



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0096780
(43) 공개일자 2020년08월13일

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/60 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61L 27/60 (2013.01)
A61F 2/105 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7017604</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년12월07일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년06월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2018/064471</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/113442
국제공개일자 2019년06월13일</p> <p>(30) 우선권주장
62/595,818 2017년12월07일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
웨이크 포리스트 유니버시티 헬스 사이언시즈
미국 27157 노스캐롤라이나 윈스턴-사렘 메디칼
센터 블러바드</p> <p>(72) 발명자
바키, 매튜
미국, 노스캐롤라이나 27106, 윈스턴-세일럼,
5442 로빈후드 빌리지 드라이브 아파트먼트 102
아타라, 앤소니
미국 노스캐롤라이나 27104, 윈스턴-세일럼, 노스
스트라퍼드 로드 345</p> <p>(74) 대리인
특허법인 피씨알</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

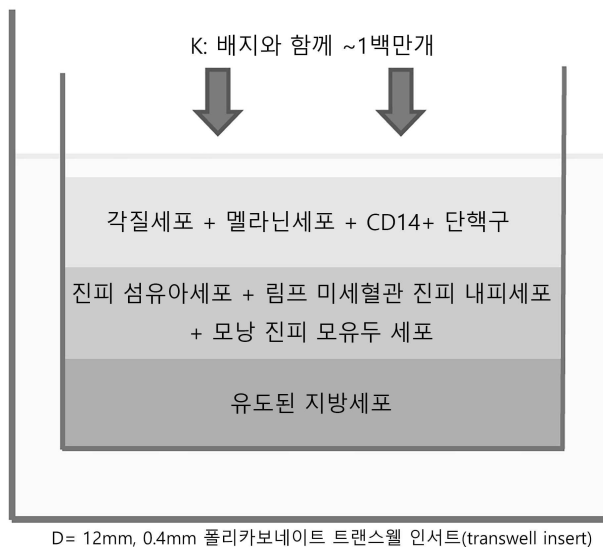
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 다층 피부 구조체 및 그의 제조 및 사용 방법

(57) 요약

피부 구조체(skin construct) 및 그의 제조 및 사용 방법, 예를 들면, 약물 후보물질 또는 화장품과 같은 조성물의 효능, 독성, 면역 반응, 침투, 염증 및/또는 대사 테스트를 포함한, 상처 치료 및 화합물 테스트를 위한 피부 구조체 및 그의 제조 및 사용 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/3804 (2013.01)

A61L 27/3891 (2013.01)

C12N 5/0625 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

A61L 2430/34 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인공 포유류 피부 구조체로서:

선택적으로, 제1 하이드로겔 담체 중 살아있는 포유류 지방세포(예를 들면, 유도 지방전구세포) 및 선택적으로 살아있는 내피세포(예를 들면, 진피 미세혈관 내피세포)를 포함하는 제1층("피하-유사(hypodermis-like)"층);

존재하는 경우, 상기 제1층 위에 있거나 또는 상기 제1층과 직접적으로 접촉하는 제2층("진피-유사(dermis-like)"층)으로서, 상기 제2층은 제2 하이드로겔 담체 중 조합된 살아있는 포유류 섬유아세포, 살아있는 포유류 모낭 모유두 세포, 및 선택적으로, 살아있는 포유류 내피세포(예를 들면, 진피 미세혈관 내피세포)를 포함하는 것인 제2층; 및

상기 제2층 위에 있거나 또는 상기 제2층과 직접적으로 접촉하는 제3층("표피-유사(epidermis-like)"층)으로서, 상기 제3층은 제3 하이드로겔 담체 중 조합된 살아있는 포유류 각질세포, 살아있는 포유류 멜라닌 세포, 및 살아있는 포유류 면역 세포(예를 들면, CD14+ 단핵구, 랑게르한스 세포, 진피 수지상 세포, 또는 이들 중 둘 이상의 조합)를 포함하는 것인 제3층을 포함하고,

상기 구조체는(예를 들면, 배양 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 후에) 가시적인 색소침착을 갖는 것인 구조체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제3층의 살아있는 포유류 면역 세포는 랑게르한스 세포 및 진피 수지상 세포를 포함하는 것인 구조체.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 피하-유사층, 상기 진피-유사층, 또는 상기 피하-유사층과 상기 진피-유사층은 살아있는 포유류 내피세포를 포함하는 것인 구조체.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 피하-유사층과 상기 진피-유사층은 살아있는 포유류 내피세포를 포함하는 것인 구조체.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구조체는 계층화된, 3층 구조체인 것인 구조체.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구조체는 인 비트로에서 모낭 구조 기관(사이토케라틴 14 양성 및 사이토케라틴 71 양성에 의해 표시될 수 있는, 내모근초 및 외모근초)을 갖고, 및/또는 프로미닌-1(PROMININ-1)에 대해 양성인 것인 구조체.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 하이드로겔 담체, 제2 하이드로겔 담체, 및/또는 제3 하이드로겔 담체는 가교 히알루론산(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 가교제에 의해 가교된 히알루론산)을 포함하고, 및/또는 상기 제1 하이드로겔 담체, 제2 하이드로겔 담체, 및/또는 제3 하이드로겔 담체는 선택적으로 콜라겐(예를 들면, 중량 기준 5, 8, 10, 또는 15%) 및/또는 젤라틴(예를 들면, 중량 기준 0.5, 1, 2, 3 또는 5%)을 더 포함하는 것인 구조체.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 제1층은, 존재하는 경우, 100, 200 또는 300 마이크로미터 내지 400, 600 또는 800 마이크로미터의 두께를 갖고;

(ii) 상기 제2층은 100, 200 또는 300 마이크로미터 내지 400, 600 또는 800 마이크로미터의 두께를 갖고;

(iii) 상기 제3층은 100, 200 또는 300 마이크로미터 내지 400, 600 또는 800 마이크로미터의 두께를 갖고; 및/또는

(iv) 상기 구조체는 상기 제1층이 없는 경우, 약 200, 400 또는 600 마이크로미터 내지 800, 1200 또는 1600 마이크로미터의 총 두께를 갖거나, 상기 제1층이 존재하는 경우, 300, 600 또는 900 마이크로미터 내지 1200, 1800 또는 2400 마이크로미터의 총 두께를 갖는 것인 구조체.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 존재하는 경우, 상기 제1층, 상기 제2층, 및 상기 제3층 각각은 0.5, 1 또는 10 평방 센티미터 내지 50, 200 또는 400 평방 센티미터의 중첩 표면적(overlying surface area)을 갖는 것인 구조체.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 지방세포 및 존재하는 경우, 상기 내피세포는 약 2:1, 1:1, 또는 1:2의 비율로 및/또는 입방 센티미터당 약 1백만개 또는 2백만개 내지 8백만개, 천만개, 또는 2천만개 세포의 총 밀도(combined density)로 상기 제 1 하이드로겔 담체에 포함되고; 및/또는

(ii) 상기 섬유아세포 및 상기 진피 모유두 세포는 약 8:1 또는 6:1 내지 2:1 또는 1:1의 비율로 상기 제2 하이드로겔 담체에 포함되고, 상기 내피 세포는 상기 제2 하이드로겔 담체에 상기 섬유아세포에 대해 약 2:1, 1:1, 또는 1:2의 비율로 존재하고, 및/또는 상기 세포는 입방 센티미터당 약 5백만개 또는 8백만개 내지 1천5백만개, 2천만개, 2천5백만개, 또는 3천만개 세포의 총 밀도로 존재하고; 및/또는

(iii) 상기 각질세포 및 상기 멜라닌세포는 상기 제3 하이드로겔 담체에 약 20:1 또는 10:1 내지 8:1, 5:1, 3:1 또는 2:1의 비율로 및/또는 입방 센티미터당 약 5백만개 또는 8백만개 내지 1천5백만개, 또는 2천만개, 2천5백만개, 3천만개, 또는 3천5백만개 세포의 총 밀도로 포함되고, 상기 면역세포는 상기 표피-유사층에 총 세포의 1% 또는 2% 내지 10 또는 15%의 양으로 포함되는 것인 구조체.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 살아있는 지방세포는 인간 지방세포이고, 상기 살아있는 섬유아세포는 인간 섬유아세포이며, 상기 살아있는 포유류 모낭 진피 모유두 세포는 인간 모낭 진피 모유두 세포이고, 상기 살아있는 포유류 각질세포는 인간 각질세포이며, 상기 살아있는 멜라닌세포는 인간 멜라닌세포이고, 상기 살아있는 포유류 내피세포는 인간 내피세포이며, 상기 포유류 면역세포는 인간 면역세포인 것인 구조체.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구조체는

(a) 선택적으로, 상기 지방세포와 상기 내피세포를 스페로이드(spheroid)로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크(hypodermal bioink)를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 기관에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계;

(b) 상기 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 상기 내피세포 및 상기 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 존재하는 경우, 상기 피하-유사층 상에, 또는 존재하지 않는 경우, 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및

(c) 상기 각질세포, 상기 멜라닌세포, 및 상기 면역세포를 상기 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 상기 진피-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하

여) 제3층(표피-유사층)을 형성하여 피부 구조체를 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것인 구조체.

