



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084933  
(43) 공개일자 2020년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B29C 64/106 (2017.01) A61L 27/16 (2006.01)  
A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/26 (2006.01)  
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)  
B33Y 10/00 (2015.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 5/077 (2010.01) B29K 71/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B29C 64/106 (2017.08)  
A61L 27/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0166368

(22) 출원일자 2018년12월20일

심사청구일자 2018년12월20일

(71) 출원인

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자

김근형

경기도 성남시 분당구 구미로186번길 19(구미동, 동서프라임빌)

여미지

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교 생명공학관 61동101호 (천천동)

(74) 대리인

이명진

전체 청구항 수 : 총 15 항

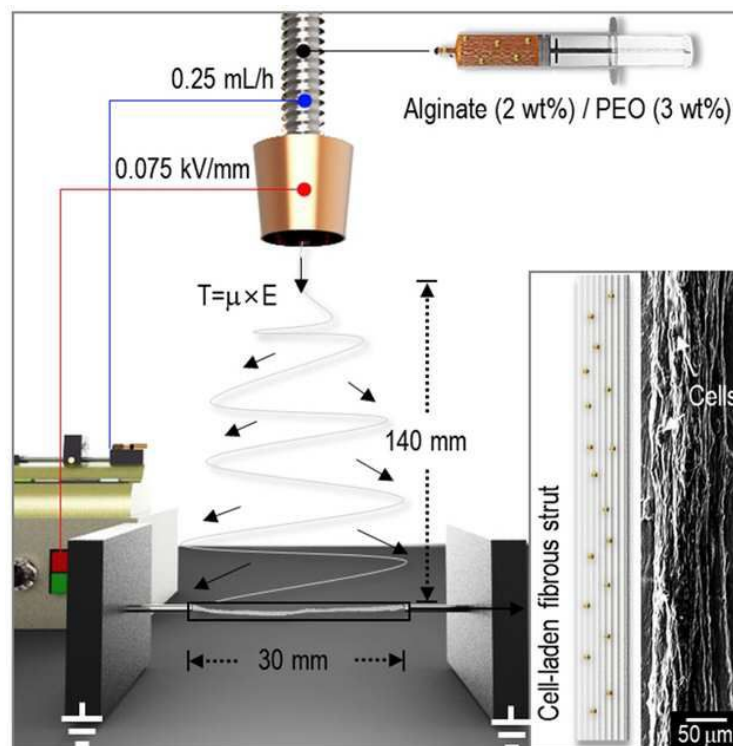
(54) 발명의 명칭 세포 전기방사를 이용한 조직재생용 세포지지체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 세포 전기방사를 이용한 조직재생용 세포지지체의 제조방법 등에 관한 것으로서, 본 발명자들은 세포 전기방사를 이용한 배열성을 지닌 적층된 구조체를 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 근육세포가 담지된 알지네이트를 전기방사하여 배열된 섬유구조에 세포가 균일하게 분포된 세포지지체를 제작하였고, 이를 통해, 한 방향

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



으로 배열된 섬유구조를 가지는 세포지지체를 제작할 수 있고, 상기 세포지지체가 세포성장을 정렬된 방향으로 유도할 수 있다는 것을 확인하였고, 이는 배열성 없는 3차원 세포지지체에 비해, 세포를 담지한 알지네이트 구조체는 3차원의 배열된 섬유다발을 통해, 균일한 세포분포 및 보다 효과적인 세포성장의 방향성을 유도할 수 있으므로 세포 연신율과 배열성 및 분화를 증가시킨다는 것을 확인하였으며, 형광염색을 통해 근육세포의 형상, 효과적으로 배열된 세포구조, 및 분화도를 확인하였는 바, 본 발명을 통해 제작된 세포지지체는 배열된 조직을 재생하는데 큰 역할을 하는 것을 확인하였는 바, 본 발명을 통해 제작된 세포지지체는 배열성을 지닌 조직/장기를 재생하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

**A61L 27/20** (2013.01)

**A61L 27/26** (2013.01)

**A61L 27/3826** (2013.01)

**A61L 27/3873** (2013.01)

**A61L 27/56** (2013.01)

**B33Y 10/00** (2013.01)

**C12N 5/0068** (2013.01)

**C12N 5/0658** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711065723

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업

연구과제명 세포프린팅/동결보존기술 개발을 기반으로 한 동물대체시험용 gut/skin-on-a-chip 제작

기 여 율 1/1

주관기관 성균관대학교(자연과학캠퍼스)

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 조직재생용 세포지지체의 제조방법:

- (a) 알지네이트(alginate)와 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide; PEO) 혼합하여 생체적합성 고분자 혼합용액을 제조하는 단계;
- (b) (a)단계에서 제조한 생체적합성 고분자 혼합용액에 세포를 혼합하여 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 (b)단계에서 제조한 세포-함유 바이오잉크를 평행전극(parallel electrodes)으로 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)하여 세포지지체(scaffold)를 제조하는 단계.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a)단계에서, 생체적합성 고분자 혼합용액은 알지네이트/PEO의 중량비가 0.5 내지 2인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체의 제조방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자 혼합용액은 상기 알지네이트/PEO의 중량비에 따라, 표면장력(Surface tension)이 38~48mN/m, 전기 전도도(conductivity)가 2.9~3.9 $\mu$ S/cm, 또는 복합점도(Complex viscosity)가 1~15Pa $\cdot$ S인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체의 제조방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (c)단계에서, 상기 세포 전기방사는 노즐-전극 간 간격을 12~14mm, 전기장 범위를 0.050~0.100kV/mm, 전극-전극 간 간격을 5~30mm, 또는 전기방사시간을 60~300초로 하여 세포지지체를 제조하는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체의 제조방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조직재생용 세포지지체는 골격근 조직재생용인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체의 제조방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 세포는 근아세포(myoblast)인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체의 제조방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 조직재생용 세포지지체로서,

상기 조직재생용 세포지지체는 세포가 살아있는 상태로 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조를 갖는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조는 반치폭(full width at half maximum; FWHM)이 10~40° 인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 세포는 F-actin의 종횡비(aspect ratio)가 4 내지 6, 또는 F-actin의 배향(orientation)은 FWHM이 0~20° 인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 10

제7항에 있어서,

상기 조직재생용 세포지지체는 미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC)가 발현되는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 MHC는 MHC 양성 지수(MHC positive index)가 90~100%, 융합 지수(Fusion index)가 30~90%, 또는 성숙지수(Maturation index)가 30~70%인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 12

제7항에 있어서,

상기 조직재생용 세포지지체는 근절 구조(sarcomeric structure)가 발현되는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 13

제7항에 있어서,

상기 조직재생용 세포지지체는 세포생존률이 80~95%, FWHM이 10~40° , 섬유밀도가 120~240/ $\mu\text{m}^2$ , 또는 인장 강도(tensile strength)가 30~35MPa, 또는 상대적 세포 증식률(relative cell proliferation)이 100% ~ 122%인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 14

제7항에 있어서,

상기 조직재생용 세포지지체는 골격근 조직재생용인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

#### 청구항 15

제7항에 있어서,

상기 세포는 근아세포(myoblast)인 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 세포 전기방사를 이용한 조직재생용 세포지지체의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 생체적합성 고분자 혼합용액에 세포를 혼합하여 제조한 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 평행전극(parallel electrodes)으로 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)하여 세포지지체(scaffold)를 제조하는 방법 및 이의

제조방법에 의해 제조된 조직재생용 세포지지체 등에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 조직공학은 생명과학과 공학의 원리를 활용하여 조직의 기능을 재생, 유지, 혹은 향상시키는 생물학적 제품을 개발하려는 여러 학문이 제휴한 분야이다. 대표적인 방법으로는 재생을 원하는 조직으로부터 세포를 분리하여 배양하고 이를 적절한 생체재료에 접종하여 증폭 배양함으로써 인공적으로 조직을 형성하는 기술이다.
- [0003] 이러한 기술에는 세포를 필요한 부위에 전달하기 쉽고, 조직이 성장하는데 3차원 구조로 기계적인 보조역할을 할 수 있으며 기능을 할 수 있는 새로운 조직으로 만들어 나가는 적당한 세포지지체가 필요하다. 이러한 지지체는 세포가 증식하고 특유의 기질을 만들 수 있는 적절한 미세구조를 갖고 있어야 하며, 3차원으로 상호 연결된 많은 기공을 가지고 있어 세포가 이 기공을 통해 안으로 자랄 수 있어야 하고, 세포 성장에 필요한 영양분을 공급할 수 있어야 한다. 또한 독성이 없으며 지지체로서의 기능 종료 후에는 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있는 생분해성 재료여야 한다.
- [0004] 인공 조직의 성능 향상을 위해 최근의 인공 조직은 성장인자와 세포를 원하는 위치에 보유할 수 있고 세포를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 성장인자를 효과적으로 운반할 수 있다는 점으로 인해 세포 프린팅 기술(cell printing techniques)이 다양한 조직 재생 분야에 널리 응용되고 있었으나, 세포가 바이오잉크 내에 포함될 때, 원하는 3D 기하학적 구조에서 세포 성장을 유도하는 것은 어렵다. 또한, 3D 프린팅 공정에서 세포의 전단은 압출된 세포의 수를 감소시킬 수 있으며, 세포-세포 상호 작용을 유도하는 데 장애물이 될 수 있다. 이러한 우려에서 외부 자극이나 미세 패턴이 없는 세포는 세포-세포 상호 작용이 덜 일어나고, 무작위 형태와 무지향성 배열로 자라난다. 따라서, 미세 환경에 대해서 세포 이동 및 미세패턴 유도세포를 정렬된 배열로 용이하게 하는 환경이 필요한 실정이었다.
- [0005] 한편, 인체에는 배열된 섬유다발 구조를 갖고 있는 많은 조직들로 구성되어있으며, 그 예로는 신경, 힘줄, 근육 등이 있다. 이러한 배열된 구조를 갖는 조직의 재생을 위해서는 반드시 세포들을 배열된 형태로 배양하고 분화시켜야 한다. 따라서 많은 연구팀들이 세포를 배열된 형태로 배양하기 위해 여러 가지 방법으로 배열된 섬유 구조를 갖는 세포지지체를 제작하기 위해 노력해 왔다. 그러나, 전기방사 공정이나 리소그래피 공정 같은 배열된 섬유 구조를 제작하는데 빈번하게 사용되어 왔으나, 대체로 적층이 불가능하고, 세포 시딩(cell seeding)시 불균일한 세포 분포, 빈약하고 시간 소모적인 세포 침투 등의 한계점 등을 갖고 있는 실정이었다.
- [0006] 다만, 이를 해결할 수 있는 기술로, 미세 패턴, 균질 세포 분포, 및 개선된 영양소 접근성에 대한 지침을 제공하기 위해, 세포 전기방사(cell electrospinning; CE) 공정이 개발되었다. CE는 전기력을 사용하여 살아있는 세포를 포함시킨 고분자 용액을 약 수백 나노미터 정도의 섬유 직경까지 인출하는 세포 담지 섬유 제조방법으로써, CE는 섬유의 전기분사(electrospraying) 및 기존 솔루션 건식 방사의 특성을 공유한다. 이 공정은 응고 화학이나 유기용매 또는 고온을 사용하여 용액에서 섬유를 생성할 필요가 없으므로, 생체 적합한 공정을 통해 3차원에서 균일한 세포분포와 섬유구조를 통한 세포생장을 유도할 수 있게 되었으나, CE를 이용한 배열성을 지닌 적층된 구조체의 개발은 보고된 바 없어 배열된 조직 재생과 같이 다양한 분야에 대한 응용 가능성은 의문점으로 남아있어, 이에 대한 많은 연구가 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 10-1449645

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 (a) 알지네이트(alginate)와 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide; PEO) 혼합하여 생체적합성 고분자 혼합용액을 제조하는 단계; (b) (a)단계에서 제조한 생체적합성 고분자 혼합용액에 세포를 혼합하여 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 제조한 세포-함유 바이오잉크를 평행전극(parallel electrodes)으로 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)하여 세포지지체(scaffold)를 제조하는

단계를 포함하는 조직재생용 세포지지체의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 세포가 살아있는 상태로 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 조직재생용 세포지지체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 알지네이트(alginate)와 폴리에틸렌 옥사이드(polyethelene oxide; PEO) 혼합하여 생체적합성 고분자 혼합용액을 제조하는 단계; (b) (a)단계에서 제조한 생체적합성 고분자 혼합용액에 세포를 혼합하여 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 제조한 세포-함유 바이오잉크를 평행전극(parallel electrodes)으로 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)하여 세포지지체(scaffold)를 제조하는 단계를 포함하는 조직재생용 세포지지체의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 (a)단계에서, 생체적합성 고분자 혼합용액은 알지네이트/PEO의 중량비가 0.5 내지 2일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 생체적합성 고분자 혼합용액은 상기 알지네이트/PEO의 중량비에 따라, 표면장력(Surface tension)이 38~48mN/m, 전기 전도도(conductivity)가 2.9~3.9  $\mu$ S/cm, 또는 복합점도(Complex viscosity)가 1~15Pa·S 일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 (c)단계에서, 상기 세포 전기방사는 노즐-전극 간 간격을 12~14mm, 전기장 범위를 0.050~0.100kV/mm, 전극-전극 간 간격을 5~30mm, 또는 전기방사시간을 60~300초로 하여 세포지지체를 제조할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 조직재생용 세포지지체로써, 상기 조직재생용 세포지지체는 세포가 살아있는 상태로 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조를 갖는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 배열된 세포-함유 나노섬유 다발 구조는 반치폭(full width at half maximum; FWHM)이 10~40° 일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 세포는 F-actin의 종횡비가 4 내지 6, 또는 F-actin의 배향(orientation)은 FWHM이 0~20° 일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 조직재생용 세포지지체는 미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC)가 발현될 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 MHC는 MHC 양성 지수(MHC positive index)가 90~100%, 융합 지수(Fusion index)가 30~90%, 또는 성숙지수(Maturation index)가 30~70%일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 조직재생용 세포지지체는 근절 구조(sarcomeric structure)가 발현될 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 조직재생용 세포지지체는 세포생존률이 80~95%, FWHM이 10~40°, 섬유밀도가 120~240/ $\mu$ m<sup>2</sup>, 또는 인장 강도(tensile strength)가 30~35MPa, 또는 상대적 세포 증식률(relative cell proliferation)이 100% ~ 122%일 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 조직재생용 세포지지체는 골격근 조직재생용일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 세포는 근아세포(myoblast)일 수 있다.

### 발명의 효과

[0024] 본 발명자들은 세포전기방사를 이용한 배열성을 지닌 적층된 구조체를 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 천연고분자인 알지네이트에 세포를 담지시킨 뒤 전기방사 공정을 응용하여 배열된 3차원 섬유구조 및 다발을 제작할

수 있는 공정을 개발, 및 세포가 담지된 알지네이트 바이오잉크 방사 조건을 정립하여, 근육세포가 담지된 알지네이트를 전기방사하여 배열된 섬유구조에 세포가 균일하게 분포된 세포지지체를 제작하였다.

[0025] 이를 통해, 본 발명자들은 한 방향으로 배열된 섬유구조를 가지는 세포지지체를 제작할 수 있고, 상기 세포지지체가 세포성장을 정렬된 방향으로 유도할 수 있다는 것을 확인하였고, 이는 배열성 없는 3차원 세포지지체에 비해, 세포를 담지한 알지네이트 구조체는 3차원의 배열된 섬유다발을 통해, 균일한 세포분포 및 보다 효과적인 세포성장의 방향성을 유도할 수 있으므로 세포 연신율과 배열성 및 분화를 증가시킨다는 것을 확인하였으며, 형광염색을 통해 근육세포의 형상, 효과적으로 배열된 세포구조, 및 분화도를 확인하였는 바, 본 발명을 통해 제작된 세포지지체는 배열된 조직을 재생하는데 큰 역할을 하는 것을 확인하였다.

[0026] 따라서, 본 발명을 통해 제작된 세포지지체는 배열성을 지닌 조직/장기를 재생하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a는 실시예 1-5에 따른 배열된 알지네이트 섬유구조의 세포 전기방사(CE) 세포구조체 공정 모식도를 나타낸 도이다.

도 1b는 시뮬레이션으로 표현되는 광학 이미지 및 전기장 강도를 나타낸 도이다.

도 1c는 순수한 알지네이트 및 알지네이트/PEO 용액을 사용한 전기 방사의 광학 이미지, 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지 및 분자 사슬을 나타낸 도이다.

도 2a는 PEO(0~4 중량%)의 상이한 중량 분율을 갖는 알지네이트(2 중량%)에 대한 표면 장력, 전기전도도, 복합 점도( $n = 3$ ), 및 섬유 직경( $n = 50$ )을 나타낸 도이다.

도 2b는 생체적합성 고분자 혼합용액의 조성 성분에 따른 섬유구조(섬유 정렬 및 섬유 분포)를 보여주는 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지를 그레이 스케일로 나타낸 도이다( $n = 50$ ).

도 3a는 비드(X), 비드 및 섬유( $\Delta$ ) 및 섬유( $\bigcirc$ )( $n = 5$ )를 나타내는 전기 방사력(electrospinnability)의 공정 창(process window)을 나타낸 도이다.

도 3b는 10~14mm 노즐-전극 거리 및  $0.050\text{--}0.075\text{ kV mm}^{-1}$  전기장을 사용하여 제조된 실시예 1-4에 따른 전기 방사 섬유의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 3c는 14 mm 노즐-전극 거리에서  $0.050\text{--}0.075\text{ kV mm}^{-1}$ 을 사용하여 제조된 세포 함유 섬유의 실시예 1-4에 따른 SEM 및 생존/사멸 이미지를 나타낸 도이다.

도 3d는 상기 도 3c의 세포생존률을 그래프로 나타낸 것이다( $n=5$ ).

도 3e는 가교 결합 전후의 전기 방사 섬유의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 4a는 다양한 전극 대 전극 거리에 대한 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지 및 배향 분포를 나타낸 도이다.

도 4b는 상기 도 4a에서 얻어진 전극 대 전극 거리에 대한 반치폭(full width at half maximum; FWHM) 및 섬유 밀도를 그래프로 나타낸 것이다( $n = 50$ ).

도 4c는 전기 방사 시간에 대한 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지 및 배향 분포를 나타낸 도이다.

도 4d는 상기 도 4c에서 얻어진 전기 방사 시간( $n = 50$ )에 대한 FWHM을 그래프로 나타낸 것이다.

도 5a는 세포 프린팅(Cell printing; CP) 세포지지체 및 전기방사(cell electrospinning; CE) 세포지지체를 도식, 광학, 생존/사멸 이미지로 나타낸 도이다.

도 5b는 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체에서  $\text{CaCl}_2$  가교(crosslinking) 전후의 세포 생존률을 그래프로 나타낸 것이다( $n = 3$ ).

도 5c는 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 실시예 1-7에 따른 인장 시험(tensile test)에 대한 광학 이미지와 응력 - 변형 곡선(stress-strain curve)( $n = 5$ )을 나타낸 도이다.

도 5d는 1일 및 7일째에 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 생존/사멸 이미지를 나타낸 것이다.

도 5e는 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 세포 생존률을 그래프로 나타낸 것이다(n = 3).

도 5f는 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 상대 세포 증식을 그래프로 나타낸 것이다(n = 6).

도 5g는 광학 이미지, 생존/사멸 이미지, DAPI/phalloidin 이미지 및 MHC-염색 이미지로 표현되는 CE 세포지지체를 나타낸 것이다.

