(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0127157
(43) 공개일자 2024년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/22 (2006.01) *A61F 2/00* (2021.01)
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
B33Y 70/00 (2020.01) *B33Y 80/00* (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/222 (2013.01)
A61F 2/0059 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0020204
(22) 출원일자 2023년02월15일
심사청구일자 2023년02월15일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강현욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
전승규
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지원

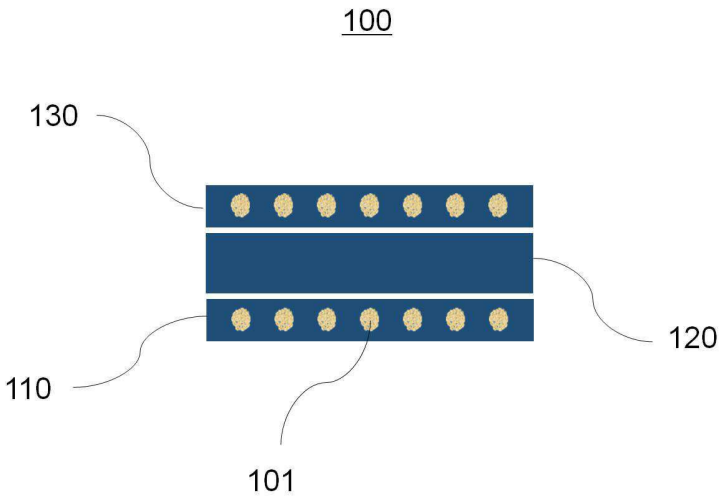
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **췌도 이식용 구조체 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이식 부위에 이식되어 혈관과의 물질 교환을 극대화하기 위하여 췌도를 혈관에 가까이 위치시킬 수 있는 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/3604 (2013.01)
A61L 27/3641 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
B33Y 70/00 (2023.05)
B33Y 80/00 (2013.01)

(72) 발명자
허준호
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

명노현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711169122
과제번호 2021R1A2C2012808
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 정밀 3차원 줄기세포-스페로이드 프린팅 기술을 이용한 고효율 이종 췌도 이식체 제작 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415180884
과제번호 20012378
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 산업기술알키미스트프로젝트사업
연구과제명 메타 소프트오간모듈 제작 기술 및 모듈 어셈블리 로봇 시스템 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 포항공과대학교산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크로 형성되는 제1 외층;

상기 제1 외층의 상부에 배치되며, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크로 형성되는 내층;

상기 내층의 상부에 배치되며, 상기 제2 바이오잉크로 형성되는 제2 외층;을 포함하는,

췌도 이식용 구조체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 췌도 이식용 구조체의 평균 두께는 2.0 내지 4.0 ㎜인,

췌도 이식용 구조체.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 제1 외층 및 제2 외층은, 상기 췌도가 2.5 내지 5.0 IEQ/㎕ 의 밀도로 포함되는 것을 특징으로 하는,

췌도 이식용 구조체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제1 외층 및 제2 외층의 두께는, 상기 제2 바이오잉크가 바이오 프린터를 통해 프린트되는 프린팅 속도에 따라 결정되며, 200 내지 400 ㎛인 것을 특징으로 하는,

췌도 이식용 구조체.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크는, 상기 젤라틴 및 알지네이트를 3:7 (v/v)로 포함하는 것을 특징으로 하는,

췌도 이식용 구조체.

청구항 6

(a) 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크와, 췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크를 준비하는 단계;

(b) 상기 제1 바이오잉크 및 상기 제2 바이오잉크를 이용하여 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅

하는 단계; 및

(c) 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 가교결합 시키는 단계;를 포함하는,

췌도 이식용 구조체 제조 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 (b)단계는,

상기 제2 바이오잉크를 압출하여 기판상에 제1 외층을 형성하는 단계;

상기 형성된 제1 외층 위에 상기 제1 바이오잉크를 압출하여 내층을 형성하는 단계; 및

상기 형성된 내층 위에 상기 제2 바이오잉크를 압출하여 제2 외층을 형성하고 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계;

를 포함하는,

췌도 이식용 구조체의 제조방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 (c)단계는,

상기 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화칼슘(CaCl2) 용액을 첨가하여 상기 알지네이트를 1차 가교시키는 단계; 및

상기 1차 가교된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화바륨(BaCl2) 용액을 첨가하여 상기 알지네이트를 2차 가교시키는 단계;

를 포함하는,

췌도 이식용 구조체의 제조방법.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 (c) 단계 이후에,

(d) 가교결합된 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 배양 배지에서 배양하는 단계;

를 더 포함하는,

췌도 이식용 구조체의 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 프린팅 속도는 190 내지 350 ㎜/min인 것을 특징으로 하는,

췌도 이식용 구조체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이식 부위에 이식되어 혈관과의 물질 교환을 극대화하기 위하여 췌도를 혈관에 가까이 위치시킬 수 있는 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨(diabetes mellitus)는 인슐린의 결핍으로 인하여 생기는 만성 대사질환으로, 크게 인슐린 의존성인 제1형 당뇨병과 인슐린 비의존성 당뇨병인 제2형 당뇨병으로 구분되며, 제1형 당뇨병(type 1 diabetes mellitus)은 일종의 자가 면역 질환으로 특정 유전자, 특히 조직적합성유전자(HLA)를 지닌 사람이 환경, 스트레스, 바이러스 등에 노출되어 췌도(pancreatic islet, Langerhans islet) 베타세포에 대한 면역반응이 일어나면서 췌도 세포가 파괴되어 인슐린 결핍이 나타난다.

[0004] 이러한 제1형 당뇨병의 치료를 위해 췌도를 간문맥에 이식하는 치료법이 각광받아왔으나, 면역 거부반응을 막지 못하여 임상 적용에는 실패하였고, 면역 억제제를 동반하는 치료 또한 암 유발 등과 같은 부작용으로 인해 유망한 해결 방법이 될 수 없다. 이와 같은 배경에서 췌도를 반투과성 생체재료에 캡슐화(encapsulation)한 후 이식하여 면역 거부반응을 물리적으로 막을 수 있는 방법이 새롭게 개발되었다.

[0005] 기존의 캡슐화 방식은 크기에 따라 마이크로(micro-) 캡슐화 방식과 매크로(macro-) 캡슐화 방식으로 분류된다. 마이크로 캡슐화는 단일 췌도를 하나의 비드(bead)에 담아 여러 비드들을 이식하는 방식으로, 마이크로 비드는 매크로 구조체에 비하여 구조와 안정성 측면에서 한계가 있다. 구체적으로는, 다량의 비드들은 이식 이후 생착(engraftment) 과정에서 하나로 뭉치게 되며, 뭉친 중앙부에 형성된 췌도들의 경우 저산소로 인해 사멸을 일으킨다. 또한, 일부 비드들은 이식 이후 체내에 무작위로 자리잡아 회수가 어려우며, 체내에서 예상치 못한 부작용이 발생했을 시 대응하기가 어렵다. 반면, 매크로 캡슐화 이식체는 다량의 췌도를 한 번에 이식 및 회수가 가능하며, 재료 구성이나 구조적 디자인을 변화시킴으로써 이식체 전반의 기능 보완이 가능하다.

[0006] 그러나, 기존의 매크로 췌도 이식체 또한 물질교환 효율을 낮추는 여러 한계들이 있다. 섬유(fiber) 형태로 제작된 사례의 경우, 이식 이후에 접히거나 꼬이게 되어 췌도가 체내 혈관과 밀접하지 못하게 되므로 사멸이 일어날 수 있다. 시트(sheet) 형태로 제작된 사례의 경우, 췌도들이 이식체 내에서 불규칙적으로 이동하여 밀집하게 되고, 산소 경쟁이 심해짐에 따라 사멸이 일어날 수 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 이식체 내 췌도의 밀도를 조절할 수 있으면서도, 이식 이후 혈관과 밀접할 수 있는 구조체의 디자인을 설계할 필요가 있다.

[0007] 한편, 췌도는 내분비조직으로서 혈액을 매개로 호르몬을 분비한다. 따라서 췌도는 췌장이 아니더라도 복막, 피하, 각막 등 혈관이 존재하는 다양한 부위에 이식되는 연구가 이루어졌으며, 그 중 피하의 경우 최소 침습적인 이식 부위로서 임상적으로 유망하지만, 혈관이 적어 췌도의 물질교환에 한계가 있다. 이에 따라 피하의 혈관과의 물질 교환을 극대화하기 위해 췌도를 혈관에 밀접하게 할 수 있는 이식체의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1798981호(2017.11.13).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 실시예는 이식 부위에 이식되어 혈관과의 물질 교환을 극대화하기 위하여 췌도를 혈관에 가까이 위치시킬 수 있는 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크로 형성되는 제1 외층; 제1 외층의 상부에 배치되며, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크로 형성되는 내층; 내층의 상부에 배치되며, 제2 바이오잉크로 형성되는 제2 외층;을 포함하는 췌도 이식용 구조체가 제공된다.

[0014] 또한, 췌도 이식용 구조체의 평균 두께는 2.0 내지 4.0 ㎜일 수 있다.

[0015] 또한, 제1 외층 및 제2 외층은 췌도가 2.5 내지 5.0 IEQ/㎕ 의 밀도로 포함될 수 있다.

[0016] 또한, 제1 외층 및 제2 외층의 두께는 제2 바이오잉크가 바이오 프린터를 통해 프린트되는 프린팅 속도에 따라 결정될 수 있으며, 200 내지 400 ㎛일 수 있다.

[0017] 또한, 제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크는, 젤라틴 및 알지네이트를 3:7 (v/v)로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명은 췌도 이식용 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, (a) 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크와, 췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크를 준비하는 단계; (b) 제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크를 이용하여 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계; 및 (c) 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 가교결합 시키는 단계;를 포함하는 췌도 이식용 구조체의 제조방법이 제공된다.

[0020] 또한, (b)단계는, 제2 바이오잉크를 압출하여 기판상에 제1 외층을 형성하는 단계; 형성된 제1 외층 위에 제1 바이오잉크를 압출하여 내층을 형성하는 단계; 및 형성된 내층 위에 제2 바이오잉크를 압출하여 제2 외층을 형성하고 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0021] 또한, (c)단계는, 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화칼슘(CaCl2) 용액을 첨가하여 알지네이트를 1차 가교시키는 단계; 및 1차 가교된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화바륨(BaCl2) 용액을 첨가하여 알지네이트를 2차 가교시키는 단계;를 포함할 수 있다.