청구항 13

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구조체는:

(a) 상기 각질세포, 상기 멜라닌세포, 및 상기 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계;

(b) 상기 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 상기 내피세포 및 상기 섬유아 세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 상기 표피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및

(c) 선택적으로, 상기 지방세포와 상기 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 상기 진피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하여, 피부 구조체를 형성하는 것인 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것인 구조체.

청구항 14

청구항 12 또는 청구항 13에 있어서, 상기 침착시키는 단계는 바이오프린팅(예를 들면, "잉크 제트(ink jet)" 타입 프린팅 및/또는 시린지 주사 타입 프린팅)에 의해 수행되는 것인 구조체.

청구항 15

필요로 하는 개체에서 상처를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량 및/또는 배열로 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 피부 구조체를 상기 상처에 국소로 적용하는 단계를 포함하고, 선택적으로, 상기 구조체의 세포는 자가 세포이거나 또는 동종 세포인 것인 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 피부 구조체는 상기 제3층 위에 있거나 또는 상기 제3층과 접촉하는 비활성 몰드층(inert mold layer)을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 비활성 몰드층은 안면 상처에 (예를 들면, 스캔 데이터에 근거하여) 맞춤형(custom fit) 크기인 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 안면 상처는 이마, 미간, 비근점, 코(예를 들면, 비교(nasal bridge), 비공점(rhinion), 하비첨소엽(infratip lobule), 비첨(supratip), 비주(columella), 비익(alar-sidewall), 비순구(nasolabial fold), 인중(philtrum), 입술, 턱(chin), 볼, 하악(jaw), 귀(예를 들면, 이륜(helix), 주상와(scapha), 대이륜 주름(antihelical fold), 대이륜, 대이주(antitragus), 이수(lobule), 이주(tragus), 이갑개(concha), 와(fossa)), 및/또는 눈 주위 피부(예를 들면, 안검)의 상처인 것인 방법.

청구항 19

청구항 15 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비활성 몰드층은 폴리우레탄을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

청구항 15 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비활성 몰드층은 다공성인 것인 방법.

청구항 21

포유류 개체의 피부에 적용되었을 때의 활성화에 대해 화합물 또는 조성물을 스크리닝하는 방법으로서:

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 피부 구조체를 상기 구조체의 구성 세포들을 살아있는 상태로 유지하는 조건에서 제공하는 단계;

상기 화합물 또는 조성물을 상기 구조체에 접촉시키는 단계; 및

상기 피부 구조체의 반응을 검출하는 단계를 포함하고, 상기 반응의 존재는 상기 화합물 또는 조성물이 포유류 개체의 피부에 적용시 잠재적으로 활성을 갖는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 반응은 면역 반응(예를 들면, 사이토카인 방출)을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

피부 구조체를 제조하는 방법으로서:

(a) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 기관에 침착시켜 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계;

(b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 존재하는 경우, 상기 피하-유사층 상에, 또는 존재하지 않는 경우, 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및

(c) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 상기 진피-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하여 피부 구조체를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

피부 구조체를 제조하는 방법으로서:

(a) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 기관에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계;

(b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 상기 표피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및

(c) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 상기 진피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하여, 피부 구조체를 제조하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서, 상기 침착시키는 단계는 바이오프린팅(예를 들면, "잉크 제트" 타입 프린팅 및/또는 시린지 주사 타입 프린팅)에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 26

청구항 23 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관은 비활성 기관인 것인 방법.

청구항 27

청구항 23 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관은 치료를 필요로 하는 개체(예를 들면, 인간 개체) 상의

상처이고, 선택적으로, 상기 세포는 자가 세포이거나 또는 동종 세포인 것인 방법.

청구항 28

청구항 23 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 인 비트로에서 상기 피부 구조체를 액침(submerged) 조건 하에 배양하는 단계; 그 후, 상기 표피-유사층이 공기에 노출된 상태로 공기-액체 인터페이스에서 상기 피부 구조체의 표피 계층화(epidermal stratification)를 촉진하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 살아있는, 인공의 피부 구조체 및 그를 제조하고, 사용하는 방법, 예를 들면, 상처 치료 및 화합물 테스트를 위해 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 피부 대체에 대한 "황금 기준(gold standard)"은 자가 피부 이식을 이용하는 것이다. 그러나, 공여-부위 조직 이용가능성, 그러한 조직의 복잡한 유지관리 및 비용 때문에 이러한 치료는 환자들에게 종종 제한적이다. 또한, 현재 조직공학 피부 또는 피부 대체재(engineered skins or skin substitute)의 대부분은 다양한 피부 세포 유형과 삼층 구조 및 진피 부속기(dermal appendage)와 같은 구조가 없으므로 천연 피부(native skin)를 완전하게 재현(recapitulate)하지 않는다. 현재 상업적으로 이용 가능한 피부 세포 모델도 간단하게 피부 종양 으로부터 유래된 불멸화된 세포주나 하나 또는 두 개의 일차 세포 유형 (예를 들어, 각질세포 및/또는 진피 섬유아세포)만을 이용하기 때문에 제한적이다; 그러므로 그들은 생체 내(in vivo) 피부의 복잡성을 제대로 대표하거나 모사하지 못한다.

[0003] E. Bellas et al., *In vitro* 3D full thickness skin equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials, *Macromol. Biosci* 12, 1627-1636 (2012)은 삼층의 피부-유사 산물(tri-layer skin-like product)을 제조하기 위하여 지방 유래 줄기세포, 각질세포, 및 섬유아세포를 이용하나, 세포를 접종할 실크 스캐폴드(scaffold)의 사용을 필요로 한다.

[0004] A. Skardal et al., Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds, *Stem Cells Translational Medicine* 1, 792-802 (2012)는 넓은 상처에 직접 적용될 수 있는 피부-대체재(skin-substitute)의 바이오프린팅(bioprinting)을 기술하나, 양수 줄기세포(amniotic fluid stem cells) 및 골수-유래 중간엽 줄기세포(bone-marrow-derived mesenchymal stem cells)만 이용한다.

[0005] A. Monfort et al., Production of a human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7, 479-490 (2013)은 피부-유사 삼층 산물(skin-like trilayer product)을 기술하나, 지방생성 세포(adipogenic cell), 섬유아세포, 및 각질세포만을 이용했고, 완료까지 35일이 소요되는 순차적 배양기법을 이용했다. Id. at 480-81.

[0006] V. Lee et al., Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting, *Tissue Engineering* 20, 473-484 (2014)는 3D 바이오프린팅으로 제조된 피부-유사 산물을 설명하나, 별개의 콜라겐 층 사이에 인쇄된 각질세포 및 섬유아세포만을 이용한다. 예를 들어, 도 2 참조.

[0007] Yoo, Xu and Atala et al., US 특허출원 공개 US 2009/0208466 (Aug. 2009)은 제3면, 단락 0037-0041에서 피부 대체재 산물(skin substitute product)을 시사하나, 예를 들면, 어떻게 모유두 세포가 그에 효과적으로 결합될 수 있는지에 대해서는 시사하거나 기재하지 않는다.