도 6a는 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL) 버팀대(sturt)(이하, PCL 버팀대)를 보충한 세포 프린팅(CP) 및 세포 전기방사(CE) 공정의 도식을 나타낸 것이다.

도 6b는 PCL 버팀대 유무에 따른 CP 세포지지체와 CE 세포지지체의 광학 이미지를 나타낸 것이다.

도 6c는 인쇄된 알지네이트, 전기 방사된 알지네이트 및 PCL 버팀대의 응력 - 변형 곡선(Stress-strain curve)을 그래프로 나타낸 도이다(n = 5).

도 6d는 PCL 버팀대와 함께 제조된 세포지지체의 단면을 DAPI/phalloidin로 나타낸 도이다.

도 6e는 근육 - 모방 전기 방사된 PCL 다발 구조를 표면 및 단면에서 도식, 광학 및 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지로 나타낸 도이다.

도 7a는 1일과 7일째에 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 생존/사멸 이미지를 나타낸 도이다(n = 3).

도 7b는 1일과 7일째에 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 세포 생존률을 그래프로 나타낸 도이다(n = 3).

도 7c는 7일째에, 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지에 의해 얻어진 세포 형태를 나타낸 도이다.

도 7d는 7일째에, DAPI / phalloidin 염색에 의해 얻어진 세포 형태를 나타낸 도이다.

도 7e는 F-액틴 중형비 및 F-액틴 배향의 도식과 이에 따른 분석을 그래프로 나타낸 도이다(n = 30).

도 7f는 7, 14, 21일에서의 DAPI / MHC 염색의 형광 이미지를 나타낸 도이다.

도 7g는 MHC 양성 지수에 대한 도식과 MHC 분석을 나타낸 도이다(n = 30).

도 7h는 융합 지수에 대한 도식 및 MHC 분석을 나타낸 도이다(n = 30).

도 7i는 성숙 지수에 대한 도식 및 MHC 분석을 나타낸 도이다(n = 30).

도 7j는 실시예 1-8에 따른 배양 뒤 21일에 광학 및 DAPI/sarcomeric  $\alpha$ -actin 염색 이미지를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

본 발명자들은 세포전기방사를 이용한 배열성을 지닌 적층된 구조체를 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 본 발명자들은 알지네이트에 근아세포(myoblast)를 포함시킨 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 제작해, 고전압 직류(high voltage direct current)를 사용하였고, 평행하게 배열된 평행전극에 방사하여 3차원 세포담지 섬유구조를 제작하고, 알지네이트 섬유구조의 영향으로 포함된 근아세포 또한 배열된 형태를 가지게 제작한 결과, 한 방향으로 배열된 섬유구조를 가지는 세포지지체를 제작할 수 있고, 상기 세포지지체가 세포성장을 정렬된 방향으로 유도할 수 있다는 것을 확인하였고, 이는 배열성 없는 3차원 세포 지지체에 비해, 세포를 담지한 알지네이트 구조체는 3차원의 배열된 섬유다발을 통해, 균일한 세포분포 및 보다 효과적인 세포성장의 방향성을 유도할 수 있으므로 세포 연신율과 배열성 및 분화를 증가시킨다는 것을 확인하였으며, 형광염색을 통해 근육세포의 형상, 효과적으로 배열된 세포구조, 및 분화도를 확인하였는 바, 본 발명을 통해 제작된 세포지지체는 배열된 조직을 재생하는데 큰 역할을 하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0030]

이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0032]

본 발명의 일 실시 예에서는 방사 과정에서 섬유의 방향성은 전기장에 직접적으로 영향을 받게 되고, 평행하게 배열된 두 개의 전극 사이로 섬유는 배열되어 방사된다는 것을 확인하고, 순수 알지네이트 용액은 다 음이온(polyanion)의 반발력(repulsive force)으로 인해 방사가 불가하다는 것을 확인하였는 바, 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide; PEO)를 첨가해 전기방사성을 증진시켜 전기 방사에 필요한 분자 얽힘(entanglement)이

형성된다는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

- [0033] 본 발명의 다른 실시 예에서는 방사가 가능한 용액의 조성비를 알기 위해, 다양한 PEO 분율을 갖는 알지네이트가 혼합된 세포-함유 바이오잉크에서 전기방사성(electrospinnability) 및 섬유정렬 비교를 통하여 다양한 비율의 용액을 테스트해 본 결과, 알지네이트 2 중량%에 PEO 3 중량%가 첨가된 A2P3용액 및 바이오잉크가 적합하다는 결과를 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시 예에서는 A2P3용액 및 바이오잉크를 이용해 배열성이 가장 높은 구조체를 제작하고자 제작 조건을 정립하였다. 전기방사에 영향을 주는 조건으로 전기장, 노즐과 전극 간 거리(nozzle-to-electrode distance), 두 전극 간 거리(electrode-to-electrode distance), 그리고 방사시간의 범위를 다양하게 두고 실험을 진행한 결과, 노즐과 전극 간 거리를 14 mm로 두고 전기장을 0.075 kV/mm로 적용했을 때 높은 배열성과 높은 세포생존률을 확인하였고, 이 후 전극 간 거리는 30 mm 그리고 방사시간은 180s에서 높은 배열성을 지닌 구조체를 안정적으로 제작할 수 있다는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0035] 본 발명의 또 다른 실시 예에서는 CE 세포지지체를 제작하고, CE 세포지지체에서의 실시예 1-9에 따른 시험관 내(in vitro) 세포활동을 확인한 결과, 높은 세포 생존률을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0036] 본 발명의 또 다른 실시 예에서는 CE 세포지지체의 기계적 안정성을 높이기 위해, PCL 버팀대를 보충한 결과 PCL 버팀대를 포함한 CE 세포지지체 내 세포-함유 섬유 다발이 기계적으로 더 안정하다는 것을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0037] 본 발명의 또 다른 실시 예에서는 PCL 버팀대를 포함한 CE 세포지지체에서의 세포활동을 확인한 결과, 지지체 표면상의 정렬된 유도에 의해 세포 신장 및 정렬이 보다 유리하다는 것을 확인하였고, 미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC) 및 근절(sarcomeric)  $\alpha$ -actin 염색 결과, MHC 및 근절 구조가 발현됨을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0038] 따라서, 본 발명은 (a) 알지네이트(alginate)와 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide; PEO) 혼합하여 생체 적합성 고분자 혼합용액을 제조하는 단계; (b) (a)단계에서 제조한 생체적합성 고분자 혼합용액에 세포를 혼합하여 세포-함유 바이오잉크(bioink)를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 제조한 세포-함유 바이오잉크를 평행전극(parallel electrodes)으로 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)하여 세포지지체(scaffold)를 제조하는 단계를 포함하는 조직재생용 세포지지체의 제조방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에 사용되는 용어 '알지네이트(alginate)'란, 음이온 특성을 가진 갈색 해조류에서 얻은 것으로서, 세포 외 기질과의 구조적 유사성, 무독성 및  $\text{Ca}^{2+}$  와 같은 양이온의 첨가로 빠른 겔화를 통한 우수한 가공성을 이유로 조직 공학에서 널리 사용되어 왔다. 이러한 특성 때문에, 알지네이트는 또한 세포-함유 바이오잉크로 응용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 비드가 없는 안정적인 세포-함유 마이크로 섬유를 형성하기 위해 세포 전기방사를 위한 바이오잉크에 알지네이트의 중량%는 당업계에 공지된 방법으로 중량%를 선택할 수 있고, 1 중량% 내지 3 중량% 바람직하게는 2 중량% 알지네이트를 최적으로 선택할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명에 사용되는 용어 '폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide; PEO)'란,  $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-]_n$  상기 식으로 표시되는 선상 폴리에테르를 의미한다. 중합 조건에 따라 분자량 200~10000 이상의 것을 얻을 수 있으며 액체에서부터 왁스 상태의 단단한 고체에 이르기까지 여러 가지 다른 성질을 가진 것을 얻을 수 있다. 모두 에테르기의 친수성 때문에 물에 잘 녹는다. 방향족 탄화수소를 포함하는 대부분의 유기 용제에 녹고 지방족 탄화수소에 녹지 않는다. 일반적으로 내약품성은 양호하고, 300℃ 부근까지 분해를 일으키지 않는다. 굴곡성은 폴리옥시메틸렌, 폴리프로필렌옥사이드 등보다 훨씬 뛰어나다. 고분자량인 것은 결정성도 좋고 인장 강도도 크며 흡습성을 갖지 않는다. 폴리에틸렌옥사이드의 블록 및 그래프트 혼성 중합체도 합성되고 있다. 표면 활성제, 중성 세제에 이용되는 것 외에 의약품, 화장품에, 또한 가소제로서 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 본 발명에 있어서, PEO는 캐리어 중합체로서, 표면 장력 및 전기 전도성을 감소시키고, 더욱 바람직하게는 전기 방사에 필요한 분자 얽힘(entanglement)이 형성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 알지네이트의 낮은 전기방사성(electrospinnability)을 증가시키기 위해, 폴리에틸렌 옥사이드 이외에 당업계에 공지된 다양한 가공제를 사용할 수 있으며, 예컨대, 활성탄, 방염가공제, 유연처리제, 또는 유류처리제 등의 가공제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0043] 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 상기 (a)단계에서, 생체적합성 고분자 혼합용액은 알지네이트/PEO의 중량비는 당업계에 공지된 방법으로 중량비를 조절할 수 있고, 0.25 내지 3 바람직하게는 0.5 내지 2이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 생체적합성 고분자 혼합용액은 상기 알지네이트/PEO의 중량비에 따라, 표면장력(Surface tension)이 30~50mN/m 바람직하게는 38~48mN/m일 수 있고, 전기 전도도(conductivity)가 2.5~4.5  $\mu$ S/cm 바람직하게는 2.9~3.9  $\mu$ S/cm일 수 있으며, 또는 복합점도(Complex viscosity)가 0.5~25Pa·S 바람직하게는 1~15Pa·S일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명에 사용되는 용어 '표면장력(Surface tension)'이란, 액체의 자유표면에서 표면을 작게 하려고 작용하는 장력을 의미한다. 액면 부근의 분자가 액체 속의 분자보다 위치에너지가 크기 때문에 액체는 표면적에 비례하는 표면 에너지를 가지고, 이로 인해 표면장력이 생긴다.
- [0045] 본 발명에 사용되는 용어 '전기 전도도(conductivity)'란, 도체에 일정한 전기장이 걸린 경우(혹은 양단사이에 전압이 걸린 경우) 전류가 흐르는데, 이 때 전류밀도는 전기장에 비례한다. 전기전도도는 그 비례상수를 의미한다.
- [0046] 본 발명에 사용되는 용어 '복합점도(Complex viscosity)'란, 복소 점도라고도 불리우며, 점도를 실수부와 허수부의 합으로 나타낸 수학적 표현. 실수부는 보통 동력학 점도로 불리고 허수부는 복소 변형 탄성률의 실수부와 관련이 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 평행전극(parallel electrodes)은 세포 전기방사에 의해 나노섬유를 정렬하여 제조하기 위한 평행한 전극으로서, 노즐과 평행전극 사이에 인가된 전기장 하에서 평행 전극 위에 이방성 배열 섬유가 증착된다. 즉, 평행 전극의 전기장 방향 및 형상 계수로 인한 유도 쌍극자 모멘트에 의해 발생한 전기장에서 유발되는 토크를 통해, 전기 방사된 섬유가 평행 전극 사이에서 정렬될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명에 사용되는 용어 '세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)'란, 전기력을 사용하여 살아있는 세포를 포함시킨 고분자 용액을 약 수백 나노미터 정도의 섬유 직경까지 인출하는 세포 담지 섬유 제조 방법을 가리키며, CE은 섬유의 전기분사(electrospraying) 및 기존 솔루션 건식 방사의 특성을 공유한다. 이 공정은 응고 화학 또는 고온을 사용하여 용액에서 실을 생성 할 필요가 없으므로, 공정은 특히 크고 복잡한 분자를 사용하는 섬유 생산에 적합한 바, 3차원에서 균일한 세포분포와 섬유구조를 통한 세포생장을 유도할 수 있다. 즉, 다양한 천연 중합체와 살아있는 세포를 사용하여 마이크로/나노 섬유구조를 통한 세포 성장의 지침을 가능케 하는 기술을 의미하는 바, 위상적 신호의 제어 가능성을 지닌 마이크로/나노 섬유 구조를 만드는 다기능 도구로써, 제작된 마이크로/나노 섬유는 세포 외 매트릭스(ECM)의 구조적인 기하 구조와 유사하므로, 다양한 조직을 재생하는데 널리 사용된다. PDMS 용액에서 인간 뇌(1321N1) 세포의 성공적인 전기 방사가 가능하고, 0.09 kV mm<sup>-1</sup> 전기장 하에서, 세포는 67.6 %의 생존율 및 9일 동안의 세포 증식을 나타낼 수 있다. 또한, 이 기술은 다양한 용액을 사용하여 신경 모세포종, 지방 줄기 세포, 및 심근 세포와 같은 상이한 세포를 재생시킬 수 있고, 전기 방사된 심장 패치(electrospun cardiac patch)는 주요 신생아 심장 근세포로 제조할 수도 있으나, 이에 제한되지 않고, 이 가공된 심장 패치는 MyBP-C, sarcomeric  $\alpha$ -actin, connexin-43 및 myomesin으로 대표되는 구조화된 근원 섬유를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 조골 세포-같은 세포(MG63)와 알지네이트/폴리에틸렌 옥사이드(PEO)/레시틴 용액을 이용한 전기 방사를 통해, 세포 외 기질(Extracellular matrix; ECM) 구조를 모방할 수 있고, 0.16 kV mm<sup>-1</sup> 전기장을 사용하여, 세포가 80% 이상의 세포 생존 능력으로 전기 방사되어, 세포 증식과 골 형성 분화를 보일 수 있다. CE 기술은 인간 임상 1상 시험의 최종 검사에 속할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 세포 전기방사는 노즐-전극 간 간격을 10~15mm 바람직하게는 12~14mm, 전기장 범위를 0.025~0.125kV/mm 바람직하게는 0.050~0.100kV/mm, 전극-전극 간 간격을 3~40mm 바람직하게는 5~30mm, 또는 전기방사시간을 50~420초 바람직하게는 60~300초로 하여 세포지지체를 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 조직재생용 세포지지체로써, 상기 조직재생용 세포지지체는 세포가 살아있는 상태로 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조를 갖는 것을 특징으로 하는, 조직재생용 세포지지체를 제공한다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 상기 배열성 있는 세포-함유 나노섬유 다발 구조는 FWHM이 8~100° 바람직하게는 10~40° 일 수 있고, 상기 세포는 F-actin의 종횡비(aspect ratio)가 2 내지 8 바람직하게는 4 내지 6, 또는 F-actin의 배향(orientation)은 FWHM이 0~30° 바람직하게는 0~20° 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

다.

- [0052] 본 발명에 사용되는 용어 '종횡비(aspect ratio)'란, 2차원 모형에서 긴축과 짧은 축의 길이에 대한 비율을 의미하며, 본 발명에 있어서, 상기 종횡비를 통해, 세포 신장(cell elongation)을 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명에 사용되는 용어 '배향(orientation)'이란, 어떤 결정의 축과 그 계의 기본축 사이의 각도 관계를 뜻한다. 면에 대해서는 그 면의 수직선과 계의 기본축과의 사이의 각도 관계로 나타낼 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 배향은 FWHM을 통해, 세포 정렬을 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 상기 조직재생용 세포지지체는 미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC) 또는 근절 구조(sarcomeric structure)가 발현될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 사용되는 용어 '미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC)'란, 분자량 약 22만 of 미오신 구성성분 단백질의 일종이다. C 말단 측은 미오신의 필라멘트 형성능을 담당하는 알파 나선의 로드영역으로 미부라고 한다. N 말단 측은 구상 영역으로 미오신의 두부라고 하며, ATPase활성, 미오신L사슬과 액틴결합부위가 있다. 2개의 H사슬은 미부에서 상호간에 코일을 감아 쌍두의 미오신 분자를 구성한다. 통상 미오신의 기능은 미오신 L사슬에 의해 제어되지만, 미오신의 종류에 따라서는 미부의 인산화에 따라 활성이 제어되는 것도 있다. 본 발명에 있어서, MHC는 근관(myotube) 형성에 필요한 단백질로서, 근육형성(myogenesis)을 나타내기 위해 발현된 것을 확인할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 MHC는 MHC 양성 지수(MHC positive index)가 80~110% 바람직하게는 90~100%, 융합 지수(Fusion index)가 20~100% 바람직하게는 30~90%, 또는 성숙지수(Maturation index)가 20~80% 바람직하게는 30~70%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 사용되는 용어 '근절 구조(sarcomeric structure)'란, 횡문근에서의 근원섬유가 반복되는 단위의 구조를 의미한다. 이웃이 되는 Z반의 사이를 나타내며 Z반-I대-A대-I대-Z반의 순서로 이루어질 수 있다. 신경에서 온 자극을 근원섬유에 전달하는 3개 조직도 Z반의 부근에 있고, 전달계의 T관, 근소포체도 근절과 같이 반복한다. 근절의 길이는 수축 시에 짧아지지만, 척추동물에서는 이완 시에 거의 2~3  $\mu\text{m}$ 가 보통이다. 본 발명에 있어서, 근관(myotube)의 성숙한 분화 단계를 확인하기 위해, 근절 구조를 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 세포지지체는 세포생존률이 80~100% 바람직하게는 80~95%, 섬유세포의 FWHM이 8~100° 바람직하게는 10~40°, 섬유 밀도가 90~250/ $\mu\text{m}^2$  바람직하게는 120~240/ $\mu\text{m}^2$ , 인장 강도(tensile strength)가 20~40MPa 바람직하게는 30~35MPa, 또는 상대적 세포 증식률(relative cell proliferation)이 95% 내지 130% 바람직하게는 100~122%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 본 발명에 사용되는 용어 '반치폭(full width at half maximum; FWHM)'이란, 어떤 함수의 폭을 나타내는 용어로서, 그 함수의 최대값의 절반이 되는 두 독립변수 값들의 차이로 정의된다. 반치전폭은 신호처리에서 펄스의 지속시간, 통신에서 사용되는 신호의 대역폭 등을 나타내는데 쓰인다. 본 발명에 있어서, FWHM을 통해, CE로 제조된 섬유의 정렬된 구조를 판단할 수 있고, 값이 낮을수록 양호한 정렬을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에 사용되는 용어 '인장 강도(tensile strength)'란, 항장력이라고도 하며, 재료의 기계적 강도를 표시하는 값의 하나이다. 막대 모양의 시험편을 잡아당겨 그 가해진 하중과 시험편의 변형의 모양에서 인장 강도를 구한다. 시험편에 하중을 가하면 시험편은 하중에 비례하여 늘어나며, 이윽고 비례 관계에서 벗어나게 된다. 어떤 늘어나는 값에서 최대하중 M을 시험편의 원래 단면적으로 나눈 값이 인장 강도이며, 단위면적에서 지탱할 수 있는 최대하중을 나타낸다. 플라스틱 상의 장식용 전기도금의 밀착성 시험에 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 인장 강도를 통해, 제작된 세포지지체의 기계적 안정성 여부를 판단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 조직재생용 세포지지체는 골격근 조직재생용일 수 있고, 상기 세포는 근아세포(myoblast)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명에 사용되는 용어 '골격근'이란, 골격의 가동성 부분에 붙어서 그 운동을 관장하는 근육으로 가로무늬근이며 수의근이다. 1개의 골격근은 다수의 근섬유와 결합조직으로 구성되며, 근의 운동은 근섬유의 방향에 따라 수축운동을 하게 된다. 골격근에는 운동신경, 감각신경, 자율신경이 분포한다. 조직을 재생할 수 있는 골격근은

예컨대, 근두가 한 개뿐인 근육을 단두근, 두 개 이상 있는 다두근, 상완 이두근·대퇴 이두근·상완 삼두근·하완 삼두근·대퇴 사두근 등 강한 힘을 발휘하는 근육이 있으며, 근복 중간이 힘줄에 의해 중단되어 있는 다복근, 악익복근·견갑 설골근·복직근 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본 발명에 사용되는 용어 '근아세포(myoblast)'이란, 분화되지 않은 상태에 있는 근육세포로 근육의 마디를 구성한다. 처음에는 원통형을 이루나 유사분열에 의해 여러 개가 평행하게 밀집한 다발을 만든다. 골격근 섬유에서는 근원세포기(단핵세포기)에 근원섬유가 형성되고, 이어서 가로무늬도 볼 수 있다. 수축기능도 이 근원섬유 형성기 또는 그 직전에 시작된다. 배기의 근섬유는 근원섬유의 수가 적고, 후에 발생과 더불어 근원섬유가 증대한다. 근섬유 자체의 수는 배기 중에 결정되고, 그 후는 비대해질 뿐 증식하지 않는 것을 원칙으로 하지만, 항문거근과 같은 예외도 있다.

