



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월15일
(11) 등록번호 10-2156310
(24) 등록일자 2020년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)

C12N 5/0062 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0025956

(22) 출원일자 2019년03월06일

심사청구일자 2019년03월06일

(56) 선행기술조사문헌

강현욱, 한국정밀공학회 학술발표대회 논문집, (2018.5) 829면*

전승규 외 2인, 한국정밀공학회 학술발표대회 논문집, (2018.10) 96면*

KR1020180032597 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

강현욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

전승규

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

허준호

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

(74) 대리인

특허법인지원

전체 청구항 수 : 총 14 항

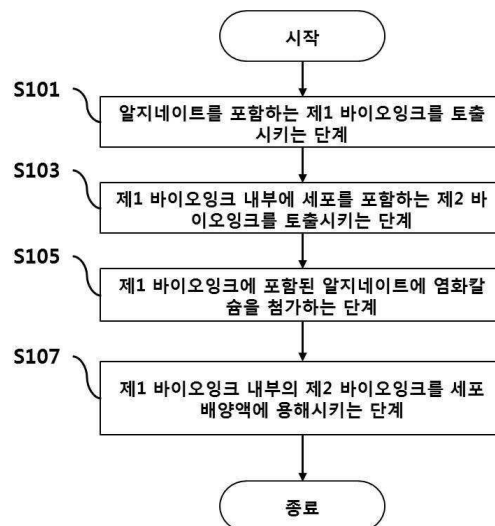
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 바이오잉크를 이용한 세포 스페로이드 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 바이오잉크를 이용한 세포 스페로이드 제조 공정에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 제조 방법은 (a) 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출(extrusion)시키는 단계; (b) 상기 토출된 제1 바이오잉크 내부에, 세포를 포함하는 제2 바이오잉크를 토출시키는 단계; (c) 상기 제1 바이오잉크에 포함된 알지네이트에 염화칼슘(CaCl₂) 용액을 첨가하는 단계; 및 (d) 상기 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크를 세포 배양액에 용해시켜, 상기 세포로부터 세포 스페로이드를 형성시키는 단계;를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2513/00 (2013.01)
 C12N 2533/30 (2013.01)
 C12N 2533/54 (2013.01)
 C12N 2533/74 (2013.01)
 C12N 2533/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082135
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오, 의료기술개발(R&D)
연구과제명	바이오프린팅 기반 생체모방 체도 제작 및 최적화 기술개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2019.02.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711064779
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오, 의료기술개발(R&D)
연구과제명	미세 혈관 내재형 간 조직 모사체 프린팅 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출(extrusion)시키는 단계;
(b) 상기 토출된 제1 바이오잉크 내부에, 세포를 포함하는 제2 바이오잉크를 토출시키는 단계;
(c) 상기 제1 바이오잉크에 포함된 알지네이트에 염화칼슘(CaCl_2) 용액을 첨가하는 단계; 및
(d) 상기 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크를 세포 배양액에 용해시켜, 상기 세포로부터 세포 스페로이드를 형성시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 (a) 단계 이전에,
폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)을 토출시켜 제1 PCL 구조체와 제2 PCL 구조체를 형성하는 단계;
를 더 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 (a) 단계는,
상기 형성된 제1 PCL 구조체와 상기 제2 PCL 구조체 사이에, 상기 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 (a) 단계는,
미리 준비된 플레이트 상에 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 제1 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴 및 상기 알지네이트를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 제2 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴, 염화칼슘 및 상기 세포를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 (b) 단계는,
상기 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 및 상기 제2 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 중 적어도 하나에 따라 상기 제2 바이오잉크를 구형으로 토출시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 (d) 단계는,
상기 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크에 포함된 히알루론산 및 젤라틴을 상기 세포 배양액에 용해시키는 단계; 및
상기 제2 바이오잉크에 포함된 세포를 상기 세포 배양액에서 소정 시간 동안 배양하여, 상기 세포로부터 상기 세포 스페로이드를 형성시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 (b) 단계는,
노즐을 사용하여 상기 제1 바이오잉크 내부의 세포를 포함하는 제2 바이오잉크를 구형으로 토출시키는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 상기 제2 바이오잉크의 토출 시간 및 토출 속도 중 적어도 하나에 따

라 결정되는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,
상기 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 상기 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따라 결정되는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,
상기 형성되는 세포 스페로이드 간 간격은, 상기 제2 바이오잉크의 토출 경로에 따라 결정되는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,
상기 (d) 단계 이후에,
(e) 상기 제1 바이오잉크의 매트릭스를 제거하여 상기 세포 스페로이드를 추출하는 단계;
를 더 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 (e) 단계는,
알지네이트리아제(alginate lyase)를 상기 제1 바이오잉크에 첨가하여 상기 제1 바이오잉크의 알지네이트를 제거하여 상기 세포 스페로이드를 추출하는 단계;
를 포함하는,
세포 스페로이드 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 스페로이드 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 바이오잉크를 이용한 세포 스페로이드 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종래의 경우, 세포가 부착할 수 없는 마이크로웰에 세포를 주입하여 세포 스페로이드를 제작하였다. 이 경우, 마이크로웰을 제작하기 위해서 포토리소그래피(Photolithography)와 소프트리소그래피(Soft-lithography)를 동반한 복잡하고 긴 과정의 마이크로 가공 공정이 요구된다.

- [0004] 또한, 종래의 경우, 세포 스페로이드의 크기 조절에 제약이 있으며, 제조된 세포 스페로이드를 수확(harvest)하는 과정이 용이하지 않다. 그 외에 세포를 현탁배양(hanging drop) 하거나 세포가 부착될 수 없는 표면(non-adherent surface)에 배양하여 세포 스페로이드가 제조되었다. 하지만, 이러한 방식의 경우 세포 배양액을 교환하기 어려우며 교환 과정에서 세포 손실이 발생하는 문제점이 있다.
- [0005] 이에, 세포 스페로이드를 따로 제작한 후 바이오 프린팅하여 메크로 인공 조직을 제작하는 기술이 개발되었다. 대표적으로 아가로오즈 지지대 (Agarose gel rod)를 먼저 프린팅하여 그 사이에 제작된 세포 스페로이드가 섞인 생체 바이오 잉크를 프린트하는 방법이 개발되었다.
- [0006] 또한, 세포 스페로이드를 컴퓨터 이미징과 로봇공학 기술을 이용해 세포 스페로이드를 마이크로 니들(Micro-needle)에 끼워 세포 스페로이드를 패터닝한 기술이 개발되었다. 그러나 상술한 종래의 방법은 세포 스페로이드의 제작이 따로 요구되었으며, 복잡한 컴퓨터 이미징과 로봇 공학 시스템이 동반되어야 했다. 또한, 세포 스페로이드 간 혹은 다종의 세포와의 패턴 정밀도가 떨어진다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1)[특허문헌 1] 한국등록특허 제10-1743231호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위하여 발명된 것으로, 바이오잉크를 이용한 세포 스페로이드 제조 방법을 제공하는 것에 그 목적이 있다.
- [0009] 또한, 본 발명은 세포가 포함된 바이오 잉크를 하이드로젤 내부에 토출시키는 공정을 통해 토출된 위치에서(in-situ) 세포 스페로이드 형성을 유도하는 제조 방법을 제공하는 것에 그 목적이 있다.
- [0010] 또한, 본 발명은 니들 노즐을 사용해 분산된 세포(Dispersed single cells)를 포함한 제2 바이오잉크를 매트릭스 하이드로젤로 구성된 제1 바이오잉크에 토출시켜 세포가 스페로이드를 만들 수 있는 환경을 제공하는 것에 그 목적이 있다.
- [0011] 또한, 본 발명은 세포가 포함된 제2 바이오잉크의 토출량을 조절하면서 세포 스페로이드의 크기를 조절하는 공정을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 프린팅 경로를 조작하여, 형성되는 세포 스페로이드의 위치를 조절하는 공정을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 하이브리드 바이오 프린팅 공정을 통해, 세포 스페로이드가 하이드로젤에 패터닝된 복잡한 3차원 구조체를 제조하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 다종 세포를 잉크에 포함하여, 다종 세포로 이루어진 스페로이드(Multi-cellular spheroids) 또는 다종 세포 스페로이드 (Multi-spheorids) 패터닝 공정을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 제조 방법은 (a) 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출(extrusion)시키는 단계; (b) 상기 토출된 제1 바이오잉크 내부에, 세포를 포함하는 제2 바이오잉크를 토출시키는 단계; (c) 상기 제1 바이오잉크에 포함된 알지네이트에 염화칼슘(CaCl₂) 용액을 첨가하는 단계; 및 (d) 상기 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크를 세포 배양액에 용해시켜, 상기 세포로부터 세포 스페로이드를 형성시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0017] 실시예에서, 상기 (a) 단계 이전에, 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)을 토출시켜 제1 PCL 구조체와 제2 PCL 구조체를 형성하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 실시예에서, 상기 (a) 단계는, 상기 형성된 제1 PCL 구조체와 상기 제2 PCL 구조체 사이에 상기 알지네이트를

