세혈관망을 함유하는 것으로 나타났다. 그 위에 고도로 진한 EC 용액이 바이오프린트된 혈관 평활근 세포의 균질성(즉, 단형) 집단을 포함하는 바이오 잉크로 제작된 바이오프린트된 구성물은 구성물의 주변부에 별개의 EC 층을 함유하는 것으로 나타났다.

[0241] **실시예 3 - 다중 웰 플레이트**

[0242] 임의적으로 압출 화합물을 함유하는, 실린더형 바이오 잉크 응집물, 세포 응집물의 현탁액, 또는 세포 현탁액/페이스트를 비롯한, 다양한 바이오 잉크 포맷을 사용하여 바이오프린트하기 위해 세포 집단(균질 또는 비균질)을 제조하였다. 간략하면, 실린더형 바이오 잉크를 제조하기 위해, 제조용 인간 트립신(75 µg/mL, 로슈) 또는 0.05% 트립신(인비트로젠)을 사용하여 표준 조직 배양 플라스틱으로부터 세포를 유리시켰다. 효소를 유리시킨 후, 세포를 세척하고, 수집하고, 계수하고, 원하는 비(즉, 50:50 간 성상 세포(hSC): 내피 세포(EC))로 조합하고, 원심분리하여 펠릿화하였다. 세포 펠릿으로부터 상청액을 제거한 후, 세포 혼합물을 원하는 직경의, 전형적으로, 내경이 500 µm 내지 250 µm인 유리 미세모세관 내로 흡인시켰다. 이어서, 상기 실린더형 세포 시료를 바이오 잉크의 성숙화를 위해 채널이 있는 비세포 부착성 하이드로겔 물질로부터 생성된 몰드 내로 압출시켰다. 이어서, 생성된 바이오 잉크 실린더를 실험적으로 결정된 시간, 전형적으로 2 내지 24시간 동안 완전 세포 배양 배지 중에서 배양하였다.

[0243] 세포 응집물의 세포 현탁액 또는 세포 페이스트 제조를 위해, 본원에 기술된 세포 증식 및 유리 프로토콜에 따라 수행하였다. 세포 펠릿 생성시, 상청액을 펠릿으로부터 제거하고, 펠릿을 시판용 침적 시린지로 옮겨 놓았다. 이어서, 세포 응집물 용액 또는 페이스트를 다중 웰 플레이트에 직접 바이오프린트하기 위해 상기 시린지를 바이오프린터 침적 헤드에 탑재시켰다.

[0244] 이어서, 복제 조직 구성물을 다중 웰 조직 배양 플레이트의 웰(예컨대, 6 웰 또는 24 웰) 내에, 또는 다중 웰 세포 배양 인서트(즉, 트랜스웰(Transwell), BD) 내에 바이오프린트한 후, 적절한 다중 웰 플레이트 내에 배치하였다. 바이오프린팅 후, 3차원의 구성물을 일정 기간, 전형적으로 3 내지 14일 동안 관련 배지를 이용하여 성숙화/조절하였다. 성숙화 후, 구성물을 수거하고, 고정시키고, 통상의 조직학적 및 면역조직학적 화학법으로 프로세싱하였다.

[0245] 결과

[0246] 바이오프린트된 조직을 다중 웰 배양 플레이트 내에서 성공적으로 제작하거나, 또는 다중 웰 배양 인서트 내에서 성공적으로 제작한 후, 다중 웰 플레이트 내로 삽입시켰다. 상기 접근법을 통해 임의적으로 배양도고, 처리

하여 동일하거나, 또는 독특한 배양 조건을 생성하는 복제 바이오프린트된 조직을 생성할 수 있다. 상기 접근법을 통해 바이오프린팅 공정 처리량 및 동일 세대달 유의적으로 증가시킬 수 있다(도 16 참조).

[0247] **실시예 4 - 바이오프린트된 신생 조직의 자극**

[0248] 관련된 비균질(즉, 다형) 세포 집단을 포함하는 실린더형 바이오 잉크를 제조하였다. 생리학상 관련된 세포 집단(예컨대, 간 정상 세포(hSC) 및 인간 대동맥 내피 세포(EC))을 특정 비로 조합하여 적절한 바이오 잉크를 생성하였다. 세포를 유지시키고, 표준 실험실 조건하에서 증식시키고, 세포를 세포와 같은 업체로부터 구입한 배지 중, 또는 전형적으로 주요 문헌상에 특정 세포 유형에 대하여 표준 세포 배양을 실행하는 데 도움이 되는 것으로 발견되는 성분을 포함하는 배지 중에서 배양하였다. 바이오 잉크 제조를 위한 세포 프로세싱은 하기와 같았다: 간략하면, 양이온 무함유 포스페이트 완충처리된 염수(PBS)로 세척하여 표준 조직 배양 플라스틱으로부터 세포를 유리시킨 후, 0.1-0.05% 트립신(인비트로젠)에 노출시켰다. 이어서, 유리된 세포를 혈청 함유 배지 중에서 세척하고, 수집하고, 계수하고, 수행되는 자극 검정법 또는 실험에 적절한 비로 조합하고, 원심분리하여 펠릿화하였다. 이어서, 상청액을 제거하고, 세포 펠릿을 유리 미세모세관 내로 흡인시킨 후, 대략 15 내지 20분 동안 완전 배지 중에 침지시켰다. 이어서, 상기 실린더형 바이오 잉크 구조를, 선형 채널을 포함하는 세포 비부착성 하이드로겔 몰드 내로 압출시키고, 2 내지 18시간 동안 유지시켰다. 이어서, hSC:EC를 함유하는 실린더형 바이오 잉크를 사용하여 바이오프린트된 조직 구성물을 펠릿화하고, 습윤화된 챔버 중에서 유지시키고/거나, 성숙화시켰다. 조직 세그먼트를 1.25 mm x 8 mm x 0.25 mm(W x L x H)의 초기 크기로 제작하였다. 바이오프린팅 후, 성숙화 기간 동안 일부 구성물을 사이토카인 TGF- β 1에 노출시켜 조직 특이 반응을 유도하였다(도 15 참조).

[0249] 상부 표면으로 제한되는 균질(즉, 단형) 세포 층을 필요로 하는 조직 구성물의 경우, 관련된 세포 유형을 함유하는 제2 세포 시료를 사용하였다. 전형적으로, 혈관 내피 세포 또는 소형 기도 상피 세포(각각 혈관벽 및 인간 폐 조직 모델을 위해)를 고도로 진한 세포 현탁액으로 제조하였다. 간략하면, 세포를 상기 기술된 바와 같이 유리시키고, 수집하고, 계수하고, 원심분리하여 펠릿화하였다. 상청액을 제거하고, 세포 펠릿을 소량의 완전 배지 중에 재현탁시켜 1×10^5 개의 세포/ μ l의 고도로 진한 세포 펠릿을 수득하였다. 이어서, 상기 세포 현탁액을 사용시까지 4°C에서 보관하였다.

[0250] 이어서, 혈청 함유 완전 세포 배양 배지 중에 바이오프린트된 신생 조직을 침지시키고, 성숙화를 위해 5% CO₂로 보충된 표준 습윤화된 챔버에 배치하였다. 이어서, 바이오프린트된 신생 조직을 배양하고, 미리 결정된 기간 동안 관련된 사이토카인(들)으로 자극시키고, 포르말린으로 고정시키고, 수거하고, 표준 조직학적 및 면역조직학적 화학법을 위해 프로세싱하였다. 예컨대, 조직 형태, 세포 조직화, 세포의 기질 생산, 세포 증식, 세포 생존능, 및 구성물 완전성을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 특징에 대하여 바이오프린트된 조직을 평가하였다.

[0251] 배양 배지에 직접 사이토카인을 첨가하고, 첨가된 단백질과 함께 바이오프린트된 조직을 인큐베이션시켜 적절한 자극에 직접적으로 장기간 동안 세포를 접근시킴으로써 사이토카인 자극을 수행하였다. 실험상 사이토카인의 ED50에 의존하여 전형적으로 0.1 내지 100 ng/mL 범위의 용량으로 용량 반응 실험을 수행하였다. 48시간 초과 기간 동안에 걸쳐 수행된 사이토카인 자극 실험을 위해, 매 48시간마다 배지를 교체하고, 새 사이토카인을 첨가하였다.

[0252] 결과

[0253] 앞서 2차원적인 시험관내 시스템에서 세포 반응을 유도하는 것으로 입증된 사이토카인을 이용하여 생리학상 관련된 세포 집단을 함유하는 바이오프린트된 신생 조직을 성공적으로 자극시켰다. 본 바이오프린트된 3차원의 조직 구성물에서 관찰된 반응은 용량 의존적이고, 바이오프린트된 구성물 내의 세포에 독특한 것으로 관찰되었다(도 15 참조).

