

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011304

(43) 공개일자 2025년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0786 (2010.01) *B33Y 10/00* (2015.01)*B33Y 80/00* (2015.01) *C12N 5/071* (2010.01)*G01N 33/50* (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0645 (2025.01)*B33Y 10/00* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0091519

(22) 출원일자 2023년07월14일

심사청구일자 2023년07월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임도선

서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호

김경섭

서울특별시 동대문구 왕산로 71, 1105호

(74) 대리인

위병갑

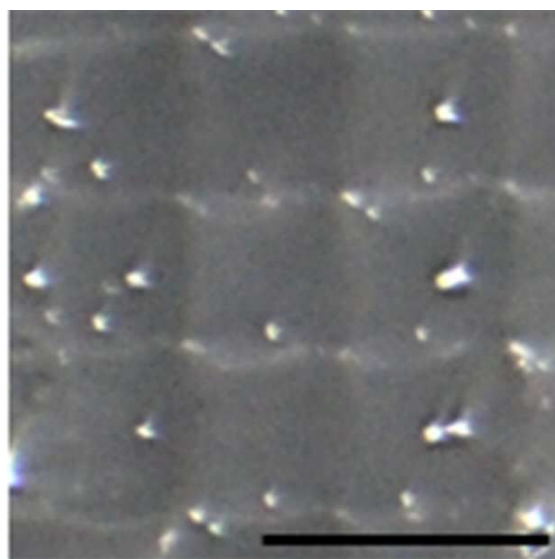
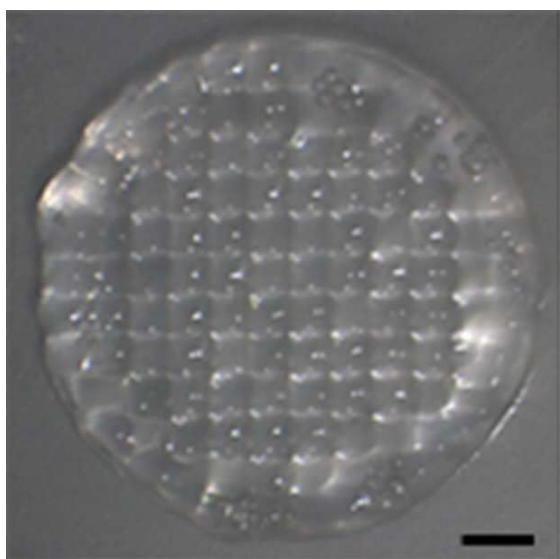
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 3차원 바이오 프린팅 기술을 이용한 동맥경화증 모델

(57) 요약

본 발명은 3D 바이오 프린팅 기술을 이용하여 제작한 관상동맥 구조체와 이를 이용하여 제작한 동맥경화증 모델에 관한 것으로, 본 발명의 바이오 잉크로 제조된 관상동맥경화증 모델은 복잡한 동맥 내부 구조와 세포 간 상호작용을 모사하며, 동맥경화증의 진행 과정을 재현하므로, 동맥경화증과 관련된 바이오마커의 발굴, 질병 메커니즘 및 치료 전략 연구에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

B33Y 80/00 (2013.01)

C12N 5/069 (2013.01)

C12N 5/0691 (2013.01)

C12N 5/0697 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

C12N 2503/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하이드로젤과 염증성 대식세포(M1 macrophage), 관상동맥 평활근 세포(vascular smooth muscle cell) 또는 관상동맥 내피세포(vascular endothelial cells), 및 메타크릴레이트 콜라겐(methacrylate collagen, ColMA)을 포함하는 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 3D 관상동맥 프린팅용인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 염증성 대식세포 1×10^5 내지 1×10^7 cells/mL, 관상동맥 평활근 세포 5×10^5 내지 5×10^7 cells/mL 또는 관상동맥 내피세포 2×10^5 내지 2×10^7 cells/mL를 포함하는, 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

- a) 제 1항의 바이오 잉크 조성물을 적재(loaded)하여 격자형 그물망 구조로 3D 바이오 프린팅하는 단계;
- b) 광 조사하여 가교결합시키는 단계; 및
- c) 배양하는 단계를 포함하는, 3D 관상동맥 구조체의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단계 a)에서 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 평활근 세포를 포함하는 제 1 바이오 잉크, 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 염증성 대식세포를 포함하는 제 2 바이오 잉크, 및 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 내피세포를 포함하는 제 3 바이오 잉크의 순서로 적재하여 3중층 구조로 3D 바이오 프린팅하는, 3D 관상동맥 구조체의 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 단계 c)에서 3 내지 7일 동안 배양하는, 3D 관상동맥 구조체의 제조방법.

청구항 7

제 4항의 방법으로 제조된 3D 관상동맥 구조체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 관상동맥 평활근 세포층, 염증성 대식세포층 및 관상동맥 내피세포층의 3중층 구조의 시트 형태인, 3D 관상동맥 구조체.

청구항 9

제 7항에 있어서, 두께 0.7 내지 1.5 mm인, 3D 관상동맥 구조체.

청구항 10

제 7항에 있어서, 다공성의 격자형 그물망 구조를 가지는, 3D 관상동맥 구조체.

청구항 11

제 10항에 있어서, 평균 공극 크기가 $370 \mu\text{m}$ 내지 $480 \mu\text{m}$ 인, 3D 관상동맥 구조체.

청구항 12

제 7항의 3D 관상동맥 구조체에 LDL(low density lipoprotein cholesterol)을 처리하는 단계를 포함하는, 3D 관상동맥경화증(coronary arteriosclerosis) 모델의 제조방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, LDL을 1 내지 5mg/mL의 농도로 처리하는, 3D 관상동맥경화증 모델의 제조방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 염증성 관상동맥경화증인, 3D 관상동맥경화증 모델의 제조방법.

청구항 15

제 12항의 방법으로 제조한 3D 관상동맥경화증 모델.

청구항 16

제 15항에 있어서, 3D 관상동맥 구조체에 LDL 처리 후 3일 내지 13일차의 초기 단계 관상동맥경화증인, 3D 관상동맥경화증 모델.

청구항 17

제 15항에 있어서, 3D 관상동맥 구조체에 LDL 처리 14일 이후의 후기 단계 관상동맥경화증인, 3D 관상동맥경화증 모델.