[0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

## [0067] [실시예]

### [0068] 실시예 1. 재료 및 방법

#### [0069] 1-1. 재료

[0070] 알지네이트 나트륨(LF10 / 50, FMC BioPolymer, Drammen, Norway)은 Pharmaline(Suwon, South Korea)에 의해 제공되었다. PEO(Mw = 900000), 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 및 PCL(Mw = 45 000)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였다. CE 및 CP에 사용된 C2C12 근육 아세포(CRL-1772)는 ATCC (Manassas, VA)에서 구입하였다.

#### [0072] 1-2. 알지네이트/PEO 용액 및 바이오잉크의 제조

[0073] 알지네이트/PEO 용액을 특성화하기 위해 2 중량 % 알지네이트와 0-4 % PEO를 3번 증류된 증류수(tri-distilled water)에 용해시켰다. 용액을 마그네틱 바를 사용하여 실온에서 며칠동안 교반하였다. 바이오잉크로서, 2 중량% 알지네이트/3 중량% PEO 용액을 선택하고,  $5 \times 10^6$  세포  $\text{mL}^{-1}$ 에서 C2C12를 첨가 하였다.

#### [0075] 1-3. 알지네이트/PEO 용액의 특성화

[0076] 알지네이트/PEO 용액의 하기 특성화를 실온에서 수행 하였다. 표면 장력 측정을 위해, 유리 모세관을 알지네이트/PEO 용액에 침지시켰다. 1시간 후, 유리 모세관을 디지털 카메라(Canon EOS 450D; Canon, Japan)를 사용하여 캡처 하였다. 그 후, 접촉각 측정(contact angle measurement)에 의해 표면 장력을 측정 하였다. 알지네이트/PEO 용액의 전도도를 측정하기 위해, pH/전도도 측정기(Consort Bvba, Belgium, Turnhout, Consort C861)를 사용하였다.

[0077] 유동학적(Rheological) 측정을 수행하여 복합 점도( $n^*$ )를 획득하였다. 회전식 레오미터(Bohlin Gemini HR Nano; Malvern Instruments, Surrey, UK)의 원추 및 판 구조( $4^\circ$  원추 각, 40mm 직경, 및  $150\mu\text{m}$  갭)를 사용하여 상이한 PEO 중량 분율(1-4 중량%)을 갖는 알지네이트(2 중량%)를 시험하였다. 동적 주파수 스위프(dynamic frequency sweep)는 선형 점탄성 영역 내에서 2% 변형률과  $24^\circ\text{C}$ 를 사용하여 0.1에서 10Hz로 수행되었다.

#### [0079] 1-4. 표면 형태학(Surface Morphology)의 분석

[0080] 미세크기 이미징(microscale imaging)의 경우, 전기 방사된 섬유를 양면 카본 테이프에 부착하고, Au 코팅을 위하여 받침대 위에 두었다. 그 후, 샘플의 섬유 형태를 주사 전자 현미경(SEM; SNE-3000M; SEC Inc., Suwon, South Korea)을 사용하여 캡처하였다. 섬유를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 섬유 직경, 정렬 및 밀도 측면에서 분석하였다.

[0082] 1-5. 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE) 공정 및 세포 프린팅 공정

[0083] CE 공정의 경우, 제조된 바이오잉크를 0.25mL/h의 유속으로 시린지 펌프(KDS 230, NanoNC, Inc.)에 장착하였다. 이어서, 고 전압 전원(SHV300RD-50K, Convertech)을 사용하여 10.5kV 고전압 직류를 인가시켰다. 바이오잉크를 3분간 두 개의 원통형 전극(직경: 360  $\mu$ m)에 전기 방사시켰다. 이 공정의 비디오를 디지털 카메라(Nikon D3100, Nikon, Japan)를 사용하여 기록하였으며, 지원 정보로 제공된다. 응용으로서, PCL 버팀대가 전극들 사이에 장착되었다.

[0084] 세포 프린팅 공정에서, 3D 로봇(DTR3-2210-T-SG, DASA Robot, South Korea)을 이용하여 바이오잉크를 분배하였다. 120 kPa의 공기압과 10 mm s<sup>-1</sup>의 노즐 이동 속도가 적용되었다. PCL 버팀대에 적용하기 위해, PCL을 가열 카트리지에서 100℃에서 녹인 후, 340 kPa를 사용하여 버팀대로 PCL을 그렸다. 잠시 후, 상기 바이오잉크는 전술한 것과 동일한 제조 조건을 사용하여, 100  $\mu$ m 겹의 PCL 버팀대에 분배된다. CE 및 세포 인쇄를 사용하여 제조된 모든 샘플을 2분 동안 고 포도당을 갖는 Dulbecco 변형 이글 매질(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM)에서 2 중량% CaCl<sub>2</sub>로 가고 결합시켰다. 이어서, 세번-완충 식염수(tris-buffered saline)를 사용하여, 샘플을 2회 행구었다.

[0086] 1-6. 세포 수 측정

[0087] 세포 수를 계산하기 위해, C2C12 세포를 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>의 바이오잉크에 포함하여 실시예 1-5에 따른 CP 및 CE 공정에 적용하였다. CE의 경우, CE 지지체를 제조하기 위해 얻어진 조건을 사용 하였지만, 전기 방사된 섬유를 세포 카운팅을 위해 2D 전극 상에 수집하였다. 세포 프린팅의 경우, 3D 바이오 프린터를 사용하여, CP 지지체와 동일한 제조 조건으로 버팀대를 그렸다. 트리판 블루(trypan blue) 용액(Sigma-Aldrich)으로 처리 한 후, 세포 수를 세기 위하여, 광학 현미경(CKX41, Olympus)을 사용하여 샘플을 관찰했다.

[0089] 1-7. 인장 특성 측정(Tensile Property Measurement)

[0090] 응력 - 변형률 곡선(stress-strain curve)은 마이크로 인장 시험기(Toptech 2000; Chemilab, Suwon, Korea)를 사용하여 얻었다. 시험 전에 샘플을 동결 건조시키고, 0.05 mm s<sup>-1</sup>에서 일축으로 연신하였다.

[0092] 1-8. 시험관 내 세포 배양(In vitro Cell Culture)

[0093] C2C12 근아세포(myoblast)는 고 포도당이 있는 DMEM이 포함된 10 % fetal bovine serum(Gemini Bio-Products, Sacramento, CA, USA)과 1% 항생제 (Antimycotic, Cellgro, Manassas, VA)를 사용하여 배양하였다. 샘플을 37℃조건 하에 5% CO<sub>2</sub>가 보충된 배양기에 저장하고, 매 2일마다 배지를 교환하였다.

[0095] 1-9. 시험관 내 세포 활동(In vitro Cellular Activities)

[0096] 세포-함유 샘플을 2.5 % 글루타알데히드(glutaraldehyde)에서 4시간 동안 고정하고, 실시예 1-4에 따른 SEM을 사용하여 세포 형태를 관찰하였다. 샘플을 각각 10분 동안 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 및 100 % 알코올로 행구었다. 헥사메틸디실라잔(Hexamethyldisilazane)을 1 시간 동안 처리하고, 샘플을 공기 건조시켰다. Au로 코팅한 후, 실시예 1-4에 따른 SEM을 사용하여 이미지를 관찰하였다.

[0097] 세포 증식 속도를 평가하기 위해, MTT 분석법(Cell Proliferation Kit I, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 사용하였다. 샘플을 37℃에서 0.6 mg mL<sup>-1</sup> MTT 용액에 4시간 동안 담겼다. 이어서, 가용화 용액을 37℃에서 밤새 처리하였다. ELISA 판독기(EL800, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여, 실시예 1-8에 따른 배양 1일 및 7일 후에, 570 nm에서 흡광도를 판독하였다. 7일째의 MTT 결과와 1일째의 MTT 결과를 비교하여, 상대적 세포 증식 속도를 나타냈다.

[0098] 4시간(in situ) 및 1일 및 7일에 세포 생존력을 측정하기 위해, 생존/사멸 염색(Live/dead staining)을 수행하였다. 샘플을 0.15 $\times$ 10<sup>-3</sup> m calcein AM과 2  $\times$  10<sup>-3</sup> m ethidium homodimer-1에 30분간 담갔다. 이어서, 현미경으

로 녹색의 살아있는 세포와 빨간색의 죽은 세포를 관찰하고 포획했다. 획득된 이미지로부터, 세포 생존력은 실시예 1-6에 따른 총 세포 수에 대한 살아있는 세포의 수로서 계산되었다.

[0099] DAPI / phalloidin 영상을 얻어, 세포의 핵과 F-actin을 검사하였다. 샘플을 상온에서 밤새 3.7 % 파라포름알데히드로 고정시켰다. 0.2 % Triton X-100으로 10 분간 처리한 후, 샘플을 Alexa Fluor 568에 접합된  $5 \times 10^{-6}$  M DAPI(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및  $15 \text{ U mL}^{-1}$  phalloidin(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 담겼다. 형광 이미지를 공초점 현미경 (LSM700, 자이스 혈구, 독일)을 사용하여 캡처했다.

[0100] MHC와 sarcomeric  $\alpha$ -actin 구조의 면역형광(immunofluorescence) 염색은 근원 분화를 나타내기 위해 수행되었다. 실온에서 3.7 % 파라포름알데히드를 밤새 담그고 나서, 샘플을 0.2 % Triton X-100을 사용하여 10 분간 투과시켰다. 배경 잡음(background noise)을 차단하기 위해, 1 % 소 혈청 알부민(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 1시간 동안 처리하였다. 일차 항체를 부착하기 위해, 샘플을 4°C에서 밤새 항-MHC 항체(트리스 완충 식염수(TBS) 중 1 : 200) 및 항 근질(sarcomeric)  $\alpha$ -actinin 항체(TBS 중 1 : 200)로 항온 배양 하였다. DAPI로 대조 염색하여, MHC에 대해서는 Alexa Fluor 488 및 근질(sarcomeric) 구조에 대해서는 Alexa Fluor 568과 접합된 염소 항균제 2 차 항체(goat antimouse secondary antibody)와 함께 샘플을 항온 배양 하였다. 이미지는 공 초점 현미경을 사용하여 얻었으며, 실시예 1-4에 따라 ImageJ 소프트웨어는 MHC 분석에 사용되었다.

## [0102] 1-10. 통계 분석

[0103] 통계 분석은 SPSS 소프트웨어(SPSS, Inc. , Chicago, IL, USA)를 사용하여 각 실험의 최소 3회 반복 수행 하였다. 분산의 단일 요인 분석에 의해, 통계적 유의성을 나타내기 위하여  $p * < 0.05$ ,  $p ** < 0.01$  및  $p *** < 0.001$  이 사용되었다.

## [0105] 실시예 2. 세포구조체 제작을 위한 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE) 공정 및 고분자 혼합용액의 분자얽힘(entanglement) 확인

[0106] CE 공정은 3D 바이오 프린터를 사용하는 세포 프린팅(cell printing; CP) 공정과 비교되었다. 도 1a 상단에 나타난 바와 같이, 실시예 1-5에 따른 3D 세포 함유 알지네이트 버팀대(struts)를 제조하는데 사용되는 세포 프린팅 공정 개략도 및 인쇄된 세포 함유 버팀대(struts)를 보여주는 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지를 보여주고 있고, 도 1a 하단에 나타난 바와 같이, CE의 개략도 및 세포가 포함되어 있는 전기방사된 알지네이트 마이크로/나노 섬유 SEM 이미지를 보여주고 있다. 상세히 설명하면, 이방성 배열 섬유는 노즐과 평행전극 사이에 인가된 전기장 하에서 평행 전극 위에 증착되었다. 이 섬유의 정전기 운동은 전기장 유도 토크에 기인한 것으로,  $T = \mu \times E$ 로 나타낼 수 있다. 여기서 T는 장 유도 토크(field-induced torque),  $\mu$ 는 유도된 분극 모멘트, E는 인가된 전기장이다.

[0107] 노즐과 접지된 전극 주변의 전기장 분포를 정확하게 관찰하기 위해, 도 1b에 나타난 바와 같이, 광학 이미지에 표시된 전기 방사 공정의 기하학적 차원(geometrical dimension)을 사용했다. 도 1b의 시뮬레이션 결과에서 알 수 있듯이, 전기 방사 섬유는 평행 전극의 전기장 방향 및 형상 계수로 인한 유도 쌍극자 모멘트에 의해 전기장이 유발되는 토크를 경험한다. 특히, 도 1b-I, 1b-II 에 나타난 바와 같이, 토크 공식  $\mu \times E$ 는  $0.5V \epsilon_0 K_T (\omega) E^2 \sin 2\theta$ 로 확장 될 수 있는데, 여기서 V는 섬유의 부피,  $\epsilon_0$ 는 자유 공간의 유전율,  $K_T(\epsilon)$ 는 섬유의 두 수직 축에 대한 탈분극 인자의 차이,  $\omega$ 는 적용된 주파수이고, E는 전기장이고,  $\theta$ 는 회전 각이다. 원통형 구조의 회전 방향은 도 1b-I, 1b-II에 나타난 바와 같이, 전기장의 방향에 직접적으로 영향을 받을 수 있다. 이 이론적인 분석에 기초하여, 전기 방사 섬유가 평행 전극 사이에서 성공적으로 정렬될 수 있음을 확인했다.

[0108] 도 1b의 광학 이미지에 나타난 바와 같이, 140mm인 노즐과 전기 전극간 거리와 30mm인 전기 전극간 거리가 고정되었다. 기하학적 실험 장치를 사용하여, 2 중량% 알지네이트를 사용한 나노 섬유를 제조하려고 시도했지만, 섬유는 얻지 못했다(도 1c). 순수한 알지네이트는 분자 체인(molecular chain)이 얽히지 않으나, 강하고 확장된 사슬 형태로 인해 서로 겹치기 때문에 전기 방사의 한계가 있다(도 1c-III). 그러므로, 알지네이트 분자 사슬의 도메인이 얼마나 집중되어 있건 관계없이, 도 1c에 나타난 바와 같이, 분자 사슬의 얽힘과 물리적 네트워크를 필요로 하는 섬유 형성은 달성되지 못한다. 알지네이트의 낮은 전기방사성(electrospinnability)을 증가시키기 위해, 가공제로 폴리에틸렌 옥사이드(polyethelene oxide; PEO)를 사용했다. PEO는 캐리어 중합체로서, 표면 장

력 및 전기 전도성을 감소시키고, 더욱 중요하게는 전기 방사에 필요한 분자 얽힘(entanglement)이 형성될 수 있다. 도 1c에 나타난 바와 같이, PEO(3 중량%)와 혼합된 알지네이트를 사용하는 전기 방사된 알지네이트/PEO 섬유를 보여준다. 예상대로, 도 1c-IV 에 나타난 바와 같이, 평행전극 사이의 정렬된 알지네이트 섬유는 알지네이트 분자 사슬 주위에 물리적 네트워크를 효과적으로 형성하는 PEO로 인해 잘 얻어진 것을 확인할 수 있었다.

[0110] **실시예 3. 다양한 PEO 분율을 갖는 알지네이트가 포함된 세포-함유 바이오잉크의 전기방사성 (electrospinnability) 및 섬유 정렬(Fiber Alignment)을 통한 최적의 중량비 확인**

[0111] 전기방사성 있는(electrospinnable) 알지네이트/PEO 용액(생체적합성 고분자 혼합용액)을 정하기 위해, 2 중량% 알지네이트를 실시예 1-1 및 실시예 1-2에 따라, A2P0, A2P1, A2P2, A2P3 및 A2P4로 각각 언급된 PEO의 다양한 무게 분율(0, 1, 2, 3 및 4 중량%)와 함께 각각 추가했다. 도 2a에 나타난 바와 같이, 실시예 1-3에 따라 다양한 PEO 분율에 대한 혼합물의 특성, 표면 장력, 전기 전도도 및 복합 점도(complex viscosity)의 변화를 보여준다. 알지네이트의 전기 방사를 방해하는 중요한 요인은 다 음이온(poly anion) 사이의 반발력이다. 이와 같이, 알지네이트에 PEO를 첨가하면 카르복실산 염의 이온화 정도가 감소함을 나타내는 전도도의 변화에 의해 입증된 것처럼, 다 음이온성 알지네이트 분자 사이의 반발력이 감소된다. 또한, 분자 사슬 얽힘은 카르복실산 염의 이온화 정도가 감소함에 따라 향상된다. 그러므로, 도 2a에 나타난 바와 같이, 알지네이트에서 PEO의 무게 분율이 증가할수록, 표면 장력의 감소, 전도도의 감소, 및 점도의 증가 모두 비드가 없는 섬유를 형성하는 데 유리하다. 한편, 낮은 전도성과 높은 점도는 A2P2에서 A2P4 로의 섬유 직경의 증가에 해당하는 섬유 직경을 증가시킨다.

[0112] 또한, 평행 전극 사이의 전기 방사된 A2P1, A2P2, A2P3 및 A2P4의 정렬은 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지에 설명되었고, 도 2b에 나타난 바와 같이, 섬유 분포는 회색조로 표현되었고, A2P1은 섬유질 구조를 형성하지 않았다. 그러므로 그레이 스케일의 피크는 무작위로 분포했다. 그러나, A2P2는 마이크로/나노 섬유를 형성 하였지만, 전극 사이의 정렬은 달성되지 않았다. 한편, A2P3 및 A2P4는 완전히 정렬된 구조를 갖는 평탄한 섬유 구조를 나타냈다. 정량적으로 말하자면, 반치폭(FWHM)은 각각 A2P2, A2P3 및 A2P4에서  $37.0^\circ$ ,  $8.4^\circ$  및  $12.0^\circ$  이었고, A2P3은 보다 양호한 정렬을 나타내는 가장 낮은 값을 나타냈다. 섬유의 전기방사성(electrospinnability) 및 정렬을 기반으로, 실시예 1-1 및 실시예 1-2에 따라 제조된 A2P3는 비드없는 섬유 형성 및 합리적으로 정렬된 섬유 다발을 위한 CE의 후속 파라미터 연구를 위해 선택되었다.

