



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월14일
(11) 등록번호 10-1612049
(24) 등록일자 2016년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/38 (2006.01) A61F 2/02 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61L 27/3886 (2013.01)
A61F 2/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7027110(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년06월24일
심사청구일자 2015년10월01일
(85) 번역문제출일자 2015년10월01일
(65) 공개번호 10-2015-0116918
(43) 공개일자 2015년10월16일
(62) 원출원 특허 10-2011-7001559
원출원일자(국제) 2009년06월24일
심사청구일자 2014년01월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/048530
(87) 국제공개번호 WO 2010/008905
국제공개일자 2010년01월21일
(30) 우선권주장
61/132,977 2008년06월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02005081970 A2
US20050276791 A1
Marga, F. et al., Deveopmental Biology and
Tissue Engineering, Birth Defects Research
(Part C) 2007, Vol.81, pages 320-328
- (73) 특허권자
더 큐레이터스 오브 더 유니버시티 오브 미주리
미국, 65211 미주리, 콜럼비아, 유니버시티 홀
316
(72) 발명자
포각스 가보르
미국 13676 뉴욕주 포츠담 폴리산트 에스티. 16
마르가 프랑스와즈 수잔느
미국 65201 미주리주 콜롬비아 에이피티. 케이 아
슬란드 알디. 1401
노로프 시릴
프랑스 에프-75016 파리 블르바드 쉬셋 53
(74) 대리인
양영준, 안국찬

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 정재철

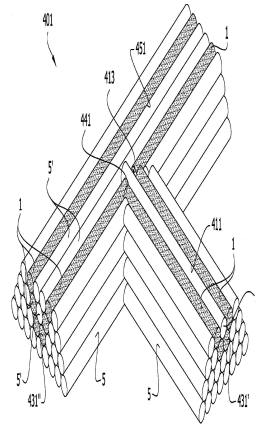
(54) 발명의 명칭 자가-조립가능 다세포체 및 이들을 이용하여 3차원 생물학적 구조체를 생산하는 방법

(57) 요약

조직 공학을 위한 구조와 방법은 복수의 생존 세포를 포함하는 다세포체를 포함한다. 복수의 다세포체는 패턴으로 배열될 수 있고 융합하여 가공된 조직을 형성할 수 있다. 이러한 배열 (arrangement)은 생물적합성 물질을 포함하는 충전체를 포함할 수 있고, 이러한 기질은 다세포체로부터 세포의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 상기

(뒷면에 계속)

대표도



기질에 대한 부착에 저항한다. 3차원 구조체는 바람직하게는, 실질적인 길이 (substantial length)를 갖는 접촉 부분을 따라 인접하는 다세포체 사이에 직접적인 접촉이 존재하도록 다세포체 및 충전체를 프린팅 (printing)하거나, 또는 그렇지 않으면 적층 (stacking)함으로써 조립될 수 있다. 다세포체 사이에 직접적인 접촉은 효율적이고 신뢰할 수 있는 융합 (fusion)을 촉진한다. 인접하는 다세포체 사이에 증가된 접촉 부분 역시 효율적이고 신뢰할 수 있는 융합을 촉진한다. 이들 3차원 구조체 (three dimensional construct)의 조립을 용이하게 하는 특징을 갖는 다세포체를 생산하는 방법 역시 제시된다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/222 (2013.01)

A61L 27/225 (2013.01)

C12M 21/08 (2013.01)

C12M 23/10 (2013.01)

C12M 3/00 (2013.01)

C12M 35/08 (2013.01)

C12N 5/0062 (2013.01)

C12N 5/0602 (2013.01)

C12N 5/0691 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

3차원 생물학적 가공된 조직(tissue)을 생산하는 방법으로,

각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하도록 하는 패턴에 따라, 복수의 다세포체를 기질 상에 배열하는 단계, 여기서 각 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함하고,

각각의 충전체가 적어도 하나의 다세포체 또는 다른 충전체와 접촉하도록 하는 패턴으로, 다세포체와 함께 하나 이상의 충전체를 배열하는 단계, 여기서 각 충전체는 다세포체로부터 충전체 내로의 세포의 이동과 내성장을 억제하고 다세포체 내의 세포의 충전체에 대한 부착을 억제하는 생물적합성 물질을 포함하고,

3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하도록 다세포체 중에서 적어도 하나가 적어도 하나의 다른 다세포체와 융합하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 배열하는 단계는 다세포체에 의해 점유되지 않고 충전체에 의해 점유되지 않은 복수의 공간을 보유하는 3차원 구조체를 형성하도록 이들 다세포체 및 충전체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 복수의 공간 중에서 적어도 일부를 조직 배양 배지로 채우는 단계를 더 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 배열하는 단계는 적어도 1000 마이크로미터 길이를 갖는 접촉 부분을 따라, 다세포체 중에서 적어도 2개를 서로 접촉시키는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 가공된 조직을 획득하도록 융합된 다세포체로부터 충전체를 분리하는 단계를 더 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 충전체를 배열하는 단계는 영양소에 투과성인 충전체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는 각각, 길이방향 축을 따라 7,850 스퀘어 마이크로미터 내지 360,000 스퀘어 마이크로미터 범위의 평균 단면적을 갖는 다세포체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는 적어도 1000 마이크로미터 길이를 갖는 다세포체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는 30 센티미터 미만의 길이를 갖는 다세포체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는 단일 유형의 세포로 구성되는 다세포체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는, 각각의 다세포체가 제1 유형의 생존 세포를 포함하고 그리고 각 다세포체 내의 세포 중에서 적어도 90%가 제1 유형의 세포인 다세포체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 다세포체를 배열하는 단계는, 복수의 제1 유형의 생존 세포 및 복수의 제2 유형의 생존 세포를 포함하는 하나 이상의 다세포체를 배열하는 단계를 포함하고, 제2 유형은 제1 유형과 상이한, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 제1 유형의 생존 세포는 내피 세포이고, 제2 유형의 생존 세포는 평활근 세포인, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 제1 유형의 생존 세포는 평활근 세포이고, 제2 유형의 생존 세포는 섬유아세포인, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 제1 유형의 생존 세포는 내피 세포이고, 제2 유형의 생존 세포는 섬유아세포인, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 다세포체 중에서 하나 이상은 복수의 제1 유형의 생존 세포, 복수의 제2 유형의 생존 세포, 그리고 복수의 제3 유형의 생존 세포를 포함하고, 여기서 제1 유형, 제2 유형 그리고 제3 유형은 서로 다른, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 제1 유형의 생존 세포는 내피 세포이고, 제2 유형의 생존 세포는 평활근 세포이고, 그리고 제3 유형의 생존 세포는 섬유아세포인, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 다세포체 및 충전체를 배열하는 단계는 각각 형상이 균일한 다세포체 및 충전체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 다세포체 및 충전체를 배열하는 단계는 형상이 서로 동일한 다세포체와 충전체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 다세포체 및 충전체를 배열하는 단계는 길이가 너비의 2배 이상 및 높이의 2배 이상인 다세포체 또는 충전체를 배열하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 각 다세포체 내의 세포들은 서로 응집되는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 세포의 응집은, 다세포체의 상부에 상기 다세포체와 동일한 다른 다세포체가 놓일 때, 각각의 다세포체가 다른 다세포체의 중량을 지지할 수 있는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

청구항 23

3차원 생물학적 가공된 조직(tissue)을 생산하는 방법으로,

각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하도록 하는 패턴에 따라, 길이가 너비의 2배 이상 및 높이의 2배 이상인 복수의 다세포체를 배열하는 단계, 여기서 각 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함하고,

각각의 충전체가 적어도 하나의 다세포체 또는 다른 충전체와 접촉하도록 하는 패턴으로, 다세포체와 함께 하나 이상의 충전체를 배열하는 단계, 여기서 각 충전체는 다세포체로부터 충전체 내로의 세포의 이동과 내성장을 억제하고 다세포체 내의 세포의 충전체에 대한 부착을 억제하는 생물적합성 물질을 포함하고,

3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하기 위하여 다세포체 중에서 적어도 하나가 적어도 하나의 다른 다세포체와 융합하는 단계를 포함하는, 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 보조금 진술

[0002] 본 발명은 미국 국립 과학 재단 (National Science Foundation)으로부터 Grant No. NSF-0526854 하에, 부분적으로 정부 지원을 받았다. 미국 정부는 본 발명에 일정한 권리를 갖는다.

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 재생 의학 (regenerative medicine)과 조직 공학 (tissue engineering)의 분야, 그리고 더욱 구체적으로 원하는 구조를 갖는 가공된 조직/장기의 생산에 관계한다.

배경 기술

[0005] 배경기술

[0006] 조직 공학은 혈관 (blood vessel)을 비롯한 이식가능 장기의 만성적인 부족과 결부된, 장기와 조직 대체물에 대한 증가하는 수요에 의해 유발된 문제점에 유망한 해법을 제공한다. 가령, 미국에서, 수천 명의 사람들이 장기 이식을 위한 대기자 명단에 올라있다. 다수는 병든 동맥 또는 정맥에 대한 대체 혈관 (replacement blood vessel) 또는 대체 복부 장기 (replacement abdominal organ)의 부족으로 사망할 것이다. 이식을 위한 혈관과 장기의 불충분한 공급의 문제점을 줄이고 궁극적으로 해결하기 위하여, 조직 공학자들은 실험실에서, 높은 정밀도로, 대규모로, 그리고 상대적으로 짧은 시간 내에 이식가능 혈관, 혈관 대용물, 장기, 또는 장기 대용물을 구축하고 성장시키기 위하여 노력하고 있다.

[0007] 가공된 조직을 구축하는 다양한 방법이 시도되고 개발되었으며 제한적으로 성공적이었다. 하지만, 맥관화 (vascularization)된 3차원 장기의 조립 (assembly)은 달성된 바가 없다.

[0008] 기존 해법은 유망하긴 하지만, 다수의 과제를 안겨주었다. 뼈대 (scaffold) 선택, 면역원성 (immunogenicity), 분해 속도 (degradation rate), 분해 산물의 독성, 숙주 염증 반응 (host inflammatory response), 뼈대 분해로 인한 섬유성 조직 형성 (fibrous tissue formation), 그리고 주변 조직과의 기계적 미스매치 (mechanical mismatch)가 가공된 조직 구조체 (tissue construct)의 장기 행태 (long term behavior)에 영향을 주고, 이의 일차적인 생물학적 기능을 직접적으로 간섭할 수 있다. 가령, 심근 조직 (myocardial tissue)은 이웃하는 세포를 빈틈없이 서로 연결하는 갭 정션 (gap junction)을 통한 동시 박동 (synchronous beating)을 담보하기 위하여 높은 세포 밀도 (cell density)를 필요로 한다.

[0009] 심장 조직 공학에서 뼈대의 이용은 감소된 세포-세포 연결 (cell-to-cell connection), 그리고 세포의 매트릭스 (ECM; 예를 들면, 콜라겐과 엘라스틴)의 부정확한 침착 (deposition)과 정렬 (alignment)과 연관되고, 뼈대 생

물분해 및 심근 구조체의 힘-발생 능력 (force-generating ability)에 영향을 주었다. ECM-관련된 인자는 또한, 맥관 조직 공학 (vascular tissue engineering)에서 특히 중요하다. 대부분 이러한 이유로, 종종 조직-가공의 "성배(holy grail)"로 지칭되는 성인 동맥 맥관우회술 (adult arterial revascularization)을 위한, 고유 혈관에 필적하는 기계적 강도 (mechanical strength)를 갖는 뼈대-가공된 작은-직경 혈관 대용물의 기대는 아직 실현되지 않고 있다. 시험관내에서 탄성 섬유 (elastic fiber)를 생산할 때 재현되는 어려움 이외에, 뼈대의 이용은 추가적인 문제를 안겨준다. 이들 겔의 선천적인 약함은 조직-가공된 혈관의 최종 강도에 방해가 될 수 있다. 이에 더하여, 잔류 중합체 단편의 존재는 혈관 벽의 정상적인 조직을 파괴할 수 있고, 심지어 평활근 세포 (smooth muscle cell, SMC) 표현형에 영향을 줄 수 있다. 이런 이유로, 조직-가공된 혈관 이식편의 첫 번째 임상적 적용 (clinical application)이 저압 적용 (low-pressure application)을 목표로 하거나, 또는 시트 (sheet)-기초된 조직-가공으로 불리는 완전하게 뼈대-없는 방법에 의존했던 것은 놀라운 일이 아니다.

[0010] 장기 프린팅 (organ printing), 특히 U.S. Pat. App. No. 10/590,446에서 기술된 기술은 3차원 조직을 생산하는데 가능성을 보였다. 장기 프린팅은 일반적으로, 기능성 장기 모듈 (functional organ module) 및 궁극적으로, 전체 장기를 층별로 구축하는 것을 목적으로 하는 컴퓨터-이용된, 디스펜서-기초된, 3차원 조직-가공 기술이다. U.S. Pat. App. No. 10/590,446에서 기술된 기술에서, 개별 다중세포 집합체는 겔 또는 다른 지지체 매트릭스 (support matrix) 내로 프린팅된다. 최종 기능성 조직은 개별 집합체의 프린팅후 융합으로부터 산출된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 미국특허출원번호 제10/590,446호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 요약

[0013] 본 발명의 한 가지 측면은 가늘고 긴 다세포체 (elongate multicellular body)이다. 상기 다세포체는 복수의 생존 세포 및 조직 배양 배지를 포함한다. 이들 세포는 서로 응집된다. 다세포체는 적어도 대략 1000 마이크로 (micron)의 길이 및 세로를 따라 대략 7,850 스퀘어 마이크로 (square micron) 내지 대략 360,000 스퀘어 마이크로 범위의 평균 단면적을 갖는다.

[0014] 본 발명의 다른 측면은 가공된 가늘고 긴 다세포체이다. 상기 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 적어도 대략 1000 마이크로 (micron)의 길이 및 세로를 따라 대략 7,850 스퀘어 마이크로 (square micron) 내지 대략 360,000 스퀘어 마이크로 범위의 평균 단면적을 갖는다.

[0015] 다른 구체예는 비-지배성과 비-연골성 가늘고 긴 다세포체이다. 상기 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 적어도 대략 1000 마이크로 (micron)의 길이 및 세로를 따라 대략 7,850 스퀘어 마이크로 (square micron) 내지 대략 360,000 스퀘어 마이크로 범위의 평균 단면적을 갖는다.

[0016] 본 발명의 다른 측면은 내강 (lumen)-없는 가늘고 긴 다세포체이다. 상기 다세포체는 복수의 생존 세포 및 조직 배양 배지를 포함한다. 이들 세포는 서로 응집된다. 다세포체는 적어도 대략 2인 가로세로비를 갖는다.

[0017] 본 발명의 한 측면에서, 점탄성 경도 (viscoelastic consistency)를 갖는 원하는 3차원 형상으로 복수의 세포 또는 세포 집합체로 만들어지는 다세포체가 기술된다. 다세포체는 복수의 세포 또는 세포 집합체를 포함하고, 여기서 이들 세포 또는 세포 집합체는 서로 응집하여 점탄성 경도, 원하는 세포 밀도 (cell density), 그리고 편의한 조작 (manipulation)과 처리 (handling)를 위한 충분한 완전성 (integrity)을 갖는 미리 결정된 형상으로 구조체를 형성한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은 복수의 생존 세포를 포함하는 가늘고 긴 다세포체를 생산하는 방법이다. 복수의 생존 세포를 포함하는 세포 페이스트는 가늘고 긴 형상으로 형상화된다. 이러한 형상화된 세포 페이스트는 세포가 서로 응집하여 가늘고 긴 다세포체를 형성할 수 있도록 통제된 환경에서 배양된다.

- [0019] 본 발명에 따른 복수의 생존 세포를 포함하는 다세포체를 생산하는 다른 방법은 세포 페이스트를 3차원 형상으로 유지시키는 장치 (device)에서, 복수의 생존 세포를 포함하는 세포 페이스트를 형상화하는 단계를 포함한다. 이러한 형상화된 세포 페이스트는 통제된 환경에서 배양되고, 이때 상기 세포 페이스트는 평평한 표면에서 스스로를 지지할 만큼 충분한 응집을 갖는 다세포체를 생산할 만큼 충분한 시간 동안 상기 3차원 형상으로 유지된다.
- [0020] 또한, 복수의 생존 세포를 포함하는 가늘고 긴 다세포체를 생산하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 복수의 생존 세포를 포함하는 세포 페이스트를 가늘고 긴 형상으로 형상화하는 단계, 그리고 세포가 서로 응집하여 가늘고 긴 다세포체를 형성할 수 있도록 하는 통제된 환경에서 상기 형상화된 세포 페이스트를 배양하는 단계를 포함한다. 본 발명의 이러한 측면에서, 복수의 세포 또는 세포 집합체를 포함하는 가늘고 긴 다세포체를 점탄성 경도를 갖는 미리-결정된 형상으로 생산하는 방법이 기술된다. 한 가지 구체예에서, 다세포체를 생산하는 방법은 1) 원하는 세포 밀도와 점성도를 갖는 복수의 미리-선택된 세포 또는 세포 집합체를 포함하는 세포 페이스트를 제공하는 단계, 2) 상기 세포 페이스트를 원하는 형상으로 조작하는 단계, 그리고 3) 성숙 분열 (maturation)을 통해 다세포체를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 측면에서, 원하는 3차원 생물학적 구조체를 구축하기 위하여 앞서 기술된 다세포체와 공동으로 이용되는 충전체가 기술된다. 충전체는 미리 결정된 형상으로 물질을 포함하고, 여기서 상기 물질은 세포의 내성장, 이동과 부착을 억제하고, 그리고 또한, 조직 배양 배지에 침투성 (즉, 영양소에 침투성)일 수 있다. 충전체는 아가로스, 한천 및/또는 기타 수화겔 (hydrogel)과 같은 물질로 만들어질 수 있다. 생물학적 구조체의 구축 동안, 이들 충전체는 미리-결정된 패턴에 따라, 다세포체가 없는 도메인을 규정하는데 이용된다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에서, 충전체를 형성하는 방법이 기술된다. 일반적으로, 상기 방법은 겔-유사 조건에서 미리-선택된 적절한 물질을 원하는 형상으로 제조한다 (가령, 조작한다). 본 발명의 방법의 한 가지 구체예에 따라, 이러한 제조 방법은 1) 상기 물질의 점성도를 액체-유사 물질로 낮추는 단계, 2) 상기 액체-유사 물질을 미리-결정된 형상으로 형상화하는 단계, 그리고 3) 상기 물질의 점성도를 원하는 겔-유사 충전물 매트릭스 단위의 점성도로 높이는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구체예는 복수의 비-지배성 가늘고 긴 다세포체를 포함하는 3차원 구조이다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하고, 그리고 이들 다세포체가 서로 응집되지 않는 패턴으로 배열된다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면은 3차원 구조이다. 상기 구조는 복수의 가공된 가늘고 긴 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하고, 그리고 이들 다세포체가 서로 응집되지 않는 패턴으로 배열된다.
- [0025] 다른 구체예에서, 3차원 구조는 복수의 가늘고 긴 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포 및 조직 배양 배지를 포함한다. 다세포체는 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하고, 그리고 이들 다세포체가 서로 응집되지 않는 패턴으로 배열된다.
- [0026] 또 다른 구체예에서, 3차원 구조는 복수의 비-지배성 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 다세포체 중에서 적어도 하나가 적어도 대략 1000 마이크로미터인 길이를 갖는 접촉 부분을 따라 이들 다세포체 중에서 다른 것과 접촉하는 패턴으로 배열된다.
- [0027] 본 발명의 다른 측면에서, 3차원 구조는 복수의 가공된 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체는 다세포체 중에서 적어도 하나가 적어도 대략 1000 마이크로미터인 길이를 갖는 접촉 부분을 따라 이들 다세포체 중에서 다른 것과 접촉하는 패턴으로 배열된다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 3차원 구조는 복수의 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포 및 조직 배양 배지를 포함한다. 다세포체는 다세포체 중에서 적어도 하나가 적어도 대략 1000 마이크로미터인 길이를 갖는 접촉 부분을 따라 이들 다세포체 중에서 다른 것과 접촉하는 패턴으로 배열된다.
- [0029] 3차원 구조의 다른 구체예는 복수의 다세포체를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 상기 구조는 또한, 복수의 분리된 충전체를 포함한다. 각각의 충전체는 다세포체로부터 세포의 충전체 내로의 이동과 내 성장을 억제하고 다세포체 내에 세포의 충전체에 대한 부착을 억제하는 생물적합성 물질을 포함한다. 다세포체 및 충전체는 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체 또는 적어도 하나의 충전체와 접촉하는 패턴으로 배열된다.

- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 복수의 다세포체를 포함하는 3차원 구조이다. 각각의 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 상기 구조는 또한, 복수의 충전체를 포함한다. 각각의 충전체는 다세포체로부터 세포의 충전체 내로의 이동과 내성장을 억제하고 다세포체 내에 세포의 충전체에 대한 부착을 억제하는 생물적합성 물질을 포함한다. 이들 다세포체 및 충전체는 3차원 구조 내에, 다세포체에 의해 점유되지 않고 충전체에 의해 점유되지 않는 복수의 공간을 형성하도록 배열된다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법이다. 상기 방법은 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하도록 하는 패턴에 따라 복수의 가늘고 긴 다세포체를 배열하는 단계를 포함한다. 각각의 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함한다. 이들 다세포체 중에서 적어도 하나는 적어도 하나의 다른 다세포체와 융합하도록 허용된다.
- [0032] 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법의 다른 구체예에서, 복수의 다세포체 및 복수의 충전체는 각각의 다세포체가 (i) 다른 다세포체 또는 (ii) 충전체 중에서 적어도 하나와 접촉하도록 하는 패턴에 따라 배열된다. 각각의 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함한다. 각각의 충전체는 생물적합성 물질을 포함하고, 이러한 생물적합성 물질은 다세포체로부터 세포의 상기 물질 내로의 이동과 내성장을 억제하고 다세포체 내에 세포의 충전체에 대한 부착을 억제한다. 이들 다세포체 중에서 적어도 하나는 적어도 하나의 다른 다세포체와 융합하도록 허용된다.
- [0033] 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 복수의 다세포체를 미리-결정된 패턴으로 미리-선택된 수용 환경에 전달한다. 이러한 가공 방법의 한 가지 구체예에 따라, 다세포체는 미리-선택된 충전체와 공동으로 이용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 한 가지 구체예에서, 상기 방법은 1) 복수의 다세포체를 복수의 충전체와의 미리 결정된 조합으로 미리-결정된 패턴에 따라 전달하여 쌓여있는 또는 층을 이루는 구조체를 형성하는 단계, 여기서 이들 다세포체 및 충전체는 연속되고, 2) 층을 이루는 구조체를 성숙 분열(maturation) 동안 미리-선택된 통제된 환경에 놓아두는 단계, 여기서 이들 다세포체는 서로 융합하여 융합된 구조체를 산출하고, 그리고 3) 융합된 구조체로부터 충전체를 제거하여 원하는 생물학적 구조체를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0034] 본 발명의 다른 구체예는 적어도 하나의 충전체 및 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함하는 3차원 구조이다. 이들 세포는 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 관상 구조를 형성한다. 충전체는 유순한 생물적합성 물질을 포함하고, 이러한 생물적합성 물질은 세포의 상기 물질 내로의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 상기 물질에 대한 부착을 억제한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 측면은 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함하는 다세포체를 생산하기 위한 주형(mold)이다. 상기 주형은 생물적합성 기질을 포함하고, 이러한 생물적합성 기질은 세포의 상기 기질 내로의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 상기 기질에 대한 부착을 억제한다. 상기 기질은 상대적으로 더욱 낮은 응집을 갖는 복수의 세포를 포함하는 조성물을 수용하고, 다세포체를 형성하기 위하여 응집이 증가하는 성숙 분열 기간(maturation period) 동안 상기 조성물을 원하는 형상으로 유지하도록 형상화된다. 이들 다세포체의 원하는 형상은 적어도 대략 1000 마이크론의 길이를 갖고 다세포체 내에 모든 세포가 상기 다세포체의 외면(exterior)으로부터 단지 대략 250 마이크론이 되도록 설정된다.
- [0036] 본 발명의 다른 구체예는 복수의 다세포체를 생산하는데 적합한 주형을 만들기 위한 도구(tool)이고, 여기서 각 다세포체는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 상기 도구는 상부와 하부를 보유하는 본체를 포함한다. 복수의 지느러미 모양 돌출(fin)이 상기 본체의 하부로부터 확장한다. 각각의 지느러미 모양 돌출은 홈(groove) 내에 배치된 생존 세포를 가늘고 긴 다세포체로 형성하도록 설정된 생물적합성 겔 기질에서 홈을 형성하기 위하여 대략 100 마이크론 내지 대략 800 마이크론 범위의 너비를 갖는다. 이들 지느러미 모양 돌출은 세로축을 갖고, 지느러미 모양 돌출 중에서 적어도 하나는 이들 지느러미 모양 돌출 중에서 다른 것의 세로축으로부터 측면으로 떨어져 있다.

과제의 해결 수단

- [0037] 상세한 설명
- [0038] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 그리고 다른 참고문헌은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.
- [0039] 가공된 조직을 생산하기 위한 신규한 구조와 방법이 제시된다. 이러한 기술은 3차원 구조체를 조립하는데 이용

될 수 있는 빌딩 블록 (building block)으로서 신규한 다세포체의 이용을 수반하고, 상기 3차원 구조체는 성숙 분열 (maturation)을 통해 원하는 가공된 조직이 될 수 있다. 각각의 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함하고, 이들 생존 세포는 상기 다세포체가 단일 객체 (single object)로서 처리 (가령, 픽업 (pick up)과 이동)될 수 있도록 할 만큼 충분히 서로 응집된다. 다세포체의 응집은 생존 세포가 인접하는 다세포체의 생존 세포에 응집할 수 있을 만큼 충분한 기간 동안 상기 다세포체가 스스로를 지지 (가령, 작업 표면 상에서 또는 복수 다세포체를 포함하는 조립체 (assembly) 내에서)할 수 있도록 할 만큼 충분하다. 자가-지지 다세포체의 형태에서 복수의 생존 세포를 픽업하고 이동시키는 능력은 다수의 상이한 3차원 구조체를 조립하는 유연성을 제공한다. 가령, 다세포체는 성숙 분열을 통해 관상 가공된 조직이 될 수 있는 구조체를 조립하는 하나 이상의 충전체 (가령, 다세포체로부터 세포의 충전체 내로의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 충전체에 대한 부착을 억제하는 생물적합성 물질을 포함하는 충전체)와 공동으로 이용될 수 있다. 다세포체 및 충전체는 또한, 성숙 분열을 통해 다른 형성을 갖는 가공된 조직이 되는 구조체를 조립하는데 이용될 수 있다. 더 나아가, 다세포체는 자가-지지이기 때문에, 다세포체를 지지 겔 또는 뼈대 내에 끼워 넣는 것이 불필요하다. 대신에, "에어 (air)에서 프린팅 (printing)" 능력은 다세포체가 서로 직접적으로 접촉하도록 하는 방식으로 다세포체를 배열하는 것을 용이하게 한다. 다세포체 사이에 더욱 우수한 접촉은 성숙 분열 동안 다세포체의 효율적이고 신뢰성 있는 융합을 조장할 수 있다. 이에 더하여, 충전체는 성숙 가공된 조직의 외부와 내부 (가령, 관상 구조의 내강)로부터 용이하게 제거될 수 있다.

[0040] 이에 더하여, 본 발명의 일부 방법에서는 가공된 조직을 위한 빌딩 블록으로서 가늘고 긴 다세포체를 이용한다. 가늘고 긴 다세포체는 다세포체의 세로축을 따라 상당한 길이에서 이미 서로 응집되기 때문에, 다세포체의 융합은 더욱 신뢰할 수 있고 더욱 짧은 시간 내에 달성될 수 있다. 게다가, 가늘고 긴 다세포체는 상당한 길이를 갖는 접촉 부분을 따라 다세포체 사이에 접촉을 확립하는 나란히 인접하는 관계로 배열될 수 있다. 이는 서로 인접하는 다세포체의 신속하고 신뢰성 있는 융합을 조장할 수 있다.

[0041] 본 발명의 물질과 공정을 이용하여 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 방법의 전반적인 개요가 제공되었기 때문에, 이런 공정과 물질은 더욱 상세하게 기술될 것이다.

[0042] 다세포체

[0043] 1로 지정된 다세포체 (본 명세서에서, 중간 세포 단위 (intermediate cellular unit)로도 지칭됨)의 한 가지 구체예는 도 1에서 예시된다. 다세포체 (1)는 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함한다. 다세포체 (1)는 생물-가공 공정, 예를 들면, 조직 또는 장기 가공 동안 용이한 조작과 처리를 위한 점탄성 정도와 충분한 완전성을 갖는 원하는 3차원 (3-D) 형상으로 함께 응집된 복수의 세포를 포함한다. 충분한 완전성은 다세포체가 후속 처리 동안, 엄격하지 않지만 점탄성 정도를 갖는 물리적 형상을 유지할 수 있고, 그리고 세포의 생명력을 유지시킬 수 있음을 의미한다.