포함하는 제1 바이오잉크를 토출시키는 단계;를 포함할 수 있다.

- [0019] 실시예에서, 상기 (a) 단계는, 미리 준비된 플레이트 상에 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0020] 실시예에서, 상기 제1 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴 및 상기 알지네이트를 포함할 수 있다.
- [0021] 실시예에서, 상기 제2 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴, 염화칼슘 및 상기 세포를 포함할 수 있다.
- [0022] 실시예에서, 상기 (b) 단계는, 상기 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 및 상기 제2 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 중 적어도 하나에 따라 상기 제2 바이오잉크를 구형으로 토출시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0023] 실시예에서, 상기 (d) 단계는, 상기 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크에 포함된 히알루론산 및 젤라틴을 상기 세포 배양액에 용해시키는 단계; 및 상기 제2 바이오잉크에 포함된 세포를 상기 세포 배양액에서 소정 시간 동안 배양하여, 상기 세포로부터 상기 세포 스페로이드를 형성시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0024] 실시예에서, 상기 (b) 단계는, 노즐을 사용하여 상기 제1 바이오잉크 내부의 세포를 포함하는 상기 제2 바이오잉크를 구형으로 토출시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0025] 실시예에서, 상기 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 상기 제2 바이오잉크의 토출 시간 및 토출 속도 중 적어도 하나에 따라 결정될 수 있다.
- [0026] 실시예에서, 상기 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 상기 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따라 결정될 수 있다.
- [0027] 실시예에서, 상기 형성되는 세포 스페로이드 간 간격은, 상기 제2 바이오잉크의 토출 경로에 따라 결정될 수 있다.
- [0028] 실시예에서, 상기 (d) 단계 이후에, (e) 상기 제1 바이오잉크의 매트릭스를 제거하여 상기 세포 스페로이드를 추출하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 실시예에서, 상기 (e) 단계는, 알지네이트리아제(alginate lyase)를 상기 제1 바이오잉크에 첨가하여 상기 제1 바이오잉크의 알지네이트를 제거하여 상기 세포 스페로이드를 추출하는 단계;를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 분산된 세포(dispersed single cells)를 포함한 제2 바이오잉크를 제1 바이오잉크의 매트릭스에 구형으로 토출하고, 세포가 포함되지 않은 매트릭스만 선택적으로 가교하여, 세포가 스페로이드를 만들 수 있는 환경을 제공할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세포 스페로이드 제조 방법을 통해 신약 개발을 위한 약물 검사 칩, 조직 재생을 위한 인공 조직 모사체 제작 기술을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 본 발명에 관한 이해를 돕기 위해 상세한 설명의 일부로 포함되는, 첨부 도면은 본 발명에 대한 실시예를 제공하고, 상세한 설명과 함께 본 발명의 기술적 특징을 설명한다.

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드의 제조 공정을 도시한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드의 제조 방법을 도시한 도면이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따른 점성 그래프를 도시한 도면이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 형광 비드의 분포 및 강도를 도시한 도면이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따라 형성되는 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 세포의 종류에 따라 형성된 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 공정에 따른 세포 스페로이드와 종래의 제조 공정에 따른 세포 스페로이드의 형태 비교를 도시한 도면이다.

도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 시간에 따른 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크의 주입 시간에 따른 세포 스페로이드의 크기를 도시한 도면이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따른 세포 스페로이드의 크기를 도시한 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크의 주입 간격에 따른 세포 스페로이드 간 거리를 도시한 도면이다.

도 7a 및 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 3차원 시트 구조체를 도시한 도면이다.

도 7c는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 나선형 원기둥 구조체를 도시한 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 3차원 시트 구조체의 세포 적합성 분석을 도시한 도면이다.

도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 세포 스페로이드의 거리가 조절된 구조체를 도시한 도면이다.

도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 세포 스페로이드의 거리 그래프를 도시한 도면이다.

도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 세포 스페로이드의 거리에 따른 기능성 비교 그래프를 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 명세서에서 제1 및/또는 제2 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 즉, 구성요소들을 상기 용어들에 의해 한정하고자 함이 아니다.
- [0036] 본 명세서에서 '포함하다'라는 표현으로 언급되는 구성요소, 특징, 및 단계는 해당 구성요소, 특징 및 단계가 존재함을 의미하며, 하나 이상의 다른 구성요소, 특징, 단계 및 이와 동등한 것을 배제하고자 함이 아니다.
- [0037] 본 명세서에서 단수형으로 특정되어 언급되지 아니하는 한, 복수의 형태를 포함한다. 즉, 본 명세서에서 언급된 구성요소 등은 하나 이상의 다른 구성요소 등의 존재나 추가를 의미할 수 있다.
- [0038] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함하여, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자(통상의 기술자)에 의하여 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미이다.
- [0039] 즉, 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미인 것으로 해석되어야 하며, 본 명세서에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0040] 이하에서는, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 바이오잉크를 이용한 세포 스페로이드 제조 공정에 대해 상세하게 설명한다.
- [0042] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드의 제조 방법을 도시한 도면이다.
- [0043] 도 1을 참고하면, S101 단계는 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출시키는 단계이다. 일 실시예에서, 상기 S101 단계 이전에, 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)을 토출시켜 제1 PCL 구조체와 제2 PCL 구조체를 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 형성된 제1 PCL 구조체와 제2 PCL 구조체 사이에 상기 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 토출시킬 수 있다.
- [0044] 일 실시예에서, 알지네이트를 포함하는 제1 바이오잉크를 미리 준비된 플레이트 상에 토출시킬 수 있다.
- [0045] 여기서, 제1 바이오잉크는 세포를 포함하지 않는 기질로 구성된 것으로, 매트릭스(matrix) 바이오잉크, 기질 바

이오잉크 또는 이와 동등한 기능을 갖는 다양한 용어로 지칭될 수 있다.

