

관 인 생 략
출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2018.10.24
 특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(4106)
 출 원 번 호 10-2018-0127389 (접수번호 1-1-2018-1050751-24)
 출 원 인 명 칭 포항공과대학교 산학협력단(2-2004-043336-1)
 대 리 인 성 명 유미특허법인(9-2001-100003-6)
 발 명 자 성 명 장진아 박예진 용의중 산스크리타 다스 황동규
 발 명 의 명 칭 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드 제조방법


특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법

제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



특허 (실용신안) 심사절차 안내

우리 청에 특허 (실용신안)를 출원해 주셔서 감사드립니다.
고객님의 특허출원은 다음과 같이 처리됨을 안내해 드립니다.

고객상담센터 : 1544-8080

- 1 먼저, 방식심사를 받게 됩니다.**

 - 출원인적격, 필수사항기재, 수수료납부 여부 등 법령에서 정한 형식적 요건에 적합하지를 심사하며, 미비사항이 있는 경우에는 보정요구되거나 반려될 수 있습니다.
- 2 출원과는 별도로 심사를 청구하셔야 심사가 진행됩니다.**

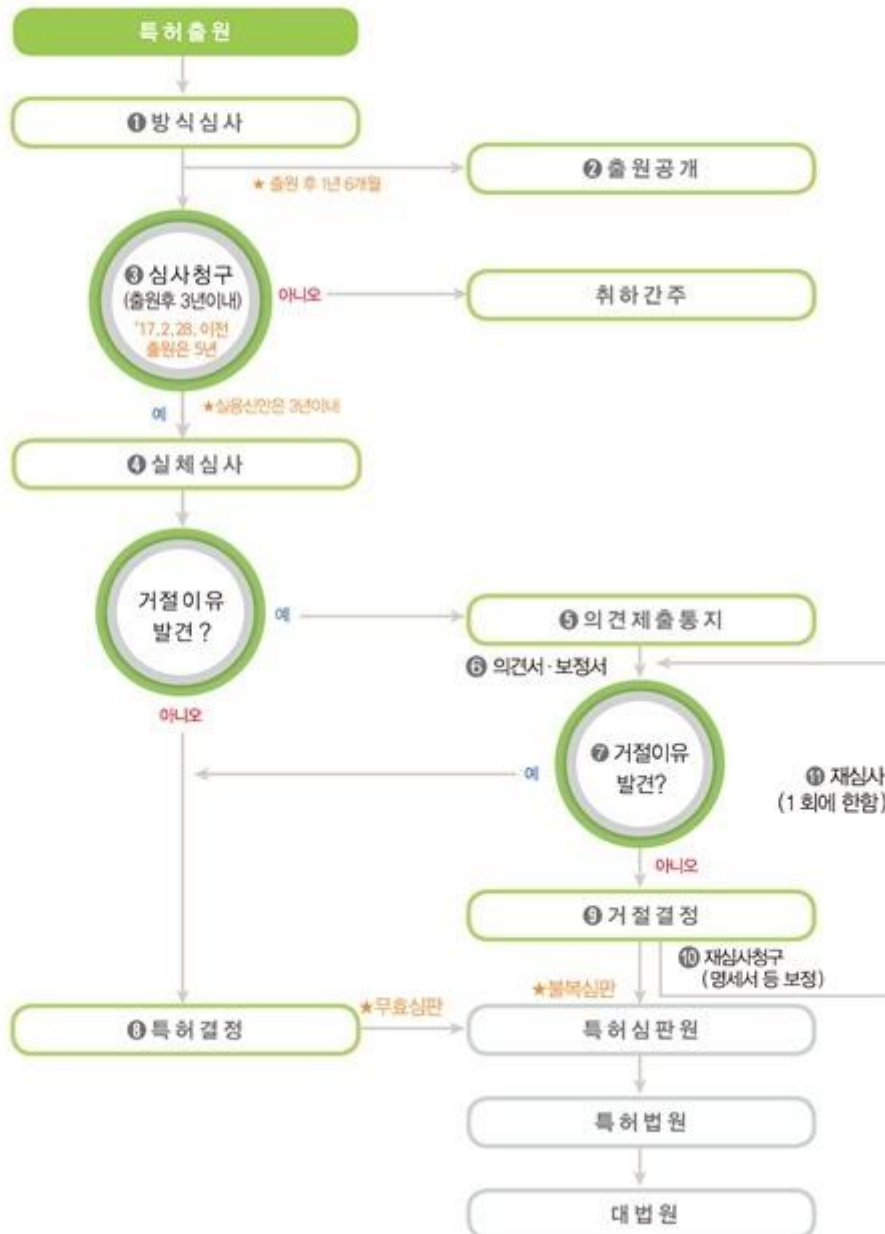
 - 출원 후 5년 이내에 심사청구가 없으면 특허법 제 59 조에 따라 취한 것으로 간주되니 유의하시기 바랍니다.
- 3 심사착수는 심사청구 접수순서대로 하며, 기술분야에 따라 처리기간의 차이가 있을 수 있습니다.**

 - 지금 출원된 건은 심사청구일 기준 평균 약 11 개월 후에 심사를 실시하게 되며 ('14. 12 월말 기준). 이는 미국, 일본에 비해 빠른 편입니다.
 - 심사착수 기간이 오래 걸리는 이유는 우리나라에 심사청구된 출원 건수가 연간 18 만여 건으로 매년 누적된 출원이 쌓여 있기 때문이며, 고객님 출원의 실제 심사진행 상황은 특허청 홈페이지 '특허로'를 통해서 확인할 수 있습니다.
- 4 심사과정에서 심사관이 보내는 '의견제출통지서'를 받게 되면, 고객님께서 의견서 또는 보정서를 제출하셔야 심사가 계속될 수 있습니다.**

