(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 11 월 2 일 (02.11.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/211147 A1

(51) 국제특허분류:
A61L 27/36 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
A61L 27/38 (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01) *B33Y 10/00* (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/005678

(22) 국제출원일: 2023 년 4 월 26 일 (26.04.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0052962 2022 년 4 월 28 일 (28.04.2022) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (**AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 박도영 (**PARK, Doyoung**); 16516 경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 45, Gyeonggi-do (KR). 윤희웅 (**YUN, Heewoong**); 16628 경기도 수원시 권선구 호매실로165번길 70, 1517동 603호, Gyeonggi-do (KR). 노수진 (**NOH, Sujin**); 16525 경기도 수원시 영통구 매봉로35번길 38-4, 202호, Gyeonggi-do (KR).

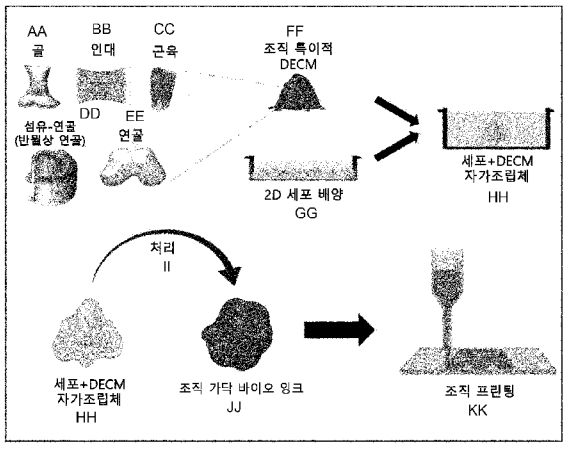
(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울특별시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING EXTRACELLULAR MATRIX-INDUCED SELF-ASSEMBLY-BASED 3D PRINTED ARTIFICIAL TISSUE, AND ARTIFICIAL TISSUE PREPARED THEREBY

(54) **발명의 명칭:** 세포외기질로 유도된 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 제조된 인공 조직체



AA ... Bone
BB ... Ligament
CC ... Muscle
DD ... Fibrocartilage (meniscus)
EE ... Cartilage
FF ... Tissue-specific DECM
GG ... 2D cell culture
HH ... Cell + DECM self-assembly
II ... Treatment
JJ ... Tissue strand bioink
KK ... Tissue printing

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for preparing an extracellular matrix-induced self-assembly-based 3D printed artificial tissue, and artificial tissue prepared thereby, and provides: a method in which a self-assembly, formed by inducing stem cell differentiation using extracellular matrix-derived biomaterials, is applied to 3D printing so that artificial tissue can be fine-patterned with widths in units of micrometers and morphological appearance of origin tissue can be implemented; and artificial tissue printed in a mature tissue form, which is not that of a cell-biomaterial mixture from the time of printing. The artificial tissue prepared by the preparation method of the present invention mimics the biological characteristics of a target organ according to the origin of the extracellular matrix, and thus enables artificial tissue and artificial organs very similar to actual original tissue to be provided.

(57) **요약서:** 본 발명은 세포외기질로 유도된 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 제조된 인공 조직체에 관한 것으로, 세포외기질 유래 생체재료를 사용하여 줄기세포의 분화를 유도함으로써 형성된 자가조립체를 3D 프린팅에 접목하여, 마이크로미터 단위의 너비로 미세 패터닝이 가능하며 기원 조직의 형태학적 외형을 구현할 수 있는 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 프린팅 시점에서부터 세포-생체소재의 혼합물이 아닌 성숙된 조직의 형태로 프린팅 되는 인공 조직체를 제공한다. 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 인공 조직체는 세포외기질의 기원에 따라 목적하는 장기의 생물학적 특성을 모사하여 실제 유래 조직과 매우 흡사한 인공 조직체 및 인공 장기를 제공하는 것이 가능하다.

WO 2023/211147 A1

[다음 쪽 계속]

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 세포외기질로 유도된 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 제조된 인공 조직체

기술분야

[1] 본 발명은 세포외기질로 유도된 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 제조된 인공 조직체에 관한 것으로, 세포외기질 유래 생체재료를 사용하여 줄기세포의 분화를 유도함으로써 형성된 자가조립체를 3D 프린팅에 접목하여, 마이크로미터 단위의 너비로 미세 패터닝이 가능하며 기원 조직의 형태학적 외형을 구현할 수 있는 인공 조직체의 제조방법 및 이로부터 프린팅 시점에서부터 세포-생체소재의 혼합물이 아닌 성숙된 조직의 형태로 프린팅 되는 인공 조직체를 제공한다. 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 인공 조직체는 세포외기질의 기원에 따라 목적하는 장기의 생물학적 특성을 모사하여 실제 유래 조직과 매우 흡사한 인공 조직체 및 인공 장기를 제공하는 것이 가능하다.

배경기술

[2] 최근 조직공학 분야에서 동종 또는 이종의 장기 및 조직을 채취한 후, 세포를 제거 (Decellularization) 하여 여러 가지 형태의 조직공학적 제제로 사용하는 기술이 주목을 받고 있다. 현재까지 소장 점막하조직, 방광, 피부, 양막, 골, 인대, 연골 등 다양한 조직유래 생체소재가 상품화되었거나 연구가 진행되고 있다. 현재까지 보고된 조직 유래 생체재료를 이용한 조직공학적 인공장기의 제작 방법으로는 염침출 (salt leaching), 전기방사, 3D 프린팅 등이 있다.

[3] 그 중 3D 프린팅은 다종 재료와 세포를 활용할 수 있고, 목적하는 형태를 구현할 수 있다는 점에서 많은 연구가 진행 중이다. 특히, 상기 언급한 조직 유래 생체재료를 액체화시키거나 파우더 형태로 섞어 세포와 함께 프린팅하는 것은 세포의 활성을 증가시키며, 기원한 조직의 특이적인 유전자와 단백질이 발현되는 등 조직으로의 유도 가능성을 확인하였으나, 분해 시 세포에 유해한 부산물을 생성할 수 있는 합성 재료를 사용하거나, 비균일한 세포-생체재료 복합체를 형성하는 등 조직의 유도 및 성숙도 면에서 여전히 한계가 있다.

[4] 예를 들어, 대한민국 공개특허 제10-2020-0066218호는 미세입자화된 인체 조직을 함유하는 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 구조체를 제조하는 기술을 개시하고 있으나, 세포의 기능과 분화를 조절하기 위해 별도의 세포 성장인자 및 분화인자를 필요로 하며, 3D 프린팅을 통해 제작된 구조체는 바이오 잉크 인쇄능 (printability)과 인쇄 후 기계적 물성을 충족시키기 위해 가교 단계를 수행해야 한다.

[5] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 분화인자를 사용하지 않고 세포와 세포외기질 유래 생체 재료를 활용하여 자가조립을 통해 조직 특이적 분화 및 프린팅 시

점에서 성숙된 자가조립체 조직을 프린팅하는 방법을 제공함으로써, 종래 기술에 비해 개선된 인공 조직체 제조방법을 제시하고자 하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 따라서, 본 발명은 조직으로의 분화 및 성숙 유도능이 우수한 자가조립 활용 세포-생체재료 복합체 (세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체)를 프린팅에 활용하여 기원 조직의 생화학적 특성과 유사한 인공 조직체를 제조하는 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[7] 구체적으로, 본 발명의 목적은 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 전술한 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체 및 인공 장기를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법을 제공한다:

[10] (a) 조직 유래 세포외기질 (Extracellular matrix, ECM)을 탈세포화 및 분말화하여 탈세포화 세포외기질 (Decellularized extracellular matrix, DECM) 분말을 제조하는 단계;

[11] (b) 세포를 포함하는 배양액에 상기 탈세포화된 세포외기질 분말을 첨가한 후 배양하여 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 형성하는 단계;

[12] (c) 상기 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 균질화하여 조직 가닥 잉크 (Tissue strand ink)로 제작하는 단계; 및

[13] (d) 상기 균질화된 조직 가닥 잉크를 3D 프린팅 장비에 적용하여 3D 프린팅 인공 조직체를 제조하는 단계.

[14] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 조직은 골, 인대, 근육, 섬유-연골 또는 연골일 수 있다.

[15] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 세포는 줄기세포일 수 있다.

[16] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[17] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 탈세포화된 세포외기질 분말은 0.05 내지 3 mg/ml의 농도로 첨가할 수 있다.

[18] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체는 생체 외 (*in vitro*) 에서 형성될 수 있다.

[19] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 세포증식 또는 세포분화 유도에 의해 세포-탈세포화 세포외기질 분말 자가조립체를 형성할 수 있다.

[20] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액을 추가로 첨가하는 것을 포함할 수 있다.

[21] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액은 50 내지 500 μg/ml의 농도로 첨가될 수 있다.

[22] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계는 세포와 탈세포화된 세포외기질 분말이 융합하기 시작한 후 2일 내지 9일 동안 배양하는 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (c) 단계의 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 균질화하는 것은 상기 (b) 단계 이후 수득된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 분자체 (Molecular sieve)에 통과시키거나, 또는 노즐로 연결된 주사기 커넥터에 관통시켜 블렌딩하는 (Blending) 것일 수 있다.

[24] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 분자체의 메쉬 직경은 50 내지 800 ㎛일 수 있고, 상기 주사기 커넥터에 연결된 노즐의 직경은 1 내지 3 mm 일 수 있다.

[25] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 (d) 단계에서 제조된 조직 가닥 잉크는 3D 프린팅용 주사기에 주입하여, 200 μm 이상의 노즐 크기, 20 내지 150 Kpa 미만의 공압 (air pressure) 및 0.1 내지 3 mm/초의 프린팅 속도로 3D 프린팅을 수행하는 것일 수 있다.

[26] 본 발명은 또한, 전술한 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체 및 인공 장기를 제공한다.

[27] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 인공 조직체 및 인공 장기는 기원 조직의 생화학적 특성을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[28] 본 발명의 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법은 마이크로미터 단위의 너비로 미세 패터닝이 가능하며, 기원 조직의 형태학적 외형을 구현할 수 있을 뿐만 아니라, 세포외기질의 기원에 따라 목적하는 장기의 생물학적 특성을 모사하는 조직으로의 성숙을 가능하게 한다. 또한, 기존 방법들과 달리 프린팅 시점에서 세포 및 생체소재의 조합물이 아닌 성숙된 자가조립체인 조직 형태로 프린팅하는 것이 가능하다. 이에 따라, 본 발명의 방법으로 제조된 인공 조직체는, 예를 들어, 골, 인대, 근육, 연골 또는 반월상 연골 손상과 같은 재생의학에 필요한 의료 제품의 개발에 활용될 수 있다. 이외에도 타겟 조직의 해부학적 위치, 특성 및 물리화학적 요구에 적합한 조직 공학적 제품을 생산할 수 있는바, 광범위한 활용을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[29] 도 1a 내지 1b는 각 조직 (골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직)의 탈세포 공정 전/후의 시각적 분석 및 생화학적 분석 결과를 나타낸 것으로, 구체적으로 도 1a는 탈세포 공정 전 모조직 (Native)과 탈세포 공정 후 (Decelled)의 시각적 분석 결과이고, 도 1b는 탈세포 공정 전 모조직 (Native)과 탈세포 공정 후 (Decelled)의 생화학 물질 함량 분석 결과이다.

[30] 도 2a 내지 2d는 세포/DECM 자가조립체의 제작에 대한 결과를 나타낸 것으로, 구체적으로 도 2a는 돼지 활액막 유래 줄기세포의 고밀도 배양 사진과 DECM 처리 후 사진이고, 도 2b는 세포/DECM 자가조립체의 응축을 보여주는 사진이며, 도 2c는 세포/DECM 자가조립체의 세포외기질 농도에 따른 시각적 및 라이브/데드 어세이 (Live/dead assay) 분석 결과이고, 도 2d는 라이브/데드 어세이 기반 정량 분석 결과이다.

[31] 도 3a 내지 3b는 수용화된 연골 DECM 처치에 의한 자가조립체의 연골조직 분화능 강화에 대한 결과를 나타낸 것으로, 구체적으로, 도 3a는 수용화된 연골 DECM 처치에 의한 자가조립체의 연골 관련 유전자 증감 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 3b는 수용화된 연골 DECM 처치에 의한 자가조립체의 조직학적 분석 결과를 나타낸 사진이다.

[32] 도 4a 내지 4c는 세포/DECM 자가조립체의 균질화 공정을 통한 조직 가닥 잉크 제작에 대한 결과를 나타낸 것으로, 도 4a는 자가조립체의 배양기간에 따른 조직 가닥 잉크의 3D 프린팅 구조체 형상 및 세포 생존율을 비교한 그래프이며, 도 4b는 자가조립체의 균질화 공정에서 사용되는 분자체 (Molecular sieve)의 메쉬 직경에 따른 조직 가닥 잉크의 인쇄 적합성을 비교한 그래프이고, 도 4c는 자가조립체의 균질화 공정에서 사용되는 주사기 노즐의 직경에 따른 조직 가닥 잉크의 인쇄 적합성을 비교한 그래프이다.

[33] 도 5a 내지 5b는 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공 조직체의 특성 분석 결과를 나타낸 것으로, 구체적으로, 도 5a는 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크의 탑재 및 3D 프린팅을 활용한 인공 조직체 제작 과정을 보여주는 사진이고, 도 5b는 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크 대비 3D 프린팅을 활용한 인공 조직체의 세포 생존율을 비교한 그래프이다.