[0008] Atala 등에 의한 PCT 공개 WO 2016/115034(July 2016)는 모유두 세포를 포함한, 다수의 세포 종류 및 3개의 층을 갖는 피부 대체재 산물을 기재한다. 그러나, 피부 대체재 산물의 치료 및/또는 약물 테스트 목적을 위해 이용될 수 있는 산물로의 추가적인 개선에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 요약
- [0010] 본 명세서에, 인공 포유류 피부 구조체(artificial mammalian skin construct)로서,
- [0011] 선택적으로, 제1 하이드로겔 담체 중 살아있는 포유류 지방세포(예를 들면, 유도 지방전구세포(pre-adipocyte)) 및 선택적으로 살아있는 내피세포(예를 들면, 진피 미세혈관 내피세포)를 포함하는 제1층("피하-유사(hypodermis-like)"층);
- [0012] 존재하는 경우, 상기 제1층 위에 또는 상기 제1층과 직접적으로 접촉하는 제2층("진피-유사(dermis-like)"층)으로서, 상기 제2층은 제2 하이드로겔 담체 중 조합된 살아있는 포유류 섬유아세포, 살아있는 포유류 모낭 진피 모유두 세포, 및 선택적으로, 살아있는 포유류 내피세포(예를 들면, 진피 미세혈관 내피세포)를 포함하는 것인 제2층; 및
- [0013] 상기 제2층 위에 또는 상기 제2층과 직접적으로 접촉하는 제3층("표피-유사(epidermis-like)"층)으로서, 상기 제3층은 제3 하이드로겔 담체 중 조합된 살아있는 포유류 각질세포, 살아있는 포유류 멜라닌 세포, 및 살아있는 포유류 면역 세포(예를 들면, CD14+ 단핵구, 랑게르한스 세포, 진피 수지상 세포, 또는 이들 중 둘 이상의 조합)를 포함하는 것인 제3층을 포함하는 인공 포유류 피부 구조체가 제공된다.
- [0014] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 (예를 들면, 배양 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 후에) 가시적인 색소침착(visible pigmentation)을 갖는다.
- [0015] 일부 구체예에서, 상기 제3층의 살아있는 포유류 면역 세포는 (예를 들면, 배양 5일 내지 최대 배양 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 후에) 랑게르한스 세포 및 진피 수지상 세포를 포함한다.
- [0016] 일부 구체예에서, 상기 피하-유사층, 상기 진피-유사층, 또는 상기 피하-유사층과 상기 진피-유사층은 살아있는 포유류 내피세포를 포함한다.
- [0017] 일부 구체예에서, 상기 피하-유사층과 상기 진피-유사층은 살아있는 포유류 내피세포를 포함한다.
- [0018] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 계층화된, 3층 구조체(stratified, tri-layered construct)이다.
- [0019] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 인 비트로에서 모낭 구조 기관(hair follicle structure organization)(사이토케라틴(cytokeratin) 14 양성 및 사이토케라틴 71 양성)에 의해 표시될 수 있는, 내모근초 및 외모근초)을 갖고, 및/또는 프로미닌-1(PROMININ-1)에 대해 양성이다(예를 들면, 배양 5일 내지 최대 배양 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 후).
- [0020] 일부 구체예에서, 상기 구조체는
- [0021] (a) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드(spheroid)로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제1 하이드로겔 담체에 결합(incorporate)시켜 피하 바이오잉크(hypodermal bioink)를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 기관에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계;
- [0022] (b) 상기 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 상기 내피세포와 상기 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를, 존재하는 경우, 상기 피하-유사층 상에, 또는 존재하지 않는 경우, 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및
- [0023] (c) 상기 각질세포, 상기 멜라닌세포, 및 상기 면역세포를 상기 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 상기 진피-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하여 피부 구조체를 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0024] 일부 구체예에서, 상기 구조체는:
- [0025] (a) 상기 각질세포, 상기 멜라닌세포, 및 상기 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계;
- [0026] (b) 상기 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 상기 내피세포와 상기 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 상기 표피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여)

제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및

- [0027] (c) 선택적으로, 상기 지방세포와 상기 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 상기 진피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하여, 피부 구조체를 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0028] 일부 구체예에서, 상기 침착시키는 단계는 바이오프린팅(예를 들면, "잉크 제트(ink jet)" 타입 프린팅 및/또는 시린지 주사 타입 프린팅)에 의해 수행된다.
- [0029] 또한, 필요로 하는 개체에서 상처를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량 및/또는 배열로(treatment-effective amount and/or configuration) 본 명세서에 교시된 피부 구조체를 상기 상처에 국소로 적용하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 구조체의 세포는 상기 개체에 대해 자가 세포이거나 또는 동종 세포이다.
- [0030] 일부 구체예에서, 상기 피부 구조체는 상기 제3층 위에 있거나 또는 그와 접촉하는 비활성 몰드층(inert mold layer)을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 비활성 몰드층은 안면 상처에 (예를 들면, 스캔 데이터에 근거하여) 맞춤형하기 위한(custom fit) 크기이다.
- [0031] 또한, 포유류 개체의 피부에 적용되었을 때의 활성화에 대해 화합물 또는 조성물을 스크리닝하는 방법으로서: 본 명세서에 교시된 피부 구조체를 상기 구조체의 구성 세포들을 살아있는 상태로 유지하는 조건에서 제공하는 단계; 상기 화합물 또는 조성물을 상기 구조체에 접촉시키는 단계; 및 상기 피부 구조체의 반응을 검출하는 단계를 포함하고, 그러한 반응의 존재는 상기 화합물 또는 조성물이 포유류 개체의 피부에 적용시 잠재적으로 활성을 갖는 것을 나타내는 것인 방법이 제공된다.
- [0032] 또한, 피부 구조체를 제조하는 방법으로서:
- [0033] (a) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 기관에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅에 의해) 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계;
- [0034] (b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를, 존재하는 경우, 상기 피하-유사층 상에, 또는 존재하지 않는 경우, 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및
- [0035] (c) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 상기 진피-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하여 피부 구조체를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다.
- [0036] 또한, 피부 구조체를 제조하는 방법으로서:
- [0037] (a) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계;
- [0038] (b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 상기 표피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및
- [0039] (c) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 상기 진피-유사층에 침착시켜 제1층(피하-유사층)을 형성하여, 피부 구조체를 제조하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다.
- [0040] 일부 구체예에서, 상기 침착시키는 단계는 바이오프린팅(예를 들면, "잉크 제트" 타입 프린팅 및/또는 시린지 주사 타입 프린팅)에 의해 수행된다.
- [0041] 일부 구체예에서, 상기 기관은 비활성 기관이다.

[0042] 일부 구체예에서, 상기 기관은 치료를 필요로 하는 개체(예를 들면, 인간 개체) 상의 상처이고, 선택적으로, 상기 구조체의 세포는 자가 세포이거나 또는 동종 세포이다. 또한, 치료를 필요로 하는 개체(예를 들면, 인간 개체)에서 상처를 치료하는 방법에서 본 명세서에 교시된 피부 구조체의 용도로서, 선택적으로 세포는 자가 세포 또는 동종 세포인 것인 용도가 제공된다.

[0043] 일부 구체예에서, 상기 방법은 인 비트로에서 상기 피부 구조체를 액침(submerged) 조건 하에 배양하는 단계; 그 후, 상기 표피-유사층이 공기에 노출된 상태로, 공기-액체 인터페이스에서 상기 피부 구조체의 표피 계층화(epidermal stratification)를 촉진하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 더 포함한다.

[0044] 본 발명은 본 명세서의 도면 및 하기에 기재된 설명에서 보다 상세하게 설명된다.

과제의 해결 수단

[0045] 상세한 설명

[0046] 본 발명은 본 명세서에 첨부된 도면 및 하기에 기재된 발명의 설명에서 보다 상세하게 설명된다. 본 명세서에 인용된 모든 미국 특허문헌의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조에 의해 포함된다.

[0047] 이하, 본 발명의 구체예가 도시된 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 보다 완전하게 기재된다. 그러나 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구체화될 수 있으며, 본 명세서에 기재된 구체예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다: 오히려 이들 구체예는 본 개시가 철저하고 완전하며 당업자에게 본 발명의 범위를 충분히 전달할 수 있도록 제공된다.