[0114] **실시예 4. 정렬된 마이크로/나노섬유를 생성하기 위한 최적의 처리 조건 확인**

[0115] 알지네이트와 PEO(A2P3)의 조성을 사용하여, 섬유 형성은 노즐 대 전극간 거리 및 전기장에 대하여 관찰되었다. 도 3a는 공정창(process window)과 비드 및 비드와 섬유로 구성된 구조를 보여주며, 섬유는 십자(X), 삼각형( $\Delta$ ), 및 원( $\circ$ )으로 나타난다. 이 실험에서, 유속 및 전기 방사 시간은 각각  $0.25 \text{ mL h}^{-1}$  및 3분으로 각각 고정되었다. 전기 방사 조건에서, 노즐-전극 간 거리가 10mm 미만이고, 전기장이  $0.075 \text{ kVmm}^{-1}$  미만인 경우, 안정한 알지네이트 섬유의 형성이 달성되지 않았다. 그러므로, 10-14 mm 노즐-전극 간 간격과  $0.075\text{-}0.125 \text{ kV mm}^{-1}$  전기장의 범위를 도 3b에 나타난 바와 같이, 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지로 나타낸 결과, 12 ~ 14 mm 노즐-전극 간 간격과  $0.075 \text{ kV}$  전기장 영역에서 안정된 섬유 구조(비드 없음 및 섬유 배열)가 관찰되었다. 가공 도표에 기초하여, 알지네이트 섬유를 형성하기 위한 안정한 범위를 발견했다.

[0116] 안정한 섬유를 제조하는 것 외에도 세포 생존 능력은 CE의 성공을 결정하는 중요한 요소이다. 고정된 처리 범위 (14 mm 거리 및  $0.050\text{-}0.125 \text{ kV mm}^{-1}$  전기장)에 대한 세포 생존율을 관찰하기 위해, C2C12 세포( $5 \times 10^6$  세포  $\text{mL}^{-1}$ )의 혼합물에서 A2P3을 사용했다. 도 3c는 세포가 함유되어 전기 방사된 알지네이트 섬유의 실시예 1-4에 따른 SEM 및 형광 이미지를 도시한다. 녹색과 빨간색은 각각 살아 있고 죽은 세포를 나타낸다. 높은 세포 생존율이 관찰되었지만, 예상대로,  $0.05 \text{ kV mm}^{-1}$ 을 사용하였을 때, 비 섬유질 구조가 형성되었다.  $0.075 \text{ kV mm}^{-1}$ 의 경우, 안정적으로 정렬된 알지네이트 섬유의 형성과 합리적인 세포 생존률(90 %)이 달성되었다. 그러나, 도 3d에 나타난 바와 같이,  $0.1 \text{ kV mm}^{-1}$  이상에서는 세포 생존률이 80%로 현저히 감소하고, 섬유질 구조가 크게 응축되기 시작했다. 세포에 높은 전류를 가하면 과열에 의해 막에 큰 구멍이 생겨, 결국 세포가 죽음에 이르게 되어,  $0.125 \text{ kV mm}^{-1}$ 에서 가장 낮은 세포 생존률이 관찰되었다. 그러므로, 세포가 담긴 섬유질 다발 구조를 얻기 위해

14 mm 노즐-전극전극 간 간격과  $0.075 \text{ kV mm}^{-1}$  전기장을 설정했다. 선택된 조건을 사용하여, 도 3e에 나타난 바와 같이, 구조적 안정성의 관점에서 가교 결합 전후의 섬유 다발을 평가했다. PEO가 용해된 가교 결합 처리 후의 섬유는 약간의 융합 영역을 나타내지만, 정렬된 방식에서 개별 섬유상 위상적 신호(topological cues) 및 구조적 안정성이 획득되었다.

[0117] A2P3 용액, 노즐 - 전극 간 거리 및 전기장을 설정한 후, 평행 전극의 전극 간 거리 및 전기 방사 시간의 영향을 평가하여 정렬된 섬유를 생성하였다. 전극 대 전극 거리는 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, 5 내지 40mm로 변화되었으며, FWHM과 섬유 수를 측정하였다. 5 mm 거리에서 전극이 너무 가까우므로, 섬유 침착이 불안정해질 수 있다. 도 4b에 나타난 바와 같이, FWHM은 기하 급수적으로 5 내지 30mm 거리로 감소하고, 30mm 이상에서 증가한다. 40mm에서, 침착된 섬유는 쉽게 파손되었다; 따라서, 그들은 광학 이미지에서 보여지는 것처럼 정렬된 섬유 다발로 발전되지 않았다. 또한,  $10^4 \mu\text{m}^2$  당 섬유 밀도를 측정했다. 평행 전극 거리 20 mm에서의 섬유 밀도는 다른 거리에 비해 가장 높았다. 이는 상기 거리가 전기 방사된 섬유가 증착된 전하의 가장 낮은 지점이 될 수 있기 때문이다. 그러나, 전기 방사된 섬유의 정렬이 30mm에서 가장 높기 때문에, 다음은 거리를 선택했다.

[0118] 도 4c에 나타난 바와 같이, 30mm거리를 사용하여 섬유 형성을 60, 180, 300 및 420초의 전기 방사 시간으로 평가했다. 그 결과, 도 4d에 나타난 바와 같이, 침착된 섬유의 FWHM은 180초에서 가장 낮았고, 180초 이상으로 증가시킴으로써 FWHM은 침착된 섬유의 잔류 전하 때문에 유의하게 증가하였다. 그러므로 180초가 전기 방사 시간에 최적의 선택이었다.

[0120] **실시예 5. 세포 전기방사된 세포지지체(Cell-Electrospun Scaffold; CE 세포지지체) 제작 및 시험관 내(in vitro) 세포 활동 확인**

[0121] 매개 변수 연구로부터, 세포 전기방사(cell eletrospinning; CE)는 14 mm 노즐-전극 거리,  $0.075 \text{ kV mm}^{-1}$  전기장, 30 mm 전극 간 거리 및 180 s 전기 방사 시간으로 진행되었다. 이어서, 실시예 1-5에 따른 CE 공정은 도 5a에 각각 도시된 바와 같이, 세포 프린팅(cell printing; CP) 공정과 비교되었다. CP 공정은 조직 공학에서 실시예 1-9에 따른 세포 활동을 관찰하기 위해 심도있게 연구되어 왔으며, 그래서, CP 세포지지체(scaffold)를 대조군으로 설정했다. 구체적으로, CP 공정은 세포 활동에 대한 미세위상 신호(microtopological cue)의 효과를 비교하기 위해 선택되었다. CP 세포지지체(scaffold)를 제조하기 위해, CE 세포지지체에 사용된 동일한 바이오잉크, C2C12 세포 함유 A2P3 및 120 kPa 공기압 및  $10 \text{ mm s}^{-1}$  노즐 이동 속도로 작동되는 3D 프린터가 사용되었다. CP 및 CE 세포지지체는 직경 70-100  $\mu\text{m}$ , 길이 30 mm의 단일 버팀대(a single strut)으로 제작되었다. 또한, 실시예 1-6에 따른 면적 당 세포 수( $\text{mm}^2$ )를 측정하였으며 CP 세포지지체 및 CE 세포지지체에 대해서는  $1868 \pm 190$  및  $1906 \pm 265$ 이었다. 세포 수는 두 개의 세포지지체 사이에서 각각 유사했다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 광학 및 실시예 1-4에 따른 SEM 이미지는 CP 세포지지체와 CE 세포지지체 사이에 다른 표면 형태를 보여준다. CP 세포지지체는 세포가 포함된 비교적 매끄러운 표면을 보였으나, CE 세포지지체는 세포가 함유된 배열된 미세 섬유를 보였다. 제작된 모든 인공 세포지지체는 도 5a의 생존/사멸 이미지에서 90 % 이상의 in situ 세포 생존력을 나타내었으며, 그 공정은 생체적합성 플랫폼으로 입증되었다.

[0122] CP 세포지지체 및 CE 세포지지체의 특성은 도 5b 내지 도 5c에 나타난 바와 같다. 즉, 2 중량%  $\text{CaCl}_2$ 를 2분간 사용하여 가교 결합 공정 전후의 독성을 평가하기 위해, 도 5b에 나타난 바와 같이, in situ 세포 생존력을 측정하였다. 통계적으로, 가교 결합 공정은 세포를 포함하나 인쇄되지 않은 순수한 바이오잉크 및 두 세포지지체에 대한 세포 생존률에 영향을 미치지 않는다. 이것은 제조 및 가교 결합 공정이 세포에 적용 가능하다는 것을 의미한다. 또한, 실시예 1-7에 따른 인장 시험(tensile test)은 도 5c에 나타난 바와 같이, 일축 인장 시험기(uniaxial tensile machine)를 사용하여 수행되었다. 응력 - 변형률 곡선(the stress-strain curves)을 얻었고, 초기 기울기에 의해, 인장 탄성률(tensile modulus)은 각각 CP 세포지지체와 CE 세포지지체에 대해  $5.1 \pm 1.0$ 과  $5.0 \pm 2.9 \text{ MPa}$ 로 측정되었다. 인장 계수(tensile moduli)가 크게 다르지는 않았지만, CE 공정을 사용하여 제작된 개별 마이크로 섬유가 균일하게 분포된 응력 집중(stress concentration)으로 인해 보다 효율적으로 늘어났기 때문에, CE 세포지지체는 최대 인장 강도(maximum tensile strength) 및 변형률(strain)이 더 높다는 것을 확인하였다.

[0123] 도 5d 내지 도 5g에서는 CP 지지체 및 CE 지지체의 시험관 내 세포 활성이 평가되었다. 두 세포지지체 모두 실

시에 1-8에 따른 배양 1일과 7일 동안 90 % 이상의 높은 세포 생존률을 유지하였는 바, 도 5d 및 도 5e에 나타난 바와 같이, 이는 세포지지체가 배양 시간을 증가시키기 위한 생체 적합성 환경임을 나타냈다. 또한, 7일째의 세포 증식률을 1일째의 세포 증식률과 비교하였을 때, 도 5f에 나타난 바와 같이, CP 세포지지체 및 CE 세포지지체에 대한 결과는 각각 122 % 및 121 %였다. 살아있는 세포가 구조에 성공적으로 자리 잡은 후, 그들은 대사 기능을 증식시키고 유지할 수 있었다. 개념 증명으로, CE 세포지지체는 작은 직경(약 60  $\mu\text{m}$ )으로 제작되어 섬유 구조에 포함된 여러 개의 개별 세포를 입증했다. 도 5g에 나타난 바와 같이, 광학 이미지는 마이크로/나노 섬유 구조와 알지네이트 미세 섬유를 따라 위치한 세포를 나타낸다. 세포는 / 이미지에서 살아 있었고, F-actin은 1 일째에 diamidino-2-phenylindole (DAPI) / phalloidin 이미지의 핵 주변에서 발현되었다. 또한, MHC의 발현은 또한 7일째에 관찰되었지만, 세포 대 세포 상호 작용을 위해서는 보다 긴 세포 배양 기간이 필요하였다. 물리적인 지지 없이, CE 공정을 사용하여 제조된 섬유 구조체는 낮은 기계적 안정성으로 인해 쉽게 구부러지거나 변형 될 수 있다. 따라서 성공적인 이식(implant)을 얻기 위한 기계적 향상이 필요하다.

#### [0125] 실시예 6. 하이브리드 구조를 이용한 세포-포함 섬유 다발의 기계적 보장

[0126] 기계적 안정성을 높이기 위해, CP 세포지지체와 CE 세포지지체에는 도 6a에 나타난 바와 같이, 300  $\mu\text{m}$ 의 PCL 버팀대가 보충되었다. 개략적인 이미지에서 볼 수 있듯이, 실시예 1-5에 따른 CP 및 CE 공정에 세포가 함유된 바 이오잉크와 세포가 함유된 미세 섬유로 덮인 원통형 PCL로드가 각각 적용되었다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 광학 이미지에 의해, PCL 버팀대의 유/무에 따른 구조의 형태가 증명되었다. PCL 버팀대가 없으면 CP 및 CE 세포 지지체는 매우 유연하며鉗자(forceps)를 사용하여 취급할 때 쉽게 구부릴 수 있다. PCL 버팀대를 지지 구조로 사용했을 때는,鉗자(forceps)를 사용하여 취급했을 때도 세포지지체는 원래 모양을 유지했다. 또한, PCL 버팀대의 실시예 1-7에 따른 인장 특성은 도 6c에 나타난 바와 같이, 인쇄 및 전기 방사된 알지네이트와 비교되었다. PCL의 탄성계수(modulus)는  $107.1 \pm 12.8\text{MPa}$ 로, PCL 버팀대를 사용하지 않은 CP 및 CE 세포지지체에 비해 월등히 우수하다. 도 6d에서는 PCL 버팀대를 사용하는 세포 지지체의 DAPI / phalloidin 이미지의 단면을 나타낸다. 1일째에, 세포는 CP 및 CE 세포지지체 표면에 고르게 분포되었다. 이어서, 세포는 7일 동안 증식하였고, 두 세포지지체 상에 있는 세포의 세포 골격은 확대되었고, 도 6a의 개략도에 의해 입증된 바와 같이, PCL의 표면을 완전히 덮었다. 또한, 근육 모방 다발 구조를 형성하기 위해, 도 6e에 나타난 바와 같이, 수십 개의 세포-함유된 PCL 버팀대를 적층할 수 있다. 이 방법에 의해, 근육-모방 다발 구조는 거시적인 크기로 형성될 수 있으며, 이것은 임상 적용을 위한 보다 현실적인 구조가 될 수 있다.

#### [0128] 실시예 7. 분화(Differentiation)를 포함한 시험관 내 세포 활동(In vitro Cellular Activities) 확인

[0129] 실시예 1-9에 따른 세포 활동은 PCL 버팀대가 보충된 CP 및 CE 세포지지체를 사용하여 조사되었다. 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, 세포 생존능은 PCL이 없는 세포지지체로부터 수득 된 것, 즉, 실시예 1-8에 따른 배양 7 일 동안 CP 및 CE 세포지지체 모두에 대해 90 % 이상에 상응하였다. 이는, PCL 버팀대를 사용한 실시예 1-5에 따른 CP 및 CE 공정은 함유된 세포에 대해 안전하고 생체 적합하다는 것을 보여준다. 또한, 세포 형태학은 도 7c에 나타난 바와 같이, 실시예 1-4에 따른 SEM에 의해 캡처되었다. 7일 째에, CP 세포지지체 상의 세포는 PCL 버팀대의 표면 상에 원형으로 부착되었다. 한편, CE 세포지지체 상의 세포는 마이크로/나노 섬유의 방향을 따라 이방성으로 신장되었다. 또한, 도 7d에 나타난 바와 같이, DAPI/phalloidin 이미지는 CP 세포지지체 상의 둥근 세포 및 CE 세포지지체 위의 일축 연신된 세포의 동일한 특징을 나타낸다. 정량 분석을 위해, DAPI/phalloidin 이미지는 F - actin의 종횡비(aspect ratio)와 배향(orientation)으로 측정되었다. CE 세포지지체와 CP 세포지지체를 이용하였을 때, 2D 배양판에서의 세포 거동이 완전히 다르기 때문에, 미세 패턴 유무에 따른 3D 환경에서의 세포 형태를 비교하였다. 도 7e에 나타난 바와 같이, 세포 신장을 나타내는 F- 액틴 종횡비는 CE 세포지지체가 CP 세포지지체보다 2.8배 더 높았다. 또한, F- 액틴 배향은 FWHM으로 나타내었으며, 더 낮은 값은 보다 우수한 세포 정렬을 나타냈다. CE 세포지지체의 FWHM은 CP 세포지지체의 FWHM보다 3.0배 낮았는데, 이는 FWHM 12 ° 에서 정렬된 섬유상에서 성장할 수 있었기 때문이다. 즉, CE 세포지지체는 지지체 표면상의 정렬된 유도에 의해 세포 신장 및 정렬에 보다 유리하다.

[0130] 근원 분화(myogenic differentiation)의 정도는 미오신 중쇄(Myosin heavy chain; MHC) 및 근절(sarcomeric)  $\alpha$ -actin 염색으로 평가하였다. CP 세포지지체가 함유된 세포에게 위상학적 신호를 제공 할 수 없으므로, CE 세포지지체에 대한 근원 분화를 관찰하기 위해, 음성 대조군으로 사용되었다. 도 7f에 나타난 바와 같이, 근관(myotube) 형성에 필요한 단백질인 MHC는 7, 14, 21일에 근육형성(myogenesis)를 나타내기 위해 발현되었다.

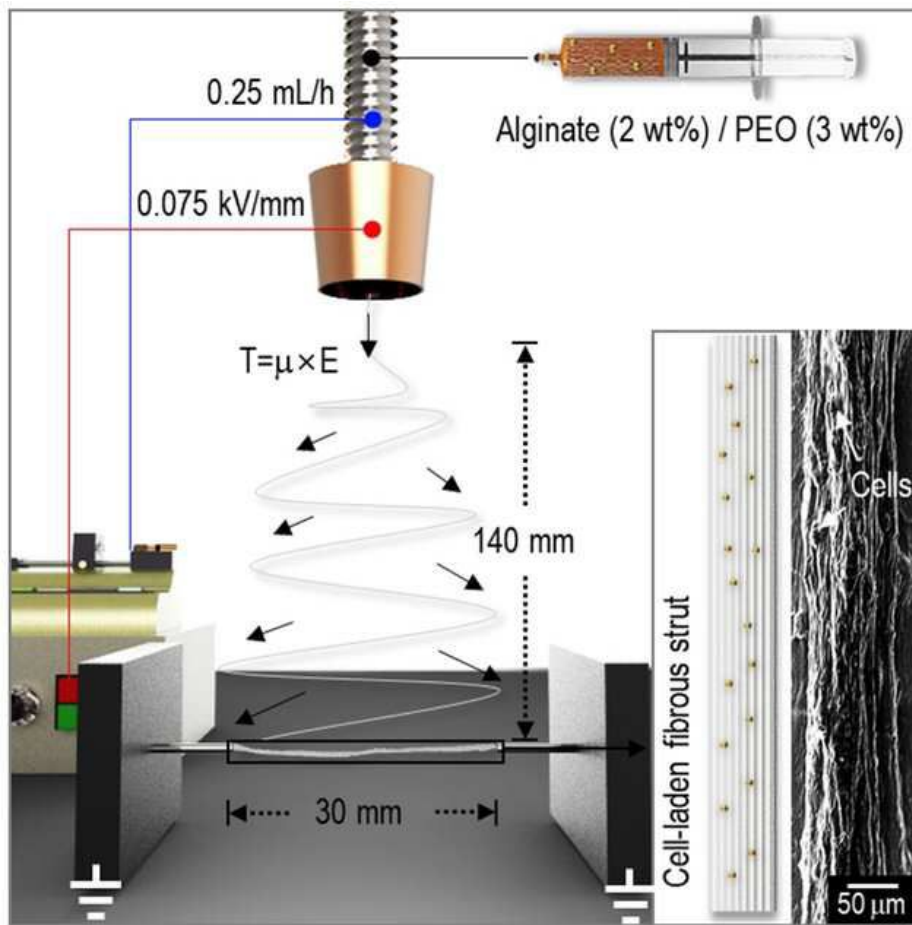
CP 세포지지체는 21일에 걸쳐 다극 형태(multipolar morphology)로 MHC 발현을 보인 반면, CE 세포지지체상의 MHC는 일축 방향(uniaxial direction)으로 배열되고 합류되었다. 도 7g는 총 핵 수에 대한 MHC-양성 핵의 비율을 나타내는 MHC 양성 지수를 나타낸다. CE 세포지지체의 MHC 양성 지수는 7일에서 약 90 %에 이르렀지만, CP 세포지지체의 값은 34 %에 불과했다. 도 7h에 나타난 바와 같이, MHC 양성 핵 중에서, 융합 지수를 나타내기 위해 두 개 이상의 핵을 가진 MHC 영역이 통합되었다. CE 세포지지체의 융합 지수는 14 일째에 CP 세포지지체의 융합 지수보다 1.6배 높았으며, 이는 90% 이상으로, CE 세포지지체상의 MHC-양성 세포가 융합 구조로 전개되기 시작한 것을 나타낸다. 성숙 지수(maturation index)는 도 7i에 나타난 바와 같이, 5 개 이상의 핵을 갖는 MHC의 수, 2개 이상의 핵을 갖는 MHC의 수에 의해 계산되었다. 21일째에 CE 세포지지체는 CP 세포지지체보다 유의하게 높은 성숙 지수를 나타내었고, 70 % 이상에 도달했다. 상기 결과로부터, 성숙한 분화 단계로의 세포 융합 및 발달은 정렬된 섬유질 구조에 의해 효과적으로 달성되었다. 근관(myotube)의 성숙한 분화 단계를 확인하기 위해, 21일째에 근절(사코메트릭; sarcomeric) 구조가 발현되었다. 이는  $\alpha$ -actin과 Z line으로 정확하게 배열된 다핵화된 근관(myotube)에서만 발견될 수 있기 때문이다. 도 7j에 나타난 바와 같이, 광학 이미지는 실시예 1-8에 따른 배양 21일 후에 족집게로 옮겨진 배양된 샘플을 증명한다. 형광 이미지는 CE 세포지지체에서 현저하게 발달된 정렬된 다핵 근절(sarcomeric) 구조를 보여준다. 이러한 결과는 CE 세포지지체상의 섬유 구조가 단방향 어레이에서 세포-세포 상호 작용, 근관 형성, 및 융합을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0132]