[34] 도 6a 내지 6d는 조직특이적 DECM 사용에 따른 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 생화학적 특성 분석 결과를 나타낸 것으로, 구체적으로, 도 6a는 조직특이적 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 시각적 관찰 결과이고, 도 6b는 조직특이적 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 단백질 프로파일 분석 결과이며, 도 6c는 조직특이적 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 콜라겐 분석 결과이고, 도 6d는 조직특이적 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 sGAG 분석 결과이다.

[35] 도 7a 내지 7e는 조직특이적 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 조직분화도 평가 결과를 나타낸 것으로, 순서대로 연골 (도 7a), 섬유-연골 (도 7b), 골 (도 7c), 인대 (도 7d) 및 근육 (도 7e) 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 조직분화도 평가 결과를 보여준다.

[36] 도 8은 본 발명의 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공조직체의 제조방법을 도식화한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[38] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[39] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[40] 상술한 바와 같이, 3D 프린팅은 다종 재료와 세포를 활용할 수 있고, 목적하는 형태를 구현할 수 있다는 점에서 많은 연구가 진행 중이지만, 분해 시 세포에 유해한 부산물을 생성할 수 있는 합성 재료를 사용하거나, 비균일한 세포-생체재료 복합체를 형성하는 등 조직의 유도 및 성숙도 면에서 여전히 한계가 있다. 이에, 본 발명자들은 별도의 합성 재료 또는 성장인자를 사용하지 않고 세포와 세포외기질 분포가 균질한 자가조립체를 형성하고, 이를 3D 프린팅 기술에 접목하여 최적화된 3D 프린팅 방법을 도출함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다. 본 발명의 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법은 마이크로미터 단위의 너비로 미세 패터닝이 가능하며, 기원 조직의 형태학적 외형을 구현할 수 있을 뿐만 아니라, 세포외기질의 기원에 따라 목적하는 장기의 생물학적 특성을 모사하는 조직으로의 성숙을 가능하게 한다.

[41] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법에 관한 것이다.

[42] 구체적으로, 상기 제조방법은 다음의 단계를 포함한다:

[43] (a) 조직 유래 세포외기질 (Extracellular matrix, ECM)을 탈세포화 및 분말화하여 탈세포화 세포외기질 (Decellularized extracellular matrix, DECM) 분말을 제조하는 단계;

[44] (b) 세포를 포함하는 배양액에 상기 탈세포화된 세포외기질 분말을 첨가한 후 배양하여 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 형성하는 단계;

[45] (c) 상기 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 균질화하여 조직 가닥 잉크로 제작하는 단계; 및

[46] (d) 상기 균질화된 조직 가닥 잉크를 3D 프린팅 장비에 적용하여 3D 프린팅 인공 조직체를 제조하는 단계.

[47] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 탈세포화 세포외기질 분말을 제조하는 단계로, 여기서 탈세포화는 이종 조직의 세포 성분에 대한 면역 반응을 없애기 위해 수행된다. 효과적인 탈세포화가 이루어지기 위해서는 조직의 세포 성분을 완전히 제거할 수 있어야 하고, 조직의 물리적인 성질을 유지하면서, 조직공학분야에서 조직 지지체로서 사용되는 세포외기질이 되도록 생화학적 특질을 최대한 보존하여야 하며, 처리 과정에서 사용된 여러 세정제나 화학물질들이 완전히 제거되어야 한다.

[48] 상기 (a) 단계의 탈세포화 과정은 당해 기술분야에 공지된 방법이 제한 없이 적용될 수 있다. 예를 들어, 동물 또는 사람의 조직이나 장기로부터 목적하는 조직의 일부를 수득하고, 이를 세척, 동결건조 및 동결파쇄하여 분말을 제조한 다음, 일정 시간 동안 저장성 용액에 용해시키고, 계면활성제를 포함한 용액에 처리하여 탈세포화를 진행할 수 있다. 다르게는, 조직 유래 세포외기질을 먼저 탈세포화 후 분말화할 수도 있다.

[49] 상기 조직 유래 세포외기질은 최종적으로 제조하고자 하는 인공 조직체 또는 인공 장기 유래일 수 있으며, 예를 들어, 지방, 근육, 연골, 섬유-연골, 심장, 골, 인대, 피부, 혈관, 폐, 각막, 뇌, 점막 상피 조직, 방광, 간장, 신장, 식도, 정소, 자궁, 태반, 신경, 척수, 췌장, 비장, 창자 등에서 유래될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

[50] 상기 계면활성제로는 음이온 계면활성제, 예를 들어, 소듐 도데실 설페이트 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)와 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트라이톤 X-100 (Triton X-100)을 사용할 수 있으나, 이로 한정되지 않는다. 바람직한 SDS의 농도는 0.1 내지 0.5% 이고, 바람직한 Triton X-100의 농도는 0.5 내지 1% 이다. 상기 저장성 용액은 계면활성제와 함께 사용하여 탈세포화 효율을 증가시킨다. 바람직한 저장성 용액으로는, 예를 들어 5 내지 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)을 사용할 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

[51] 상기 탈세포화는 조직 분말을 저장성 용액에 2 내지 6시간 동안 처리한 다음 계면활성제를 포함한 용액에 1 내지 4 시간 동안 처리하여 수행될 수 있으며, 상기 과정은 4 ℃ 내지 실온 (예를 들어, 4 내지 35 ℃)에서 수행된다.

[52] 마지막으로, 조직 분말에 존재하는 유전 물질의 제거를 위해, DNA 분해효소를 처리하여 10 내지 12 시간 동안 교반시킨다.

[53] 유전 물질을 제거한 후에는 최종적으로 동결 건조를 통해 탈세포화 세포외기질 분말을 제조하였으며, 분말의 입자 크기는 25 내지 100 μm 이하의 미세분말이 되도록 제조될 수 있다. 상기 범위보다 큰 미세 입자를 사용하는 경우, 세포의 생물학적, 물리적 특성이 변화될 수 있으며, 궁극적으로 분화도 조절에 영향을 끼칠 수 있다. 또한, 상기 범위보다 작은 미세 입자를 사용하는 경우, 내부 제조 공정의

한계로 인하여 수율이 낮고 추가적으로 시간이 소요되어 사용하는 데 제한이 있다.

[54] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 상기와 같은 과정을 통해 제조된 탈세포화 세포외기질 분말의 콜라겐, sGAG 및 DNA 함량을 분석하였다. 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 탈세포화 후에도 조직의 콜라겐 및 sGAG 함량이 잘 유지되었고, DNA는 97% 이상이 제거되어 탈세포가 성공적으로 진행되었음을 확인하였다.

[55] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계는 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 형성하는 단계로, 세포를 포함하는 배양액에 상기 (a) 단계에서 제조된 탈세포화된 세포외기질 분말을 첨가한 후 배양함으로써 수행된다.

[56] 상기 (b) 단계에서 상기 세포는 줄기세포로서, 자가 동종 또는 이종 줄기 세포일 수 있으며, 구체적으로 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이로 한정되지 않는다. 상기 세포는 1.5X10 내지 4X10 세포로 파종하여 90% 이상의 배양률을 나타낼 때까지 배양하는 것이 바람직하다. 상기 범위보다 적은 수의 세포를 사용하는 경우, 세포외기질의 축적이 제한되며 자가 조립이 진행되지 않는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 상기 범위보다 많은 수의 세포를 사용하는 경우, 일부 세포에 산소와 영양소의 공급이 원활하지 못하여 세포의 생존율에 영향을 끼칠 수 있다.

[57] 이후, 배양액에 상기 (a) 단계에서 제조된 탈세포화된 세포외기질 분말을 첨가한 후 일정 시간 동안 배양할 수 있다. 이때, 탈세포화된 세포외기질 분말은 0.05 내지 3 mg/ml, 바람직하게는 1 내지 2.5 mg/ml의 농도로 첨가될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다. 상기 배양 시간은 최대 48 시간, 바람직하게는 12 내지 24 시간일 수 있다.

[58] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 탈세포화 세포외기질 분말의 농도에 따른 세포-탈세포화된 세포외기질 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크의 세포 생존율을 분석함으로써, 최적화된 탈세포화 세포외기질 분말의 농도를 확립하였다. 0 내지 2.5 mg/ml의 농도 범위로 연골화 세포외기질 분말을 사용한 결과, 도 2c 및 2d에서 확인되는 바와 같이 2.5 mg/ml 이상 처리하였을 때, 약 72%의 세포 생존율을 보이며 대조군 및 다른 농도의 세포외기질 분말 처리군에 비하여 유의적인 세포 사멸이 관찰되었다.

[59] 상기 (b) 단계에서 탈세포화된 세포외기질 분말은 세포를 끌어들이는 화학유인물질 (chemoattractant)로서 작용할 수 있을 뿐만 아니라, 세포와 강한 결합 능력이 있고, 증식과 분화를 촉진하는 능력이 있다. 상기 탈세포화된 세포외기질은 유래된 조직의 종류에 따라 분화 유도가 이루어지기 때문에 다양한 생체 모방 구조를 만들 수 있다. 따라서, 상기 탈세포화된 세포외기질 분말은 세포의 부착 및 증식에 효과적이며, 특히 줄기세포가 특정 세포로 분화되는 데에 큰 영향을 미칠 수 있다.

[60] 상기 (b) 단계에서 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체는 생체 외 (*in vitro*)에서 형성될 수 있다.

[61] 또한, 상기 (b) 단계에서 세포 증식 또는 세포 분화 유도에 의해 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 형성할 수 있다. 세포와 탈세포화된 세포외기질이 융합하기 시작한 후 일정 기간 동안 추가 배양하면 자가조립 (self-assembly)을 통해 점점 응축하는 형태의 세포-탈세포화된 세포외기질 자가조립체가 제조된다.

[62] 상기 (b) 단계에서 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체의 조직 분화능을 강화시키기 위해 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액을 추가로 첨가할 수 있다. 상기 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액은, 예를 들어, 탈세포화 세포외기질 분말을 0.01 M 내지 0.5 M 염산수용액 또는 0.1 M 내지 0.5 M 아세트산수용액에 펩신 (pepsin)과 함께 4 ℃ 내지 36 ℃에서 교반하고, NaOH 용액을 이용하여 pH를 중성화시켜 제조될 수 있다. 상기 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액은 중성화 과정에서 생성된 염 (NaCl)을 제거하기 위해 투석막 (MWCO: 1,000 ~ 3000 Da)이 이용될 수 있고, 인산완충용액 (PBS)을 추가하여 pH, 이온 농도 및 삼투압을 조절할 수 있다. 또한, (a) 단계에서 제조된 탈세포화된 세포외기질 분말과 동일한 조직 유래의 세포외기질을 포함하며, 50 내지 500 μg/ml 의 농도로 첨가될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다. 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액은 자가조립체를 형성하는 시점과 이후 자가조립체 내의 배양액을 교체하는 시점마다 같이 첨가되는 것이 바람직하다.

[63] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계는 상기 (b) 단계에서 수득된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 3D 프린팅 장비에 적용하여 사용하기 위한 조직 가닥 잉크로 제조하는 단계로서, 균질화 과정을 통해 3D 프린팅에 사용하기에 최적화된 조직 가닥 잉크로 제조된다.

[64] 본 발명에서, 용어 "조직 가닥 (tissue strand) 잉크"는 비균질한 상태의 자가조립체를 균질하게 블렌딩하여 수득되는 3차원 조직 배양물을 지칭한다.

[65] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계, 즉, 자가조립체에서 조직 가닥 잉크로 제작하는 과정은 프린팅에 적합한 물리적 특성을 가지는 초기의 미성숙한 자가조립체를 균질하게 블렌딩 (Blending) 하는 공정을 포함한다.

[66] 상기 (b) 단계에서 수득된 자가조립체는 물리/생화학적으로 비균질한 상태로 인쇄 적합성이 떨어지기 때문에 3D 프린팅에 바로 적용하기에는 한계가 있다.

[67] 이에 따라, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체의 배양기간 및/또는 블렌딩 공정을 조절하여 조직 가닥 잉크를 제조하고, 이의 인쇄 적합성 및 세포 생존율을 확인하였다.

[68] 먼저, 세포와 탈세포화된 세포외기질이 융합하기 시작한 후 각각 1일, 3일, 7일 및 10일 동안 배양한 후 블렌딩 공정을 거쳐 제조된 조직 가닥 잉크의 인쇄 적합성 및 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 도 4a에서 확인되는 바와 같이, 자가조립체의 배양기간이 3일 미만일 경우, 세포 및 세포외기질 사이의 적절한 융합이 이루어지지 않아 점착성이 떨어져 3차원 구조체 형성이 어려웠고, 배양기간이

10일을 초과하면 세포 및 세포외기질 사이의 결합이 너무 강하여 잉크의 물리적 균질성 확보가 어려우며, 블렌딩 공정에서의 물리적 응력이 증가하여 유의적인 세포사멸이 나타남을 확인하였다.

[69] 따라서, 조직 가닥 잉크로 사용하기 위한 자가조립체의 최적의 배양기간은 세포와 탈세포화된 세포외 기질이 융합하기 시작한 후 2일 내지 9일, 보다 바람직하게는 3일 내지 8일, 가장 바람직하게는 3일 내지 7일일 수 있다.

[70] 추가로, 배양된 자가조립체의 블렌딩 공정에 따른 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 확인하였다. 균질한 조직 가닥 잉크의 제조를 위한 자가조립체의 블렌딩 공정은, 예를 들어, 배양된 자가조립체를 분자체 (Molecular sieve) 또는 주사기 노즐에 관통시켜 수행할 수 있다.