[0044] 다세포체 (1)는 하나 이상의 미리-선택된 세포 유형으로 구성될 수 있다. 일반적으로, 세포 유형의 선택은 원하는 3차원 생물학적 조직에 따라 달라질 것이다. 가령, 다세포체가 혈관-유형 3차원 구조를 가공하는데 이용되면, 이들 다세포체를 형성하는데 이용되는 세포는 맥관 조직 내에서 전형적으로 관찰되는 세포 유형 또는 세포 유형들 (가령, 내피 세포, 평활근 세포, 섬유아세포 등)을 용이하게 포함할 수 있다. 다세포체가 상이한 유형의 3차원 조직 (가령, 장, 간, 신장 등)을 가공하는데 이용되면, 상기 다세포체를 형성하는데 다른 세포 유형이 이용될 수 있다. 당업자는 가공되는 3차원 조직의 유형에 기초하여 다세포체에 대한 적절한 세포 유형 또는 유형들을 선택할 수 있을 것이다. 적절한 세포 유형의 무-제한적 실례에는 특히, 수축 또는 근육 세포 (가령, 근육모세포와 심근세포를 비롯한 가로무늬근 세포, 그리고 평활근 세포), 신경 세포, 섬유아세포, 연결 조직 세포 (골과 연골을 구성하는 세포 유형, 골 형성 세포와 연골세포로 분화할 수 있는 세포, 그리고 림프 조직을 구성하는 세포 유형 포함), 실질 세포, 상피 세포 (강 (cavity)과 맥관 (vessel) 또는 채널 (channel)에서 내막 (lining)을 형성하는 내피 세포, 외분비물과 내분비물 분비 상피 세포, 상피 흡수 세포, 각질 상피 세포, 그리고 세포의 매트릭스 분비 세포 포함), 간세포, 그리고 미분화 세포 (가령, 배아 세포, 줄기 세포, 그리고 다른 전구체 세포)가 포함된다. 가령, 다세포체 (1)를 형성하는데 이용되는 세포는 살아있는 인간 또는 동물 개체로부터 획득되고 일차 세포주 (primary cell line)로서 배양될 수 있다.

[0045] 다세포체 (1)는 동종세포 (homocellular) 또는 이종세포 (heterocellular)일 수 있다. 동종 다세포체에서, 복수의 생존 세포는 복수의 단일 세포 유형의 생존 세포를 포함한다. 동종 다세포체 내에서 거의 모든 생존 세포는 단일 세포 유형의 세포이고, 동종 다세포체를 비롯한 구조체의 성숙 분열에 극히 미미한 영향을 주는 상대적으로 적은 숫자의 상이한 세포 유형의 세포를 비롯한 낮은 수준의 불순물을 일부 관용한다.

[0046] 대조적으로, 이중세포 다세포체는 상당한 숫자의 한 가지 이상의 세포 유형의 세포를 포함한다. 가령, 다세포체는 복수의 첫 번째 유형의 생존 세포 및 복수의 두 번째 세포 유형의 생존 세포 (등)를 포함할 수 있고, 두 번째 세포 유형은 첫 번째 세포 유형과 상이하다. 다세포체가 맥관 조직을 산출하는데 이용되면, 예로써, 첫 번째 유형의 생존 세포는 내피 세포이고, 두 번째 유형의 생존 세포는 평활근 세포이거나, 첫 번째 유형의 생존 세포는 내피 세포이고, 두 번째 유형의 생존 세포는 섬유아세포이거나, 또는 첫 번째 유형의 생존 세포는 평활근 세포이고, 두 번째 유형의 생존 세포는 섬유아세포일 수 있다. 이중세포 다세포체는 또한, 복수의 첫 번째 세포 유형의 세포, 복수의 두 번째 세포 유형의 세포, 그리고 복수의 세 번째 세포 유형의 세포를 포함할 수 있고, 첫 번째, 두 번째와 세 번째 세포 유형 각각은 첫 번째, 두 번째와 세 번째 세포 유형 중에서 나머지와 상이하다. 가령, 가공된 혈관을 생산하는데 적합한 다세포체는 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포를 포함할 수 있다. 이중 세포체에서 이들 생존 세포는 가공된 조직에 대한 특정한 내부 구조를 형성하기 위한 융합 과정 동안 분류되지 않은 상태로 존속하거나, 또는 "분류 (sort out)"될 수 있다 (가령, 자가-조립할 수 있다). 세포의 자가 분류 (self sorting)는 차별적 부착 가설 (Differential Adhesion Hypothesis, DAH)의 예측과 일치한다. DAH는 성분 세포 사이에 접착성과 접착성 상호작용에 의해 산출된 조직 표면장력 (surface tension)과 계면장력 (interfacial tension)의 관점에서 세포 집단의 액체-유사 행태를 설명한다. 일반적으로, 세포는 이들 세포의 접착 강도 (adhesive strength)에서 차이에 기초하여 분류될 수 있다. 가령, 이중세포 다세포체의 중심으로 분류되는 세포 유형은 일반적으로, 다세포체의 외부로 분류되는 세포보다 보다 강한 접착 강도 (및 이에 따라 더욱 높은 표면장력)를 갖는다.

[0047] 더 나아가, 이중세포 다세포체가 정상 환경에서 이웃하는 조직으로부터 세포로 구성될 때, 분류 과정 동안 이들은 그들의 생리학적 형태 (physiological conformation)를 회복할 수 있다. 따라서 이중세포 다세포체는 성분 세포의 접착성과 접착성, 그리고 이들 세포가 위치하는 환경에 기초하여, 일종의 미리 건조된 내부 구조를 포함할 수 있다. 이는 더욱 복잡한 생물학적 구조를 확립하는데 이용될 수 있다. 가령, 간단한 수축성 관을 확립할 때, 근육 세포로 구성되는 동종 다세포체가 이용될 수 있다; 혈관-유사 구조를 구축하기 위하여, 적어도 2가지 세포 유형이 이용될 수 있다. 가령, 가공된 혈관을 구축하는데 이용되는 이중세포 다세포체는 바람직하게는, (i) 내피 세포 및 평활근 세포; (ii) 평활근 세포 및 섬유아세포; (iii) 내피 세포 및 섬유아세포; 또는 (iv) 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포를 포함할 수 있다. 다세포체 내에서 무작위로 분산된 이들 복수의 상이한 세포 유형으로 구성되는 다세포체를 이용하여 3차원 생물학적 구조를 구축함으로써, 구조 형성의 과정 동안 이들 상이한 세포 유형은 분류될 수 있고, 따라서 내피 세포는 관의 내부 구조 (즉, 내강)의 내막을 형성하고, 평활근 세포는 이들 내피 세포를 둘러싸는 층을 형성하고, 그리고 섬유아세포는 상기 평활근 층을 둘러싸는 외부 층을 형성한다. 최적 구조는 다세포체의 조성 (가령, 다양한 상이한 세포 유형의 서로에 대한 비율), 그리고 다세포체의 크기를 변화시킴으로써 달성될 수 있다. 다른 실례로서, 이중세포 다세포체는 복수의 첫 번째 세포 유형의 생존 세포, 복수의 두 번째 세포 유형의 세포, 그리고 복수의 세 번째 세포 유형의 세포를 포함할 수 있다. 이런 다세포체가 맥관 조직을 산출하는데 이용되면, 예로써, 첫 번째 세포 유형의 세포는 바람직하게는, 내피 세포일 수 있고, 두 번째 세포 유형의 세포는 바람직하게는, 평활근 세포일 수 있고, 그리고 세 번째 세포 유형의 세포는 바람직하게는, 섬유아세포일 수 있다. 다시 한 번, 세포의 자가-분류가 이런 이중세포 다세포체에서 발생할 수 있다. 따라서 이들 다세포체가 3차원 생물학적 구조, 예를 들면, 관상 구조를 구축하는데 이용되면, 구조 형성의 과정 동안 이들 세포 유형은 분류될 수 있고, 따라서 내피 세포는 관의 내부 구조 (즉, 내강)의 내막을 형성하고, 평활근 세포는 이들 내피 세포를 실질적으로 둘러싸는 층을 형성하고, 그리고 섬유아세포는 내피 세포의 층 및 평활근 세포의 층 둘 모두를 실질적으로 둘러싸는, 관상 구조의 외부 층을 형성한다.

[0048] 일부 실례에서, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 복수의 세포 이외에 한 가지 이상의 세포의 매트릭스 (ECM) 성분 또는 한 가지 이상의 ECM 성분의 하나 이상의 유도체를 포함한다. 가령, 다세포체는 다양한 ECM 단백질 (가령, 젤라틴, 피브리노젠, 피브린, 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 및/또는 프로테오글리칸)을 포함할 수 있다. ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 하기에 더욱 상세하게 기술된 바와 같이, 다세포체를 형성하는데 이용되는 세포 페이스트에 첨가될 수 있다. 세포 페이스트에 첨가되는 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 인간 또는 동물 공급원으로부터 정제되거나, 또는 당분야에 공지된 제조법으로 생산될 수 있다. 대안으로, ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 다세포체 내에 세포에 의해 자연적으로 분비되거나, 또는 다세포체를 만드는데 이용되는 세포는 한 가지 이상의 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체 및/또는 하나 이상의 세포 유착 분자 또는 세포-기질 유착 분자 (가령, 셀렉틴, 인테그린, 면역글로불린, 그리고 카드헤린)의 발현 수준을 변화시키기 위하여 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 유전자 조작될 수 있다. ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 다세포체 내에서 세포의 응집을 촉진할 수 있다. 가령, 젤라틴 및/또는 피브리노젠이 다세포체를 형성하는데 이용

되는 세포 페이스트에 적절하게 첨가될 수 있다. 피브리노겐은 이후, 트롬빈의 첨가에 의해 피브린으로 전환될 수 있다.

[0049] 앞서 언급된 바와 같이, 일부 사례에서 다세포체 (1)는 바람직하게는, 조직 배양 배지를 포함한다. 조직 배양 배지는 임의의 생리화적으로 적합성 배지일 수 있고, 당분야에 공지된 바와 같이 관련된 세포 유형에 따라 전형적으로 선택될 수 있다. 조직 배양 배지는 예로써, 기본 영양소, 예를 들면, 당류와 아미노산, 성장 인자, 항생제 (오염 최소화) 등을 포함할 수 있다.

[0050] 다세포체 (1) 내에서 세포의 응집은 바람직하게는, 다세포체가 평평한 표면에서 스스로를 지지하는 동안 3차원 형상을 유지할 수 있도록 할 만큼 충분히 강하다. 도 1B에서, 예로써, 다세포체 (1)는 평평한 표면 (13)에서 스스로를 지지한다. 약간의 변형 (가령, 다세포체 (1)가 표면 (13)에 접촉하는 경우에)이 있긴 하지만, 다세포체는 바람직하게는, 너비의 적어도 절반, 그리고 더욱 바람직하게는, 너비에 대략 필적하는 높이를 유지할 만큼 충분히 점착성이다. 또한, 도 1B에서 예시된 바와 같이, 예로써, 다세포체 (1)는 다세포체 및 표면 (13) 사이의 접촉에 의해 다세포체의 바닥에서 형성된 평평한 외부 표면 (15)에 의해 지지된다. 다세포체 (1)의 전체 중량이 표면 (13)에 의해 지지될 때, 접촉 표면 (15)의 면적 A1은 다세포체의 약간의 변형으로 인하여 최초 접촉 부분보다 클 수 있다. 하지만, 접촉 표면 (15)의 면적 A1은 바람직하게는, 다세포체 (1)의 지지체 표면 (13)으로의 2차원 돌출부 (projection)의 면적 A2보다 작다 (도 1B 참조). 이는 다세포체 (1)의 일부분 (가령, 도 1B에서 예시된 바와 같은 각 측면)이 바람직하게는, 작업 표면 (13) 위에서 다세포체 (1)에 의해 지지된다는 것을 의미한다. 유사하게, 2개 이상의 다세포체 (1)가 평평한 표면 (13) 상에서 서로 나란히 인접한 관계로 위치될 때 (도 1C), 그들 자신을 유지하는 3차원 형상과 공동으로 자가-지지 능력은 그들의 측면 아래에, 그리고 작업 표면 위에 빈 공간 (17)을 형성할 수 있다.

[0051] 또한, 다세포체 (1) 내에서 세포의 응집은 바람직하게는, 다세포체 및 충전체가 서로의 위에 적층되는 구조체로 다세포체가 조립될 때, 상기 다세포체가 적어도 하나의 유사한 크기의 형상화된 다세포체 또는 충전체의 중량을 지지할 만큼 충분히 강하다 (도 2 참조, 하기에 더욱 상세하게 논의됨). 또한, 다세포체 (1) 내에서 세포의 응집은 바람직하게는, 다세포체가 기구 (implement) (가령, 모세관 마이크로피펫)에 의해 픽업 (pickup)될 수 있도록 할 만큼 충분히 강하다 (도 3D 참조, 하기에 더욱 상세하게 논의됨).

[0052] 더 나아가, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 비-지배성 (즉, 뉴런이 실질적으로 존재하지 않는다) 또는 비-연골성 이거나, 또는 비-지배성과 비-연골성 둘 모두일 수 있다. 다세포체는 "가공된" 다세포체로서 기술될 수 있는데, 그 이유는 상기 다세포체가 인간 독창성 (human ingenuity)의 보도 없이 발생하는 생물학적 구조와 상이하기 때문이다. 다시 말하면, 다세포체는 합성, 또는 비-자연 발생이다.

[0053] 다세포체 (1)는 본 발명의 범위 내에서 다양한 크기와 형상을 가질 수 있다. 가령, 도 1에서 예시된 다세포체 (1)는 내강-없는 다세포체인데, 이는 다세포체를 관통하는 열린 통로가 없음을 의미한다. 가령, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 다세포체 내에 실질적으로 공백, 또는 속이 빈 공간 등을 보유하지 않는다. 이는 도 1에서 예시된 다세포체 (1) 및 기존의 가공된 혈관과 기타 기존의 관상 가공된 조직 사이에 한 가지 차이점이다.

[0054] 도 1A-1B에서 예시된 다세포체 (1)는 산소 및/또는 영양소가 다세포체의 중심 부분으로 확산하지 못함으로 인하여 유발된 세포 괴사를 제한하도록 설정된다. 가령, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 다세포체 내에 어떤 생존 세포도 상기 다세포체의 외부 표면으로부터 대략 250 마이크로미터 이상이 아니고, 그리고 더욱 바람직하게는, 다세포체 내에 어떤 생존 세포도 상기 다세포체의 외부로부터 대략 200 마이크로미터 이상이 되지 않도록 설정된다. 다세포체 (1)의 중심 부분에서 세포의 다세포체의 외부 표면으로의 근접성으로 인하여, 다세포체 내에 세포는 다세포체의 외부 표면에서 빈 공간으로부터 상기 다세포체의 중심 부분으로의 확산에 의해 산소 및/또는 영양소가 공급될 수 있다. 다세포체의 하나 이상의 부분 (가령, 중심 부분)에서 세포의 일부 괴사가 나타날 수 있긴 하지만, 이러한 괴사가 제한된다.

[0055] 도 1에서 다세포체 (1)는 또한, 높이 H1과 너비 W1보다 훨씬 큰 길이 L1을 갖는 가늘고 긴 다세포체이다. 다세포체 (1)의 길이 L1은 바람직하게는, 적어도 대략 1000 마이크로미터 (가령, 대략 1000 마이크로미터 내지 대략 30 센티미터 범위), 더욱 바람직하게는 적어도 대략 1 센티미터 (가령, 대략 1 센티미터 내지 대략 30 센티미터 범위), 그리고 이보다 더욱 바람직하게는 적어도 대략 5 센티미터 (가령, 대략 5 센티미터 내지 대략 30 센티미터 범위)이다. 다세포체의 길이 L1에서 이론적 상한선은 존재하지 않는다. 따라서 개체가 긴 다세포체를 만드는 것과 연관된 실질적인 어려움, 예를 들면, 충분한 양의 생존 세포를 획득하는 것, 또는 긴 다세포체를 처리하는 것 등을 극복할 의향만 있으면, 본 발명의 범위 내에서 30 센티미터 초과와 길이 (또는 30 센티미터가 아닌 임의의 길이)를 갖는 다세포체를 만드는 것이 가능한 것으로 인식된다.

- [0056] 도 1에서 예시된 가늘고 긴 다세포체 (1)의 높이 H1과 너비 W1은 바람직하게는, 길이 L1보다 훨씬 작다. 가령, 길이 L1은 바람직하게는, 너비 W1의 적어도 2배 및 높이 H1의 적어도 2배인데, 이는 상기 다세포체 (1)가 적어도 대략 2, 더욱 바람직하게는 적어도 대략 10, 이보다 더욱 바람직하게는 적어도 20의 가로세로비 (즉, 길이 대(對) 상기 길이에 직각으로 가장 긴 치수의 비율)를 갖는다는 것을 의미한다. 상기 다세포체 (1)의 치수에 관한 설명으로부터, 가로세로비는 또한, 본 발명의 범위 내에서 20보다 훨씬 높을 수 있음이 주목될 것이다; 가령, 가로세로비는 2000일 수 있다.
- [0057] 도 1에서 예시된 다세포체 (1)는 또한, 상대적으로 좁은 너비 W1 및 상대적으로 짧은 높이 H1을 갖는다. 가령, 길이 L을 따라 다세포체 (1)의 평균 단면적은 바람직하게는, 대략 7,850 스퀘어 마이크론 내지 대략 360,000 스퀘어 마이크론 범위, 더욱 바람직하게는 대략 31,400 스퀘어 마이크론 내지 대략 250,000 스퀘어 마이크론 범위, 그리고 이보다 더욱 바람직하게는 대략 31,400 스퀘어 마이크론 내지 대략 90,000 스퀘어 마이크론 범위에 있다. 다른 실례에서, 도 1에서 예시된 다세포체 (1) (이는 실질적으로 원통형이고 원형 횡단면을 보유한다)은 바람직하게는, 세로를 따라 대략 100 마이크론 내지 대략 600 마이크론 (대략 7,850 스퀘어 마이크론 내지 대략 282,600 스퀘어 마이크론 범위의 평균 단면적에 해당함) 범위, 더욱 바람직하게는 대략 200 마이크론 내지 대략 500 마이크론 (대략 31,400 스퀘어 마이크론 내지 대략 196,250 스퀘어 마이크론 범위의 평균 단면적에 해당함) 범위, 그리고, 이보다 더욱 바람직하게는 대략 200 마이크론 내지 대략 300 마이크론 (대략 31,400 스퀘어 마이크론 내지 대략 70,650 스퀘어 마이크론 범위의 평균 단면적에 해당함) 범위의 평균 직경을 갖는다.
- [0058] 도 1에서 예시된 다세포체 (1)가 실질적으로 원통형이고 실질적으로 원형 횡단면을 보유하긴 하지만, 상이한 크기와 형상을 갖는 다세포체가 본 발명의 범위 내에 있다. 가령, 다세포체는 본 발명의 범위 내에서, 정사각형, 직사각형, 삼각형, 또는 기타 비-원형 횡단면 형상을 갖는 가늘고 긴 형상 (가령, 원통형 형상)일 수 있다. 유사하게, 다세포체는 본 발명의 범위 내에서, 전반적으로 구상 형상 (spherical shape), 비-가늘고 긴 원통형 형상, 또는 입방형 형상을 가질 수 있다.
- [0059] 다세포체를 만드는 방법
- [0060] 본 발명의 범위 내에서, 앞서 기술된 특징을 갖는 다세포체를 만드는 다양한 방법이 존재한다. 가령, 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함하거나, 또는 원하는 세포 밀도와 점성도를 갖는 세포 페이스트로부터 제조될 수 있다. 세포 페이스트는 원하는 형상으로 형상화될 수 있고, 그리고 다세포체는 성숙 분열 (가령, 배양)을 통해 형성될 수 있다. 다른 실례에서, 가늘고 긴 다세포체는 복수의 생존 세포를 포함하는 세포 페이스트를 가늘고 긴 형상으로 형상화함으로써 생산된다. 세포 페이스트는 세포가 서로 응집하여 가늘고 긴 다세포체를 형성할 수 있도록 통제된 환경에서 배양된다. 또 다른 실례에서, 다세포체는 세포 페이스트를 3차원 형상에 유지시키는 장치 (device)에서, 복수의 생존 세포를 포함하는 세포 페이스트를 형상화함으로써 생산된다. 세포 페이스트는 앞서 기술된 바와 같이, 통제된 환경에서 배양되고, 이때 상기 세포 페이스트는 평평한 표면에서 스스로를 지지할 만큼 충분한 응집을 갖는 다세포체를 생산할 만큼 충분한 시간 동안 상기 3차원 형상으로 유지된다.
- [0061] 세포 페이스트는 바람직하게는, (A) 세포 또는 세포 집합체 (본 명세서에서, "미리-선택된" 세포 또는 세포 집합체로도 지칭됨) (하나 이상의 세포 유형일 수 있다) 및 세포 배양 배지 (본 명세서에서, "미리-선택된" 배지로도 지칭됨) (가령, 미리-결정된 비율로)를 혼합하여 세포 현탁액 (본 명세서에서, 세포 혼합물로도 지칭됨)을 산출하고, 그리고 (B) 세포 혼합물을 압축하여 원하는 세포 밀도와 점성도를 갖는 세포 페이스트를 생산함으로써 제공될 수 있다. 압축은 다수의 방법에 의해, 예를 들면, 세포 배양액으로부터 산출된 특정한 세포 현탁액을 농축하여 세포 페이스트에 요구되는 원하는 세포 농도 (밀도), 점성도, 그리고 경도를 달성함으로써 완수될 수 있다. 가령, 세포 배양액으로부터 상대적으로 희석된 세포 현탁액은 주형에서 형상화를 가능하게 하는 펠릿 (pellet)으로 세포 농축을 달성하기 위하여 결정된 시간 동안 원심분리될 수 있다. 접선 유동 여과 (tangential flow filtration, "TFF")는 세포를 농축하거나 압축하는 다른 적절한 방법이다. 요구되는 압출 성형 (extrusion) 특성을 부여하기 위한 화합물 역시 세포 현탁액과 결합될 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 적절한 화합물의 일부 실례에는 콜라겐, 수화겔, Matrigel, 나노섬유, 자가-조립가능 나노섬유, 젤라틴, 피브리노겐 등이 포함된다.
- [0062] 따라서 이들 방법에 이용되는 세포 페이스트는 바람직하게는, 복수의 생존 세포를 조직 배양 배지와 혼합하고, 그리고 생존 세포를 압축 (가령, 원심분리에 의해)함으로써 생산된다. 한 가지 이상의 ECM 성분, 또는 한 가지 이상의 ECM 성분의 하나 이상의 유도체가 세포 페이스트에 포함되면 (하기에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이), 세포 펠릿은 바람직하게는, ECM 성분 (들) 또는 ECM 성분 (들)의 유도체를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로

허용되는 완충액에서 재현탁되고, 그리고 생성된 세포 현탁액은 세포 페이스트를 형성하기 위하여 다시 한 번 원심분리될 수 있다.

[0063] 추가 가공을 위하여 요구되는 세포 페이스트의 세포 밀도는 세포 유형에 따라 달라질 수 있다. 세포 사이에 상호작용은 세포 페이스트의 특성을 결정하고, 그리고 상이한 세포 유형은 세포 밀도와 세포-세포 상호작용 사이에 상이한 상관관계를 가질 것이다. 세포는 세포 페이스트를 형상화하기에 앞서, 세포 상호작용을 증가시키기 위하여 전-처리될 수 있다. 가령, 세포는 세포 페이스트를 형상화하기에 앞서, 세포-세포 상호작용을 강화시키기 위하여 원심분리후 원심분리 튜브 내에서 배양될 수 있다.

[0064] 본 발명 하에 세포 페이스트를 형상화하기 위하여 다양한 방법이 이용될 수 있다. 가령, 세포 페이스트는 원하는 형상을 달성하기 위하여 조작되거나, 수동으로 성형되거나, 또는 프레스될 수 있다 (가령, 원심분리/압축 이후에). 가령, 세포 페이스트는 미리 형성된 수단 (instrument), 예를 들면, 마이크로피펫 (가령, 모세관 피펫) 내로 집어넣어지고 (가령, 흡인되고), 이러한 수단은 상기 수단의 내부 표면에 적합하도록 세포 페이스트를 형상화시킨다. 마이크로피펫 (가령, 모세관 피펫)의 횡단면 형상은 원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형, 또는 기타 비-원형 횡단면 형상일 수 있다. 세포 페이스트는 또한, 미리 형성된 주형, 예를 들면, 플라스틱 주형, 금속 주형, 또는 겔 주형 내로 침적 (deposition)함으로써 형상화될 수 있다. 더 나아가, 세포 페이스트를 형상화하기 위하여 원심분리 주조 (centrifugal casting) 또는 연속 주조 (continuous casting)가 이용될 수 있다.

[0065] 이러한 방법의 한 가지 실례에서, 형상화는 세포가 형상화 장치 내에서 서로 부분적으로 응집할 수 있도록 상기 형상화 장치 내에 세포 페이스트를 유지하는 단계를 포함한다. 가령, 도 3A에서 예시된 바와 같이, 세포 페이스트 (55)는 형상화 장치 (51) (가령, 모세관 피펫) 내로 흡인되고, 세포가 서로 적어도 부분적으로 응집할 수 있도록 성숙 분열 기간 (본 명세서에서, 배양 기간으로도 지칭됨) 동안 형상화 장치 내에 유지된다 (도 3B). 이들 세포가 첫 번째 형상화 장치 (51)에서 충분한 응집을 달성할 수 있으면, 다세포체 (1)는 단일 성숙 분열 단계 (가령, 단일 배양 단계)만을 갖는 공정에서 생산될 수 있다. 가령, 이러한 방법은 바람직하게는, 단일 형상화 장치 (51)에서 세포 페이스트 (55)를 형상화하는 단계 및 세포가 서로 응집하여 다세포체 (1)를 형성하도록 단일 통제된 환경에서 형상화된 세포 페이스트를 배양하는 단계를 포함한다. 이러한 경우에, 형상화 장치 (51) (가령, 모세관 피펫)는 바람직하게는, 하기에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이, 다세포체를 3차원 구조체로 자동적으로 위치시키는데 사용가능한 바이오프린터 (bioprinter) 또는 유사한 기계 (apparatus)의 프린팅 헤드 (printing head)의 일부일 수 있다. 세포 페이스트 내에 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체, 예를 들면, 젤라틴 및/또는 피브리노겐의 포함은 단일 성숙 분열 단계에서 다세포체의 생산을 조장할 수 있는데, 그 이유는 이런 성분이 다세포체의 전반적인 점착력을 촉진할 수 있기 때문이다. 하지만, 세포가 형상화 장치, 예를 들면, 모세관 피펫 내에 존속할 수 있는 시간의 양은 제한되고, 상기 장치는 세포의 생존능이 영향을 받기에 앞서, 산소 및/또는 영양소에 대한 기껏해야 제한된 접근만을 세포에 제공한다.

[0066] 세포가 원하는 응집을 달성할 만큼 충분히 오랫동안 성숙 분열 기간 동안 형상화 장치 (51) 내에 유지될 수 없으면, 부분적으로 응집된 세포 페이스트 (55)는 바람직하게는, 상기 형상화 장치 (가령, 모세관 피펫)에서 두 번째 형상화 장치 (301) (가령, 주형)로 이전되는데, 세포는 추가의 성숙 분열 기간 동안 두 번째 형상화 장치 내에 유지되는 동안 영양소 및/또는 산소가 공급된다. 세포에 영양소와 산소가 공급될 수 있도록 하는 적절한 형상화 장치 (301)의 한 가지 실례는 도 4A-4D에서 예시된다. 이러한 형상화 장치는 복수의 다세포체 (가령, 실질적으로 동일한 다세포체)를 생산하기 위한 주형 (301)이다. 주형 (301)은 생물적합성 기질 (303)을 포함하고, 이러한 생물적합성 기질은 세포의 상기 기질 내로의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 상기 기질에 대한 부착을 억제하는 물질로 만들어진다. 주형 (301)은 세포가 주형 내로 성장하거나 이동하고, 또는 주형에 부착하는 것을 배제시키는 임의의 물질로 만들어질 수 있다. 가령, 기질 (303)은 바람직하게는, Teflon® (PTFE), 스테인리스강, 히알루론산, 아가로즈, 아가로즈, 폴리에틸렌 글리콜, 유리, 금속, 플라스틱, 또는 겔 물질 (가령, 아가로즈 겔 또는 기타 수화겔), 그리고 유사한 물질로 만들어질 수 있다.