 - 통계에 따르면 심사 건의 90% 정도가 의견제출통지서를 받고, 출원 대비 최종 등록결정율은 약 67.6%로 나타나고 있습니다. ('14. 12 월말 기준)
- 5 의견서 등을 통해 거절이유가 해소되면 특허결정서를, 해소되지 않으면 거절결정서를 받게 됩니다.**

참고

- 1) 우선심사제도를 이용하면 심사기간을 3~5 개월 이내로 단축시킬 수 있습니다.
- 2) 출원내용은 특허법 제 64 조에 따라 출원 18 개월 후에 특허청 홈페이지를 통해서 공개 됩니다.
- 3) 거절결정서를 받은 경우에는 특허청에 '재심사청구'를 하거나 특허심판원에 '거절결정 불복심판'을 제기할 수 있습니다.
- 4) 기타 자세한 내용은 특허청 홈페이지 (kipo.go.kr)를 참고하시고, 문의사항은 고객상담 센터 (1544-8080)로 연락하시기 바랍니다.



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	4106
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	포항공과대학교 산학협력단
【특허고객번호】	2-2004-043336-1
【대리인】	
【명칭】	유미특허법인
【대리인번호】	9-2001-100003-6
【지정된변리사】	이정희
【포괄위임등록번호】	2005-006871-0
【발명의 국문명칭】	3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드 제조방법
【발명의 영문명칭】	Method of manufacturing cell spheroid using three-dimensional printing method
【발명자】	
【성명】	장진아
【성명의 영문표기】	JANG, JI NAH
【주민등록번호】	870905-2XXXXXX
【우편번호】	37673
【주소】	경상북도 포항시 남구 청암로 77(지곡동)
【발명자】	

【성명】 박예진
【성명의 영문표기】 PARK, YEJIN
【주민등록번호】 960919 2616819
【우편번호】 57795
【주소】 전라남도 광양시 광장로 112-11, 102동 1105호(중동, 태영 아파트)

【발명자】

【성명】 용의중
【성명의 영문표기】 YONG, UI JUNG
【주민등록번호】 940504 1163817
【우편번호】 37666
【주소】 경상북도 포항시 남구 지곡로 80(지곡동)

【발명자】

【성명】 산스크리타 다스
【성명의 영문표기】 SANSKRITA DAS
【우편번호】 37666
【주소】 경상북도 포항시 남구 지곡로 80(지곡동)

【발명자】

【성명】 황동규
【성명의 영문표기】 HWANG, DONG GYU
【주민등록번호】 921011-1XXXXXX
【우편번호】 37666

- 【주소】** 경상북도 포항시 남구 지곡로 80(지곡동)
- 【출원언어】** 국어
- 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**
- 【과제고유번호】** 1711064968
- 【부처명】** 과학기술정보통신부
- 【연구관리 전문기관】** 한국연구재단
- 【연구사업명】** 바이오.의료기술개발(R&D)
- 【연구과제명】** 기능성 바이오 인공체장 제조를 위한 3D 세포 프린팅 기술 기반 융합기술 개발 및 실용화 연구
- 【기여율】** 1/2
- 【주관기관】** 포항공과대학교
- 【연구기간】** 2018. 01. 01 ~ 2018. 12. 31
- 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**
- 【과제고유번호】** 1465025249
- 【부처명】** 보건복지부
- 【연구관리 전문기관】** 한국보건산업진흥원
- 【연구사업명】** 첨단의료기술개발
- 【연구과제명】** 심혈관질환 타겟 생체니쉬 모사형 3D줄기세포 이식체 개발 연구
- 【기여율】** 1/2
- 【주관기관】** 전남대학교산학협력단
- 【연구기간】** 2018. 01. 01 ~ 2018. 12. 31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 유미특허법인

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0 면	46,000 원
【가산출원료】	25 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】	46,000 원	
【감면사유】	전담조직(50%감면)[1]	
【감면후 수수료】	23,000 원	
【수수료 자동납부번호】	064-059182-01-018	

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드 제조방법{Method of manufacturing cell spheroid using three-dimensional printing method}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드의 제조방법에 관한 것이며, 상기 세포 스페로이드는 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포 등을 유효성분으로 포함하는 혈관계, 내분비계 질환 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 장질환, 뇌혈관질환, 말초 혈관성질환 등의 허혈성질환은 40%의 높은 유병률을 가진다. 약물 및 외과적 치료기술 발달에도 허혈조직의 제한적인 재생능으로 인해 난치성 질환 치료의 한계를 보인다. 이와 같은 허혈성 혈관 질환의 미충족 의료수요 발생을 극복하기 위하여 줄기세포를 이용한 효과적이고 획기적인 치료법 개발이 필요한 상황이다. 성체줄기세포를 활용한 허혈성질환 치료제 개발과 관련하여 현재까지 혈관을 통한 투여에 대한 제품의 임상연구가 수행되었고 제품이 출시되어 있으나, 기존의 치료에서는 줄기세포의 생착률과 증식/분화를 개선할 수 있는 환경제공이 어려워 효율성이 낮은 것으로 보고되었다.

【0003】 이러한 문제를 해결하고자, 허혈성 조직내에 이식된 줄기세포의 생존률을 높이는 방법으로써 단일 줄기세포의 이식법 보다 혼성 줄기세포 및 3차원 구형의 스페로이드 이식법이 개발되고 있다. 이러한 이식법은 종종 심혈관 질환 동물모델을 통해 효능이 우수함을 입증한 바 있다. 기존의 3차원 스페로이드 제조 방법으로는 크게 두 가지로 나눌 수 있다.