[71] 첫 번째로, 50 내지 800 μm의 다양한 메쉬 직경 (각각 50, 100, 200, 400 및 800 μm)을 갖는 분자체를 이용하여 블렌딩을 수행한 후 메쉬 직경에 따른 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 확인하였다. 그 결과, 도 4b에서 확인되는 바와 같이, 메쉬 직경이 커질수록 조직 가닥 잉크의 수율 및 세포 생존율은 증가하고, 인쇄 해상력 (인쇄 적합성)은 감소하였다. 따라서, 조직 가닥 잉크의 수율, 세포 생존율 및 인쇄 적합성을 종합적으로 고려하였을 때, 50 내지 800 ㎛, 보다 바람직하게는 100 내지 600 ㎛, 가장 바람직하게는 200 내지 400 ㎛의 메쉬 직경을 갖는 분자체를 이용하여 자가조립체의 블렌딩을 수행하는 것이 적합하지만, 이로 한정되지 않는다. 상기 분자체를 이용한 블렌딩 공정은 조직 가닥 잉크의 입자 크기가 균질해질 때까지 수회 반복하여 수행될 수 있으며, 예를 들어, 1 내지 5회 반복하여 수행될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

[72] 두 번째로, 배양된 자가조립체를 1.2 mm 내지 2.4 mm의 다양한 직경 (각각 1.2, 1.4 및 2.4 mm)을 갖는 주사기 노즐에 반복적으로 관통시켜 블렌딩을 수행한 후 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 확인하였다. 그 결과, 도 4c에서 확인되는 바와 같이, 주사기 노즐의 직경이 감소할수록 수율 및 인쇄 적합성이 향상되었고, 세포 생존율은 주사기 노즐의 직경에 상관없이 일정한 수준임을 나타내었다. 따라서, 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 종합적으로 고려하였을 때, 1.0 내지 3.0 mm, 보다 바람직하게는 1.0 내지 2.7 mm, 가장 바람직하게는 1.2 내지 2.4 mm의 노즐 직경을 갖는 주사기를 이용하여 자가조립체의 블렌딩을 수행하는 것이 적합하나, 이로 한정되지 않는다. 상기 분자체를 이용한 블렌딩 공정은 조직 가닥 잉크의 입자 크기가 균질해질 때까지 수회 반복하여 수행될 수 있으며, 예를 들어, 1 내지 5회 반복하여 수행될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

[73] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (d) 단계는 상기 (c) 단계에서 균질화된 조직 가닥 잉크를 3D 프린팅 장비에 적용하여 3D 프린팅 인공 조직체를 제조하는 단계이다. 상기 (d) 단계에서 3D 프린팅 장비에 적용되는 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크는 살아 있는 세포와 세포외기질을 포함하고 있기 때문에, 3D 프린팅 시 세포 생존율을 최대한 높이기 위한 조건으로 수행

하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 (c) 단계에서 수득되는 균질화된 조직 가닥 잉크는 3D 프린팅용 주사기에 주입하여, 200 μm 이상의 노즐 크기, 20 내지 150 Kpa 미만의 공압 (air pressure) 및 0.1 내지 3 mm/초의 프린팅 속도로 3D 프린팅을 수행하는 것이 바람직하다.

[74] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 조건으로 3D 프린팅을 수행하여 제조된 인공 조직체의 모양을 관찰하고 이의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 도 5a에서 확인되는 바와 같이 500 μm 크기의 미세한 십자 구조 (Cross-shaped structure)뿐만 아니라 1 cm 이상의 크기가 큰 구조체도 제작할 수 있었으며, 도 5b에서 확인되는 바와 같이 프린팅 후에도 조직 가닥 잉크 대비 85% 이상의 세포 생존율을 보유하고 있었다.

[75] 이에 따라, 본 발명의 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법은 전술한 바와 같은 균질화 과정을 통해 3D 프린팅에 사용하기에 최적화된 조건의 조직 가닥 잉크를 제작하는 것이 가능하며, 이를 3D 프린팅에 적용하여 마이크로미터 단위 (예를 들어, 200 내지 700 μm)의 너비로 미세 패터닝된 인공 조직체 및 인공 장기를 수득하는 것이 가능하다.

[76] 따라서, 본 발명의 제2 측면은 전술한 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체 및 인공 장기에 관한 것이다.

[77] 전술한 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체 및 인공 장기는 기원 조직의 형태학적 외형을 구현할 수 있고 세포외기질의 기원에 따라 목적하는 장기의 생물학적 특성을 모사하는 조직으로의 성숙이 가능하다.

[78] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[79] [실시예 1]

[80] **골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직 유래 탈세포화 세포외기질 (DECM) 분말 제작**

[81] 돼지 골 (Bone)는 경골 (Tibia)과 대퇴부과 (Femoral condyle)에서, 인대 (Tendon)는 슬개건 (Patella tendon)에서, 근육 (Muscles)은 사두근 (Quadriceps)에서, 섬유-연골 (Meniscus) 및 연골 (Cartilage) 조직은 무릎에서 각각 수술용 블레이드 및 톱을 사용하여 수확하였다. 각각의 조직은 증류수로 3회 세척한 뒤 동결 건조 및 동결 파쇄를 통해 분말(Powder)로 수득하였다.

[82] 수득한 조직 분말은 10 mM Tris-HCl, pH 7.4의 저장성 용액 (hypotonic solution)을 넣고 실온에서 4시간 처리한 후 0.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate)를 포함하는 TBS 완충액에 2시간 처리하여 탈세포를 진행하였다. 이후 계면활성제 성분인 SDS를 제거하기 위해 증류수로 6회 세척하였다. 마지막으로, 조직 세포외기

질 분말에 존재하는 유전물질을 제거하기 위하여 DNA 분해효소(DNAase)를 포함한 용액을 넣어주고 12시간 교반시켰다. 이후 추가적으로 6회 증류수로 세척하여 탈세포 과정을 완료하였다.

[83] 최종적으로 도 1a와 같이 이를 동결 건조하여 탈세포화 세포외기질 (Decellularized extracellular matrix: DECM) 분말로 제작하였으며, 체에 걸러 100 μm 이하의 미세분말로 제조하였다.

[84] [실시예 2]

[85] **골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직 유래 DECM 분말의 생화학적 특성 분석**

[86] 2-1. 탈세포화된 골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직 유래 DECM 분말의 콜라겐, sGAG 함량 분석

[87] 탈세포 공정 후 유지된 콜라겐, sGAG 성분을 정량적으로 분석하기 위해 시르콜 콜라겐 어세이(Sircol collagen assay) 와 블라이스캔 sGAG 어세이 (Blyscan Glycosaminoglycan assay)를 진행하였다.

[88] 그 결과, 도 1b와 같이 근육 조직을 제외하고 4 가지 조직에서는 탈세포 후 콜라겐 함량이 잘 유지되는 것을 확인하였으며, 특히 섬유-연골 및 연골 조직에서는 탈세포 후 콜라겐 조성이 높아지는 것을 확인하였다.

[89] sGAG 함량의 경우, 골 조직을 제외한 4 가지 조직에서 탈세포 공정 이후에도 원래 조직(Native tissue) 대비 50% 이상 유지하였고, 특히 인대 조직은 탈세포 공정 후에도 원래 조직과의 통계적 유의성이 없었다.

[90] 2-2. 탈세포화된 골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직 유래 DECM 분말의 DNA 함량 분석

[91] 피코그린 어세이(Picogreen assay)를 통하여 탈세포 공정이 완료된 골, 인대, 근육, 섬유-연골 및 연골 조직 세포외기질 분말의 dsDNA 함량을 분석하였다.

[92] 그 결과, 도 1b와 같이 5 가지 조직에서 97% 이상의 DNA가 제거되었으며 절대량으로는 조직 1 mg 당 50 ng 이하 수치를 보였다. 따라서, 상기 5 가지 조직에서 성공적으로 탈세포가 진행되었음을 확인하였다.

[93] 상기 결과로부터 5 가지 조직에서 수행한 탈세포 공정이 sGAG와 콜라겐과 같은 주요 물질은 유지하면서도 효율적으로 유전 물질을 감소시키는 것을 확인하였다.

[94] [실시예 3]

[95] **3D 프린팅을 위한 줄기세포/DECM 자가조립체의 제작**

[96] 3-1. 세포/DECM 자가조립체의 제조

[97] 각 조직의 DECM 분말을 이용한 세포/DECM 자가조립체는 다음과 같은 과정으로 제조되었다.

[98] 도 2a와 같이 60 mm 직경을 가진 배양 접시에 돼지의 활액막 유래 줄기 세포 (pSYMSC) 를 2.5x10으로 파종한 후 90% 이상의 배양율 (confluency) 을 가질 수 있도록 최대 48 시간 동안 인큐베이터에서 배양한다. 이후 준비된 각 조직 유래 DECM 분말을 1 mg/ml 의 농도로 세포 배양액에 현탁한 후 최대 48 시간 동안 배

양한다. 줄기세포와 DECM이 융합하기 시작하면 세포 스크레이퍼 (cell scraper)를 사용하여 배양 접시로부터 분리한 후 6 웰 플레이트로 옮겨 5 ml의 배양액을 넣어주고, 3일마다 새로운 세포 배양액으로 교환해 주었다.

[99] 도 2b와 같이 줄기세포/DECM 융합 이후 일주일 동안 자가조립 (self-assembly)을 통하여 점점 응축하는 형태의 줄기세포/DECM 자가조립체가 제조되는 것을 확인할 수 있었다.

[100] 3-2. 3D 프린팅을 위한 세포/DECM 자가조립체의 DECM 농도 최적화

[101] 세포외기질의 농도에 따른 줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직잉크의 세포 생존율을 분석하기 위해, 0-2.5 mg/ml의 연골 세포외기질 분말을 세포배양액에 현탁하여 자가조립체를 제작한 후 배양 7 일째 라이브/데드 어세이 (Live/dead assay)를 진행하였다.

[102] 그 결과, 도 2c 및 2d에 나타난 바와 같이 DECM 분말의 농도가 높아질수록 자가조립체의 부피도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, DECM 분말의 농도를 2.5 mg/ml 이상 처리하였을 때, 약 72%의 세포 생존율을 보이며 대조군 및 다른 농도의 DECM 처리군에 비하여 유의적인 세포사멸이 관찰되었다.

[103] [실시예 4]

[104] **수용화된 연골 DECM 처치에 의한 세포/DECM 자가조립체의 조직분화능 강화**

[105] 수용화된 DECM (DECM-Sol)의 처치에 의해 세포/DECM 자가조립체의 조직분화능이 강화되는지 분석하기 위해 자가조립체 배양 14 일째에 RT-qPCR 과 조직학적 분석을 진행하였다. 이를 위해, DECM-Sol 은 줄기세포/DECM이 자가조립 형성을 시작하는 날부터 250 μg/ml의 농도로 배양액 교체시마다 2 주간 처치되었다.

[106] 그 결과, 도 3a와 같이 줄기세포 단독 및 줄기세포/DECM 자가조립체 그룹에 비해 DECM-Sol이 추가적으로 처치된 자가조립체 그룹은 연골 특이적 마커 (COL2, SOX9 및 ACAN)의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다.

[107] 또한, 자가조립체의 H&E 염색 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 줄기세포 단독 그룹 및 DECM 분말만 처치한 그룹에 비하여 DECM 분말+DECM-Sol을 함께 처치한 그룹에서 세포와 세포외기질의 분포가 가장 균질한 것을 확인할 수 있었다. 사프라닌-오 (safranin-O) 염색 분석에서도, 다른 두 그룹에 비하여 DECM-Sol이 추가된 줄기세포/DECM 자가조립체의 sGAG 발현이 유의적으로 강화된 것을 확인할 수 있었다.

[108] [실시예 5]

[109] **세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크의 균질화 공정 최적화**

[110] 자가조립체에서 조직 가닥 잉크로 제작하는 과정은 프린팅에 적합한 물리적 성상을 가지는 배양 1일 내지 10일 차의 초기 미성숙한 자가조립체를 균질하게 블렌딩 (Blending) 하는 공정을 포함한다. 이때, 자가조립체는 배양 기간이 길어짐에 따라 세포와 ECM이 더욱 응집되기 때문에 점착성 및 물리적 강도가 증가하

고, 블렌딩 과정에서 발생하는 응력 (stress)으로 인해 조직 가닥 잉크 내 세포 생존율이 감소할 수 있다. 따라서, 본 실시예에서는 세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크의 균질화 공정을 최적화하기 위해 자가조립체의 배양기간 및 블렌딩 공정을 조절함으로써 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 평가하였다.

[111] 5-1. 자가조립체의 배양기간 최적화

[112] 세포와 탈세포화된 세포외기질이 융합하기 시작한 후 각각 1일, 3일, 7일 및 10일 동안 배양한 후 블렌딩 공정을 거쳐 제조된 조직 가닥 잉크의 인쇄 적합성 및 세포 생존율을 확인하고, 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[113] 도 4a의 좌측 사진에 나타난 바와 같이, 배양 1일차 자가조립체로 제작된 조직 가닥 잉크는 세포와 ECM 사이에 충분한 응집이 일어나지 않아 약한 점착성을 가지기 때문에 프린팅 시 형상 유지가 어려우며 쉽게 구조가 무너지는 것을 확인할 수 있다. 한편, 배양 3일차 및 7일차의 자가조립체로 각각 제작된 조직 가닥 잉크는 프린팅 해상도가 1일차 그룹에 비해 향상되었으며, 안정적인 3차원 구조체 제작이 가능하였다. 그러나, 배양 10일차 자가조립체로 제작된 조직 가닥 잉크는 세포 및 ECM 사이의 높은 응집력으로 인해 물리적 강성이 높았으며, 블렌딩 과정 이후에도 잉크의 균질성이 떨어지고 프린팅에 적합하지 않았다.