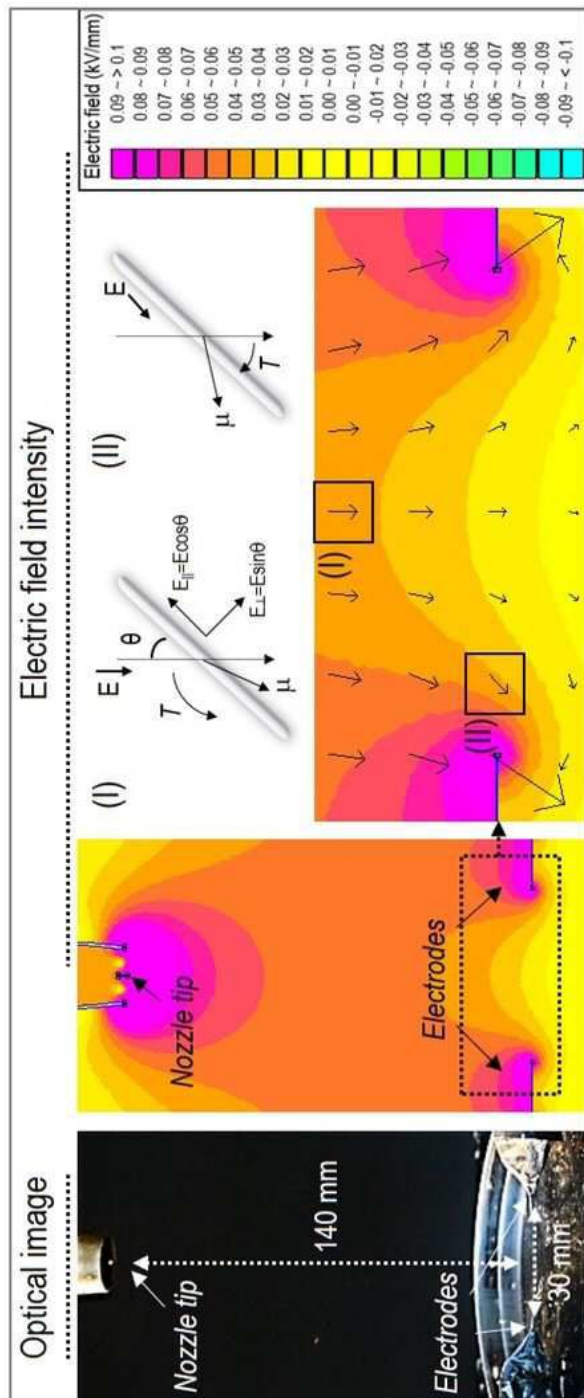
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