- [0046] S103 단계는 토출된 제1 바이오잉크 내부에, 세포를 포함하는 제2 바이오잉크를 토출시키는 단계이다. 일 실시예에서, 제1 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴 및 알지네이트를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 및 제2 바이오잉크에 포함된 젤라틴의 농도 중 적어도 하나에 따라 제2 바이오잉크를 구형으로 토출시킬 수 있다. 일 실시예에서, 제2 바이오잉크는, 히알루론산, 젤라틴, 염화칼슘 및 세포를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 제2 바이오잉크는 노즐을 통해 구형으로 토출될 수 있다. 예를 들어, 노즐은 니들 노즐을 포함할 수 있지만 노즐의 종류는 한정되지 않는다.
- [0047] 여기서, 제2 바이오잉크는 분산된 세포를 포함하는 것으로, 희생(sacrificial) 바이오잉크, 세포 바이오잉크 또는 이와 동등한 기능을 갖는 다양한 용어로 지칭될 수 있다.
- [0048] S105 단계는 제1 바이오잉크에 포함된 알지네이트에 염화칼슘(CaCl_2) 용액을 첨가하는 단계이다. 일 실시예에서, 염화칼슘 용액의 염화칼슘은 알지네이트와 가교결합(crosslinking)을 형성할 수 있다.
- [0049] S107 단계는 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크를 세포 배양액에 용해시켜, 세포로부터 세포 스페로이드를 형성시키는 단계이다. 일 실시예에서, 제1 바이오잉크 내부의 제2 바이오잉크에 포함된 히알루론산 및 젤라틴을 세포 배양액에 용해시킨 후, 제2 바이오잉크에 포함된 세포를 세포 배양액에서 소정 시간 동안 배양하여, 세포로부터 세포 스페로이드를 형성시킬 수 있다.
- [0050] 일 실시예에서, 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 제2 바이오잉크의 토출 시간 및 토출 속도 중 적어도 하나에 따라 결정될 수 있다. 일 실시예에서, 형성되는 세포 스페로이드의 크기는, 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따라 결정될 수 있다. 일 실시예에서, 형성되는 세포 스페로이드 간 간격은, 제2 바이오잉크의 토출 경로에 따라 결정될 수 있다.
- [0052] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드의 제조 공정을 도시한 도면이다.
- [0053] 도 2를 참고하면, PCL 프린팅 공정(201)에서, 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)을 토출(extrusion)시켜 PCL 구조체를 형성할 수 있다.
- [0054] 제1 바이오잉크 프린팅 공정(203)에서, 제1 바이오잉크를 먼저 토출된 PCL 구조체 사이에 토출시킬 수 있다. 이 경우, 제1 바이오잉크는 PCL 구조체 사이에 토출됨으로써 매트릭스를 형성할 수 있다. 일 실시예에서, PCL 프린팅 공정(101)이 생략되는 경우, 제1 바이오잉크를 바로 미리 준비된 플레이트 위에 토출시킬 수 있다.
- [0055] 제2 바이오잉크 프린팅 공정(205)에서, 니들 노즐을 사용하여 세포가 포함된 제2 바이오잉크(sacrificial bio-ink)를 제1 바이오잉크의 매트릭스 내부에 구형으로 토출시킬 수 있다. 이 경우, 제2 바이오잉크는 염화칼슘(CaCl_2)을 포함할 수 있으며, 염화칼슘의 가교결합(crosslinking)으로 인해 제2 바이오잉크가 제1 바이오잉크의 매트릭스 내부로 주입될 때 분산되는 것을 방지할 수 있다.
- [0056] 가교결합 공정(207)에서, 염화칼슘(CaCl_2) 용액을 추가적으로 첨가되어 제1 바이오잉크에 포함된 알지네이트와 선택적으로 가교결합을 형성할 수 있다. 이를 통해, 제2 바이오잉크에 의해 형성된 구형의 공간이 유지될 수 있다.
- [0057] 용해 공정(209)에서, 제2 바이오잉크에 포함된 희생 재료를 소정 온도의 세포 배양액에서 용해시킬 수 있다. 소정 온도는 35°C 내지 39°C 일 수 있다. 이 경우, 희생 재료는 히알루론산 및 젤라틴을 포함할 수 있다. 이후, 제2 바이오잉크의 희생 재료가 제거된 공간에서 세포 부착 부위가 존재하지 않는 알지네이트 주변 환경으로 인해, 소정 기간 경과 후 세포가 스페로이드를 형성할 수 있다. 소정 기간은 2일 내지 4일일 수 있다. 즉, 제2 바이오잉크에 존재하는 세포들이 세포 배양액을 통해 배양되어 세포 스페로이드를 형성할 수 있다.
- [0058] 일 실시예에서, 본 발명의 제조 공정에서 사용되는 제1 바이오잉크는 히알루론산, 젤라틴 및 알지네이트 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 또한, 제2 바이오잉크는 히알루론산, 젤라틴 및 염화칼슘 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0059] 이 경우, 제1 바이오잉크와 제2 바이오잉크는 모두 세포를 균일하게 섞기 위해 두 잉크 모두 히알루론산(Hyaluronic acid)을 포함할 수 있다. 또한, 제1 바이오잉크와 제2 바이오잉크는 모두 가역적으로 온도 가교가 가능한 젤라틴을 포함할 수 있으며, 이에 의해, 프린팅 시 점도와 프린팅능을 조절할 수 있다.
- [0060] 제1 바이오잉크는 선택적 가교결합을 위해 알지네이트를 포함할 수 있다. 제2 바이오잉크는 제1 바이오잉크의 매트릭스 내부로 주입 시 분산을 방지하기 위해 알지네이트 가교제인 염화칼슘(CaCl_2)을 포함할 수 있다.