[0022] 또한, (c) 단계 이후에, (d) 가교결합된 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 배양 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0023] 또한, 프린팅 속도는 190 내지 350 ㎜/min일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면 세포 생존율이 우수한 이식 구조체를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면 이식 이후, 혈당 조절 능력을 유지할 수 있는 효과가 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식 구조체는 이식 이후, 다시 회수할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 구조를 개략적으로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 제조 방법의 순서를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체 제조용 바이오잉크의 제조 공정을 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 제조 공정을 도시한 것이다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 형태 및 외층을 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 바이오잉크로의 면역글로불린 투과성 분석 결과를 도시한 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체의 프린팅 속도에 따른 쉘 패터닝 결과를 도시한 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 서로 다른 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 물성 분석 결과를 도시한 것이다.

도 9는 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체 내 췌도의 생존율 분석 결과를 도시한 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체 내 췌도의 밀도에 따른 생존율 및 기능성 검증 결과를 도시한 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체의 피하 이식 방법의 기능성 평가 결과를 도시한 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 섬유화 완화 약물을 공동 프린트한 췌도 이식용 구조체의 기능성 평가 결과를 도시한 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 회수 가능성 평가 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0031] 이하에서는, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체 및 그 제조 방법을 상세히 설명한다.

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 구조를 개략적으로 도시한 것이다.

[0034] 도 1을 참고하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체(100)는 제1 외층(110), 내층(120), 제2 외층(130)을 포함할 수 있다.

[0035] 일 실시예에서, 상기 제1 외층(110)은 췌도(101), 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크로 형성될 수 있다.

[0036] 일 실시예에서, 상기 내층(120)은 상기 제1 외층(110)의 상부에 배치되며, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크로 형성될 수 있다.

[0037] 일 실시예에서, 상기 제2 외층(130)은 상기 내층(120)의 상부에 배치되며, 상기 제2 바이오잉크로 형성될 수 있다.

[0038] 이때, 제1 바이오잉크는 별도의 세포를 포함하지 않는 기질로 구성된 것으로, 매트릭스(matrix) 바이오잉크, 기질 바이오잉크 또는 이와 동등한 기능을 갖는 다양한 용어로 지칭될 수 있다.

[0039] 또한, 제2 바이오잉크는 췌도(Langerhans islets, 랑게르한스섬)를 포함하는 것으로, 세포 바이오잉크 또는 이와 동등한 기능을 갖는 다양한 용어로 지칭될 수 있다. 이때, 췌도는 체내에서 인슐린을 분비하는 조직으로, 췌장(이자) 내부에 섬 모양으로 분포하는 미세조직 또는 이자의 내분비 세포의 군집을 의미한다.

[0040] 일 실시예에서, 상기 췌도는 면역력이 있는(immunocompetent) 래트(rats)로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 일 실시예에서, 상기 췌도의 직경(또는 지름)은 100 내지 300 ㎛ 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 일 실시예에서, 상기 췌도의 밀도는 2.5 내지 5.0 IEQ(Islet equivalents, 췌도 수)(IEQ: 췌도들의 지름이 다양하여 이를 150 ㎛로 표준화한 췌도 수의 단위) /㎕ 일 수 있고, 바람직하게는 1.5 내지 3.5 IEQ/㎕ 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 일 실시예에서, 상기 췌도 이식용 구조체(100)의 평균 두께는 2.0 내지 4.0 ㎜일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 일 실시예에서, 상기 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)은, 상기 췌도(101)를 2.5 내지 5.0 IEQ/μl 의 농도로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 일 실시예에서, 상기 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)의 두께는, 상기 제1 바이오잉크가 바이오 프린터를 통해 프린트되는 프린팅 속도에 따라 결정될 수 있고, 200 내지 400 μm일 수 있으며, 바람직하게는 300 μm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 제조 방법의 순서를 도시한 것이다.

[0048] 도 2를 참고하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체 제조방법은 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크와, 췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크를 준비하는 단계(S100), 상기 제1 바이오잉크 및 상기 제2 바이오잉크를 이용하여 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계(S200), 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 가교결합 시키는 단계(S300)를 포함할 수 있다.

[0049] 일 실시예에서, 상기 S200 단계는, 상기 제2 바이오잉크를 압출하여 기판상에 제1 외층(110)을 형성하는 단계, 상기 형성된 제1 외층(110) 위에 상기 제1 바이오잉크를 압출하여 내층(120)을 형성하는 단계, 상기 형성된 내층(120) 위에 상기 제2 바이오잉크를 압출하여 제2 외층(130)을 형성하고 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계를 포함할 수 있다.

[0050] 일 실시예에서, 상기 S300 단계는, 상기 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화칼슘(CaCl2) 용액을 첨가하여 상기 알지네이트를 1차 가교시키는 단계, 상기 1차 가교된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화바륨(BaCl2) 용액을 첨가하여 상기 알지네이트를 2차 가교시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0051] 일 실시예에서, 상기 S300 단계 이후에, 가교결합된 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 배양 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0053] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체를 제조하기 위한 바이오잉크의 제조 공정을 도시한 도면이다.

[0054] 도 3을 참고하면, 용액 준비 공정(301)에서, 젤라틴 파우더와 알지네이트 파우더를 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium, MEM)에 각각 따로 혼합하고, 혼합된 각 용액을 소정 온도 조건의 오븐에서 로테이터를 통해 소정 속도로 로테이션하며 소정 시간 동안 녹여 젤라틴 용액 및 알지네이트 용액을 준비할 수 있다. 이때, 소정 온도는 35℃ 내지 39℃ 일 수 있다. 또한, 소정 속도는 7 내지 10 rpm 일 수 있다. 또한, 소정 시간은 4 내지 16 시간일 수 있다.

[0055] 소독 공정(302)에서, 용액 준비 공정(301)에서 준비된 젤라틴 용액 및 알지네이트 용액을 필터를 통해 각각 필터링함으로써 소독할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 필터는 시린지 필터(syringe filter)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 혼합 공정(303)에서, 소독 공정(302)에서 필터링된 젤라틴 용액 및 알지네이트 용액을 소정의 부피비로 혼합할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 소정의 부피비는 3:7 (젤라틴 용액 : 알지네이트 용액)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 혼합 공정(303)을 통해 혼합된 젤라틴 용액 및 알지네이트 용액의 혼합 용액에서는 거품이 발생할 수 있다.

[0057] 거품 제거 공정(304)에서, 혼합 공정(303)에서 발생한 혼합 용액의 거품을 제거하기 위해 원심 분리기를 이용하여 상기 혼합 용액을 회전시켜 상기 혼합 용액의 상층부로 거품을 모아준 뒤, 모인 거품을 제거하여 제1 바이오잉크를 제조할 수 있다.

[0058] 일 실시예에서, 상기 거품 제거 공정(304) 이후 제조된 상기 제1 바이오잉크에 면역력이 있는(immunocompetent) 래트(rats)로부터 분리한 췌도(Langerhans islets, 랑게르한스섬)가 소정 밀도를 갖도록 혼합되는 세포 혼합 공정을 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 췌도의 밀도는 2.5 내지 5.0 IEQ/μl 일 수 있고, 바람직하게는 1.5 내지 3.5 IEQ/μl 일 수 있다.

[0059] 또한, 일 실시예에서, 상기 췌도의 직경(또는 지름)은 100 내지 300 μm 일 수 있다. 이때, 직경은 각각의 췌도로부터 측정될 수 있는 최대 길이를 의미한다. 상기 세포 혼합 공정을 통해 상기 제1 바이오잉크에 췌도가 소정

밀도로 포함되는 제2 바이오잉크를 제조할 수 있다.

[0061] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 제조 공정을 도시한 도면이다.

[0062] 도 4를 참고하면, 제1 외층 프린팅 공정(401)에서, 미리 준비된 기판(plate) 위에 압출 기반 바이오 프린터를 통해 제2 바이오잉크를 압출하여 제1 외층(110)을 형성할 수 있다.

[0063] 내층 프린팅 공정(402)에서, 상기 형성된 제1 외층(110)의 위에 제1 바이오잉크를 압출하여 내층(120)을 형성할 수 있다.

[0064] 제2 외층 프린팅 공정(403)에서, 상기 형성된 내층(120)의 위에 제2 바이오잉크를 압출하여 제2 외층(130)을 형성하고, 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 프린팅할 수 있다.

[0065] 일 실시예에서, 상기 제1 외층 프린팅 공정(401) 및 제2 외층 프린팅 공정(403)에서 제2 바이오잉크를 압출하는 바이오 프린터의 프린팅 속도(printing speed)는 190 내지 350 mm/min일 수 있고, 바람직하게는 270 mm/min일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 가교결합 공정(404)에서, 상기 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 염화칼슘(CaCl2) 용액을 첨가하여 제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크에 포함된 알지네이트와 선택적으로 가교결합을 형성할 수 있다.

[0067] 일 실시예에서, 상기 가교결합 공정(404)에서, 염화칼슘에 의한 가교결합 형성 이후, 염화바륨(BaCl2) 용액이 첨가되어 상기 알지네이트와 염화바륨에 의한 가교결합을 추가적으로 형성시킬 수 있다.

[0068] 일 실시예에서, 상기 가교결합 공정(404) 이후, 다층 구조의 시트 형태의 구조체에 남아있는 바륨을 제거하기 위한 수세 공정을 더 포함할 수 있다. 이때, 남아있는 바륨을 제거하기 위하여 HEPES buffer 용액이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 일 실시예에서, 상기 가교결합 공정(404) 또는 수세 공정 이후, 가교결합된 삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 배양 배지에서 배양하는 배양 공정을 더 포함할 수 있다. 이때, 배양 배지로서 RPMI 1640 배양 미디어가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 본 실시예는 본 발명의 이해를 위한 하나의 실시예일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1. 췌도 이식용 구조체 제조용 바이오잉크의 제조**

[0074] 바이오잉크는 프린팅능 부여를 위한 젤라틴(gelatin) (G6144, Sigma, Missouri, United States)과 면역 세포 침투를 막기 위한 알지네이트(alginate) (PRONOVA UP MVG, NovaMatrix, Sandvika Norway)를 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium, MEM) (15-015-cvr, corning, Somerville, MA, United States)에 혼합하여 제조하였다. 이 때, 혼합 과정에서 직접 파우더를 혼합할 경우 점성이 높아 이후 시린지 필터를 이용한 소독 과정이 어려우므로, 각 파우더를 따로 녹여서 섞는 방식으로 혼합하며, 혼합 과정에서 희석이 일어나기 때문에 최종 농도와 희석 비율을 바탕으로 젤라틴 파우더와 알지네이트 파우더의 질량을 계산한다.

[0075] 보다 구체적으로, 질량이 계산된 각각의 젤라틴 파우더와 알지네이트 파우더를 MEM이 들어 있는 코니칼 튜브(conical tube)에 각각 투입한 뒤 로테이터에 로딩하고, 7 내지 10 rpm으로 설정하고 37 É의 오븐에서 4 내지 16 시간(hr) 동안 녹인다.