[0048] 본 명세서에 사용된 용어는 특정 구체예만을 설명하기 위한 것이며, 발명을 한정하는 것으로 의도되지 아니한다. 본 명세서에서 사용된 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥상 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수 형태를 포함하도록 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 명시된 특징, 정수, 단계, 동작, 구성요소, 성분 및/또는 그의 그룹 또는 조합의 존재를 특정하나, 하나 또는 그 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 동작, 구성요소, 성분 및/또는 그의 그룹 또는 조합의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0049] 본 명세서에 사용된 용어 "및/또는(and/or)"은 연관된 열거 항목의 임의의 모든 가능한 조합 또는 하나 또는 그 이상 및, 선택적으로("or") 해석되는 경우, 조합의 부재를 포함한다.

[0050] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 용어(기술 및 과학 용어 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 또한, 용어, 예를 들면 일반적으로 사용되는 사전에서 정의된 용어는 명세서 및 청구범위와 관련하여 사전과 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 명세서에서 명시적으로 그렇게 정의되지 않는 한, 이상화되거나 지나치게 형식적인 의미로 해석되어서는 안 된다. 잘 알려진 기능 또는 구조(construction)는 명세서의 간결 및/또는 명료함을 위하여 상세히 기술되지 않을 수 있다.

[0051] 한 구성요소가 다른 구성요소의 "위에(on)", "부착된(attached to)", "연결된(connected to)", "결합된(coupled with)", "접촉된(contacting)" 것으로 언급될 때, 그 다른 구성요소의 바로 위에 있거나, 직접적으로 부착되거나, 연결되거나, 결합되거나, 및/또는 접촉되거나, 또는 개재 요소(intervening element)가 또한 존재할 수 있다. 반면에, 예를 들어, 한 구성요소가 다른 구성요소의 "직접적으로 위에(directly on)", 그에 "직접적으로 부착된(directly attached to)", 그와 "직접적으로 연결된(directly connected to)", 그와 "직접적으로 결합된(directly coupled with)", 또는 그와 "직접적으로 접촉된(directly contacting)" 것으로 언급될 때, 다른 개재 요소는 존재하지 않는다. 또한 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자라면 다른 특징에 "인접(adjacent)하여" 배치되어 있는 구조 또는 특징에 대한 언급은 인접한 특징과 중첩되거나 또는 그의 하부에 있는 부분을 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0052] 본 명세서에서 제1, 제2, 등의 용어가 다양한 요소(element), 성분(component), 영역(region), 층 및/또는 섹션(section)을 설명하기 위해 사용될 수 있으나, 이러한 요소, 성분, 영역, 층 및/또는 섹션은 이러한 용어에 의해 한정되지 않는 것으로 이해될 것이다. 오히려, 이러한 용어는 단지 하나의 요소, 성분, 영역, 층 및/또는 섹션을 다른 요소, 성분, 영역, 층 및/또는 섹션과 구별하기 위해서 사용된다.

[0053] 본 명세서에 사용된 용어 "포유류(mammalian)"는 인간 개체(및 세포 출처)와 비-인간 개체(및 세포 출처 또는 종류), 예를 들어 개, 고양이, 마우스, 원숭이, 등(예들 들어, 수의학 또는 연구 목적용)을 포함한다.

[0054] 본 명세서에 사용된 용어 “하이드로겔(hydrogel)”은 임의의 적절한 하이드로겔일 수 있다. 일반적으로, 하이드로겔은 물을 포함하고, 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide), 폴록사민(poloxamine), 셀룰로스(cellulose), 하이드록시알킬레이트 셀룰로스(hydroxyalkylated cellulose), 폴리펩티드(polypeptide), 폴리사카라이드(polysaccharide), 탄수화물(carbohydrate), 단백질(protein), 이들의 공중합체(copolymers) 또는 이들의 조합을 더 포함하거나 그로부터 유래되고, 및 보다 구체적으로는, 그로부터 유래되고, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(에틸렌 옥사이드)-코-폴리프로필렌 옥사이드 블록 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 메틸하이드록시프로필 셀룰로스, 폴리수크로스, 히알루론산, 텍스트란, 헤파란 황산(heparan sulfate), 콘드로이틴 황산(chondroitin sulfate), 헤파린, 알기네이트(alginate), 젤라틴, 콜라겐, 알부민, 난백알부민, 그의 공중합체, 및 조합을 포함하거나, 또는 그로부터 유래되고, 이들 모두는 바람직하게는 공지된 기법 또는 당업자에게 자명한 그의 변형에 의하여 다양한 정도로 가교된다. 예를 들어, 미국 특허 제8,815,277호; 제8,808,730호; 제8,754,564호; 제8,691,279호 참조. 일부 구체예에서, 가교된 히알루론산 하이드로겔(선택적으로 젤라틴 및/또는 콜라겐과 같은 추가적인 폴리머를 포함)이 바람직하다.

[0055] **1. 피부 구조체 및 그의 제조 방법.**

[0056] 일부 구체예에서, 본 발명의 피부 구조체는 하기 단계에 의하여 제조될 수 있다:

[0057] (a) 선택적으로, 기관(예를 들어, 다공성 폴리머 메쉬(porous polymer mesh), 콜라겐 등과 같은 비활성 기관; 또는 치료가 필요한 개체의 상처) 위에 제1 하이드로겔 담체 중 살아있는 포유류 지방세포(예를 들어, 유도된 지방전구 세포) 및 선택적으로, 살아있는 포유류 내피 세포를 포함하는 제1층(“피하-유사” 층)을 침착(deposit)시키는 단계;

[0058] (b) 상기 제1층이 존재하는 경우, 제1층 위에 (또는 상기 제1층이 부재하는 경우, 상기 기관 위에) 제2층(“진피-유사” 층)을 침착시키는 단계로서, 상기 제2층은 제2 하이드로겔 담체 중 살아있는 포유류 섬유아세포 및 살아있는 포유류 모낭 진피 모유두 세포 및 선택적으로, 살아 있는 포유류 내피 세포를 포함하는 것인 단계; 및

[0059] (c) 상기 제2층 위에 제3층(“표피-유사” 층)을 침착시키는 단계로서, 상기 제3층은 제3 하이드로겔 담체 중 살아있는 포유류 각질세포, 살아있는 포유류 멜라닌세포 및 살아있는 포유류 면역 세포(예를 들면, CD14+ 단핵구)를 포함하는 것인 단계.

[0060] 상기 제1 하이드로겔 담체, 제2 하이드로겔 담체 및/또는 제3 하이드로겔 담체는 동일할 수 있거나, 또는 상이할 수 있다.

[0061] 이 단계들은 반대 순서로 진행될 수 있고, 즉, 표피-유사층을 침착시키고, 그 후, 진피-유사층, 및 선택적으로 피하-유사층을 침착시킬 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 사용된, “면역 세포(immune cell)”는 CD14+ 단핵구, 랑게르한스 세포(Langerhans cell), 진피 수지상 세포(dermal dendritic cell), 또는 이들 중 둘 이상의 조합을 포함하나, 그에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 예를 들면, 인 비트로에서 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 또는 그 이상의 배양 후, 형성된 구조체 중 랑게르한스 세포 및 진피 수지상 세포를 모두 포함한다.

[0063] 일부 구체예에서, 상기 피하-유사층, 상기 진피-유사층, 또는 상기 피하-유사층과 상기 진피-유사층은 살아있는 포유류 내피세포를 포함한다.

[0064] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 (예를 들면, 배양에서 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 후) 가시적인 색소침착을 갖고, 즉, 인간 나안/육안으로 볼 수 있는 색소침착을 갖는다(도 2 참조).

[0065] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 계층화된 3층 구조체이다.

[0066] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 인 비트로에서 모낭 구조 기관(사이토케라틴 14 양성 및 사이토케라틴 71 양성)에 의해 표시될 수 있는, 내모근초 및 외모근초)을 갖고, 및/또는 프로미닌-1(PROMININ-1)에 대해 양성(멜라닌 세포/색소침착을 나타냄)이다.

[0067] 일부 구체예에서, 상기 구조체 내에 내포될 하나 이상의 종류의 세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 지방세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 내피세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 지방세포가 내피세포와 공-배양된 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 모낭 진피 모유두 세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는

배양된다. 일부 구체예에서, 섬유아세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 섬유아세포가 내피세포와 공-배양된 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 각질세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 멜라닌세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 면역세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 종류의 세포가 스페로이드로서 제공되고 및/또는 배양된다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 각질세포, 멜라닌세포, 및/또는 면역세포가 스페로이드로서 제공되지 않고 및/또는 배양되지 않는다.