- [0063] 본 발명의 다양한 실시예들에서, 도 1에 도시된 각 공정은 필수적인 것은 아니어서, 도 1에 도시된 공정 중 일부는 생략될 수 있고, 다른 공정이 추가될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 다양한 실시예들에서, 본 발명의 제조 공정에서 사용한 바이오 프린터는 적어도 하나의 프린팅 모듈, PCL 토출을 위한 공압 기반 디스펜서, 바이오잉크 토출을 위해 메커니컬 디스펜서, 프린팅 공정을 수행하는 공간의 온도와 습도를 조절하는 인클로저(enclosure) 및 프린팅 경로생성 소프트웨어를 통해 프린팅 코드를 생성하여 본 발명의 제조 공정을 제어하는 제어 모듈을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 젤라틴에 의한 점성 조절을 위해 프린팅 공간의 온도는 일정 온도로 유지될 수 있다.
- [0066] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따른 점성 그래프를 도시한 도면이다.
- [0067] 도 3a를 참고하면, 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 의한 제1 바이오 잉크의 점성 변화를 확인할 수 있다. 제1 바이오잉크에 포함되는 젤라틴 농도를 각각 42.5, 32.5, 22.5mg/ml(도 3a에서 G42.5, G32.5, G22.5로 표기)로 조절한 후, 제1 바이오잉크와 제2 바이오잉크의 점성을 비교할 수 있다. 이 경우, 젤라틴 농도가 높아짐에 따라 제1 바이오잉크의 점성이 높아 졌으며, 제1 바이오잉크와 제2 바이오잉크의 점성 차이는 G22.5일 때, 가장 적게 차이남을 확인할 수 있다.
- [0069] 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 형광 비드의 분포 및 강도를 도시한 도면이다.
- [0070] 도 3b를 참고하면, 제1 바이오잉크에 포함되는 젤라틴 농도(G42.5, G32.5, G22.5)를 조절하고, 세포를 대신하여 내부에 빨간색을 띄는 형광 비드(red fluorescence beads)가 포함된 제2 바이오잉크를 토출시킬 수 있다.
- [0071] 이 경우, 제1 바이오잉크 젤라틴 농도를 22.5mg/ml로 조절했을 때, 제2 바이오잉크가 상대적으로 밀도 있는 구의 형태로 토출됨을 확인할 수 있다. 또한, 중심에 대하여 정규화된 그래프(스케일 바, 200^{μm})를 참고하면, Z축에 따른 형광 비드의 강도 분포를 확인할 수 있다. 즉, 형광 비드의 중심에서 강도가 가장 강함을 확인할 수 있다.
- [0073] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따라 형성되는 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.
- [0074] 도 4a를 참고하면, 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도에 따라 형성되는 세포 스페로이드의 모양을 비교할 수 있다(스케일 바, 200^{μm}). 형광 비드 실험과 마찬가지로 HepG2(Liver carcinoma cell) 세포가 제2 바이오잉크에 포함된 경우, 제1 바이오잉크에 포함된 젤라틴 농도가 G22.5일 때 세포가 가장 구의 형태로 토출되었으며, 배양 3일 차에 세포 스페로이드를 형성함을 확인할 수 있다.
- [0076] 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 세포의 종류에 따라 형성된 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.
- [0077] 도 4b를 참고하면, 다른 종류 세포를 본 발명의 제조 공정에 적용하여 형성된 세포 스페로이드를 확인할 수 있다(스케일 바, 200^{μm}). 신경세포와 유사한 특성을 가진 PC12(Neuronal like cell)와 췌도 β 세포(Pancreatic β-cell) 특성을 가진 Min6 세포 라인(Cell line)을 본 발명의 제조 공정에 적용하여 세포 스페로이드를 제작할 수 있다. 즉, 본 발명의 제조 공정은 신경 세포를 포함한 다양한 세포를 적용하여 세포 스페로이드를 제작할 수 있다.
- [0079] 도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 공정에 따른 세포 스페로이드와 종래의 제조 공정에 따른 세포 스페로이드의 형태 비교를 도시한 도면이다.
- [0080] 도 4c를 참고하면, 기존 방법인 마이크로웰을 이용해 제조된 세포 스페로이드와 본 발명의 제조 공정을 통해 제조된 세포 스페로이드를 수확(harvest)하여 모양을 비교할 수 있다(스케일 바, 200^{μm}). 즉, 본 발명의 제조 공정은 기존의 방법과 유사한 형태의 세포 스페로이드를 제작할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0081] 이 경우, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드는 제1 바이오 잉크의 매트릭스를 제거함으로써 수확, 즉, 추출될 수 있다. 예를 들어, 약 2U/ml 내지 4U/ml 범위를 갖는 용액으로 알지네이트리아제(alginate lyase)를 제1 바이오잉크에 첨가하여 제1 바이오잉크의 알지네이트를 분해하고, 세포를 약 30분 내지 1시간동안 37도에서 배양함으로써 매트릭스를 제거하고 세포 스페로이드를 수확할 수 있다.

- [0083] 도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 시간에 따른 세포 스페로이드의 형태를 도시한 도면이다.
- [0084] 도 4d를 참고하면, 본 발명의 제조 공정을 통해 제조된 세포 스페로이드의 공초점 현미경 이미지(Confocal microscope)를 확인할 수 있다. 이 경우, 프린팅 직후(Day 0) 분산되어 있었던 세포들이 배양 3일차에 삼차원 세포 스페로이드를 형성함을 확인할 수 있다.
- [0086] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크의 토출 시간에 따른 세포 스페로이드의 크기를 도시한 도면이다.
- [0087] 도 5a를 참고하면, 제2 바이오잉크의 토출 시간에 따라 형성되는 세포 스페로이드의 크기를 확인할 수 있다. 세포가 포함된 제2 바이오잉크의 토출 시간을 1초에서 2초 간격으로 늘려 9초까지 조절했을 때, 세포 토출량이 늘어나 배양 3일차에 크기가 더욱 큰 세포 스페로이드가 형성됨을 확인할 수 있다(스케일 바, 200 μ m). 또한, 점도표 그래프를 통해서도 제2 바이오잉크 토출 시간이 길어질수록 스페로이드의 크기가 커짐을 확인할 수 있다.
- [0089] 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따른 세포 스페로이드의 크기를 도시한 도면이다.
- [0090] 도 5b를 참고하면, 제2 바이오잉크에 포함된 세포 농도에 따른 세포 스페로이드의 크기를 확인할 수 있다. 제2 바이오잉크의 토출시간이 각각 1초와 9초일 때, 세포 농도를 증가시켜 형성되는 세포 스페로이드 크기를 확인할 수 있다(스케일 바, 200 μ m). 이 경우, 동일한 토출시간에 대하여, 세포 농도가 증가할수록 세포 스페로이드의 크기가 커짐을 확인할 수 있다. 또한, 동일한 세포 농도에 대하여, 토출시간이 증가할수록 세포 스페로이드의 크기가 커짐을 확인할 수 있다. 일 실시예에서, 세포 토출시간과 세포 농도 조절을 통해 세포 스페로이드의 지름은 100-400 μ m 까지 조절될 수 있다.
- [0092] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 제2 바이오잉크의 주입 간격에 따른 세포 스페로이드 간 거리를 도시한 도면이다.
- [0093] 도 6을 참고하면, 프린팅 경로(printing path)를 제어하여 형성되는 세포 스페로이드의 간격을 확인할 수 있다. 이 경우, 프린팅 경로는 제2 바이오잉크의 토출 경로를 의미할 수 있다. 제어한 프린팅 경로에 따라 세포 스페로이드가 형성됨을 확인할 수 있다(스케일 바, 200 μ m).
- [0094] 또한, 그래프를 통해 제2 바이오잉크의 토출 간격에 따른 형성된 세포 스페로이드의 표면 거리(Surface-to-surface distance)를 확인할 수 있다. 프린팅 경로 조절을 통해 세포 스페로이드의 표면 거리는 최소 20 μ m 까지 조절될 수 있다.
- [0096] 도 7a 및 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 3차원 시트 구조체를 도시한 도면이다.
- [0097] 도 7a를 참고하면, 세포 스페로이드가 패터닝된 3차원 시트 구조체를 확인할 수 있다. 이 경우, 3차원 시트 구조체는 세포 스페로이드가 패터닝된 격자 사이에 세포 배양액이 원활히 통과할 수 있는 빈 채널(흰색 점선)이 존재할 수 있다.
- [0098] 도 7b를 참고하면, 다중 세포를 이용하여 세포 스페로이드를 패터닝한 3차원 시트 구조체를 확인할 수 있다(스케일 바, 200 μ m). 제2 바이오잉크에 HepG2와 NIH3T3(fibroblast)를 같이 섞어 주어 다세포 스페로이드(Multi-cellular cell spheroids)가 패터닝된 3차원 구조체를 제작할 수 있다. 또한, 각 세포를 각각 제2 바이오잉크에 섞어 다중 세포 스페로이드(Multi-type cell spheroids)가 패터닝된 3차원 구조체를 제작할 수 있다.
- [0100] 도 7c는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 나선형 원기둥 구조체를 도시한 도면이다.
- [0101] 도 7c를 참고하면, 설계 소프트웨어와 프린팅 경로 조절을 통해 세포 스페로이드가 패터닝된 나선형 원기둥 구조체 제작할 수 있다. 설계 소프트웨어를 통해 프린팅 경로를 생성한 후, 경로 내에 매트릭스와 세포 토출 경로를 추가할 수 있다. 이에, 예를 들어, 지름 14.4mm, 높이 12.4mm의 세포 스페로이드가 패터닝된 나선형 원기둥 구조체 제작할 수 있다(스케일 바, 200 μ m).
- [0103] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드가 패터닝된 3차원 시트 구조체의 세포 적합성 분석을 도시한 도면이다.
- [0104] 도 8을 참고하면, 종래의 분산된 단일 세포를 매트릭스에 추가하여 프린팅한 제1 그룹(Single cells printed),