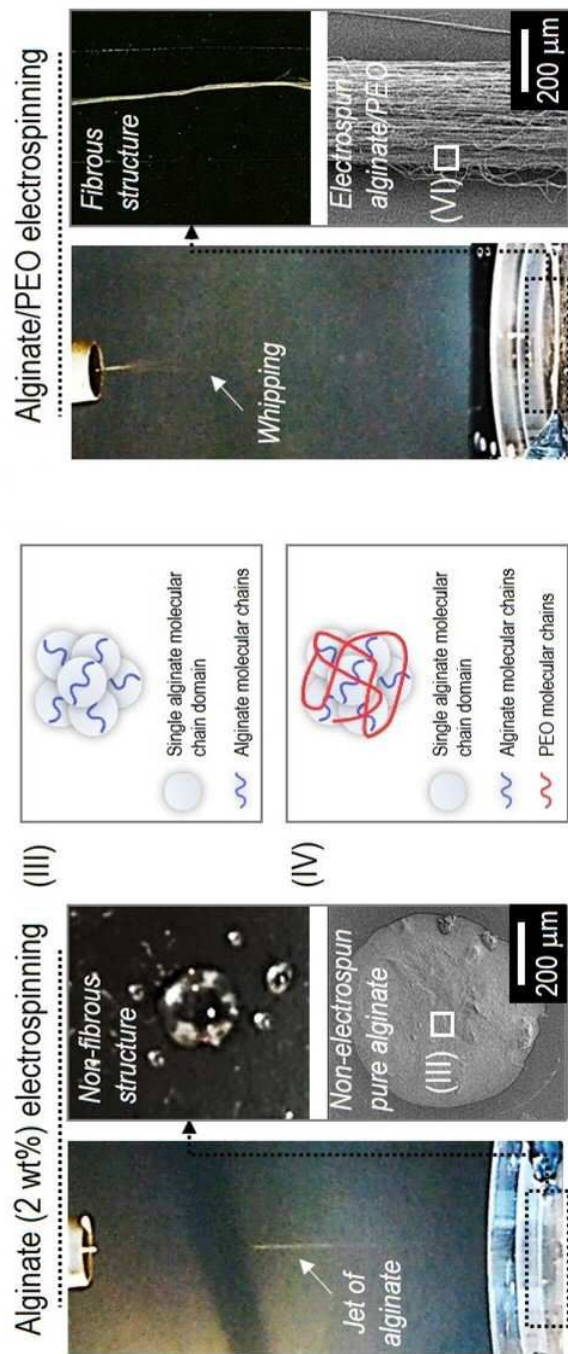
도면1a



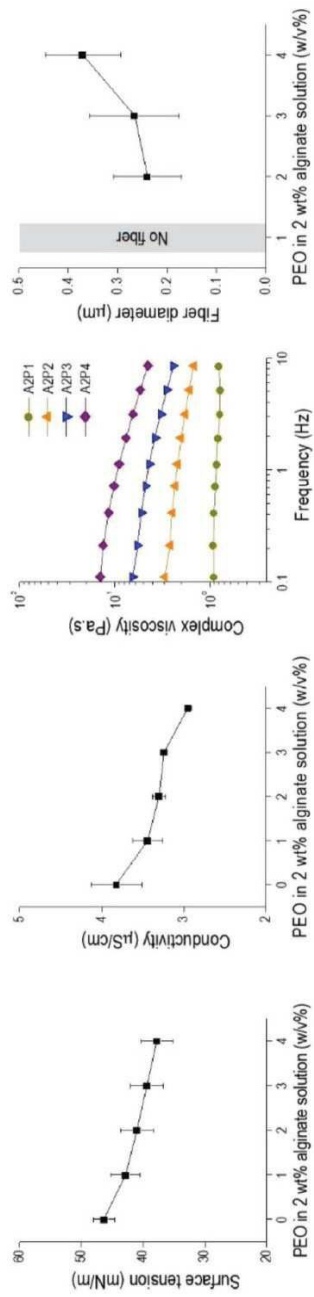
도면1b



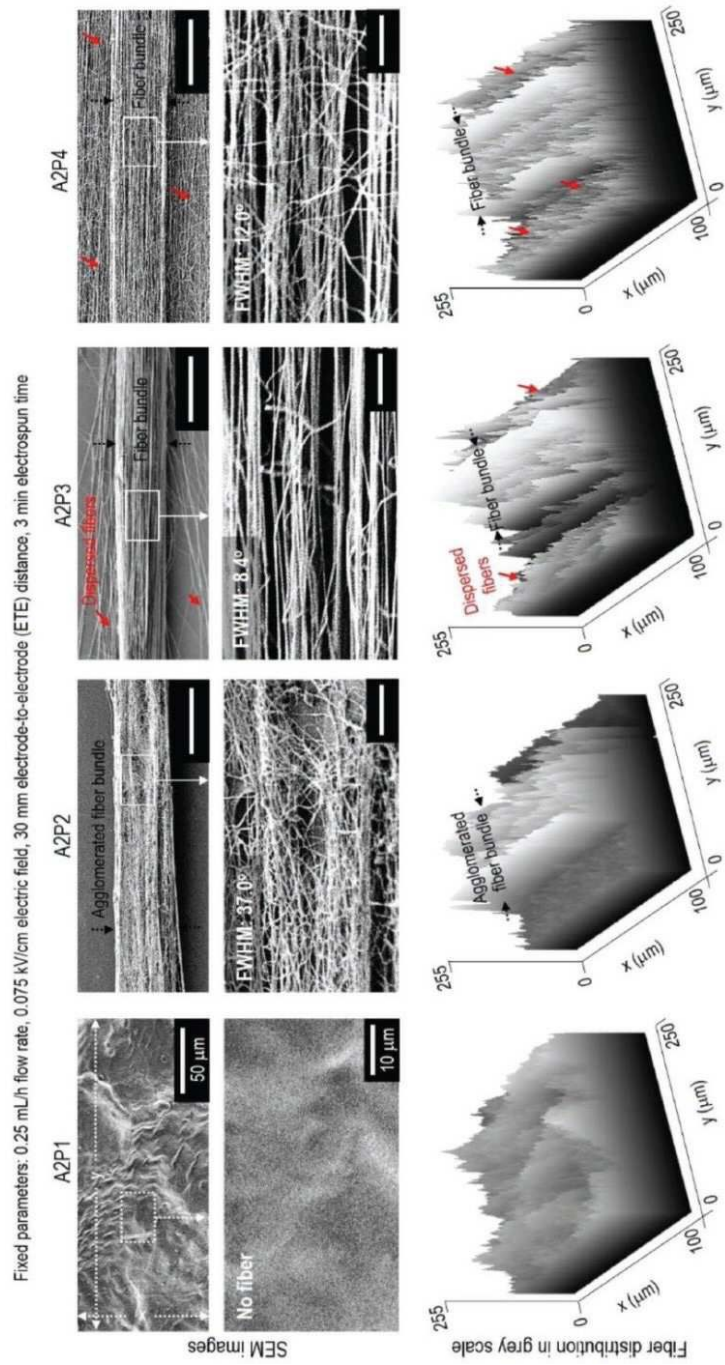
도면1c



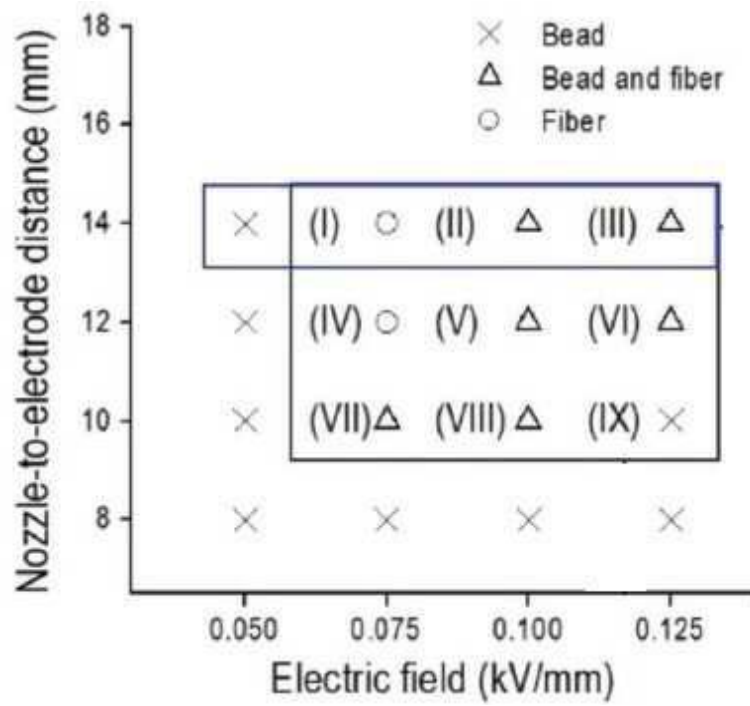
도면2a



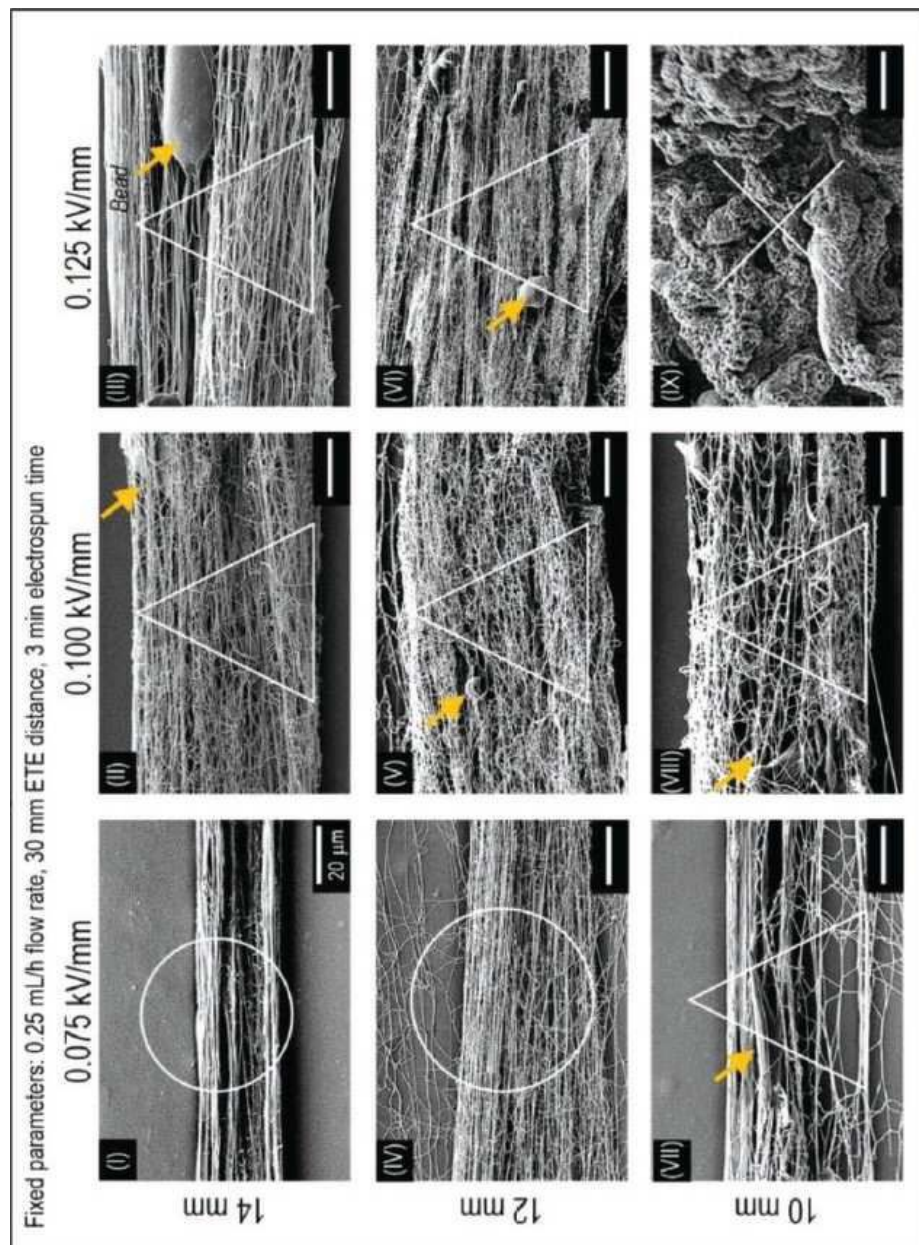
도면2b



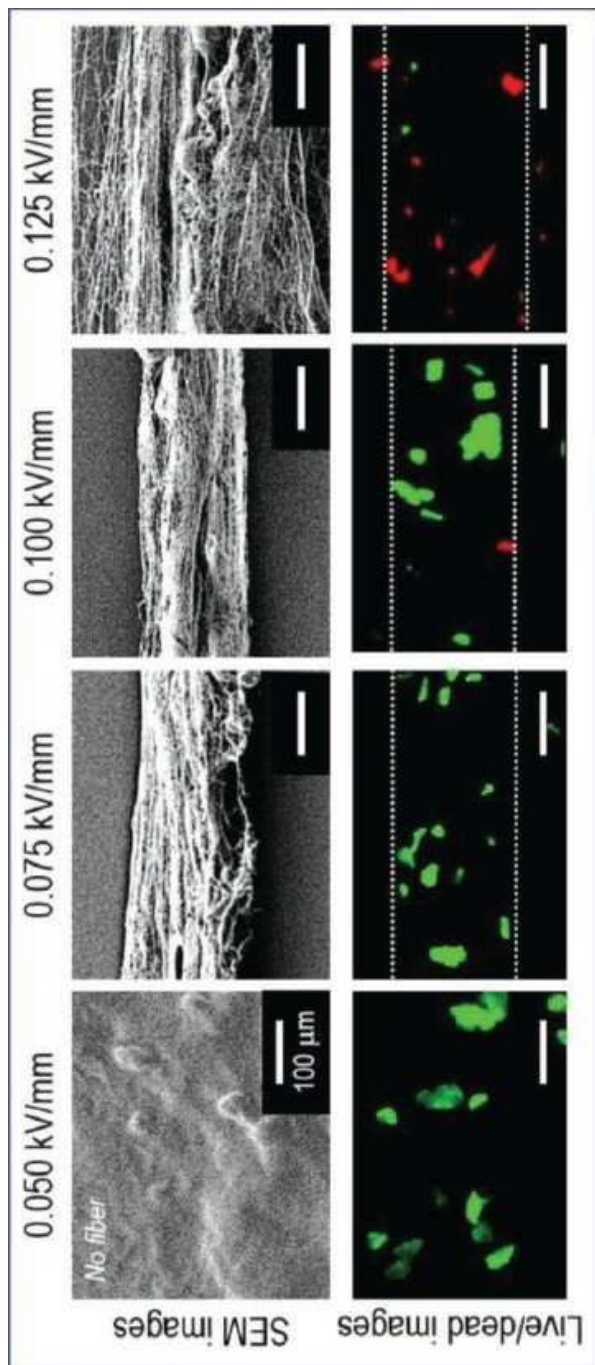
도면3a



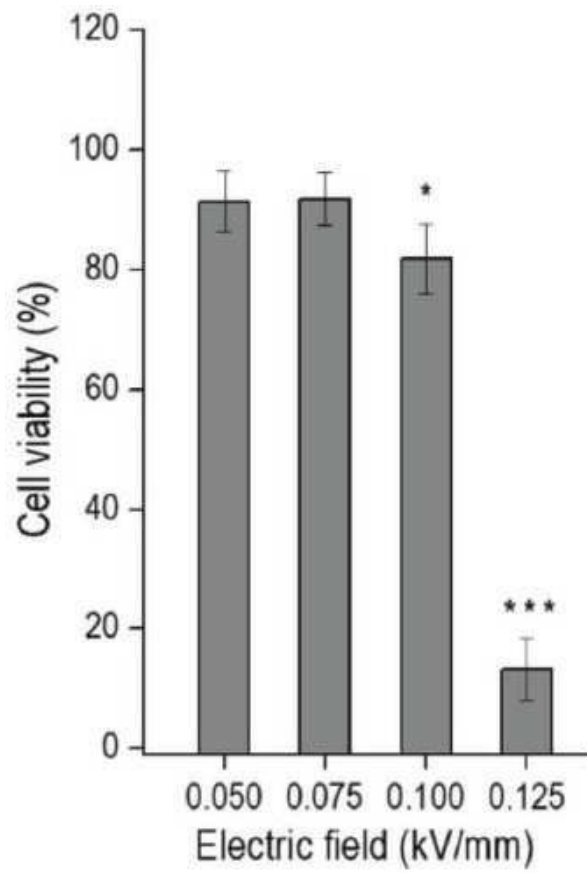
도면3b



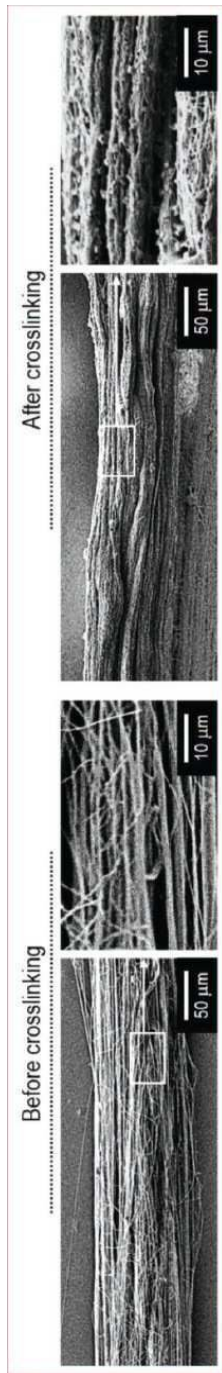
도면3c



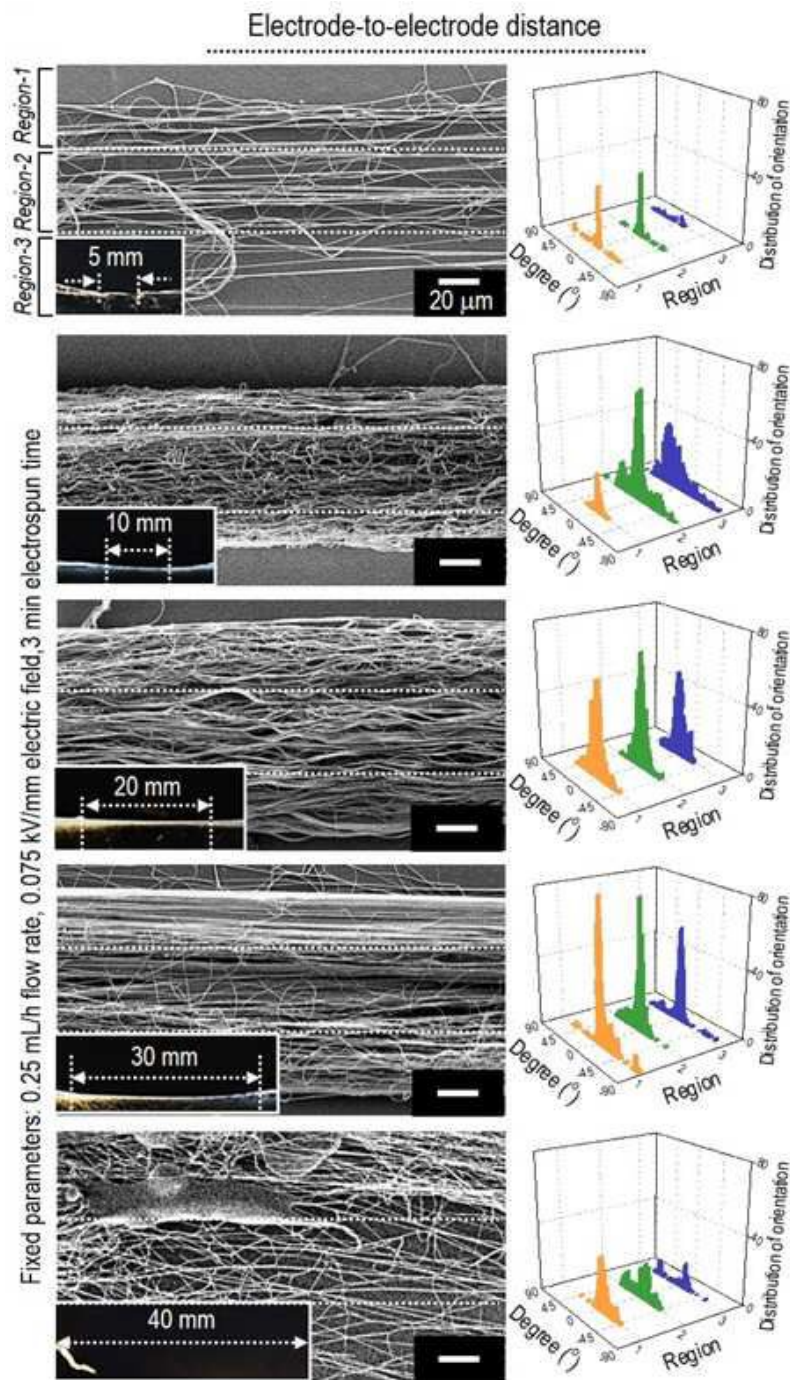
도면3d



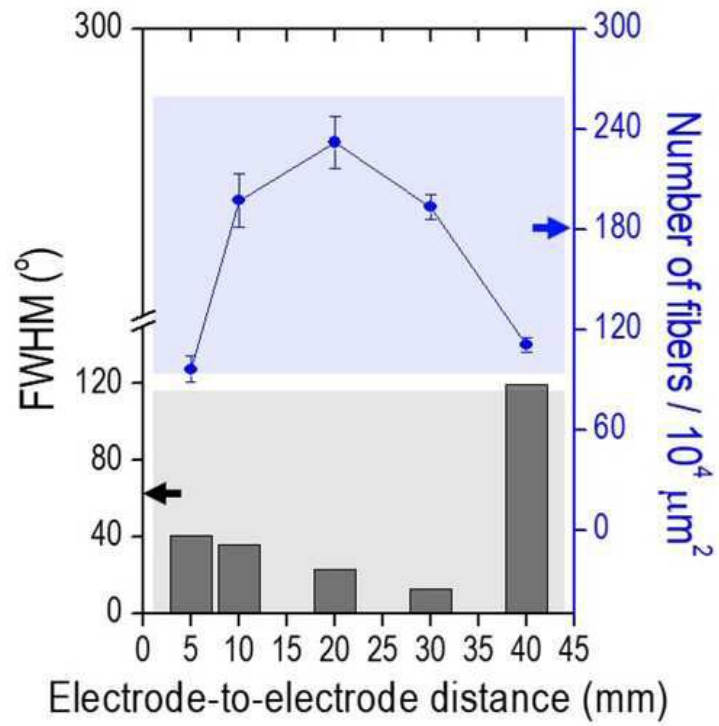
도면3e



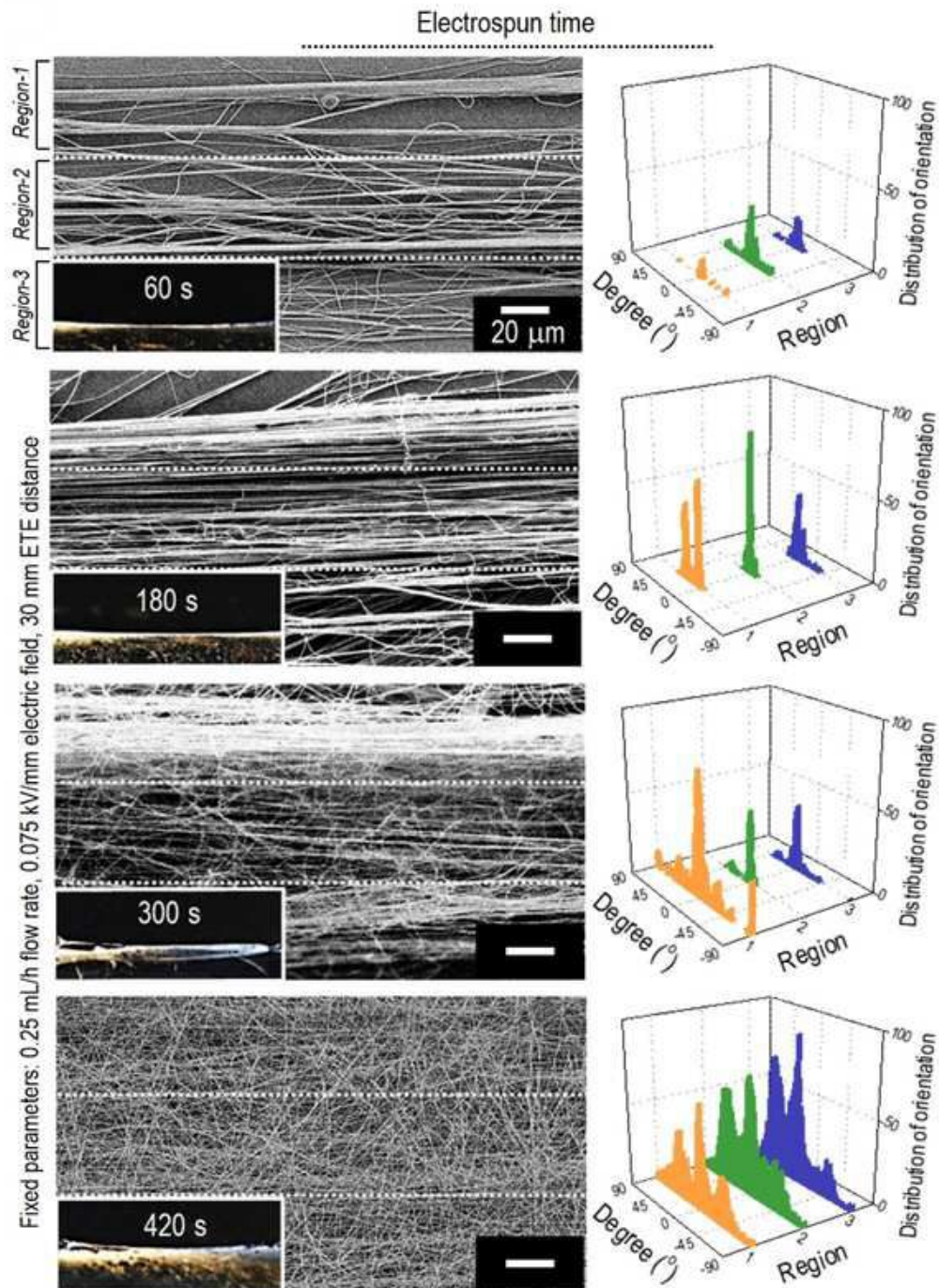
도면4a



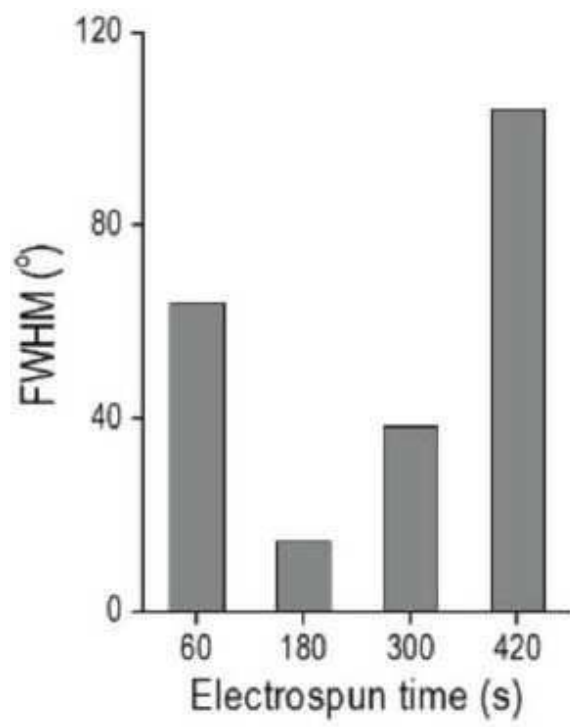