[114] 세포 생존율의 경우, 블렌딩 공정 수행을 통해 조직 가닥 잉크로 제작한 후의 세포 생존율을 공정 전과 비교하여 평가하였다. 블렌딩 공정 전후의 세포 생존율의 변화를 관찰하기 위하여, 동일 중량의 자가조립체와 블렌딩 공정 후의 조직 가닥 잉크를 준비하여 콜라겐 분해효소 (collagenase)를 4시간 처리하고 단일 세포로 분리시킨 후, 트리판 블루 (trypan blue) 용액을 처리하여 생존 세포의 수를 세포 계수기를 통해 측정하였다. 이때, 세포 생존율은 블렌딩 공정 전 자가조립체의 생존율을 100%로 계산하여 백분율로 나타낸 값이다. 그 결과, 도 4a의 우측 그래프에서 확인되는 바와 같이 세포 생존율은 배양 1일차 그룹에서 85.3%로 가장 높았으며, 배양기간이 증가할 수록 감소하는 경향을 보였다. 배양 3 일차와 배양 7일차 그룹에서는 모두 70% 이상의 생존율을 보였으며, 두 그룹 간의 통계적 차이는 나타나지 않았다. 마지막으로, 배양 10일차 그룹은 49.8%로 가장 낮은 세포 생존율을 나타내었다.

[115] 상기 결과를 통해, 조직 가닥 잉크로 사용하기 위한 자가조립체의 최적의 배양기간은 세포와 탈세포화된 세포외 기질이 융합하기 시작한 후 2일 내지 9일임을 알 수 있다.

[116] 5-2. 배양된 자가조립체의 블렌딩 공정 최적화

[117] 자가조립체의 블렌딩 공정은 마이크로미터 단위의 메쉬 직경을 갖는 분자체 (Molecular sieve)를 이용하거나, 또는 밀리미터 사이즈 직경의 노즐로 연결된 주사기 커넥터 (Syringe connector)에서 자가조립체를 반복적으로 관통시켜 수행할 수 있다.

[118] 따라서, 자가조립체의 블렌딩 공정을 최적화하기 위해, 배양된 자가조립체를 분자체 (Molecular sieve) 또는 주사기 노즐에 관통시킨 후 조직 가닥 잉크의 수율, 세포 생존율 및 인쇄 적합성을 평가하였다.

[119] 먼저, 분자체를 이용한 블렌딩 공정의 경우, 자가조립체를 멸균이 완료된 체 위에 올려놓은 후 세포 스크래퍼를 이용하여 좌우로 이동시키면서 체를 관통시켜 수행하였다. 이때, 분자체는 각각 50, 100, 200, 400 및 800 μm의 메쉬 직경을 갖는 것으로 사용하여, 메쉬 직경에 따른 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 확인하였다. 조직 가닥 잉크의 수율은 1 g의 자가조립체를 100% 기준으로 하였을 때, 블랜딩 공정 이후에 수득되는 조직 가닥 잉크의 무게를 백분율로 계산하여 평가하였다. 도 4b의 좌측 그래프에서 확인되는 바와 같이, 조직 가닥 잉크의 수율은 분자체의 메쉬 직경이 작아질수록 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 100 μm 이하의 메쉬 직경에서 유의적으로 감소하였고, 200 ㎛ 이상의 메쉬 직경에서는 유의미한 차이가 없었다 (50 ㎛: 38.1%, 100 ㎛: 48.2%, 200 ㎛: 69.7%, 400 ㎛: 73.5%, 800 ㎛: 80.5%).

[120] 세포 생존율은 실시예 4-1과 동일한 방식으로 확인하였다. 도 4b의 가운데 그래프에서 확인되는 바와 같이, 세포 생존율은 분자체의 메쉬 직경이 커질수록 증가하는 경향을 보였다. 50 ㎛의 메쉬 직경을 사용하였을 때 세포 생존율은 약 44.7%로 유의적인 세포 사멸이 관찰되었으나, 100 ㎛ 이상의 직경에서는 약 70% 이상의 세포 생존율이 관찰되었고, 800 ㎛ 그룹에서는 약 83.8%의 세포 생존율이 관찰되었다.

[121] 인쇄 적합성은 4X4 mm 형태의 정사각형 (square) 구조체를 선형으로 프린팅 한 후, 설계 면적 (designed pore size) 대비 프린팅 후 실제 형성된 구조체의 면적을 이미지 분석 소프트웨어로 분석하여 인쇄의 정밀성을 백분율로 계산하였다. 도 4b의 우측 그래프에서 확인되는 바와 같이, 50 ㎛ 메쉬 직경의 분자체를 사용하였을 때, 인쇄 적합성이 88.5% 로 가장 우수하였고, 메쉬 직경이 증가할수록 점진적으로 감소하며, 800 ㎛ 메쉬 직경의 분자체를 사용했을 때 7.8%로 감소하였다. 종합적으로, 메쉬 직경이 커질수록 수율 및 세포 생존율도 증가하나, 인쇄 적합성은 감소하는 경향을 확인할 수 있다.

[122] 노즐로 연결된 주사기 커넥터를 이용한 블렌딩 공정의 경우, 주사기 커넥터 노즐에서의 이동을 반복하여 균질한 조직 가닥 잉크를 제조하였다. 이때, 노즐은 각각 1.2, 1.4 및 2.4 mm의 직경을 갖는 것으로 사용하여, 노즐 직경에 따른 조직 가닥 잉크의 수율, 세포생존율 및 인쇄 적합성을 확인하였다.

[123] 조직 가닥 잉크의 수율, 세포 생존율 및 인쇄 적합성은 전술한 바와 동일하게 평가하였다. 그 결과, 도 4c에서 확인되는 바와 같이, 조직 가닥 잉크의 수율은 노즐의 직경이 커질수록 감소하는 경향을 나타내었고 (도 4c의 좌측 그래프 참조), 세포 생존율은 노즐 직경에 관계없이 약 70% 이상 유지되었다 (도 4c의 가운데 그래프 참조). 한편, 도 4c의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 인쇄 적합성은 1.2 mm 직경에서 69.2% 값을 보였고, 이는 나머지 그룹에 비해 가장 높은 해상력인

것으로 확인되었다. 따라서, 노즐의 직경이 커질수록 인쇄 적합성이 감소하는 경향을 나타낸다는 것을 알 수 있다 (1.4 mm: 62.8%, 2.4 mm: 54.5%). 종합적으로, 노즐의 직경이 커질수록 세포 생존율이 증가하지만, 수율 및 인쇄 적합성은 감소하는 경향을 확인할 수 있다.

[124] [실시예 6]

[125] **줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크를 활용한 3D 프린팅 인공 구조체 제작**

[126] 상기 실시예 5에서 제작된 조직 가닥 잉크는 최종적으로 프린팅용 주사기에 충전되어 3차원 형상을 가진 인공조직체로 제작되었다 (도 5a). 조직 가닥 잉크를 3D 프린터에 활용하여 원하는 모양의 구조체를 제작하기 위하여 프린팅 조건을 다음과 같이 설정하였다.

[127] 실시예 5에서 제작된 줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크는 살아있는 세포와 세포외기질을 포함하고 있기 때문에, 프린팅 시 세포 생존율을 최대한 높이기 위하여 노즐 (nozzle)의 크기는 200 μm 이상, 80 Kpa 미만의 공압 (air pressure)과 1 mm/sec의 프린팅 속도를 사용하였다.

[128] 그 결과, 도 5a와 같이 500 μm 크기의 미세한 십자 구조 (Cross-shaped structure) 뿐 아니라 1 cm 이상의 크기가 큰 구조체를 제작할 수 있었으며, 도 5b에 나타난 바와 같이, 프린팅 후에도 80% 이상의 세포 생존율을 보유하는 것을 확인하였다.

[129] [실시예 7]

[130] **줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 조직특이적 인공조직체의 생화학적 특성**

[131] <u>7-1. 조직특이적 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 육안 관찰</u>

[132] 줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직잉크로 프린팅된 인공조직체가 설정한 크기에 맞게 프린팅 되었는지 확인하기 위하여 육안 관찰을 진행하였다.

[133] 도 6a에서 확인되는 바와 같이, 설계한대로 직경 5 mm의 원형 디스크 (disc) 형태의 구조체가 잘 제작되었다.

[134] <u>7-2. 조직특이적 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공조직체의 생화학적 특성 분석</u>

[135] 각 조직특이적 조직 가닥 잉크로 프린팅된 인공 조직체의 단백질 카고 프로파일(protein cargo profile)을 분석하기 위하여 SDS-PAGE 분석을 진행하였다.

[136] 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 모조직에서 발견되는 주요 단백질 밴드의 발현이 프린팅된 인공조직체에서도 발견되었으며, 이를 통해 인공조직체가 모조직의 생화학적 특성과 유사함을 확인하였다.

[137] 또한, 근골격계 조직 ECM의 주요 성분인 콜라겐과 GAG의 정량 평가를 통하여 인공 조직체의 모조직 구현도를 평가하였다. 도 6c와 같이 프린팅된 인공조직체의 콜라겐 함량은 모조직 대비 60-170% 수준으로 함유하고 있음을 확인하였다 (모조직 대비 연골: 172%, 반월상연골: 124%, 골: 96%, 인대: 100%, 근육: 61%). 도 6b에 나타난 바와 같이, sGAG의 경우에도, 모조직 대비 30-100% 수준으로 함유

하고 있음을 확인하였다 (모조직 대비, 연골: 76%, 반월상연골: 46%, 골: 32%, 인대: 103%, 근육: 57%).

[138] [실시예 8]

[139] **줄기세포/DECM 자가조립체 기반 조직 가닥 잉크로 프린팅된 조직특이적 인공조직체의 조직 분화도 분석**

[140] 인공조직체가 분화 유도 이후 모조직과 유사한 생물학적 특성을 가지는지 평가하기 위하여 프린팅 이후 분화 배지에서 4주 동안 배양한 다음 구조체의 생화학적 조직학적 분석을 진행하였다.

[141] 연골 조직 유래 DECM 분말로 제작된 인공 조직체의 RT-qPCR 결과, 도 7a에서 확인되는 바와 같이 세포만 사용하여 제작된 대조군에 비해 연골 특이적 마커인 SOX9 및 COL2의 발현이 유의적으로 증가하였다. 또한, 면역 형광 염색 결과 빨간색으로 나타난 제 2형 콜라겐 (collagen type 2)의 발현이 대조군에 비해 증가한 것을 확인하였다.

[142] 섬유-연골 DECM 분말을 사용하여 제작된 인공 조직체의 RT-qPCR 결과, 도 7b에서 확인되는 바와 같이 세포만 사용하여 제작된 대조군에 비하여 섬유-연골에 풍부한 제 2형 콜라겐의 유전자 발현이 유의적으로 증가하였으며, 면역 형광 염색 결과에서도 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.

[143] 골 조직 유래 DECM 분말을 사용하여 제작된 인공 조직체의 RT-qPCR 결과, 도 7c에서 확인되는 바와 같이 세포만 사용하여 제작된 대조군에 비하여 골 조직에 주요 성분인 제 1형 콜라겐의 유전자 발현이 유의적으로 증가하였으며, ALP 또한 증가하는 것을 확인하였다. 이를 H&E 염색을 통해 조직학적으로 분석한 결과, DECM 분말 및 줄기세포가 균질하게 분포되어 인공 조직을 형성하고 있음을 확인하였고, 칼슘(calcium) 축적을 나타내는 알리자린 레드(alizarin red) 발현이 대조군에 비해 증가한 것을 확인하였다.

[144] 인대 유래 DECM 분말을 사용하여 제작된 인공 조직체의 RT-qPCR 결과, 도 7d에서 확인되는 바와 같이 세포만 사용하여 제작된 대조군에 비하여 인대의 주요 ECM 성분인 제1형 콜라겐 및 SCX 유전자 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 인공 조직체 내부를 H&E 염색을 통해 관찰한 결과, DECM 분말과 세포가 균질하게 분포되어 하나의 인공 조직을 형성하였으며, 면역화학염색법을 통한 평가에서도 제1형 콜라겐이 인공조직내 축적되어 있음을 확인하였다.

[145] 마지막으로, 근육 DECM 분말을 사용하여 제작된 인공 조직체의 RT-qPCR 결과, 도 7e에서 확인되는 바와 같이 세포만 사용하여 제작된 대조군에 비하여 근육 특이적 단백질인 MYF5의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 면역 형광 염색법으로 분석한 결과, 근육 특이적 단백질인 Desmin 단백질의 발현이 대조군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[146] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들

은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[147] 본 발명을 지원한 국가연구개발사업은 다음과 같다.