청구항 18

제 15항의 3D 관상동맥경화증 모델에 후보 약물을 처리하는 단계를 포함하는, 관상동맥경화증 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3D 바이오 프린팅 기술을 이용하여 제작한 관상동맥 구조체와 이를 이용하여 제작한 동맥경화증 모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 성인병 증가와 더불어 동맥경화, 고지혈증, 심근경색 등의 심혈관계 질환이 크게 증가하고 있다. 대표적인 심혈관계 질환으로서 동맥경화(Atherosclerosis)는 지질대사와 관련된 유전적 요인과 식습관, 흡연, 운동부족 등의 환경적 요인에 의하여 동맥이 경화되는 질환으로, 뇌, 심장, 신장 등의 인체의 중요 장기의 혈액순환에 이상을 초래함으로써 심근경색증, 뇌경색증, 폐쇄성 말초혈관질환 및 동맥류 등의 심혈관질환의 원인을 제공하며, 뇌동맥 또는 관상동맥에서 일어나기 쉽고, 이로 인해 심장질환, 뇌혈관 질환 등의 심혈관계 질환으로 발전하게 된다. 뇌동맥경화의 경우에는 두통, 현기증, 정신장애 등을 나타내고 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화의 경우에는 심장부에 동통과 부정맥을 일으켜 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한, 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발되어, 동맥경화로 인한 질병이 현대 사회에 있어, 특히 50 내지 60대의 남성들에게 가장 큰 사망요인으로 부각되고 있다. 동맥경화는 동맥혈관의 손상 및 리포프로테인으로 인한 콜레스테롤 축적 등이 발생원인으로 알려져 있다. 동맥벽은 얇은 단층의 세포로 된 내막, 평활근육 세포로 된 동맥벽의 중간층, 동맥을 보호역할을 하는 외막으로 되어 있다. 동맥경화는 동맥벽의 손상과 변성으로 동맥경화형성을 유발하여 발병하지만, 고혈압, 고지혈증, 흡연이 중요하다. 혈액 속의 콜레스테롤 수치가 높은 고지혈증일 경우는 동맥 내막과 근육층 사이의 식세포가 많은 기름기를 세포질 속에 함유하여 동맥벽에 지방이 축적된다.

[0003] 혈관 내벽의 플라그(plaque) 형성 및 혈관과열은 심근경색 발병의 주요한 요인이며, 동맥의 혈류를 저해하거나 차단함으로써 심혈관질환의 심각한 합병증을 초래할 수 있다 (Circulation. 2023 Feb 21;147(8):e93-e621). 동맥경화의 초기 발생에 관한 가설은 혈관벽의 손상에 대한 만성 염증과정으로 제시되고 있다. 이는 유전적 변이,

과산화물, 고혈압, 당뇨, 혈장 호모시스테인 농도 증가 또는/및 미생물 감염 등의 원인에 의하여 혈관 내피세포가 정상적인 항상성을 유지하지 못하는 기능부전 상태가 되는 것이다. 구체적으로, 상기의 원인들로 인하여 혈중 저밀도 지방단백질(low-density lipoprotein; LDL)이 산화, 당결합, 집적화, 당단백 결합 등을 거쳐 변형-LDL(highly modified LDL; HM-LDL)로 변화하게 되고, 이들은 혈관 내피세포 및 평활근을 자극하고 손상을 유발한다. 이로 인하여, 내피세포의 혈관세포부착물질-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1)의 발현 및 염증세포의 염증매개인자 방출이 촉진되면 LDL은 내피세포 아래에 유입 및 축적되고, 축적된 LDL 및 산화된 HM-LDL은 다시 대식세포, T 임파구 등의 면역세포의 유입 및 활성화를 유발하는 과정을 되풀이하여 병변의 염증반응을 촉진시키게 된다. 유입된 대식세포나 임파구로부터 방출된 가수분해효소, 염증매개인자, 성장인자 등의 작용으로 병반은 과사하게 되고, 과사된 병소 부위로 단핵구의 유입, 평활근의 이동 및 분화, 섬유성 조직의 형성 등의 반복적인 과정이 이루어진다. 상기 과정을 통해 병변 조직은 HM-LDL을 핵으로 한 과사조직에 섬유질이 덮인 복잡한 구조의 섬유질 병변으로 발달하게 되며, 발달된 병변 조직으로부터 혈전이 생성되고, 동맥벽의 근육층은 더욱 두꺼워지며 혈관은 점점 좁아지게 되어 심혈관계 질환에 따른 여러 장기의 손상이 야기될 수 있다.

[0004] 이러한 죽상 동맥경화증을 더 잘 이해하기 위한 체외 실험은 일반적으로 2D 세포 배양 시스템에서 수행되었으며, 이러한 모델에는 기본 동맥의 3D 구조와 생리학적 조건이 모두 부족한 문제가 있어왔다 (Vasc Med. 2014 Oct;19(5)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 바이오 잉크 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 3D 관상동맥 구조체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 3D 관상동맥 구조체를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 3D 관상동맥경화증 모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 3D 관상동맥경화증 모델을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 관상동맥경화증 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 염증성 대식세포, 관상동맥 평활근 세포 또는 관상동맥 내피세포, 및 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 3D 관상동맥 구조체의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 3D 관상동맥 구조체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 3D 관상동맥경화증 모델의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 3D 관상동맥경화증 모델을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 관상동맥경화증 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 바이오 잉크로 제조된 관상동맥경화증 모델은 복잡한 동맥 내부 구조와 세포 간 상호작용을 모사하며, 동맥경화증의 진행 과정을 재현하므로, 동맥경화증과 관련된 바이오마커의 발굴, 질병 메커니즘 및 치료 전략 연구에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 바이오잉크에 포함될 세포 종류 및 밀도에 최적화된 하이드로젤 종류를 선별한 도이다.

도 2는 본 발명의 바이오잉크를 이용하여 3D 프린팅 기술로 제작한 그물망 구조의 관상동맥 조직의 이미지이다.

도 3은 본 발명의 3D 바이오 프린팅 기술로 제작한 관상동맥 조직 내에 0일 차 및 4일 차의 세포 생착 및 세포

골격을 확인한 도이다.