- [0068] 본 명세서에서 사용된, "스페로이드(spheroid)"는 (2차원 또는 단일층 배양물과 대조적으로) 3차원 또는 다층 구조로 배열된, 통상적으로 담체 배지(carrier media) 중 살아있는 세포의 조성물을 의미한다. 스페로이드 배양은 예를 들면, 적합한 세포 배양용기(cultureware)를 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들면, Bennett 등에 의한 US 2014/0322806 참조.
- [0069] 일부 구체예에서, 스페로이드는 직경이 약 100 μm , 200 μm , 또는 350 μm 내지 약 500 μm , 750 μm 또는 1,000 μm , 예를 들면, 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1000 μm 이다. 스페로이드는 총 약 1,500개, 2,000개, 5,000개, 10,000개, 25,000개, 또는 50,000개 내지 총 약 100,000개, 500,000개, 1백만개, 2백만개, 또는 5백만개의 세포를 포함할 수 있다.
- [0070] 스페로이드의 적절한 담체 배지는 본 발명의 조성물(예를 들면, 하이드로겔, 예를 들면, 본 발명의 가교-하이드로겔)을 포함한다.
- [0071] 보다 구체적으로, 일부 구체예에서, 피부 구조체는:
- [0072] (a) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 기관에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계;
- [0073] (b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포 및 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를, 존재하는 경우, 상기 피하-유사층 상에, 또는 존재하지 않는 경우, 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및
- [0074] (c) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜, 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 상기 진피-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계에 의해 제조될 수 있다.
- [0075] 대안적으로, 일부 구체예에서, 상기 피부 구조체는:
- [0076] (a) 각질세포, 멜라닌세포, 및 면역세포를 제3 하이드로겔 담체에 결합시켜 표피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 표피 바이오잉크를 기관 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제3층(표피-유사층)을 형성하는 단계;
- [0077] (b) 모낭 진피 모유두 세포를 스페로이드로서 배양하는 단계; 독립적으로, 내피세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 제2 하이드로겔 담체에 결합시켜 진피 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 진피 바이오잉크를 상기 피하-유사층 상에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제2층(진피-유사층)을 형성하는 단계; 및
- [0078] (c) 선택적으로, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하는 단계; 상기 스페로이드를 상기 제1 하이드로겔 담체에 결합시켜 피하 바이오잉크를 형성하는 단계; 및 상기 피하 바이오잉크를 상기 진피-유사층에 침착시켜(예를 들면, 바이오프린팅하여) 제1층(피하-유사층)을 형성하는 단계에 의해 제조된다.
- [0079] 일부 구체예에서, 상기 제1 하이드로겔 담체는, 침착되는 경우, 예비-중합된(prepolymerized) 형태 또는 부분적으로 중합된(partially polymerized) 형태로 침착되고, 상기 제2 하이드로겔 담체는 예비-중합된 형태 또는 부분적으로 중합된 형태로 침착되며, 및/또는 상기 제3 하이드로겔 담체는 예비-중합된 형태 또는 부분적으로 중합된 형태로 침착된다.
- [0080] 일부 구체예에서, 상기 침착시키는 단계 (a) 및 (b)는 상기 제1층이 존재하는 경우, 상기 제1층 중 상기 제1 하이드로겔과 상기 제2층 중 상기 제2 하이드로겔이 적어도 부분적으로 서로 가교(crosslink)되는 조건에서 수행되고, 및 상기 침착시키는 단계 (b) 및 (c)는 상기 제2층 중 상기 제2 하이드로겔과 상기 제3층 중 상기 제3 하

이드로겔이 적어도 부분적으로 서로 가교되는 조건에서 수행된다. 상기 층들은 직접, 또는 개재 가교층(intervening cross-linkable layer)을 통하여 가교될 수 있다.

- [0081] 일부 구체예에서, 상기 제1 하이드로겔 담체, 제2 하이드로겔 담체, 및/또는 제3 하이드로겔 담체는 가교된 히알루론산을 포함하고, 및/또는 상기 제2 하이드로겔 담체 및/또는 제3 하이드로겔 담체는 선택적으로 그러나 바람직하게는 콜라겐을 추가로 포함한다.
- [0082] 일부 구체예에서, 상기 침착시키는 단계는 상기 제2층과 상기 제3층이 적어도 부분적으로 서로 가교되고, 및/또는 상기 제1층과 상기 제2층이 적어도 부분적으로 서로 가교되는 조건에서 -일반적으로 두 개의 층 사이에서 가교 반응이 일어날 수 있도록 시간상 충분히 근접하게 침착시키는 단계들을 수행하는 것에 의해- 수행된다.
- [0083] 일부 구체예에서, 부분적 또는 완전한 개재 층(intervening layer), 예를 들어 개재 하이드로겔 층이 상기 제1 하이드로겔 층과 상기 제2 하이드로겔 층, 및/또는 상기 제2 하이드로겔 층과 상기 제3 하이드로겔 층 사이에 개재되고, 상기 제1 하이드로겔 층과 상기 제2 하이드로겔 층 및/또는 제2 하이드로겔 층과 상기 제3 하이드로겔 층은 선택적으로 각각의 개재 하이드로겔 층과 가교된다. “부분적(partial)” 개재 층은 상기 층이 상기 제1층과 상기 제2층 및/또는 상기 제2층과 상기 제3층이 직접적으로 서로 접촉하는 개구부(opening)를 갖는다는 것을 의미한다. 또한, 하기에 기재된 것과 같은 추가적인 세포 종류가 선택적으로 그러한 개재 층으로 침착될 수 있다. 이러한 개재 층들의 하이드로겔은, 존재하는 경우, 상기 제1 하이드로겔 층, 상기 제2 하이드로겔 층 및/또는 상기 제3 하이드로겔 층과 동일한 물질로 형성될 수 있으며, 다른 층들과 마찬가지로 부분적으로 가교된 형태로 침착될 수 있다.
- [0084] 일부 구체예에서, (i) 상기 제1층은, 존재하는 경우, 100, 200 또는 300 μm 내지 400, 600 또는 800 μm 의 두께를 갖고; (ii) 상기 제2층은 100, 200 또는 300 μm 내지 400, 600 또는 800 μm 의 두께를 가지며; (iii) 상기 제3층은 100, 200 또는 300 μm 내지 400, 600 또는 800 μm 의 두께를 갖고; 및/또는 (iv) 상기 구조체는, 상기 제1층이 부재하는 경우, 약 200, 400 또는 600 μm 내지 800, 1200 또는 1600 μm 의 총 두께를 갖거나, 또는 상기 제1층이 존재하는 경우 300, 600 또는 900 μm 내지 1200, 1800 또는 2400 μm 의 총 두께를 갖는다.
- [0085] 일부 구체예에서, 존재하는 경우 상기 제1층, 상기 제2층 및 상기 제3층 각각은 0.5, 1 또는 10 평방 센티미터 내지 50, 200 또는 400 평방 센티미터의 중첩 표면적(overlying surface area)을 갖는다.
- [0086] 세포는 임의의 적절한 양으로 포함될 수 있다. 일부 구체예에서, (i) 상기 지방세포(및 존재하는 경우, 내피 세포)는 1백만개 또는 2백만개 내지 8백만개, 10백만개, 15백만개 또는 20백만개 (바람직하게는 4백만개 내지 6백만개 또는 10백만개 내지 20백만개) 세포/입방 센티미터의 양으로 상기 제1 하이드로겔 담체에 포함되고; 및/또는 (ii) 상기 섬유아세포 및 상기 모낭 진피 모유두 세포는 약 8:1 또는 6:1 내지 2:1 또는 1:1의 비율 (바람직하게는 5:1 내지 3:1의 비율), 및/또는 약 5백만개 또는 8백만개 내지 15백만개, 20백만개, 25백만개 또는 30백만개 (바람직하게는 약 10백만개, 또는 약 20백만개 내지 25백만개) 세포/입방 센티미터의 총 밀도(combined density)(존재하는 경우, 면적 세포 포함)로 상기 제2 하이드로겔 담체에 포함되며; 및/또는 (iii) 상기 각질세포 및 상기 멜라닌세포는 약 20:1 또는 10:1 내지 8:1, 5:1, 3:1 또는 2:1의 비율 (바람직하게는 12:1 내지 3:1의 비율), 및/또는 약 5백만개 또는 8백만개 내지 15백만개, 20백만개, 25백만개, 30백만개 또는 35백만개 (바람직하게는 약 10백만개 또는 약 20백만개 내지 30백만개) 세포/입방 센티미터의 총 밀도(존재하는 경우, 면적 세포 포함)로 상기 제3 하이드로겔 담체에 포함된다. 일부 구체예에서, 내피세포는 섬유아세포에 대해 약 2:1, 1:1 또는 1:2의 비율로 진피-유사층에 존재한다. 일부 구체예에서, 면적세포는 표피-유사층에 총 세포의 1% 또는 2% 내지 10 또는 15%의 양으로 포함된다.
- [0087] 세포는 확립된 배양물(established culture), 공여자, 또는 이들의 조합으로부터 획득할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 살아있는 포유류 지방세포는 인간 지방세포이고, 상기 살아있는 포유류 섬유아세포는 인간 섬유아세포이며, 상기 살아있는 포유류 모낭 진피 유두 세포는 인간 모낭 진피 유두 세포이고, 상기 살아있는 포유류 각질세포는 인간 각질세포이며, 상기 살아있는 포유류 내피세포는 인간 내피세포이고, 상기 살아있는 면적세포는 인간 면적세포이며, 및/또는 상기 살아있는 포유류 멜라닌세포는 인간 멜라닌세포이다.
- [0088] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 상기 제1층, 제2층 및/또는 제3층에 및/또는 그 사이에 신경세포 또는 그의 전구체를 (예를 들면, 입방 센티미터당 1백만개 또는 2백만개 내지 8백만개 또는 천만개(바람직하게는 4백만개 내지 6백만개) 세포의 총량으로) 더 포함할 수 있다. 그의 전구체를 포함한, 신경세포가 알려져 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,001,654호 및 제8,785,187호를 참조한다.
- [0089] 일부 구체예에서, 상기 구조체는 1 내지 5 mm, 또는 3 내지 7 mm, 또는 5 내지 10 mm, 또는 8 내지 16 mm, 또는