[0067] 기질 (303)은 상대적으로 더욱 낮은 응집을 갖는 복수의 세포를 포함하는 조성물 (가령, 첫 번째 형상화 장치 (51)로부터)을 수용하고 성숙 분열 기간 동안 상기 조성물을 원하는 3차원 형상으로 유지하도록 형상화되고, 상기 기간 동안 이들 세포의 응집이 증가하여 성숙 분열 기간 이전의 조성물에 비하여 더욱 높은 응집을 갖는 다세포체, 예를 들면, 앞서 기술된 다세포체 (1)의 특징을 갖는 다세포체를 형성한다. 주형 (301)은 또한, 바람직하게는 조직 배양 배지가 세포 페이스트 (55)에 공급될 수 있도록 설정된다 (가령, 조직 배양 배지를 주형의 상부로 분배함으로써). 가령, 도 4A-4D에서 예시된 바와 같이, 복수의 가늘고 긴 홈 (305)이 기질 (303) 내에 형성된다. 도 4D에서 예시된 바와 같이, 각 홈의 깊이 D2는 바람직하게는, 대략 500 마이크로미터 내지 대략 1000 마이크로미터의 범위에 있다. 예시된 구체예에서 각 홈 (305)의 하부는 바람직하게는, 실질적으로 원형 횡단면 형상을

갖는 가늘고 긴 원통형 다세포체를 형성하기 위한 아치형 (가령, 반원형) 횡단면 형상을 갖는다. 홈 (305)의 너비 W5는 바람직하게는, 주형 (301)에서 생산되는 다세포체의 너비보다 약간 더 크다. 가령, 이들 홈의 너비 W5는 바람직하게는, 대략 300 마이크로미터 내지 대략 1000 마이크로미터의 범위에 있다. 홈 (305) 사이에 간격은 결정적이지 않지만, 일반적으로 주형 (301)에서 생산될 수 있는 다세포체의 숫자를 증가시키기 위하여 이들 홈을 서로 상대적으로 가깝게 위치시키는 것이 바람직하다. 예시된 구체예에서, 예로써 각각의 홈 (305) 사이에 기질 (303)의 스트립 (strip)은 대략 2 mm인 너비 W4를 갖는다.

[0068] 본 발명의 범위 내에서, 적절한 주형을 만드는 다양한 방법이 존재한다. 가령, 도 5A-5C에서는 201로 지정된 도구의 한 가지 구체예를 예시하는데, 상기 도구는 앞서 기술된 다세포체를 만드는데 적합한 주형을 만드는데 이용될 수 있다. 일반적으로, 도구 (201)의 부분은 두 번째 성숙 분열 기간 동안 부분적으로 응집된 세포 페이스트를 유지하는 주형 (301)의 부분의 반대측 (negative)이 되도록 설정된다. 가령, 도구 (201)은 바람직하게는, 본체 (203) 및 상기 본체로부터 확장하는 복수의 돌출부 (205)를 포함한다. 각 돌출부 (205)는 바람직하게는, 상기 돌출부에 의해 주형 내에 형성된 함몰 (depression)/수용 부분 (receiving area) 내에 어떤 세포도 형성화된 세포 페이스트의 외부 표면으로부터 대략 300 마이크로미터 이상이 되지 않도록 하는 형상으로 세포 페이스트 (55)를 유지할 주형 기질에서, 함몰 (depression) 또는 수용 부분 (receiving area)을 형성하는 크기와 형상을 갖는다.

[0069] 도 5A-5C에서 예시된 특정한 도구 (201)는 도 4A-4B에서 예시된 주형 (301)을 생산하도록 설정된다. 돌출부 (205)는 본체 (203)의 하부 (207)로부터 확장하는 복수의 지느러미 모양 돌출로서 설정된다. 각각의 지느러미 모양 돌출 (205)은 주형 (301) 내에 홈 (305) 중에서 하나의 반대측 (negative)이다. 지느러미 모양 돌출 (205)은 세로축 (209)을 갖고 (도 5A), 앞서 기술된 가늘고 긴 다세포체 (1)를 만드는데 이용될 수 있는 주형을 만들도록 설정된다. 지느러미 모양 돌출 (205) 중에서 적어도 하나는 이들 지느러미 모양 돌출 중에서 다른 것의 세로축 (209)으로부터 측면으로 떨어져 있다. 이는 도구 (201) 및 겔 전기영동 (gel electrophoresis)을 수행하기 위한 겔에서 웰 (well)을 형성하는데 이용되는 전통적인 소면기 (comb) 사이에 한 가지 차이점이다. 예시된 구체예에서, 모든 지느러미 모양 돌출 (205)은 서로 실질적으로 평행하고, 각각의 지느러미 모양 돌출은 세로축 (209)에 대하여 다른 지느러미 모양 돌출로부터 측면으로 떨어져 있다. 이들 지느러미 모양 돌출 (205)은 바람직하게는, 서로 실질적으로 동일하다. 도 5C를 참조하면, 각각의 지느러미 모양 돌출 (205)은 바람직하게는, 대략 1.5 mm의 거리 D1로 본체 (203)로부터 확장한다. 지느러미 모양 돌출 (205)의 원위 단부는 주형 (301) 내에 홈 (305)의 하부의 형상에 대응하는 아치형 (가령, 반원형) 횡단면 형상을 갖는다. 각각의 지느러미 모양 돌출의 너비 W3은 바람직하게는, 대략 300 마이크로미터 내지 대략 1000 마이크로미터이다. 이들 지느러미 모양 돌출을 분리하는 거리 W2는 바람직하게는, 대략 2mm이다. 도구 (201)에서 귀때 (211)는 바람직하게는, 세포 배양 접시의 하부 위에 돌출부를 유지하기 위하여 상기 접시의 가장자리 (rim)에 위치하도록 설정된다. 도구 (201)는 주형이 용이하게 분리되는 다양한 물질, 예를 들면, Teflon® (PTFE), 스테인리스강 등으로 만들어질 수 있다.

[0070] 주형 (301)을 만들기 위하여, 세포 배양 접시 (221)는 바람직하게는, 도 6A에서 예시된 바와 같이 응결 (solidification)되거나 겔로서 설치될 수 있는 액체 (223)로 채워진다. 가령, 액체는 아가로즈 용액 (223)일 수 있다. 도구 (201)는 세포 배양 접시 (221)의 상부에 배치되고 (도 6B), 따라서 귀때 (211)는 세포 배양 접시의 가장자리 (225)에 놓여지고, 돌출부 (205) (가령, 지느러미 모양 돌출)는 도구 (201)의 하부 (207)로부터 액체 (223) 내로 확장한다. 액체 (223)는 돌출부 (205) (가령, 지느러미 모양 돌출)의 원위 단부를 둘러싸는 고형 또는 겔 기질을 형성하도록 설치 (setup)될 수 있다. 이후, 도구 (201)는 새로 생산된 주형 (301)으로부터 상기 도구 (201)를 분리하기 위하여 세포 배양 접시로부터 들어 올려진다 (도 6C).

[0071] 따라서 두 번째 형상화 장치가 이용되면, 부분적으로 응집된 세포 페이스트 (55)는 바람직하게는, 첫 번째 형상화 장치 (51) (가령, 모세관 피펫)로부터 두 번째 형상화 장치 (가령, 도 4A-4D에서 예시된 주형 (301))로 이전된다. 부분적으로 응집된 세포 페이스트 (55)는 도 3C에서 예시된 바와 같이, 첫 번째 형상화 장치 (51) (가령, 모세관 피펫)에 의해 주형 (301)의 홈 (305) 내로 이전될 수 있다. 따라서 상기 방법은 부분적으로 응집된 세포 페이스트 (55)를 두 번째 형상화 장치 (301)로 이전하는 단계, 그리고 부분적으로 응집된 세포 페이스트를 두 번째 형상화 장치에 유지하여 다세포체 (1)를 형성하는 단계를 포함한다. 세포 페이스트 내에 세포가 서로 더욱 응집하여 다세포체 (1)를 형성할 수 있도록 하는 통제된 환경에서 주형 (301)이 그 내부에 유지된 세포 페이스트 (55)와 함께 배양되는 성숙 분열 기간 이후에, 세포의 응집은 도 3D에서 예시된 바와 같이, 생성된 다세포체 (1)가 기구 (implement) (51'), 예를 들면, 모세관 피펫에 의해 픽업될 수 있도록 할 만큼 충분히 강할 것이다. 모세관 피펫 (51') (주형 (301) 내에 홈 (305)으로부터 픽업된 성숙 다세포체 (1) 포함)은 바람직하게는, 하기에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이, 다세포체를 3차원 구조체로 자동적으로 위치시키는데 사용가능한 바이오프

린터 (bioprinter) 또는 유사한 기계 (apparatus)의 프린팅 헤드 (printing head)의 일부일 수 있다.

[0072] 따라서 다세포체 (1)를 만드는 방법의 한 가지 실례에서, 형상화는 세포가 첫 번째 형상화 장치 내에서 서로 부분적으로 응집할 수 있도록 세포 페이스트 (55)를 첫 번째 형상화 장치 (51) 내에 유지하는 단계, 부분적으로 응집된 세포 페이스트를 두 번째 형상화 장치 (301)로 이전하는 단계, 그리고 부분적으로 응집된 세포 페이스트를 두 번째 형상화 장치 내에 유지하여 다세포체 (1)를 형성하는 단계를 포함한다. 하지만, 일부 구체예에서, 예를 들면, 젤라틴 및/또는 피브리노겐이 세포 페이스트에 첨가될 때, 이들 세포는 첫 번째 형상화 장치 (51) 내에서 다세포체를 형성할 만큼 충분히 응집할 수 있고, 그리고 세포 페이스트 (55)를 두 번째 형상화 장치 (301)로 이전하고 세포 페이스트를 두 번째 형상화 장치에 유지하는 단계가 필요하지 않을 수도 있다.

[0073] 첫 번째 형상화 장치 (51)에는 바람직하게는, 모세관 피펫이 포함될 수 있고, 두 번째 형상화 장치에는 세포가 상기 두 번째 형상화 장치, 예를 들면, 앞서 기술된 주형 (301) 내에 유지될 때 영양소와 산소가 이들 세포에 공급될 수 있도록 하는 장치가 포함될 수 있다.

[0074] 다세포체의 횡단면 형상과 크기는 첫 번째 형상화 장치 및 선택적으로, 다세포체를 만드는데 이용되는 두 번째 형상화 장치의 횡단면 형상과 크기에 실질적으로 대응할 것이고, 그리고 당업자는 앞서 논의된 횡단면 형상, 횡단면 면적, 직경, 그리고 길이를 갖는 다세포체를 산출하는데 적합한 적절한 횡단면 형상, 횡단면 면적, 직경, 그리고 길이를 갖는 형상화 장치를 선택할 수 있을 것이다.

[0075] 앞서 논의된 바와 같이, 본 발명의 다세포체를 산출하기 위하여 매우 다양한 세포 유형이 이용될 수 있다. 따라서 예로써, 앞서 열거된 모든 세포 유형을 비롯한 하나 이상의 유형의 세포 또는 세포 집합체, 인간과 동물 체 세포 둘 모두 세포 페이스트를 산출하기 위한 출발 물질로서 이용될 수 있다. 가령, 평활근 세포, 내피 세포, 연골세포, 간엽 줄기 세포, 근육모세포, 섬유아세포, 심근세포, 슈반 (Schwann) 세포, 간세포 또는 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, "CHO") 세포와 같은 세포가 이용될 수 있다. 의도된 수용자로부터 (가령, 생검에 의해 획득된) 세포 또는 하나 이상의 확립된 세포주 (cell line)로부터 세포의 샘플은 다세포체의 제작을 위한 충분한 양의 세포가 생산되도록 배양될 수 있다. 의도된 수용자로부터 획득된 세포로부터 만들어진 다세포체는 숙주 염증 반응 (host inflammatory response), 또는 수용자에 의한 이식된 장기 또는 조직의 다른 급성 또는 만성 거부반응을 회피하는데 유리하다.

[0076] 앞서 언급된 바와 같이, 다세포체는 동종 또는 이종세포일 수 있다. 동종 다세포체를 만드는 경우에, 세포 페이스트는 바람직하게는, 동종세포이다, 다시 말하면, 복수의 단일 세포 유형의 생존 세포를 포함한다. 동종 다세포체를 산출하는데 이용되는 세포 페이스트 내에 거의 모든 생존 세포는 단일 세포 유형의 세포이고, 이런 세포 페이스트로부터 만들어진 동종 다세포체를 비롯한 구조체의 성숙 분열에 극히 미미한 영향을 주는 상대적으로 적은 숫자의 상이한 세포 유형의 세포를 비롯한 낮은 수준의 불순물을 일부 관용할 것이다. 가령, 동종 다세포체를 만들기 위한 세포 페이스트는 바람직하게는, 첫 번째 세포 유형의 세포를 포함하고, 여기서 세포 페이스트 내에 세포 중에서 적어도 대략 90%는 첫 번째 세포 유형의 세포이다.

[0077] 다른 한편, 이종세포 다세포체를 만드는 경우에, 세포 페이스트는 바람직하게는, 상당한 숫자의 한 가지 이상의 세포 유형의 세포를 포함할 것이다 (즉, 세포 페이스트는 이종세포일 것이다). 가령, 세포 페이스트는 복수의 첫 번째 유형의 생존 세포 및 복수의 두 번째 세포 유형의 생존 세포 (등)을 포함할 수 있고, 두 번째 세포 유형은 첫 번째 세포 유형과 상이하다. 다른 실례에서, 세포 페이스트는 복수의 첫 번째 세포 유형의 생존 세포, 복수의 두 번째 세포 유형의 생존 세포, 그리고 복수의 세 번째 세포 유형의 생존 세포를 포함할 수 있다. 따라서 세포 페이스트가 이종세포 다세포체를 만드는데 이용되고, 이들 이종세포 다세포체가 차례로, 맥관 조직을 만드는데 이용되면, 세포 페이스트 내에 복수의 생존 세포에는 바람직하게는, (i) 내피 세포 및 평활근 세포; (ii) 평활근 세포 및 섬유아세포; (iii) 내피 세포 및 섬유아세포; 또는 (iv) 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포가 포함될 수 있다. 앞서 상세하게 기술된 바와 같이, 이종세포 세포 페이스트가 다세포체를 산출하는데 이용될 때, 생존 세포는 이들 세포의 접착 강도에서 차이에 기초하여 성숙 분열과 응집 과정 동안 "분류 (sort out)"될 수 있고, 그리고 그들의 생리학적 형태 (physiological conformation)를 회복할 수 있다.

[0078] 앞서 언급된 바와 같이, 복수의 생존 세포 이외에, 한 가지 이상의 ECM 성분 또는 한 가지 이상의 ECM 성분의 하나 이상의 유도체 (가령, 젤라틴, 피브리노겐, 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 및/또는 프로테오글리칸)를 다세포체 내로 통합하기 위하여 이들 물질이 세포 페이스트에 포함될 수 있다. 세포 페이스트에 첨가된 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체는 인간 또는 동물 공급원으로부터 정제되거나, 또는 당분야에 공지된 재조합 방법으로 생산될 수 있다. 세포 페이스트에 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체를 첨가하면, 다세포체 내에서 세포의 응집이 촉진된다. 가령, 젤라틴 및/또는 피브리노겐이 세포 페이스트에 첨가될 수 있다. 더욱 구체적으로,

젤라틴과 피브리노겐을 포함하는 세포 현탁액을 형성하기 위하여 10-30% 젤라틴의 용액 및 10-80 mg/ml 피브리노겐의 용액이 복수의 생존 세포와 혼합될 수 있다. 세포 현탁액은 이후, 세포 페이스트를 형성하기 위하여 압축 (가령, 원심분리에 의해)될 수 있다. 이러한 공정으로 형성된 세포 페이스트는 이후, 세포가 서로 응집하여 다세포체를 형성할 수 있도록 하는 통제된 환경에서 형상화되고 배양될 수 있다. 피브리노겐은 트롬빈의 첨가에 의해 피브린으로 전환될 수 있다 (가령, 프린팅 과정 동안). ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체, 예를 들면, 젤라틴과 피브리노겐이 세포 페이스트에 포함될 때, 형상화 단계는 바람직하게는, 세포 페이스트를 단일 형상화 장치에 유지하여 다세포체를 형성하는 것을 포함하고, 그리고 배양 단계는 바람직하게는, 세포가 서로 응집하여 다세포체를 형성할 수 있도록 하는 단일 통제된 환경에서 형상화된 세포 페이스트를 배양하는 것을 포함한다.

[0079] 본 발명에서는 또한, 원하는 3-D 형상으로 형성된 복수의 세포 또는 세포 집합체를 포함하는 다세포체의 제조 방법을 제시한다. 본 발명의 제조 방법은 일반적으로, 1) 복수의 미리 선택된 세포 또는 세포 집합체 (가령, 원하는 세포 밀도와 점성도를 갖는)를 포함하는 세포 페이스트를 제공하는 단계, 2) 세포 페이스트를 형상화하는 (가령, 원하는 형상으로) 단계, 그리고 3) 성숙 분열을 통해 다세포체를 형성하는 단계를 포함한다.

[0080] 앞서 기술된 형성 단계는 다세포체 (가령, 세포 단위)의 응집을 담보하기 위한 1 단계 또는 복수 단계를 통해 완수될 수 있다. 일정한 공정에서, 최초 성숙 분열 시에, 세포 페이스트는 추가 처리가 가능할 만큼 충분한 완전성을 갖는 다세포체를 형성하기 위하여 부분적으로 안정화되거나, 또는 부분적으로 경화될 수 있다.

[0081] 한 가지 구체예에 따라, 형성 단계는 2가지 하위단계를 포함할 수 있다: A) 최초 성숙 분열을 위한 첫 번째 기간 (가령, 미리-결정된 기간) 동안 세포 페이스트를 형상화 장치, 예를 들면, 마이크로피펫 (가령, 모세관 피펫)에 유지하는 단계, 그리고 B) 추가 성숙 분열을 위한 두 번째 기간 (가령, 미리-결정된 기간) 동안 형상화된 세포 페이스트를 유지 장치, 예를 들면, 주형 내로 침적하는 단계, 여기서 상기 유지 장치는 세포가 장치 내로 성장하거나 이동하고, 또는 장치에 부착하는 것을 배제시킬 수 있는 물질로 만들어진다. 최초 성숙 분열은 추가 성숙 분열 과정에서 처리 동안 원래 상태로 존속할 만큼 충분한 안정성을 세포 페이스트에 제공할 것이다.

[0082] 추가 성숙 분열 과정을 조장하기 위하여 다양한 방법이 이용될 수 있다. 한 가지 구체예에서, 세포 페이스트는 응집을 촉진하는 기간 (세포-유형 의존성일 수 있다) 동안 대략 37°C에서 배양될 수 있다. 대안으로 또는 이에 더하여, 세포 페이스트는 부착을 촉진하기 위한 인자 및/또는 이온을 포함하는 세포 배양 배지의 존재에서 유지될 수 있다.

[0083] 가령, 주면체 (cylinder)가 마이크로피펫으로부터 파괴 없이 압출 성형될 수 있도록, 원통형 형상 내에 세포 페이스트가 세포의 부착 때까지 마이크로피펫 (가령, 모세관 피펫)에서 배양 (즉, 최초 성숙 분열 과정)된 이후에, 세포 페이스트는 추가로 배양되고, 그리고 원하는 형상의 유지를 조장하는 추가 성숙 분열 과정에서 배지와 함께 배양될 수 있다.

[0084] 충전체

[0085] 본 발명에서는 또한, 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 형성하기 위하여 앞서-기술된 다세포체와 공동으로 이용될 수 있는 충전체를 제시한다. 구체적으로, 본 발명에서는 또한, 생물학적 구조체를 구축하기 위한 빌딩 단위 (building unit)로서 다세포체와 공동으로 이용되는 충전체 (본 명세서에서, "충전체 매트릭스 단위"로도 지칭됨)를 제시하는데, 여기서 이들 충전체는 다세포체가 없는 원하는 3-D 생물-구조체의 도메인을 규정하는데 이용된다. 충전체는 바람직하게는, 미리-결정된 형상을 갖는 충전체이고, 세포가 상기 충전체 내로 성장하거나 이동하고, 또는 상기 충전체에 부착하는 것을 배제시킬 수 있는 물질로 만들어진다. 충전체 물질은 바람직하게는, 영양 배지 (본 명세서에서, 조직 배양 배지 또는 세포 배양 배지로도 지칭됨)에 투과성이다. 가령, 충전체 물질은 바람직하게는, 아가로스, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 그리고 한천, 또는 기타 수화겔 또는 비-겔 유연성 생물적합성 물질로 구성된 군에서 선택되는 생물적합성 겔 물질이다. 충전체는 바람직하게는, 상이한 물질 또는 상이한 농도의 동일한 물질로부터 형성될 수 있다. 가령, 내강-형성 충전체는 4% 아가로스로 만들어질 수 있는 반면, 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 구축하는데 이용되는 나머지 충전체는 2% 아가로스로 만들어질 수 있다. 충전체는 상응하는 다세포체의 형상과 크기와 일치하는 임의의 형상 또는 크기를 취하고, 원통형 형상이 선호된다.

[0086] 일부 구체예에서, 충전체는 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 구축하기 위하여 그들과 함께 이용되는 다세포체의 형상과 크기에 실질적으로 동일한 형상과 크기를 갖는다. 따라서 예로써, 충전체는 바람직하게는, 다세포체 (1)와 관련하여 앞서 기술된 형상을 가질 수 있다. 가령, 충전체, 그리고 다세포체 둘 모두 실질적으로 원

통형이고, 실질적으로 동일한 직경을 갖는 실질적으로 원형 횡단면을 보유할 수 있다 (도 2에 도시된 바와 같이).

[0087] 충전체, 그리고 다세포체는 다세포체가 서로 융합할 때 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직이 형성되도록 하는 패턴에 따라 충전체 및 다세포체가 배열될 수 있으면, 상이한 크기 및/또는 형상을 가질 수 있다. 가령, 충전체는 실질적으로 원통형일 수 있고, 그리고 다세포체는 실질적으로 구상일 수 있다 (도 2에서 예시된 바와 같이). 게다가, 충전체, 그리고 다세포체는 둘 모두 가늘고 길며 실질적으로 원통형일 수 있지만, 상이한 길이를 갖는다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 변하는 크기와 형상의 충전체 및 다세포체를 결합시켜 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 형성할 수 있는 다양한 방법이 존재한다.

[0088] 충전체는 바람직하게는, 적절한 겔-유사 물질을 미리-결정된 형상으로 형상화함으로써 생산된다. 한 가지 구체예에 따라, 상기 방법은 1) 충전물 물질 (즉, 미리-선택된 충전물 물질)의 점성도를 액체-유사 물질로 감소시키는 (낮추는) 단계, 2) 액체-유사 물질을 형상화 (가령, 미리-선택된 형상으로)하는 단계, 그리고 3) 상기 물질의 점성도를 증가 (상승)시켜 충전체 (가령, 미리-선택된 형상을 갖는)로 응결시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

[0089] 상기 물질의 직접적인 또는 간접적인 가열, 압력의 적용, 또는 농도 변화를 비롯하여, 다수의 공지된 방법이 충전물 물질의 점성도를 감소시키는데 이용될 수 있다. 게다가, 형상화 단계에서 다수의 방법, 예를 들면, 상기 물질의 미리 성형된 주형 내로 침적, 또는 피펫에 의해 또는 피스톤의 음의 변위 (negative displacement)에 의해 이를 원하는 형상의 챔버 내로 끌어들이미 이용될 수 있다. 더 나아가, 상기 물질의 직접적인 또는 간접적인 냉각, 용매가 제거되거나 증발되도록 함, 화학 작용이 상기 물질을 경화시키도록 함, 성분의 농도 변화, 또는 화학 작용 또는 다른 작용으로 중합성 물질의 가교 연결 (crosslinking)을 가능하게 함을 비롯한 다수의 공지된 방법이 상기 물질의 점성도를 증가시켜 이의 형상을 응결시키는데 이용될 수 있다.

[0090] 가령, 한 가지 구체예에 따라, 아가로즈 용액 (최초에, 완충액과 물과 혼합된 분말 상 (powder phase)에서 아가로즈)은 점성도를 감소시키기 위하여 가열되고 원하는 치수를 갖는 모세관 피펫 (즉, 마이크로피펫) 내로 (또는 피스톤의 음의 변위에 의해 원하는 형상의 챔버 내로) 집어넣어진다 (가령, 흡인된다). 충전체의 원하는 횡단면 형상에 따라, 다양한 횡단면 형상을 갖는 모세관 피펫이 이용될 수 있다. 가령, 세로를 따라 실질적으로 원형 횡단면 형상을 갖는 모세관 피펫이 실질적으로 원통형이고 실질적으로 원형 횡단면 형상을 갖는 충전체를 만드는데 이용될 수 있다. 대안으로, 세로를 따라 실질적으로 정사각형 횡단면을 보유하는 모세관 피펫이 실질적으로 원통형이고 정사각형 횡단면 형상을 갖는 충전체를 만드는데 이용될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 무수한 횡단면 형상을 갖는 충전체는 앞서 기술된 바와 같은 다세포체를 만드는데 이용되는 모세관 피펫을 이용하여 유사한 방식으로 생산될 수 있다.

[0091] 피펫 (또는 챔버) 내에 아가로즈 용액은 원하는 형상을 갖는 아가로즈 겔, 다시 말하면, 충전체로 응결될 수 있도록, 예로써 피펫의 외부에서 강제 공기 (forced air)에 의해 또는 피펫을 차가운 액체가 담긴 용기 내로 집어넣음으로써 실온으로 냉각될 수 있다. 생성된 충전체는 특정한 생물-구조체의 구축 동안 피펫 또는 챔버로부터 압출 성형될 수 있다.

[0092] 충전체는 바람직하게는, 다세포체 및 충전체의 배열을 포함하는 3차원 구조체를 조립하는 바이오프린터 또는 유사한 기계에 의해 생산될 수 있다. 가령, 모세관 피펫은 바이오프린터의 프린팅 헤드의 일부일 수 있다. 충전체가 3차원 구조체에 요구될 때, 모세관 피펫은 겔로서 설치될 수 있는 액체의 공급원으로 수송될 수 있다. 가령, 모세관 피펫은 아가로즈 용액을 액체 상태로 유지하기 위하여 가열되는, 상기 용액의 공급원으로 수송될 수 있다. 액체는 충전체의 형상으로 형상화를 위하여, 모세관 피펫 내로 흡인될 수 있다. 이후, 모세관 피펫은 아가로즈 겔의 설치를 촉진하기 위하여 냉각될 수 있다 (가령, 이를 차가운 수조에 담금으로써).

[0093] 3차원 구조체

[0094] 앞서 기술된 다세포체 및 충전체는 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 본 발명의 방법에 따라서 이용될 수 있다. 간단히 말하면, 복수의 다세포체 및 복수의 충전체는 각각의 다세포체가 (i) 다른 다세포체, 또는 (ii) 충전체 중에서 적어도 하나와 접촉하도록 하는 패턴에 따라 배열된다. 다세포체는 이후, 적어도 하나의 다른 다세포체와 융합하여 3차원 생물학적 가공된 조직을 형성할 수 있다. 충전체는 이후, 가공된 조직을 획득하기 위하여 융합된 다세포체로부터 분리될 수 있다.

[0095] 101로 지정된 본 발명의 3차원 구조 (structure)의 한 가지 구체예는 도 2에서 예시된다. 구조 (101)는 복수의 가늘고 긴 다세포체 (1)를 포함하고, 이들 각각은 바람직하게는, 앞서 기술된 가늘고 긴 다세포체 (1)와 동일하

다. 가령, 각각의 가늘고 긴 다세포체 (1)는 바람직하게는, 에어 (air)에서 프린팅될 수 있는 자가-지지 다세포 조직체 (self-supporting multicellular tissue body)를 생산하기 위한 앞서 기술된 방법에 따라 생산되었다. 다세포체 (1)는 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하는 패턴으로 배열된다. 도 1C를 참조하면 완전하게 이해되는 바와 같이, 이들 다세포체 (1) 중에서 적어도 하나는 실질적인 길이를 갖는 접촉 부분을 따라 이들 다세포체 중에서 다른 것과 접촉한다. 도 1C에서는 도 2에서 예시된 패턴으로 배열되기 보다는 표면 (13) 상에서 나란히 인접하는 관계로 존재하는 2개의 다세포체 (1)를 도시하긴 하지만, 2개의 다세포체 (1) 사이에 접촉 부분은 이들이 서로에 나란히 인접하는 관계로 존재하는 패턴으로 배열될 때는 언제나 도 1C에서 예시된 접촉 부분과 실질적으로 유사할 수 있는 것으로 이해된다. 가령, 도 2의 배열에서 각각의 다세포체 (1)는 실질적인 길이를 갖는 접촉 부분에서 적어도 하나의 (가령, 2개의) 다른 다세포체와 접촉한다. 나란한 관계로 인접하는 가늘고 긴 다세포체 사이에 접촉 부분은 바람직하게는, 적어도 대략 1000 마이크로, 더욱 바람직하게는 적어도 대략 1 센티미터, 더욱 바람직하게는 적어도 대략 5 센티미터, 그리고, 이보다 더욱 바람직하게는 대략 5 센티미터 내지 대략 30 센티미터 범위의 길이를 갖는다. 다른 실례에서, 접촉 부분은 바람직하게는, 대략 1000 마이크로 내지 대략 30 센티미터 범위, 그리고 더욱 바람직하게는, 대략 1 센티미터 내지 대략 30 센티미터 범위의 길이를 갖는다. 접촉 부분의 길이는 다세포체 (1)의 길이에 대응할 수 있다. 다세포체 (1)의 길이에서 이론적 상한선이 존재하지 않기 때문에, 개체가 긴 다세포체의 생산과 연관된 실질적인 어려움, 예를 들면, 충분한 양의 세포 페이스트를 획득해야 하는 필요성을 극복할 의향만 있으면, 접촉 부분은 본 발명의 범위 내에서 30 센티미터 초과 길이 (또는 30 센티미터가 아닌 임의의 길이)를 가질 수 있다. 다세포체 (1)가 도 2에서 서로 접촉하긴 하지만, 성숙 분열의 초기 단계에서 다세포체는 서로 응집되지 않는다.