【0004】 첫 번째는 세포가 바닥에 붙지 않는 U자 모양의 작은 plate에 세포를 넣어 스스로 무리를 형성하게끔 하는 것이다. 이 방법을 사용할 시, 세포가 스스로 안정적인 스페로이드를 만드는데, 최소 24시간에서 최대 96시간 정도가 소요된다. 또한 제조시 세포가 모이는 정도에 따라 다양한 사이즈의 스페로이드가 형성되는데, 이는 일정한 크기와 일정한 효과를 필요로 하는 세포 치료제의 기준에는 미치지 못한다.

【0005】 두 번째 방식은, 미세 유체 장치를 이용하여 세포가 들어간 알지네이트를 내부에서 간헐적으로 분사하고, 겔에서 염화칼슘을 지속적으로 분사하며 스페로이드를 만드는 방식이다. 이 방법은 균일한 스페로이드를 만들기에는 적합하지만, 완전히 스페로이드가 만들어지기 전에 인접한 스페로이드와 합쳐질(fusion) 가능성이 있으며, 젤화(gelation)과정은 확산 시간(diffusion time)에 의존적이기 때문에 초기에 만들어지는 스페로이드는 일정한 크기를 가지지 못해 균일한 스페로이드가 만들어질 때까지는 시간이 소요된다. 또한 이 방법으로 만들어지는 스페로이드의 경우, 다양한 3D 구조체를 만들 때 쓰일 기반 요소(building block)로 쓰이기에는 적합하지 않다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0006】 본 발명은 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포 등을 유효 성분으로 포함하는 혈관계, 내분비계 질환 예방 또는 치료 목적으로 사용 할 것으로 기대되는 3차원 세포 프린팅 기반 스페로이드 제조 기법에 관한 것이다.

【과제의 해결 수단】

【0007】 이에 본 발명자들은 국소 부위로의 줄기세포의 효율적인 전달 및 생체 니쉬 미세환경 (niche microenvironment) 모사를 위하여 3차원 스페로이드 형상의 구조체를 제조하는 3차원 세포 프린팅 기반 기술을 개발하였다.

【0008】 본 발명은 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포 등을 유효 성분으로 포함하는 혈관계, 내분비계 질환 예방 또는 치료 목적으로 사용 할 것으로 기대되는 3차원 세포 프린팅 기반 스페로이드 제조 기법에 관한 것이다.

【0009】 본 발명의 일 예는 세포, 탈세포화된 세포외 기질, 및 겔화 고분자로서 알지네이트를 포함하는 바이오잉크 조성물을 이용하여, 마이크로토출 방식으로 인쇄하는 3차원 바이오프린팅 기법으로 세포 스페로이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

【0010】 본 명세서에서 '바이오 잉크'는 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 통칭하는 용어이다. 본 발명의 바이오 잉크는 복수의 세포를 포함하는

액체, 반고체, 또는 고체 조성물을 포함한다. 따라서 바이오 잉크는 3차원 가공을 위한 물리적 성질과 세포가 목적된 기능을 수행하게 하기 위한 생물학적 환경을 제공하여 주어야 한다. 프린팅 공정이 길어질 때에는 잉크 토출 부재 내에서 세포의 생존에 필요한 영양분과 산소의 공급이 적절히 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 프린팅 과정에서 발생하는 물리적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있어야 한다. 그 외에도 바이오 잉크는 3차원 패터닝의 반복성, 생산성, 노즐의 막힘이 없어야 하는 등 프린팅 공정상에서 필요로 하는 물리적 성질을 가져야 한다. 본 발명에 따른 잉크는 하이드로젤인 것이 바람직하며, 이에 상기 잉크는 겔화고분자를 포함할 수 있으며, 예를 들면 겔화 고분자, 세포, 성장인자, 및 세포외기질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

【0011】 본 발명은 또한, 상기 바이오 잉크 조성물은 조직유래 성분이 추가로 포함된 것을 특징으로 하는 바이오 잉크 조성물을 제공한다. 조직유래 성분은 연골, 신장, 심장, 간, 근육 등과 같은 동물의 특정조직이 탈세포화 되고 세포외기질을 주성분으로 하는 물질의 겔(gel)화 된 것을 의미하며, 이는 바이오 잉크 조성물의 조직특이성을 강화하기 위하여 포함될 수 있다.

【0012】 본 발명에 있어서 상기 바이오 잉크 조성물은 세포 배양 배지를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지는 목적하는 세포에 적합한 임의의 배지를 포함하는 개념이다.

【0013】 상기 방법에서, (A)세포와 탈세포화된 세포의 기질을 포함하는 용액과 (B)고분자로서 알지네이트 용액의 혼합비는 부피비로 1 : 1 내지 1: 4 이며, 상

기 탈세포화된 세포의 기질은 2.5 중량% 용액이고, 상기 알지네이트 2중량% 용액을 사용하는 것일 수 있다.

【0014】 본 발명의 바이오잉크 조성물에 사용되는 탈세포화된 세포의 기질은 0.5 내지 5 중량%의 용액이고, 알지네이트 용액은 0.5 내지 5중량%의 용액일 수 있다. 상기 바이오잉크 조성물은 세포, 탈세포화된 세포외기질, 겔화 고분자로서 알지네이트를 포함한다.

【0015】 본 발명에 따른 세포는 세포 스페로이드 제조를 위해 사용 가능한 종류의 세포일 수 있으며, 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포, 전구세포 등을 들 수 있으며, 예를 들면 심장세포, 혈관계 세포로 분화할 수 있는 세포일 수 있다.

【0016】 본 발명에 따른 바이오잉크는 세포를 포함할 수 있으며, 적용 가능한 세포 또는 조직은 특별히 한정되지 않으며, 줄기세포(stem cell), 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germcell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 구체적으로 CPC (cardiac progenitor cell), EPC (endothelial

progenitor cell), 인간 체도세포, 혈관 세포, 신경 세포, 면역 세포 등을 사용할 수 있다.