도 4는 본 발명의 3D 바이오 프린팅 기술로 제작한 관상동맥 조직 내에 0일 차 및 4일 차의 세포 생존력을 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 3D 바이오 프린팅 기술로 제작한 관상동맥 조직에서 염증성 대식세포, 관상동맥 평활근 세포 및 관상동맥 내피세포의 적층을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과(동맥경화 유발 후 날짜)에 따른 ApoB 단백질의 축적을 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 ApoB 단백질의 축적이 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 ApoB 단백질이 가장 많이 축적된 시기의 동맥경화증 모델.

도 7은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따른 LDL 흡수 거품 세포를 Oil-Red-O 염색으로 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 8은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따른 LDL 흡수 거품 세포 (Oil-Red-O 양성 세포)의 수를 계수한 그래프이다.

도 9는 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따른 LDL 흡수 거품 세포를 Bodipy 염색으로 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 10은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따른 LDL 흡수 거품 세포 (Bodipy 양성 세포)의 수를 계수한 그래프이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 11은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따른 CD146 양성 거품 세포를 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 12는 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 진행 경과에 따라 거품 세포에 흡수된 LDL를 TEM을 이용한 세포 미세구조로 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 LDL 흡수 거품 세포 유도가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 13은 본 발명의 3D 관상동맥 조직에 염증성 동맥경화를 유발한 동맥경화증 모델에서 염증 관련 단백질들의 발현 수준을 확인한 도이다:

Baseline: 염증성 동맥경화 유발 0일차의 동맥경화증 모델;

Early athero: 동맥경화증 모델에서 염증성 동맥경화가 심화 되는 시기의 동맥경화증 모델; 및

Late athero: 동맥경화증 모델에서 염증성 동맥경화가 가장 많이 진행된 시기의 동맥경화증 모델.

도 14는 본 발명의 동맥경화증 모델의 심혈관질환과의 관련성을 프로테오믹스로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0020] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0023] 일 측면에서, 본 발명은 염증성 대식세포(M1 macrophage), 관상동맥 평활근 세포(vascular smooth muscle cell) 또는 관상동맥 내피세포(vascular endothelial cells), 및 메타크릴레이트 콜라겐(methacrylate collagen, ColMA) 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 일 구현예에서, 상기 바이오 잉크 조성물은 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 평활근 세포를 포함하는 제 1 바이오 잉크, 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 염증성 대식세포를 포함하는 제 2 바이오 잉크, 및 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 내피세포를 포함하는 제 3 바이오 잉크를 포함할 수 있다.
- [0025] 일 구현예에서, 상기 바이오 잉크 조성물은 3D 관상동맥 바이오 프린팅용일 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 바이오 잉크 조성물은 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤에 염증성 대식세포를 1×10^5 내지 1×10^7 cells/mL, 관상동맥 평활근 세포를 5×10^5 내지 5×10^7 cells/mL 또는 관상동맥 내피세포를 2×10^5 내지 2×10^7 cells/mL로 포함할 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 상기 바이오 잉크 조성물은 세포, 세포 배양액, 생리활성물질 및 첨가제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 함유될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 용어, "하이드로젤(hydrogel)"은 고분자 사슬이 삼차원 구조를 이루는 친수성 망상구조 물질로, 신체의 일부가 손상되거나 기능을 잃었을 때 조직이나 장기를 대체하기 위한 조직재생용 지지체로 사용이 가능하다. 하이드로젤은 수용액 상에서 물을 비롯한 친수성 성분들의 흡수를 통해 팽윤되면서 투명하게 되고, 또한 적당한 기계적 물성을 가진다. 이러한 팽윤도와 고분자의 기계적 물성은 주로 고분자 네트워크 구조의 물성에 의존한다. 이러한 하이드로젤을 만들 수 있는 소재로는 주로 고분자가 많이 사용되며, 이 고분자는 그 소재의 기원에 따라 천연고분자와 합성고분자로 나뉘어진다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어, "바이오 잉크"는 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 총칭한다. 바이오 잉크는 3D 가공을 위한 물리적 성질과 세포가 목적된 기능을 수행하게 하기 위한 생물학적 환경을 제공하며, 우수한 세포 친화성을 가지는 소재이다. 상기 바이오 잉크 조성물은 복수의 세포를 포함하는 액체, 반고체 또는 고체 조성물을 포함할 수 있다. 바이오 잉크는 액체 또는 반고체 세포 용액, 세포 현탁액, 또는 세포 농축물을 포함할 수 있다. 상기 바이오 잉크 조성

물은 1) 복수의 세포 또는 세포 응집체와 생체적합성 액체 또는 젤을 소정의 비율로 혼합하여 바이오 잉크를 제조하는 단계, 및 2) 바이오 잉크를 치밀화하여 원하는 세포 밀도 및 점도를 갖는 바이오 잉크를 제조하는 단계에 의해 제조된다.

[0030] 본 발명의 사용되는 세포 유형은 당업계에 공지된 임의의 방식으로 배양될 수 있다. 세포 및 조직 배양 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures; Freshney (1987), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다. 일반적인 포유동물 세포 배양 기술, 세포주, 및 본 발명과 함께 사용될 수 있는 세포 배양 시스템이 또한 문헌 Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G., (eds.) Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Wiley (1998)에 기술되어 있고, 상기 정보에 대한 이의 내용은 본원에 참고 인용된다.