[0254] **실시예 5 - 연속 침적을 이용한 공동 몰딩된 기능성 간 조직 미세구조의 바이오프린팅**

[0255] 30% PF-127 제조

[0256] PBS를 사용하여 30% PF-127 용액(w/w)을 제조하였다. 4°C로 유지된 자기 교반 플레이트를 사용하여 빙냉 PBS와 PF-127 분말을 혼합하였다. 대략 48시간 경과 후 완전히 용해되었다.

[0257] 세포 제조 및 몰드 및 필의 공동 프рин팅

[0258] 바이오프린터를 이용하여 3 mL의 PF-127 용액을 3 cc 저장소 내로 흡인시키고, 510 μ m 분배 팁을 이용하여 30%

PF-127 용액을 6 웰 트랜스웰 상에 단일 육각형 형상으로 바이오프린트하고, 연속하여 6회에 걸쳐 적층시켰다.

[0259] 7.8×10^7 개의 간 세포(HepG2)로 구성된 세포 현탁액을 1,000 g로 6분 동안 원심분리하여 세포 페이스트를 생성하였다. $5 \mu\text{L}$ 의 세포 페이스트를 $510 \mu\text{m}$ 니들을 통해 압출시켜 각각의 삼각형 몰드를 충전시켰다(도 5a 참조). 육각형 몰드를 실온에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 3 mL의 배지(10% FBS 및 1 X 페니실린, 스트렙토마이신, 및 암포테리신 B로 보충된 DMEM)를 상기와 같이 유지된 트랜스웰을 이용하여 웰에 첨가한 후, 37°C 및 5% CO_2 에서 인큐베이션시켰다. 45분 이내에 PF-127 몰드는 배지 내로 용해되었고, 몰딩된 간 바이오 잉크는 무손상 상태 그대로 유지되어 세포 및 빈 공간으로 이루어진 평면 기하학적 구조가 형성되었다(도 5b 참조). 배지로부터 남은 PF-127을 제거하기 위해, 트랜스웰을 3 mL의 배지를 함유하는 새 웰로 옮기고, 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 과정을 총 9 mL의 전체 배지 교환을 위해 6시간에 걸쳐 추가로 2회 반복하였다.

[0260] 6시간 후, 트랜스웰을 배지를 함유하지 않는 새 웰로 옮기고, 90%의 인간 대동맥 내피 세포 및 10%의 간 성상 세포인 비로 2×10^6 개의 세포로 이루어진 세포 현탁액을 분배하여, PF-127 몰드 용해에 의해 형성된 빈 공간을 충전시켰다. 간 구성물을 실온에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 5분 동안 인큐베이션시킨 후, 4 mL의 배지는 85%의 배지(10% FBS 및 1 X 페니실린, 스트렙토마이신, 및 암포테리신 B로 보충된 DMEM, 간 및 성상 세포 유지를 위해) 대 15%의 M199(2% LSGS, 10% FBS, HEPES 및 1 X 페니실린, 스트렙토마이신, 및 암포테리신 B로 보충된 것, 인간 대동맥 내피 세포 유지를 위해)의 비로 함유하였다. 구성물을 37°C 및 5% CO_2 에서 48시간 동안 인큐베이션시켜 개재 내피 세포 포함 조직을 포함하는 간 실질의 소엽성(삼각형) 배열을 포함하는 평면 기하학적 구조를 가지는 인접한 구성물을 형성하였다.

[0261] 실시예 6 - 기능성 간 조직의 바이오프린팅 및 특징 규명

[0262] 세포 배양

[0263] 냉동보존된 일차 인간 간세포(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 제조사의 프로토콜에 따라 정제하고, 페니실린 100 I.U./mL, 스트렙토마이신 $0.25 \mu\text{g/mL}$, 및 암포테리신 $85 \mu\text{g/mL}$ (1XP/S/A)(라이프 테크놀로지스)로 보충된 hepatocyte maintenance media(라이프 테크놀로지스) 중에서 인큐베이션시켰다. 하기 세포: 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC: human umbilical vein endothelial cell); 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson) 및 간 성상 세포(사이언셀(ScienCell))을 바이오프린트된 조직의 비실질 세포 성분으로 사용하고, 제조사의 설명서에 따라 증식시켰다. HUVEC를 EGM-2 배지(론자(Lonza)) 중에서 성장시키고, 간 성상은 10% FBS(라이프 테크놀로지스), 페니실린 100 I.U./mL, 스트렙토마이신 $0.25 \mu\text{g/mL}$, 및 암포테리신 $85 \mu\text{g/mL}$ (1XP/S/A; 코닝(Corning))으로 보충된 DMEM(코닝) 중에서 성장시켰다.

[0264] 유도 검정법에서 사용된 화학 물질

[0265] 하기 시약을 시그마(Sigma)로부터 구입하였다: 리팜피신, 디클로페낙, 베라파밀, 5-(및-6)-카복시-2',7' 디클로로 플루오레세인 디아세테이트 및 비타민 D3.

[0266] 바이오 잉크 제조

[0267] 본문에 기술된 프로토콜 및 기법에 기초하여 바이오 잉크를 제조하였다. 세포를 함유하는 하이드로겔을 제조하기 위해, 제조사의 설명서에 따라 노보겔 2.0(오르가노보 잉크.)을 제조하고, 바이오프린팅 이전에 비실질 세포 집단을 도입하였다.

[0268] 바이오프린팅

[0269] 모든 조직을 표준 오르가노보 바이오프린팅 프로토콜 및 노보젠 MMX 바이오프린터 또는 그의 변형법을 사용하여 표준 조직 배양 웰 인서트(코닝 트랜스웰)의 막 상에서 직접 제작하였다. 바이오프린트된 간 조직은 노보겔(Novogel) 2.0 중 비실질(간 성상, HUVEC)을 포함하는 경계를 포함하였다. 경계는 내부를 포함하는 구획을 정의하였다. 구획의 내부를 일차 간세포를 포함하는 세포 페이스트로 충전시켰다. 바이오프린트된 간 조직은 또한 노보겔 1.0을 포함하는 모트를 포함하였다. 도 20은 프린트된 인간 간 조직의 특정 일례를 보여주는 것이다. 바이오프린트된 간 조직은 실험 기간 동안 상기 막 상에서 유지되었다. 구성물을 매일 90% 일차 간세포 배지 및 10% EGM-2로 이루어진 블렌드 $600 \mu\text{L}$ 로 배지를 교체하고, 5% CO_2 로 보충된, 습윤화된 대기 조건하에 37°C 에서 인큐베이션시켰다. 분비된 인자 분석을 위해 페 배지를 수집하고, 종점 분석(예컨대, 유전자 발현, 조직학적 성질, 조직 생존능 등)을 위해 간 조직을 수거하였다.

[0270] 분비된 단백질 검출

[0271] 폐 배지를 수집하고, -80℃에서 보관한 후, 상업적으로 이용가능한 ELISA 키트에 의해 하기 간 대사산물: 알부민(베틸 라보라토리즈(Bethyl Laboratories)), 피브리노겐(젠 웨이 랩스(Gen Way Labs)), 및 트랜스페린(젠 웨이 랩스)에 대해서 분석하였다. 콜레스테롤 생합성을 형광 분석 방식으로(케이만 바이오케미칼(Cayman Biochemical)) 정량화하였다. 상업적으로 이용가능한 시약(어빔(Abeam))을 이용하여 열량 측정 방식으로 락테이트 데하이드로게나제(LDH) 활성을 측정하였다.

[0272] 전사 프로파일링을 위한 RNA 단리 및 cDNA 합성

[0273] 제조사의 설명서에 따라 퀵-RNA 미니프렙(Quick-RNA MiniPrep)(자이모(Zymo))을 사용하여 3차원의 간 구성물로부터 벌크 RNA를 추출하였다. 분광 광도계(벡크만 쿨터(Beckman Coulter) DU 640)를 사용하여 RNA를 정량화하였다. 제조사의 설명서에 따라(클론테크(CloneTech)) 각각의 개별 cDNA 합성 스마트스크라이브(SmartScribe) 반응에서 2 µg 입력 RNA를 사용하였다. 제조사의 가이드라인(라이프 테크놀로지스)에 따라 택맨 유니버설 마스터 믹스 UNG(TaqMan Universal Master Mix UNG)에서 FAM 염료로 표지화된 CYP3A4, 및 VIC 염료로 표지화된 18S에 대한 택맨(TaqMan)(라이프 테크놀로지스) 프로브 및 프라이머 쌍을 사용하였다. 스텝 원 플러스(Step One Plus) 시스템(라이프 테크놀로지스)을 사용하여 전사체 앰플리콘을 검출하였다.