[148] [과제고유번호] 1711187902

[149] [과제번호] 2023R1A2C100720011

[150] [부처명] 과학기술정보통신부

[151] [과제관리(전문)기관명] 한국연구재단

[152] [연구사업명] (유형1-1)중견연구)

[153] [연구과제명] 기존 세포-생체재료 혼합물 바이오잉크 대체용, 임상 적용 가능한 차세대 인공조직 사출형 연골 조직 스트랜드 바이오잉크의 개발

[154] [기여율] 1/1

[155] [과제수행기관명] 아주대학교 산학협력단

[156] [연구기간] 2023.03.01 ~ 2027.02.28

청구범위

[청구항 1] 다음의 단계를 포함하는, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법:

(a) 조직 유래 세포외기질 (Extracellular matrix, ECM)을 탈세포화 및 분말화하여 탈세포화 세포외기질 (Decellularized extracellular matrix, DECM) 분말을 제조하는 단계;

(b) 세포를 포함하는 배양액에 상기 탈세포화된 세포외기질 분말을 첨가한 후 배양하여 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 형성하는 단계;

(c) 상기 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 균질화하여 조직 가닥 잉크로 제조하는 단계; 및

(d) 상기 균질화된 조직 가닥 잉크를 3D 프린팅 장비에 적용하여 3D 프린팅 인공 조직체를 제조하는 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 조직은 골, 인대, 근육, 섬유-연골 또는 연골인 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 세포는 줄기세포인 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 탈세포화된 세포외기질 분말은 0.05 내지 3 mg/ml의 농도로 첨가하는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체는 생체 외 (*in vitro*)에서 형성되는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 세포증식 또는 세포분화 유도에 의해 세포-탈세포화 세포외기질 분말 자가조립체를 형성하는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액을 추가로 첨가하는 것을 포함하는, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 수용화된 탈세포화 세포외기질 용액은 50 내지 500 μg/ml의 농도로 첨가되는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 세포와 탈세포화된 세포외기질 분말이 융합하기 시작한 후 2일 내지 9일 동안 배양하는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 균질화하는 것은 상기 (b) 단계 이후 수득된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체를 분자체 (Molecular sieve)에 통과시키거나, 또는 노즐로 연결된 주사기 커넥터에 관통시켜 블렌딩하는 (Blending) 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 분자체의 메쉬 직경은 50 내지 800 ㎛이고, 상기 주사기 커넥터에 연결된 노즐의 직경은 1.0 내지 3.0 mm인 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

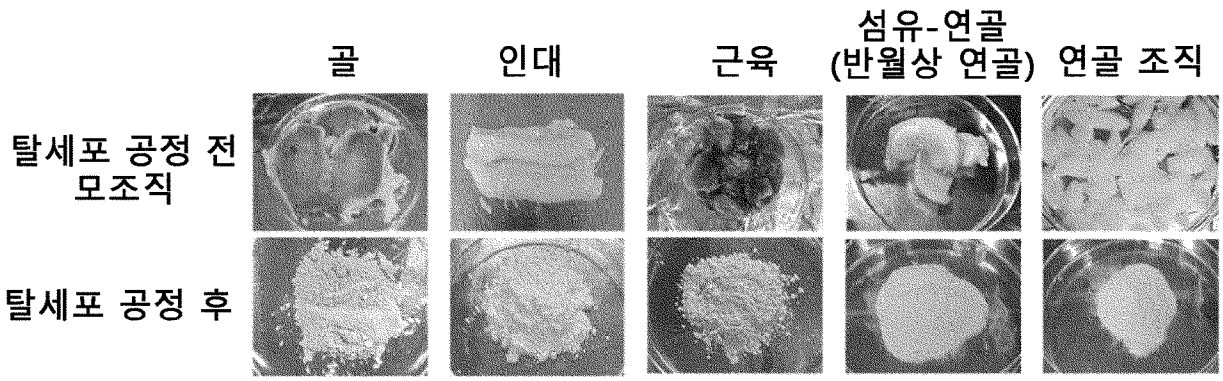
[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 제조된 조직 가닥 잉크는 3D 프린팅용 주사기에 주입하여, 200 μm 이상의 노즐 크기, 20 내지 150 Kpa 미만의 공압 (Air pressure) 및 0.1 내지 3 mm/초의 프린팅 속도로 3D 프린팅을 수행하는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체의 제조방법.

[청구항 14] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체.

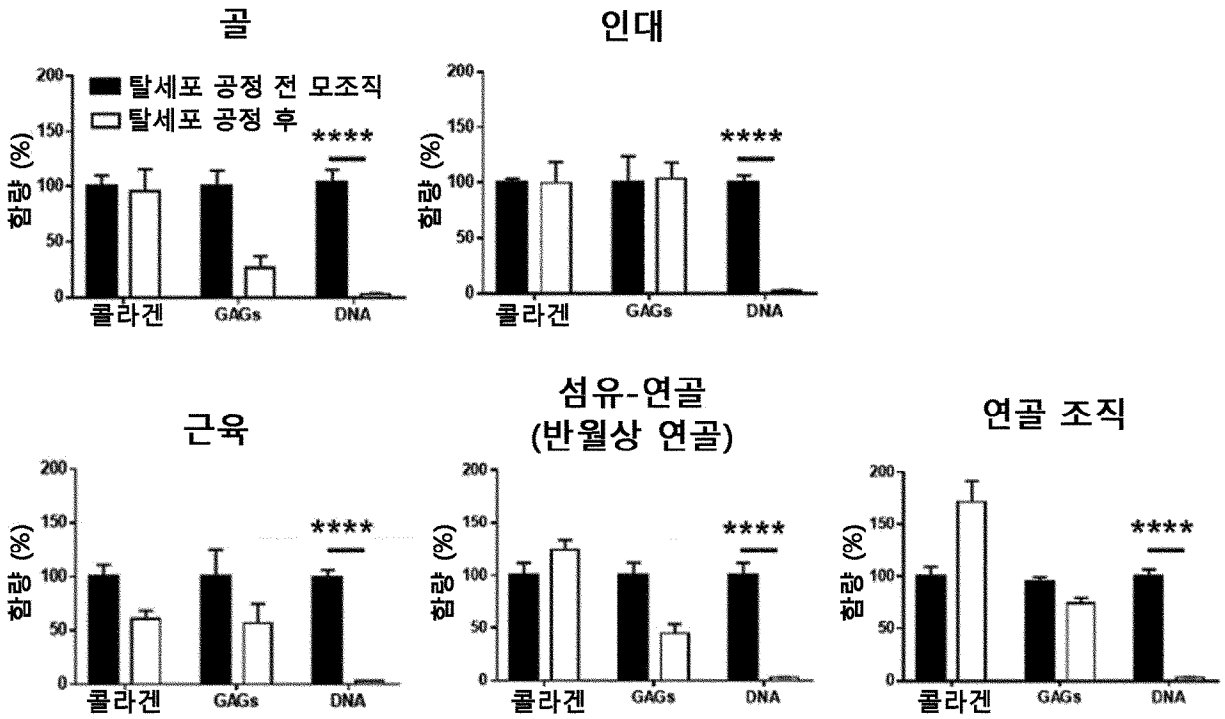
[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 인공 조직체는 기원 조직의 생화학적 특성을 나타내는 것인, 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 조직체.

[청구항 16] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립체 기반 3D 프린팅 인공 장기.

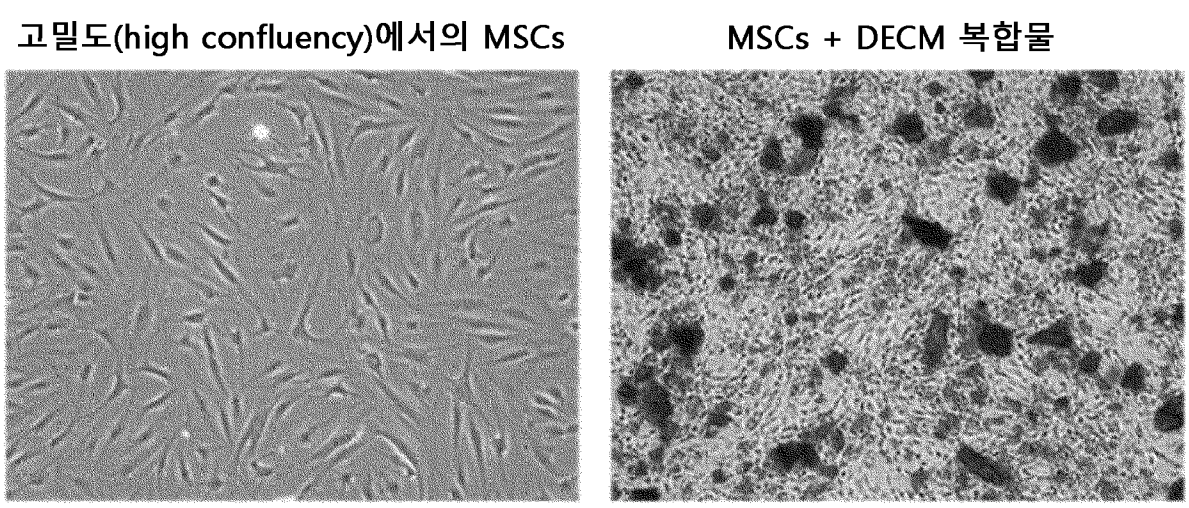
[도1a]


골
인대
근육
섬유-연골
(반월상 연골)
연골 조직
탈세포 공정 전
모조직
탈세포 공정 후

[도1b]


골
인대
근육
섬유-연골
(반월상 연골)
연골 조직
탈세포 공정 전 모조직
탈세포 공정 후
함량 (%)
200
150
100
50
0
****
콜라겐
GAGs
DNA

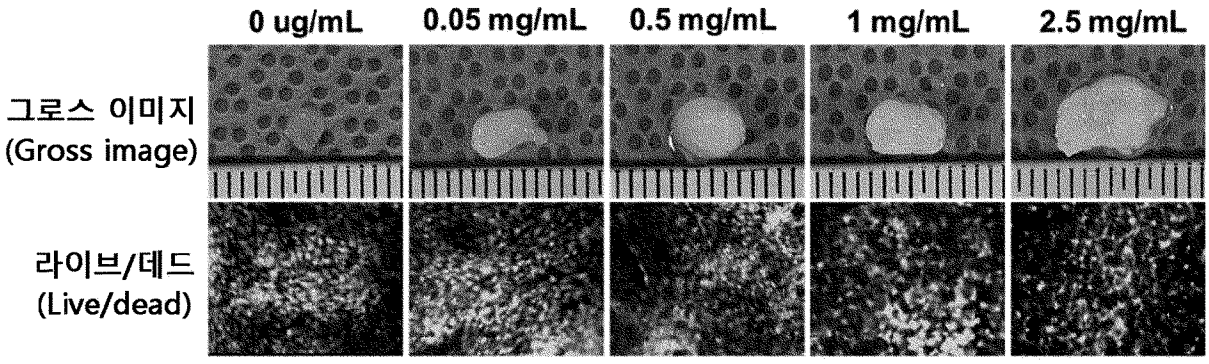
[도2a]


고밀도(high confluency)에서의 MSCs
MSCs + DECM 복합물

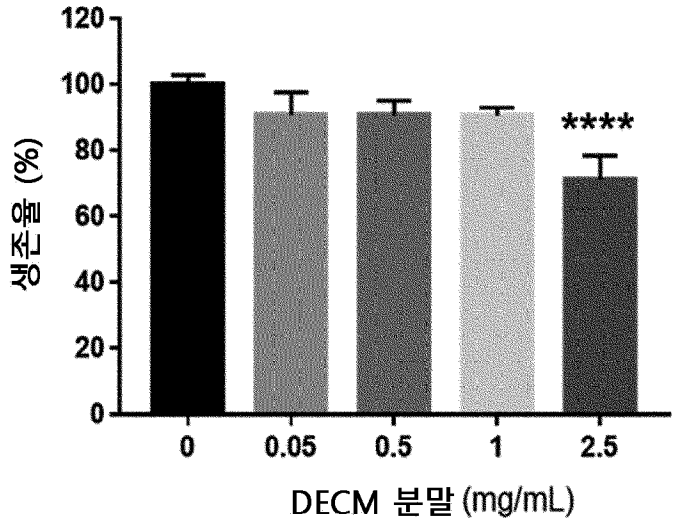
[도2b]