10 내지 20 mm, 또는 20 내지 50 mm, 또는 30 내지 80 mm, 또는 50 내지 100 mm의 직경 또는 폭을 갖는다.

[0090] 침착(depositing)은 분무, 스프레딩/페인팅(spreading/painting), 코팅 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 기술에 의하여 수행될 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 침착시키는 단계는 “잉크 젯(ink jet)” 타입 프린팅 및 시린지 주사(syringe injection) 타입 프린팅을 포함하는 임의의 적절한 기법에 따라 프린팅 또는 바이오프린팅에 의해 수행된다. 이러한 바이오 프린팅을 수행하는 장치는 알려져 있고, 예를 들어, Boland et al., 미국특허 제7,051,654호; Yoo et al., 미국 출원공개 제2009/0208466호; 및 Kang et al., 미국 출원공개 제2002/0089238호에 기재된다.

[0091] 비활성 기관 위에 침착된 경우, 전술된 구조체는 그로부터 제거되어 즉시 사용되거나, 또는 임의의 적절한 배양 배지 중에서 인 비트로(in vitro) 지지체(support) 위에 유지되고, 더 증식될 수 있다. 상기 구조체는 적절한 영양분 및/또는 배양 배지와 함께, 멸균 용기에 또는 바람직한 경우, 후속 사용을 위한 패키지에 (상기 지지체의 존재 또는 부재 하에, 또는 다른 지지체로 옮겨져) 포장될 수 있다.

[0092] 상기 지지체는 다공성(porous) 또는 비-다공성일 수 있다. 예를 들어, 상기 지지체는 구조체, 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 층의 구조체의 살아있는 세포로 확산되도록 배지 영양분이 투과할 수 있는 다공성 필터, 막 또는 메쉬(mesh)일 수 있다.

[0093] **2. 상처 치료에서 사용하는 방법**

[0094] 개체의 화상(burn), 절개(incision)(외과 절개 포함) 찰과상(abrasion), 열상(laceration) 등과 같은 상처가 본원에 기재된 것과 같은 피부 구조체를 치료 유효량 및/또는 치료 유효 배열(treatment-effective configuration)(예를 들어, 상처의 치유를 보조하기 위해 충분히 상처를 덮거나 또는 상처에 놓는 것)로 상처에 국소 적용함으로써 치료될 수 있다. 깊이 않은 화상과 상처의 속성에 따라, 제1 “피하-유사” 층은 요구되지 않을 수 있다. 적합한 개체는 인간 개체, 및 수의학적 목적(수의학 및 의약품 스크리닝 포함)을 위한 기타 동물(일반적으로 포유류) 개체(예를 들어, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 등)를 포함한다.

[0095] 일부 구체예에서, 상기 상처는 안면 상처, 예를 들면, 이마(forehead), 미간(glabella), 비근점(nasion), 코(예를 들면, 비교(nasal bridge), 비공점(rhinion), 하비첨소엽(infratip lobule), 비첨(supratip), 비주(columella), 비익(alar-sidewall), 비순구(nasolabial fold), 인중(philtrum), 입술, 턱(chin), 볼, 하악(jaw), 귀(예를 들면, 이륜(helix), 주상와(scapha), 대이륜 주름(antihelical fold), 대이륜, 대이주(antitragus), 이수(lobule), 이주(tragus), 이갑개(concha), 와(fossa)), 및/또는 눈 주위 피부(예를 들면, 안검)의 상처일 수 있다.

[0096] 일부 구체예에서, 피부 구조체는 상처 치료를 위하여 맞춤형 형태(personalized shape)를 제공하기 위해 비활성 기관으로 이루어진 맞춤형 몰드(customized mold)에서 제작(fabricate)될 수 있다. 상기 몰드는 CT 데이터와 같은 임상 이미지 데이터를 기초로 제조될 수 있으며, 선택적으로 상처 치유를 위해 원하는 형태 및 특징을 갖도록 변형될 수 있다. 비-한정적 예로서, 몰드는, 선택적으로 본 명세서에 교시된 바와 같이 프린터로부터 제공될 수 있는, 폴리머 물질(예를 들어, 폴리우레탄)로부터 형성될 수 있다. 일부 구체예에서, 상처는 외과 수술 또는 성형 수술과 같은 기타 의학적 시술(medical procedure)에 의한 결과일 수 있다.

[0097] 일부 구체예에서, 표피층(epidermis layer)은 비활성 기관 위에 침착되고, 진피층(dermis layer)은 표피층 위에 침착되며, 및 선택적으로, (상처의 속성 및 상처 치료에 대한 피하의 필요성에 따라) 피하층(hypodermis layer)이 진피층 위에 침착된다.

[0098] 일부 구체예에서, 비활성 기관층(inert substrate layer)을 포함하는 살아있는 피부 구조체는 안면 상처의 복잡한 윤곽(complex contour), 형태 및 구조(architecture)에 꼭 맞도록 성형된다.

[0099] 일부 구체예에서, 상기 구조체의 하나 이상의 세포 종류는 치료될 개체에 대하여 자가(autologous)이다. 일부 실시예에서, 상기 구조체의 하나 이상의 세포 종류는 치료될 개체에 대하여 동종이계(allogeneic)이다.