[0096]

상기 구조는 또한, 하나 이상의 충전체 (5)를 포함하고, 이들 각각은 바람직하게는, 앞서 기술된 충전체와 동일하다. 가령, 도 2에서 이러한 구조는 복수의 분리된 충전체 (5)를 포함한다. 충전체 (5)는 각각의 충전체가 적어도 하나의 다세포체 또는 다른 충전체와 접촉하는 패턴으로, 다세포체와 함께 배열된다. 도 2에서 다세포체 (1)와 충전체 (5)는 구조 (101) 내에, 다세포체에 의해 점유되지 않고, 또한 충전체에 의해 점유되지 않는 복수의 공간 (17)을 형성하도록 배열된다. 공간 (17)은 바람직하게는, 조직 배양 배지를 포함하고, 상기 조직 배양 배지는 다세포체 (1)와 충전체 (5)의 상부에 조직 배양 배지를 부어넣음으로써 구조 (101)에 첨가될 수 있다. 따라서 공간 (17)은 다세포체 (1) 내에 세포에 영양소 및/또는 산소의 공급을 조절할 수 있다 (가령, 성숙 분열 동안).

[0097]

도 2에서 예시된 구조에서 다세포체 (1)는 동종 세포체, 이종 세포체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 특히, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 앞서 기술된 임의의 세포 유형 및 세포 유형의 조합을 포함할 수 있다. 예시된 바와 같이 다세포체는 바람직하게는, 그 내부에 포함된 세포 유형에 대하여 실질적으로 동일하다. 하지만, 본 발명의 범위 내에서, 다세포체 중에서 하나 이상이 상기 구조 내에 다세포체와 상이한 세포 유형의 세포를 포함하는 것이 가능하다. 가령, 하나 이상의 다세포체 (1) 각각에서 대부분의 세포는 바람직하게는, 첫 번째 세포 유형의 세포 (가령, 내피 세포 또는 평활근 세포)일 수 있고, 상기 구조 (101) 내에 하나 이상의 다른 다세포체 각각에서 대부분의 세포는 첫 번째 세포 유형과 상이한 두 번째 세포 유형의 세포 (가령, 평활근 세포 또는 섬유아세포)일 수 있다. 다세포체 (1)는 바람직하게는, 형상에서 실질적으로 균일하다. 또한, 충전체는 바람직하게는, 형상에서 실질적으로 균일하다. 게다가, 도 2에서 예시된 바와 같이, 다세포체 (1)는 충전체 (5)의 형상과 실질적으로 동일한 형상을 갖는다.

[0098]

다세포체 (1) 중에서 적어도 일부 (가령, 모든 다세포체)는 관-유사 구조 (tube-like structure) (31)를 형성하도록 배열된다. 적어도 하나의 충전체 (5')는 관-유사 구조 (31) 내부에 존재하고 상기 관-유사 구조를 형성하는 다세포체 (1)에 의해 실질적으로 둘러싸인다. 가령, 도 2에서 다세포체 (1)는 충전체 (5) 중에서 하나를 둘러싸는 관-유사 구조 (31)를 형성하도록 6각형 외형으로 배열된다. 도 2의 6각형 외형에서 각각의 다세포체 (1)는 적어도 2개의 이웃하는 가늘고 긴 다세포체와 나란히 인접하는 관계로 존재한다. 이러한 배열에서, 관-유사 구조 (31) 내부에 하나 이상의 충전체 (5')는 내강-형성 충전체이다. 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')는 그들이 관-유사 구조 (31)를 관통하는 가늘고 긴 공간 내로 다세포체 (1)로부터 세포의 이동과 내성장을 예방하고, 하기에 기술된 방법에 따라 상기 구조의 성숙 분열후 내강이 되기 때문에 이렇게 지칭된다. 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')는 성숙 분열 동안 그 자체 내에서 내강이 전혀 발생하지 않는다. 일반적으로, 성숙 분열을 통해 복수의 생존 세포를 포함하는 관상 가공된 조직을 생산할 수 있는 다세포체의 임의의 배열은 관-유사 구조 내부에 충전체가 존재하지는 여부에 상관없이 관-유사 구조로서 간주될 수 있다. 전술한 내용으로부터, 성숙 분열의 이러한 단계에서 인접하는 다세포체가 서로 응집되지 않고, 따라서 관-유사 구조를 형성하는 2개의 인접하는 다세포체 사이에 공간 내로 물체가 밀려들어갈 수 있다는 사실에 의해, 상기 관-유사 구조가 관상 구조

(tubular structure)와 상이할 수 있음을 명백하다.

[0099]

201로 지정된 3차원 구조의 다른 구체에는 도 7에서 예시된다. 하기에 기술된 점을 제외하고, 상기 구조는 도 2에서 예시되고 앞서 기술된 구조와 실질적으로 동일하다. 도 7에서 구조 (201)는 복수의 다세포체를 포함하고, 이들 각각은 앞서 기술된 다세포체 (1)와 동일할 수 있다. 하지만, 이러한 구조 (201)에서, 상기 구조를 형성하는 패턴으로 배열되는 2가지 상이한 세트의 다세포체 (1', 1'')가 존재한다. 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 내에 대부분의 세포 (가령, 세포 중에서 적어도 대략 90%)는 첫 번째 세포 유형의 세포이고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'') 내에 대부분의 세포 (가령, 세포 중에서 적어도 대략 90%)는 첫 번째 세포 유형과 상이한 두 번째 세포 유형의 세포이다. 가령, 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 내피 세포이고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 평활근 세포일 수 있다. 다른 실례로서, 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 내피 세포이고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'') 내에 대부분의 세포는 섬유아세포일 수 있다. 또 다른 실례로서, 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 평활근 세포이고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'') 내에 대부분의 세포는 섬유아세포일 수 있다. 또한, 다른 세포 유형을 이용하는 것도 가능하다. 첫 번째 세트의 다세포체 (1')는 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')를 둘러싸는 6각형 외형 (앞서 기술된 6각형 외형과 유사함)으로 배열된다. 두 번째 세트의 다세포체 (1'')는 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 및 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')를 둘러싸는 더욱 큰 6각형 외형으로 배열된다. 다세포체 (1', 1'')는 합쳐져서, 2가지 상이한 유형의 세포를 포함하는 관-유사 구조 (231)를 형성한다. 첫 번째 세트의 다세포체 (1')는 관-유사 구조 (231)의 내부 층을 형성하도록 배열되고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'')는 관-유사 구조의 외부 층을 형성하도록 배열된다. 따라서 첫 번째 세포 유형의 세포 (가령, 내피 세포)는 관-유사 구조 (231)의 내부 부분에 더욱 집중되고, 두 번째 세포 유형의 세포 (가령, 평활근 세포)는 관-유사 구조의 외부 부분에 더욱 집중되고, 따라서 첫 번째 세트의 다세포체 (1')에서 내피 세포의 총수 : 비-내피 세포의 총수의 비율은 두 번째 세트의 다세포체 (1'')에서 내피 세포의 총수 : 비-내피 세포의 총수의 비율보다 높고, 또는 두 번째 세트의 다세포체 (1'')에서 평활근 세포의 총수 : 평활근 세포가 아닌 세포의 총수의 비율은 첫 번째 세트의 다세포체 (1')에서 평활근 세포의 총수 : 평활근 세포가 아닌 세포의 총수의 비율보다 높다. 이러한 배열은 첫 번째 유형의 생존 세포의 내부 층 및 두 번째 유형의 생존 세포의 외부 층을 보유하는 관상 가공된 조직의 생산을 조장할 수 있다. 가령, 구조 (201)는 내피 세포의 내부 층 및 평활근 세포의 외부 층을 보유하는 가공된 혈관을 생산하는데 이용될 수 있다. 다른 실례에서, 복수의 내피 세포 및 복수의 평활근 세포를 각각 포함하는 첫 번째 세트의 다세포체 (1')는 관-유사 구조 (231)의 내부 층을 형성하도록 배열되고, 섬유아세포를 포함하는 두 번째 세트의 다세포체 (1'')는 관-유사 구조의 외부 층을 형성하도록 배열된다. 따라서 내피 세포는 관-유사 구조 (231)의 내부 부분에서 더욱 집중되고, 평활근 세포는 상기 관-유사 구조의 중심 부분에서 더욱 집중되고, 그리고 섬유아세포는 상기 관-유사 구조의 외부 부분에서 더욱 집중되고, 따라서 두 번째 세트의 다세포체 (1'')에서 섬유아세포의 총수 : 비-섬유아세포의 총수의 비율은 첫 번째 세트의 다세포체 (1')에서 섬유아세포의 총수 : 비-섬유아세포의 총수의 비율보다 높다. 다른 실례에서, 내피 세포를 각각 포함하는 첫 번째 세트의 다세포체 (1')는 관-유사 구조의 내부 층 (231)을 형성하도록 배열되고, 복수의 평활근 세포 및 복수의 섬유아세포를 각각 포함하는 두 번째 세트의 다세포체 (1'')는 관-유사 구조의 외부 층을 형성하도록 배열된다. 따라서 내피 세포는 관-유사 구조 (231)의 내부 부분에서 더욱 집중되고, 평활근 세포는 상기 관-유사 구조의 중심 부분에서 더욱 집중되고, 그리고 섬유아세포는 상기 관-유사 구조의 외부 부분에서 더욱 집중되고, 따라서 첫 번째 세트의 다세포체 (1')에서 내피 세포의 총수 : 비-내피 세포의 총수의 비율은 두 번째 세트의 다세포체 (1'')에서 내피 세포의 총수 : 비-내피 세포의 총수의 비율보다 높다.

[0100]

도 7A에서는 본 발명의 3차원 구조 (251)의 다른 실례를 예시한다. 이러한 구조 (251)는 세 번째 세트의 다세포체 (1''')를 포함하는 점을 제외하고, 도 7에서 예시된 구조와 실질적으로 동일하다. 세 번째 세트에서 다세포체 (1''') 내에 대부분의 세포는 첫 번째와 두 번째 세트에서 개별 다세포체 (1', 1'')에 대한 다수 세포 유형을 구성하는 각 세포 유형과 상이한 세포 유형이다. 세 번째 세트에서 다세포체 (1''')는 바람직하게는, 두 번째 세트에서 다세포체 (1'')를 둘러싸고 인접하는 전반적으로 6각형 외형으로 배열된다. 따라서 세 번째 세트에서 다세포체 (1''')는 바람직하게는, 두 번째 세트에서 다세포체 (1''), 그리고 첫 번째 세트에서 다세포체 (1')를 둘러싼다. 다세포체 (1', 1'', 1''')는 합쳐져서, 바람직하게는 다세포체의 3개의 층으로 형성된 관-유사 구조 (261)를 형성한다. 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')는 관-유사 구조 (261)를 축 방향으로 관통한다. 구조 (251)가 가공된 혈관을 형성하는데 이용되면, 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 내피 세포이고, 두 번째 세트의 다세포체 (1'') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 평활근 세포이고, 그리고 세 번째 세트의 다세포체 (1''') 내에 대부분의 세포는 바람직하게는, 섬유아세포이고, 따라서 세 번째 세트의 다세포체 (1''')에서 섬유아세포의 총수 : 비-섬유아세포의 총수의 비율은 첫 번째 세트의 다세포체 (1') 또는 두 번째

세트의 다세포체 (1")에서 섬유아세포의 총수 : 비-섬유아세포의 총수의 비율보다 높다. 하지만, 다세포체 (1', 1", 1'")는 본 발명의 범위 내에서 다른 다수의 세포 유형을 가질 수 있다.

[0101] 본 발명의 3차원 구조 (301)의 다른 구체예는 도 8에서 예시된다. 하기에 기술된 점을 제외하고, 이러한 구조 (301)는 앞서 기술되고 도 2에서 예시된 구조 (101)와 실질적으로 동일하다. 이러한 구체예에서, 도 2에서 예시된 구조 (101)에 이용되는 각각의 가늘고 긴 원통형 다세포체 (1)는 일련의 실질적으로 구상 다세포체 (11)로 대체되었다. 구상 다세포체 (11)는 바람직하게는, 자가-지지 다세포체를 생산하기 위한 앞서 기술된 방법에 따라 생산된다. 당연히, 구상 다세포체 (11)의 형상은 이들이 앞서 기술된 다세포체 (1)의 가늘고 긴 특징을 갖지 않기 때문에, 이들 다세포체와 상이하다. 구상 다세포체 (11)는 바람직하게는, 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')를 둘러싸는 관-유사 구조 (331)를 형성하도록 배열된다. 구상 다세포체의 융합을 조장하기 위하여, 각각의 일련 (가령, 계열)의 다세포체는 이웃하는 일련의 다세포체로부터 파생될 수 있고, 따라서 각각의 구상 다세포체의 중심은 이웃하는 시리즈 (series) 내에 인접하는 구상 다세포체의 중심 사이에 거리의 대략 절반의 포인트 (point)로 축 방향 정렬된다. 이는 이웃하는 구상 다세포체 (11) 사이에 접촉 부분을 증가시키기 때문에, 융합을 조장할 수 있다. 도 8에서 하나 이상의 내강-형성 충전체 (5')를 둘러싸는 다세포체 (11)의 층이 하나만 존재하긴 하지만, 도 7 또는 7A에서 다세포체 (1', 1", 그리고 1'") 역시 구상 다세포체 (11)로 대체될 수 있다. 구상 다세포체는 세포 유형, 상이한 다세포체에서 세포 유형의 조합, 그리고 다세포체 내에 세포 유형의 혼합물에 대하여, 가늘고 긴 다세포체에서와 동일한 옵션을 제공한다.

[0102] 예시되지 않은 본 발명의 3차원 구조의 다른 구체예에서, 이러한 구조는 앞서 기술되고 도 2에서 예시된 구조 (101)와 실질적으로 동일하다. 이러한 구체예에서, 도 2에서 예시된 구조 (101)에서 이용된 각각의 가늘고 긴 원통형 충전체는 일련의 실질적으로 구상 충전체로 대체되었다. 구상 충전체는 바람직하게는, 자가-지지 충전체를 생산하기 위한 앞서 기술된 방법에 따라 생산된다. 당연히, 구상 충전체의 형상은 이들이 앞서 기술된 충전체의 가늘고 긴 특징을 갖지 않기 때문에, 이들 충전체와 상이하다. 구상 충전체의 적층을 조장하기 위하여, 각각의 일련 (가령, 계열)의 충전체는 이웃하는 일련의 충전체로부터 파생될 수 있고, 따라서 각각의 구상 충전체의 중심은 이웃하는 시리즈 (series) 내에 인접하는 구상 충전체의 중심 사이에 거리의 대략 절반의 포인트 (point)로 축 방향 정렬된다. 이는 이웃하는 구상 충전체 사이에 접촉 부분을 증가시키기 때문에, 적층을 조장할 수 있다. 구상 충전체는 물질 (가령, 아가로스 등)에 대하여, 가늘고 긴 충전체에서와 동일한 옵션을 제공한다.

[0103] 예시되지 않은 본 발명의 3차원 구조의 다른 구체예에서, 상기 구조는 도 8에서 도시된 바와 같은 가늘고 긴 충전체 중에서 적어도 일부를 대체하는 앞서 기술된 바와 같은 구상 충전체를 포함하는 점을 제외하고, 도 8에 도시된 구조와 실질적으로 동일하다.

[0104] 도 9에서는 401로 지정된 3차원 구조의 다른 구체예의 일부분을 예시한다. 이러한 구조는 바람직하게는, 앞서 기술된 다세포체 (1) 및 복수의 충전체 (5)와 실질적으로 동일할 수 있는, 가늘고 긴 다세포체 (1)의 배열이다. 도 9에서 다세포체 (1) 및 충전체 (5) 중에서 일부가 다세포체 및 충전체의 내부 배열을 도시하기 위하여 제거되었다. 이러한 구조 (401)에서, 충전체 (5) 중에서 하나 이상은 내강-형성 충전체 (5')가 되도록 배열된다. 예시된 바와 같이, 내강-형성 충전체 (5')는 다세포체로부터 세포의 첫 번째와 두 번째 가늘고 긴 공간 (411, 413) 내로의 내성장을 예방하도록 배열된다. 내강-형성 충전체 (5')는 다세포체 (1)에 의해 실질적으로 둘러싸인다. 가령, 다세포체는 바람직하게는, 첫 번째 가늘고 긴 공간 (411)을 둘러싸는 첫 번째 관-유사 구조 (431'), 그리고 두 번째 가늘고 긴 공간 (413)을 둘러싸는 두 번째 관-유사 구조 (431'')를 형성하도록 배열된다. 관-유사 구조 (431', 431'')가 완전하게 도시된 것은 아니지만, 이들은 하기에 기술된 점을 제외하고, 도 2에서 관-유사 구조 (31)와 유사하다.

[0105] 관-유사 구조 (431'') 중에서 하나는 다른 관-유사 구조 (431')보다 더욱 큰 직경을 갖는다. 더욱 작은 직경 관-유사 구조 (431')를 형성하는 가늘고 긴 다세포체 (1) 중에서 적어도 일부는 관-유사 구조 (431', 431'')의 교차점 (441)에서, 더욱 큰 직경 관-유사 구조를 형성하는 가늘고 긴 다세포체 (1) 중에서 적어도 일부와 접촉한다. 게다가, 적어도 하나의 내강-형성 충전체 (5')는 바람직하게는, 다세포체 (1) 내에서 갭 (451)을 관통하여 첫 번째 가늘고 긴 공간의 단부를 두 번째 가늘고 긴 공간에 연결하고, 따라서 내강-형성 충전체 (5')에 의해 관-유사 구조 (431', 431'')에서 형성된 내강은 서로 연결된다. 따라서 이러한 구조의 성숙 분열은 가지화된 관상 가공된 조직, 예를 들면, 가공된 혈관을 생산할 수 있다. 도 9에서 예시된 실례는 단일 가지를 산출하지만, 이러한 기술은 복수의 상이한 직경을 갖는 가지를 보유하는 구조를 비롯한 더욱 고등 가지화 구조 (branching structure)를 산출하기 위하여 확대될 수 있다. 또한, 도 9에서 가늘고 긴 다세포체 (1)는 도 10에서 구조 (501)로 예시된 바와 같이, 구상 다세포체 (11)로 대체될 수 있다. 게다가, 가늘고 긴 다세포체 (1) (도 9) 또

는 구상 다세포체 (도 10)에 의해 형성된 관-유사 구조 (431', 431")는 바람직하게는, 도 7과 7A에서 예시된 바와 유사한 방식으로 하나 이상의 추가 세트의 다세포체를 포함하도록 변형될 수 있다. 앞서 기술된 세포 유형, 상이한 다세포체에서 세포 유형의 조합, 그리고 다세포체 내에 세포 유형의 혼합물에 대하여, 동일한 옵션이 도 9와 10에서 예시된 구조 (401, 501)에도 적용된다.

[0106] 도 1C에서는 본 발명의 다른 3차원 구조 (601)를 예시한다. 이러한 구조 (601)는 충전체를 반드시 필요로 하지는 않는다. 대신에, 일련의 가늘고 긴 다세포체는 시트-유사 구조를 형성하기 위하여 나란히 인접하는 관계로 배열된다. 도 1C에서 예시된 시트 구조 (601)에서 단지 2개의 다세포체 (1)만 존재하지만, 임의의 숫자의 추가적인 다세포체가 이들 다세포체와 나란히 배치될 수 있고, 따라서 각각의 다세포체는 시트 구조의 너비를 증가시키기 위하여 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉된다.

[0107] 3차원 구조를 만드는 방법

[0108] 본 발명의 범위 내에서, 앞서 기술된 3차원 생물학적 구조체를 생산하기 위하여 가늘고 긴 다세포체 (1) 및 구상 다세포체 (11) (일부 경우에, 충전체 (5)와 공동으로)를 비롯한, 앞서 기술된 다세포체를 이용하는 다수의 상이한 방법이 존재한다. 가령, 한 가지 방법은 전반적으로, 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체와 접촉하도록 하는 패턴에 따라 복수의 가늘고 긴 다세포체 (1)를 배열하는 단계, 그리고 이후 다세포체 중에서 적어도 하나 (가령, 전부)가 적어도 하나의 다른 다세포체에 융합하도록 하여 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 생산하는 단계를 수반한다. 다세포체의 배열 내에 충전체를 반드시 포함할 필요는 없다 (예로써, 도 1C 참조). 하지만, 각각의 다세포체가 적어도 하나의 다른 다세포체 또는 충전체와 접촉하고, 이후 다세포체가 융합하도록 하여 원하는 3차원 생물학적 가공된 조직을 형성하도록, 복수의 다세포체 (앞서 기술된 가늘고 긴 다세포체 (1) 및 구상 다세포체 (11) 포함) 및 하나 이상의 충전체 (5)를 배열하는 것도 가능하다.

[0109] 미리-결정된 패턴으로 다세포체를 전달하여 원하는 3차원 구조를 생산하기 위하여 다수의 방법이 이용될 수 있다. 가령, 다세포체는 서로 또는 충전체와 접촉하게 수동으로 배치되거나, 피펫, 노즐, 또는 바늘로부터 압출 성형 (extrusion)에 의해 적소에 침적되거나, 또는 자동화 기계에 의해 접촉되게 적소에 놓일 수 있다. 도 11에서 예시된 바와 같이, 예로써, 다세포체를 픽업하기 위하여 (가령, 앞서 기술된 주형 (301)으로부터 이들을 끄집어내기 위하여), 하나 이상의 기구 (이는 바람직하게는, 앞서 기술된 첫 번째 형상화 장치 (51), 앞서 기술된 바와 같이 주형 (301)으로부터 다세포체를 끄집어내는 모세관 피펫 (51') 및/또는 상이한 기구를 포함할 수 있다)가 이용된다. 이러한 기구는 다세포체를 조립 구역 (assembly area) (가령, 유리 표면)으로 수송하고, 여기서 3차원 구조체 (가령, 도 1C, 2, 7, 7 A, 또는 8-10에서 예시된 바와 같이)가 조립되고, 이후 조립 구역으로 이미 수송되어 조립되고 있는 구조체에 배치된 다른 다세포체 및 충전체에 상대적인 위치로, 다세포체를 분배하거나, 또는 달리 위치시킨다.

[0110] 다세포체가 적소에 놓인 이후, 이러한 공정은 바람직하게는, 구조체에 다른 다세포체 또는 충전체를 추가하기 위하여 (가령, 구조체에 이미 배치된 다세포체와 나란히 이를 위치시킴으로써) 반복된다. 조립되는 구조체가 하나 이상의 충전체를 포함하면, 바람직하게는 충전체 (5)를 픽업하고 (또는 앞서 기술된 바와 같이, 충전체를 만들고), 충전체를 조립 구역으로 수송하고, 그리고 충전체가 필요할 때는 언제나, 조립되는 구조체 내에 적소에 충전체를 분배하거나, 또는 달리 위치시키기 위하여 다른 기구 (도시되진 않지만, 형상화 장치 (51) 또는 모세관 피펫 (51')과 유사할 수 있다)가 이용된다. 다세포체를 조립 구역으로 수송하는데 이용되는 기구 (51, 51')는 바람직하게는, 다세포체 및 충전체를 원하는 패턴으로 배열하는데 사용가능한 바이오프린터 (bioprinter) 또는 다른 자동화 기계 (apparatus)의 프린팅 헤드 (printing head)에 의해 운반된다. 가령, 한 가지 적합한 바이오프린터는 U.S. Patent App. No. 20040253365에서 개시되는데, 이는 본 발명에 참조로서 편입된다. 조직 공학 분야의 당업자는 다세포체 (및 이용되는 경우의 충전체)를 적절한 구조체 내로 배열하는데 이용될 수 있는 다른 적절한 바이오프린터 및 유사한 기계에 익숙할 것이다.

[0111] 충전체를 조립 구역으로 수송하는데 이용되는 기구는 바람직하게는, 바이오프린터의 다른 헤드의 일부이다. 바이오프린터는 복수 헤드를 보유할 수 있고 및/또는 다세포체 및 충전체를 수송하기 위한 다양한 기구 (51, 51')는 하나 이상의 바이오프린터 헤드 내로 순차적으로 적재될 수 있다. 구조체를 자동으로 조립하기 위하여 바이오프린터 또는 유사한 기계를 이용하는 것이 바람직하긴 하지만, 본 명세서에 기술된 방법은 본 발명의 범위 내에서 수동으로 (가령, 하나 이상의 모세관 피펫을 이용하여) 수행될 수 있다.

[0112] 도 11에서 예시된 바와 같이, 다세포체 (1)는 바람직하게는, 하나 이상의 충전체 (5)의 상부에 배치 (가령, 적층)된다. 다세포체 (1)는 바람직하게는, 다른 다세포체 및/또는 충전체 (5)에 인접하게 배치된다. 따라서 다세포체 (1)는 충전체 (5) 내로 밀려들어가거나, 또는 상기 충전체 내에 묻혀지지 않는다. 이는 "에어 (air)에서

프린팅"으로 지칭될 수 있는데, 그 이유는 다세포체가 겔 또는 액체 내로 분배되지 않기 때문이다. 도 12에서 예시된 방법은 구상 다세포체 (11)가 도 11에서 예시된 가늘고 긴 다세포체 (1) 대신에 이용되는 점을 제외하고, 도 11에서 예시된 방법과 실질적으로 유사하다. 도 11과 12에서는 각각, 도 2와 8에 도시된 구조체를 만드는 공정을 예시하지만, 도 1C, 7, 7A, 8, 그리고 9에서 예시되고 앞서 기술된 것들 (및 많은 다른 것들)과 같은 구조체는 본 발명의 범위 내에서 실질적으로 동일한 방식으로 생산될 수 있는 것으로 이해된다.

[0113] 구조체의 조립이 완결되면, 조직 배양 배지는 바람직하게는, 구조체의 상부 위에 부여진다. 조직 배양 배지는 다세포체 내에 세포를 지지하기 위하여, 다세포체 및 충전체 사이의 공간 (17)에 들어갈 수 있다. 이들 3차원 구조체 내에 다세포체는 서로 융합하여 생물학적 가공된 조직을 형성할 수 있다. "융합하는", "융합된", 또는 "융합"은 세포 표면 단백질 사이에 상호작용을 통해 직접적으로, 또는 세포와 ECM 성분 또는 ECM 성분의 유도체의 상호작용을 통해 간접적으로, 연속된 다세포체의 세포가 서로 부착되는 것을 의미한다. 융합후, 구조체 내에 포함된 임의의 충전체는 가공된 조직으로부터 분리된다. 관-유사 구조를 포함하는 구조체의 경우에, 예로써, 상기 관 외부에 임의의 충전체는 제거될 수 있다 (가령, 관-유사 구조체로부터 형성된 관상 구조로부터 이들을 벗겨냄으로써). 관상 구조 내부에 임의의 내강-형성 충전체 (5')는 바람직하게는, 관상 구조의 열린 단부로부터 외부로 끌어당겨진다. 내강-형성 충전체 (5')는 바람직하게는, 내강으로부터 외부로 충전체를 끌어당기는 것을 용이하게 하기 위하여 원하는 경우에, 도움이 되는 (가령, 가공된 조직이 가지화된 관상 구조이면) 유연성 물질로 만들어질 수 있다. 다른 옵션은 융합후, 용해 (가령, 온도 변화, 광선, 또는 다른 자극에 의해)될 수 있는 물질로부터 충전체 (5) 및 내강-형성 충전체 (5')를 만드는 것이다.

[0114] 또한, 본 발명에서는 복수의 다세포체를 미리-결정된 3-D 패턴에 따라 미리-선택된 수용 환경에 더욱 전달하여 이들 세포 단위가 원하는 생물-구조체 내로 융합할 수 있도록 함으로써, 다세포체를 이용하여 3-D 형상을 갖는 생물학적 구조체, 예를 들면, 조직, 혈관, 또는 장기를 가공하는 다른 방법을 제시한다. 융합되는 2개 이상의 다세포체는 동일하거나 상이한 형상과 크기를 가질 수 있고, 그리고 동일하거나 상이한 세포 유형을 포함할 수 있다. 다세포체는 다수의 방법으로 생물-구조체-가공에 적용될 수 있다. 가령, 원하는 구조의 상부 절반과 하부 절반을 포함하는 2개의 상이하게 형상화된 다세포체가 생산될 수 있고, 접촉되고, 융합될 수 있다. 대안으로, 복수의 다세포체가 조립되고 충전체와 공동으로 원하는 형상으로 융합될 수 있다.

[0115] 한 가지 구체예에 따라, 다세포체가 충전체와 함께 이용될 때, 가공 방법은 A) 복수의 다세포체를 복수의 충전체와의 미리-결정된 조합으로 미리-결정된 패턴에 따라 전달하여 층을 이루는 구조체를 형성하는 단계, 여기서 다세포체 및 충전체는 연속되고, B) 성숙 분열 동안 층을 이루는 구조체를 미리-선택된 통제된 환경 내로 침적하는 단계, 여기서 다세포체는 서로 융합하여 융합된 구조체를 산출하고, 그리고 C) 융합된 구조체로부터 충전체를 제거하여 원하는 생물학적 구조체를 생산하는 단계를 포함할 수 있다.