[0076] 이후, 0.45 um 시린지 필터(syringe filter)를 이용해 젤라틴과 알지네이트를 각각 필터링하고, 필터링된 알지네이트 용액과 젤라틴 용액을 7:3의 부피비(v:v)로 섞어 바이오잉크를 제조한다. 이 때, 모세관 피펫팁(capillary piston)이 결합된 피펫(pipet)을 이용하여 강하게(vigorous) 섞어줌에 따라 버블이 발생하며, 발생하는 버블을 제거하기 위하여, 바이오잉크를 원심분리기에서(1000 rpm, 실온 조건) 1분 간 돌려 버블을 바이오잉크의 상층부로 모아준 뒤, 모인 버블을 제거하여 제1 바이오잉크를 제조한다.

[0077] 제조된 상기 제1 바이오잉크에 면역력이 있는(immunocompetent) 마우스로부터 분리한 췌도(Langerhans islets, 랑게르한스섬)를 혼합하여 제2 바이오잉크를 제조하였다. 이때, 상기 췌도는 100 내지 300 μm 의 직경을 갖는

췌도를 사용하였으며, 1.5 내지 3.5 IEQ/μl 의 밀도(또는 농도)를 갖도록 상기 제1 바이오잉크에 혼합되었다. 결과적으로, 췌도 이식용 구조체 제조용 바이오잉크로서 췌도를 포함하지 않는 제1 바이오잉크와, 췌도를 포함하는 제2 바이오잉크를 제조하였다.

[0078] 이렇게 제조된 췌도 이식용 구조체 제조용 바이오잉크의 최종 농도는 젤라틴이 40 mg/ml, 알지네이트가 20 mg/ml 이고, 이 농도는 희석을 고려하여 초기 파우더 질량을 조절함으로써 유연하게 조정 가능하다.

[0080] **실시예 2. 췌도 이식용 구조체의 제조**

[0081] 췌도 이식용 구조체의 제조를 위해 자체적으로 제작한 압출 기반 바이오 프린터를 이용하였다. 바이오 프린팅을 위해 프린터 챔버의 온도를 17.5 ℃, 습도를 60 내지 80%로 설정하였으며, 이러한 온도 조건은 젤라틴의 온도 가교를 통해 프린팅능을 유지하기 위함이다.

[0082] 우선, 미리 준비된 기판상에 상기 실시예 1에 따라 제조된 췌도를 포함하는 제2 바이오잉크를 압출하여 첫 번째 층(제1 외층, 110)을 형성하고, 두 번째부터 네 번째 층까지는(내층, 120) 상기 실시예 1에 따라 제조된 췌도를 포함하지 않는 제1 바이오잉크를 압출하여 형성한다. 마지막 다섯 번째 층(제2 외층, 130)으로 상기 제2 바이오잉크를 도포하여 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 제조한다. 이 때, 바이오 프린터의 프린팅 속도(printing speed)는 270 mm/min으로 조정한다. 이렇게 제조된 구조체는 피하 이식 이후에 혈관과 접하게 되는 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)에만 췌도(101)가 포함되며, 내층(120)은 췌도 이식용 구조체(100)에 두께를 부여함으로써 강성을 확보하는 역할을 한다.

[0083] 이후, 1차 가교 과정으로서, 제1 바이오잉크 및 제 2 바이오잉크를 구성하는 알지네이트를 가교하기 위해 염화칼슘 용액(30 mM CaCl2 25mM HEPES, pH 7.4)을 구조체 위에 2 ml 파이펫팅하고 15분 간 실온 상태에 두었다. 이 때, 프린팅된 구조체에는 온도에 의해 이미 가교된 젤라틴이 있기 때문에 바이오잉크가 염화칼슘 용액으로 거의 확산되지 않는다. 이 후 염화칼슘 용액을 피펫을 통해 흡입하여 제거한다.

[0084] 이후, 2차 가교 과정으로서, 소독된 도루코 단면도를 이용하여 구조체를 긁어서 단면도 위에 올리고 5 ml 염화바륨 용액 (20 mM BaCl2 25mM HEPES, pH 7.4)이 들어있는 6 well-plate에 넣고 5분 간 실온 상태에 두었다. 이 때, 염화 칼슘에 의해 적당한 가교가 이루어졌기 때문에 구조체의 손상은 일어나지 않으며, 염화 바륨 용액에 구조체를 넣는 이유는 모든 면의 알지네이트가 고루 가교될 수 있도록 하기 위함이다.

[0085] 이후, 수세 과정으로서, 염화 바륨 용액에 의한 가교 이후 잔여 바륨을 제거하기 위해 염화바륨 용액을 제거하고 HEPES buffer 용액 (25 mM HEPES, 132 mM NaCl2, 1.2 mM MgCl2, 4.7 mM KCl, pH 7.4) 5 ml 을 넣고 3분 간 실온 상태에 두었고, 이 과정을 3번 반복했다.

[0086] 마지막으로 구조체를 RPMI 1640 (+10% Fetal Bovine Serum and 1% penicillin and streptomycin) 배양 미디어에 넣어서 배양시켜 췌도 이식용 구조체를 제조하였다.

[0087] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 췌도 이식용 구조체의 형태 및 외층을 관찰한 결과를 도시한 것이다.

[0088] 도 5를 참조하면, 제작된 시트 형태의 췌도 이식용 구조체의 크기는 13 X 13 X 2 mm^3 이고, 위쪽(top)에서 시트 형태를 관찰했을 때, 구조체에 췌도가 골고루 분포하고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 옆쪽(side)에서 시트 형태를 관찰했을 때, 시트는 그립(grip)이 가능한 충분한 물성을 지니고 있음을 확인하였으며, 형광 비드를 이용해 외층 부분을 가시화하하여 췌도가 포함되는 제1 외층 및 제2 외층의 두께가 약 300 μm임을 확인하였다.

[0090] **실험예 1. 바이오잉크로의 면역글로불린 투과성 분석**

[0091] 바이오잉크로의 면역글로불린 투과성을 분석하기 위하여 젤라틴 농도가 0 (순수 알지네이트, pure alginate), 27.5, 32.5, 37.5 mg/ml인 바이오잉크를 제조하였고, 각 바이오잉크에 대한 면역글로불린 투과성 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 도시하였다. 이 때, 젤라틴 농도가 서로 다른 바이오잉크는 상시 실시예 1에 따른 바이오잉크 제조 방법에서 초기 젤라틴의 파우더 질량만을 조절하여 젤라틴 농도를 조절하였다.

[0092] 투과 실험을 진행하기 위해 너비 1mm, 길이 6mm, 높이 2mm 인 Polycaprolactone (PCL) 채널 몰드 구조를 프린팅하고, 알지네이트를 주조(casting) 하여 구조체를 제작하였다.

[0093] 젤라틴 농도가 0 mg/ml인 Pure alginate 그룹의 경우 PCL 채널 몰드 구조에 알지네이트만 함유된 MEM 용액을 파

이펫팅 해주고, 상기 실시예 2에서와 같은 방법으로 가교 과정 및 수세 과정을 진행한다.

[0094] 젤라틴 농도가 27.5, 32.5, 37.5 mg/ml인 바이오잉크 그룹은 PCL 프린트 이후 채널 공간에 바이오잉크를 프린트하고, 상기 실시예 2에서와 같은 방법으로 가교 과정 및 수세 과정을 진행한다.

[0095] 투과 실험을 진행하기 앞서, 구조체 내의 젤라틴이 영향을 줄 수 있기 때문에 이를 완전히 제거해주기 위하여, 상기 실시예 2에서 언급한 HEPES buffer 용액을 구조체 당 약 3 ml 분주하여 5분 동안 37도 조건의 인큐베이터에서 배양(incubation)하는 과정을 4번 반복한다. 이 때, 젤라틴은 온도가 약 20도 이상이 되면 졸(sol) 형태로 변하는 성질이 있으므로, 젤라틴은 이 과정에서 용해된다.

[0096] 이 후, 0.15 mg/ml 농도의 형광이 지표된 면역글로불린(Fluorescence-labeled IgG)이 들어 있는 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)를 10분 혹은 20시간 동안 37도 조건의 인큐베이터에서 배양한다. 배양 이후, 실온 조건에서 약 1ml의 DPBS 용액을 구조체에 분주하여 헹구고, 형광 촬영을 진행하였다.

[0097] 또한, 가교된 바이오잉크의 투과성에 대한 비교 실험을 위하여 Pure alginate의 가교 방식을 달리하여 negative, positive 그룹을 제작했다.

[0098] Negative 그룹의 경우, 바륨 용액에 의한 가교를 하지 않고 칼슘 용액으로만 가교한 Pure alginate를 의미하며(상기 실시예 2에서의 1차 가교 과정), 이렇게 제작할 경우 알지네이트의 가교가 충분히 이뤄지지 않기 때문에 면역글로불린이 쉽게 구조체 내부로 확산된다.

[0099] Positive 그룹의 경우, 칼슘 용액 및 바륨 용액 모두에 의해 가교된 Pure alginate를 의미하며(상기 실시예 2에서의 1차 가교 과정 및 2차 가교 과정), 칼슘과 바륨을 모두 이용하여 가교된 알지네이트는 참고 문헌에서 이미 재료적 기능이 충분히 검증되었다. (A bioinspired scaffold for rapid oxygenation of cell encapsulation systems, 2021, nature communications)

[0100] 도 6은 본 발명에 따른 바이오잉크로의 면역글로불린 투과성 분석 결과를 도시한 것으로, (a)는 젤라틴 농도가 27.5, 32.5 및 37.5 mg/ml인 바이오잉크와 Pure alginates(Negative control, Positive control)에 대한 면역글로불린 투과성 분석을 위한 형광 촬영 결과를 도시한 것이고, (b)는 젤라틴 농도가 27.5, 32.5 및 37.5 mg/ml인 바이오잉크와 Pure alginates(Negative control, Positive control)에 대한 면역글로불린 투과성 분석을 위한 형광 세기 측정 결과를 도시한 것이다.