[0031] 본 발명에 있어서 상기 바이오 잉크 조성물은 세포 배양 배지(배양액)를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지는 목적하는 세포에 적합한 임의의 배지를 포함하는 개념이며, 세포 배양 배지의 비제한적인 예시로는 돌베코 인산 완충 식염수, 얼 균형화 염, 행크 균형화 염, 티로드 염, 알시버 용액, 게이 균형화 염 용액, 크랩-헨젤라이트 변성 완충제, 크랩-링거 중탄산 완충제, 펙 식염수, 돌베코 변성 이글 배지, 돌베코 변성 이글 배지/영양소 F-12 Ham, 영양소 혼합물 F-10Ham(Ham's F-10), 배지 199, 이글 최소 필수 배지, RPMI-1640 배지, 에임즈배지, BGJb 배지(Fitton-Jackson Modification), 클릭 배지, CMRL-1066 배지, 피셔 배지, 글라스코우 최소 필수 배지(GMEM), 이스코브 변성 돌베코 배지(IMDM), L-15 배지(Leibovitz), 맥코이 5A 변성 배지, NCTC 배지, 스웜 S-77 배지, 웨이마우스 배지, 윌리엄 배지 E, 또는 이의 조합을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 세포 배양 배지는 알부민, 셀레늄, 트랜스페린, 페투인, 슈가, 아미노산, 비타민, 성장 인자, 사이토카인, 호르몬, 항생물질, 지질, 지질 담체, 사이클로텍스트린, 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서 상기 바이오 잉크 조성물은 세포 접착을 촉진하는 물질 및/또는 산화방지제를 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 바이오 잉크 조성물은 세포사(예, 괴사, 세포사멸, 또는 자율흡수작용)를 억제하는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 세포사를 억제하는 물질의 비제한적 예로서, 소분자, 항체, 펩티드, 펩티마이드, 항-TNF 물질, 인터류킨의 활성을 억제하는 물질, 인터페론의 활성을 억제하는 물질, GCSF(과립구 콜로니-자극 인자)의 활성을 억제하는 물질, 대식세포 염증성 단백질의 활성을 억제하는 물질, TGF-B(형질전환 성장 인자 B)의 활성을 억제하는 물질, MMP(매트릭스 메탈로프로티나제)의 활성을 억제하는 물질, 카스페이스의 활성을 억제하는 물질, MAPK/JNK 신호전달 캐스케이드의 활성을 억제하는 물질, Src 키나아제의 활성을 억제하는 물질, JAK(야누스 키나아제)의 활성을 억제하는 물질, 또는 이의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0033] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 바이오 잉크 조성물을 적재(loaded)하여 격자형 그물망 구조로 3D 바이오 프린팅하는 단계; b) 광 조사하여 가교결합시키는 단계; 및 c) 배양하는 단계를 포함하는, 3D 관상동맥 구조체의 제조방법에 관한 것이다.

[0034] 일 구현예에서, 상기 단계 a)에서 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 평활근 세포를 포함하는 제 1 바이오 잉크, 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 염증성 대식세포를 포함하는 제 2 바이오 잉크, 및 메타크릴레이트 콜라겐 하이드로젤 및 관상동맥 내피세포를 포함하는 제 3 바이오 잉크의 순서로 적재하여 3중층 구조로 3D 바이오 프린팅할 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 3중층 구조는 제1층, 제2층 및 제3층이 순차적으로 증착된 것일 수 있고, 상기 3중층은 각층이 분리되거나 결합되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 3중층은 제1층, 제2층 및 제3층이 동일한 구조로 프린팅된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 일 구현예에서, 두께 0.7 내지 1.5 mm의 시트형으로 3D 프린팅할 수 있다. 즉, 3중층 구조를 포함하는 관상동맥의 두께가 0.6 내지 1.5 mm일 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 내피세포를 포함하는 층은 0.1 내지 0.2 mm일 수 있으며, 관상동맥 내피세포를 포함하는 층은 0.4 내지 0.8 mm일 수 있고, 관상동맥 평활근 세포를 포함하는 층은 0.1 내지 0.5 mm일 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 광은, UV, 가시광 또는 레이저일 수 있으며, 가시광선인 것이 더욱 바람직하고, UV LED인 것이 가장 바람직하다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 단계 c)에서 3 내지 7일 동안 배양할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용된 용어, "바이오프린팅(bioprinting)"이란 자동화된, 컴퓨터 보조의, 삼차원 시제품화 장치(예, 바이오프린터)와 상용되는 방법론을 통해 삼차원의 정확한 세포 침착(예, 세포 용액, 세포 함유 젤, 세포

현탁액, 세포 농축물, 다세포 응집체, 다세포체 등)을 이용하는 것을 의미한다. 바이오 프린팅 발명은 연속 또는 실질적으로 연속일 수 있다. 연속 바이오 프린팅 방법의 비제한적 예는 바이오 잉크의 저장소에 연결되는 분사 팁(dispense tip) (예, 주사기, 모세관 등)을 통해 바이오 프린터로부터 바이오 잉크를 분사하는 것이다. 연속 바이오 프린팅 방법은 기능 단위의 반복 패턴에서 바이오 잉크를 분사하는 것이다. 상기 반복 기능 단위는 예를 들어 원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형, 다각형, 및 불규칙 기하구조를 포함하는 임의의 적당한 기하구조를 갖는다. 일 실시예에 있어서, 상기 바이오프린팅은 3D 바이오프린팅일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용된 용어, "3D 바이오 프린팅(three-dimensional bio printing)"은 3D 프린팅을 이용해 인공 생체조직 및 장기를 만들어내는 것으로, 인체 조직에서 추출한 세포를 포함한 바이오 잉크를 3D 프린터에 넣고, 3차원 공간에서 세포 구조물을 만드는 것을 의미할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 바이오 잉크 조성물을 이용하여 해부학적으로 또는 기능적으로 적용 가능한 복잡한 관상동맥 구조물/구조체를 생산할 수 있음을 시연하였다. 조직-특이적인 세포 종류 및 삼차원적 구조물에 적용된 바이오 잉크의 조합을 통하여, 세포에 내재된 재생산 능력을 이용할 수 있고, 이를 통해 필요한 조직 또는 장기를 생산해 내는 것이 가능할 수 있다. 삼차원적 바이오 프린팅된 조직 구조체에서, 노즐의 크기는 세포가 포함된 바이오 잉크의 집적을 부피 및 위치 측면에서 미세한 조작이 가능하도록 해준다. 뿐만 아니라, 본 발명의 관상동맥 구조체의 기하학적 및 구성적 구조를 조절할 수 있다. 따라, 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물을 이용하여 바이오 프린팅된 관상동맥 구조체는, 포유류 조직 및 기관과 해부학적으로 및 기능학적으로 유사성을 지닌 구조체를 제공해준다.

[0042] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 3D 관상동맥 구조체에 관한 것이다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 3D 관상동맥 구조체는 다공성이며, 격자형 그물망 구조를 가질 수 있고, 평균 공극 크기가 370 μ m 내지 480 μ m일 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 상기 3D 관상동맥 구조체는 평균 두께 0.7 내지 1.5 mm의 시트 형태일 수 있으며, 관상동맥 평활근 세포층, 염증성 대식세포층 및 관상동맥 내피세포층의 3중층 구조의 시트 형태일 수 있다.

[0045] 일 구현예에서, 상기 3D 관상동맥 구조체는 공극을 유지하면서 상하로 서로 교차하여 복수 개의 시트가 다층으로 적층된(layer-by-layer) 구조일 수 있다.