[0116] 더 나아가, 각각의 다세포체 (1, 11)는 2가지 이상의 세포 유형을 포함하고, 2가지 이상의 세포 유형을 포함하는 생물-구조체를 산출할 수 있다. 이들 세포 유형은 구조 표면에 대한 친화성 또는 다른 힘, 예를 들면, 세포-세포 상호작용에 기초하여 분리될 것으로 예상된다. 가령, 원통형 성형된 다세포체는 관상 구조, 예를 들면, 이식가능 맥관을 생산하기 위하여 평활근 세포 및 내피 세포의 혼합물로부터 산출될 수 있다. 다세포체는 이후, 적소에 배치되고 (가령, 도 2에서처럼) 관상 구조체 내로 융합될 수 있다. 내강을 통한 상기 구조체의 관류 (perfusion) 시에, 내피 세포는 관상 구조체의 중심 내부 표면으로 이동하는 반면, 평활근 세포는 외부로 점유할 것으로 예상된다. 다른 실례로서, 다세포체 (1)가 내피 세포 및 섬유아세포의 혼합물을 포함하면, 내피 세포는 내강을 통한 상기 구조체의 관류 시에 관상 구조체의 중심 내부 표면으로 이동하는 반면, 섬유아세포는 외부로 점유할 것으로 예상된다. 다른 실례로서, 다세포체 (1)가 평활근 세포 및 섬유아세포의 혼합물을 포함하면, 평활근 세포는 관상 구조체의 중심 내부 표면으로 이동하는 반면, 섬유아세포는 외부로 점유할 것으로 예상된다. 또 다른 실례로서, 다세포체 (1)가 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포의 혼합물을 포함하면, 내피 세포는 내강을 통한 상기 구조체의 관류 시에 상기 구조체의 내부 층으로 분류되고, 섬유아세포는 상기 구조체의 외부 층으로 분류되고, 그리고 평활근 세포는 내부 내피 층과 외부 섬유아세포 층 사이에 끼여 있는 중간 층으로 분류될 것으로 예상된다.

[0117] 3차원 가공된 관상 구조

[0118] 본 발명에서는 본 발명의 방법에 따라 가공된 세포 관상 구조체의 실례를 더욱 제공한다. 도 13과 14에서는 본 명세서에 기술된 공정에 의해 구축된 실제 바이오-구조체 (bio-construct)를 도시한다. 도 13에서는 성숙 분열 및 충전체의 제거 이후에, 2가지 상이한 관상 바이오-구조체의 측면을 도시한다. 도 14에서는 모든 충전체가 제거된 이후, 관상 구조체의 단부를 도시한다.

- [0119] 이런 구조체의 한 가지 구체에는 도 15에서 개략적으로 예시되고, 그리고 801로 지정된다. 3차원 관상 구조 (801)는 적어도 하나의 충전체 (5') 및 복수의 서로 응집된 생존 세포를 포함하고, 이들 세포는 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 관상 구조 (801)를 형성한다. 충전체 (5')는 유순한 생물적합성 물질을 포함하고, 이러한 생물적합성 물질은 세포의 상기 물질 내로의 이동과 내성장을 억제하고 세포의 상기 물질에 대한 부착을 억제한다. 생물적합성 물질은 또한, 영양소에 투과성이다.
- [0120] 3차원 관상 구조는 바람직하게는, 적어도 대략 1000 마이크로미터의 길이, 더욱 바람직하게는 적어도 대략 5 센티미터 (가령, 대략 5 센티미터 내지 대략 30 센티미터 범위)의 길이를 갖는다. 일부 경우에, 3차원 관상 구조는 바람직하게는, 대략 30 센티미터 이하의 길이를 갖는다. 다세포체에서처럼, 3차원 관상 구조의 길이에서 이론적 상한선은 존재하지 않고, 따라서 개체가 긴 관상 구조를 만드는 것과 연관된 실질적인 어려움 (가령, 충분한 양의 세포를 획득하는 것, 이런 구조를 만드는데 필요할 수 있는 긴 다세포체를 처리하는 것 등)을 극복할 의향만 있으면, 본 발명의 범위 내에서 30 센티미터 초과 길이 (또는 30 센티미터가 아닌 임의의 길이)를 갖는 3차원 관상 구조를 만드는 것이 가능한 것으로 인식된다.
- [0121] 개별 다세포체와 유사하게, 3차원 관상 구조는 단일 세포 유형으로 구성되거나, 또는 복수 세포 유형을 포함할 수 있다. 3차원 관상 구조는 앞서 논의된 임의의 다양한 세포 유형을 이용하여 만들어질 수 있다. 따라서 예로써, 상기 관상 구조는 실질적으로 동종일 수 있다 (즉, 관상 구조 내에 거의 모든 생존 세포는 단일 세포 유형의 세포이고, 상기 관상 구조의 성숙 분열에 극히 미미한 영향을 주는 상대적으로 적은 숫자의 상이한 세포 유형의 세포를 비롯한 낮은 수준의 불순물을 일부 관용한다). 더욱 구체적으로, 상기 관상 구조의 세포는 바람직하게는, 단일 세포 유형의 세포로 본질적으로 구성된다. 대안으로, 상기 관상 구조의 세포는 바람직하게는, 첫 번째 세포 유형의 생존 세포를 포함하고, 그리고 세포 중에서 적어도 대략 90%가 첫 번째 세포 유형의 세포이다.
- [0122] 3차원 관상 구조는 또한, 이종세포이고, 2가지 이상의 상이한 세포 유형을 포함할 수 있다. 3차원 관상 구조가 맥관 관상 구조이면, 상기 관상 구조는 맥관 조직에서 전형적으로 관찰되는 세포 유형 (가령, 내피 세포, 평활근 세포, 섬유아세포 등)을 유리하게 포함할 것이다. 한 가지 실례에서, 상기 관상 구조의 세포는 복수의 첫 번째 세포 유형의 생존 세포 및 복수의 두 번째 세포 유형의 생존 세포를 포함하고, 두 번째 세포 유형은 첫 번째 세포 유형과 상이하다. 다른 실례에서, 상기 관상 구조의 세포는 복수의 첫 번째 세포 유형의 생존 세포, 복수의 두 번째 세포 유형의 생존 세포, 그리고 복수의 세 번째 세포 유형의 생존 세포를 포함한다. 따라서 맥관 관상 구조의 경우에, 세포는 바람직하게는, (i) 내피 세포 및 평활근 세포; (ii) 평활근 세포 및 섬유아세포; (iii) 내피 세포 및 섬유아세포; 또는 (iv) 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포를 포함할 수 있다. 게다가, 맥관 관상 구조에서, 이들 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포는 자연 발생 조직에서 관찰되는 세포 유형의 층을 모방하는 층을 유리하게 형성할 수 있다. 따라서 한 가지 실례에서, 내피 세포 및 평활근 세포를 포함하는 맥관 관상 구조에서, 내피 세포는 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 내부 층을 유리하게 형성하고, 그리고 평활근 세포는 적어도 하나의 충전체 및 내피 세포에 의해 형성된 내부 층을 실질적으로 둘러싸는 층을 유리하게 형성한다. 다른 실례에서, 내피 세포 및 섬유아세포를 포함하는 맥관 관상 구조에서, 내피 세포는 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 내부 층을 유리하게 형성하고, 섬유아세포는 적어도 하나의 충전체 및 내피 세포에 의해 형성된 내부 층을 실질적으로 둘러싸는 층을 유리하게 형성한다. 다른 실례로서, 평활근 세포 및 섬유아세포를 포함하는 맥관 관상 구조에서, 평활근 세포는 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 내부 층을 유리하게 형성하고, 섬유아세포는 적어도 하나의 충전체 및 평활근 세포에 의해 형성된 내부 층을 실질적으로 둘러싸는 층을 유리하게 형성한다. 다른 실례에서, 내피 세포, 평활근 세포, 그리고 섬유아세포를 포함하는 맥관 관상 구조에서, 내피 세포는 바람직하게는, 적어도 하나의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 내부 층을 형성하고, 평활근 세포는 바람직하게는, 적어도 하나의 충전체 및 내피 세포에 의해 형성된 내부 층을 실질적으로 둘러싸는 두 번째 층을 형성하고, 그리고 섬유아세포는 바람직하게는, 적어도 하나의 충전체, 내피 세포에 의해 형성된 내부 층, 그리고 평활근 세포에 의해 형성된 두 번째 층을 실질적으로 둘러싸는 세 번째 층을 형성한다.
- [0123] 3차원 가지화된 관상 구조 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 이런 구조의 한 가지 실례에서, 복수의 생존 세포는 내강-형성 충전체인 하나 이상의 충전체를 실질적으로 둘러싸는 가지화된 관상 구조를 형성한다. 이들 내강-형성 충전체는 생존 세포의 첫 번째와 두 번째 가늘고 긴 공간으로의 내성장을 예방하도록 배열되고, 여기서 첫 번째 가늘고 긴 공간의 단부는 두 번째 가늘고 긴 공간의 측면에 인접한다.
- [0124] 적어도 하나의 충전체의 유순한 생물적합성 물질은 아가로즈, 한천, 히알루론산, 그리고 폴리에틸렌 글리콜로 구성된 군에서 선택된다. 적어도 하나의 충전체는 바람직하게는, 관상 구조로부터 외부로 충전체를 끌어당김으

로써 상기 관상 구조로부터 분리될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0125]

도면의 간단한 설명

도 1A는 본 발명의 다세포체의 한 가지 구체예의 사시도이다;

도 1B는 표면에 의해 지지되는 다세포체의 확대된 사시도이다;

도 1C는 표면 상에서 서로 간에 나란히 인접하는 복수 다세포체의 단부의 확대된 사시도이다;

도 2는 가공된 조직의 한 가지 구체예를 생산하는데 적합한 패턴으로 배열되는 복수의 다세포체 및 복수의 충전체를 포함하는 3차원 구조체의 한 가지 구체예의 사시도이다;

도 3A-3D에서는 도 1A, 1B, 1C, 그리고 2에서 예시된 다세포체를 만드는 방법의 한 가지 구체예를 예시한다;

도 4A는 도 3A-3D에서 예시된 방법에 이용하기 적합한 주형의 한 가지 구체예의 사시도이다;

도 4B는 상기 주형의 평면도이다;

도 4C는 도 4B에서 라인 4C--4C를 포함하는 수평면에서 포착된 상기 주형의 단면도이다;

도 4D는 도 4C에서 예시된 바와 같은 주형의 일부분의 확대된 단면도이다;

도 5A는 도 4A-4D에서 예시된 주형을 만드는데 이용될 수 있는 도구의 한 가지 구체예의 사시도이다;

도 5B는 도 5A에서 예시된 도구의 측면도이다;

도 5C는 도 5B에서 예시된 바와 같은 도구의 일부분의 확대된 측면도이다;

도 6A-6C에서는 도 5A-5C에서 예시된 도구를 이용하여 도 4A-4D에서 예시된 주형을 만드는 방법의 한 가지 구체예를 예시한다;

도 7, 7A, 그리고 8-10은 복수의 다세포체 및 복수의 충전체로부터 만들어진 3차원 구조체의 다양한 구체예의 개략적 사시도이다;

도 11과 12는 복수의 다세포체 및 충전체로부터 3차원 구조체를 만드는 다양한 방법의 개략도이다;

도 13은 각각, 1200 마이크론과 900 마이크론의 외부 직경 (outside diameter)을 갖는, 본 명세서에 기술된 방법에 따라 가공된 2가지 관상 구조의 사진이다;

도 14는 본 명세서에 기술된 방법에 따라 가공된 다른 관상 구조의 사진이다;

도 15는 관상 구조의 내강에서 충전체와 공동으로, 본 명세서에 기술된 방법에 따라 가공된 관상 구조의 한 가지 구체예의 개략적 사시도이다;

도 16에서는 가지화된 관상 구조를 형성하기 위한 구상 다세포체의 융합을 예시하는 일군의 사진을 포함한다;

도 17에서는 첫 번째 세트의 다세포체 및 첫 번째 세트에서 다세포체의 세포 유형 조성 (cell type composition)과 상이한 세포 유형 조성을 갖는 두 번째 세트의 다세포체의 융합을 예시하는 일군의 사진을 포함한다; 그리고

도 18에서는 젤라틴과 피브린을 포함하는 관상 가공된 구조를 예시하는 일군의 사진을 포함한다.

대응하는 참고 기호 (reference character)는 도면의 전체에 걸쳐서 대응하는 부분을 지시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0126]

실시예

[0127]

실시예 1: 돼지 평활근 세포를 이용한 다세포체의 제조 및 조직 공학

[0128]

I. 돼지 평활근 세포. 돼지 평활근 세포 (SMC)는 기존 연구에서 이용된 동일한 조건에서 성장되었다. 배지 조성은 10% 돼지 혈청, 10% 소 혈청, 50 mg/ℓ의 프롤린, 20 mg/ℓ의 알라닌, 50 mg/ℓ의 글리신, 50 mg/ℓ의 아스코르브산, 12 μg/ℓ의 혈소판 유래된 성장 인자-BB (PDGF-BB), 12 μg/ℓ의 염기성 섬유아세포 성장 인자

(bFGF), 3.0 $\mu\text{g}/\ell$ 의 CuSO_4 , 0.01 M의 HEPES 완충액, 그리고 1.0×10^5 단위/ ℓ 의 페니실린과 스트렙토마이신으로 보충된 저당 (low glucose) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle 배지)이었다. 이들 세포는 젤라틴 (돼지 피부로부터 젤라틴) 코팅된 10 cm 페트리 접시에서 성장되고 37°C, 5% CO_2 에서 배양되었다. 이들 SMC는 다세포체 (가령, 세포 단위) 제조물에 이용되기에 앞서, 최대 7회 계대배양 (passage)되었다. 24개의 세포 단위 및 4개의 관 (외부 직경 (OD): 1.5 mm; 내부 직경 (ID): 0.5 mm; 길이 (L): 5 cm)을 제조하기 위하여 18개의 합류성 페트리 (즉, 세포 배양) 접시가 필요하였다.

[0129] II. 아가로즈 주형.

[0130] (i) 2% 아가로즈 용액의 제조. 2 g의 초고순도 저융점 (LMP) 아가로즈가 100 ml의 초고순도 물/완충액 용액 (1:1, v/v)에 용해되었다. 완충액 용액은 PBS = Dulbecco의 인산염 완충된 염수 1x 또는 HBSS= Hanks의 균형된 염 용액 1x일 수 있다. 아가로즈 용액은 온수 (80°C 초과)를 포함하는 비커에 배치되고 아가로즈가 완전히 용해될 때까지 전열기에 유지되었다. 아가로즈 용액은 온도가 36°C를 초과하면 액체로 존속한다. 36°C 미만에서, 상 전이 (phase transition)가 발생하고, 점성도가 증가하고, 그리고 최종적으로 아가로즈가 겔을 형성한다.

[0131] (ii) 아가로즈 주형의 제조. 아가로즈 주형은 페트리 접시 (10 cm 직경)에 잘 들어맞는 테플론 프린트 (즉, 테플론 도구) (도 5A-5C)를 이용하여 형성되었다. 조립체 (테플론 프린트 + 페트리 접시)는 수평으로 유지되고 대략 40 ml의 미리-가온된 아가로즈가 테플론 프린트 내에 구멍을 통해 페트리 접시에 부어졌다. 모든 공기 기포를 제거한 이후, 상기 조립체는 4°C에서 적어도 1시간 동안 배치되었다. 아가로즈의 완전한 교질화 (gelification) 이후, 테플론 프린트가 제거되고 홈이 아가로즈에서 드러났다 (도 4D에서 홈 (305) 참조). 10 ml의 배지가 주형에 첨가되었다.

[0132] III. 다세포체의 제조.

[0133] 배지는 합류성 페트리 접시로부터 제거되고, 세포는 10 ml의 HBSS + 2mM CaCl_2 로 세척되었다. 표면으로부터 세포를 이탈시키기 위하여 1.5 ml의 트립신 0.1%가 균등하게 살포되었다. 5 ml의 배지 + 2 mM CaCl_2 가 페트리 접시에 첨가되었다. 세포 현탁액은 900g에서 5분 동안 원심분리되었다. 배지 (즉, 상층액)의 제거후, 세포 펠렛은 200 μl 의 배지 + 2mM CaCl_2 에서 재현탁되고, 세포 클러스터를 깨트리고 단일 세포 현탁액을 획득하기 위하여 수회 상하로 흔들렸다 (즉, 활발하게 피펫팅 (pipetting)되었다). 생성된 용액은 15 ml 원심분리 튜브 내에 배치된 2 ml Eppendorf 튜브 내로 이전되었다. 고밀도 세포 페이스트는 1300g에서 2분 동안 원심분리에 의해 형성되었다. 배지 (즉, 상층액)는 제거되고, 세포 페이스트는 1 ml Eppendorf 피펫터 (pipettor)에 적재된 1 ml 첨단 (tip) 내로 삽입된 모세관 (OD 1mm, ID 0.5 또는 0.3 mm) 내로 흡인 (aspiration)에 의해 이전되었다. 세포 페이스트를 포함하는 모세관은 배지 + 2mM CaCl_2 에서 15분 동안 37°C, 5% CO_2 에서 배양되었다. 형상화된 세포 페이스트는 플런저 (plunger)로 모세관으로부터, 배지로 채워진 아가로즈 주형의 홈 내로 분출되었다 (도 3C). 주형은 배양기 내에서 하룻밤동안 배치되었다. 익일에, 성숙 다세포체는 손으로 모세관 내로 흡인되고 (즉, 역으로 빨아들여지고) (도 3D) 추가 이용 때까지 배지 내로 배치되었다.

[0134] IV. 조직 공학.

[0135] 10 ml의 2% 아가로즈의 미리-가온된 용액이 10 cm 직경 페트리 접시에 침적되고, 균일한 층을 형성하기 위하여 균등하게 살포되었다. 아가로즈 겔은 4°C에서 냉장고에서 제조되었다. 모세관은 아가로즈 용액으로 채워지고, 충전체를 형성하기 위하여 신속하게 냉각되었다 (차가운 불어넣는 공기 또는 차가운 PBS 용액을 이용하여). 내강-형성 충전체의 경우에, 아가로즈 농도는 4%이었다; 모든 다른 충전체의 경우에, 아가로즈 농도는 2%이었다. 실체 현미경 (binocular microscope) 하에, 충전체는 피스톤 또는 와이어를 이용하여 모세관으로부터 압출 성형되고, 5 cm 아가로즈 막대 (즉, 충전체)가 페트리 접시 내부에 아가로즈 층에 일직선으로 놓여졌다. 두 번째 충전체는 첫 번째 충전체에 병렬되고, 이런 방식으로 9개의 충전체가 침적되어 첫 번째 층을 형성하였다. 두 번째 층을 구성하는 6개의 충전체는 도 11에 도시된 바와 같이 침적되었다. 관의 첫 번째 층을 형성하기 위하여 4번째와 5번째 위치에서 2개의 다세포체가 침적되었다. 세 번째 층은 3번째와 5번째 위치에서 5개의 충전체 및 2개의 다세포체의 침적에 의해 형성되었다. 네 번째 층은 3번째와 4번째 위치에서 4개의 충전체 및 2개의 다세포체로 구성되었다. 다섯 번째 층은 5개의 충전체로 구성되었다 (도 2). 이러한 침적 과정 내내, 상기 물질 (아가로즈 및 다세포체)의 탈수를 피하기 위하여 상기 구조체의 측면에 소량의 배지 (이 시점에서 10 μl)가 첨가되었다. 0.5 내지 1 ml의 액체 아가로즈 (37°C < T < 40°C)가 상기 구조체의 완전성을 유지하기 위하여 이의 주변과 상부에 부어졌다. 교질화후, 상기 구조체가 완전히 잠길 때까지 배지가 첨가되었다. 상기 구조체는 배양기

에 배치되었다. 48시간후, 다세포체는 서로 융합하였다. 아가로즈는 관상 구조의 외부 표면으로부터 벗겨냄으로써, 그리고 관상 구조의 내강을 채우는 충전체를 상기 관상 구조로부터 외부로 끌어당김으로써 제거되었다. 관은 이후, 추가의 성숙 분열을 위하여 생물반응기 (bioreactor) 내로 이전되었다. 이러한 성숙 분열을 위하여 임의의 상업적으로 가용한 생물반응기가 이용될 수 있다.

실시예 2: 다세포체 제조 및 조직 공학을 위한 대안적 절차.

I. 다양한 유형의 세포에 대한 성장 조건

N-카드헤린으로 형질감염 (transfection)된 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포는 10% 소 태아 혈청 (FBS), 항생제 (100U/ml 페니실린-스트렙토마이신 및 25 μ g/ml 젠타마이신) 및 400 μ g/ml 제네티신으로 보충된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle 배지)에서 성장되었다. 젠타마이신을 제외한 모든 항생제는 Invitrogen으로부터 구입되었다.

인간 제대 정맥 평활근 세포 (HUSMC)와 인간 피부 섬유아세포 (HSF)는 American Type Culture Collection (각각, CRL-2481 및 CRL-2522)로부터 구입되었다. HUSMC는 3:1의 비율로 Ham의 F12, 10% FBS, 항생제 (100U/ml 페니실린-스트렙토마이신 및 25 μ g/ml 젠타마이신), 20 μ g/ml 내피 세포 성장 보충물 (ECGS), 그리고 나트륨 피루브산염 (NaPy) 0.1M을 포함하는 DMEM에서 성장되었다. 인간 피부 섬유아세포 (HSF)는 3:1의 비율로 Ham의 F12, 20% FBS, 항생제 (100U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 25 μ g/ml 젠타마이신), 글루타민 2mM, NaPy 0.1M을 포함하는 DMEM에서 성장되었다.

새로 분리된 돼지 대동맥 평활근 세포 (PASMC)는 10% FBS, 10% 돼지 혈청, L-아스코르브산, 황산 동, HEPES, L-프롤린, L-알라닌, L-글리신, 그리고 페니실린 G를 포함하는 저당 DMEM에서 성장되었다.

모든 세포주 (CHO 제외)는 0.5% 젤라틴 (돼지 피부 젤라틴) 코팅된 접시에서 배양되고 5% CO₂를 포함하는 가습된 공기에서 37°C에서 유지되었다.

II. 다세포체의 제조

세포 배양액은 인산염 완충된 염수 용액 (PBS)으로 2회 세척되고, 0.1% 트립신으로 10분 동안 처리되고, 그리고 생성된 세포 현탁액은 1,500 RPM에서 5분 동안 원심분리되었다. 세포는 4 ml의 세포-유형 특이적 배지에서 재현탁되고, 부착력 회복을 위하여 37°C, 5% CO₂에서 선회 진탕기 (gyratory shaker) 위에 10-ml 조직 배양 플라스크에서 1시간 동안 배양되고, 이후 1,500 RPM에서 5분 동안 원심분리되었다. 이들 세포는 이후, 재현탁되고, 200 μ l의 배지에서 활발하게 피펫팅되고, 3,500 RPM에서 2분 동안 재원심분리되었다. 생성된 세포 펄트 (세포 페이스트)은 300 μ m 또는 500 μ m 내부 직경을 갖는 모세관 내로 이전되고 37°C, 5% CO₂에서 15분 동안 배양되었다.

실질적으로 구상 다세포체의 경우에, HSF 또는 CHO 세포가 이용되었고, 부분적으로 응집된 세포 페이스트는 기계적으로 압출 성형되고 동등한 단편으로 절단되며, 이들 단편은 37°C, 5% CO₂에서 선회 진탕기 위에서 하룻밤 동안 모아졌다. 모세관의 직경에 따라, 이러한 절차는 분명히 정의된 크기와 세포 수의 규칙적인 회전 타원체 (regular spheroid)를 제공하였다.

가늘고 긴 다세포체의 경우에, PASMC, HUSMC, 또는 HSF가 이용되었고, 부분적으로 응집된 세포 페이스트는 바이오프린터를 이용하여 특수하게 제조된 비-접착성 테플론 또는 아가로즈 주형 내로 기계적으로 압출 성형되었다. 37°C, 5% CO₂에서 주형 내에서 하룻밤 성숙 분열 이후에, 다세포체는 충전체와 함께 침적되어 실시예 1에 기술된 바와 같은 3차원 가공된 조직을 산출할 수 있을 만큼 충분히 점착성이었다.

III. 충전체의 제조

아가로즈 막대를 제조하기 위하여, 액체 아가로즈 (온도 > 40°C)가 모세관 (300 또는 500 μ m ID) 내로 적하 (loading)되었다. 내강-형성 충전체의 경우에, 아가로즈 농도는 4%이었다; 모든 다른 충전체의 경우에, 아가로즈 농도는 2%이었다. 적하된 모세관은 차가운 PBS (4°C) 내로 담가졌다. 아가로즈가 이들 모세관에 부착하지 않기 때문에, 겔화 (gelation) 시에, 다른 프рин팅 헤드를 이용한 바이오프린터에 의해 연속 막대가 용이하게 압출 성형될 수 있었다.

IV. 면역조직화학

조직은 4% 파라포름알데히드에서 하룻밤동안 고정되었다. 탈수후, 조직은 파라핀 침투 (infiltration)와 포매

(embedding)를 위하여 처리되었다. 전체적인 외관을 위하여, 5 μm 절편은 헤마톡실린-에오신으로 염색되었다. 면역조직화학을 위하여, 절편은 아래의 항체와 함께 배양되었다: 항-절단된 카스파제-3 (생쥐와 인간 절단된 카스파제-3과 반응하는 토끼 항-절단된 카스파제-3 다중클론 항체의 1:50 희석액); 항-평활근 액틴 (생쥐 항-인간 평활근 액틴 (1A4)의 1:400 희석액). 이차 항체 (EnVision+, 항-생쥐 또는 항-토끼 항체와 접합된 양고추냉이 과산화효소-표지된 중합체)는 DAB (3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 가시화되었다. 절편은 Mayer의 헤마톡실린으로 대조염색되고, 현미경 검사 (1X70)를 위하여 커버 슬립으로 덮어졌다.

[0150] V. 실질적으로 구상 다세포체를 이용한 조직 공학.

[0151] 실질적으로 구상 다세포체를 정의된 위상의 맞춤형 관상 구조로 조립하기 위하여, 빌딩 블록으로서 충전체 (가령, 아가로즈 막대)의 이용에 기초된 뼈대-없는 접근법이 고안되었다. 아가로즈 막대 및 실질적으로 구상의 실질적으로 균일한 다세포체가 층별로 침적될 때, 관 직경, 벽 두께, 그리고 가지화 패턴의 정확한 제어가 가능하였다 (도 10).

[0152] 이러한 접근법을 이용하여, 도 8에 도시된 패턴에 따라, 일직선 관이 초기에 손으로 구축되었다. 가장 작은 관은 HSF로 만들어진 실질적으로 구상 다세포체를 이용하여 조립되었고 900 μm 의 직경 및 300 μm 의 벽 두께를 가졌다 (도 16A). 조립되면, 실질적으로 구상 다세포체는 5 내지 7일 내에 서로 융합하여 최종의 관상 구조체를 산출하였다. 이러한 융합 과정을 더욱 상세하게 조사하기 위하여, 녹색 또는 적색 막 염료로 염색된 CHO 세포가 실질적으로 구상 다세포체를 산출하는데 이용되었고, 이들 다세포체는 이후, 도 8에 도시된 설계에 따라 조립되었다. 교대 순서로 녹색과 적색 회전 타원체의 융합은 도 16B에 도시되고, 거의 뒤섞임 (intermingling) 없이 명확한 융합 경계를 나타내는데, 이는 이전의 조사 결과를 확증한다.

[0153] 관 직경 및 벽 두께에서 유연성 이외에, 상기 제시된 방법은 독특한 특징으로서, 가지화된 거대맥관 구조를 구축하는 수단을 제공한다. 이러한 목적으로, 정확한 내강 연결 (luminal connection)을 담보하기 위하여, 맥관 트리 (vascular tree)의 상이한 가지가 동시에 조립되었다. 상이한 직경의 가지를 보유하는 가지화된 관상 구조 (도 16C)는 도 10에서 패턴에 따라, HSF로 만들어진 300 μm 직경의 실질적으로 구상 다세포체를 이용하여 구축되었다. 이들 가지는 직경에서 1.2 mm (실선 화살표)와 0.9 mm (점선 화살표)이었다 (도 16C). 실질적으로 구상 다세포체는 5 내지 7일 내에 서로 융합하여 융합된 가지화된 관상 구조를 형성하였다 (도 16D).

[0154] VI. 가늘고 긴 다세포체를 이용하여 단일과 이중-층 맥관을 산출하는 조직 공학

[0155] 속도, 정밀도, 그리고 재현성을 향상시켜 잠재적 임상적 적용을 위한 방법을 적합시키기 위하여, 특수하게 구축된 3차원 전달 장치 (즉, 바이오프린터)가 충전체 (가령, 아가로즈 막대) 및 가늘고 긴 다세포체의 침적을 위하여 개조되고, 앞서 기술된 바와 동일한 개념적 접근법을 유지하였다 (도 2).