【0017】 본 발명에 있어서, "스페로이드(spheroid)"란 3차 조직배양을 통하여 만들어지는 작은'구'체로서, 스페로이드는 일종의 작은'조직'으로서, 외부와 내부가 구분되어 기능이 나뉘기도 하며, 조직의 기능적 단위를 모사하는 형태를 띤다. 스페로이드 배양은 동물이나 인체 조직이 가지고 있는 고유 형태나 성질이 비슷할 뿐만 아니라, 이를 적용하여 연구에 활용할 수 있는 플랫폼으로 개발되고 있다.

【0018】 본 발명에 따른 세포 스페로이드 제조를 위한 3차원 인쇄법에서 공압을 가하는 시간이 0.01 내지 0.1 초 조건에서 수행하여 스페로이드의 크기 300 내지 500 um를 제조할 수 있다. 또한, 3차원 인쇄법에 사용되는 인쇄기의 노즐 크기가 25 내지 28게이지, 예를 들면 27 게이지일 수 있다. 예를 들면, 상기 노즐 크기가 27 게이지이고, 35-50 kPa 공압 조건에 인쇄를 수행하는 것일 수 있다.

【0019】 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 세포 스페로이드는 1종 혹은 여러 가지 종류의 세포가 혼합되고 재생하고자 하는 조직의 니쉬 미세환경을 구현할 수 있는 특성을 가진다. 또한, 본 발명에 따라서, 하나의 원 내에 다수의 스페로이드를 형성할 수 있으며, 구체적으로 균일한 간격으로 다수의 스페로이드를 형성하기 위해 삼각함수가 포함된 코드를 생성하여 원의 반지름과 스페로이드 개수를 설정하면 스페로이드를 만들 지점에 노즐을 위치시키는 방법이다.

【0020】 본 발명은 종래 3차원 스페로이드 제조 방법으로서 미세 유체 장치

를 이용하여 세포가 들어간 알지네이트를 내부에서 간헐적으로 분사하고, 겔에서 염화칼슘을 지속적으로 분사하며 스페로이드를 만드는 방식이 가지는 문제점을 해결하고자, 줄기세포의 효능을 극대화하기 위한 다양한 플랫폼 연구의 필요성이 제기되었다. 특히 재생시키고자 하는 조직에 따라 최적의 세포상태, 생체재료 및 세포의 기질 등을 개별적으로 위치시킬 수 있는 3D 바이오프린팅 기술은 이러한 한계를 극복할 수 있는 최적의 기술로 판단된다. 바이오프린팅을 이용하여 제조하는 스페로이드는 제조과정을 거치는 즉시 3차원 sphere가 형성되며, 세포의 자가조립에 의한 형상제어가 아닌 동일한 볼륨의 바이오잉크를 분사하여 형성되는 방법이기 때문에 동일한 크기의 스페로이드를 동일한 조건으로 계속해서 제작할 수 있다는 장점이 있다. 또한, 스페로이드는 분사하면서 x, y, z축의 헤드를 구동함으로써 스페로이드로 이루어진 3차원 형상의 구조를 제작할 수 있는 가능성이 있다.

【0021】 구체적으로, 본 발명에 따른 세포 스페로이드 제조를 위한 방법으로도 1을 들어 설명하고자 한다.

【0022】 알지네이트의 겔화제인 염화칼슘용액을 담은 페트리디쉬를 프린터 헤드 하단에 비치하고 노즐의 끝이 용액에 닿지 않는 거리에서 공압을 가해 drop (스페로이드)을 생성한다. 이후 노즐의 끝이 용액의 표면에 닿도록 z축을 이동한다. 이후 용액과 만나게 되면 생성한 drop이 용액 안으로 떨어질 수 있도록 z축 방향으로 2-3번 운동한다. 이 후 동일한 위치에서 drop이 형성되어 서로 엉겨 붙는 현상을 방지하기 위해 프린터 헤드를 우측으로 이동하여 동일한 방식으로 스페로이드를 제작한다.

【0023】 두 번째 스텝은 여러 개의 스페로이드를 제조하기 위한 디스펜서의 움직임 제어과정이다. 한번의 배치(batch)에서 제조하고자 하는 스페로이드의 개수를 정하고, 각 위치값을 지정하는 G-code를 생성한다. G-code를 자동적으로 생성하기 위해서 python을 이용하여 code generator를 제작하였다. 원하는 반지름과 스페로이드 개수를 삽입하면, 첫 번째 스텝을 수행할 수 있는 G-code를 자동으로 생성하여 준다.

【0024】 스페로이드 개수에 따라 디스펜서가 얼마나 움직여야 하는지를 삼각함수를 이용하여 구해내고, 특정 위치에서 스페로이드를 생성한 후, 챔버에 스페로이드를 떨어뜨릴 수 있도록 code를 구성하였다. 또한 효율적으로 스페로이드를 프린팅하기 위하여, 다양한 반지름을 한 번에 프린팅할 수 있게끔 코드를 합하였다. 챔버의 크기에 맞게 반지름과 스페로이드 개수를 조정하여 G-code 생성을 하기에 용이하다.

【0025】 이후 프린팅 과정이 원활하게 진행 될 수 있을지에 대한 시뮬레이션을 통해 코드 정확성을 검증한 후 제조한다. 시뮬레이션은 G-code를 가상으로 확인해주는 CAMotics라는 프로그램을 사용하였으며, 초록색 실선으로 움직인 궤적을 표현해준다. 프린팅 코드는 좌표계 원점에서부터 시작하여 챔버가 있는 곳까지 간 후, 챔버 내에서 특정한 반지름과 스페로이드 수에 맞게 제작된 코드를 수행하여준다. 원 내에서 균일하게 스페로이드를 만들 수 있도록 일정한 간격의 점을 계산한 후, 그 점으로 가게 되면 공압 ON/OFF로 스페로이드를 생성한다. 그리고 z축 방향으로 내려가 챔버 내에 스페로이드를 떨어뜨린 후, 다시 올라온 후, 다음 위치로

향한다. 가장 작은 원은 반지름 3mm에 스페로이드를 7개 만들도록 설정하였기 때문에 코드 내에서는 반지름 3mm인 원을 7등분하여 각 점에서 z축 방향으로 움직이는 걸 볼 수 있다. 효율성을 높이기 위해 총 6가지의 반지름을 가진 원을 합하였고, 반지름이 커질수록 만들어질 수 있는 스페로이드의 개수 역시 증가시켜 효율성을 높였다.