[0274] 조직학적 분석: 간 조직의 파라핀 제조

[0275] 간 구성물을 실온하에 계내에서 24시간 동안 2% 파라포름알데히드 용액(PBS 중 2% 파라포름알데히드, 10 mM 염화칼슘, 50 mM 수크로스) 중에서 고정시켰다. 24시간 후, 고정액을 제거하고, 70% 에탄올로 교체하였다. 트랜스웰 막이 부착된 구성물을 플라스틱 생검 몰드 중 45℃ 액체 히스토겔(Histogel)(아메리칸 마스터테크(American MasterTech: 미국 캘리포니아주 로디), 카탈로그 번호 EMHGECS)에 침지시키고, 실온에서 고형화시켰다. 이어서, 파라핀 포매를 위해 조직 프로세서를 사용하여 간 구성물이 포매된 히스토겔 블록을 프로세싱하였다. 파라핀을 침투시킨 후, 간 구성물을 파라핀 몰드에 포매시키고, 회전식 마이크로톰(정 바이오컷(Jung Biocut) 2035, 레이카 마이크로시스템즈(Leica Microsystems: 미국 일리노이주 버팔로 그로브))을 사용하여 5 µm 단면을 생성하였다. 헤마톡실린 및 에오신 염색을 위해, 크실렌 중에서 슬라이드를 탈납하고, 100%, 95%, 70%, 및 50% 에탄올을 거쳐 재수화시키고, 증류수 중에서 세정하였다. 슬라이드를 길(Gill) 헤마톡실린(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific: 미국 펜실베이니아주 피츠버그)) 중에 침지시켰다. 증류수로 세정한 후, 슬라이드를 0.2% v/v 수산화암모늄 중에 단기간 동안 침지시켰다. 증류수로 세정한 후, 슬라이드를 에오신 수용액(아메리칸 마스터테크) 중에 침지시켰다. 이어서, 슬라이드를 에탄올 구배를 통해 수화시키고, 크실렌 중에서 세정하고, 수지로 만든 탑재용 매질(사이토실(CytoSeal), 피셔 사이언티픽)을 사용하여 탑재하였다.

[0276] 제조사의 설명서에 따라(어빔: 미국 매사추세츠주 캠프릿지) 과요오드산 쉬프 염색을 수행하였다.

[0277] 면역조직화학적 분석을 위해, 크실렌 중에서 슬라이드를 탈납하고, 100, 95, 70, 및 50% 에탄올 중에서 순차적으로 침지시켜 재수화시킨 후, 최종적으로 증류수 중에서 세정하였다. 재수화된 절편을 표준 마이크로웨이브 오븐을 사용하여 10 mM 시트르산 나트륨 (pH 6.0) 중에서 열 매개 항원 회수를 수행하여 용액 및 슬라이드를 가열하여 서브보일링한 후, 30분 동안 천천히 냉각시켰다. 이어졌, 슬라이드를 1시간 동안 트리스 완충처리된 염수(TBS: Tris-buffered saline) 중 10% 염소 혈청으로 차단한 후, 4℃에서 밤새도록 1차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 하기 1차 항체를 사용하였다: 토끼 항E-카드헤린(어빔; 1:50); 마우스 항알부민(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich: 미국 미주리주 세인트루이스; 1:200); 토끼 항테스민(어빔; 1:200); 마우스 항CD31(어빔; 1:25). 이어서, 절편을 TBS 중에서 0.1% 트윈 20을 이용하여 3회에 걸쳐 세척하고, TBS 중에 1:200으로 희석된 알렉사플루오르(AlexaFluor) 488 또는 알렉사플루오르 568 컨쥬게이트된 2차 항체(라이프 테크놀로지스: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 절편을 TBS-0.1% 트윈 20 중에서 3회에 걸쳐 세척하고, 증류수로 세정하고, DAPI 함유 탑재용 배지(벡터 랩스(Vector Labs: 미국 캘리포니아주 벨링게임))를 이용하여 탑재시켰다.

[0278] 동결절편을 위한 구성물 제조

[0279] 간 구성물을 DPBS로 1회 세정하고, 티슈(Tissue-Tek) OCT 화합물(사쿠라 핀테크 유럽 B.V.(Sakura Finetek Europe B.V.: 네덜란드)) 중에 침지시키고, 급냉시켰다. 이어서, 간 구성물을 함유하는 냉동 블록을 저온 유지장치(레이카 크라이오컷(Leica Cryocut) 1800, 레이카 마이크로시스템즈) 상에서 5 µm로 절편화하였다. 절편화된 슬라이드를 -20℃ 액체 아세톤 중에서 급속으로 고정시키고, 실온에서 20분 동안 대기 건조시켰다. 오일 레드 O 염색을 위해, 슬라이드를 증류수 중에 재수화시키고, 2 min 동안 60% 이소프로판올 중에 침지시켰다. 슬라이드

이드를 실온에서 15분 동안 60% 이소프로판올 중 0.3% w/v 오일 레드 O(시그마-알드리치)로 염색한 후, 1 min 동안 60% 이소프로판올로 세정하였다. 대조염색을 위해 슬라이드를 길 헤마톡실린 중에 단기간 동안 침지시켰다. 증류수로 슬라이드를 세정하고, 수정 매질(아메리칸 마스터테크)을 이용하여 탑재시켰다

[0280] 현미경법

[0281] 자이스 악시오스코프(Zeiss Axioskop) 현미경(자이스(Zeiss: 독일 제나))을 이용하여 H&E, PAS, 및 오일 레드 O 염색된 슬라이드를 영상화하였다. 인사이트(Insight) 2 카메라 및 스폿(Spot) 5.0 소프트웨어(다이아그노스틱 인스트루먼트, 인크.(Diagnostic Instruments Inc.: 미국 미시간주 스틸링하이츠))를 이용하여 영상을 획득하였다. 자이스 악시오이미저(Zeiss AxioImager) 현미경을 이용하여 형광으로 염색된 슬라이드를 영상화하고, 자이스 ICM-1 카메라 및 젠 프로(Zen Pro) 소프트웨어를 이용하여 영상을 획득하였다.

[0282] S9 분획 제조

[0283] 3차원의 간 구성물로부터 배지를 흡인시키고, 1 x 프로테아제 억제제 콕테일(시그마)로 보충된 400 μ l의 포스페이트 완충처리된 염수(코닝)를 구성물에 첨가한 후, -80°C에서 냉동시켰다. 구성물을 해동시키고, 티슈럽터(TissuRuptor)(퀴아젠(Qiagen)) 및 1회용 팁을 사용하여 3,000 rpm으로 90 sec로 균질화한 후, 이어서, 90 sec 동안의 일시 정지 후, 이어서, 3,000 rpm으로 90 sec로 균질화하였다. 균질화된 상청액을 4°C에서 20,000 X g로 20 min 동안 원심분리하였다. 상청액을 새 튜브로 옮긴 후, 단백질을 정량화하였다.

[0284] 단백질 정량화

[0285] 표준으로서 소 알부민(시그마)을 사용하여 브래드포드(Bradford) 검정법(시그마)을 사용하여 단백질 정량화를 수행하였다.

[0286] CYP 3A4 검정법

[0287] S9 분획을 단백질 함량에 의해 정규화하고, 제조사의 프로토콜에 따라 루시페린-IPA 검정법(CYP 프로글로(CYP ProGlo); 프로메가(Promega))에 사용하고, 플레이트 판독기(폴라스타(Polarstar), BMG)를 사용하여 발광을 판독하였다.

[0288] 통계

[0289] 그래프패드 프리즘 소프트웨어(GraphPad Prism Software)를 이용하여 AOVA 및 스튜던츠 t 검정 통계 분석을 수행하였다.

[0290] 결과

[0291] 바이오프린트된 간 조직은 인간 조직과 유사한 다세포 구조를 포함하였다. 천연 간 조직과 같이, 바이오프린트된 간 조직은 특정 구역에 풍부한 특정 세포 유형(예컨대, 간 성상 세포, 간세포, 내피 세포 등)을 포함함으로써 패턴화된 구획화된 구조를 획득하였다.

[0292] 바이오프린트된 간 조직을 조직학적으로 특징을 규명한 결과, 높은 세포 밀도, 및 ECM, 지질, 및 글리코겐을 비롯한, 천연 간의 중요한 특징이 나타났다. 도 21(프린팅 후 7일째)을 참조할 수 있다. 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 (E-카드헤린, 알부민 및 DAPI의 시각화에 의해 관찰된) 밀착 연결부, 및 (테스민, CD31, 및 DAPI의 시각화에 의해 관찰된) 휴지 성상 세포 및 미세혈관 구조를 비롯한, 관심의 대상이 되는 조직학적 특징을 보였다. 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 초기 제작을 훨씬 넘어 지속되는 구획화를 보였다. 제작 후 21일째, 주변에 비실질 "간질"이 존재하는 간세포 영역이 확인되었다. 도 22를 참조할 수 있다. 예상 밖으로, 바이오프린트된 간 조직은 소엽 유형의 구조로의 뚜렷한 자기 조직화를 보였고, 이는 천연 간과 매우 유사한 모방성을 띠었다.

[0293] 관찰된 구조는 40+일 동안 기능 및 생존능을 유지시키고, 이로써 장기간의 검사, 예컨대, 저용량, 반복 노출 및 만성 병적 상태에 대한 검사가 가능할 수 있다. 간 특이 기능은 3차원의 바이오프린트된 간 조직(일차 간세포)에서 40일 초과 기간 동안 지속된다. 바이오프린트된 간 조직은 전통적인 2차원적인 기술에서 일차 간세포에 대한 공개된 시간적 추이를 훨씬 넘어, 6주(42일)까지 알부민을 계속해서 생산하는 것으로 나타났다. 도 23을 참조할 수 있다. 바이오프린트된 간 조직은 또한 예컨대, 콜레스테롤과 같은 다른 간세포 인자도 지속적으로 생산하는 것으로 나타났다. 도 23을 참조할 수 있다.