[0156] 컴퓨터이용 신속 조형 바이오프린팅 (computer-aided rapid prototyping bioprinting) 기술은 앞서와 동일한 템플레이트 (template)에 따라, 충전체 (가령, 아가로즈 막대) 및 가늘고 긴 다세포체 (가령, 다중세포 주면체)의 제어된 동시 침적을 가능하게 하였다 (도 2). 침적은 2개의 수직 이동 프린트 헤드가 장착된 바이오프린터를 이용하여 수행되었는데, 이들 중에서 하나는 아가로즈 막대의 제조와 사출 성형을 위한 것이고, 다른 하나는 다중세포 주면체의 침적을 위한 것이었다. 아가로즈 막대의 적하, 겔화와 사출 성형은 완전 자동화 사이클로 이루어졌다. 프린트 헤드에 부착된 모세관 피펫-카트리지는 먼저, 적하를 위하여 따뜻한 액체 아가로즈로 이전되었다. 그 다음, 아가로즈의 신속한 겔화를 가능하게 하기 위하여, 적하된 카트리지가 PBS의 차가운 바이알에 담겨졌다. 최종적으로, 생성된 아가로즈 막대는 페트리 접시 내로 사출 성형되었다. 이러한 침적 설계가 다중세포 주면체의 전달을 요구할 때, 이런 주면체는 아가로즈 주형으로부터 모세관 피펫 내로 끌어당겨졌다. 이후, 모세관 피펫은 두 번째 프린트 헤드 내로 적하되고, 다중세포 주면체는 아가로즈 막대와 유사하게 사출 성형되었다. HUSMC의 간단한 일직선 관은 도 2에 도시된 도안에 따라 프린팅되었다. 2개의 프린트 헤드의 컴퓨터이용 동작 (motion)과 조정 (coordination)은 미리 프로그램된 패턴의 재현성을 담보하였다. 조립 이후에, HUSMC로 만들어진 다세포체는 2 내지 4일 내에 최종 관상 구조로 융합하고, 그리고 지지하는 아가로즈 막대는 제거되었다. 2가지 상이한 직경 (각각, 1200 마이크로미터와 900 마이크로미터의 외부 직경)의 융합된 관이 도 13에 도시된다.

[0157] 그 다음, 중막 (media)과 외막 (adventitia)을 보유하는 거대 맥관 구조 (vasculature) 내에 맥관과 유사한 이중-층 맥관이 구축되었다. 이를 위하여, HUSMC와 HSF 주면체 둘 모두 도 17에 도시된 패턴에 따라 빌딩 블록으로서 이용되었다. 이러한 방법의 다재다능성을 입증하기 위하여, 생체내 등가물이 없는 패턴인, HUSMC와 HSF로 구성되는 다중세포 주면체를 교대로 침적함으로써 관이 가공되었다 (도 17E). HUSMC의 헤마톡실린-에오신 (H&E) (도 17B, 17F) 및 평활근 액틴 (도 17C, 17G) 염색은 3일간의 융합후 가공된 구조체 내에서 SMC와 섬유아세포

층 또는 영역 사이에 명확한 경계를 지시하였다. 카스파제 3 염색은 관상 구조의 벽 내에서 몇몇 아포토시스(apoptosis) 세포를 나타냈다(도 17D, 17H). 도 17A-D에 도시된 더욱 복잡한 이중-층 구조는 더욱 많은 융합 시간을 요구하였다.

[0158] 이들 단일-층과 이중-층 관은 외부 직경의 범위가 대략 0.9 mm 내지 대략 2.5 mm이었다.

[0159] 본 발명의 조직 공학 방법에서, 가공된 구조체는 세포 단독으로부터 구축되고 최대 가능 세포 밀도가 달성된다. 이는 중요한데, 그 이유는 고유 맥관이 상대적으로 세포-밀집된 중막 층을 제공하고 인접하는 SMC가 접하기 때문이다. 본 발명의 방법은 빌딩 블록으로서 다중세포 3차원 회전 타원체 또는 주면체를 이용한다. 세포-세포 상호작용을 통한 조직 응집은 사전에, 액체 시스템과 유사하게 정량되었고, 그리고 SMC가 지금까지 관찰된 가장 높은 자가-접착성 세포 유형 중에서 한 가지임을 확인시켰다. 다중세포 조립체와 액체 사이에 유사성은 본 발명에서 이용된 발달 형태발생 과정(developmental morphogenetic process) 중에서 일부에 관한 더욱 많은 이해를 제공하였다. 본 연구에서 기술된 다중세포 회전 타원체와 주면체의 라운딩(rounding) 또는 융합은 시(hour)의 시간 척도(time scale)에서 운동성과 접착성 세포로 구성된 조직이 조직 공학을 위하여 이전에 이용되었던 개념인 고점성의 압축불가능 액체를 모방한다는 물리적 이해와 일치한다.

[0160] 실시예 3: 다세포체 및 3차원 융합된 관상 구조의 제조에서 젤라틴 및/또는 피브린의 이용

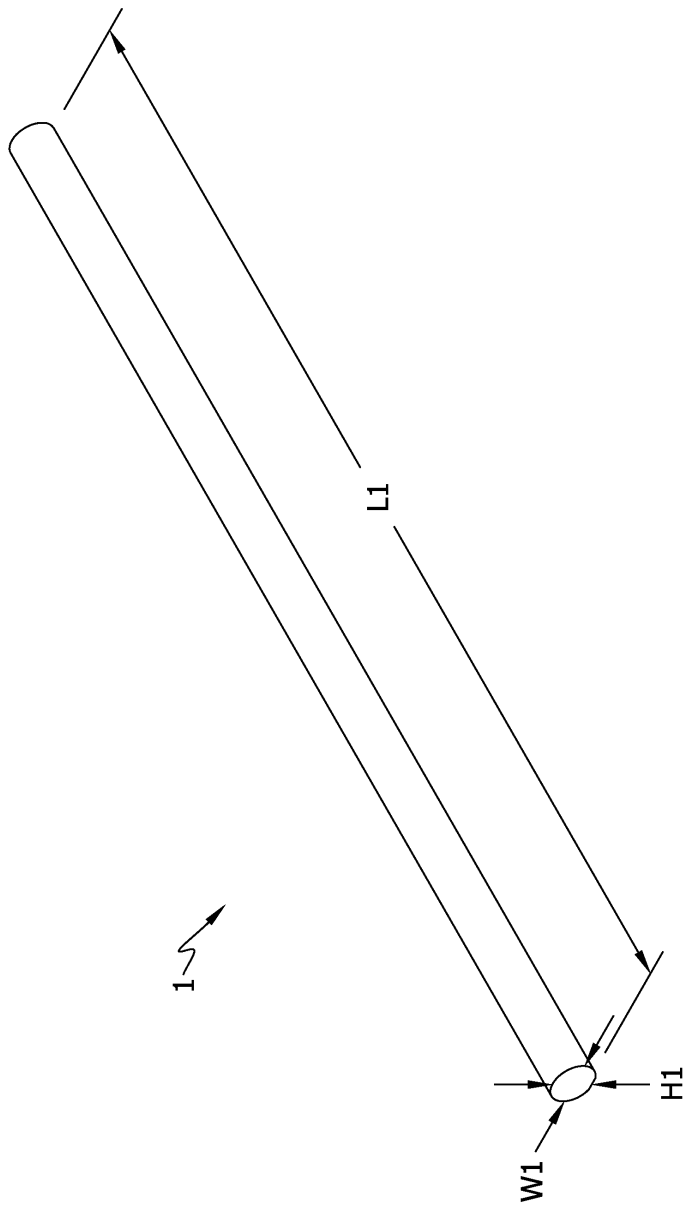
[0161] 인간 대동맥 평활근 세포(HASMC)는 Cascade Biologies(C-007-5C)로부터 구입되었다. HASMC는 평활근 성장 보충물(SMGs)로 보충된 배지 231에서 성장되었다. 이들 HASMC는 코팅되지 않은 세포 배양 접시에서 성장되고 5% CO₂를 포함하는 가습된 공기에서 37°C에 유지되었다. 이들 HASMC는 트립신 처리되고, 조직 배양 배지에서 재현탁되고, 그리고 실시예 1과 2에서 앞서 기술된 바와 같이 원심분리되었다. 원심분리후, 조직 배양 배지(즉, 상층액)는 제거되고, 그리고 세포(1 합류성 페트리 접시)는 먼저 100 μ l의 피브리노겐 용액(0.9% NaCl에서 50 mg/ml)에서 재현탁되고, 이후 70 μ l의 젤라틴 용액(인산염 완충된 염수(PBS)에서 20%)이 첨가되었다. 세포 현탁액은 다시 한 번 원심분리되고, 상층액은 제거되고, 그리고 세포 펠릿을 포함하는 원심분리 튜브는 세포 페이스트가 모세관 내로 흡인될 때까지, 37°C 수조(젤라틴이 액체로 존속하는 온도)에 배치되었다. 세포 페이스트는 이후, 모세관 내로 흡인되고 PBS의 얼음같이 차가운 용액에 15분 동안 배치되었다. 이러한 단계 동안, 젤라틴은 겔화되고, 다세포체가 두 번째 형상화 단계 또는 두 번째 배양 단계에 대한 요구 없이 즉시 프린트될 수 있을 만큼 충분한 점착성을 이들 다세포체에 제공한다. 다세포체는 충전체와 함께, 실시예 1에서 앞서 기술된 바와 같이 수용 표면으로 침적되어 원하는 3차원 생물학적 구조(가령, 관상 구조)를 형성하였다. 피브리노겐을 피브린으로 전환시키기 위하여 각 층이 침적된 이후에 트롬빈 용액(50 U/ml)이 첨가되었다. 3차원 구조는 이후, 실시예 1에서 앞서 기술된 바와 같이 다세포체의 성숙 분열 및 서로 간에 융합을 위하여 배양기에 배치되었다.

[0162] 도 18에서는 침적후 12일 시점에, 이러한 방법을 이용하여 산출된 일부 관상 구조를 도시한다. 도 18A에서는 아가로즈 충전체의 제거에 앞서, 이러한 방법을 이용하여 산출된 관상 구조를 도시하고, 그리고 도 18B-G에서는 아가로즈 제거 이후에 이런 구조를 도시한다. 도 18C와 18D에서는 다세포체 사이에 융합의 정도를 보여주기 위하여 세로로 절단 개방된, 이러한 방법을 이용하여 산출된 관상 구조를 도시한다. 도 18E-18G는 이러한 방법을 이용하여 만들어진 관상 구조의 횡단면도를 도시한다.

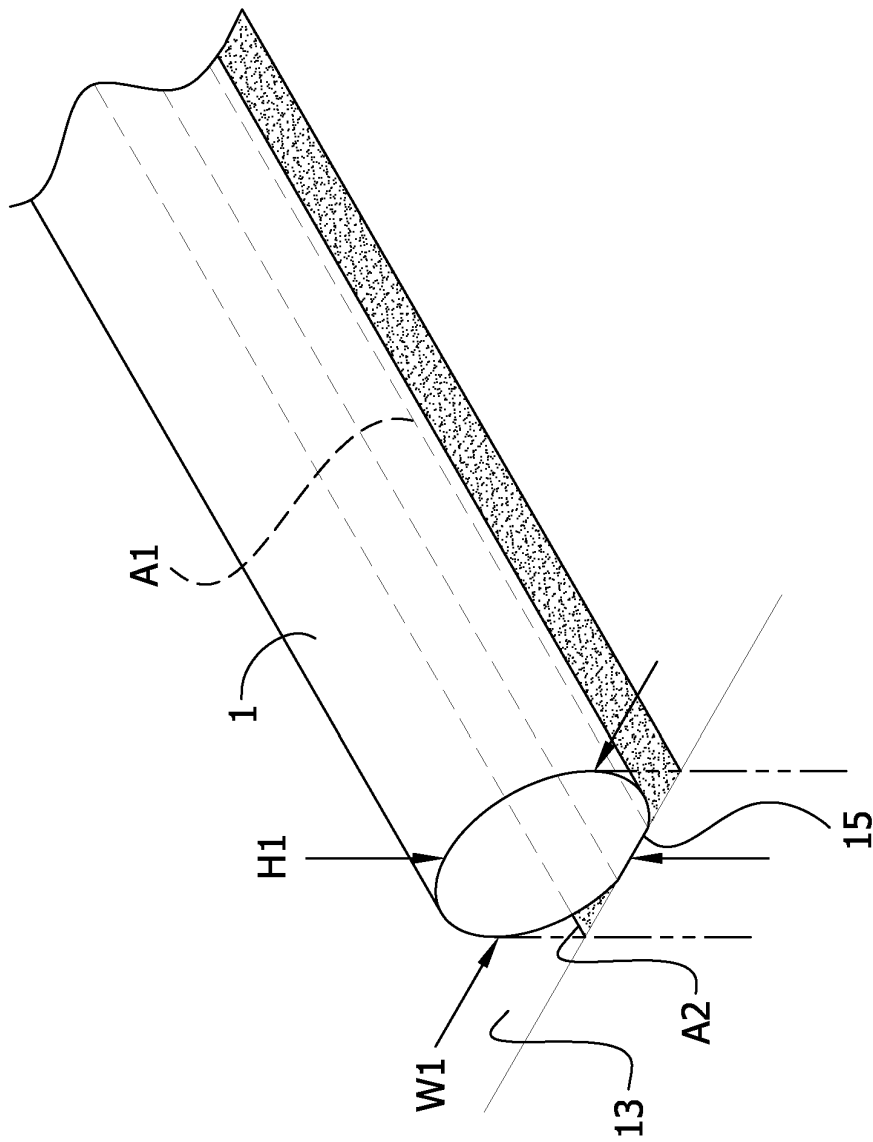
[0163] 본 발명이 특정한 구체예와 관련하여 기술되긴 했지만, 본 발명의 방법은 추가적인 변형이 가능한 것으로 이해될 것이다. 본 특허 출원은 일반적으로, 본 발명의 원리에 따른, 그리고 본 발명이 속하는 분야에서 공지되거나 통상적인 관례에 해당하고 앞서 열거된 본 발명의 본질적인 특징에 적용될 수 있으며 첨부된 특허청구범위에 의해 규정되는, 본 발명의 개시로부터 개변을 비롯한 본 발명의 임의의 변화, 이용, 또는 개작을 포괄하는 것으로 의도된다.