【0026】 본 발명은 스페로이드를 제조하는 기본 메커니즘을 확립하고, 스페로이드를 구성하는 바이오잉크 조성물의 혼합 조건을 확립하였으며 사용 목적에 적합한 크기의 스페로이드를 제조하기 위한 3차원 바이오프린팅 공정 조건을 수립하였다.

【0027】 본 발명에서 제안하는 스페로이드 제조 방식은 총 3가지 단계로 구성되며 공압 기반의 스페로이드 생성을 기초로 한다.

【0028】 먼저 디스펜서의 공압을 짧은 시간 on/off 함으로써 spherical shape의 droplet을 생성한다. 공압을 가하는 시간에 따라 스페로이드의 크기를 다르게 제조할 수 있다. 이후 바닥면 (x-y평면)에 놓인 CaCl_2 (염화칼슘) 용액이 담긴 챔버의 표면에 스페로이드를 위치하고 z 방향으로 반복적으로 움직이면서 챔버에 스페로이드를 떨어뜨린다.

【0029】 스페로이드를 구성하는 소재 중 하나인 알지네이트 수용액은 염화칼슘 수용액의 칼슘 이온과 만나면 젤화 (gelation) 되는 성질을 가지고 있어 이를 바탕으로 스페로이드의 형상을 유지할 수 있다.

【0030】 세 번째 스텝은 스페로이드를 구성하는 재료에 특성에 따른 파라미터 설정 과정이다. 본 발명에서 제안하는 스페로이드는 체내 미세환경을 국소 부위에 구현하기 위한 목적이므로 이의 제조를 위한 소재로써 탈세포화 된 세포의 기질과 세포의 혼합물을 사용한다.

【0031】 이에, 본 발명에 따른 바이오 잉크는 세포, 탈세포화 된 세포의 기질, 및 겔화 고분자로서 알지네이트를 포함한다.

【0032】 탈세포화 된 세포의 기질만 사용하게 되면 순간적인 가교를 유도하기 어려운 한계점으로 인해 알지네이트 하이드로젤을 혼합하여 사용하였다. 스페로이드의 형상은 알지네이트 하이드로젤의 비율이 탈세포화 된 세포의 기질보다 높을 경우 구형을 유지하기 용이하나, 세포 친화성 및 세포 부착성은 상대적으로 낮아진다. 이와 반대로, 알지네이트 비율이 낮을 경우 최종 혼합 된 바이오잉크의 순간적인 가교가 이루어지지 않기 때문에 스페로이드의 외형을 구형으로 제작하기 어려운 문제가 있다. 여러 가지 조건을 검증한 결과, 탈세포화 된 세포의 기질 (세포를 혼합한 상태)과 알지네이트의 부피 비율이 약 1:2가 되었을 때가 가장 적절한 조건임을 확인하였다.

【0033】 본 발명에 따른 세포 스페로이드 제조방법에서, 3차원 인쇄기에 공압을 가하는 시간은 약 0.01-0.1초 사이이고 공압을 가하는 시간에 비례하여 스페로이드의 크기가 크게 제작된다. 스페로이드 크기는 주사기로 전달하기에 적절하도록 지름이 약 300-500 um로 제작을 하며, 제작 후 일주일가량 배양하면 최초 크기에서 일부 수축이 일어나서 크기가 50 um 가량 더 감소한다. 스페로이드를 3차원

형상을 만드는 building block으로 사용하는 경우에는 크기의 제약은 없으나, 300-500um 크기 일 때가 스페로이드 내 세포의 생존률이 가장 높다.

【0034】 본 발명의 3차원 인쇄법으로 제조된 세포 스페로이드는, 기존 미세 유체기반 스페로이드 제조방법의 경우 한 위치에서만 계속해서 스페로이드가 제조되기 때문에 가교공정을 거치는 동안 스페로이드끼리 엉겨붙어서 동일한 크기로 제작이 불가능 하지만, 프린터 헤드가 지속적으로 이동하면서 스페로이드를 한 디쉬 안에 골고루 분포시켜 만들면 다수의 스페로이드를 같은 크기로 가교공정할 수 있다는 장점이 있다.

【0035】 본 발명에 따른 세포 스페로이드 제조를 위한 3차원 인쇄법에서 공압을 가하는 시간이 0.01 내지 0.1 초 조건에서 수행하여 스페로이드의 크기 300 내지 500 um를 제조할 수 있다. 또한, 3차원 인쇄법에 사용되는 인쇄기의 노즐 크기가 25 내지 28게이지, 예를 들면 27 게이지일 수 있다. 예를 들면, 상기 노즐 크기가 27 게이지이고, 35-50 kPa 공압 조건에 인쇄를 수행하는 것일 수 있다. 노즐 사이즈가 커지거나 (게이지가 작아지거나) 공압조건이 높아지면, 스페로이드 크기는 점점 커지며, 반대 조건에서는 작아진다.