0일차
4일차
7일차

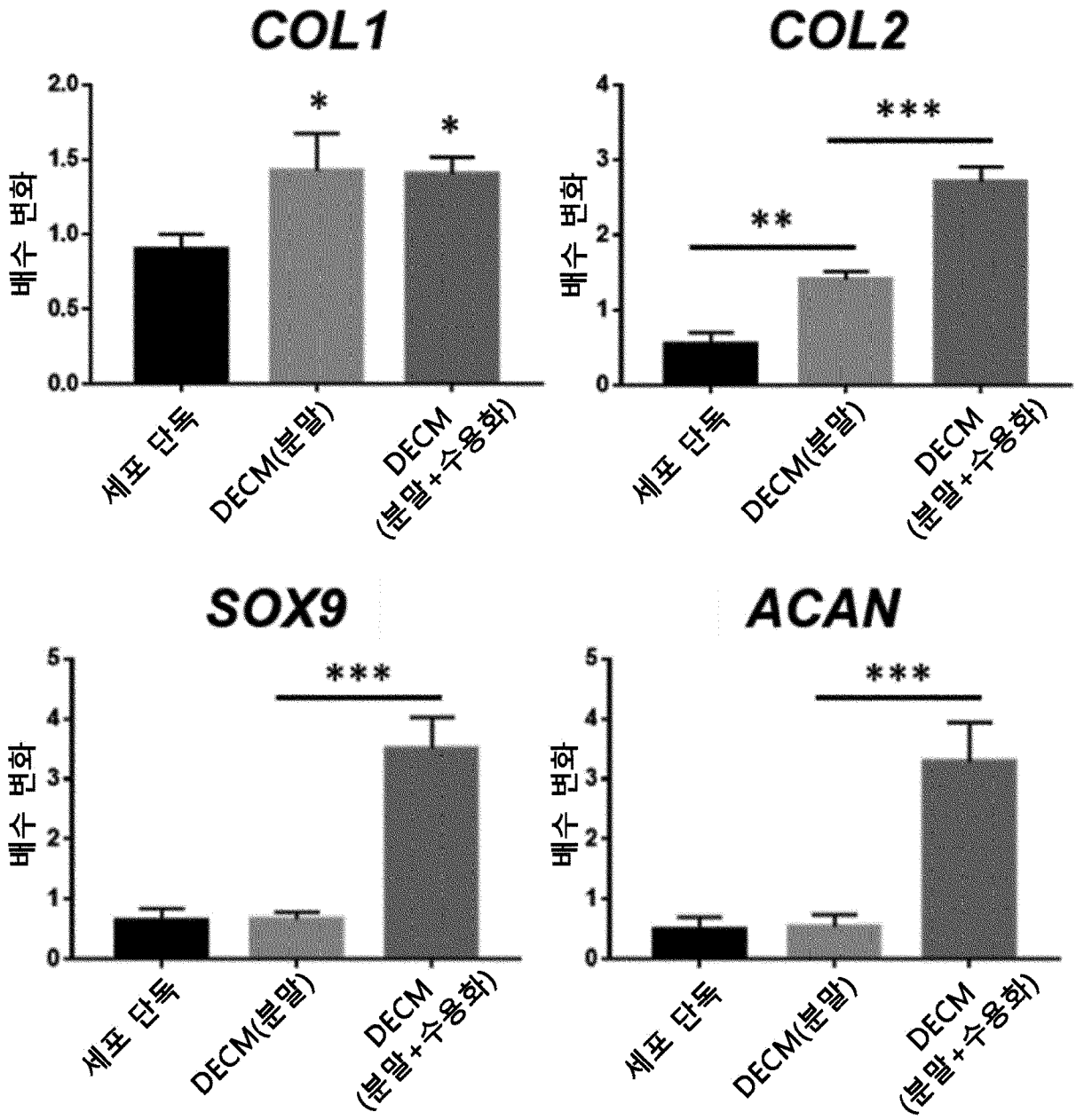
[도2c]


0 ug/mL
0.05 mg/mL
0.5 mg/mL
1 mg/mL
2.5 mg/mL
그로스 이미지
(Gross image)
라이브/데드
(Live/dead)

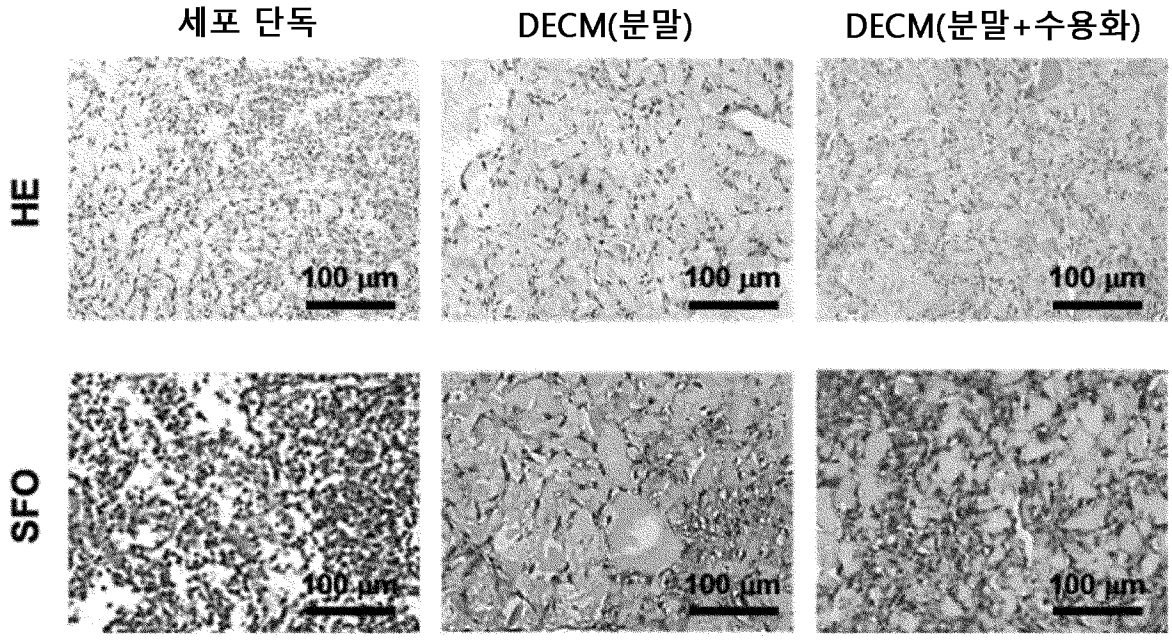
[도2d]


120
100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
****
0
0.05
0.5
1
2.5
DECM 분말 (mg/mL)

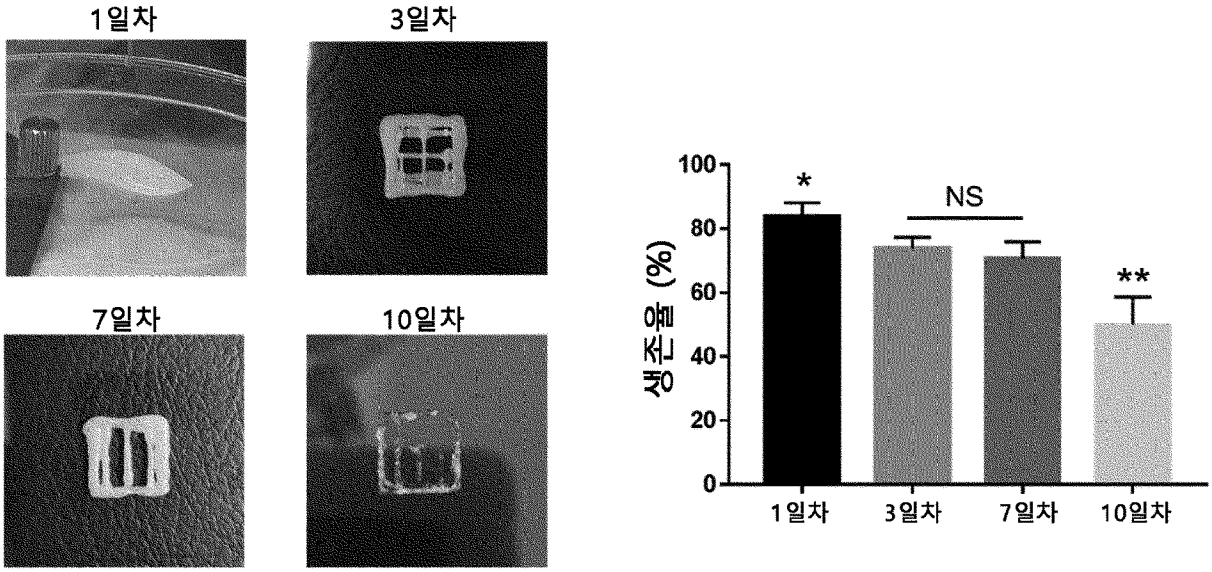
[도3a]


COL1
배수 변화
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
세포 단독
DECM(분말)
DECM (분말+수용화)
COL2
배수 변화
4
3
2
1
0
**
***
세포 단독
DECM(분말)
DECM (분말+수용화)
SOX9
배수 변화
5
4
3
2
1
0
***
세포 단독
DECM(분말)
DECM (분말+수용화)
ACAN
배수 변화
5
4
3
2
1
0
***
세포 단독
DECM(분말)
DECM (분말+수용화)

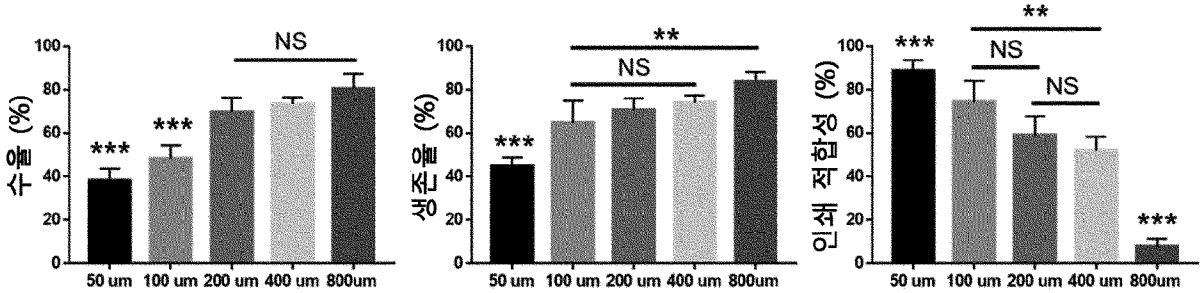
[도3b]


세포 단독
DECM(분말)
DECM(분말+수용화)
HE
SFO
100 μm

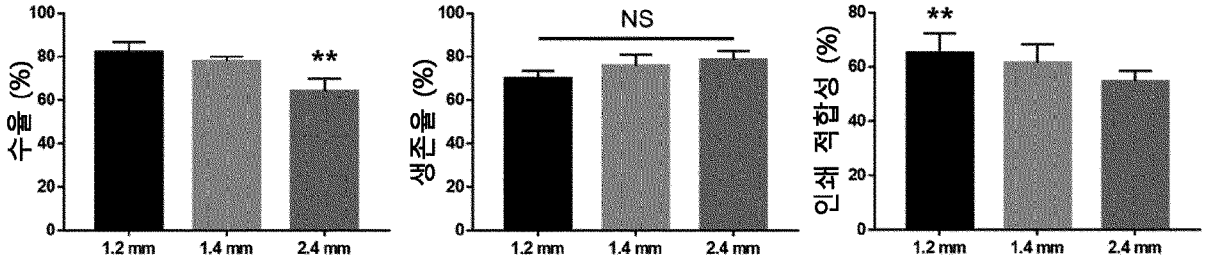
[도4a]


1일차
3일차
7일차
10일차
생존율 (%)
*
NS
**
1일차
3일차
7일차
10일차

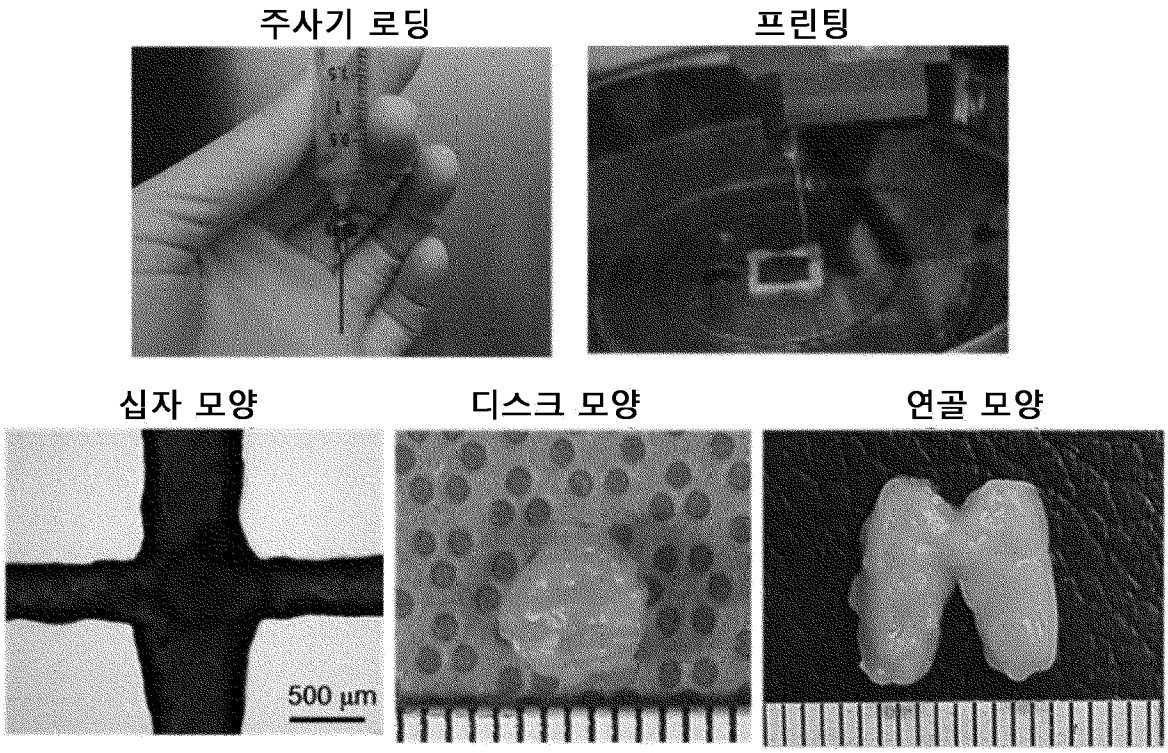
[도4b]


수율 (%)
생존율 (%)
인쇄 적합성 (%)
NS
**
***
50 um
100 um
200 um
400 um
800um

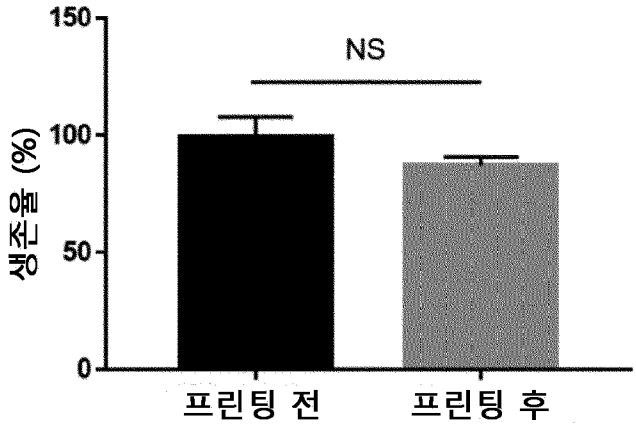
[도4c]