[0294] 3차원의 프린트된 인간 간 조직은 현 2차원적인 방법에서는 달성되지 못하는, 트랜스페린 및 피브리노겐을 비롯

한, 추가의 관련 대사산물을 생산하는 것으로 나타났다. 도 24를 참조할 수 있다.

[0295] 3차원의 프린트된 인간 간은 또한 담소관 형성의 마커를 보인다. 담즙산염 외수송 단백질(BSEP: Bile salt exporting protein)은 간세포의 담소관 막 내에 위치하는 막 단백질이다. BSEP의 주요 기능은 간세포로부터 언컨쥬게이트된 및 컨쥬게이트된 담즙산 및 염을 제거하는 것이다. 추가로, BSEP 발현은 천연 조직 내의 극성을 나타낸다. BSEP(BSEP 단백질에 대하여 IHC 염색), 알부민, 및 DAPI의 조직학적 시각화는 BSEP가 간세포 알부민 생산 세포에 존재한다는 것을 입증한다. 도 25는 프린팅 후 10일째 2개의 바이오프린트된 간 조직에서의 하우스키핑 유전자 RNA(18s RNA)에 대해 상대적인, BSEP mRNA의 상대량을 산출한 것을 보여주는 것이다. BSEP의 검출가능한 수준이 조직학적 관찰 결과를 뒷받침한다.

[0296] 수일 경과 후 그 기능을 상실하는 2차원적인 일차 간세포와 달리, 바이오프린트 3차원의 간 조직 구성물은 활성 CYP3A4 효소를 지속적으로 유도할 수 있는 것으로 보인다(상기 유도가능성은 베라파밀에 의해 억제된다). 도 26을 참조할 수 있다.

[0297] 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 디클로페낙, 트로바플록사신, 및 메토틱세이트를 비롯한, 공지된 간 독물에 대하여 천연 유사 반응을 보인다. 도 27은 락테이트 데하이드로게나제(LDH)에 의해 측정되는 바, 중간 용량의 디클로페낙에서의 CYP3A4의 유도, 이어서, 보다 고용량에서의 손상을 보여주는 것이다. 도 28은 트로바플록사신 대 레보플록사신의 다중 용량 연구(n=3, 4일간 2개의 용량)에서 관찰된 알부민 감소 및 LDH 증가를 보여주는 것이다. 트로바플록사신 효과는 임상적 C_{최대}(~4 μM)와 더 유사한 것으로 관찰되었다. 이는 LDH 유도는 관찰되지 않는, 저농적인 2차원적인 일차 간세포 배양물과는 대조를 이룬다. 도 29는 메토틱세이트의 다중 용량 연구(n=3, 7일간 매일 투약)에서 관찰된 생존능(ATP로 측정-셀 타이터 글로) 및 알부민 감소 및 LDH 증가를 보여주는 것이다.

[0298] 3차원의 바이오프린트된 간 조직은 생리학상 관련된 분자, 예컨대, 비타민 D에 대하여 천연 유사 반응을 보인다. 비타민 D는 체내에서 항상성을 유지하는 데 중요하다. 비타민 D는식이 섭취를 통해 얻을 수 있거나, 또는 피부 내에서 세포에 의해 합성될 수 있다. 간은 비타민 D를 골 형성/유지에 중요한 대사산물로, 및 신장에 의해 배설될 수 있는 형태로 가공한다. 비타민 D는 또한 간에서 CYP3A4의 발현을 자극하고, 잠재적으로는 약물의 생체이용가능성에 영향을 줄 수 있다. 1, 5, 10 μM의 비타민 D로 처리된 바이오프린트된 3D 간 조직의 전사 프로파일링에 착수하였다. CYP3A4 전사체의 상대적인 발현에 대하여 측정하였다. 도 30은 5 및 10 μM의 비타민 D로 처리하였을 때, CYP3A4 활성이 각각 ~7 및 4배로 자극을 받았다는 것을 보여주는 것이다.

[0299] 실시예 7 - 쿠퍼 세포를 혼입한 기능성 간 조직의 바이오프린팅

[0300] 쿠퍼 세포를 혼입함으로써 오르가노이드의 3D 간 조직의 면역학적 측면을 조사할 수 있다. 쿠퍼 세포를 생리학상 관련된 비율(%)로 바이오프린트된 간 구성물 내에 혼입시켰다. 구성물은 LPS 자극에 대하여 용량에 의존하는 방식으로 반응한다(LPS: E. 콜라이(*E. coli*) 0127:B8; 시그마). 도 31을 참조할 수 있다. 쿠퍼 세포를 생리학상 관련된 비율(%) (~12%)로 간 구성물 내로 바이오프린트하였다. 구성물은 LPS 자극에 대하여 용량에 의존하는 방식으로 반응한다. IL-10 및 TNF-α는 대립 사이토카인이다. IL-10의 발현은 TNF-α의 발현을 감소시킨다. 이는 바이오프린트된 3D 간 조직 내에서 관찰되었고, 이는 100 μg/ml 용량의 LPS에서 가장 현저하게 나타났다. 도 32를 참조할 수 있다.

[0301] 실시예 8 - 간 굴모양혈관 내피 세포를 혼입한 기능성 간 조직의 바이오프린팅

[0302] 간 굴모양혈관 내피 세포를 혼입함으로써 3차원의 바이오프린트된 간 조직의 면역학적 측면을 조사할 수 있다. 간 굴모양혈관 내피 세포(HSEC)는 천연 간 내피 세포 집단이다. 도 33은 HSEC의 2차원적인 단층을 보여주는 것이다. 상기 세포는 면역학적 반응에 대한 세포 신호전달을 비롯한, 독특한 특징을 가진다. HSEC는 도 34에서 입증된 바와 같이, 2D 배양물에서 IL-6을 생산함으로써 LPS에 대해 반응한다. 대조적으로, HUVEC는 LPS에 의해 자극받았을 때에는 검출가능한 양으로 IL-6을 생산하지 못한다. 바이오프린팅 프로세스 내로 혼입되었을 때, HSEC는 융합된 3D 간 조직을 생산한다. 도 35는 HSEC를 포함하는 융합된 3차원의 간 조직을 보여주는 것이다. 상기 조직을 제조하기 위해 간 굴모양혈관 내피 세포가 비실질 분획 내로 혼입하였고, 이로써, 융합된 구조를 수득하였다.

[0303] 실시예 9 - 소형 분자 투과

[0304] 소형 분자가 3차원의 바이오프린트된 간 조직 전역에 걸쳐 투과할 수 있는지 여부를 측정하기 위해 실험을 수행하였다. 5-(및-6)-카복시-2',7'-디클로로 플루오레세인 디아세테이트를 1 μM로 24 hr 동안 3D 간 조직의 배지

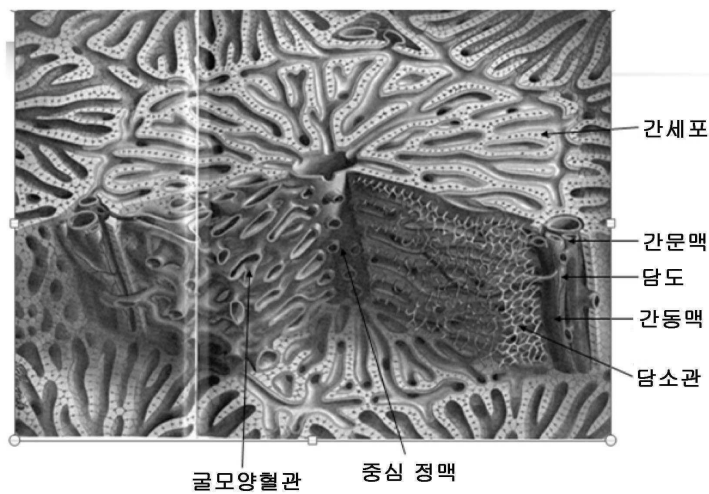
내에 보충하였다. 구성물을 1 ml의 HBSS 완충제로 세정하고, 세척 완충제를 흡인시켰다. 상기 과정을 3x 반복하였다. OCT 포매 용액을 첨가하고, 구성물을 급냉시키고, 동결절편화하였다. 5 μ m 절편을 495 nm 여기로 FITC 채널을 이용하여 시각화하였다. 분자 5-(및-6)-카복시-2',7' 디클로로 플루오레세인 디아세테이트의 플루오레세인 성분은 상기 과정에서 여기된다. 상기 절편은 구성물 내에서 대략 150 μ m였고, 형광 표지화된 화합물이 전역에 걸쳐 관찰된다. 5-(및-6)-카복시-2',7' 디클로로 플루오레세인 디아세테이트의 화학식량은 529.28이다. 도 36은 5X로 동결절편된 3D 간 조직의 FITC 영상을 보여주는 것이고, 이는 소형 분자 투과를 입증한다.