【0036】 프린팅 헤드 (dispenser)에 가해지는 압력 (pneumatic pressure)이 너무 낮을 경우 표준화 된 공정을 잡기 어렵고, 압력이 큰 경우 이식용 캡슐의 크기가 너무 커진다. 노즐 역시 크기가 작을수록 표준화 된 공정을 잡기 어렵고, 크기가 클수록 이식용 캡슐의 크기가 커져 향후 카테터등의 주입형 (injectable) 스페로이드를 제조하기에 부적합하다고 판단된다. 안정적인 캡슐 제작 가능성을 확인

하기 위해 약 20-100 kPa의 공압을 27 Gauge의 노즐 조건 하에서 확인해 보았고, 약 35-50 kPa 조건에서 생산 효율이 가장 좋았다.

【0037】 본 발명에 따른 스페로이드 형태의 세포는 허혈성 혈관 질환 치료용 등 허혈성 혈관 질환 치료용도나 체도세포 전달을 위한 구조체로 사용 가능하며 주사형태 혹은 3차원 구조형태 등 다양한 전달 방법 (delivery method)을 적용할 수 있다.

【발명의 효과】

【0038】 본 발명은 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드의 제조방법에 관한 것이며, 상기 세포 스페로이드는 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포 등을 유효성분으로 포함하는 혈관계, 내분비계 질환 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

【0039】 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 제조 과정 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 G-code를 가상으로 확인해주는 CAMotics라는 프로그램을 이용하여 인쇄 시뮬레이션 결과를 보여주는 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물을 구성하는 세포외기질과 알지네이트의 혼합 비율에 따른 세포 스페로이드 제작 결과를 보여주는 실험결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 노즐 및 공압 조건으로 인쇄를 수행한 결과를 나타내는 캡슐 사진이다.

도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 세포 스페로이드 내 세포의 생존능을 보여주는 사진이며, 도 5d는 도 5a 내지 5c와 동일한 사진을 사용 세포별로 구분하여 나타낸 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0040】 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명이 하기 예시적인 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

【0042】 실시예 1: 세포 스페로이드 제조

【0043】 세포 스페로이드를 제조하기 위해선 충분한 양의 세포를 확보하여야 한다. 바이오잉크는 세포, 탈세포화된 세포의 기질 및 알지네이트를 포함하였다. 바이오잉크에 들어가는 탈세포화된 세포의 기질에 세포가 섞인 미디어(cell suspension)와 알지네이트의 부피비 비율은 1:2이다. 상기 탈세포화된 세포의 기질은 2.5 중량% 용액이고, 상기 알지네이트 2중량% 용액을 사용하였다.

【0044】 상기 세포는 CPC (cardiac progenitor cell), EPC (endothelial progenitor cell) 또는 CPC와 EPC의 동일 개수 비율로 혼합한 세포를 사용하였다. 상기 탈세포화된 세포의 기질은 돼지 심장 조직에서 얻어진 탈세포화된 세포질 기질을 사용하였다. 세포 농도는 모두 10^7 개를 사용하였으며, 혼합 세포의 경우 CPC와

EPC를 동일 개수로 혼합하여 총 세포 개수가 10^7 개가 되도록 하였다

【0045】 한 번 프린팅을 할 때에, 세포는 10^7 개를 사용하였고, 탈세포화 된 세포의 기질 50ul, 미디어 50ul, 그리고 알지네이트는 200 ul을 사용하여 총 300 ul의 바이오 잉크를 제작하였다. 세포를 트립신을 이용하여 디쉬에서 떼낸 후, 알지네이트와 탈세포화 된 세포의 기질이 섞인 바이오 잉크에 골고루 섞어준다. 이때, 기포가 생기지 않도록 주의해주어야 하며 탈세포화 된 세포의 기질은 4°C 이하에서 사용해야 실험 도중 겔화가 안되므로 아이스박스 내에서 잉크를 섞어준다.

【0046】 모든 물질이 골고루 섞인 바이오 잉크를 27G 노즐을 연결한 3ml 주사기에 넣고, 이를 프린터 노즐 부위에 연결한다. 챔버는 6 well plate를 사용하며, 각각의 bath에 2%의 염화칼슘 용액을 1ml씩 주입한 후, 탈세포화된 세포의 기질이 bath 내에서 겔화될 수 있도록 37°C 를 맞춰준다. 원하는 bath를 선택하여, bath의 중심을 코드의 첫 부분에 입력하면 그 위치를 중심으로 하여 원을 그리며 세포가 들어있는 스페로이드를 제작하게 된다. bath의 중심으로 노즐이 이동하게 되고, 중심에서 일정한 거리에 해당하는 위치에 도달하게 되면, 공압을 주어 노즐 끝에 스페로이드를 맺히게 한다. 그리고 염화칼슘 용액의 표면까지 노즐을 내려서 노즐 끝에 맺힌 스페로이드가 bath에 떨어질 수 있도록 한다. 공압시간은 0.032초, 공압은 35kPa이다.

【0048】 실시예 2: 공간을 가하는 시간을 다양하게 하여 제조

【0049】공압을 가하는 시간에 따라 스페로이드의 크기를 다르게 제조할 수 있으며, 공압을 가하는 시간에 따른 효과를 평가하고자 다양한 조건으로 스페로이드를 제조하였다.

【0050】실시예 1에서 언급한 방법으로 바이오 잉크를 제작하여 프린터 노즐에 연결한다. 최소 공압 시간의 경우 0.032초인데, 여기서 공압을 가하는 시간을 증가시키며 스페로이드를 제작할 수 있다. 코드 상에서 노즐 끝에 스페로이드가 맺히게 하기 위해 공압을 쬐었을 때에 딜레이를 주게 되면 공압 시간을 증가시킬 수 있다. 추가로 딜레이를 주는 시간을 0.1초, 0.3초, 0.5초, 0.7초로 하여 스페로이드를 제작하였다. 공압 시간이 0.032초일 때는 스페로이드의 지름이 300~500um였는데, 공압을 가하는 시간을 증가하게 될 경우, 1000um을 넘어가는 스페로이드가 제작되고, 0.7초의 딜레이를 준 경우에는 스페로이드가 무게를 이기지 못해 노즐 끝에 맺혀있지 못하고 bath로 떨어졌다.