[0100] **3. 화합물 테스트에서 사용하는 방법**

[0101] 본 명세서에 기재된 피부 구조체는 화합물 또는 조성물 스크리닝(예를 들어, 효능, 독성, 투과, 염증(irritation), 면역 반응, 또는 기타 대사 또는 생리학적 활성의 스크리닝)에 있어 살아있는 동물 테스트(testing)의 대안으로 이용될 수 있다. 그러한 테스트는 본 명세서에 기재된 살아있는 피부 대체체 구조체의 구성 세포를 살아있는 상태를 유지하는 조건(예를 들어, 산소 처리(oxygenation)를 동반한 배양 배지 중에서) 하에 피부 대체체 구조체를 제공하는 단계; 테스트 대상 화합물 또는 조성물(예를 들어, 일반적으로 비히클

(vehicle) 또는 담체 중에 제공되는 약물 후보, 비누 또는 화장품 등과 같은 국소 조성물)을 상기 피부 대체제 구조체에 적용(예를 들어, 상기 제3층으로의 국소적 적용)하는 단계; 및 상기 피부 대체제 구조체(예를 들어, 화상, 세포 사멸, 히스타민 방출과 같은 마커의 분비, 사이토카인 분비, 유전자 발현의 변화 등)에 대한 생리학적 반응(예를 들어, 손상, 상처 조직 형성, 염증, 투과, 세포 분화 등)을 검출하는 단계에 의해 수행될 수 있고, 그러한 생리학적 반응의 존재는 상기 화합물 또는 조성물을 포유류 개체의 피부에 적용하는 경우 치료적 효능, 독성, 염증, 투과, 또는 다른 대사 또는 생리학적 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 피부 대체제 산물의 대조군 샘플은 대조군 화합물 또는 조성물(예를 들어, 생리 식염수, 화합물 비히클 또는 담체)이 적용될 수 있는 유사한 조건 하에서 유지될 수 있으며, 그 결과 비교 결과를 수득하거나, 또는 이력 데이터(historic data)와의 비교, 또는 시험 화합물 또는 조성물의 희석 수준을 적용하여 수득한 결과와의 비교에 기초하여 손상(damage)이 결정될 수 있다.

[0102] 일부 구체예에서, 상기 피부 구조체는 세포 배양 접시(예를 들어, 페트리 디쉬, 2-웰 플레이트, 6-웰 플레이트, 12-웰 플레이트, 24-웰 플레이트, 48-웰 플레이트, 96-웰 플레이트 등)에 배치되도록 구성된 삽입물(insert), 예를 들면, 세포 배양 삽입물(cell culture insert) 상에 형성되거나, 또는 제공된다. 세포 배양 삽입물은 예를 들어 미국특허 제5,652,142호, 제5,578,492호, 제5,468,638호, 제5,470,473호 등에 기재되어 있다.

[0103] 본 발명은 하기의 비-한정적인 실시예에서 보다 상세하게 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1은 바이오프린팅에 의한 피부 구조체의 형성의 개략도를 제공한다.

도 2는 본 개시에 따라 제조되고 가시적인 색소침착을 갖는 피부 구조체의 사진이다.

도 3은 4일차 및 15일차의 바이오프린팅된 피부 구조체의 층상 배열(layered configuration)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 실시예

[0106] 실시예 1: 7종의 세포를 포함하는 개선된 바이오프린팅된 피부

[0107] 표피, 진피, 및 피하를 포함하는 계층화된 3층 구조를 갖는 바이오프린팅된 전장 인간 피부 구조체(bioprinted full-thickness human skin construct)를 개발했다. 바이오프린팅된 피부 구조체는 모낭 부속기(hair follicle appendage), 미세혈관, 면역 세포, 및 색소 침착(pigmentation)을 포함했고, 구조적으로 천연 인간 피부와 유사하다.

[0108] 전장 인간 피부를 7종의 상이한 세포로 바이오프린팅했다: 각질세포, 멜라닌 세포, CD14+ 단핵구, 진피 섬유아 세포, 진피 미세혈관 내피 세포, 모낭 진피 모유두 세포, 및 지방세포. 세포는 4-암 폴리에틸렌 글리콜 가교제(4-arm poly ethylene glycol cross-linker)로 가교된 히알루론산(HA)과 젤라틴(각각 1%), 및 인간 콜라겐(10%)의 하이드로겔로 제공되었다(HyStem 하이드로겔 키트).

[0109] 요약하면, 피하를 먼저 프린팅한다; 프린팅 전 48시간에, 지방세포와 내피세포를 스페로이드로서 공배양하고 하이드로겔에 결합시킨다. 진피 프린팅을 위해, 프린팅 전 48시간에, 모낭 진피 모유두 세포 및 독립적으로, 내피 세포와 섬유아세포를 스페로이드로서 공-배양하고, 그 후, 섬유아세포, 내피-섬유아세포, 및 모낭 스페로이드를 포함하는 진피층을 프린팅한다. 최종적으로, 각질세포, 멜라닌세포, 및 CD14+ 단핵구를 포함하는 표피층을 진피 위에 프린팅한다. 그러나, 층 프린팅의 역 순서도 수행될 수 있다.

[0110] 프린팅된 구조체를 4일 동안 액침(submerged) 조건 하에 배양하고 그 후, 표피 계층화를 촉진하기 위해 공기-액체 인터페이스에서 배양한다. 인 비트로에서, 바이오프린팅된 피부 구조체는 표피, 진피, 및 피하를 갖는 계층화된 3층 구조를 보였다.

[0111] 3주차까지, 인 비트로에서 외모근초 및 내모근초를 갖는 모낭 조직화(hair follicle organization)가 관찰되었다. 배양 56일 후에, 피부 구조체는 그들의 구조적 구성을 유지했고, 개별적인 세포 종류들이 살아있고, 구조체 내에서 그들의 특정된 영역에 국소화되어 유지되었다.

[0112] 피부 구조체는 육안으로 볼 수 있는 색소침착을 가졌고(도 2 참조), 면역 세포, 내피 세포의 존재를 보였고, 모낭 구조 조직화를 가졌다. 구체적으로, 56일차에, 표피는 수지상 세포(DC-SIGN 양성) 및 랑게르한스 세포(랑게린(Langerin) 양성)에 대해 양성이었다. 모낭 구조 조직화는 사이토케라틴(cytokeratin) 14 양성(외모근초)

및 사이토케라틴 71 양성 (내모근초)에 의해 나타난 바와 같이, 내모근초 및 외모근초를 포함했다.