[0101] 도 6의 (a) 및 (b)를 참조하면, 젤라틴 농도가 27.5, 32.5 및 37.5 mg/ml인 바이오잉크와 가교가 충분히 이뤄지지 않은 Pure alginates(Negative control), 가교가 충분히 이뤄진 Pure alginates(Positive control)으로의 면역글로불린(10 min 또는 20 h 배양) 투과성 분석을 위해 형광 촬영 및 세기를 측정한 결과, 바이오잉크에 다양한 농도(27.5, 32.5, 37.5 mg/ml)의 젤라틴이 혼합되어도, 기존의 가교가 충분히 이뤄진 순수한 알지네이트(Positive control)의 투과 양상과 유사하게 면역글로불린이 투과되지 않는 결과를 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 이식 후의 췌도가 면역세포의 침투에 의한 공격을 받지 않음을 의미한다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따라 젤라틴이 특정 농도로 혼합되는 제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크를 이용하여 제조되는 췌도 이식용 구조체는 면역세포의 침투를 차단함으로써 면역 보호가 가능하다.

[0103] **실험예 2. 프린팅 속도에 따른 쉘 패터닝 결과 분석**

[0104] 상기 실시예 2에서 언급한 제1 외층 및 제2 외층의 두께는 프린팅 속도(printing speed)의 조절을 통해 구현되었다.

[0105] 도 7은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체의 프린팅 속도에 따른 쉘(shell) 패터닝 결과를 도시한 것으로, (a)는 서로 다른 속도에서 프린팅된 구조체의 외층을 이미지로 나타낸 것이고, (b)는 프린팅 속도에 따른 구조체의 외층의 두께(Thickness) 분포를 그래프로 나타낸 것이다. 이때, 쉘은 제1 외층 및 제2 외층을 의미한다.

[0106] 도 7의 (a)를 참조하면, 110 mm/min, 190 mm/min, 270 mm/min 및 350 mm/min의 속도로 프린팅된 구조체의 외층의 이미지를 확인할 수 있으며, 프린팅 속도가 110 mm/min 에서 350 mm/min으로 커질수록 외층의 두께가 얇아짐을 확인할 수 있다.

[0107] 이때, 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)은 췌도 이식용 구조체가 이식 부위에 이식되었을 때 혈관과 직접 접하는 층으로서, 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)의 두께가 얇을수록 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)에 포함되어있는 췌도를 혈관에 더욱 가까이 위치시킬 수 있으므로 혈관과의 물질 교환이 보다 용이하다.

[0108] 그러나, 350 ㎜/min의 속도로 프린팅된 구조체의 외층의 경우, 잉크의 토출량에 비해 프린팅 속도가 빨라 결손된 부분(도 5, (a)의 흰색 화살표)이 관찰되었으므로, 본 발명의 일 실시예에서는 제1 외층(110) 및 제2 외층(130)을 형성하기 위해 제2 바이오잉크를 프린팅하는 바이오 프린터의 프린팅 속도를 270 ㎜/min으로 조정하였다.

[0110] **실험예 3. 두께 조절에 따른 췌도 이식용 구조체의 물성 분석**

[0111] 도 8은 본 발명에 따른 서로 다른 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 물성 분석 결과를 도시한 것으로, (a)는 서로 다른 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 인장길이에 따른 하중을 그래프로 나타낸 것이고, (b)는 서로 다른 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 피하 이식 이후 접힘이 일어나는 유무를 파악한 결과를 나타낸 것으로, 위쪽의 이미지는 피하에 자리잡은 형태를 보여주는 것이며, 아래쪽의 이미지는 췌도 이식용 구조체를 이식 부위에서 꺼내어 펼친 후 촬영한 것이다.

[0112] 도 8의 (a)를 참조하면, 2.0 ㎜의 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체가 0.5 ㎜ 및 1.0 ㎜의 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체보다 동일한 인장길이에서 더 큰 하중을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0113] 도 8의 (b)를 참조하면, 0.5 ㎜ 및 1.0 ㎜의 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 경우 피하 이식 이후 접힘이 일어나는 반면, 2.0 ㎜ 및 4.0 ㎜의 두께를 갖는 췌도 이식용 구조체의 경우 피하 이식 이후 접힘이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0114] 따라서, 본 발명의 일 실시예에서는 췌도 이식용 구조체의 두께를 피하 이식 이후 접힘이 일어나지 않도록 2.0 ㎜로 제작하였다.

[0116] **실험예 4. 쉘 패터닝에 따른 췌도의 생존율 분석**

[0117] 췌도 이식용 구조체의 쉘 패터닝에 따른 췌도의 생존율을 평가하기 위하여, 실험군으로서 상기 실시예 2에 따라 제조된 외층에만 췌도가 분포된 구조체(Shell-positioned)와, 대조군으로서 전체적으로 췌도들이 균일하게 분포된 구조체(Homogenous)를 제조하여 비교 분석하였으며, 그 결과를 도 9에 도시하였다.

[0118] 이때, 대조군(전체적으로 췌도들이 균일하게 분포된 구조체)의 경우, 췌도를 포함하는 바이오잉크만을 이용하여 상기 실시예 2와 같은 방식으로 제조되었으며, 실험군(상기 실시예 2에 따라 제조된 외층에만 췌도가 분포된 구조체)과 췌도의 수를 동일하게 맞출 수 있도록 바이오잉크에 포함되는 췌도의 농도를 적절하게 조절하였다.

[0120] 도 9는 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체 내 췌도의 생존율 분석 결과를 도시한 것으로, (a)는 구조체 전체적으로 췌도들이 균일하게 분포된 구조체(Homogenous)와, 상기 실시예 2에 따라 제조된 외층에만 췌도가 분포된 구조체(Shell-positioned)의 단면도 상에서 췌도의 분포 상태를 나타낸 것이고, (b)는 Homogenous 구조체(대조군)와 Shell-positioned 구조체(실험군)에 대하여 산소 확산 시뮬레이션 이후 각 구조체의 단면을 나타낸 것이고, (c)는 Homogenous 구조체(대조군)와 Shell-positioned 구조체(실험군)에 대하여 약 8일 간의 체외 배양 이후 세포 생존율을 Live and dead staining을 통해 확보한 이미지를 도시한 것이다.

[0121] 도 9의 (b)를 참조하면, 췌도가 외층에 패터닝된 Shell-positioned 구조체가 췌도가 구조체에 전체적으로 균일하게 분포된 Homogenous 구조체보다 췌도들이 분포한 부분의 산소 농도가 적정한 것을 확인할 수 있다.

[0122] 도 9의 (c)를 참조하면, 췌도가 구조체에 전체적으로 균일하게 분포될 경우(Homogenous 구조체) 구조체의 중앙부에서 많은 비율의 췌도가 사멸한 것을 확인할 수 있다. 반면에, 췌도가 쉘에 패터닝되는 경우(Shell-positioned 구조체) 췌도의 생존율이 높은 것을 확인할 수 있다.

[0123]

[0124] **실험예 5. 췌도 이식용 구조체 내 췌도 밀도에 따른 생존율 및 기능성 평가**

[0125] 췌도 이식용 구조체 내부의 췌도 밀도에 따른 생존율 및 기능성을 평가하기 위하여, 2.5, 5, 10 및 20 IEQ/㎕의 밀도로 췌도가 포함되는 바이오잉크(실시예 1)를 이용하여 상기 실시예 2에 따라 췌도 이식용 구조체들을 제조하였고, 제조된 췌도 이식용 구조체들을 비교 분석하였으며, 그 결과를 도 10에 도시하였다. 이때, 2.5, 5,

10 및 20 IEQ/μl의 밀도로 췌도가 포함되는 바이오잉크의 경우, 인증된 방식을 통해 카운트한 췌도를 정해진 밀도에 맞게 바이오잉크에 혼합하여 제조하였다.

[0127] 도 10은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체 내 췌도의 밀도에 따른 생존율 및 기능성 검증 결과를 도시한 것으로, (a)는 2.5, 5, 10 및 20 IEQ,/μl 밀도에서의 췌도 상태를 도시한 것이고, (b)는 2.5, 5, 10 및 20 IEQ,/μl 밀도의 췌도가 포함되는 구조체들의 4일차 및 8일차의 인슐린 분비 기능 분석 결과를 도시한 것이고, (c)는 2.5, 5, 10 및 20 IEQ,/μl 밀도의 췌도가 포함되는 구조체들의 당 자극 시 인슐린 분비 기능 분석 결과를 도시한 것이고, (d)는 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)와 췌도 밀도가 높은 구조체(~20 IEQ/μl)의 단면도 상에서 췌도의 분포 상태를 나타낸 것이고, (e)는 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)와 췌도 밀도가 높은 구조체(~20 IEQ/μl)를 각각 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐에 대한 혈당 조절 기능 분석 결과를 도시한 것이고, (e)는 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)와 췌도 밀도가 높은 구조체(~20 IEQ/μl)를 각각 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐에 대한 포도당 내성검사(Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IPGTT) 결과를 도시한 것이다. 이때, 상기 실험예 5에서 사용된 쥐는 BALB/c Nude 마우스(mouse)이다.

[0128] 도 10의 (a)를 참조하면, 밀도가 10 IEQ/μl 또는 20 IEQ/μl 일 경우, 췌도에서 일부 세포들이 괴사(흰색 화살표)하거나 비정상적인 모습을 보이는 것을 확인할 수 있으며, 밀도가 낮은 경우(2.5 IEQ/μl 또는 5 IEQ/μl) 생존율이 우수함을 확인할 수 있다.

[0129] 도 10의 (b)를 참조하면, 2.5, 5, 10 및 20 IEQ/μl 밀도의 췌도가 포함되는 구조체들의 4일차 및 8일차의 인슐린 분비 기능을 분석한 결과, 밀도가 낮은 (2.5 IEQ/μl 또는 5 IEQ/μl) 구조체의 인슐린 분비 기능이 밀도가 높은 (10 IEQ/μl 또는 20 IEQ/μl) 구조체보다 상대적으로 더 우수함을 확인할 수 있다.

[0130] 도 10의 (c)를 참조하면, 2.5, 5, 10 및 20 IEQ/μl 밀도의 췌도가 포함되는 구조체들의 당 자극 시 인슐린 분비 기능을 분석한 결과, 밀도가 2.5 IEQ/μl 로 가장 낮은 구조체가 가장 우수한 인슐린 분비 기능을 보였으며, 다음으로 5 IEQ/μl 밀도의 구조체가 우수함을 확인할 수 있다.

[0131] 도 10의 (e)를 참조하면, 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)와 췌도 밀도가 높은 구조체(~20 IEQ/μl)를 각각 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐에 대하여 이식 이후 75일 간 혈당 수준(Blood glucose level (mg/dL))을 분석한 결과, 밀도가 낮은 구조체를 이식한 경우에만 혈당 조절 기능이 있는 것을 확인할 수 있다. 이 때, 혈당 조절 기능의 유무를 판단하는 정상 혈당의 기준은 200 mg/dl 이하로 한다.