수율 (%)
100
80
60
40
20
0
**
1.2 mm
1.4 mm
2.4 mm
생존율 (%)
NS
인쇄 적합성 (%)

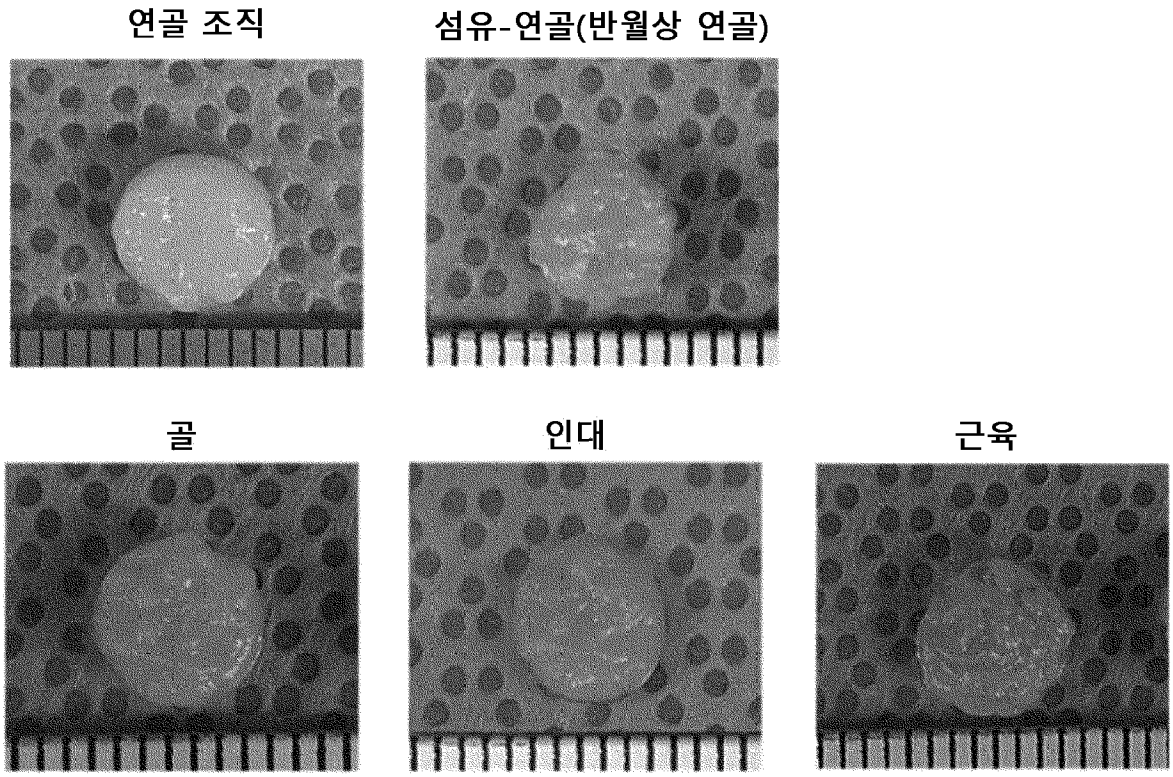
[도5a]


주사기 로딩
프린팅
십자 모양
디스크 모양
연골 모양
500 μm

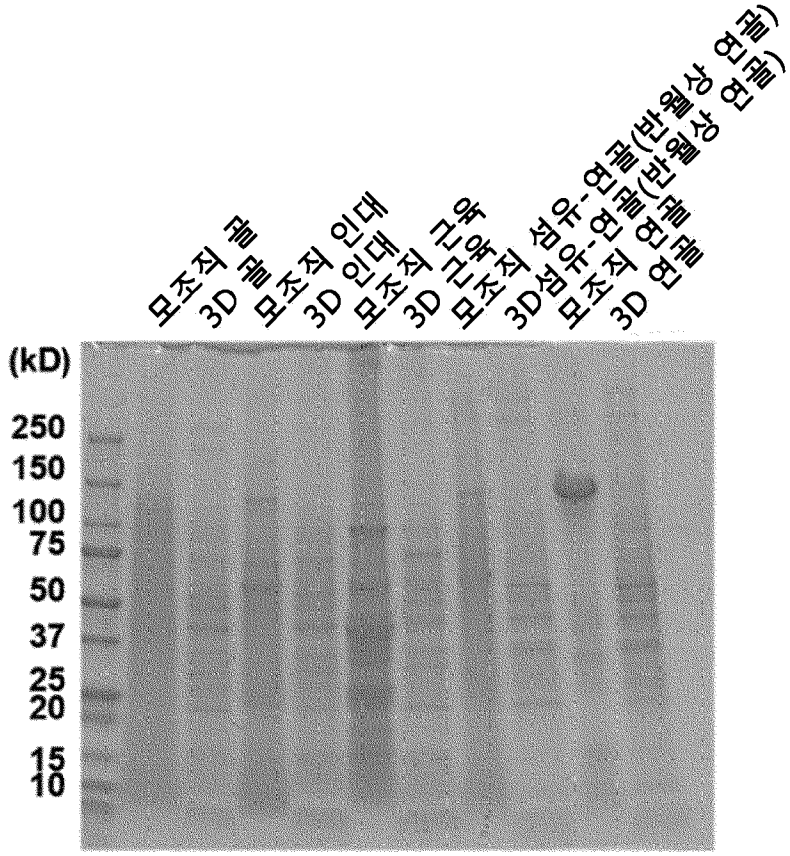
[도5b]


150
100
50
0
생존율 (%)
NS
프린팅 전
프린팅 후

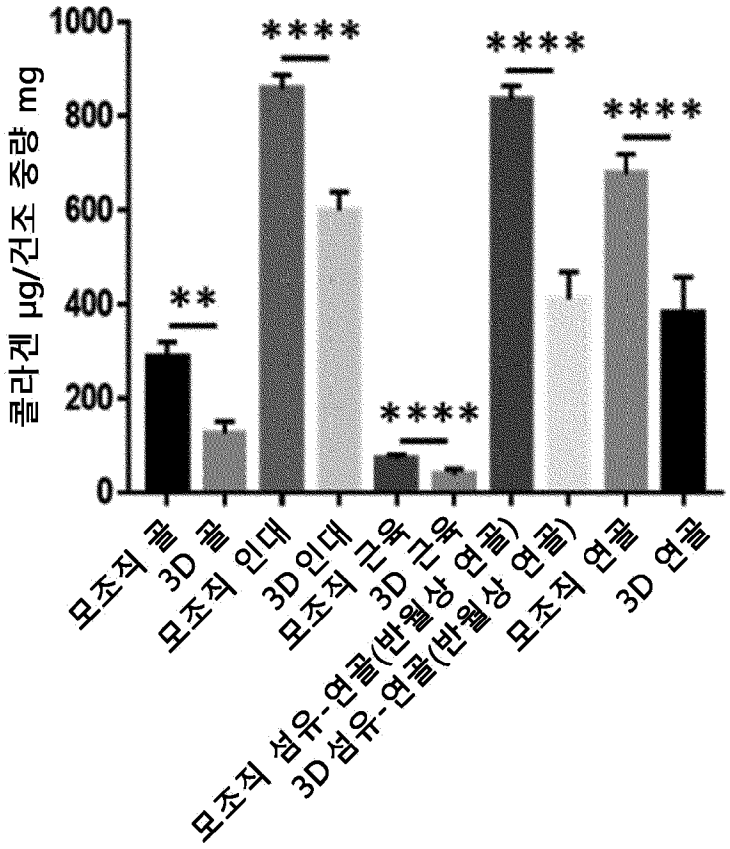
[도6a]


연골 조직
섬유-연골(반월상 연골)
골
인대
근육

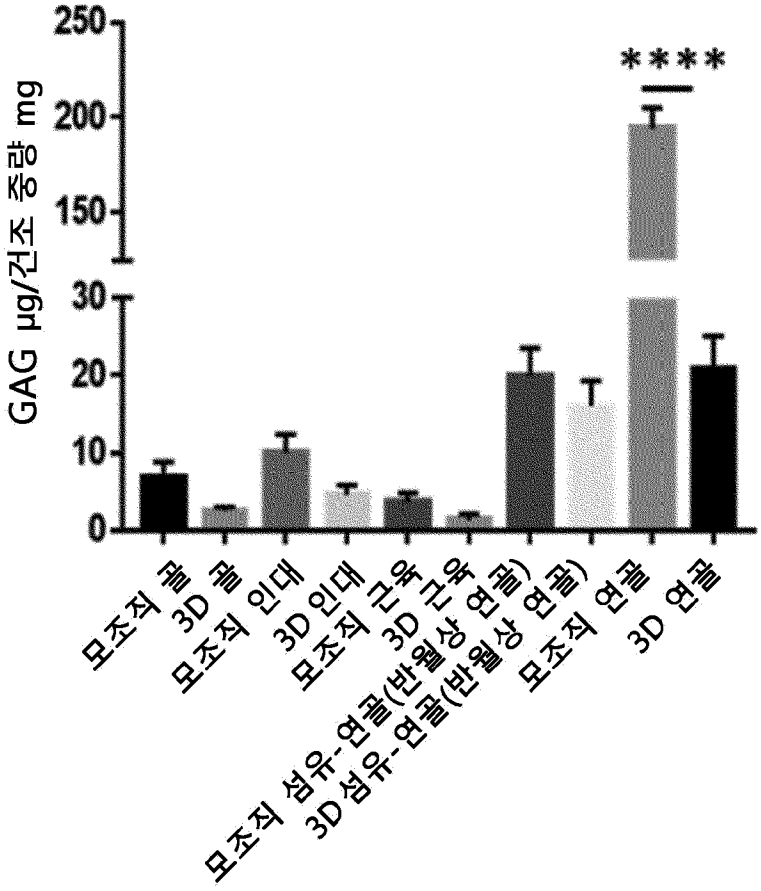
[도6b]


모조직 골
3D 골
모조직 인대
3D 인대
모조직 근육
3D 근육
모조직 섬유-연골(반월상 연골)
3D섬유-연골(반월상 연골)
모조직 연골
3D 연골
(kD)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

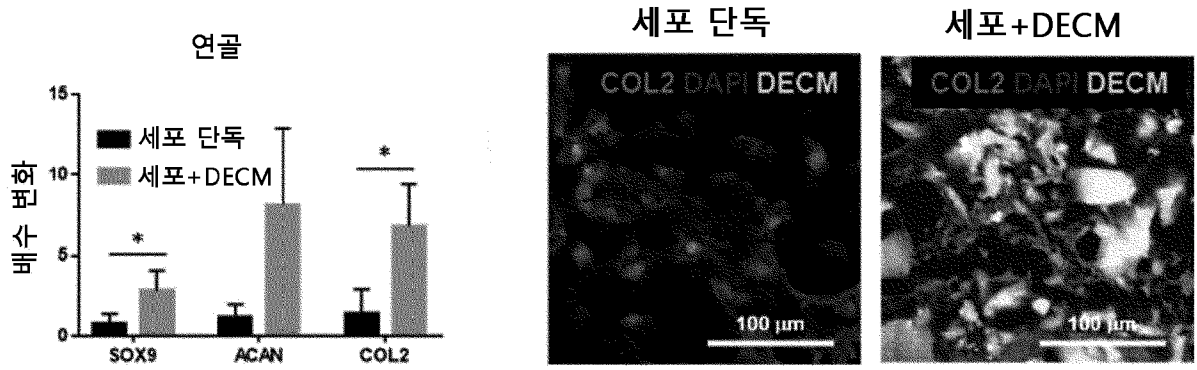
[도6c]


콜라겐 μg/건조 중량 mg
1000
800
600
400
200
0
**
****
****
****
****
모조직 콜
3D 콜
모조직 인대
3D인대
모조직 근육
3D 근육
모조직 섬유-연골(반월상 연골)
3D섬유-연골(반월상 연골)
모조직 연골
3D 연골

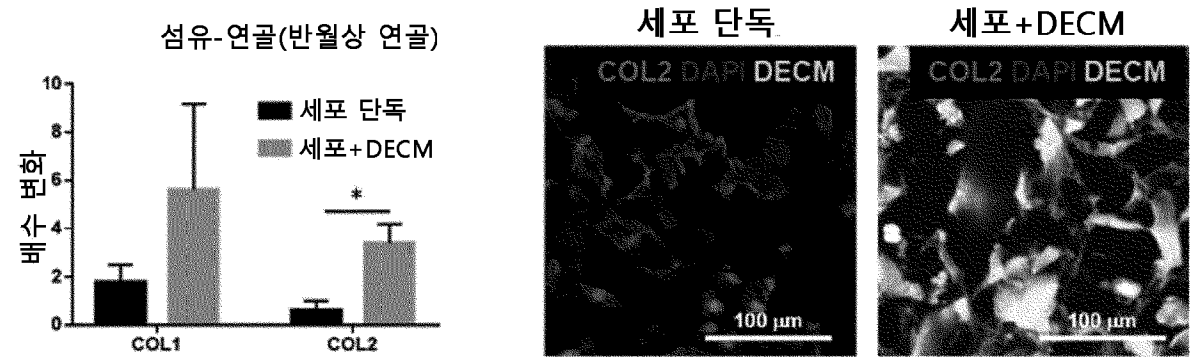
[도6d]