도면

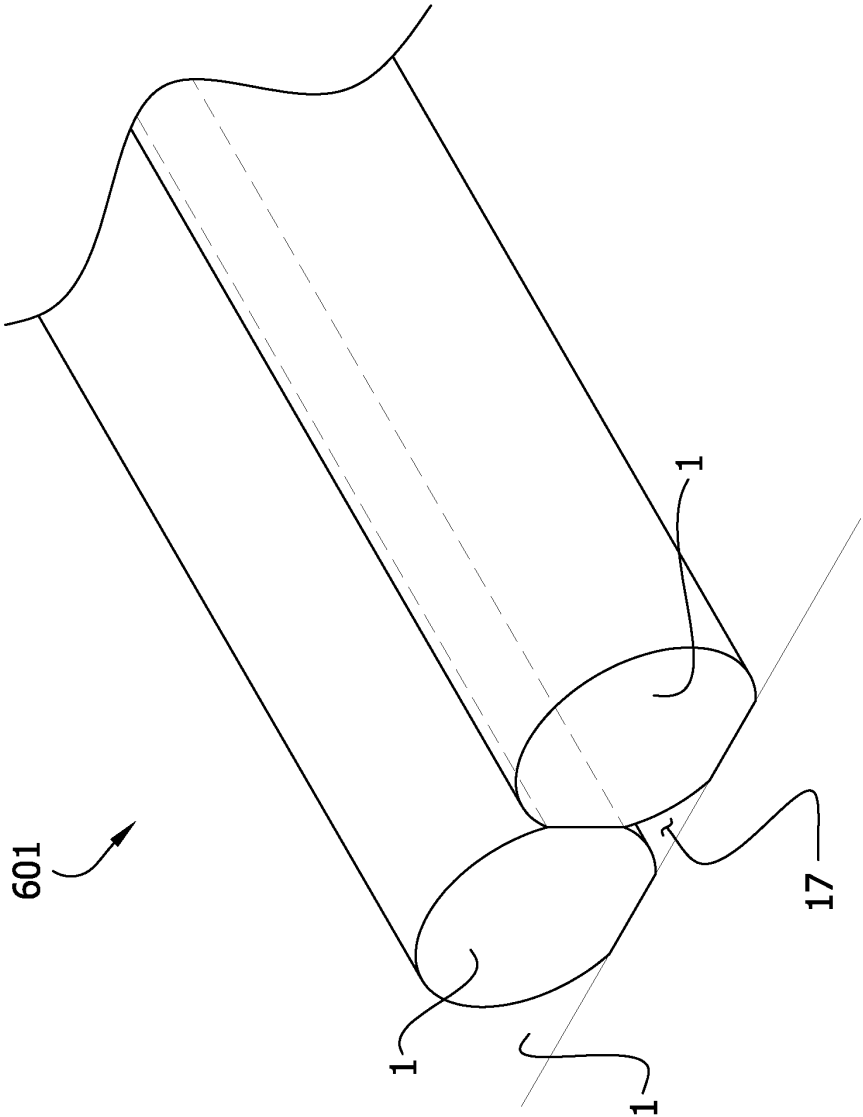
도면1a



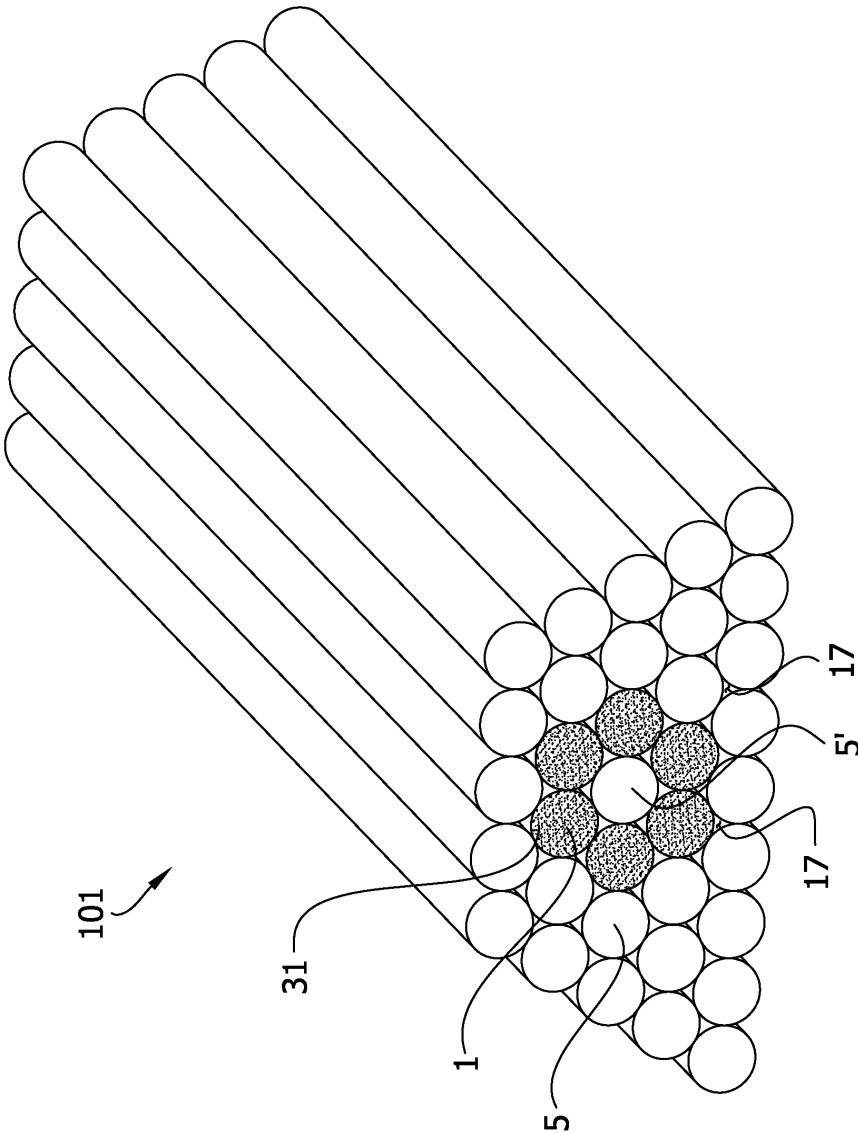
도면1b



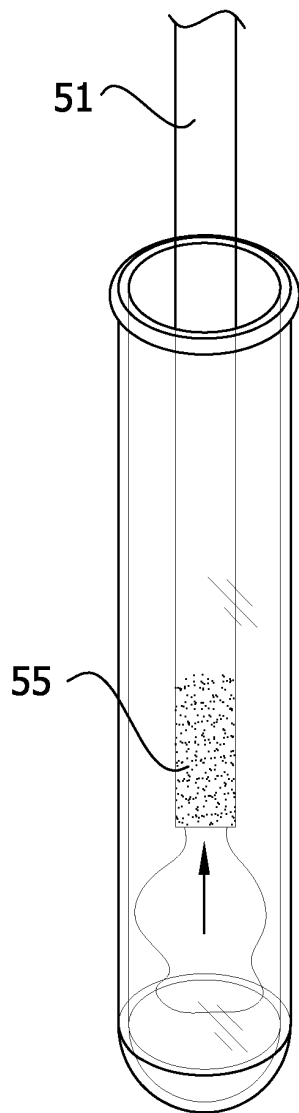
도면1c



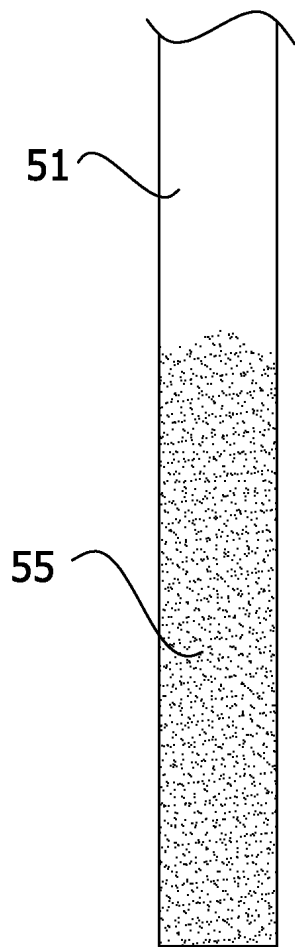
도면2



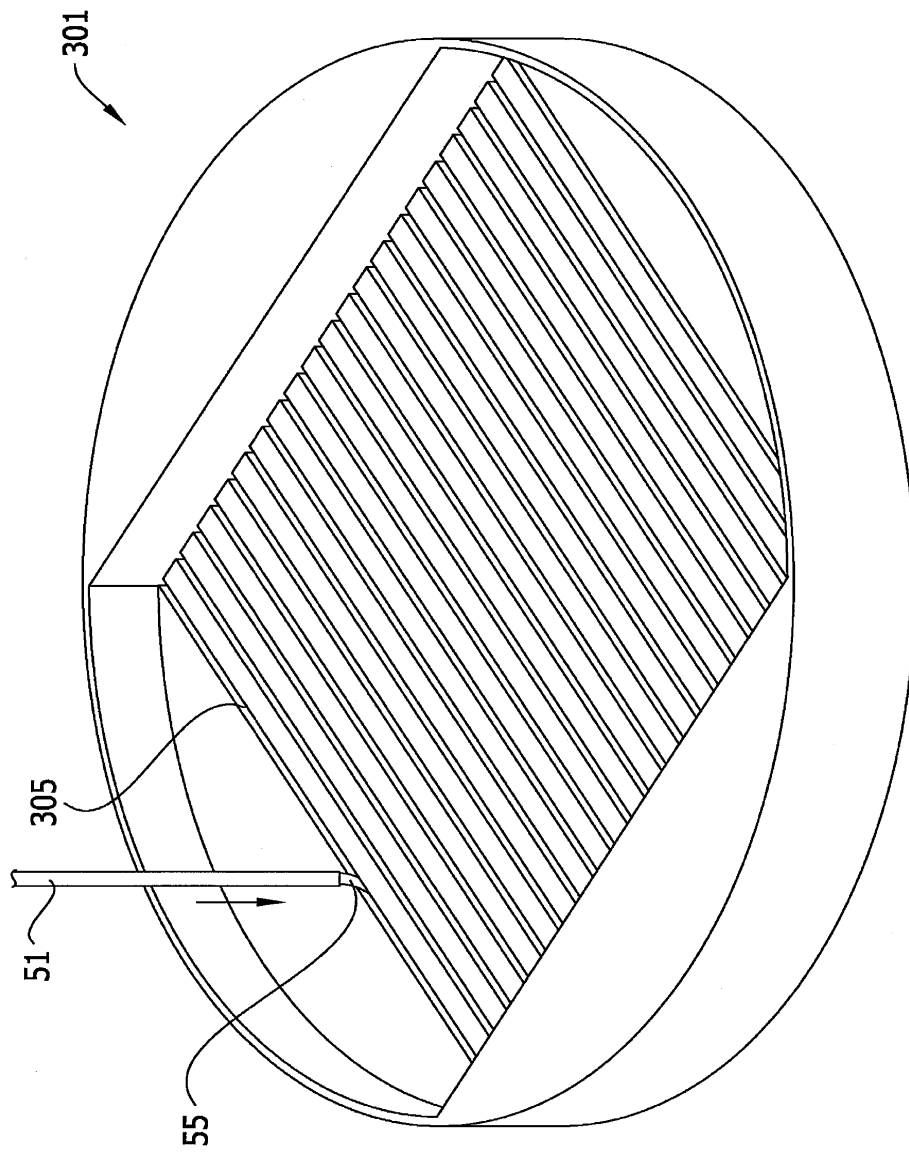
도면3a



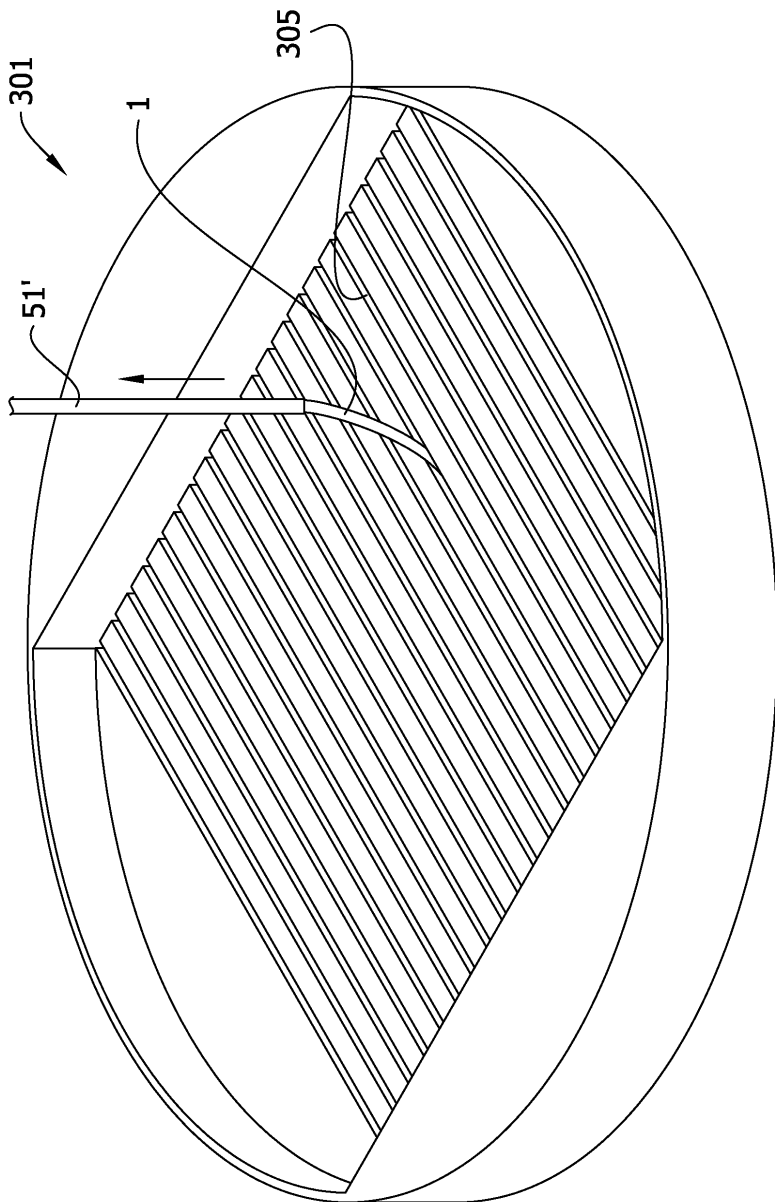
도면3b



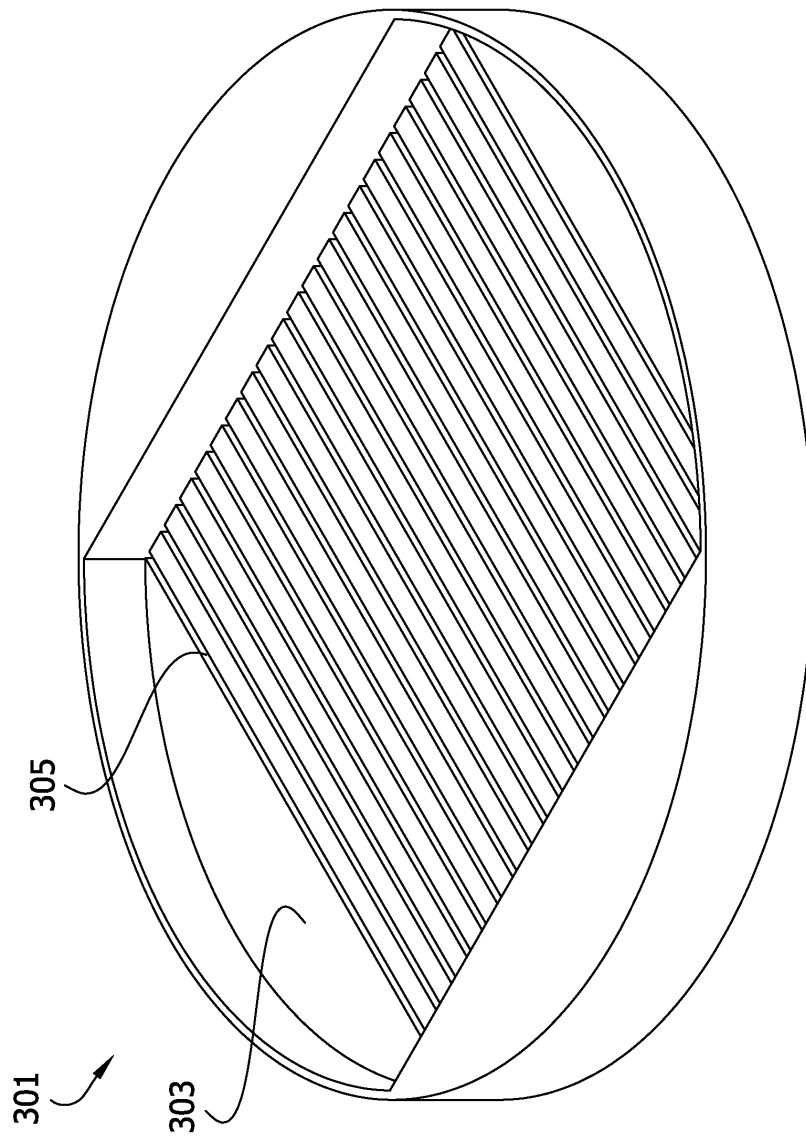
도면3c



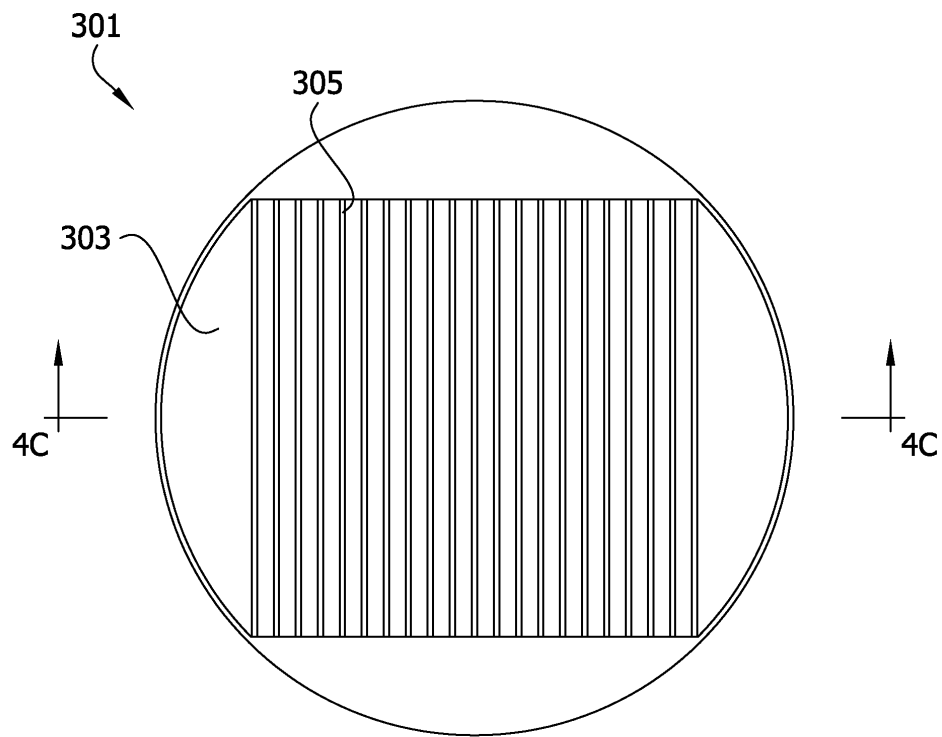
도면3d



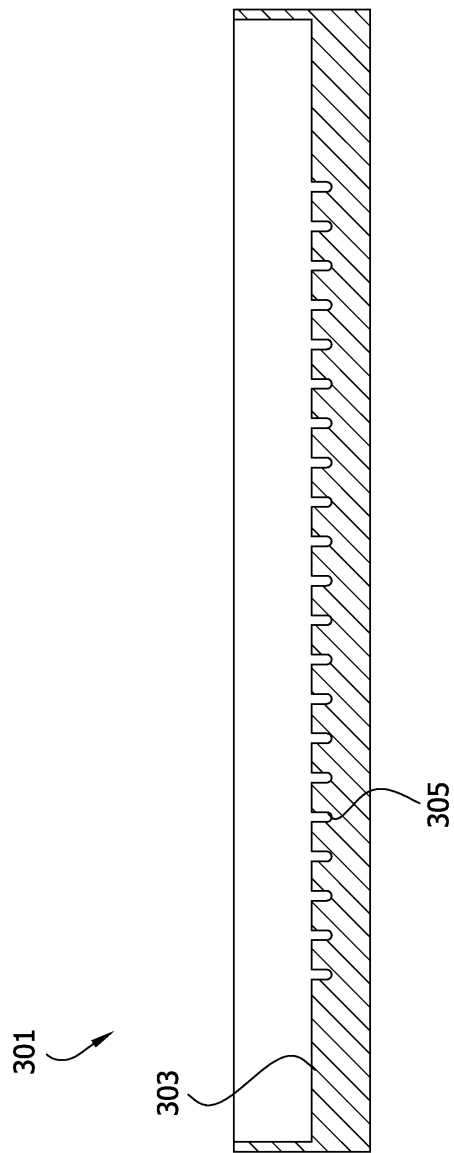
도면4a



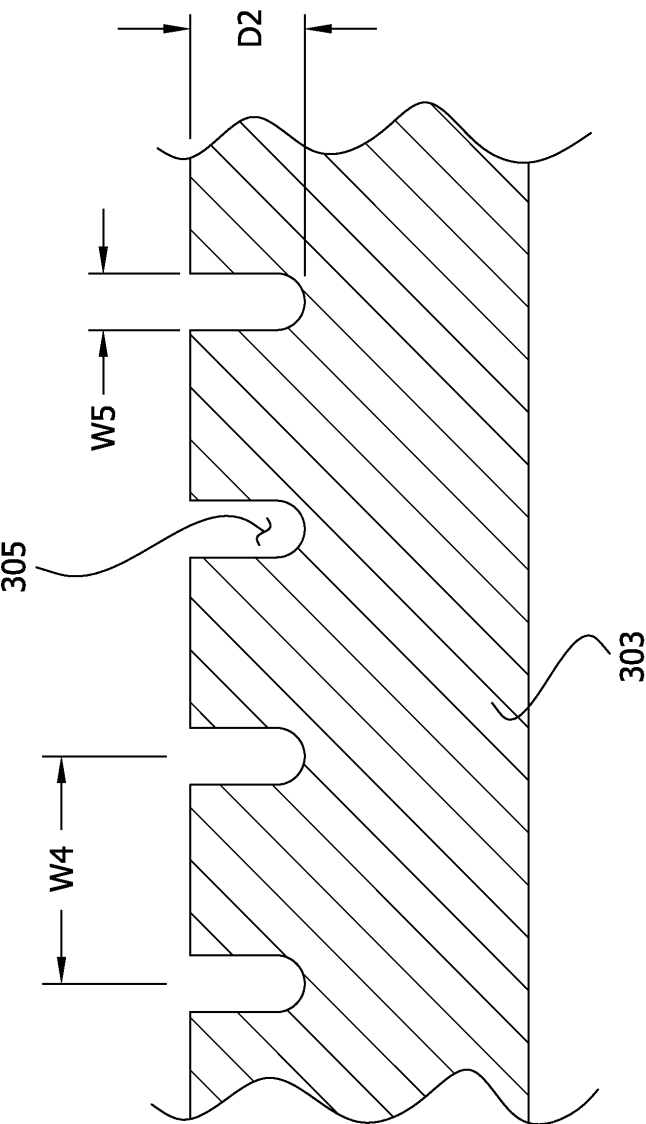
도면4b



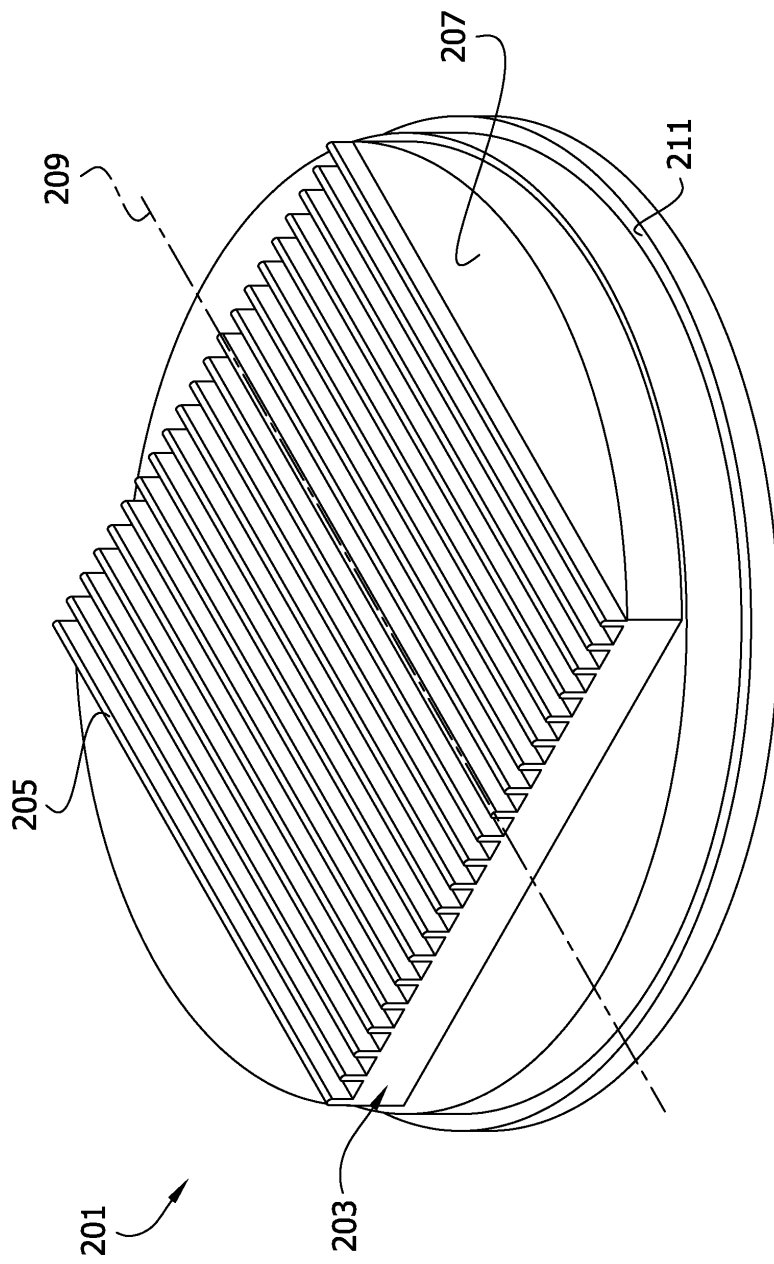
도면4c



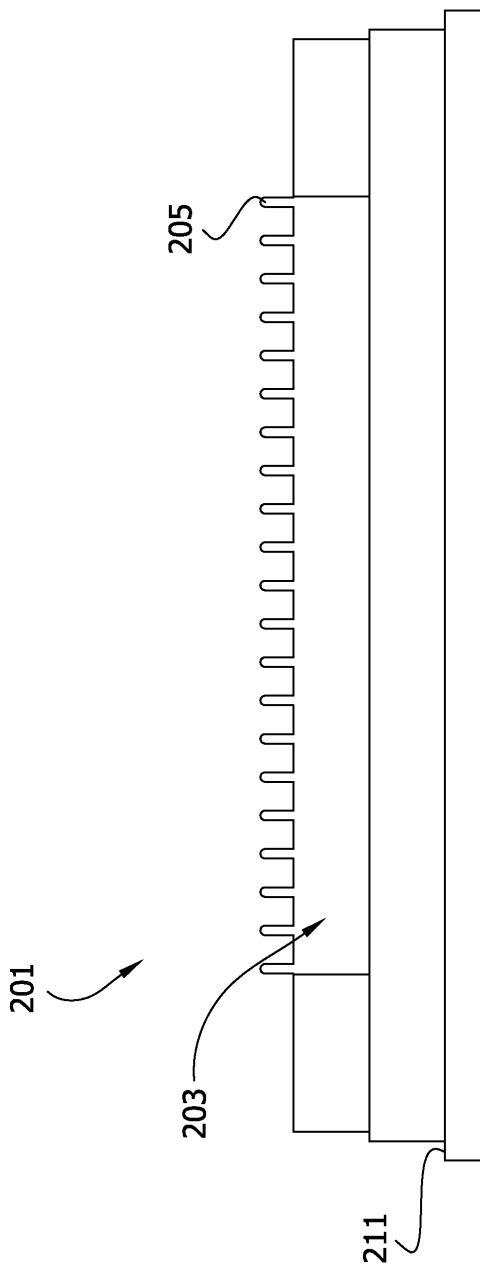
도면4d



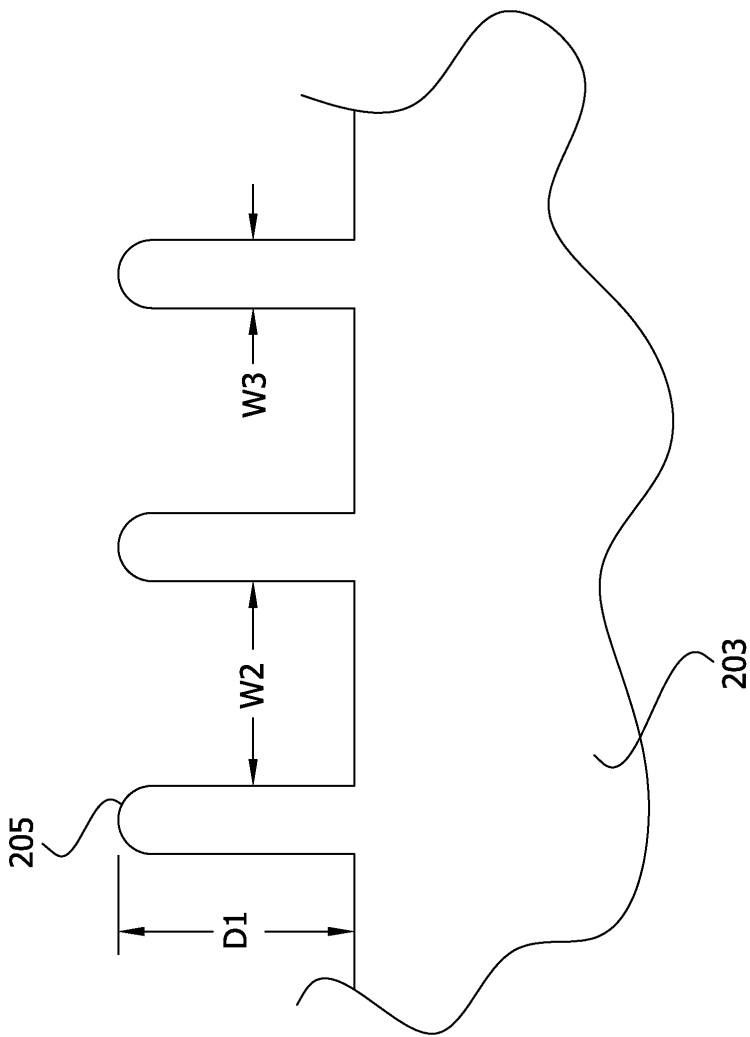
도면5a



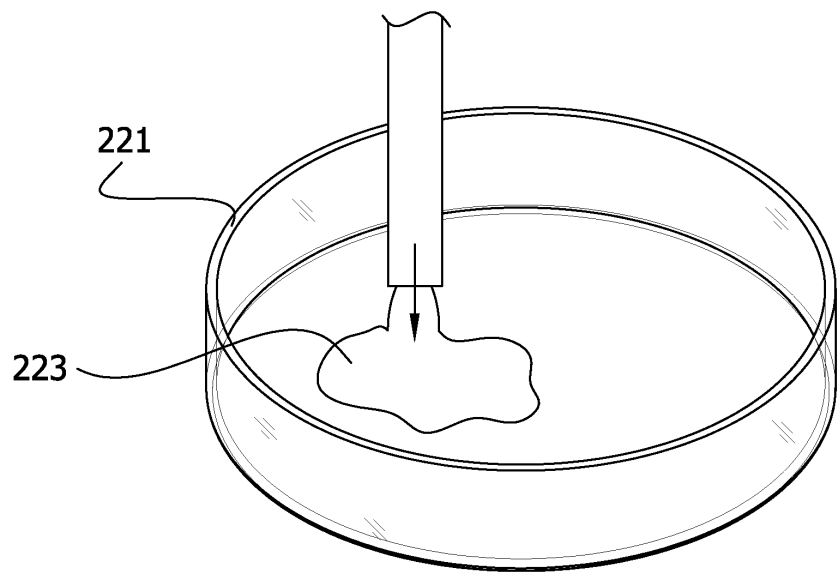
도면5b