[0132] 도 10의 (f)를 참조하면, 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)와 췌도 밀도가 높은 구조체(~20 IEQ/μl)를 각각 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐에 대하여 포도당 내성검사(Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IPGTT)를 수행한 결과, 췌도 밀도가 낮은 구조체(~2 IEQ/μl)를 이식한 경우 건강한 쥐(Healthy mice)와 유사한 혈당 수준을 보이는 것을 확인할 수 있다. 또한, 2.5 및 5 IEQ/μl 밀도로 췌도가 포함되는 구조체를 각각 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 경우에도 충분한 혈당조절 기능이 발현됨을 확인하였다.

[0134] **실험예 6. 췌도 이식용 구조체 이식 방법의 기능성 평가**

[0135] 췌도 이식용 구조체(실시예 2)를 피하에 이식하는 방법의 기능성을 평가하기 위하여, 췌도 단순 주입 방법과의 비교 분석, 포도당 내성검사 및 회수 후 성능 평가를 수행하였으며, 그 결과를 도 11에 도시하였다.

[0136] 도 11은 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체의 피하 이식 방법의 기능성 평가 결과를 도시한 것으로, (a)는 췌도를 프린트하지 않고 면역결핍 당뇨 쥐에 단순 주입하는 경우와, 췌도 이식용 구조체를 프린팅하여 면역결핍 당뇨 쥐의 피하에 이식하는 경우를 비교 분석한 결과를 도시한 것이고, (b)는 면역결핍 당뇨 쥐와 건강한 쥐, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 이식 후 120일 경과일에 포도당 내성검사 결과를 도시한 것이고, (c)는 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 이식 후 120일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 조직 염색한 결과를 도시한 것이고, (d)는 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 이식 후 120일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 면역 염색한 결과를 도시한 것이다. 이때, 상기 실험예 6에서 사용된 쥐는 BALB/c Nude 마우스(mouse)이다.

[0138] 도 11의 (a)를 참조하면, 췌도를 프린트하지 않고 단순 주입한 실험 동물(Free islets)과, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 실험 동물(The sheet)에 대하여 이식 이후 120일 간 혈당 수준(Blood glucose level (mg/dL))을 분석한 결과, 췌도를 프린트하지 않고 단순 주입한 실험 동물의 경우 60일이 경과하기 전에 사망했지만, 췌도 이식용 구조체를 프린팅하여 피하에 이식한 실험 동물은 120일 간 생존하며 혈당 조절 능력을 유지함을 확인할 수 있다.

[0139] 도 11의 (b)를 참조하면, 면역결핍 당뇨 쥐(Diabetic mice)와 건강한 쥐(Healthy mice), 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐(The sheet)의 이식 후 120일 경과일에 포도당 내성검사를 수행한 결과, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐(The sheet)가 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식하고 120일이 지난 뒤에도 건강한 쥐와 유사한 혈당 조절 능력을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0140] 도 11의 (c)를 참조하면, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 이식 후 120일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 조직 염색한 결과, 췌도의 모양이 정상적인 모습을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있다.

[0141] 도 11의 (d)를 참조하면, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 이식 후 120일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 면역 염색한 결과, 췌도가 인슐린, 글루카곤 등의 기능성 단백질을 여전히 분비하고 있음을 확인할 수 있다.

[0143] **실험예 7. 섬유화 완화 약물을 공동 프린트한 췌도 이식용 구조체의 제작 및 기능성 평가**

[0144] 췌도 이식용 구조체의 이종 이식 가능성을 확인하기 위하여, 섬유화(fibrosis)를 완화시키는 약물을 공동 프린트한 췌도 이식용 구조체의 제작 및 그 성능을 평가하고, 그 결과를 도 12에 도시하였다.

[0145] 췌도를 이종이식(xenotransplantation)하는 경우, 면역세포의 침투를 막더라도, 이물 반응(foreign body response)에 의한 섬유화(fibrosis)로 인해 췌도가 사멸하게 되는 문제가 있다. 이러한 문제의 해결 가능성을 확인하기 위해, 약물 (GW2580; 5-[[3-Methoxy-4-[(4-methoxyphenyl)methoxy]phenyl]methyl]-2,4-Pyrimidinediamine)을 췌도와 함께 프린트하여 췌도 이식용 구조체를 제작하고, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(실시예 2)와 비교 분석을 진행하였다.

[0146] 이때, 약물을 췌도와 함께 프린트하여 제작되는 구조체의 경우, 상기 제1 바이오잉크와, 상기 실시예 1의 췌도를 포함하지 않는 바이오잉크(제1 바이오잉크)에 약물을 먼저 혼합한 이후, 췌도를 혼합하는 방식으로 제조되는 바이오잉크(췌도와 약물을 모두 포함하는 바이오잉크)를 사용하여 실시예 2에 따라 제작하였다.

[0148] 도 12는 섬유화 완화 약물(GW2580)을 공동 프린트한 췌도 이식용 구조체의 기능성 평가 결과를 도시한 것으로, (a)는 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)의 단면상에 췌도 및 약물의 분포 상태를 나타낸 것이고, (b) 및 (c)는 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)가 면역능력이 있는 당뇨 쥐의 피하에 이식되고 2주 이후 형성되는 섬유화 층에 대한 분석 결과를 도시한 것이고, (d)는 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Diabetic mouse)와 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Only islets), 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)에 대하여 이식 이후 35일 간 혈당 수준(Blood glucose level (mg/dL))을 분석한 결과를 도시한 것이고, (f)는 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Diabetic mouse)와 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Only islets), 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)의 이식 후 35일 경과일에 포도당 내성검사를 수행한 결과를 도시한 것이고, (g)는 이식 35일 이후 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)의 상태를 도시한 것이고, (h)는 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)의 이식 후 이식 후 35일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 조직 염색한 결과를 도시한 것이고, (i)는 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)의 이식 후 이식 후 35일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 면역 염색한 결과를 도시한 것이다. 이때, 상기 실험예 7에서 사용된 쥐는

C57BL/6 마우스(mouse)이다.

[0149] 일 실시예에 따라 제조되는 상기 췌도 이식용 구조체에 포함되는 췌도는 면역력이 있는(immunocompetent) 래트(rats)로부터 유래되는 것이며, 상기 췌도를 면역능력이 있는 마우스(mouse)에 이식하는 것은 다른 종(species)에게 이식하는 이종이식(xenotransplantation)에 해당한다.

[0151] 도 12의 (b) 및 (c)를 참조하면, 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)가 면역능력이 있는 당뇨 쥐의 피하에 이식되고 2주 이후 형성되는 섬유화 층에 대하여 분석한 결과, 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)의 경우 이식 2주 이후 형성되는 섬유화 층의 두께가 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)의 경우보다 얇음을 확인할 수 있다.

[0152] 도 12의 (d)를 참조하면, 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Diabetic mice)와 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Only islets), 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)에 대하여 이식 이후 35일 간 혈당 수준(Blood glucose level (mg/dL))을 분석한 결과, 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)가 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Only islets)보다 혈당 조절 능력이 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0153] 도 12의 (f)를 참조하면, 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Diabetic mice)와 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(Only islets), 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)의 이식 후 35일 경과일에 포도당 내성검사를 수행한 결과, 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)가 건강한 쥐와 유사한 혈당 조절 능력을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0154] 도 12의 (g)를 참조하면, 이식 35일 이후 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)의 상태를 분석한 결과, 이식 35일 이후 이식체에 췌도가 존재함을 확인할 수 있으며(W/ GW2580, Only islets), 약물을 같이 프린팅했을 경우(W/ GW2580) 용해가 완전히 일어나지 않은 약물이 함께 존재함을 확인할 수 있다.

[0155] 도 12의 (h) 및 (i)를 참조하면, 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체가 피하에 이식된 면역능력이 있는 당뇨 쥐(W/ GW2580)의 이식 후 이식 후 35일 경과일에 이식했던 췌도 이식용 구조체를 회수하여 조직 염색 및 면역 염색을 진행한 결과, 췌도가 정상적인 모양 및 기능성을 유지하고 있음을 확인할 수 있다.

[0157] **실험예 8. 췌도 이식용 구조체의 회수 가능성 평가**

[0158] 췌도 이식용 구조체를 이식했던 실험 동물로부터 췌도 이식용 구조체의 회수 가능성을 평가하기 위하여, 상기 실험예 7에 따른 이식 35일 이후 약물(GW2580)이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)(실시예 2)를 실험동물(면역결핍 당뇨 쥐)로부터 회수하여 관찰하고 그 결과를 도 13에 도시하였다. 이때, 상기 실험예 8에서 사용된 쥐는 BALB/c Nude 마우스(mouse)이다.

[0160] 이식했던 췌도 이식용 구조체를 실험 동물로부터 회수하기 위하여 우선 이산화탄소를 이용하여 실험 동물을 안락사시키고, 수술 가위를 이용해 이식 부위에서 약 3-5cm 떨어진 부분에서부터 이식 부위까지 절개하여 피부를 드러낸다. 피하에 이식된 췌도 이식용 구조체가 보이면 주변의 섬유화된 조직을 제거하고 췌도 이식용 구조체를 꺼내어 관찰하였으며, 이 때 알지네이트는 다른 생체재료에 비해 세포 부착이 가능한 표면이 아니므로 주변의 조직을 약간만 제거해주어도 구조체를 쉽게 꺼낼 수 있다.

[0161] 도 13은 상기 실험예 7에 따른 이식 35일 이후 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets)를 실험 동물로부터 회수하여 관찰한 결과를 도시한 것이다.

[0162] 도 13을 참조하면, 실험 동물로부터 회수된 약물이 췌도와 함께 프린팅된 췌도 이식용 구조체(W/ GW2580)와, 약물 없이 프린팅된 췌도 이식용 구조체(Only islets) 모두 정상적으로 회수가 가능했으며, 이식 전의 모양을 유

지하고 있음을 확인할 수 있다. 특히, 포셉(forcep)으로 집어 올려도 각 췌도 이식용 구조체의 구조가 변형되지 않았음을 확인할 수 있다.

[0164] 상기 실험예 1 내지 실험예 8을 통해, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체의 물성 및 기능성을 다양한 측면에서 평가할 수 있었으며, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체는 실험 동물의 피하에 이식한 이후에도 접힘이 일어나지 않고, 췌도 이식용 구조체 내에서 췌도의 생존율이 우수하며, 본 발명에 따른 췌도 이식용 구조체를 피하에 이식한 면역결핍 당뇨 쥐의 인슐린 분비 기능 및 혈당 조절 기능이 우수함을 확인할 수 있다.