[0305]

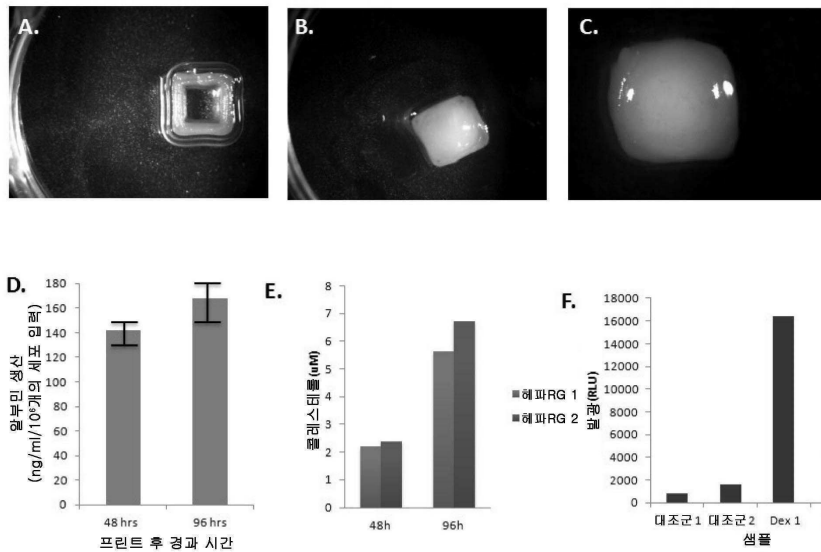
본원에서 본 발명의 바람직한 실시양태가 제시되고, 기술되기는 하였지만, 그러한 실시양태는 단지 일례로 제공된 것이라는 것은 당업자에게는 자명할 것이다. 이에, 당업자에게는 본 발명으로부터 벗어남 없이 다수의 변형, 변경, 및 치환이 이루어질 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안들이 본 발명을 수행하는 데 적합하게 사용된다는 것을 이해하여야 한다.