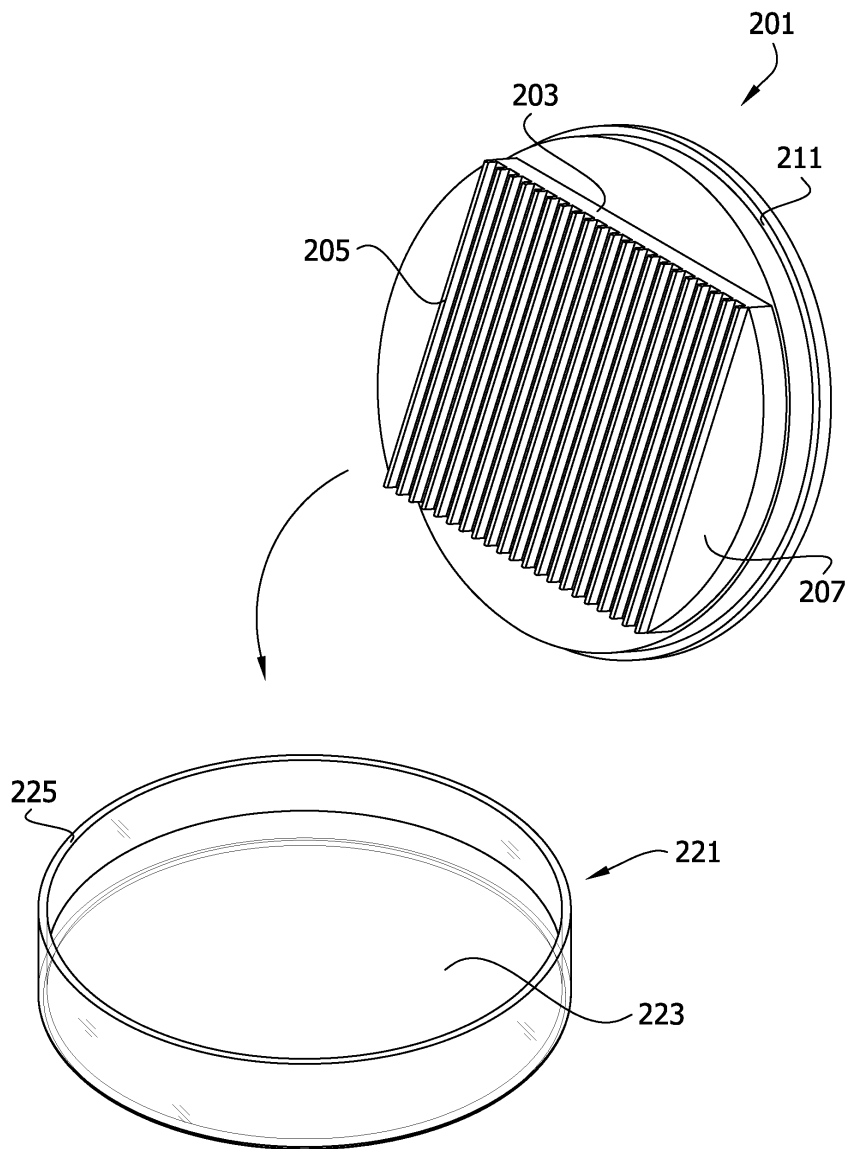
도면5c



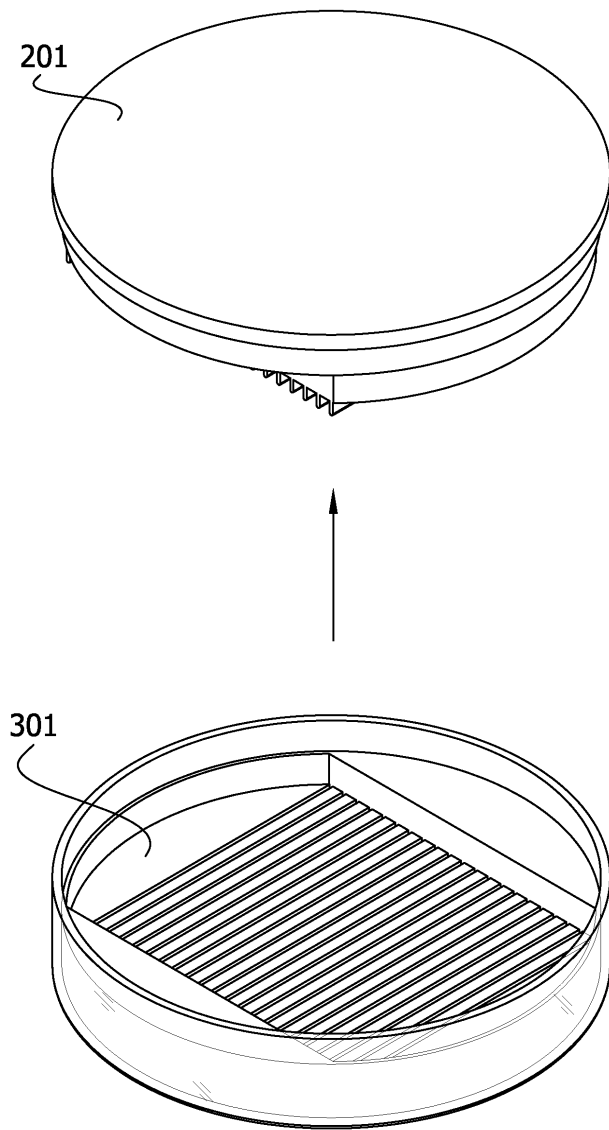
도면6a



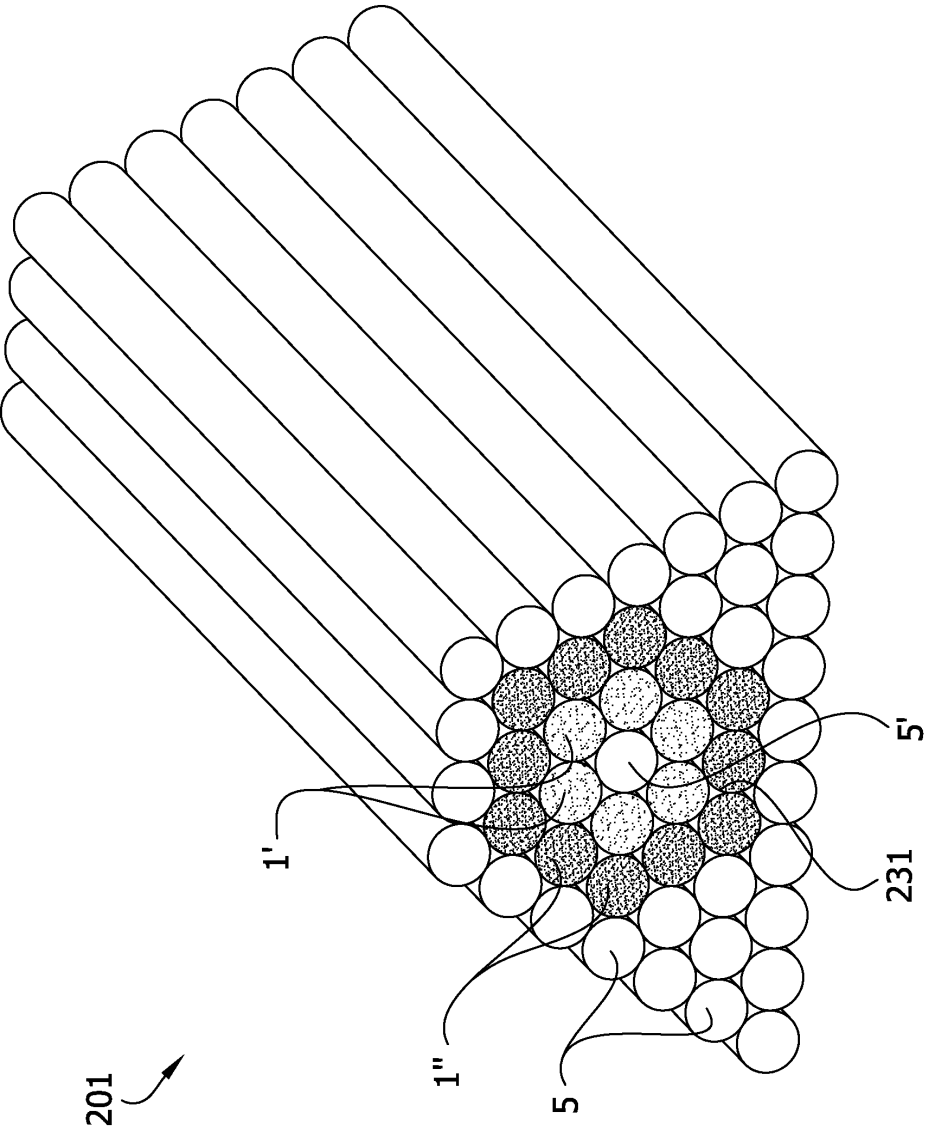
도면6b



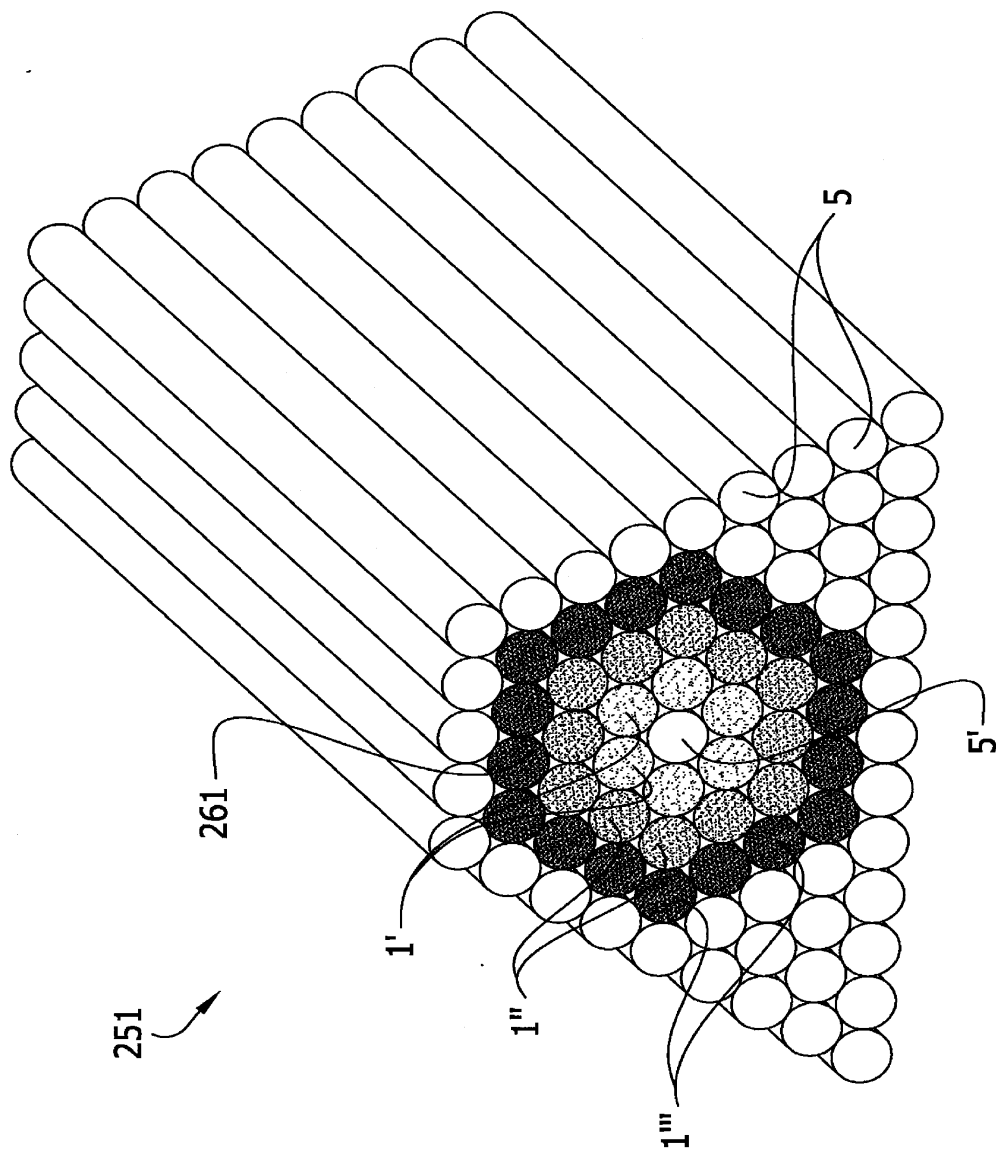
도면6c



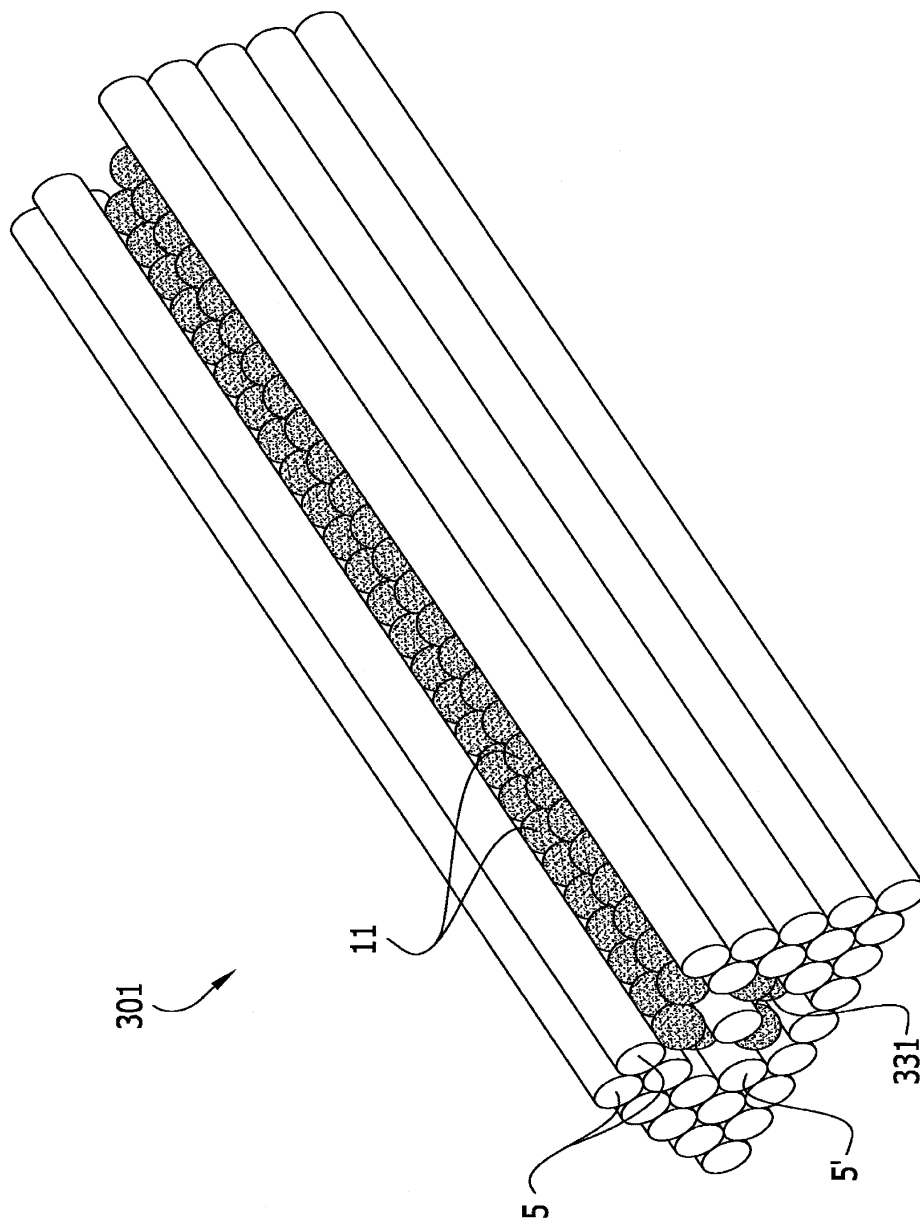
도면7



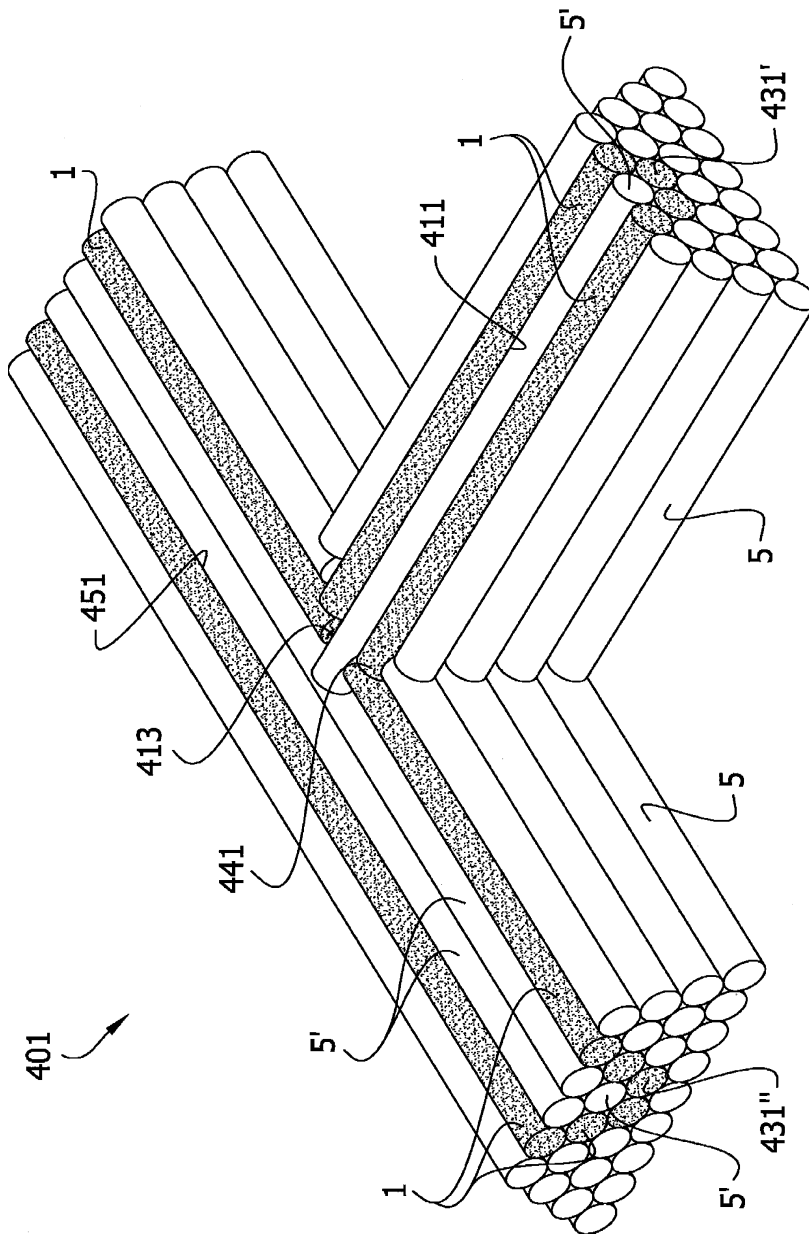
도면7a



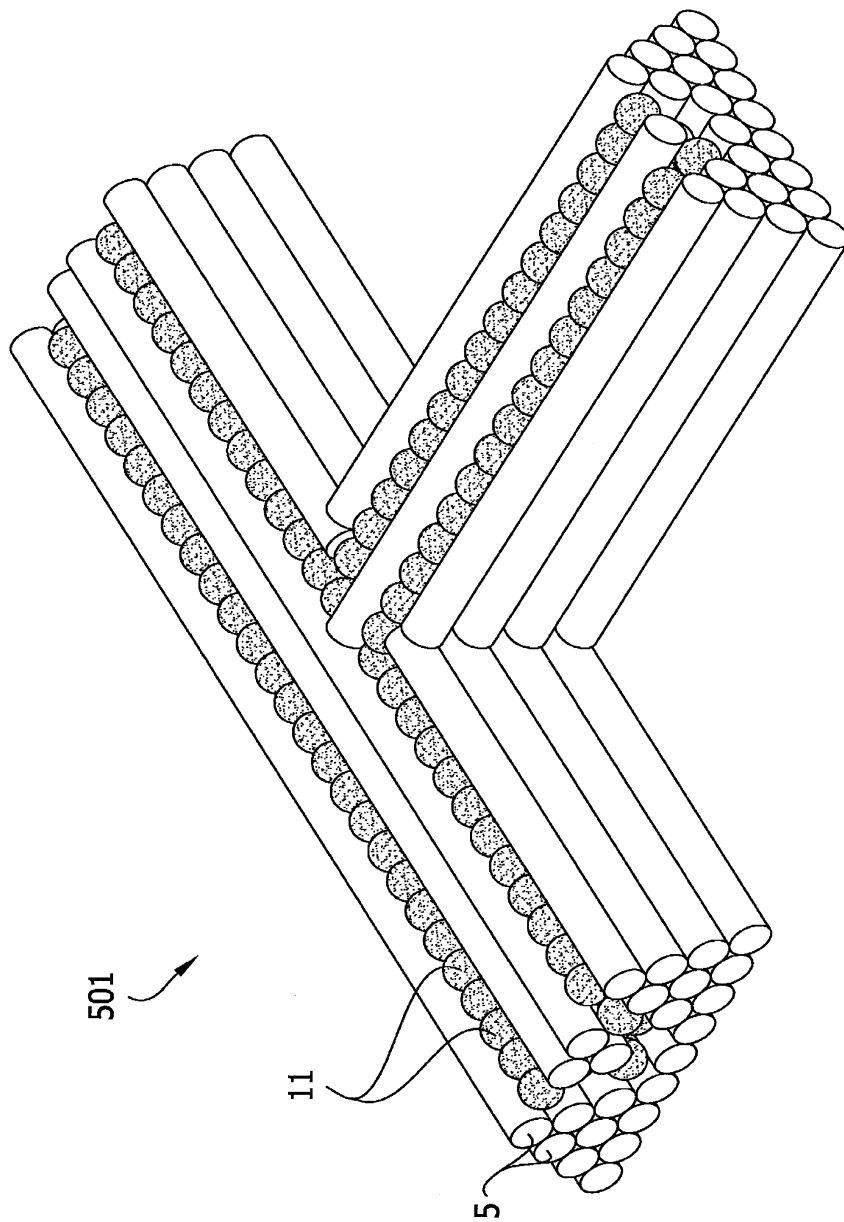
도면8



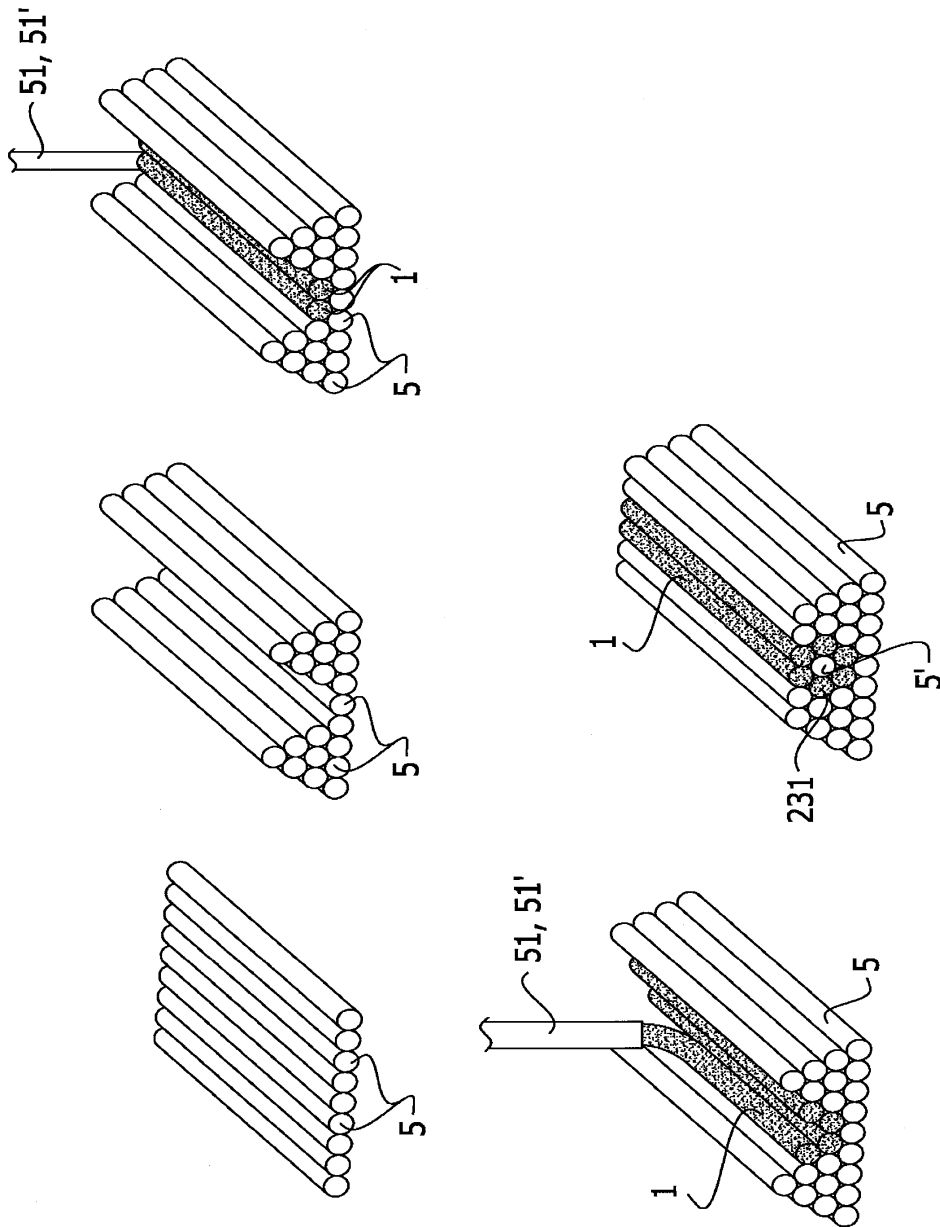
도면9



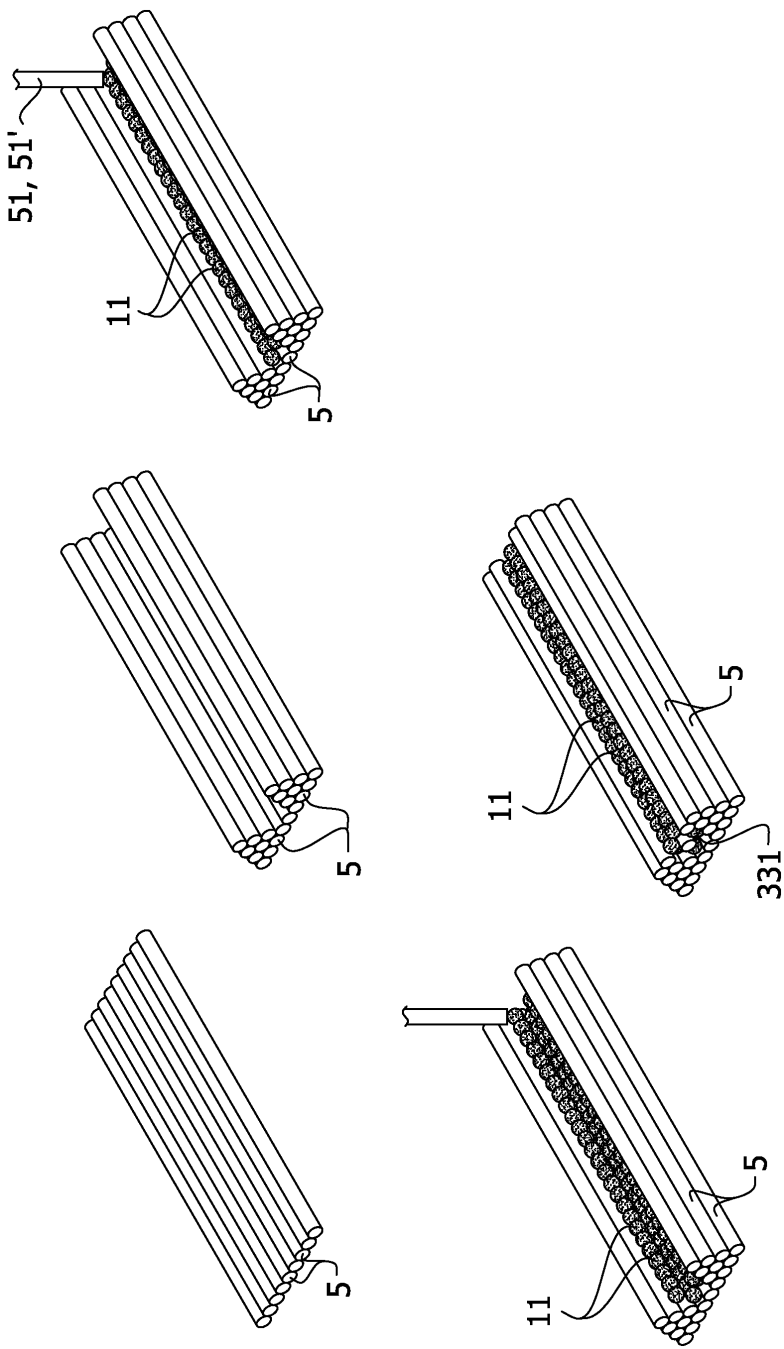
도면10



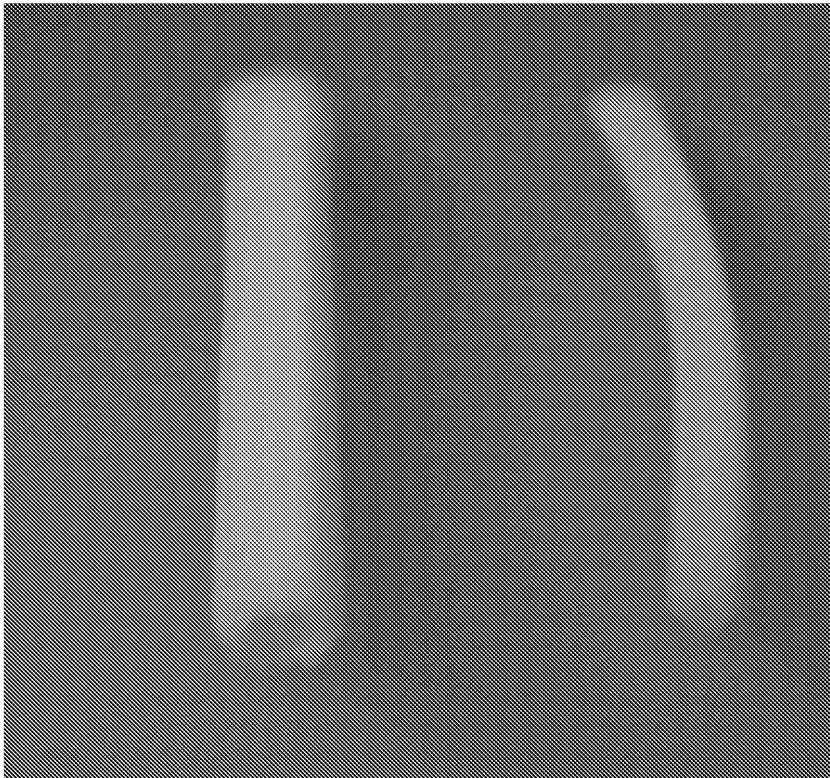
도면11



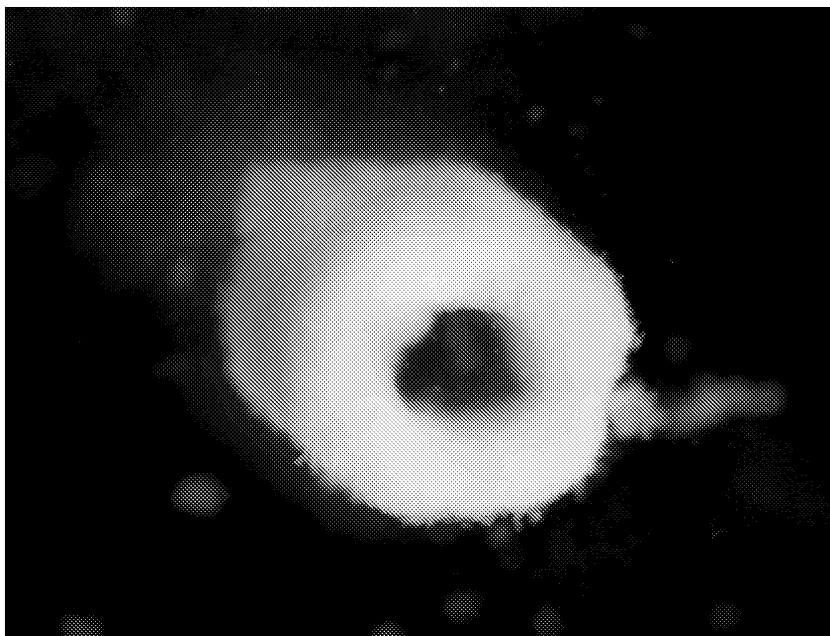
도면12



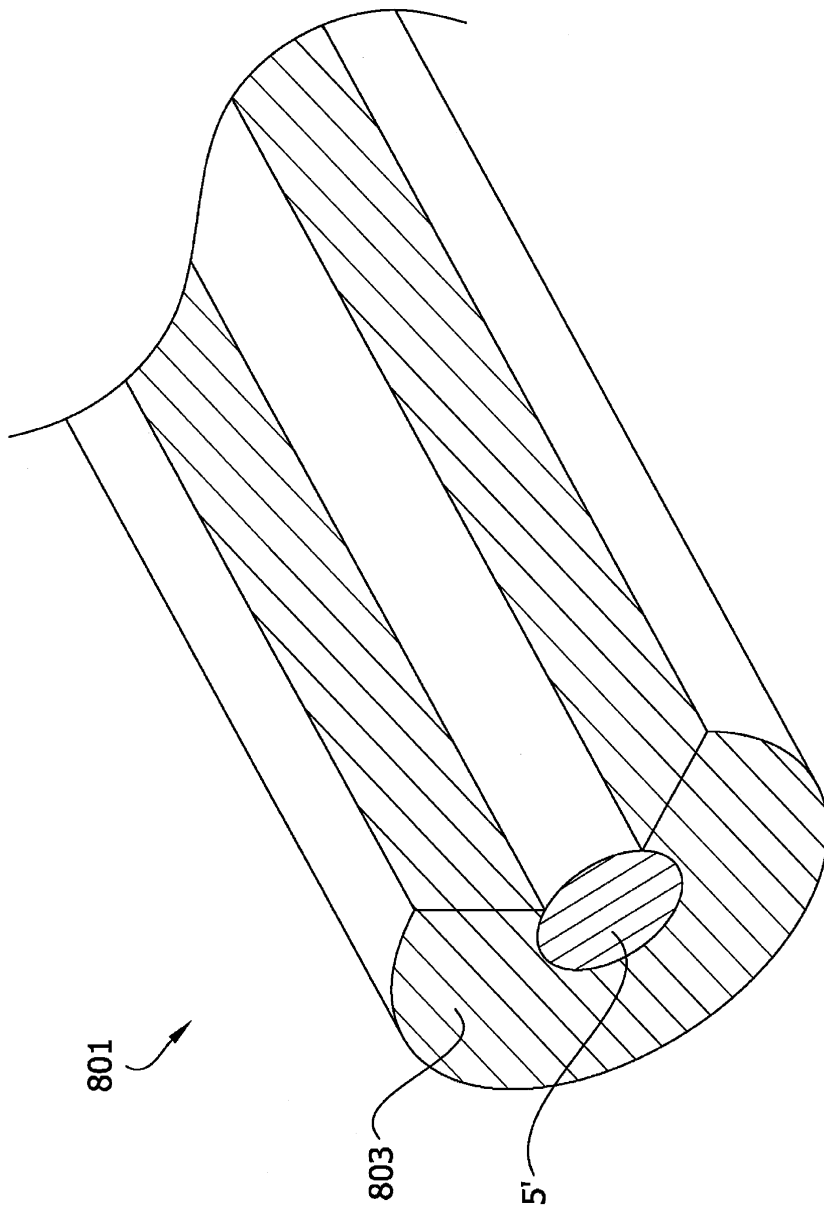
도면13



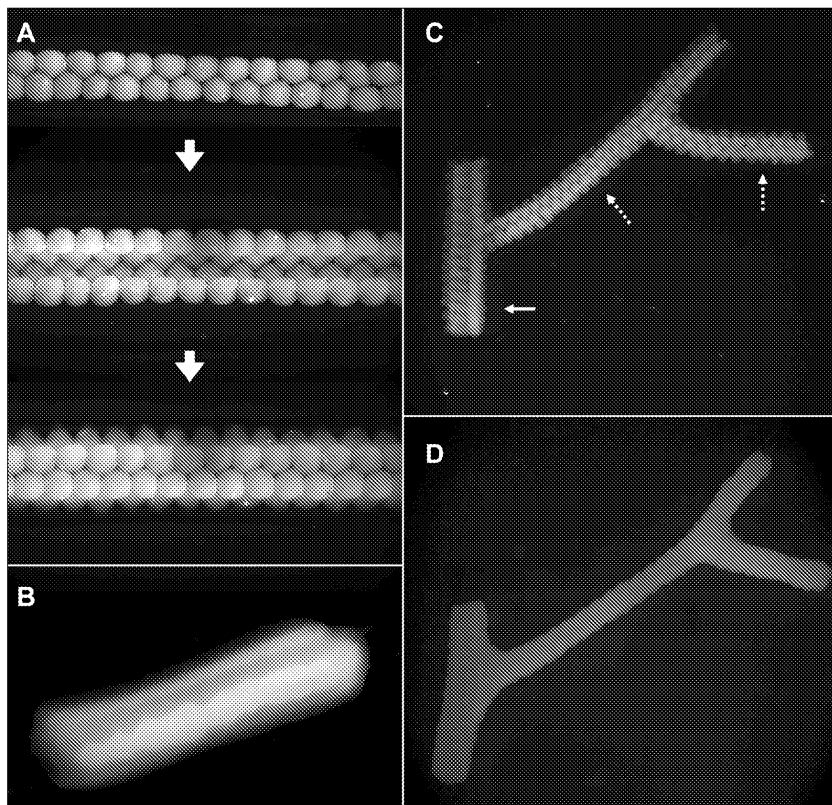
도면14



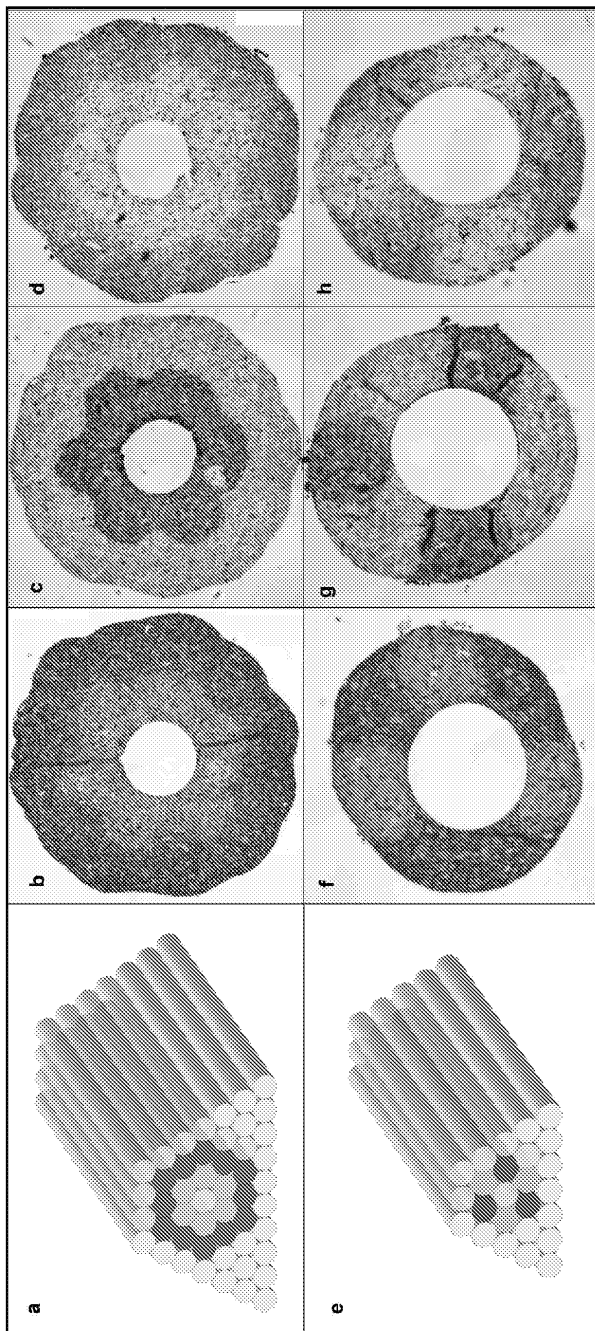
도면15



도면16



도면17



도면18