[0166] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지 만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하 고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

부호의 설명

[0168] 100 : 췌도 이식용 구조체

101 : 췌도

110 : 제1 외층

120 : 내층

130 : 제2 외층

301 : 용액 준비 공정

302 : 소독 공정

303 : 혼합 공정

304 : 거품 제거 공정

401 : 제1 외층 프린팅 공정

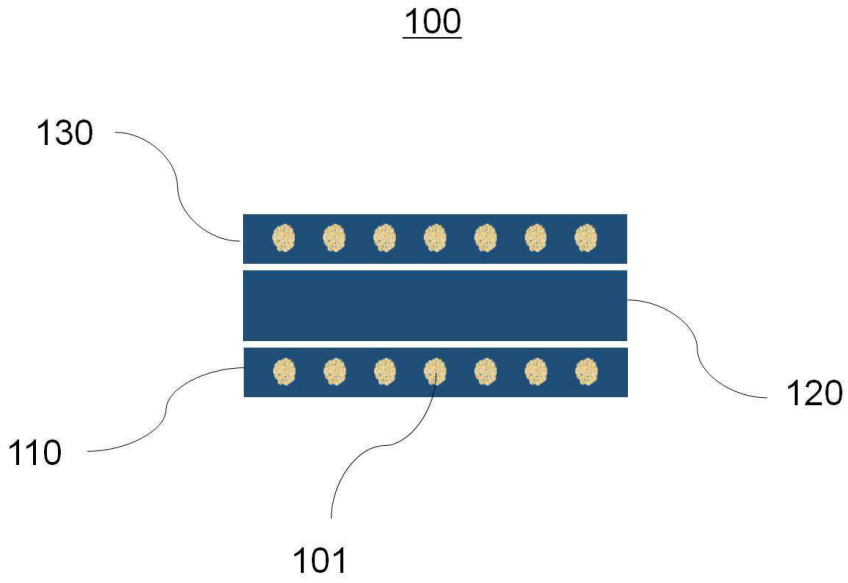
402 : 내층 프린팅 공정

403 : 제2 외층 프린팅 공정

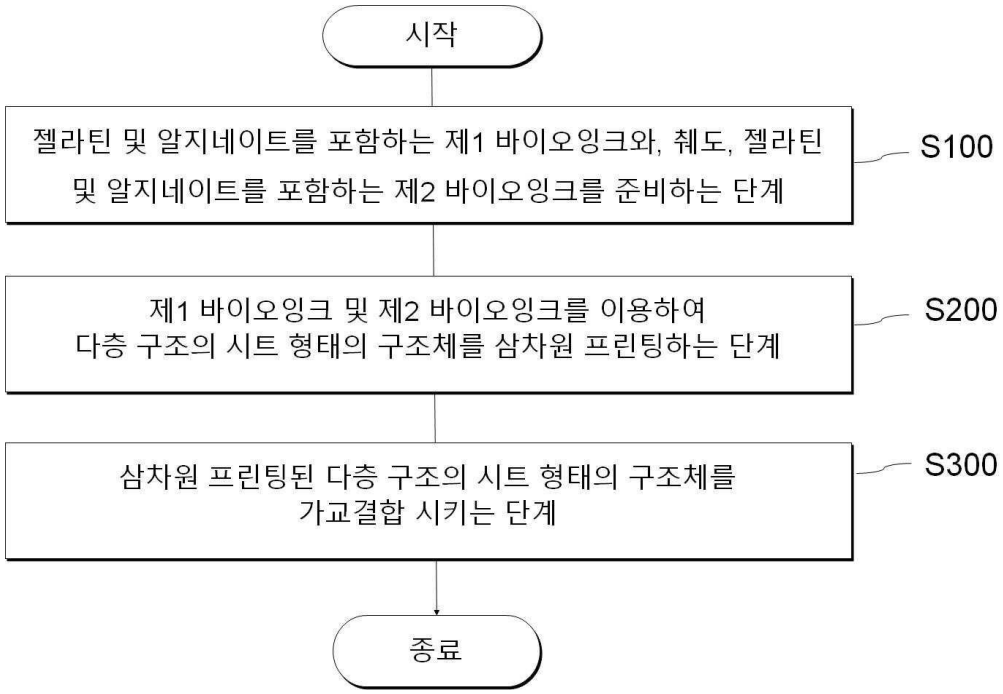
404 : 가교결합 공정

도면

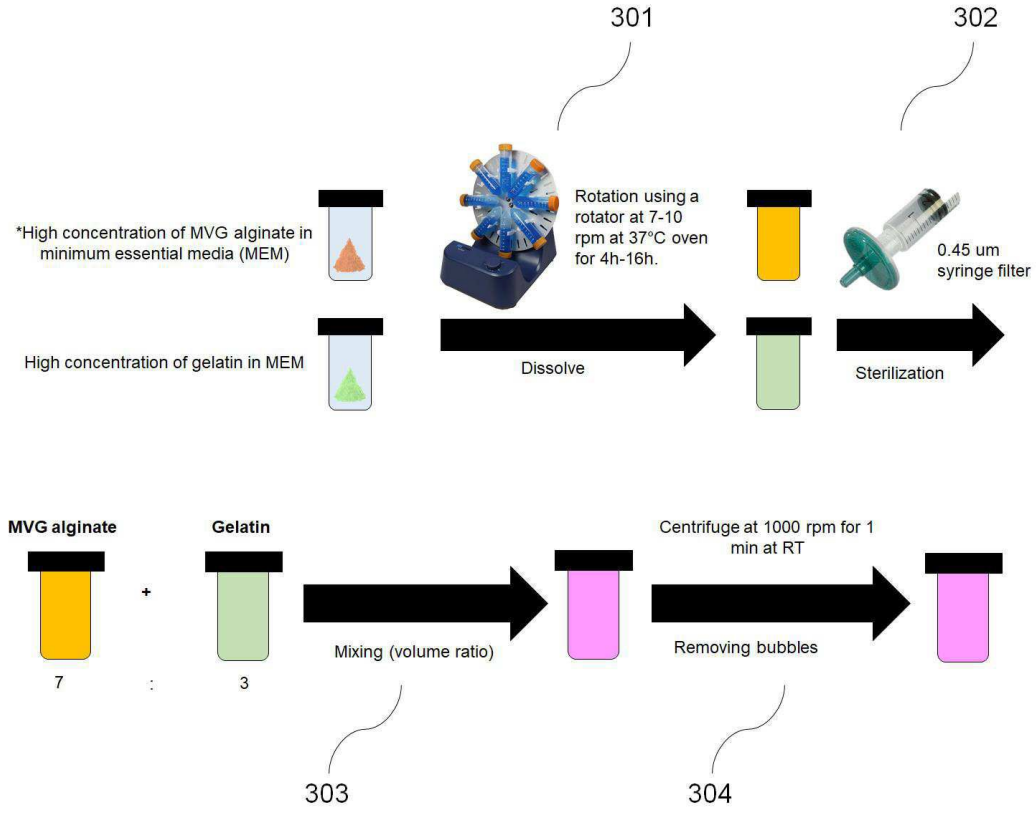
도면1


100
130
120
110
101

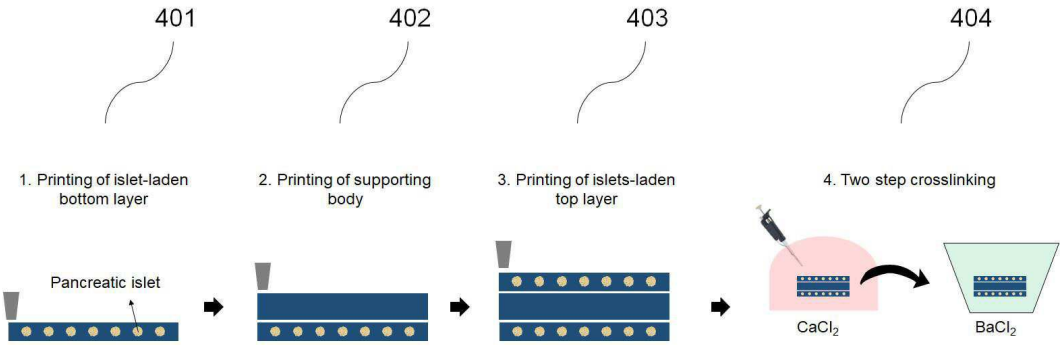
도면2


시작
젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크와, 췌도, 젤라틴 및 알지네이트를 포함하는 제2 바이오잉크를 준비하는 단계
S100
제1 바이오잉크 및 제2 바이오잉크를 이용하여 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 삼차원 프린팅하는 단계
S200
삼차원 프린팅된 다층 구조의 시트 형태의 구조체를 가교결합 시키는 단계
S300
종료

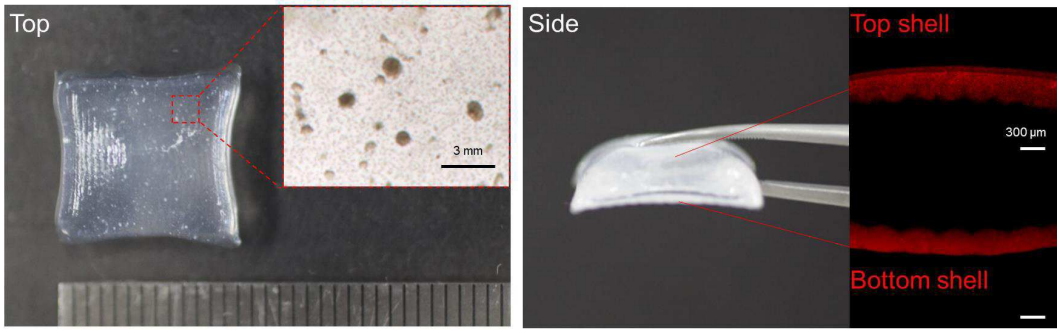
도면3


301
302
*High concentration of MVG alginate in minimum essential media (MEM)
Rotation using a rotator at 7-10 rpm at 37°C oven for 4h-16h.
0.45 um syringe filter
High concentration of gelatin in MEM
Dissolve
Sterilization
MVG alginate
Gelatin
+
7
:
3
Mixing (volume ratio)
Centrifuge at 1000 rpm for 1 min at RT
Removing bubbles
303
304