[0046] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 3D 관상동맥 구조체에 LDL(low density lipoprotein cholesterol)을 처리하는 단계를 포함하는, 3D 관상동맥경화증(coronary arteriosclerosis) 모델의 제조방법에 관한 것이다.

[0047] 일 구현예에서, 상기 3D 관상동맥 구조체에 LDL을 1 내지 5mg/mL의 농도로 처리할 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 상기 동맥경화증은 염증성 관상동맥경화증일 수 있다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조한 3D 관상동맥경화증 모델에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, 3D 관상동맥경화증 모델은 상기 3D 관상동맥 구조체에 LDL을 처리하고 3일 내지 13일차의 초기 단계 관상동맥경화증 모델일 수 있다.

[0051] 일 구현예에서, 3D 관상동맥경화증 모델은 상기 3D 관상동맥 구조체에 LDL을 처리하고 14일 이후의 후기 단계 관상동맥경화증 모델일 수 있다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 3D 관상동맥경화증 모델에 후보 약물을 처리하는 단계를 포함하는, 관상동맥경화증 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0054] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1. 관상동맥 조직 제작에 적합한 하이드로젤 선별

[0057] 관상동맥 조직을 3D로 제작하기 전에, 이에 사용할 세포 종류 및 밀도에 적합한 하이드로젤을 선별하기 위해, GelMA, ColMA 및 Gel4Tissue 하이드로젤 각각에 염증성 대식세포 (1×10^6 cells/mL), 관상동맥 평활근 세포 (5×10^6 cells/mL) 및 관상동맥 내피세포 (2×10^6 cells/mL)를 각각 혼합하여 바이오잉크를 제작하고 3개의 주사기에 각각 주입하여 3D 프린팅하여 F-액틴으로 면역형광염색하여 삼차원 구조 내에서 생착하여 세포 골격을 뺀

것을 확인하였다.

[0058] 그 결과, ColMA 하이드로젤이 본 발명의 3D 관상동맥 조직 제작에 있어 가장 적합한 것을 확인하였다 (도 1).

[0060] 실시예 2. 3D 관상동맥 조직 제작

[0061] 주사기 고정 장치, UV LED, 주사기 및 침대 온도 조절 장치가 장착된 바이오 프린팅 기계와 이의 소프트웨어로서 NewCreatorK (Rokit, Seoul, South Korea)를 사용하여, 그물망 구조의 관상동맥 조직을 삼차원 프린팅하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에서 선별한 콜마(ColMA) 하이드로젤을 실험 직전에 37℃에서 용해시키고, 용해한 콜마(ColMA) 하이드로젤에 염증성 대식세포 (1×10^6 cells/mL) (M1 대식세포), 관상동맥 평활근 세포 (5×10^6 cells/mL) 및 관상동맥 내피세포 (2×10^6 cells/mL)를 각각 혼합하여 바이오잉크를 제작하였다. 이를 3개의 주사기에 각각 주입한 뒤, 150 μ m의 테플론 바늘(Teflon needle)과 결합하고, 프린팅에 적합한 바이오잉크의 점도를 유지하기 위해 4℃에서 유지한 상태로 주사기 고정 장치에 장착시켰다. 주사기와 베드의 온도를 10 내지 20℃로 유지하고, 관상동맥 평활근 세포, 염증성 대식세포 및 관상동맥 내피세포의 순서로 3D 프린팅하여, 가장 위층에 내피세포 (두께 0.15mm), 중간층에 염증성 대식세포 (두께 0.6mm) 및 가장 아래층에 평활근세포 (두께 0.3mm)의 구조이며, 평균 공극 크기가 370 μ m 내지 480 μ m인 다공성인, 격자형 그물망 구조의 균질한 시트 구조물 (평균 직경 약 7 mm 및 높이 약 1.05 mm)을 제작하였다. 제조된 구조물에 UV LED를 조사하여 하이드로젤을 가교 결합시킨 후 12 웰 플레이트에서 배양하였다 (도 2).

[0062] 그 결과, 배양 0일 차에 3D 관상동맥 조직에서 세포가 아직 생착되지 않아 타원형의 형태를 띄고 있었던 반면, 4일 차에는 완전히 삼차원 구조 내에서 생착하여 세포 골격을 뺀 것으로 관찰되었다 (도 3). 또한, 0일 차 및 4일 차에 세포 생존력을 비교한 결과, 세포 생존력이 유사한 수준인 것으로 나타났으며 (도 4), 염증성 대식세포 (마커: CD80), 관상동맥 평활근 세포 (마커: smooth muscle actin, SMA) 및 관상동맥 내피세포 (마커: von Willebrand Factor, vWF)가 layer-by-layer 형태로 잘 적층되어 있는 것을 확인하였다 (도 5).

[0064] 실시예 3. 동맥경화증 모델 제작

[0065] 동맥경화증 모델링을 위해 상기 실시예 2에서 제작한 3D 관상동맥 조직에 LDL을 2mg/mL을 처리하여 염증성 동맥 경화를 유발하고 12시간, 1일, 3일, 6일 및 14일까지 관찰하였다.

[0067] 실시예 4. 동맥경화증 모델의 동맥경화증 진행에 따른 조직학적 분석

[0068] 4-1. 조직 내 ApoB 단백질 축적 확인

[0069] 상기 실시예 3에서 제작한 동맥경화증 모델에서 혈류를 순환하는 콜레스테롤이 함유된 입자의 수를 나타내는 지표인 ApoB 단백질의 조직 내 축적을 DAB 염색기법으로 확인하여 염증성 동맥경화증 모델링을 확인하고, 이를 지표로 초기 및 후기로 염증성 동맥경화증 모델을 구별하였다.

[0070] ApoB 단백질의 조직 내 축적을 확인한 결과, 초기에는 ApoB 단백질의 축적이 미미하였으나, 염증 유도 3일 차부터 ApoB 단백질의 축적이 현저하게 증가하였으며 14일 차에 가장 많이 축적된 것으로 나타났다 (도 6). 이에, 기준 그룹(baseline) (0일 차)을 기준으로, 축적이 심화 되는 시기를 초기 동맥경화증(Early athero) 그룹으로, 가장 축적이 많이된 시기를 후기 동맥경화증(Late athero) 그룹으로 명명하였다.