도면4b



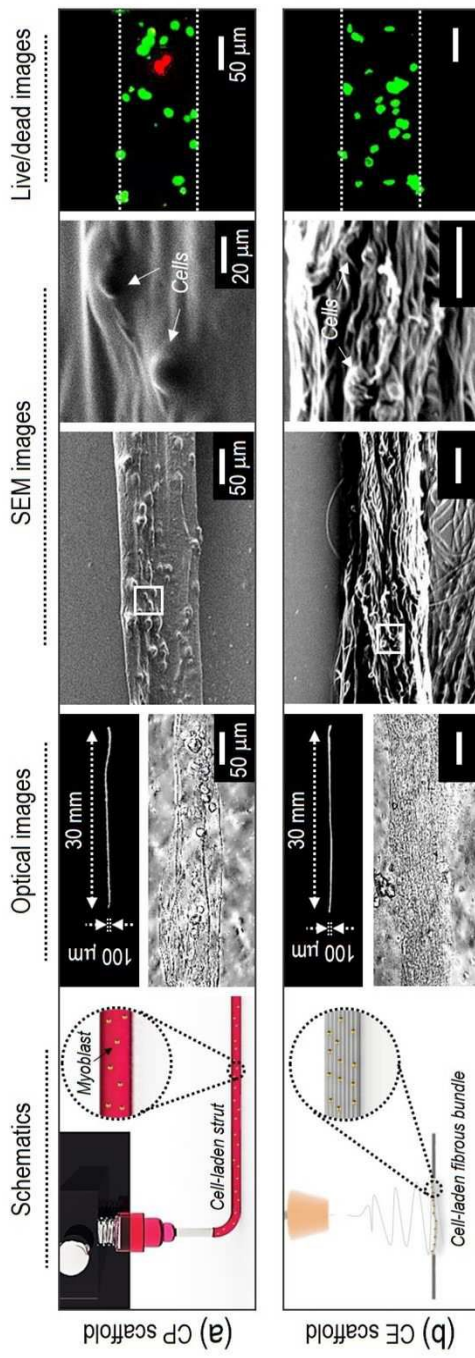
도면4c



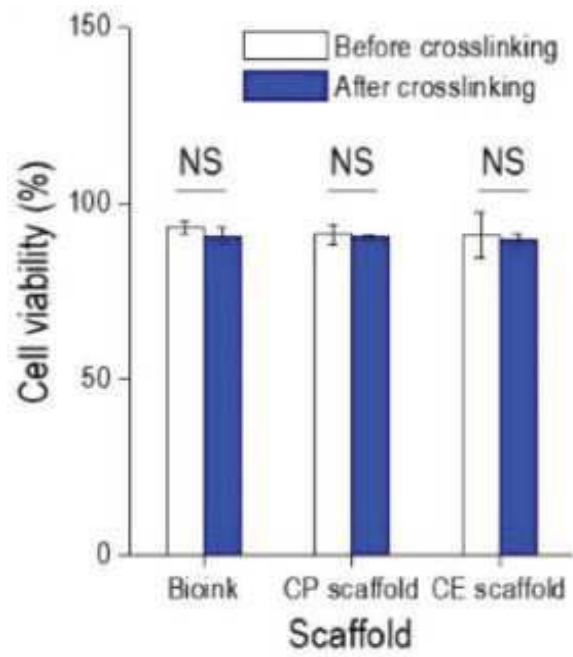
도면4d



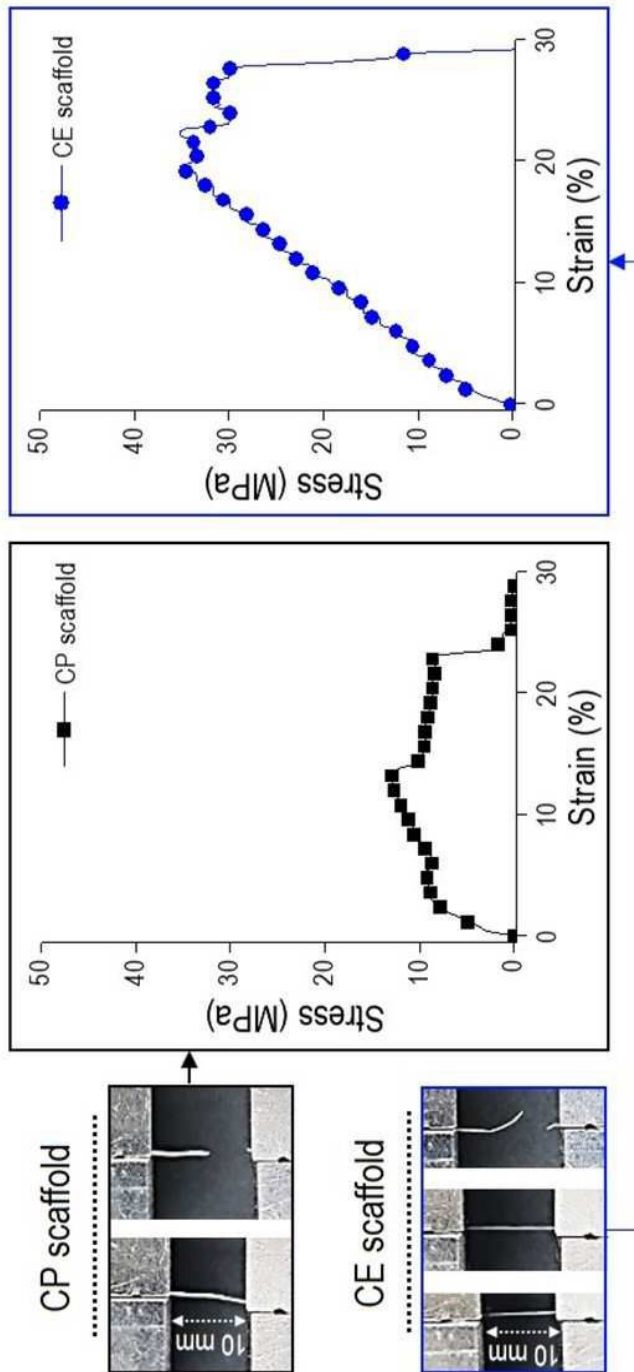
도면5a



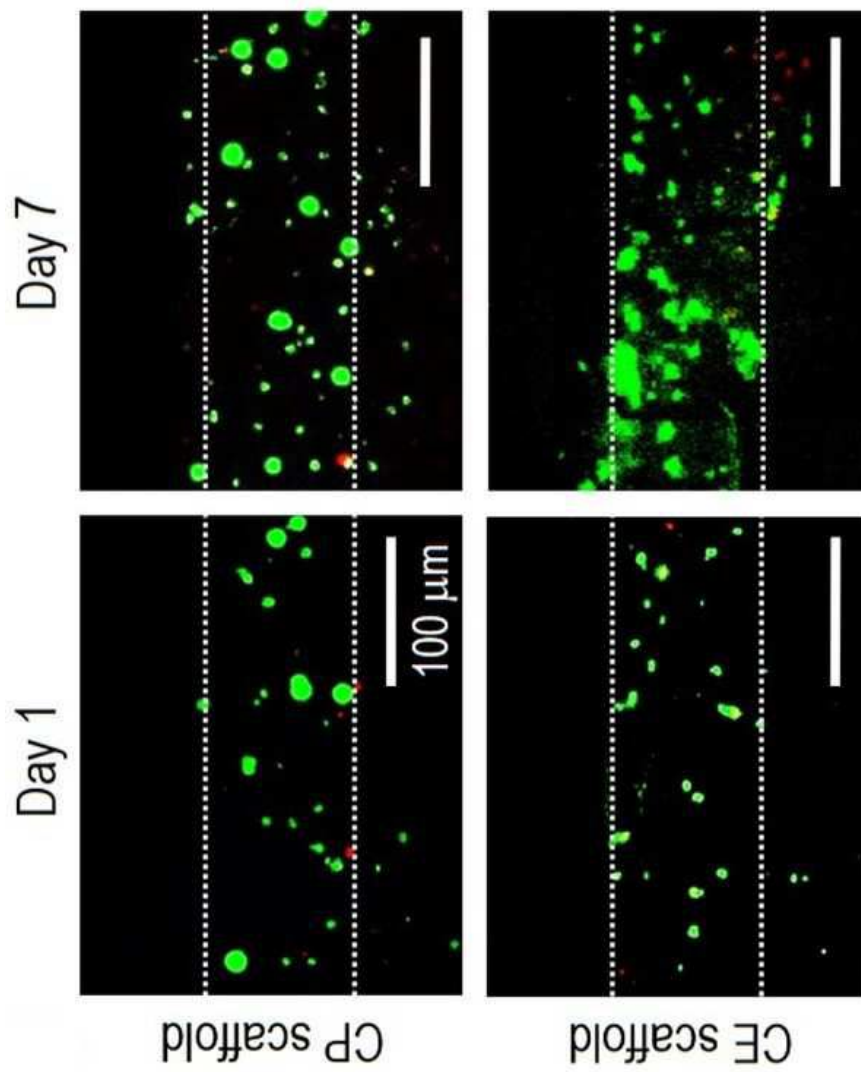
도면5b



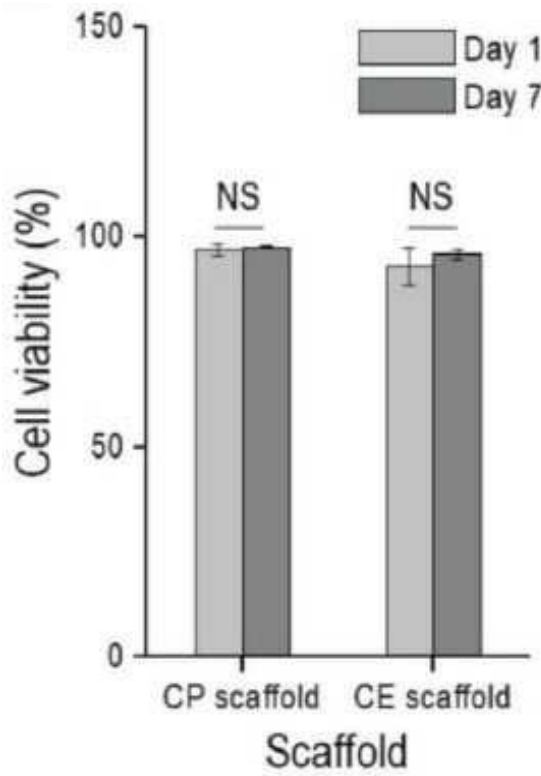
도면5c



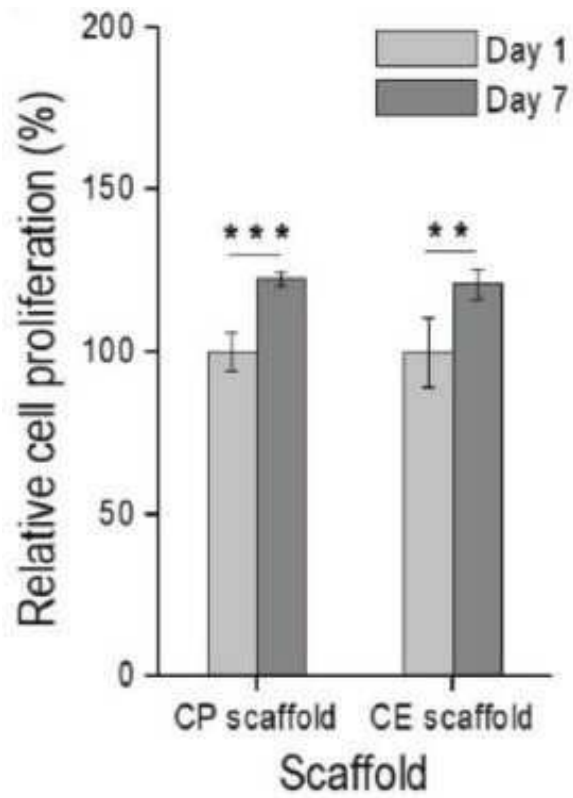
도면5d



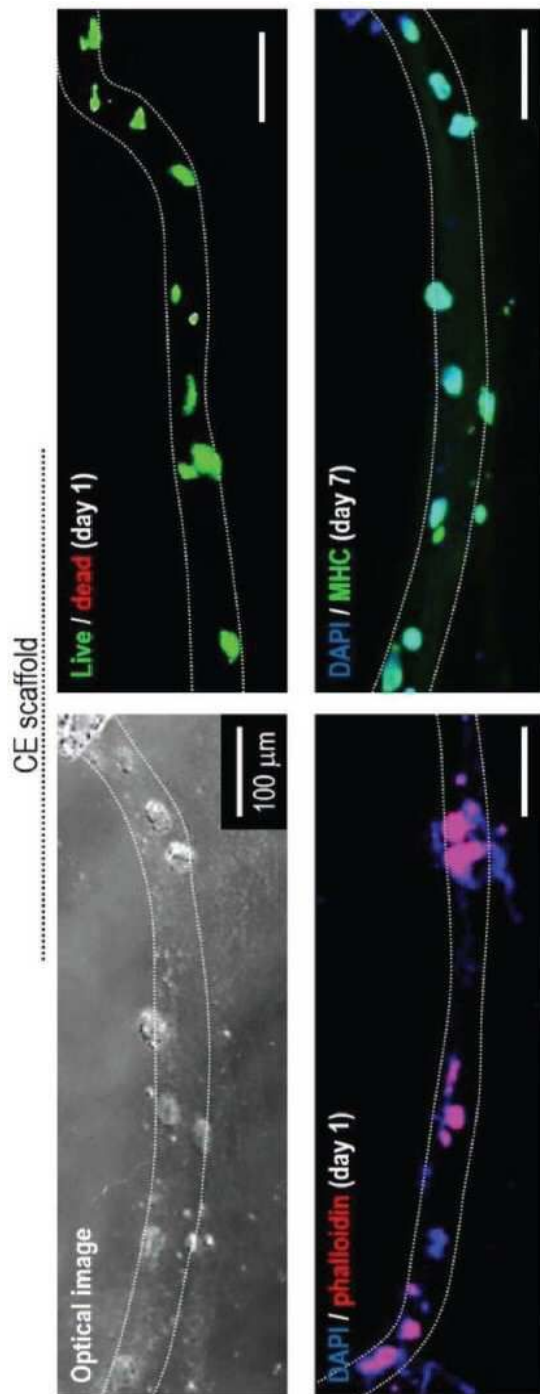
도면5e



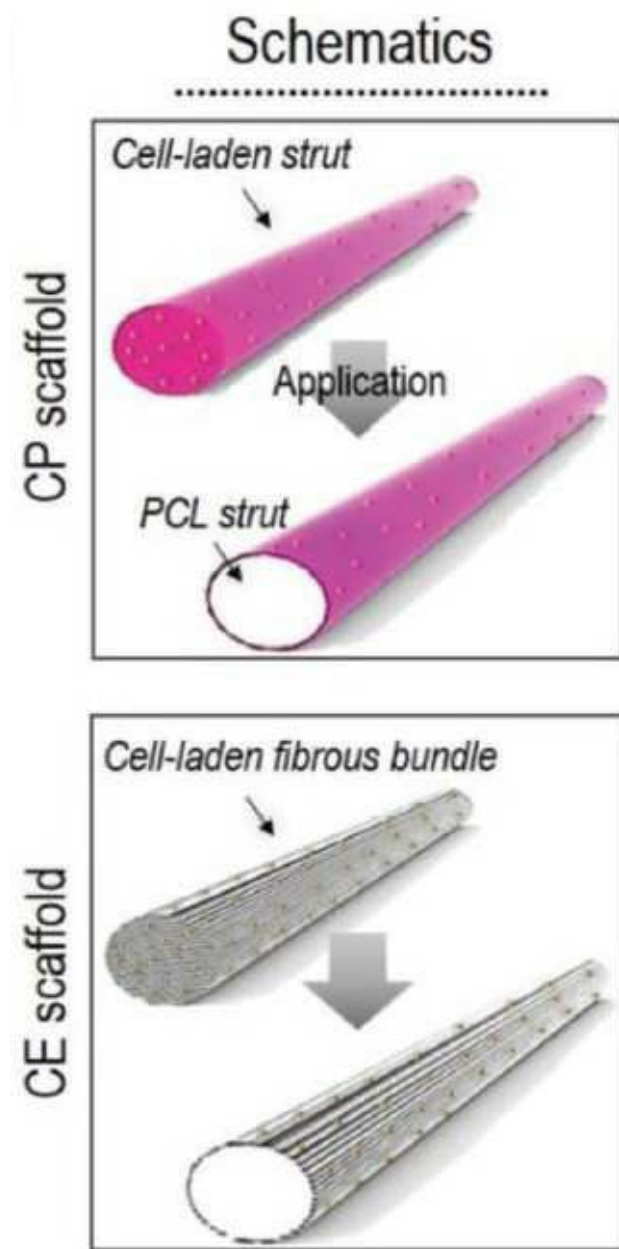
도면5f



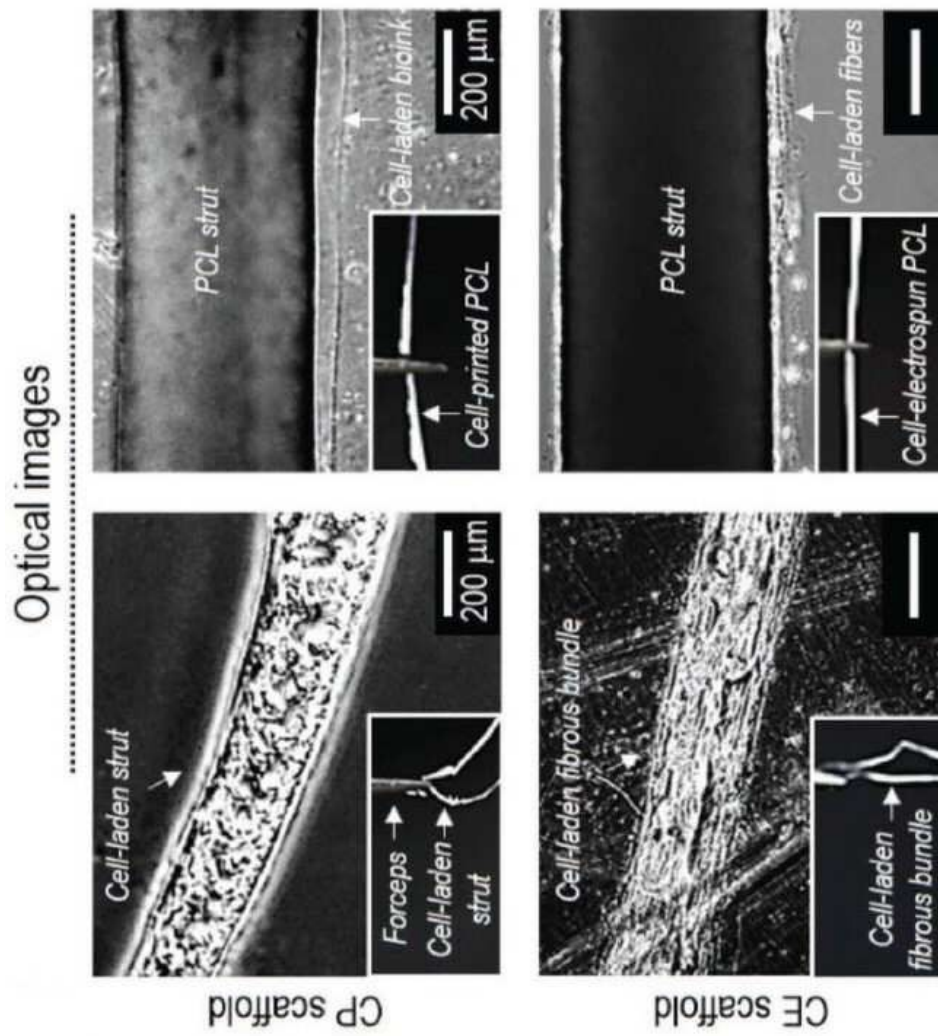
도면5g



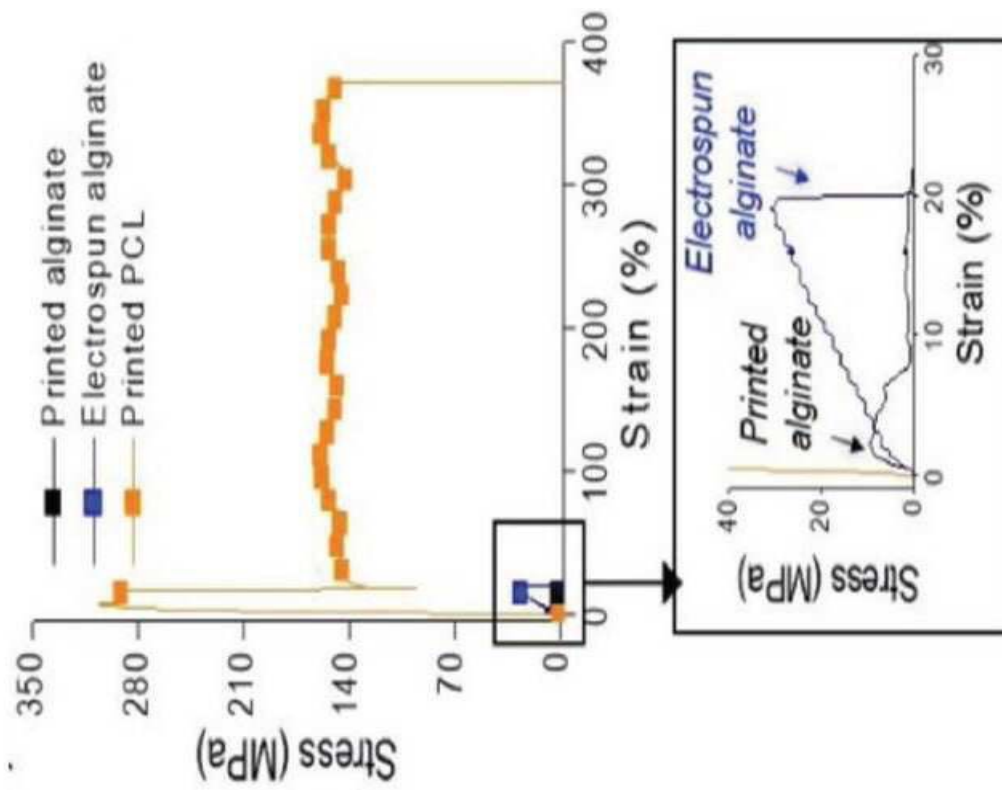
도면6a



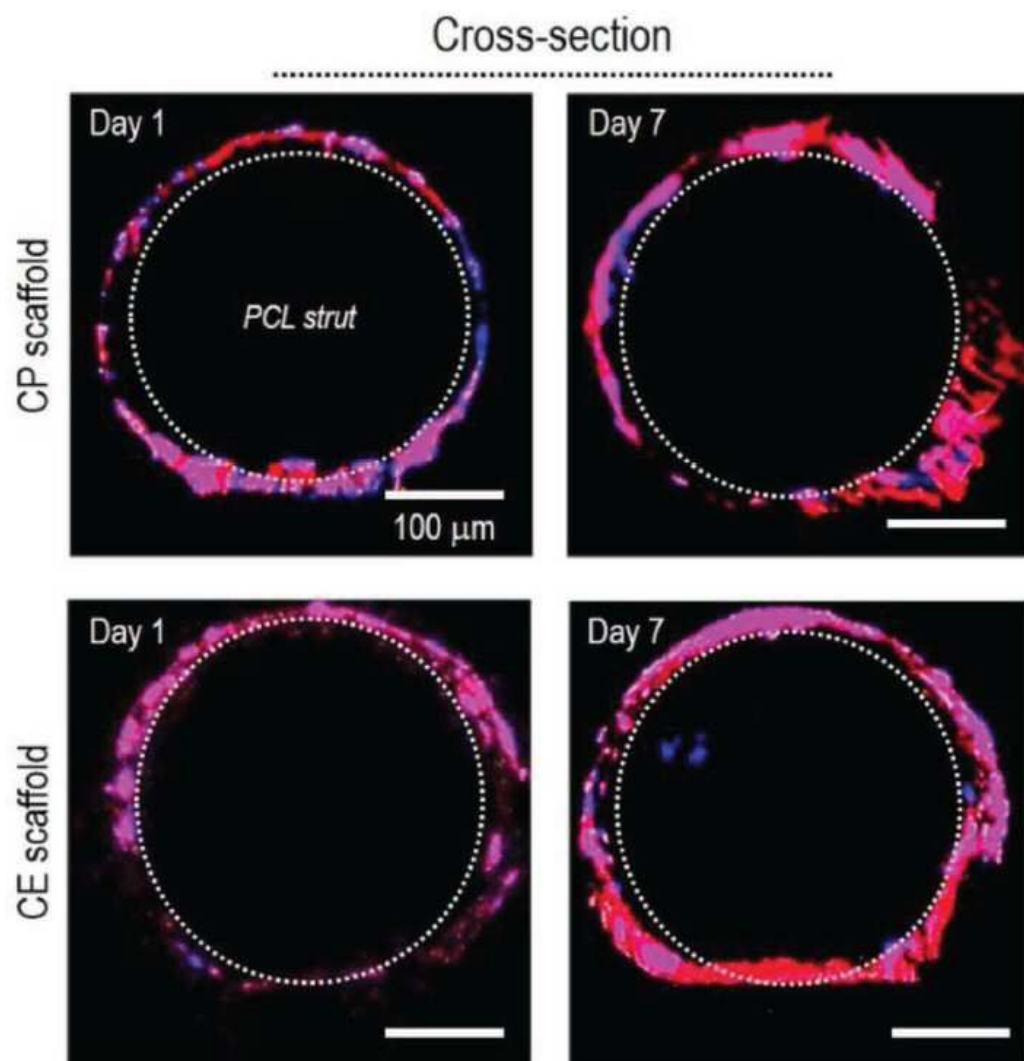
도면6b