도면

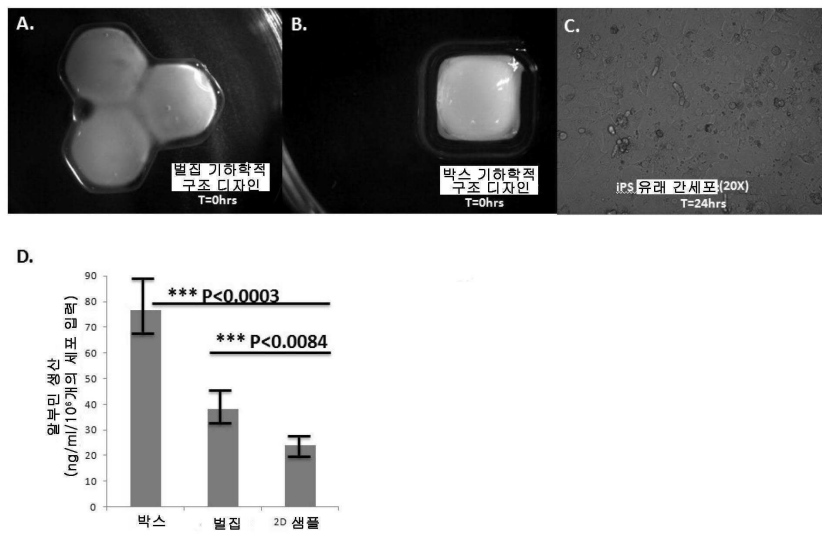
도면1



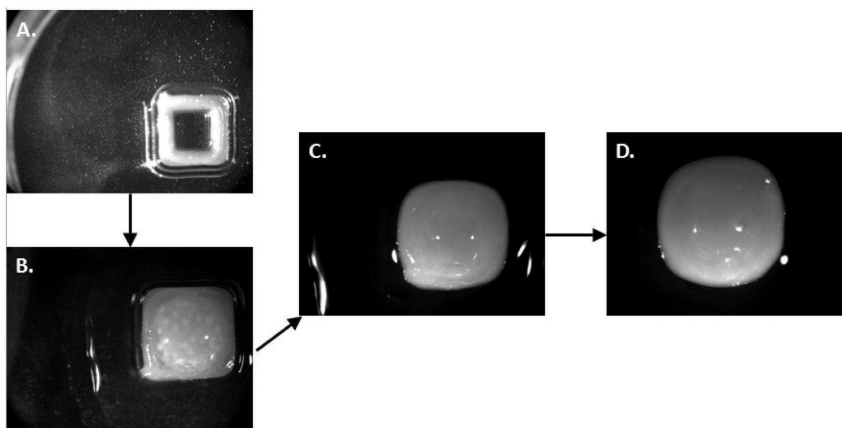
도면2



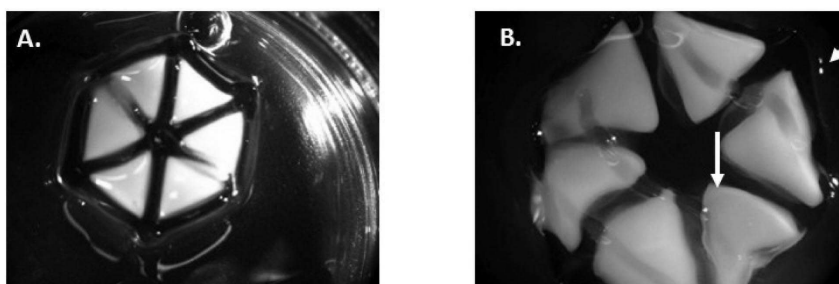
도면3



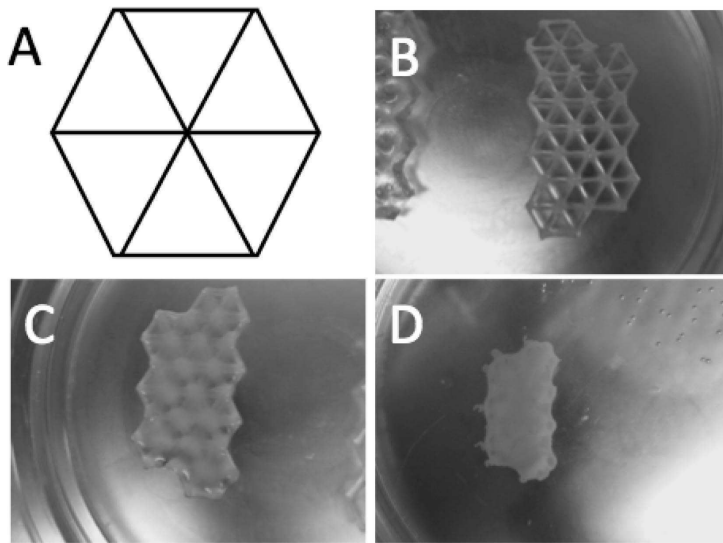
도면4



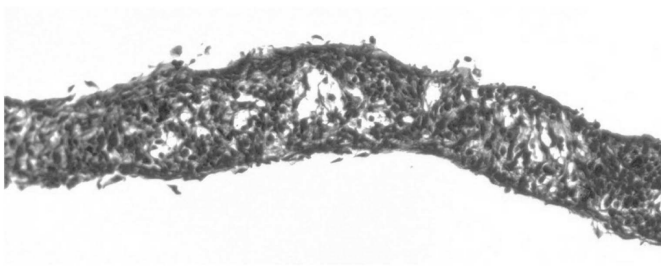
도면5



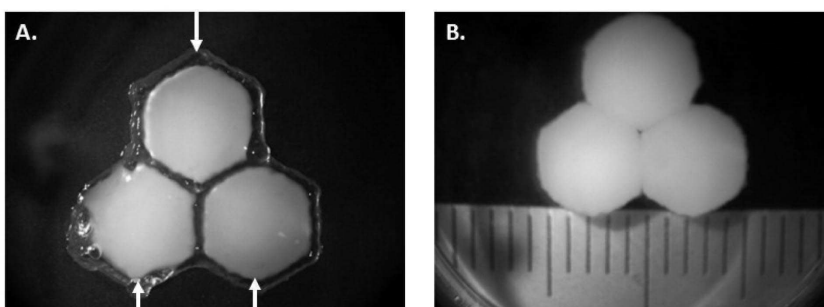
도면6



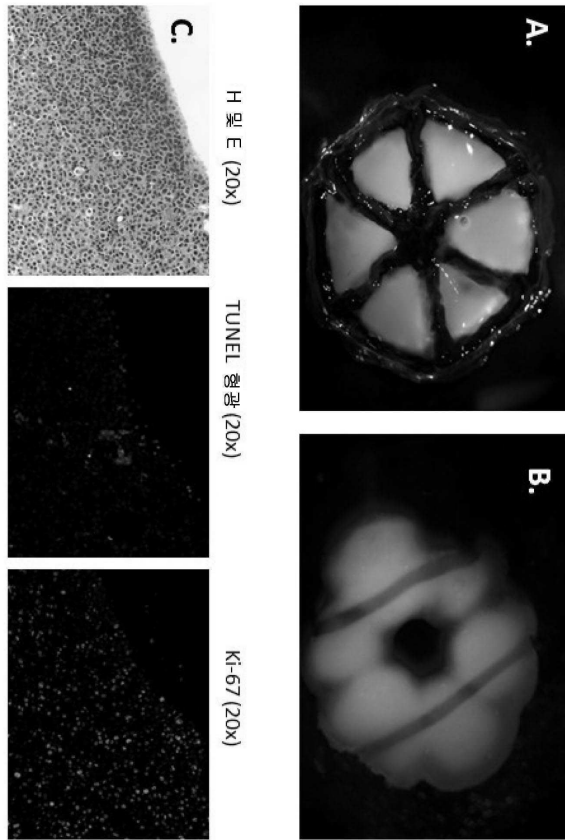
도면7



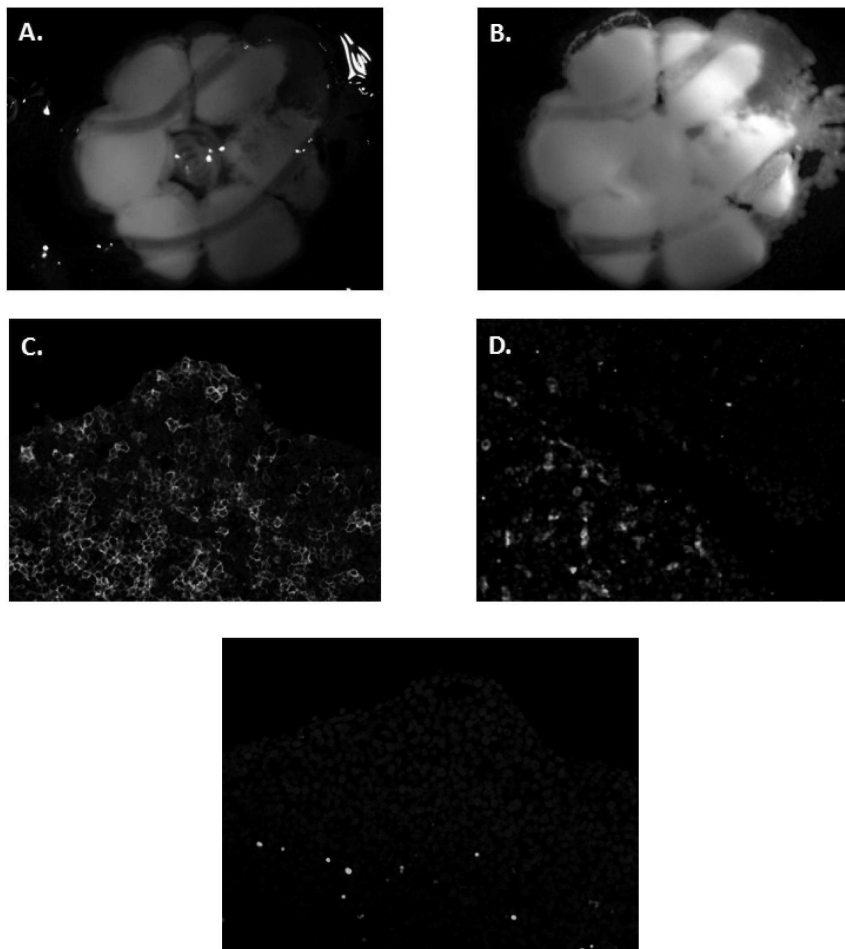
도면8



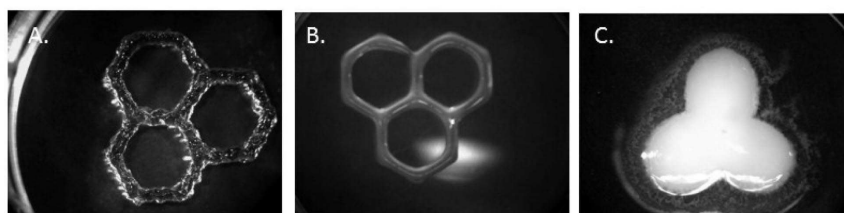
도면9



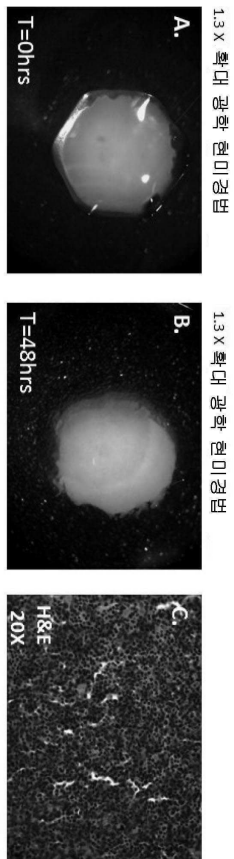
도면10



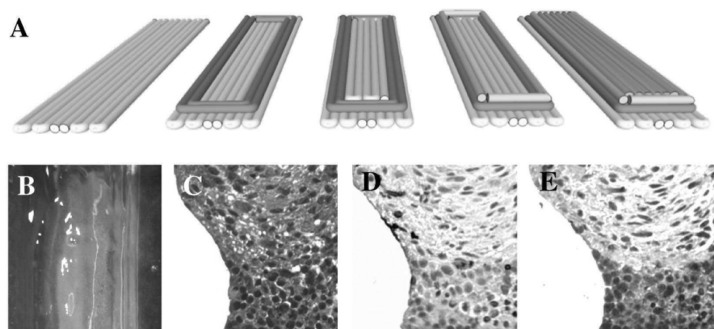
도면11



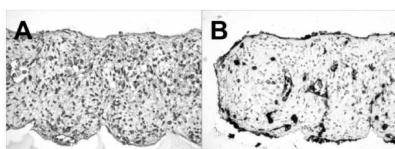
도면12



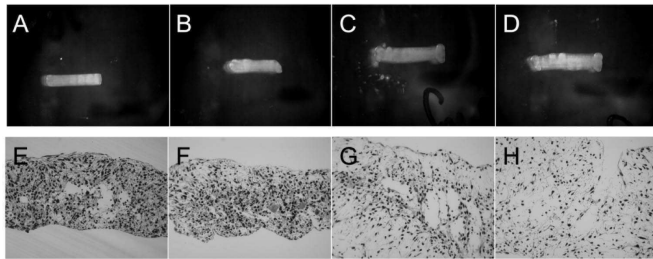