[0072] 4-2. 조직 내 LDL 흡수 거품 세포 확인

[0073] LDL 처리에 의한 염증성 동맥경화증 모델링 후, Oil-Red-O 염색으로 조직 내 LDL 흡수 거품 세포 (관상동맥 평활근 세포 및 대식세포)들을 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 상기 실시예 4-1의 ApoB 단백질 축적 결과와 마찬가지로 염증 유도 3일차부터 LDL 흡수 거품 세포들이 현저하게 증가하였으며, 14일차에 가장 많이 증가되는 것으로 나타났다 (도 7). Oil-Red-O 양성 세포들을 계수하여 이를 정량적으로 분석한 결과, 기준 그룹 (baseline)에 비해 동맥경화의 발병 진행에 따라 점점 Oil-Red-O 양성 세포들이 증가하는 것으로 나타났다 (도 8).

[0076] 실시예 5. 동맥경화증 모델의 동맥경화증 진행에 따른 세포학적 분석

[0077] 초기 동맥경화증(Early athero) 그룹 및 후기 동맥경화증(Late athero) 그룹에서 거품 세포의 LDL 흡수를 더 자세히 관찰하기 위해, 중성 지질, 오일 및 기타 비극성 지질에 대한 마커인 보디피(Bodipy) 염색을 수행하고 시각화하였다. 또한, 대식세포는 죽상동맥경화증 동안 거품 세포의 형성 및 유지를 촉진하고 CD146은 대식세포 거품 세포에서 상향 조절되므로, CD146 양성 거품 세포를 시각화하기 위해 CD146으로 형광 면역염색을 수행하였다. 아울러, TEM 이미징을 통해 세포 미세구조를 확인하여 거품 세포에 흡수된 LDL을 분석하였다.

[0078] 그 결과, 기준 그룹 (Baseline) 및 초기 동맥경화증 그룹 (Early athero)에 비해 후기 동맥경화증 그룹 (Late athero)에서 보디피 양성 거품 세포가 현저하게 증가했으며 (도 9 및 10), 후기 동맥경화증 그룹의 거품 세포에서 점 모양의 LDL이 관찰되었다 (도 9). 또한, CD146 양성 거품 세포가 기준 그룹 (Baseline)에 비해 초기 동맥경화증 그룹 (Early athero)에서 증가하는 것으로 나타났으며, 특히, 후기 동맥경화증 그룹 (Late athero)에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 11). 아울러, 세포 미세구조를 확인한 결과, 거품 세포에 흡수된 LDL이 기준 그룹 (Baseline)에 비해 초기 동맥경화증 그룹 (Early athero)에서 증가하였으며, 후기 동맥경화증(Late athero) 그룹에서 가장 많은 것으로 나타났다 (도 12).

[0080] 실시예 6. 동맥경화증 모델의 동맥경화증 진행에 따른 분자학적 분석

[0081] LDL 처리에 의한 염증성 동맥경화증을 유도한 삼차원 동맥경화 모델에서 염증성 단백질 MCP-1, TNF- α , IL-6 및 IL-8의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인하여 염증성 동맥경화증의 유도를 확인하였다.

[0082] 그 결과, 기준 그룹 (Baseline) 및 초기 동맥경화증 그룹 (Early athero)에 비해 후기 동맥경화증(Late athero) 그룹에서 MCP-1, TNF- α , IL-6 및 IL-8의 발현이 현저하게 증가된 것을 확인하였다 (도 13).

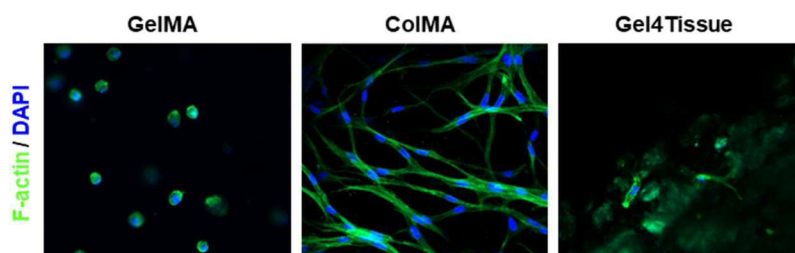
[0084] 실시예 7. 동맥경화증 모델의 심혈관질환 모사 검증

[0085] 본 발명에서 제작된 3D 동맥경화증 모델이 실제로 심혈관질환과 연관이 있는지 확인하기 위해, 단백질의 발현 수준, 수정 및 상호작용, 단백질 패턴 등을 조사하여 질병과의 연관성을 확인하는 데 사용되는 프로테오믹스 분석을 수행하였다.

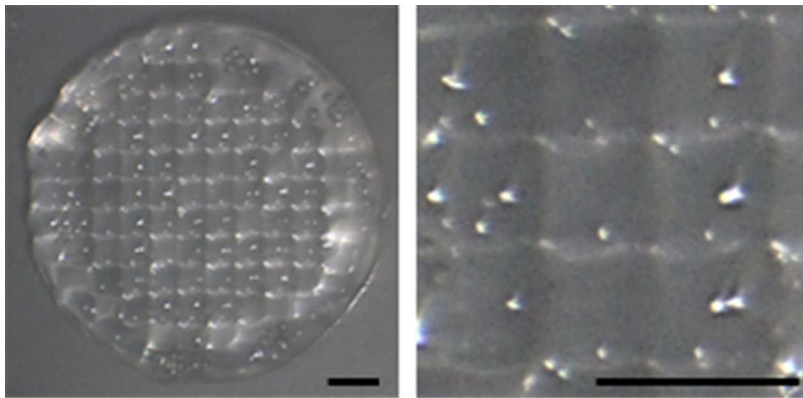
[0086] 그 결과, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델이 동맥경화를 포함한 다양한 심혈관질환 질병들과 관련된 단백질들을 발현하는 것을 확인하였다 (도 14).