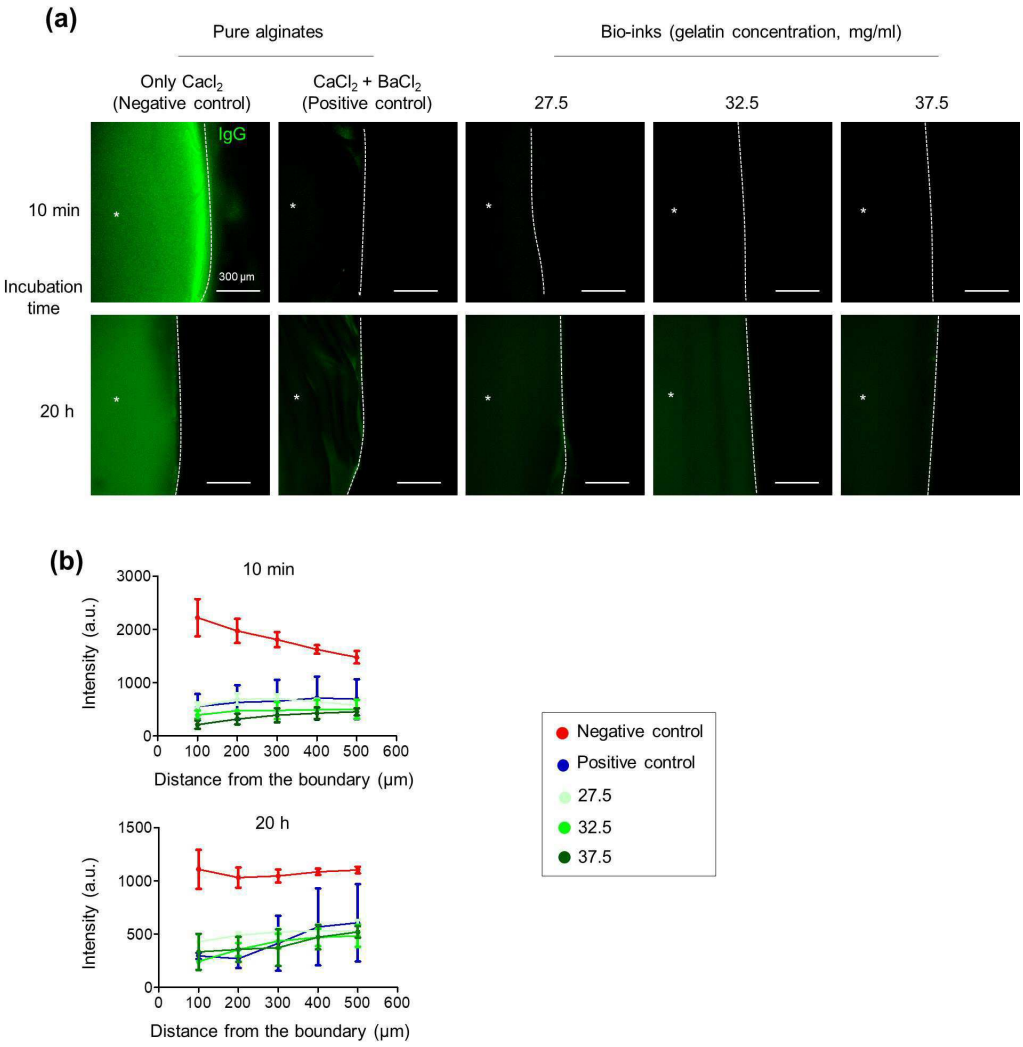
도면4


401
402
403
404
1. Printing of islet-laden bottom layer
2. Printing of supporting body
3. Printing of islets-laden top layer
4. Two step crosslinking
Pancreatic islet
$CaCl_2$
$BaCl_2$

도면5

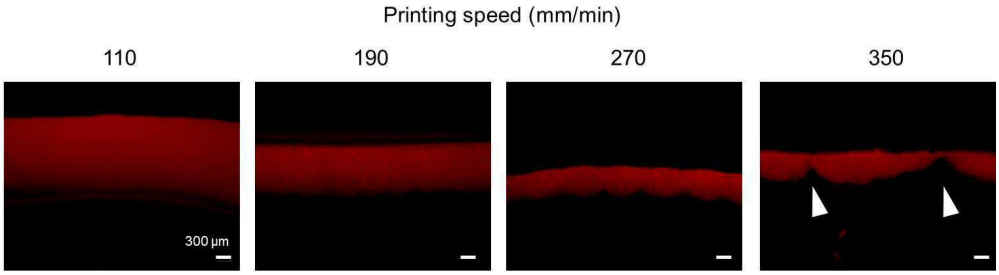

Top
3 mm
Side
Top shell
300 μm
Bottom shell

도면6

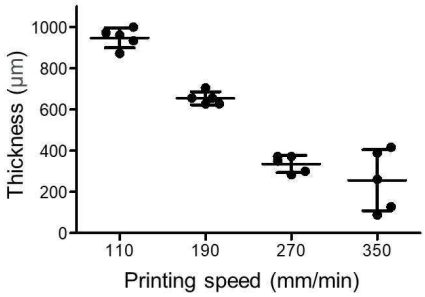

(a)
Pure alginates
Bio-inks (gelatin concentration, mg/ml)
Only Cacl2 (Negative control)
CaCl2 + BaCl2 (Positive control)
27.5
32.5
37.5
IgG
10 min
Incubation time
20 h
300 μm
(b)
10 min
Intensity (a.u.)
Distance from the boundary (μm)
20 h
Negative control
Positive control
27.5
32.5
37.5

도면7

(a)

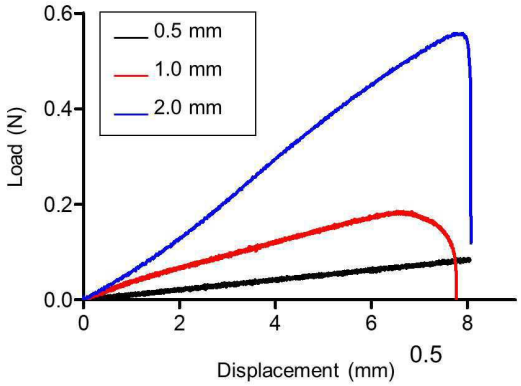

Printing speed (mm/min)
110
190
270
350
300 μm

(b)

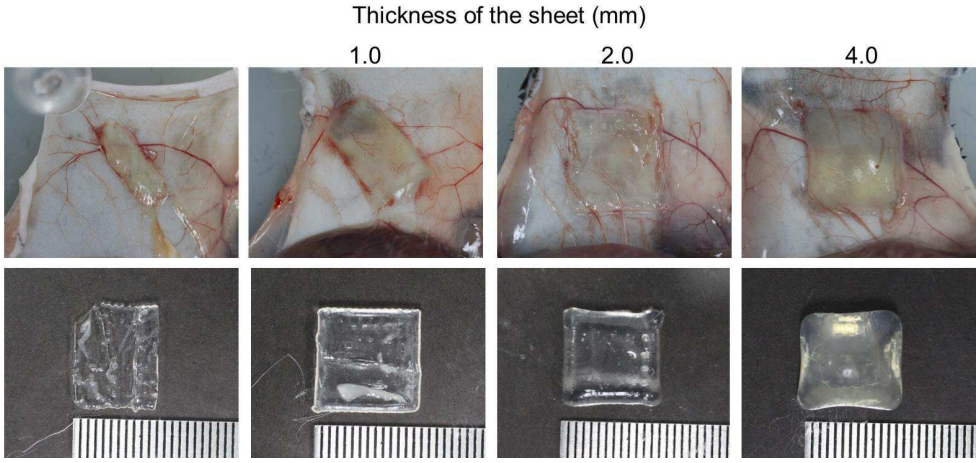

Thickness (μm)
1000
800
600
400
200
0
110
190
270
350
Printing speed (mm/min)

도면8

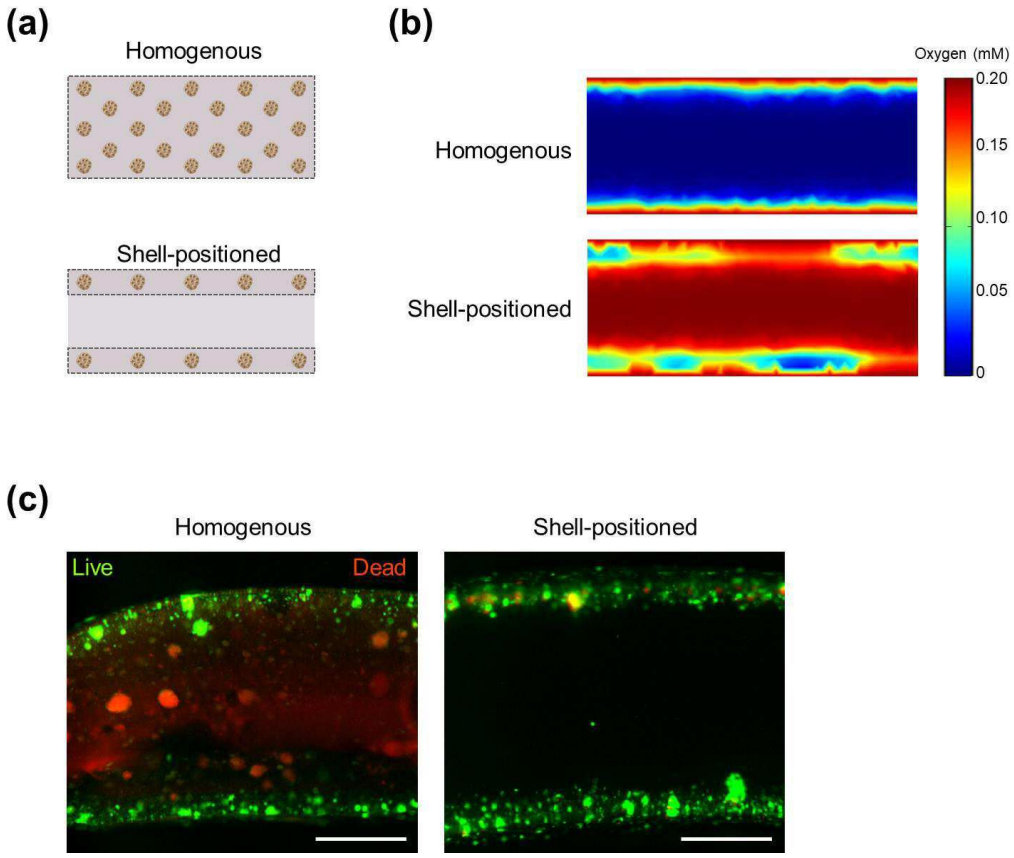
(a)


0.5 mm
1.0 mm
2.0 mm
Load (N)
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
Displacement (mm)
0.5