도면13



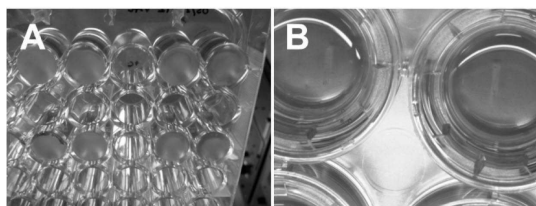
도면14



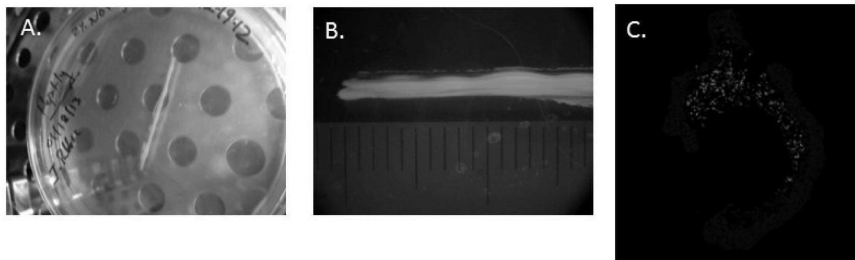
도면15



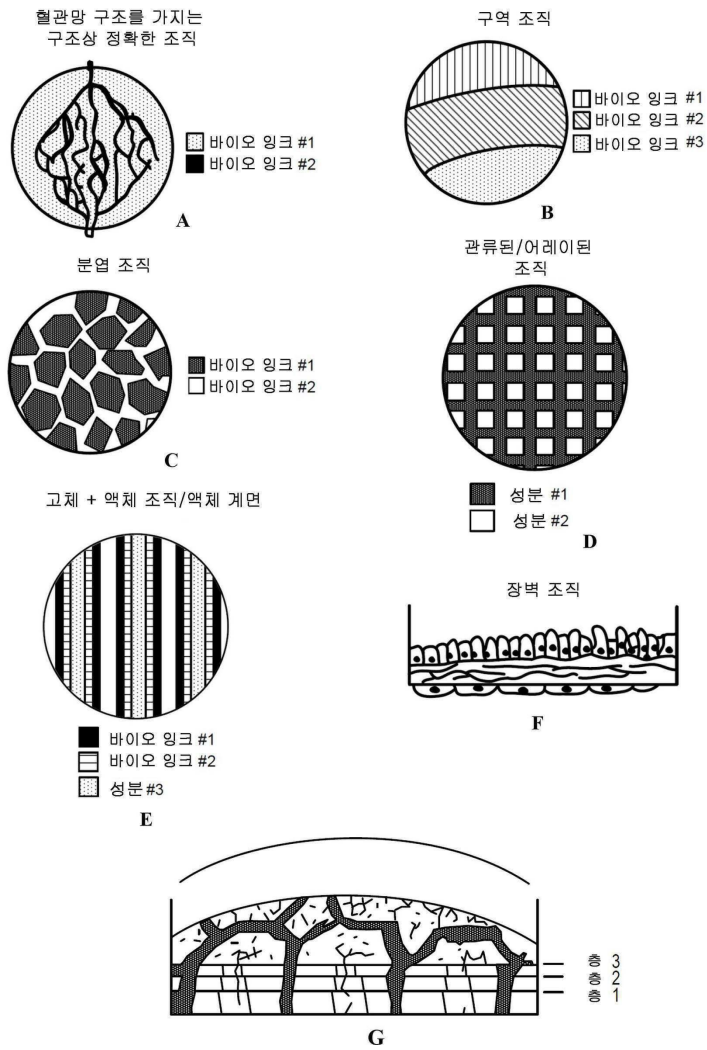
도면16



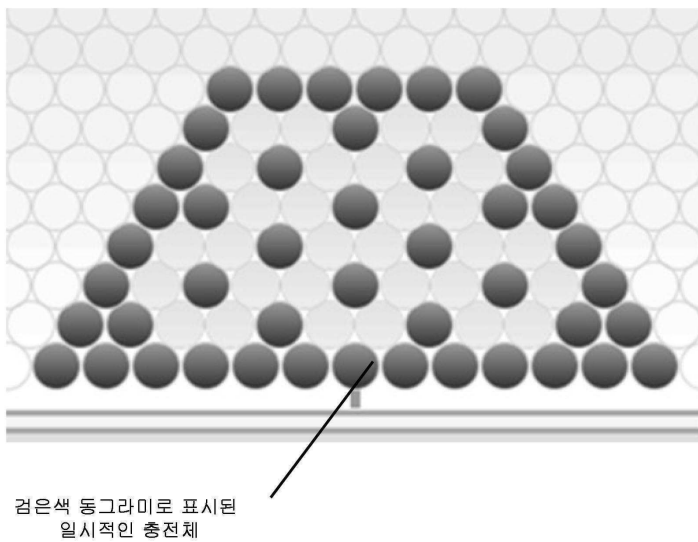
도면17



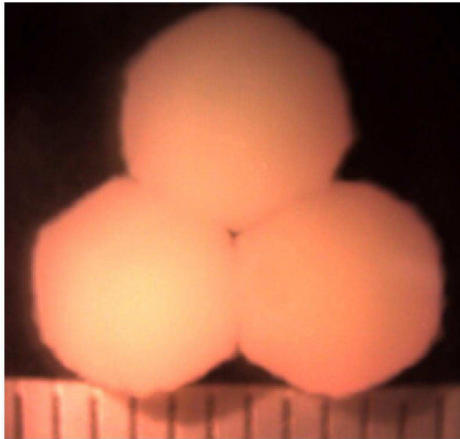
도면18



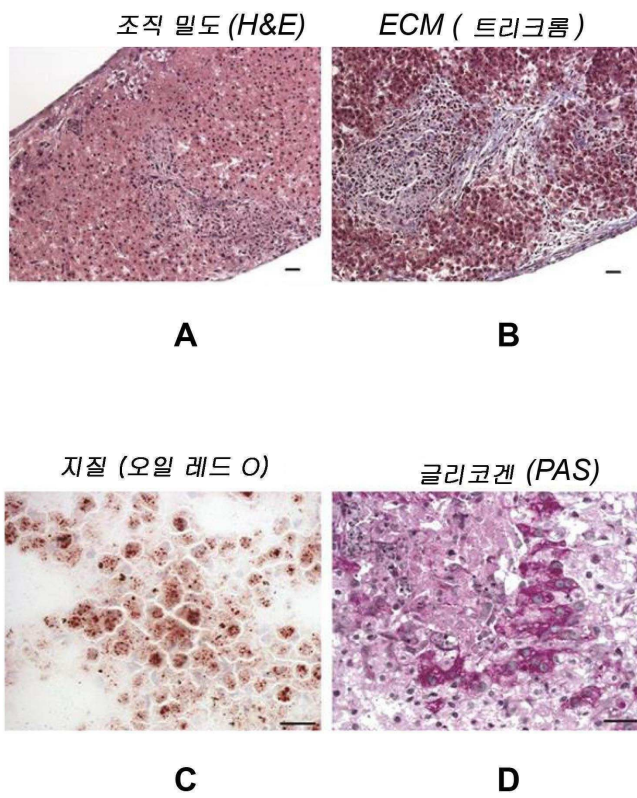
도면19



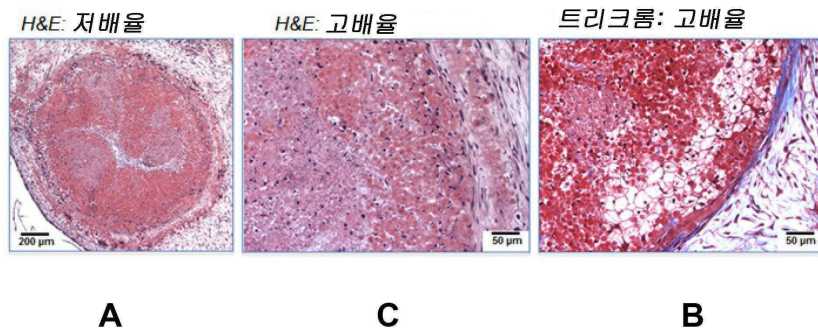
도면20



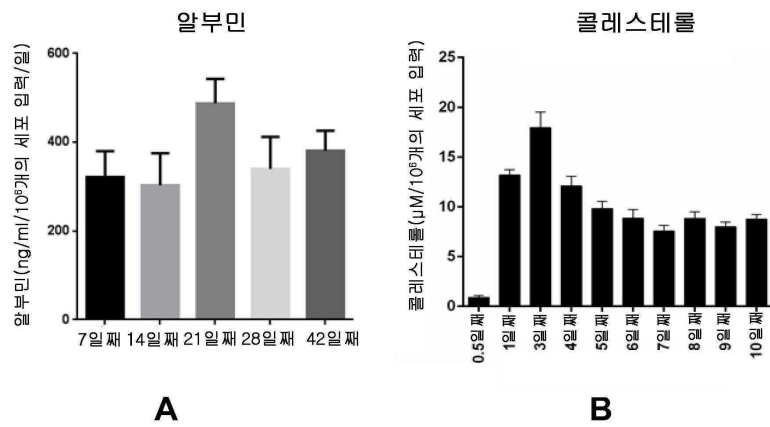
도면21



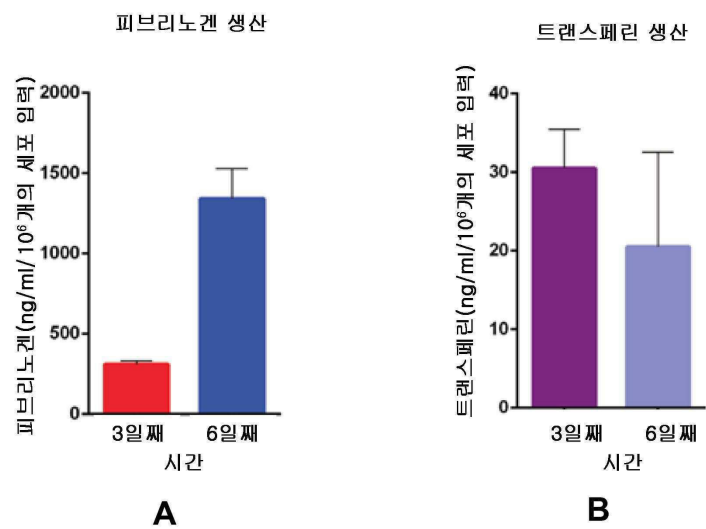
도면22



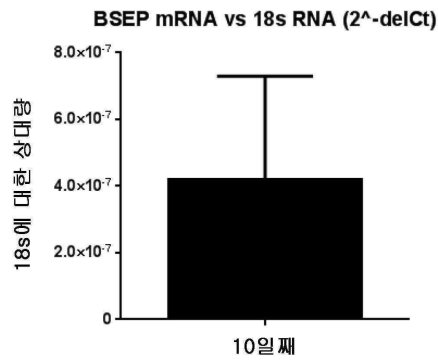
도면23



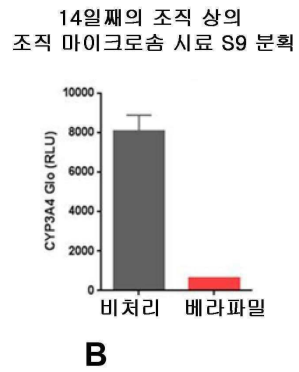
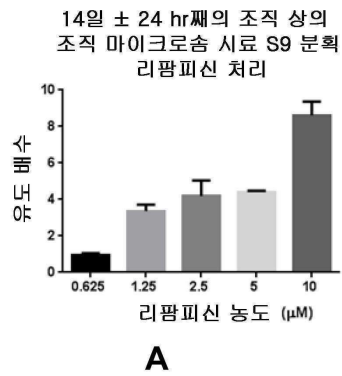
도면24