도면

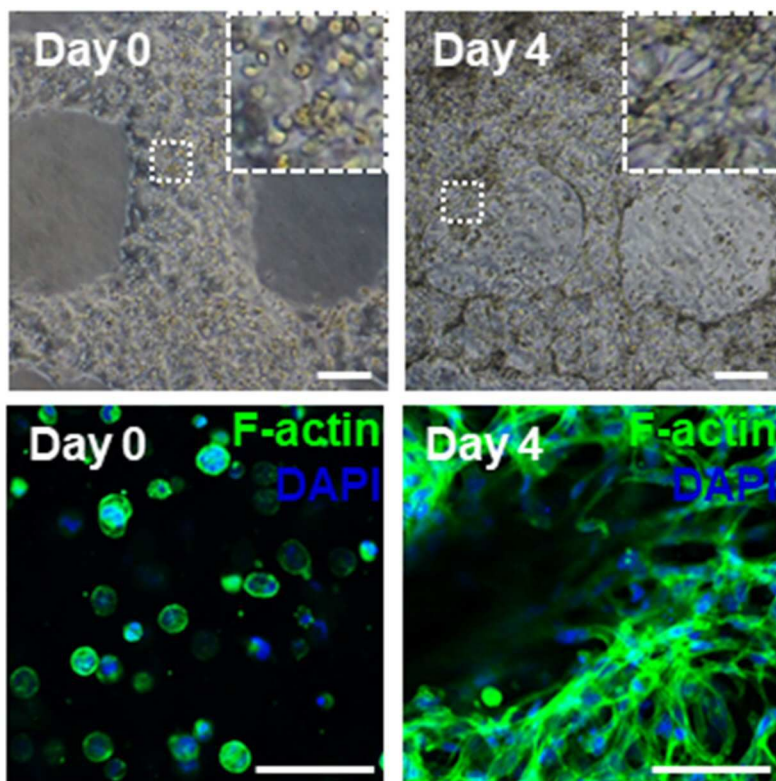
도면1



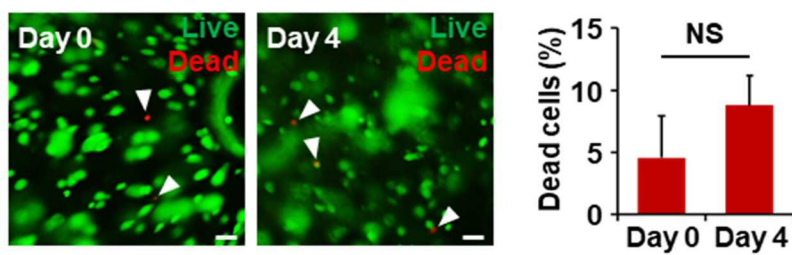
도면2



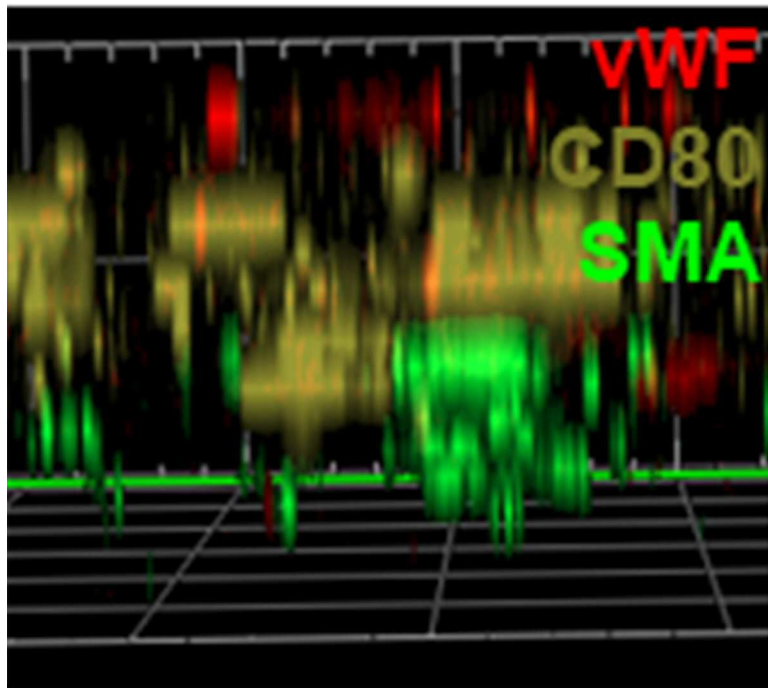
도면3



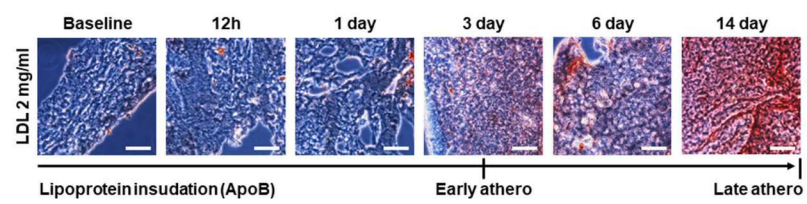
도면4



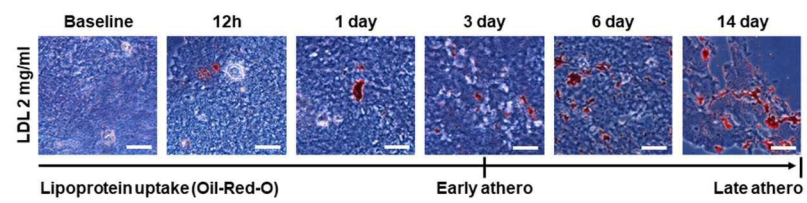
도면5



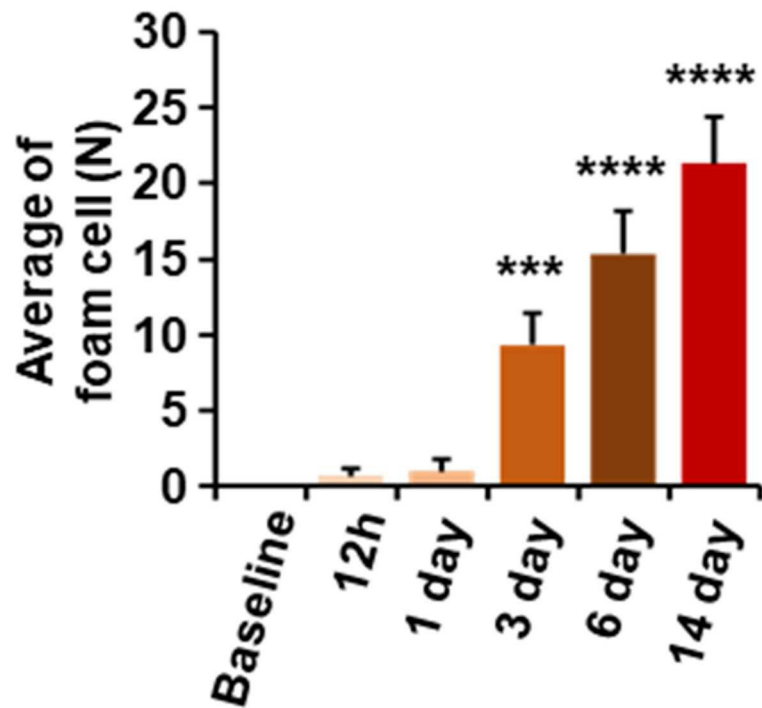