종래의 마이크로웰에서 생성한 스페로이드의 제2 그룹(Microo-wells spheroids)과 본 발명의 제조 공정으로 제작한 스페로이드의 세포 적합성을 비교할 수 있다.

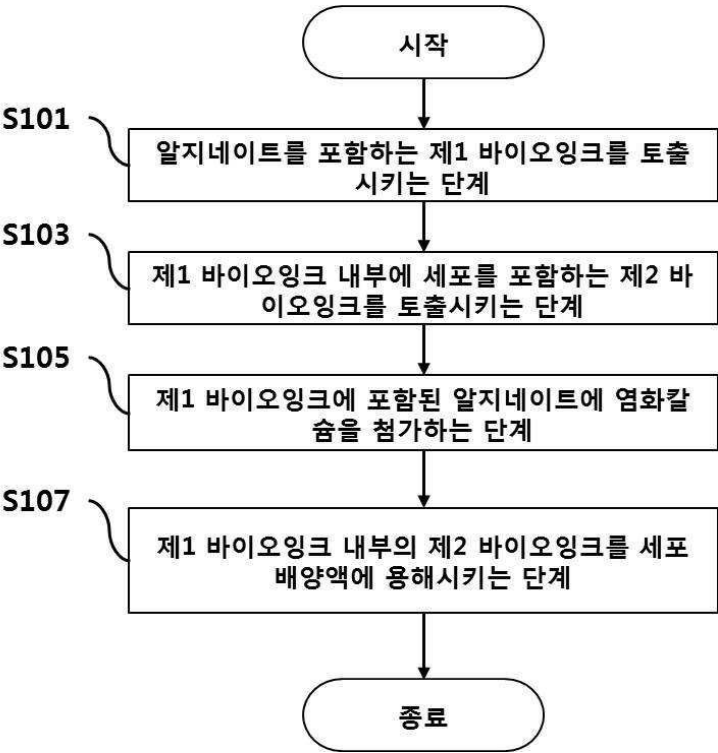
- [0105] 활성 분석법(live and dead assay) 결과를 참고하면, 종래의 비교 그룹에 비해 본 발명의 제조 공정으로 제작된 세포 스페로이드가 높은 세포 생존률을 보임을 확인할 수 있다(스케일 바, 200^{μm}). 또한 Alamar blue 분석 결과를 참고하면, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 세포 스페로이드는 제1 그룹에 의해 제조된 세포 스페로이드보다 높고 제2 그룹에 의해 제조된 세포 스페로이드와 유사한 대사활성 능력을 보임을 확인할 수 있다.
- [0107] 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 세포 스페로이드의 거리가 조절된 구조체를 도시한 도면이다.
- [0108] 도 9a를 참고하면, 혈관 내피세포(HUVEC) 라인패턴과 Mouse primary hepatocyte 스페로이드의 거리가 조절된 구조체 제작할 수 있다. 이 경우, 피브린 기반 바이오잉크가 혈관 내피세포를 포함하고, PCL 사이에 endothelial 셀 라인패턴을 프린트할 수 있다.
- [0109] 본 발명의 제조 공정을 통해 Mouse primary hepatocyte 스페로이드를 혈관 내피세포 라인패턴과의 거리에 따라 패턴닝할 수 있다. 이 때, 혈관 내피세포가 없는 그룹을 “w/o ECs”, Mouse primary hepatocyte 스페로이드와 혈관 내피세포 라인패턴의 거리가 먼 그룹(예: 프린팅 경로상 거리 : 500^{μm})을 “far”, 가까운 그룹(예: 프린팅 경로상 거리 : 250^{μm})을 “Nearby”, 접촉되어 있는 그룹(예: 프린팅 경로상 거리 : 0^{μm})을 “Contacted”로 설정하여 실험을 진행하였다. 일반 도립현미경과 공초점 현미경을 이용해 촬영한 프린팅 결과를 확인할 수 있다(스케일 바, 200^{μm}).
- [0110] 이 경우, 도 9b를 참고하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 Mouse primary hepatocyte 스페로이드의 거리 그래프를 통해, 혈관 내피세포 라인 패턴과 Mouse primary hepatocyte 스페로이드의 표면 측정 거리를 확인할 수 있다.
- [0112] 도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 라인 패턴과 세포 스페로이드의 거리에 따른 기능성 비교 그래프를 도시한 도면이다.
- [0113] 도 9c를 참고하면, 혈관 내피세포 라인패턴과 Mouse primary hepatocyte 스페로이드 거리에 따른 알부민(Albumin), 요소(Urea) 분비량을 비교할 수 있다. 패턴 거리에 따라 다른 기능성을 보이며, 배양 7일 차에 “Nearby” 및 “Far” 그룹의 알부민, 요소 분비량이 상대적으로 높은 결과를 보임을 확인할 수 있다.
- [0115] 비록 본 명세서에서의 설명은 예시적인 몇 가지 양상으로 나타났지만, 다양한 수정이나 변경이 후술되는 특허청구범위에 의해 정의되는 범주로부터 이루어질 수 있으며, 본 발명의 기술적인 보호범위는 다음의 특허청구범위에 의하여 정해져야 할 것이다.