【0051】

【0052】실시예 3: 반지름 3mm의 원에 다수개의 스페로이드를 제조

【0053】다수 개의 스페로이드를 일정한 간격으로 제작하기 위해서는 원의 궤도를 따라 움직이는 게 가장 효율적이라 생각하여, 원 궤도를 움직일 수 있도록 코드를 생성하였다. 처음에 원의 중심 위치에 노즐을 위치시킨 후, 반지름(3mm)과 만들 스페로이드 개수를 코드 상에 대입하면 삼각함수를 이용하여 스페로이드가 위치해야 할 점을 구하게 된다. 각 점에 도달하게 될 경우, 실시예 1에서 언급되었듯

이, 노즐 끝에 스페로이드를 맺히게 한 후, 노즐을 아래로 내려 염화 칼슘 용액에 떨어뜨린다. 다시 노즐이 위로 올라와 다음 위치와 현 위치의 차이를 이용해 다음 위치로 바로 이동을 한 후, 공압을 분사하여 스페로이드를 노즐에 맺히게 하고, 노즐을 아래로 내려 염화 칼슘 용액에 스페로이드를 떨어뜨린다. 이 과정을 계속 반복하여 원의 궤도를 모두 돌게 되면 원의 중심으로 돌아가게 된다.

【0054】 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 G-code를 가상으로 확인해주는 CAMotics라는 프로그램을 이용하여 인쇄 시뮬레이션 결과를 보여주는 모식도이다.

【0056】 실시예 4: 탈세포화된 ECM과 알지네이트의 다양한 혼합비로 제조

【0057】 본 실시예에는 바이오 잉크 조성의 최적화를 위해서, 세포를 포함하지 않는 점을 제외하고는 바이오 잉크 조성은 실시예1과 동일하게 제조하였으며, 다만 탈세포화된 ECM과 알지네이트의 다양한 혼합비로 잉크 조성물을 제조하였다.

【0058】 구체적으로, 비율에 따른 실험을 할 때에는 세포를 사용하지 않고 미디어와 ECM의 혼합물과 알지네이트만 사용하였다. 미디어 100ul 에 ECM 100ul 에 넣어 기포가 생기지 않도록 하여 균일하게 섞어준다. 이를 5개의 그룹으로 나누어 e-tube에 40ul 씩 담는다. 알지네이트를 각각 160, 80, 40, 20, 10ul 씩 넣고, 골고루 섞어준다. 한 그룹씩 차례대로 바이오잉크를 주사기로 옮겨 프린터 노즐에 연결한다. 사용하지 않는 그룹의 바이오잉크는 미리 주사기로 옮겨놓으면 시간이 지남에 따라 조성이 불균일해지기 때문에 e-tube에 보관하다가 프린팅하기 직전에 주사

기로 옮긴다. 모두 동일한 프린팅 조건 하에 프린팅을 하여 스페로이드의 형상이 균일한 비율을 찾았다. 각 실험 별로 스페로이드는 반지름 3mm 원의 둘레를 돌아가며 8개씩 제작하여 평균적인 모양을 살펴보았다.

【0059】 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물을 구성하는 세포외기질과 알지네이트의 혼합 비율에 따른 세포 스페로이드 제작 결과를 보여주는 실험결과이다. 도 3에 나타나 있듯이, 2.5 중량%의 dECM 용액과 2.0 중량%의 알지네이트 용액의 혼합 부피비가 1:4일때와 1:2일 때 스페로이드의 형상이 균일하게 나온다. 이 때에 알지네이트의 비율이 낮을수록 세포 친화도가 높아지므로, 1:2 비율이 가장 적절하다는 것을 알 수 있다.

【0061】 실시예 5: 다양한 노즐 크기 및 공압 조건에 따른 스페로이드 제조

【0062】 본 실시예에는 바이오 잉크 조성의 최적화를 위해서, 세포를 포함하지 않는 점을 제외하고는 바이오 잉크 조성은 실시예1과 동일하게 제조하였으며, 다만 탈세포화된 ECM과 알지네이트의 다양한 혼합비로 잉크 조성물을 제조하였다.

【0063】 실시예 4에서 얻은 ECM과 알지네이트의 비율을 사용하여 바이오 잉크를 제작한다. 이 실험 역시 세포를 사용하지 않고 진행한다. 노즐 크기와 공압 조건의 프린터에서 조절하는 부분이기 때문에 하나의 바이오 잉크만 제작하면 된다. 알지네이트 200ul 과 ECM+media 100ul 을 준비하여 25G 노즐이 연결된 주사기에 주입한다. 공압은 동일하게 0.032초씩 제공하며, 공압 크기를 100kPa, 20kPa로

바뀌가며 스페로이드를 제작한다. 각 실험 별로 스페로이드는 반지름 3mm 원의 둘레를 돌아가며 8개씩 제작하여 평균적인 모양을 살펴보았다. 25G일 경우, 20kPa을 주었을 경우에도 스페로이드의 크기가 500um를 넘어가는 수준이었고, 그 모양마저 균일하지 않았다. 공압을 낮추게 되면 더욱 균일한 스페로이드를 얻기 어려울 것이라 판단되어, 25G는 부적절하다는 결론을 얻었다. 사이즈가 더 작은 27G로 노즐을 변경한 후, 100kPa, 50kPa, 35kPa, 20kPa의 공압으로 스페로이드를 프린팅하였다. 100kPa의 공압을 주었을 때는 스페로이드는 크기가 너무 컸고, 20kPa의 공압을 주었을 때는 압력이 약하다 보니 염화칼슘 용액에 떨어질 때, 노즐에서 나오는 꼬리가 형성되어 스페로이드 형상이 균일하지 못하였다. 결론적으로 27G 노즐을 사용하여, 35kPa~50kPa의 공압을 주었을 때 균일한 스페로이드를 대량으로 손쉽게 생산가능하다.