도면6



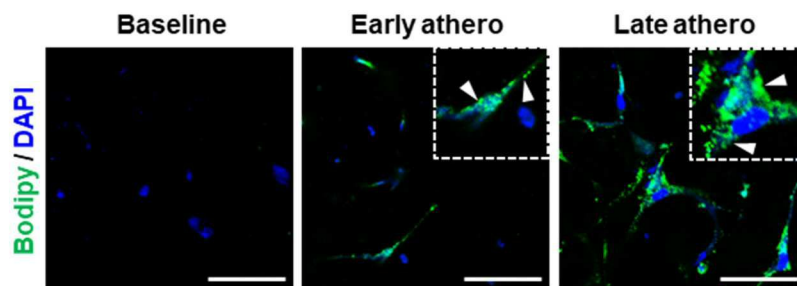
도면7



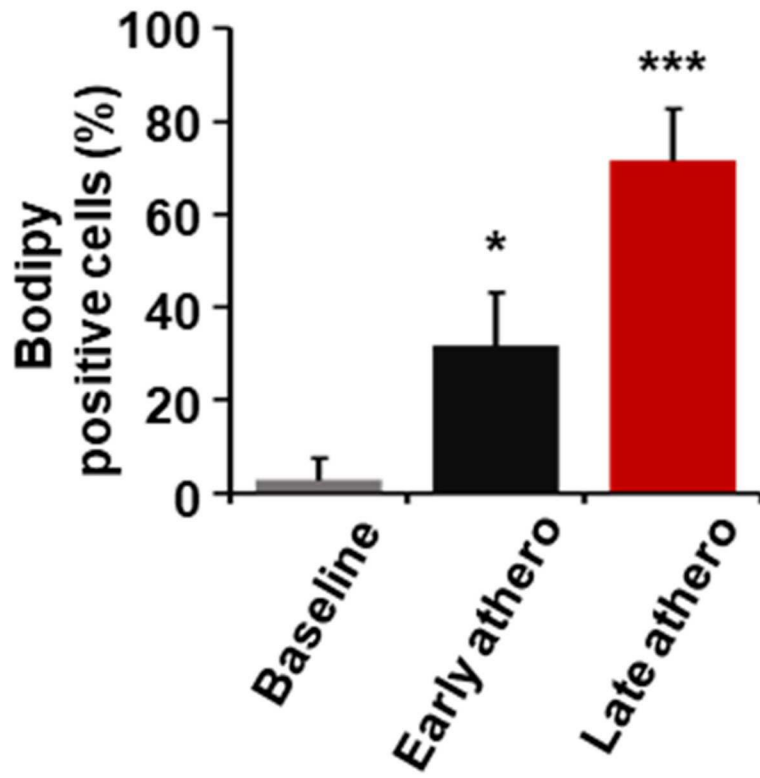
도면8



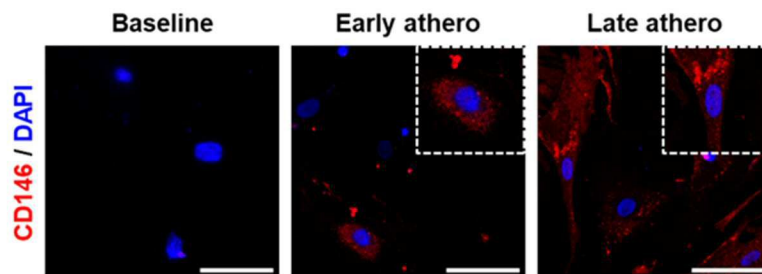
도면9



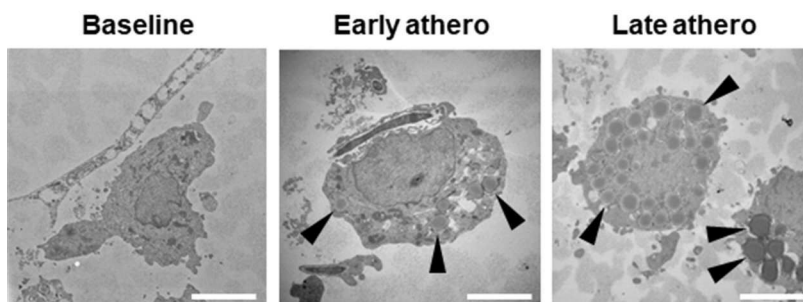
도면10



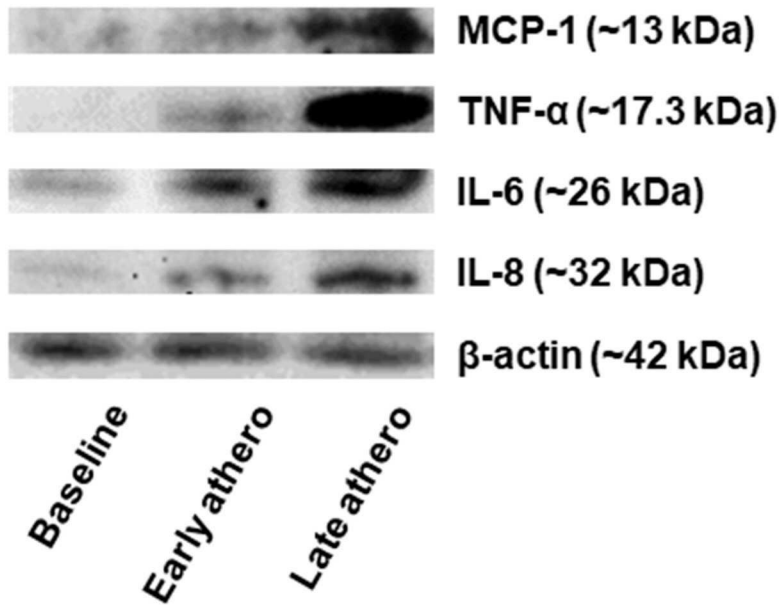
도면11



도면12



도면13



도면14