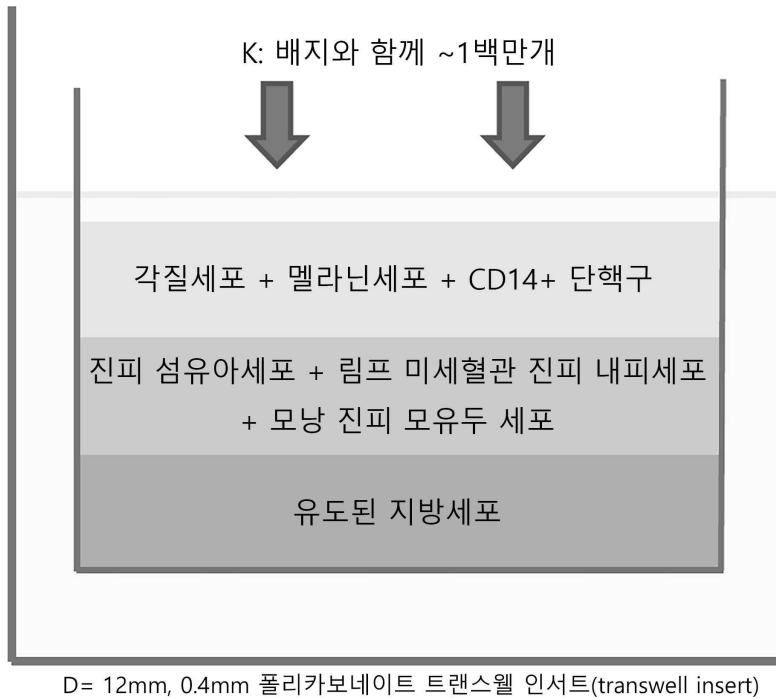
- [0113] 생리학적으로, 조직은 통상적으로 니치(niche)로 상호 간에 인접하여 사는 상이한 종류의 세포들로 이루어진다. 본 연구에서 사용된 세포의 스페로이드 배양은 상이한 종류의 세포들간 더 큰 상호작용을 촉진하여, 연장된 기간 동안 그들의 관찰된 개선된 유지에 기여할 수 있다. 세포들은 또한 모낭과 같은 특정한 구조로의 분화에 대한 더 큰 잠재력을 갖는 것으로 관찰된다.
- [0114] 이러한 바이오프린팅된 구조체에서, 생존력이 연장되고, 상이한 세포의 분화 상태가 8주에 걸쳐 강화되었다. 멜라닌 세포의 경우에, 배양의 8주차에 세포의 지숙된 생존력을 갖고, 또한 바이오프린팅된 구조체 상에서 멜라닌 색소 생성도 명확하게 관찰된다 (도 2). 배양에서 이러한 변형 전에, 색소침착은 배양의 1주차 후에 유의성있게 감소되는 것으로 관찰되었고, 장기간 동안 유지될 수 없었다.
- [0115] 8주 후에 면역세포도 관찰가능한 것으로 확인되고, 숫적으로 감소되는 것으로 보이지 않는다. 또한, 그들은 랭게르한스 세포 외에, 진피 수지상 세포로 분화되는 것으로 확인되었다. 선행 연구에서, 1주의 배양 후에 면역 세포는 숫적으로 감소하는 것으로 관찰되었다.
- [0116] 스페로이드 배양 기법은 또한 인 비트로에서 모낭 진피 모유두 세포의 연장된 생존력 및 그들의 내모근초 및 외모근초 구조로의 분화를 보였다. 또한, 진피 미세혈관 내피 세포가 생존가능한 것으로 관찰되고, 그들의 존재는 8주 배양 기간 동안 유지되었다. 이론에 의해 한정되기를 원치 않으나, 상이한 세포 종류의 스페로이드의 결합 후 바이오프린팅된 구조체에서 관찰된 이러한 유의성 있게 상이한 효과들은 이러한 세포들이 그들의 주변 미세 환경에서 노출된 분비된 인자들 때문일 수 있다.
- [0117] 결론적으로, 바이오프린팅된 피부 구조체를 인간 세포를 이용하여 바이오프린팅하고 인 비트로에서 천연 인간 피부와 유사하게, 면역 세포와 색소 침착을 갖는 표피, 모낭을 갖는 진피, 및 피하를 포함하는 계층화된 3층 구조로 성숙시켰다.
- [0118] 실시예 2: 바이오프린팅된 피부 구조체의 추가적인 규명(characterization)
- [0119] 염색은 구조체를 CD14+ 단핵구를 이용하여 바이오프린팅한 후 5일차에 랭게르한스(Langerin+) 세포 및 진피 수지상 세포(DC-SIGN)의 존재를 보여주었다. 5일차에 내모근초(KRT71), 외모근초(KRT14) 및 내피 세포(CD31)도 보였다.
- [0120] 21일차에, 구조체는 외모근초(KRT14) 및 내피세포(CD31)에 대해 양성으로 염색되었다. 이는 바이오프린팅된 피부 구조체가 면역-적격(immune-competent)이고, 내피 구조를 형성할 수 있으며, 모낭 조직화를 지지할 수 있다는 것을 보여준다. 또한, MEL5 염색은 구조체 전체에서 다수의 멜라닌세포의 존재를 보여주었다. 또한, 멜라닌 세포와 모낭-유사 구조의 동시-국재화(co-localization)가 있어서, 모낭-유사 구조에서 색소침착을 시사했다.
- [0121] 도 3은 4일차 및 15일차에 바이오프린팅된 피부 구조체의 층상 배열(layered configuration)을 보여준다. 염색은 4일차와 15일차에 구조체가 판 사이토케라틴(pan cytokeratin)에 대해 양성이라는 것을 나타냈다.
- [0122] 실시예 3: 화상 상처의 치료를 위한 7종의 세포를 포함하는 바이오프린팅된 피부
- [0123] 방법: 상이한 종류의 세포들을 상업적 판매처로부터 구입하고 적절한 세포 개수를 달성하기 위해 배양으로 확장시킨다. 특이적 성장 배지에서 확장된 각 종류의 세포를 트립신으로 처리하고 세포 현탁액으로 균질하게 분포시키고 층별(layer-by-layer) 3D 바이오프린팅을 위해 바이오잉크로 결합시킨다. 3D 바이오프린팅을 위해 사용되는 바이오잉크는 히알루론산(3 mg/mL), 젤라틴(35 mg/mL), 글리세롤(100 μ L/mL), 피브리노젠(30 mg/mL), 및 세포로 구성되고, 이는 3D 바이오프린팅 후 트롬빈(20 μ L/mL)을 이용하여 가교된다. 구조체의 3D 바이오프린팅은 이전에 기술된 바와 같이 수행된다. 피하 프린팅을 위해, 지방세포(30×10^6 개 세포/mL)를 바이오잉크 내로 결합시킨다. 진피 프린팅을 위해, 48시간 동안 현적 배양(hanging drop culture)로 미리 배양된, 모낭 스페로이드로서 섬유아세포(30×10^6 개 세포/mL), 내피세포(15×10^6 개 세포/mL) 및 모낭 진피 모유두 세포(15×10^6 개 세포/mL)를 바이오잉크 내로 결합시킨다. 표피 프린팅을 위해, 각질세포(40×10^6 개 세포/mL), 멜라닌세포(8×10^6 개 세포/mL), 및 면역세포(2×10^6 개 세포/mL)를 사용할 것이다. 구조체를 3 cm X 3 cm 크기로 프린팅한다. 프린팅 후, 상기 구조체를 4일 동안 액침 배양(submerged culture) 하에 숙성시키고, 그 후, 누드 마우스의 등에 있는 2.5 cm X 2.5 cm 절제 상처(excisional wound)에 이식한다. 그 후, 이 마우스들을 7주차를 제외하고, 매주 시점들에 8주까지 추적한다.

[0124] 예비 데이터는 바이오프린팅된 피부 구조체가 바이오프린팅된 겔 단독 및 상처는 있으나, 치료되지 않은 대조군 (wound but no treatment control)에 비해 보다 빠른 상처 봉합을 강화한다는 것을 나타낸다. 치유 속도는 대조군 대비 바이오프린팅된 그룹에서 훨씬 더 빨랐다. 바이오프린팅된 피부는 대조군 대비 상처 위에 더 두껍고 계층화된 표피의 형성을 촉진했다.

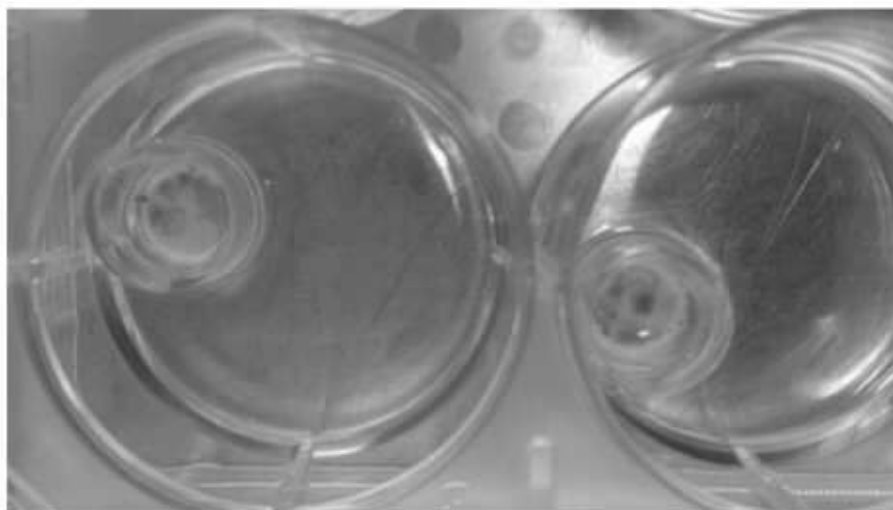
[0125] 전술한 내용은 본 발명의 예시이며, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명은 하기의 청구항에 의해 정의되고, 청구항의 균등물은 그에 포함된다.

도면

도면1



도면2



도면3

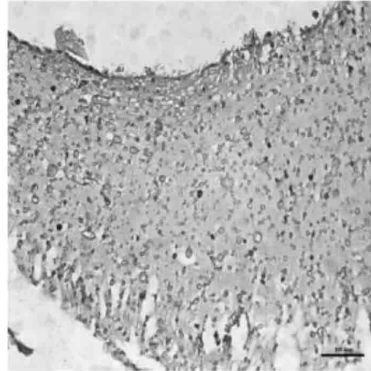
바이오프린팅된 피부 구조체

4일차

표피

진피

피하

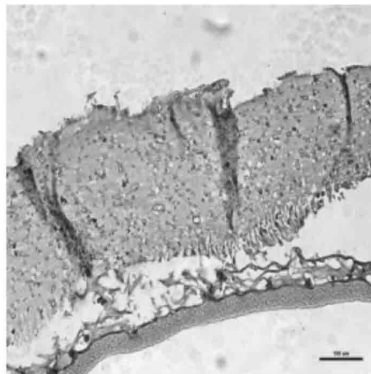


15일차

표피

진피

피하



200x