부호의 설명

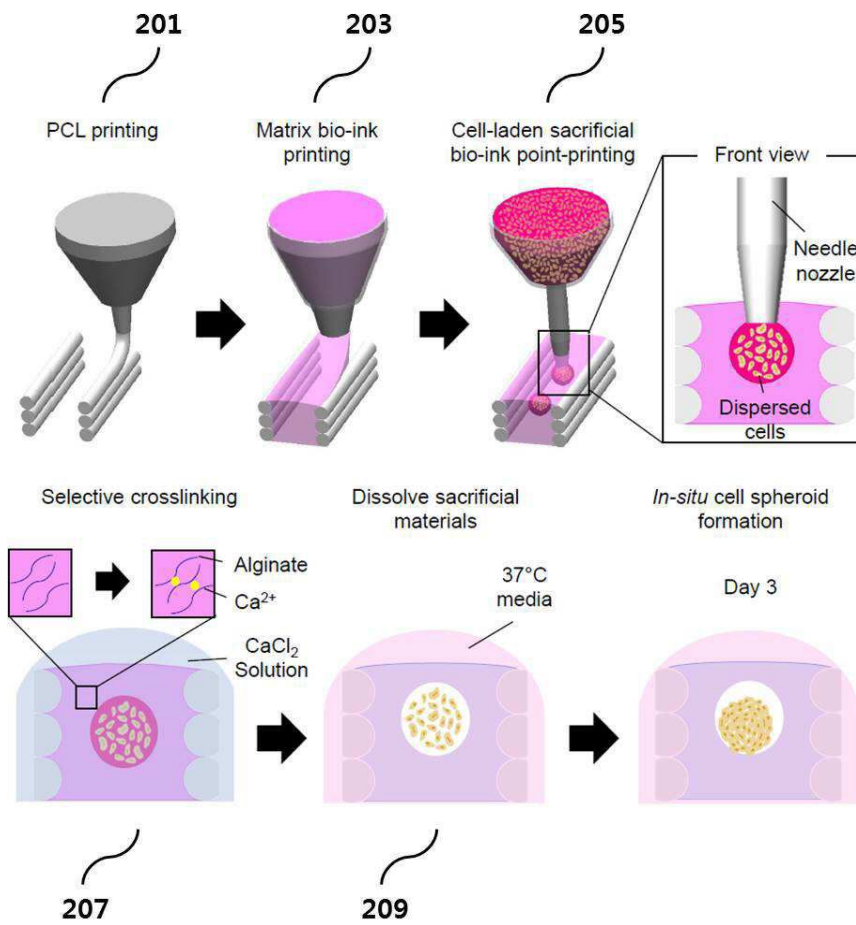
- [0117] 201: PCL 프린팅 공정
- 203: 제1 바이오잉크 프린팅 공정
- 205: 제2 바이오잉크 프린팅 공정
- 207: 가교결합 공정
- 209: 용해 공정