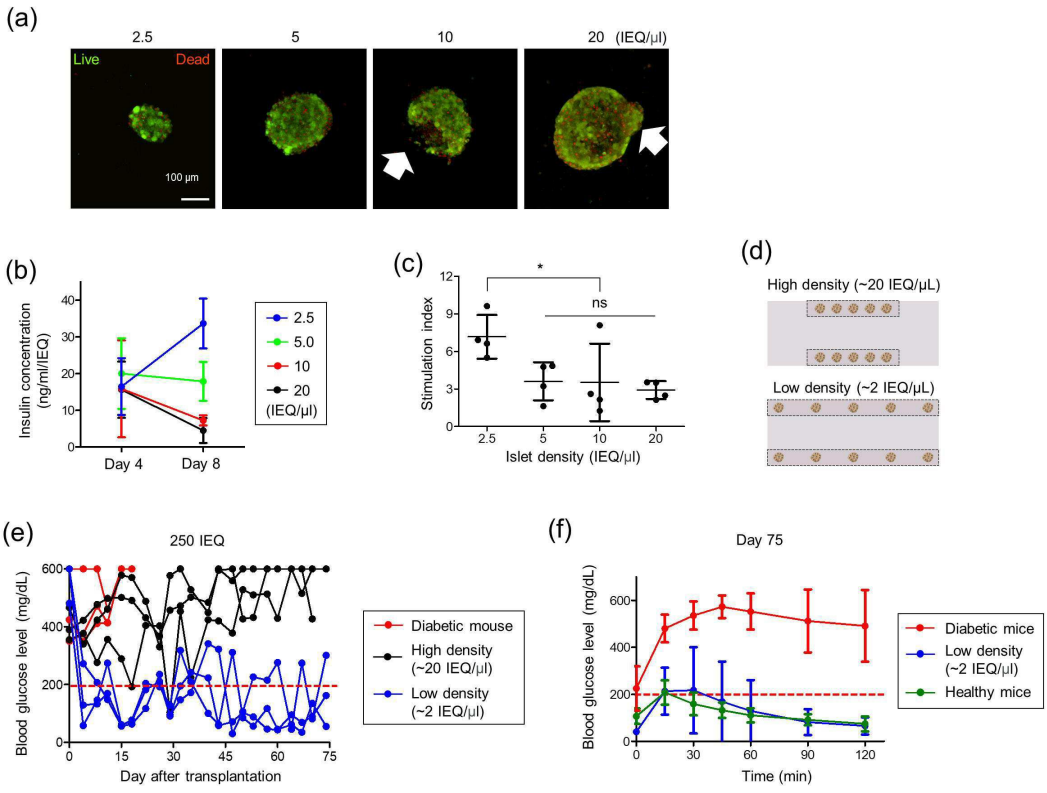
(b)


Thickness of the sheet (mm)
1.0
2.0
4.0

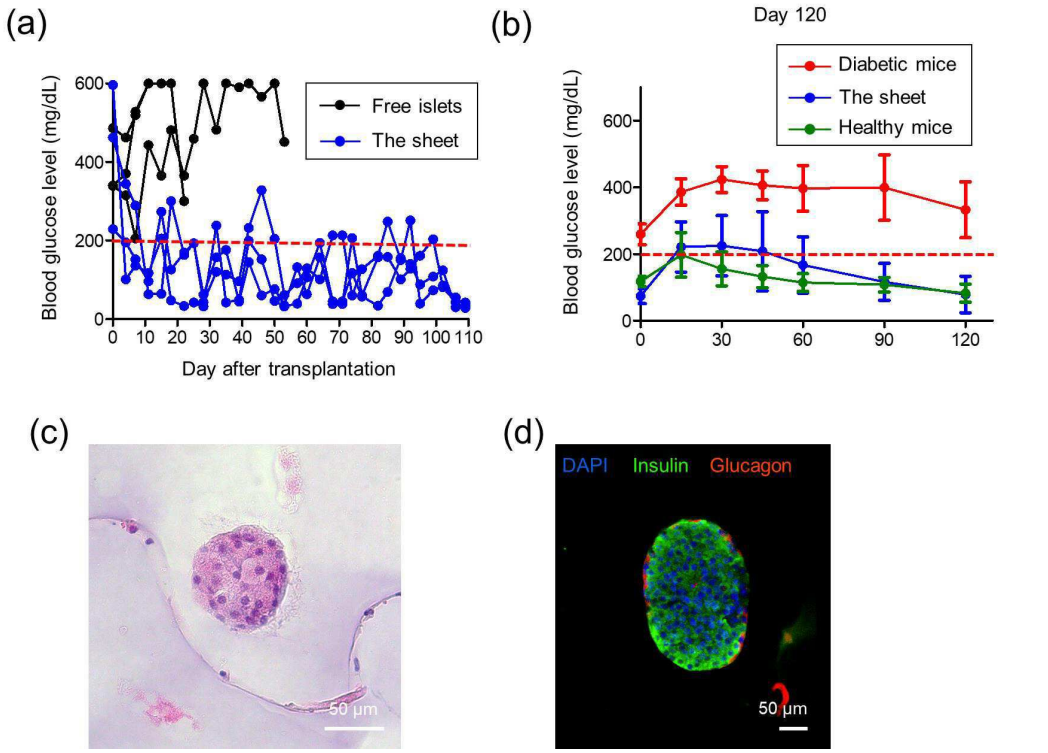
도면9


(a)
Homogenous
Shell-positioned
(b)
Oxygen (mM)
0.20
0.15
0.10
0.05
0
Homogenous
Shell-positioned
(c)
Homogenous
Shell-positioned
Live
Dead

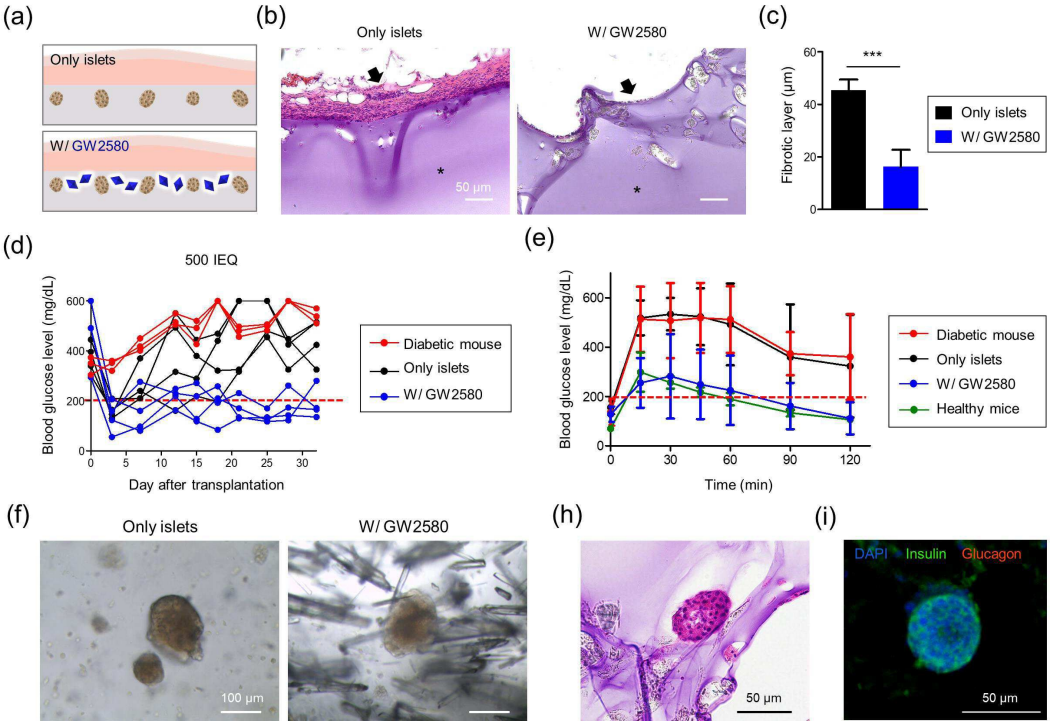
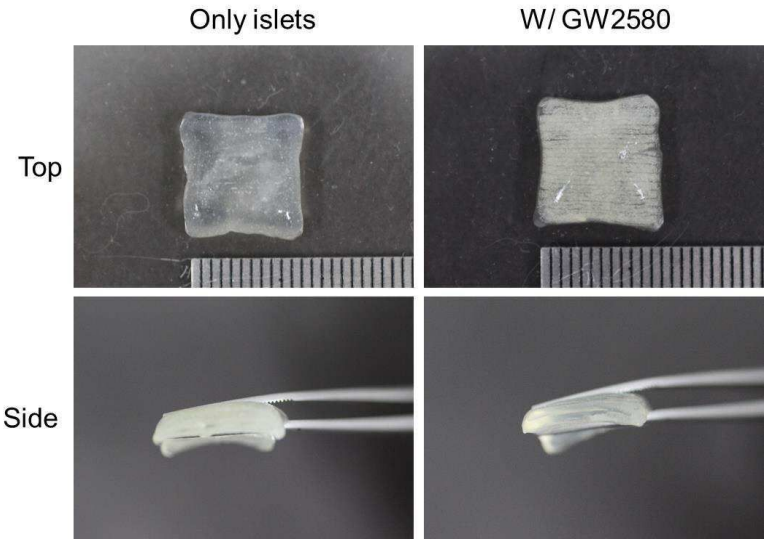
도면10


(a)
2.5
5
10
20 (IEQ/μl)
Live
Dead
100 μm
(b)
Insulin concentration (ng/ml/IEQ)
Day 4
Day 8
2.5
5.0
10
20 (IEQ/μl)
(c)
Stimulation index
*
ns
Islet density (IEQ/μl)
(d)
High density (~20 IEQ/μL)
Low density (~2 IEQ/μL)
(e)
250 IEQ
Blood glucose level (mg/dL)
Day after transplantation
Diabetic mouse
High density (~20 IEQ/μl)
Low density (~2 IEQ/μl)
(f)
Day 75
Blood glucose level (mg/dL)
Time (min)
Diabetic mice
Low density (~2 IEQ/μl)
Healthy mice

도면11


(a)
Blood glucose level (mg/dL)
600
400
200
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Day after transplantation
Free islets
The sheet
(b)
Day 120
Blood glucose level (mg/dL)
600
400
200
0
0 30 60 90 120
Diabetic mice
The sheet
Healthy mice
(c)
50 μm
(d)
DAPI
Insulin
Glucagon
50 μm

도면12


(a)
Only islets
W/ GW2580
(b)
Only islets
W/ GW2580
50 μm
(c)
Fibrotic layer (μm)
60
40
20
0
***
Only islets
W/ GW2580
(d)
500 IEQ
Blood glucose level (mg/dL)
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30
Day after transplantation
Diabetic mouse
Only islets
W/ GW2580
(e)
Blood glucose level (mg/dL)
600
400
200
0
0 30 60 90 120
Time (min)
Diabetic mouse
Only islets
W/ GW2580
Healthy mice
(f)
Only islets
W/ GW2580
100 μm
(h)
50 μm
(i)
DAPI
Insulin
Glucagon
50 μm

도면13