GAG μg/건조 중량 mg
250
200
150
30
20
10
0
****
모조직 콜
3D 콜
모조직 인대
3D인대
모조직 근육
3D 근육
모조직 섬유-연골(반월상 연골)
3D섬유-연골(반월상 연골)
모조직 연골
3D 연골

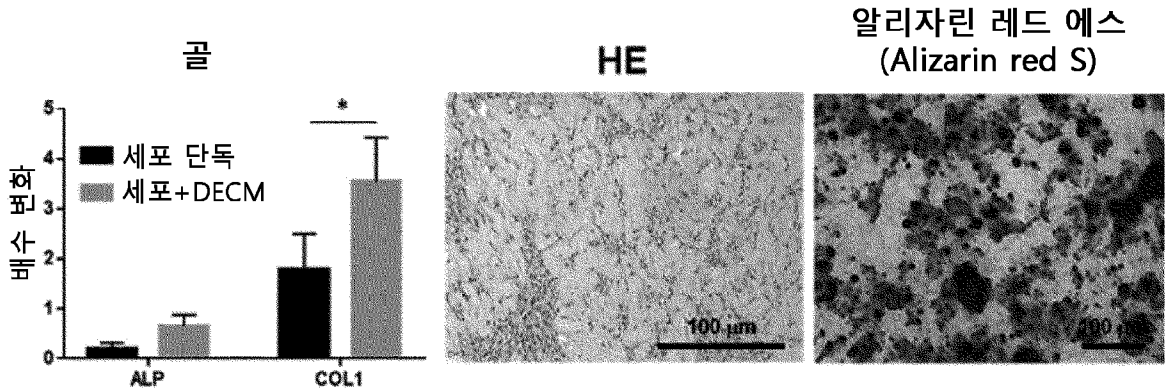
[도7a]



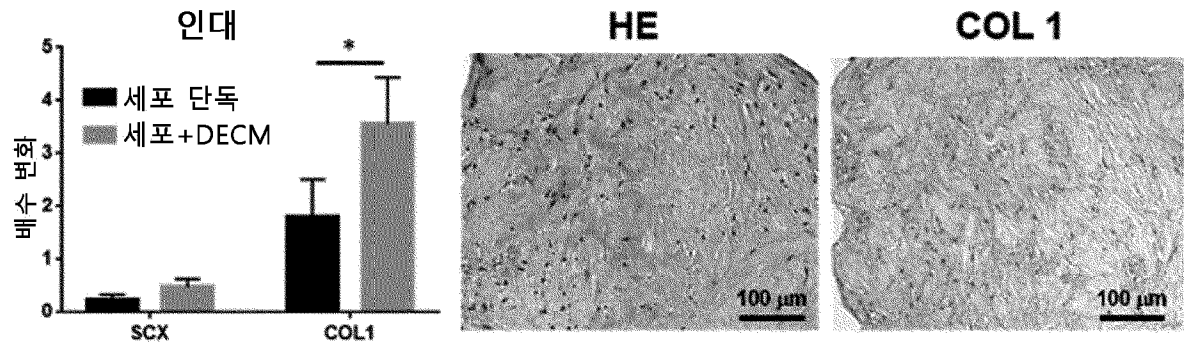
[도7b]



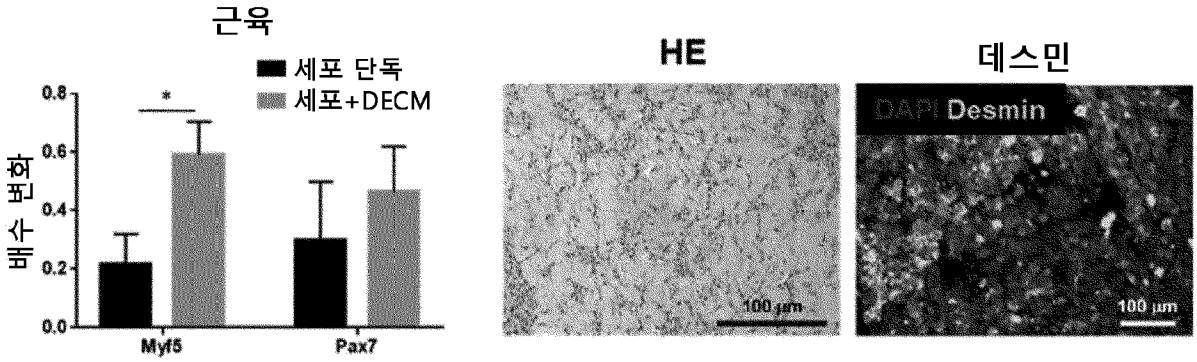
[도7c]



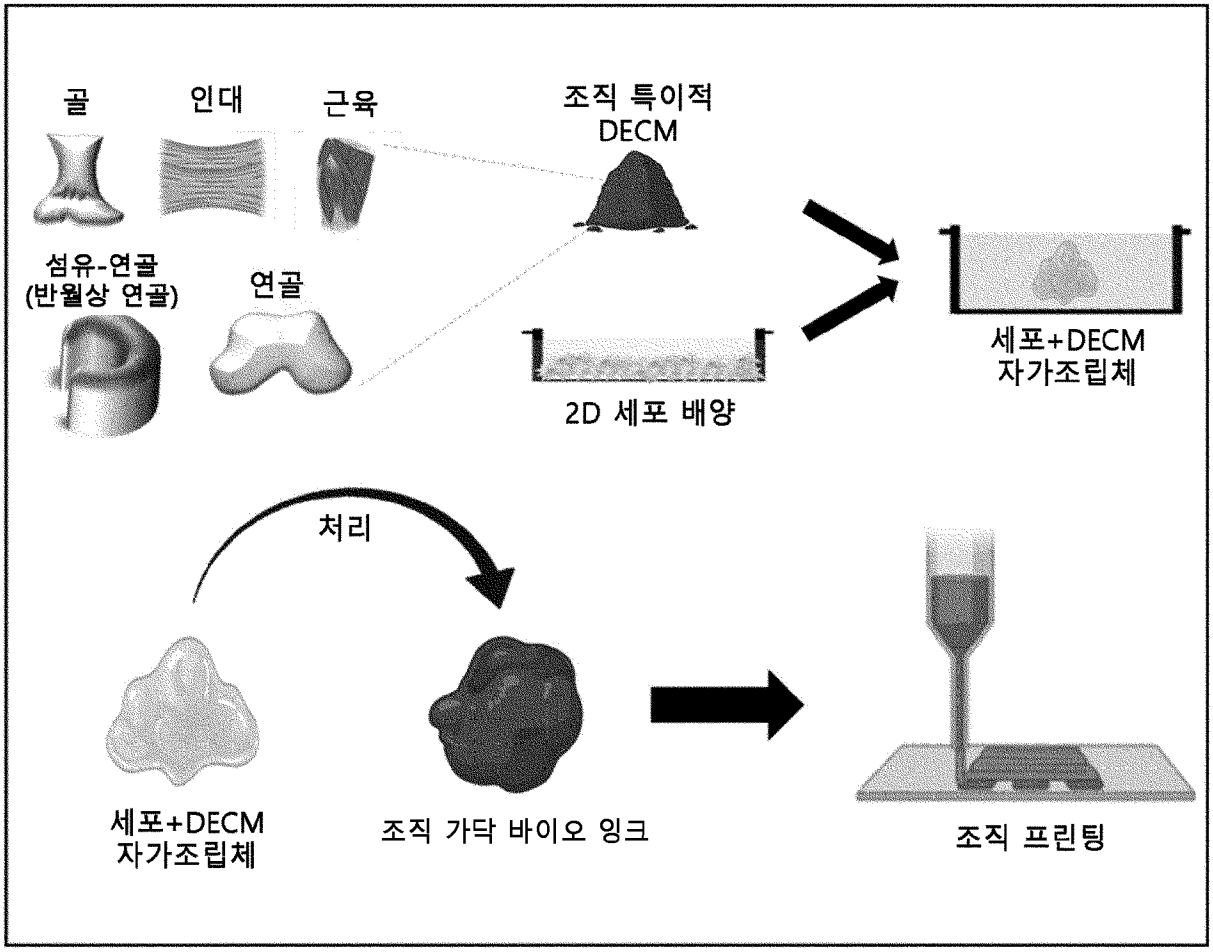
[도7d]



[도7e]


근육
세포 단독
세포+DECM
상대적 발현량
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Myf5
Pax7
HE
100 μm
데스민
DAPI Desmin
100 μm

[도8]


골
인대
근육
조직 특이적
DECM
섬유-연골
(반월상 연골)
연골
2D 세포 배양
세포+DECM
자가조립체
처리
세포+DECM
자가조립체
조직 가닥 바이오 잉크
조직 프린팅

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/005678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/36(2006.01)i; **A61L 27/38**(2006.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i; **C12N 5/0775**(2010.01)i; **C12N 5/0735**(2010.01)i; **C12N 5/074**(2010.01)i; **B33Y 10/00**(2015.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/36(2006.01); B33Y 70/00(2015.01); C12N 5/071(2010.01); C12N 5/077(2010.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 3D 프린팅 인공 조직체(3D printed artificial tissue), 인공 장기(artificial organ), 조직 유래 탈세포화 세포외기질(tissue derived DECM), 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립(cell-DECM self assembly), 조직 가닥 잉크(tissue strand ink), 줄기세포(stem cell)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0038705 A (POLBIONICA SP. Z O.O.) 29 March 2022 (2022-03-29) See abstract; and paragraphs [0002], [0007], [0076]-[0082], [0143] and [0202].	1-16
A	KR 10-2021-0037242 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 April 2021 (2021-04-06) See entire document.	1-16
A	YU, Yin et al. Three-dimensional bioprinting using self-assembling scalable scaffold-free "tissue strands" as a new bioink. Scientific Reports. 2016, vol. 6, article no. 28714, pp. 1-11. See entire document.	1-16
A	JAKAB, Karoly et al. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. Biofabrication. 2010, vol. 2, article no. 022001, pp. 1-14. See entire document.	1-16

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 August 2023	**07 August 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEVILLA, Carlos A. et al. Extracellular matrix fibronectin stimulates the self-assembly of microtissues on native collagen gels. Tissue Engineering: Part A. 2010, vol. 16, no. 12, pp. 3805-3819. See entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/005678

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2022-0038705 A	29 March 2022	BR 112022001029 A2	15 March 2022
		CA 3146781 A1	28 January 2021
		CL 2022000153 A1	14 October 2022
		CN 114340687 A	12 April 2022
		CU 20220004 A7	08 September 2022
		EP 3769796 A1	27 January 2021
		JP 2022-541636 A	26 September 2022
		PE 20220701 A1	04 May 2022
		US 2022-0280694 A1	08 September 2022
		WO 2021-014359 A1	28 January 2021
		ZA 202202184 B	28 September 2022
KR 10-2021-0037242 A	06 April 2021	KR 10-2272781 B1	05 July 2021
		US 2022-0340867 A1	27 October 2022
		WO 2021-060776 A1	01 April 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/005678

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 27/36(2006.01)i; **A61L 27/38**(2006.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i; **C12N 5/0775**(2010.01)i; **C12N 5/0735**(2010.01)i; **C12N 5/074**(2010.01)i; **B33Y 10/00**(2015.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/36(2006.01); B33Y 70/00(2015.01); C12N 5/071(2010.01); C12N 5/077(2010.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 3D 프린팅 인공 조직체(3D printed artificial tissue), 인공 장기(artificial organ), 조직 유래 탈세포화 세포외기질(tissue derived DECM), 세포-탈세포화 세포외기질 자가조립(cell-DECM self assembly), 조직 가닥 잉크(tissue strand ink), 줄기세포(stem cell)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2022-0038705 A (폴바이오니카 에스피. 제트 오.오.) 2022.03.29 요약; 단락 [0002], [0007], [0076]-[0082], [0143], [0202] 참조.	1-16
A	KR 10-2021-0037242 A (아주대학교산학협력단) 2021.04.06 전체 문헌 참조.	1-16
A	YU, YIN 등, "Three-dimensional bioprinting using self-assembling scalable scaffold-free “tissue strands” as a new bioink", Scientific Reports, 2016, 6권, article no. 28714, 페이지 1-11 전체 문헌 참조.	1-16
A	JAKAB, KAROLY 등, "Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells", Biofabrication, 2010, 2권, article no. 022001, 페이지 1-14 전체 문헌 참조.	1-16
A	SEVILLA, CARLOS A. 등, "Extracellular matrix fibronectin stimulates the self-assembly of microtissues on native collagen gels", Tissue Engineering: Part A, 2010, 16권, 12호, 페이지 3805-3819 전체 문헌 참조.	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년08월07일(07.08.2023)	**2023년08월07일(07.08.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/005678

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0038705 A	2022/03/29	BR 112022001029 A2	2022/03/15
		CA 3146781 A1	2021/01/28
		CL 2022000153 A1	2022/10/14
		CN 114340687 A	2022/04/12
		CU 20220004 A7	2022/09/08
		EP 3769796 A1	2021/01/27
		JP 2022-541636 A	2022/09/26
		PE 20220701 A1	2022/05/04
		US 2022-0280694 A1	2022/09/08
		WO 2021-014359 A1	2021/01/28
		ZA 202202184 B	2022/09/28
KR 10-2021-0037242 A	2021/04/06	KR 10-2272781 B1	2021/07/05
		US 2022-0340867 A1	2022/10/27
		WO 2021-060776 A1	2021/04/01