도면

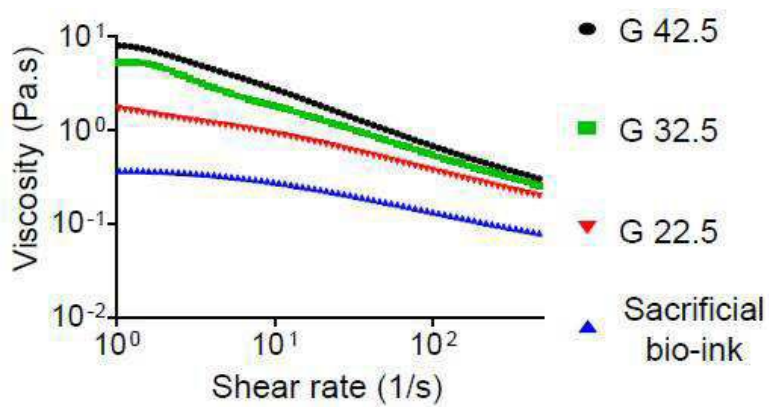
도면1



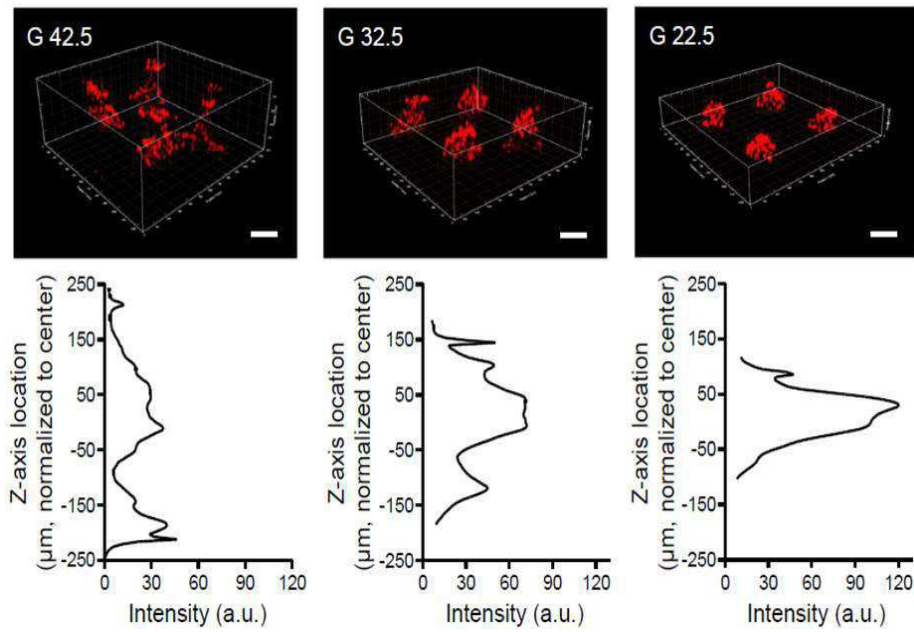
도면2



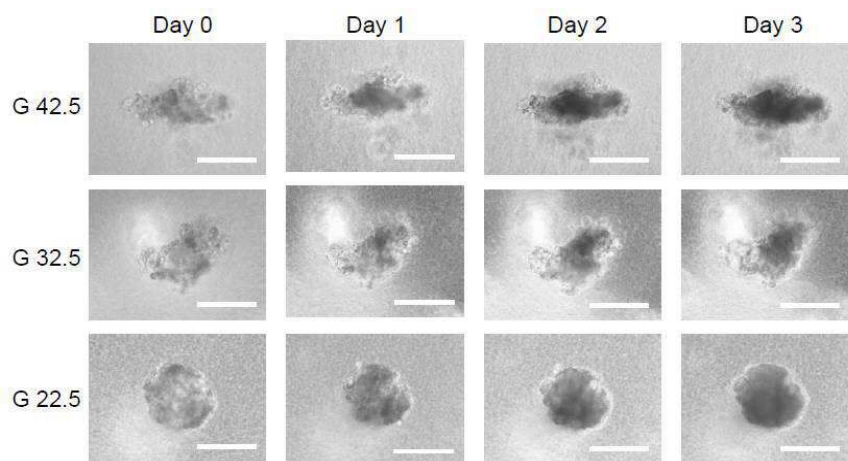
도면3a



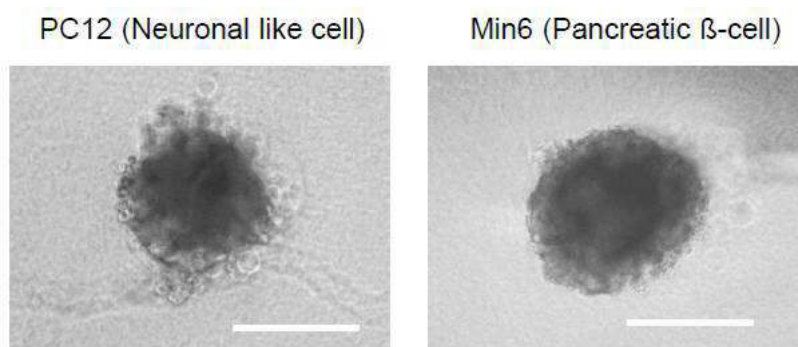
도면3b



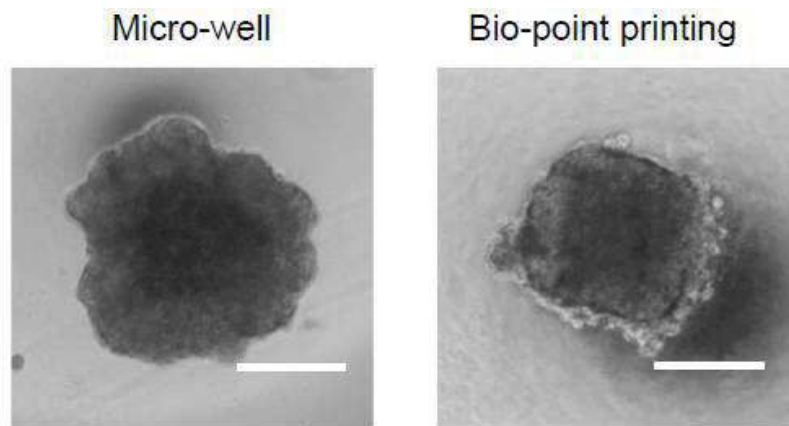
도면4a



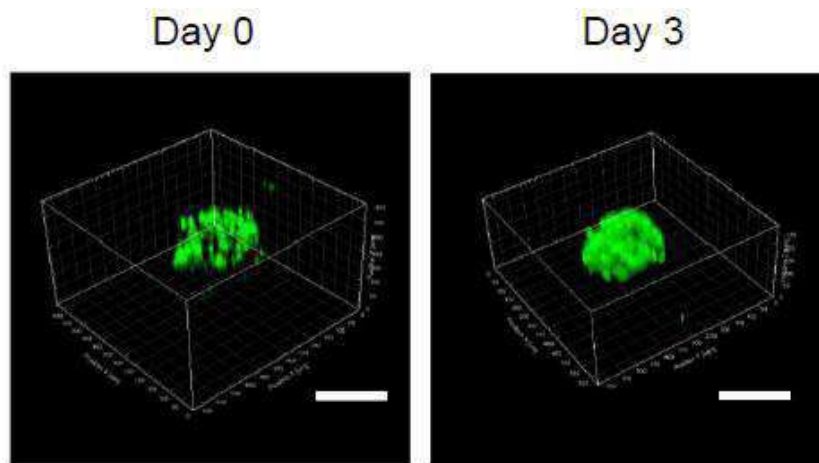
도면4b



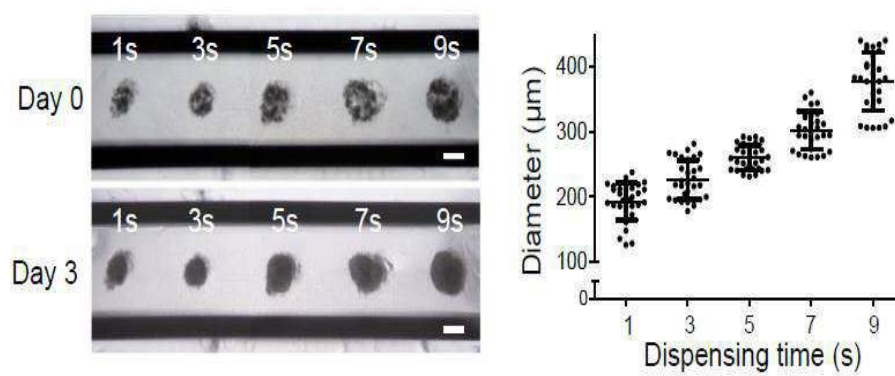
도면4c



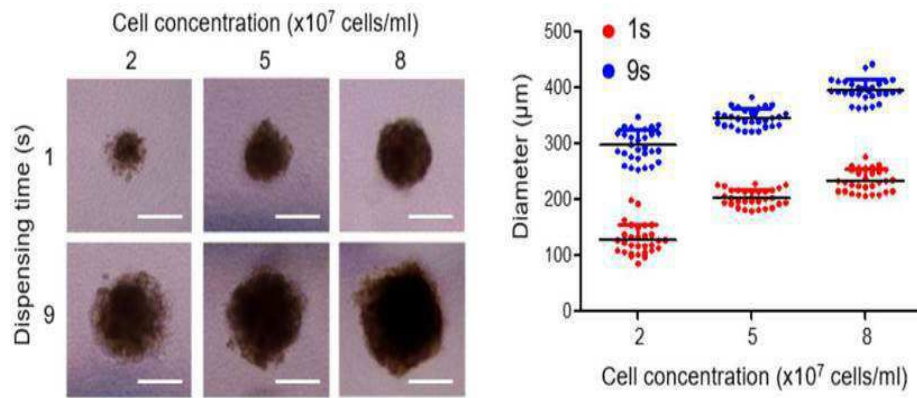