도면6c

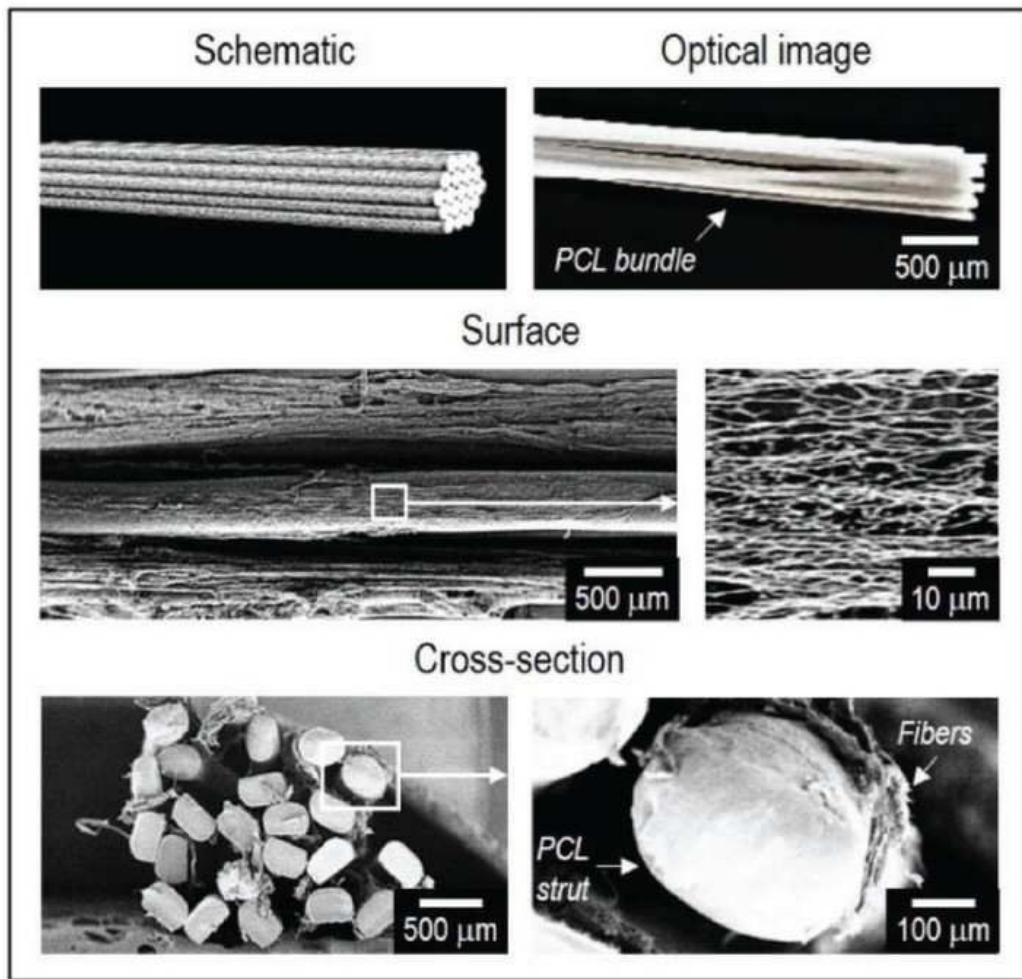


도면6d

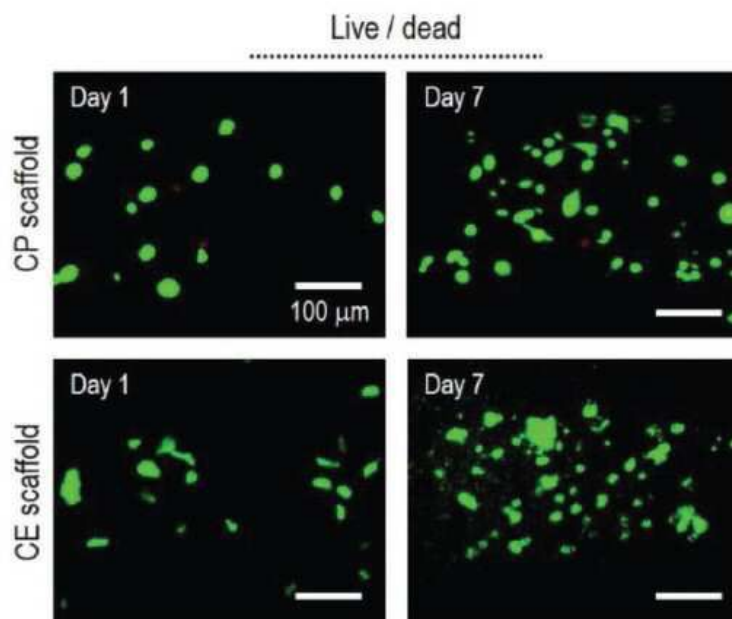


도면6e

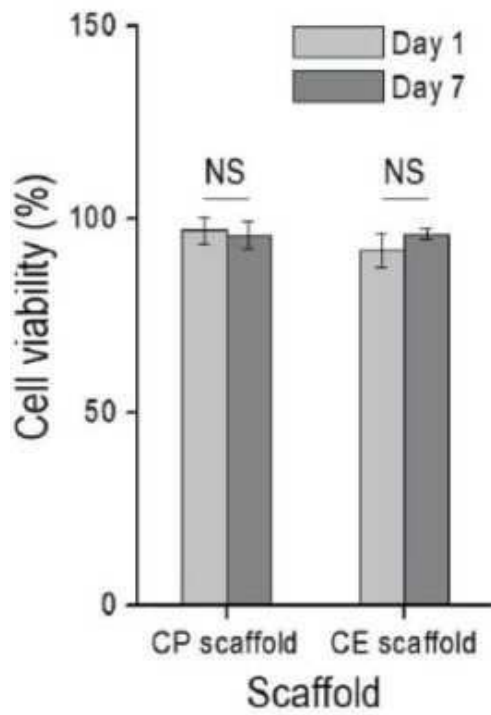
# Muscle-mimetic electrospun PCL bundle structure



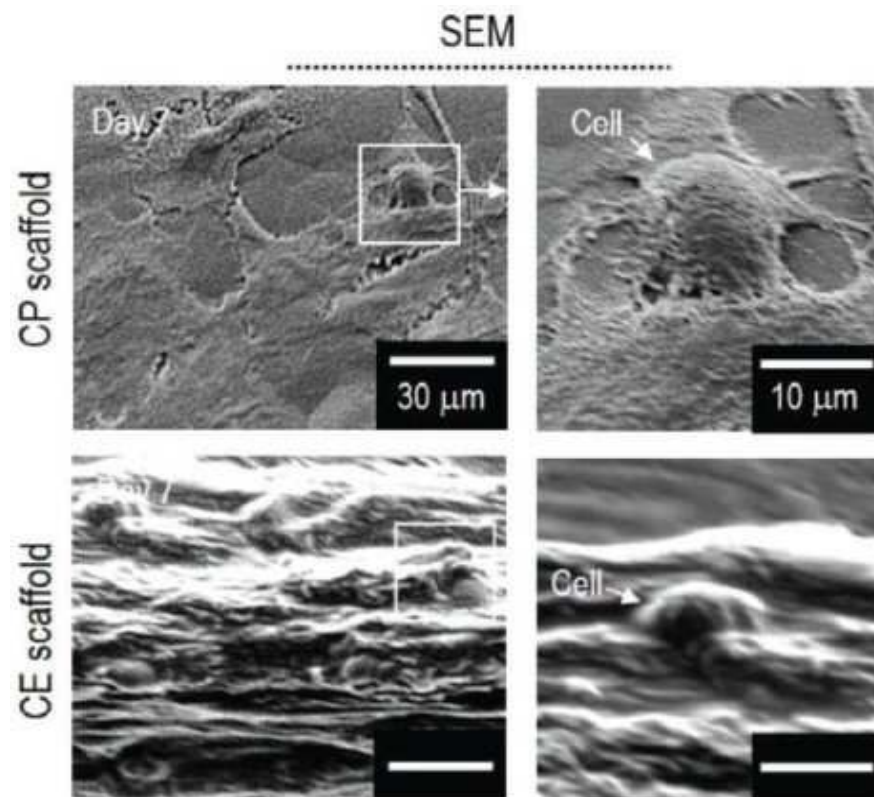
도면7a



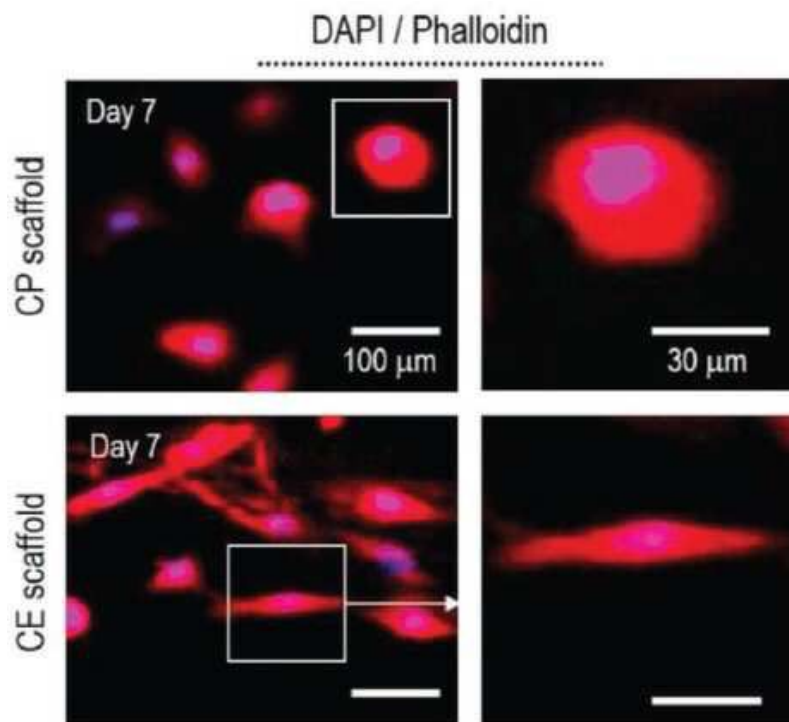
도면7b



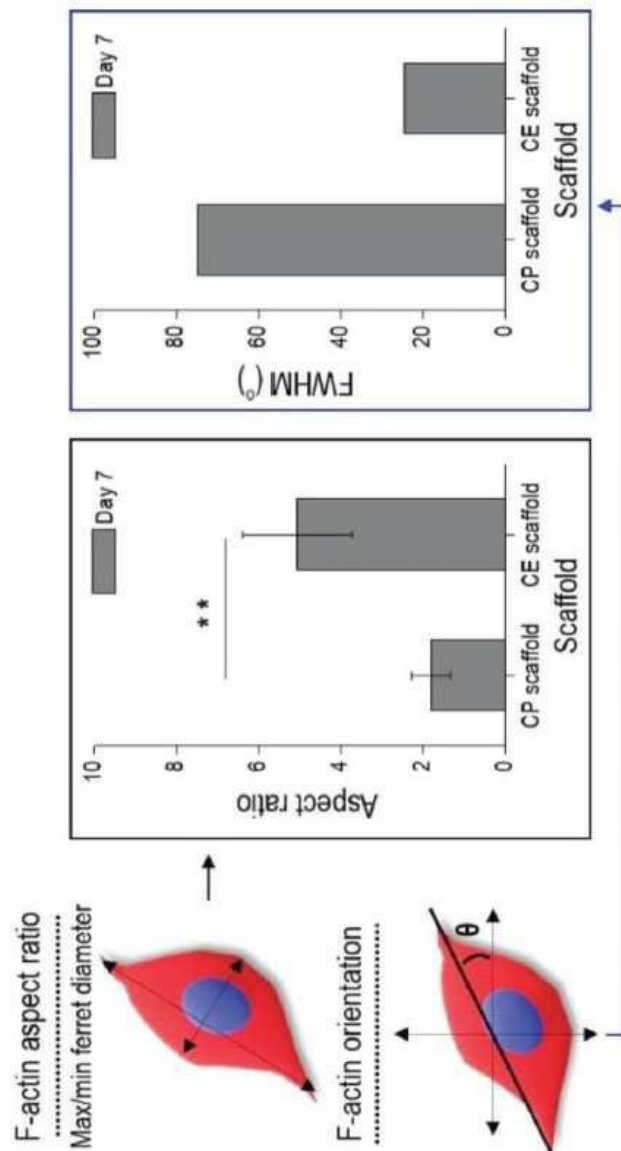
도면7c



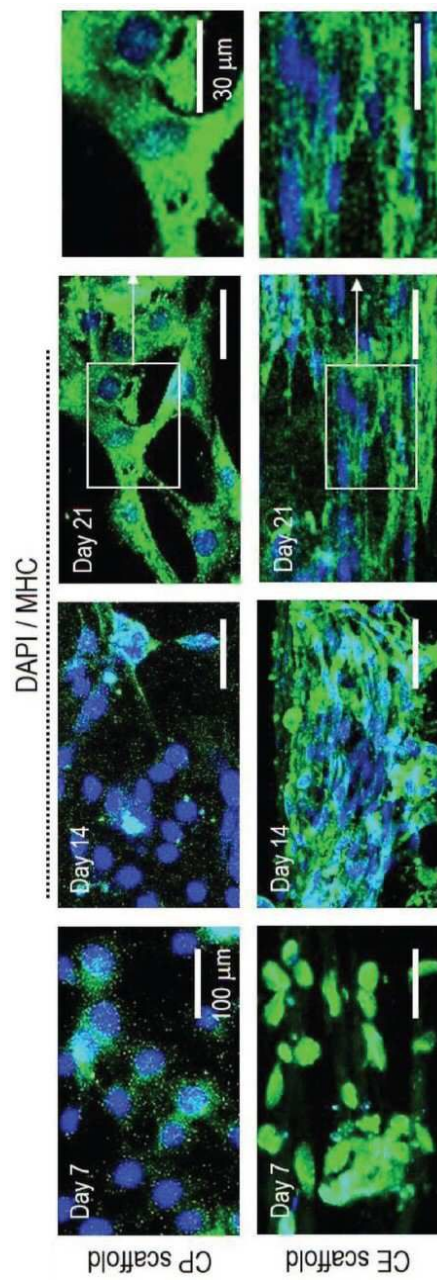
도면7d



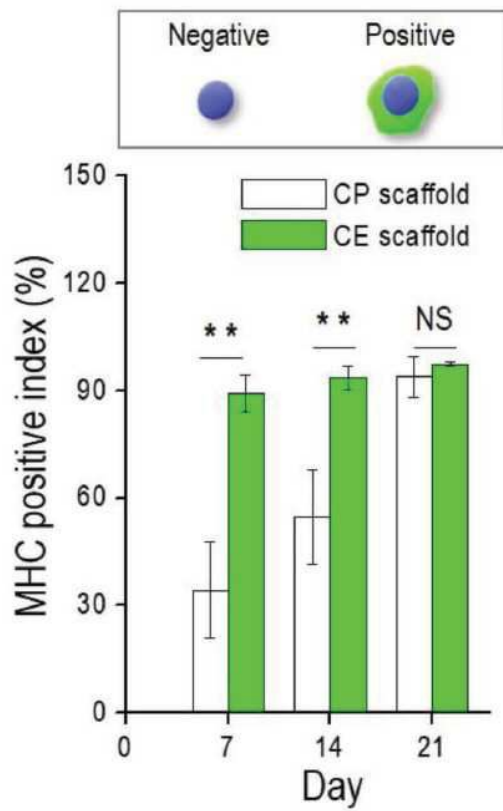
도면7e



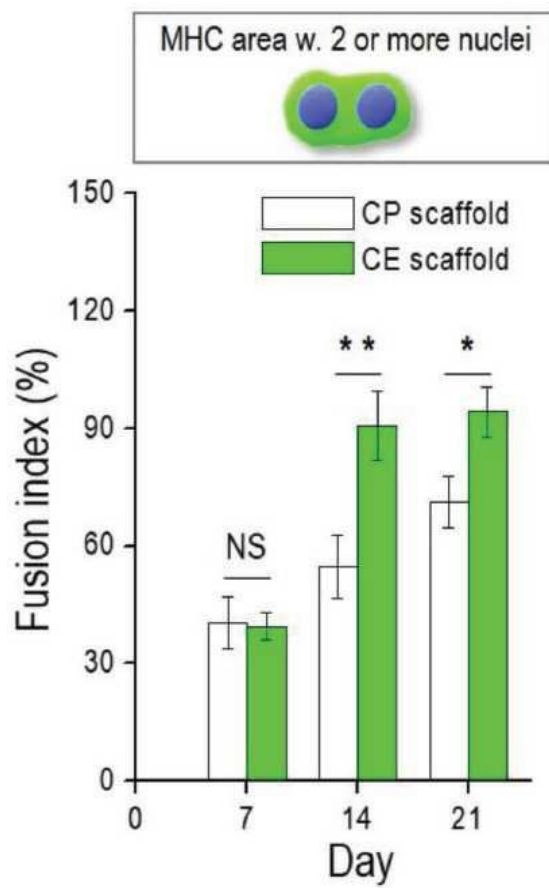
도면7f



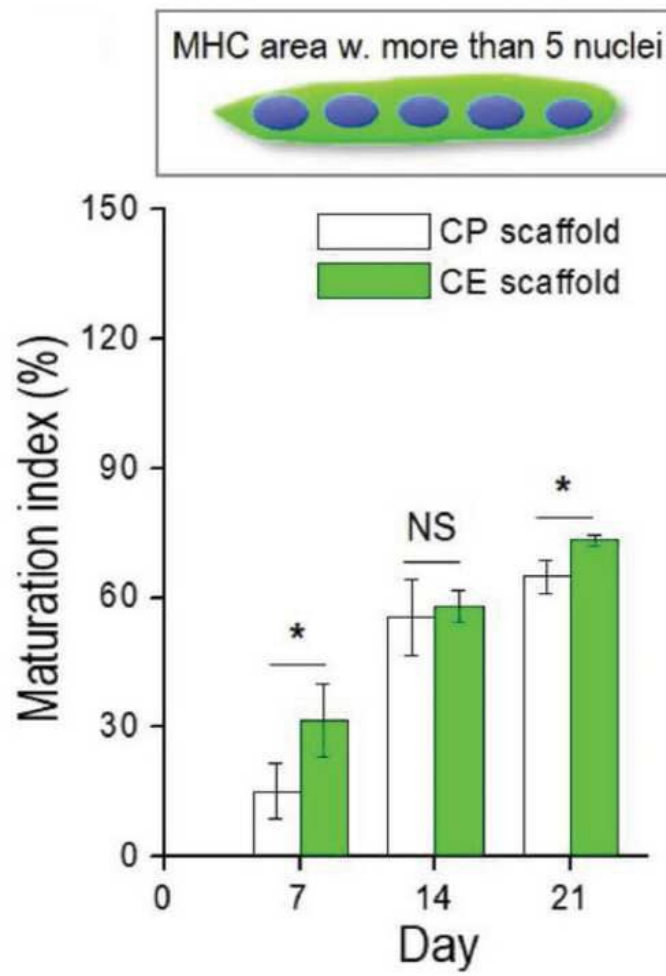
도면7g



도면7h



도면7i



도면7j