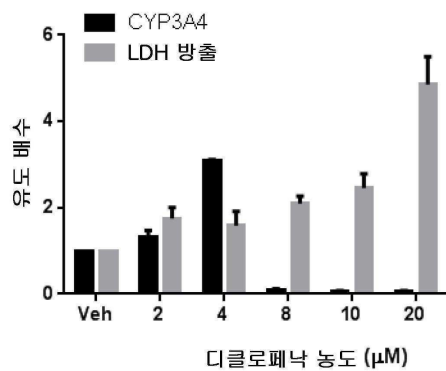
도면25



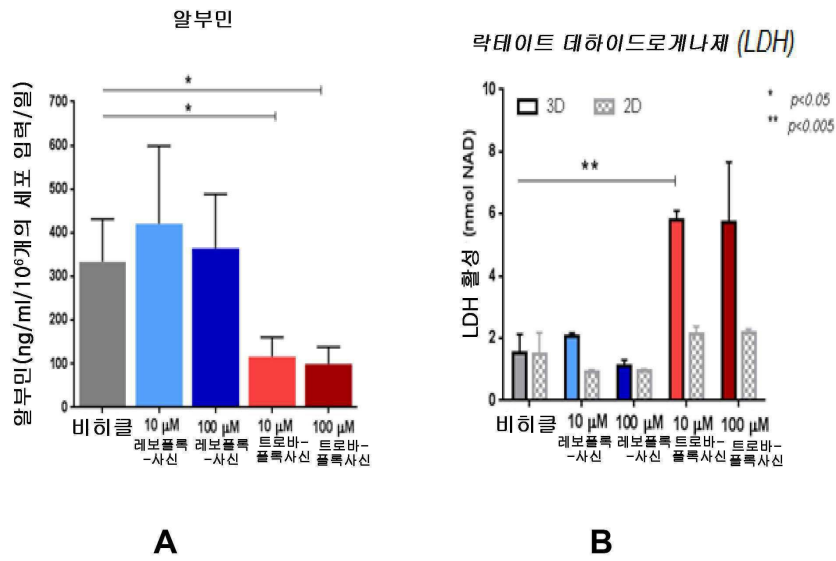
도면26



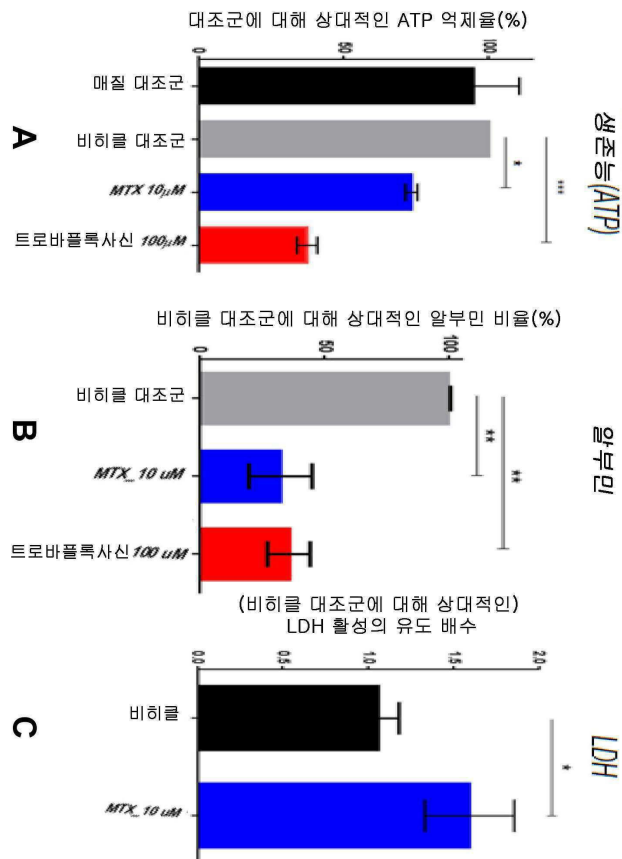
도면27



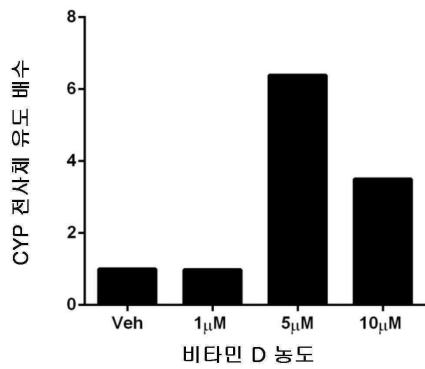
도면28



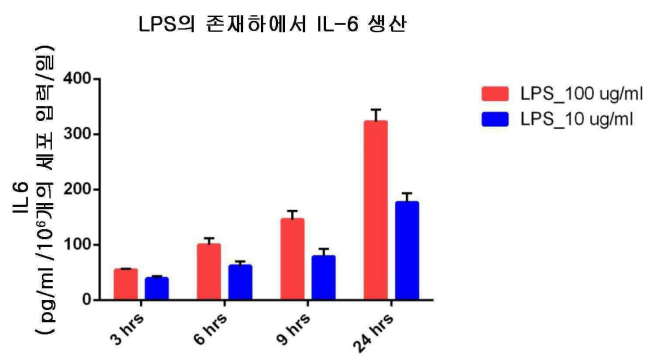
도면29



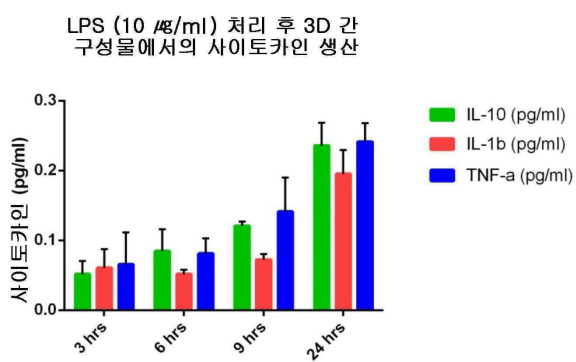
도면30



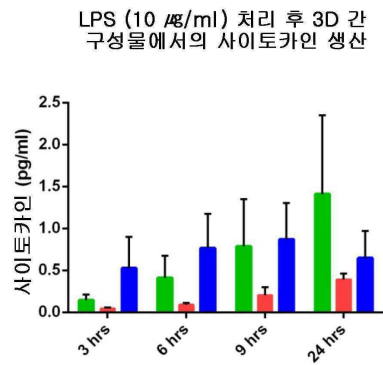
도면31



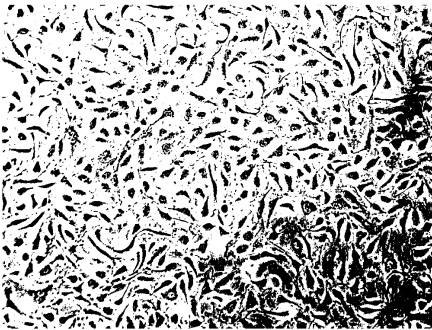
도면32a



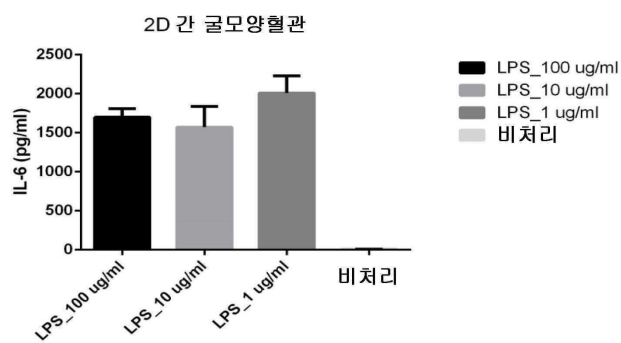
도면32b



도면33

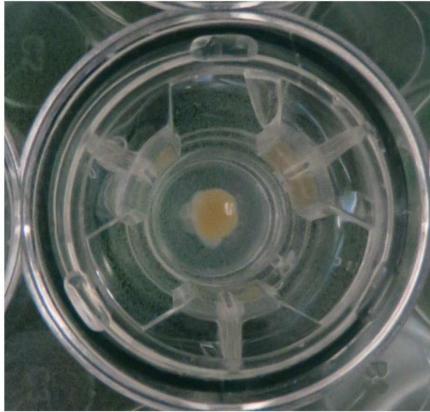


도면34



N=3
LPS-EB초순수, E. 콜라 0111:B4

도면35



도면36