도면4d



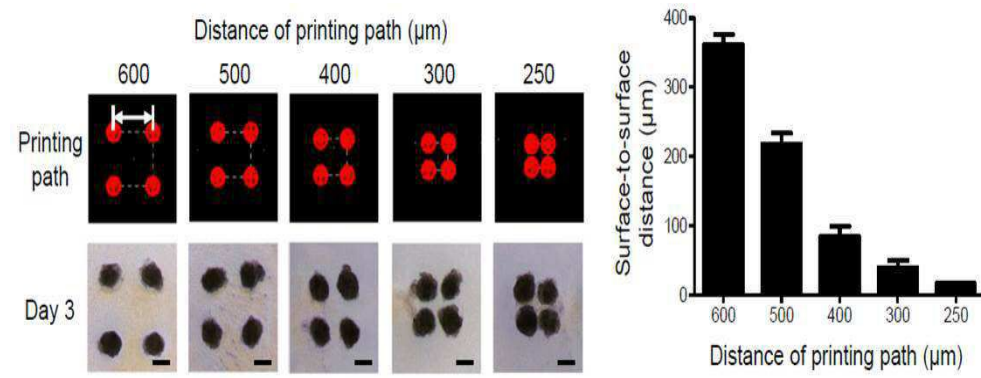
도면5a



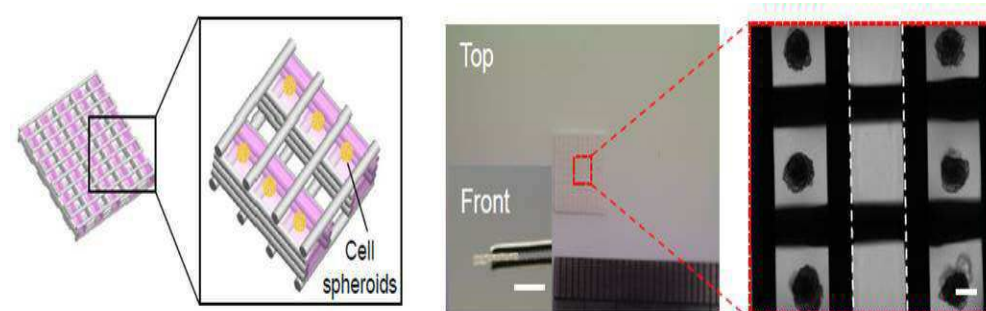
도면5b



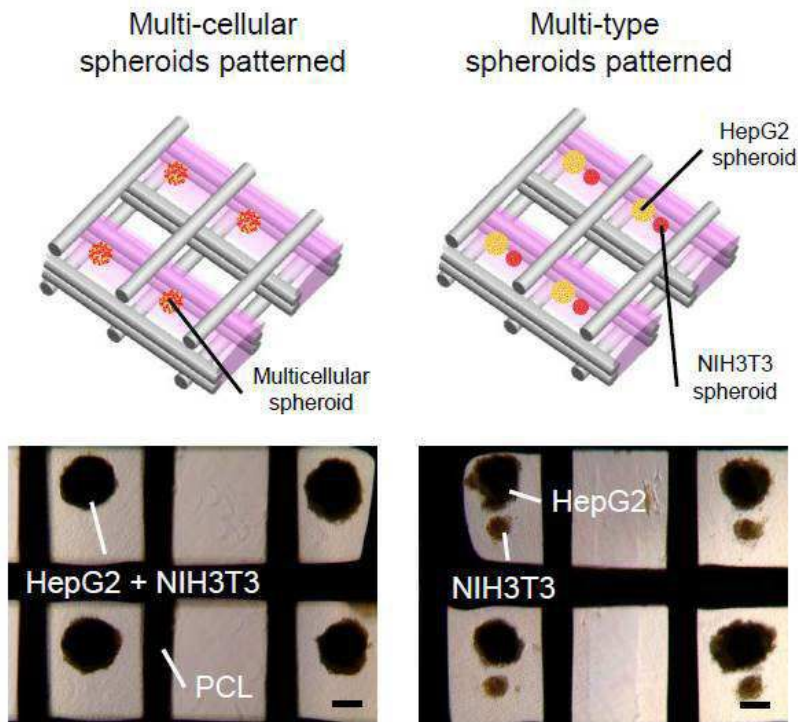
도면6



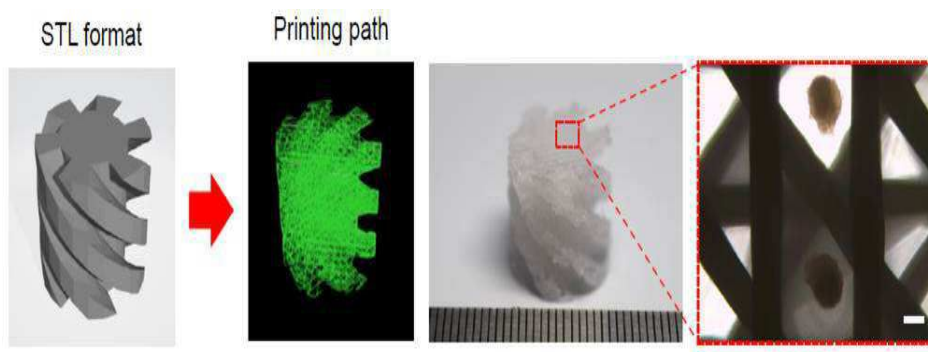
도면7a



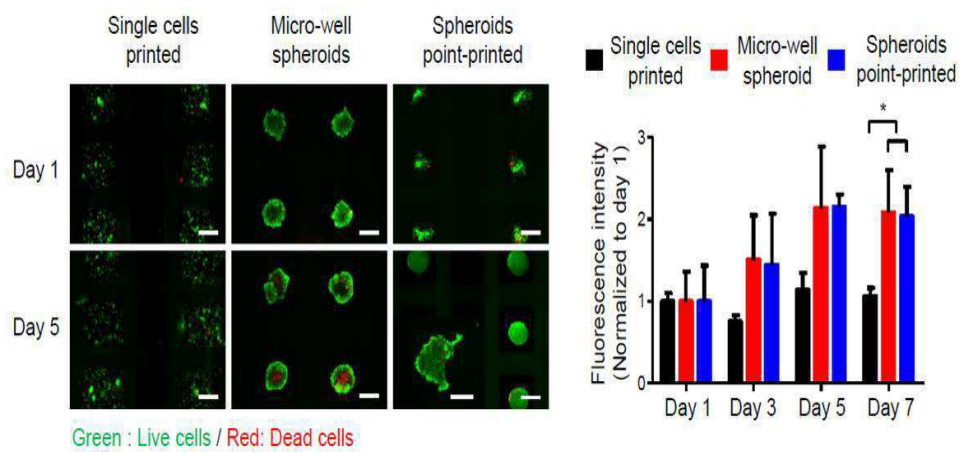
도면7b



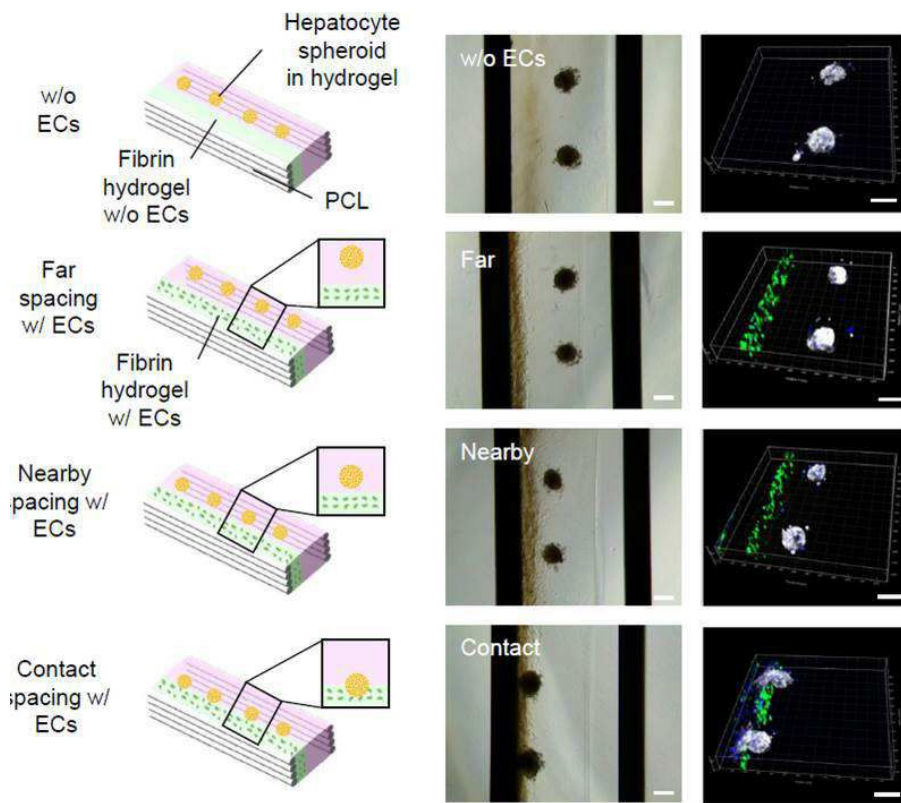
도면7c



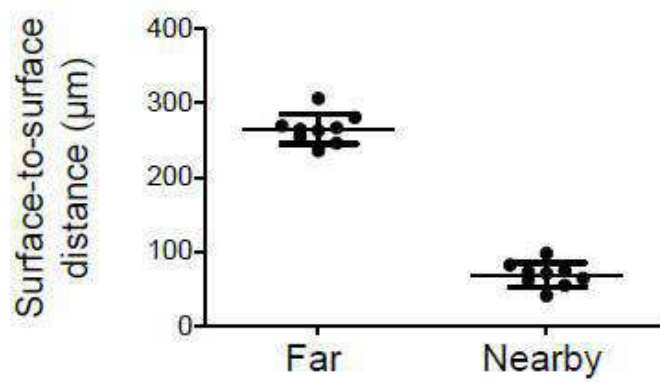
도면8



도면9a



도면9b



도면9c