【0064】 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 노즐 및 공압 조건으로 인쇄를 수행한 결과를 나타내는 캡슐 사진이다.

【0066】 실시예 6: 세포생존력 평가

【0067】 실시예1 에서 제작한 세포 스페로이드에서의 세포 생존능을 보는 실험이다. 구체적으로 세포는 3가지 종류로 수행하였으며, 즉, EPC 단독, CPC 단독, EPC 및 CPC을 동일 개수비로 혼합한 혼합세포를 사용하였다.

【0068】 제작을 마친 후, 스페로이드가 들어가 있는 6-well plate를 클린벤치로 옮겨와 1ml의 염화칼슘용액에 추가로 미디어를 4ml 주입해준다. 염화칼슘 용액을 제작 이후 바로 제거하려다 스페로이드 형상이 부서질 수 있기 때문에 염화칼슘 용액을 그대로 둔 채, 미디어만 벽을 따라 조심스럽게 추가해준다. 24시간 동안 인큐베이터에 넣어 두었다가, 다시 꺼내어 6well plate의 다른 bath에 체를 설치하여 스페로이드와 미디어를 조심스럽게 빨아들여 체로 스페로이드만 걸러낸다. 새로운 미디어를 bath에 넣고, 체를 담근다. 이 때, 체 위로도 미디어가 충분히 올라와서 스페로이드가 잠길 수 있도록 한다. 그 이후엔 2일에 한 번씩 미디어를 갈아주었다.

【0069】 생존능을 보기 위해선 체로 걸러낸 스페로이드를 미디어가 아닌 live/dead assay 용액이 섞인 2차수 용액에 넣어 30분간 인큐베이터에 넣은 후 형광현미경으로 관찰하였다. 이 때, PBS를 사용하지 않는 이유는 스페로이드에 알지네이트가 섞여있는데, PBS에 오랜 시간 노출될 경우, 알지네이트가 분해될 수 있기 때문이다.

【0070】 도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 세포 스페로이드 내 세포의 생존능을 보여주는 사진이며, 도 5d는 도 5a 내지 5c와 동일한 사진을 사용 세포별로 구분하여 나타낸 것이다.

【0071】 Day1과 Day7일 때에 생존능을 보면 대부분의 세포가 살아있는 것을 볼 수 있다. 이를 통해 스페로이드 내 환경을 세포 친화적 니쉬 환경으로 조성해주었다는 걸 알 수 있다.

【요약서】

【요약】

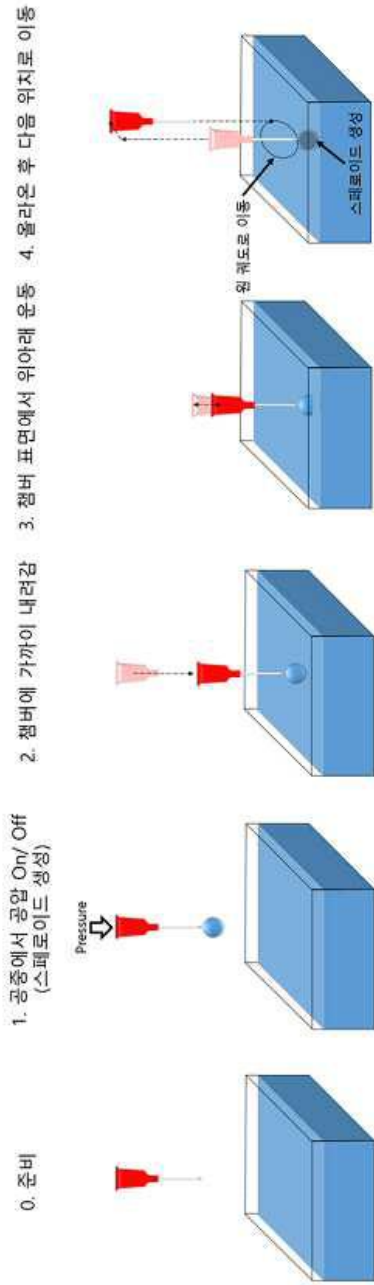
본 발명은 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 세포 스페로이드의 제조방법에 관한 것이며, 상기 세포 스페로이드는 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래 세포 등을 유효성분으로 포함하는 혈관계, 내분비계 질환 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

【대표도】

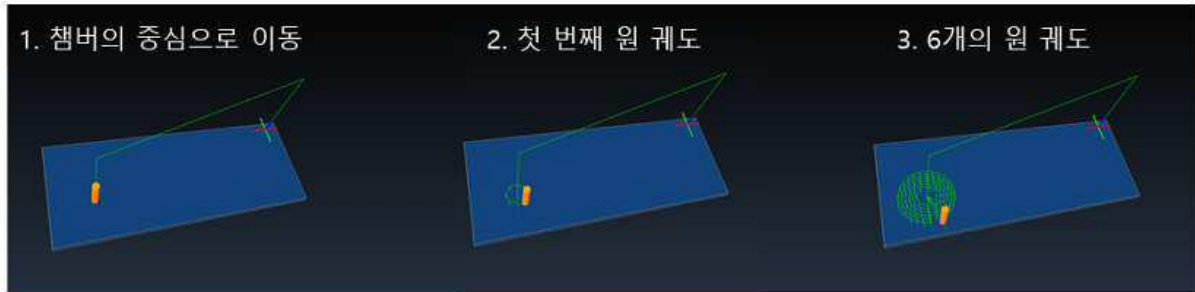
도 1

【도면】

【도 1】



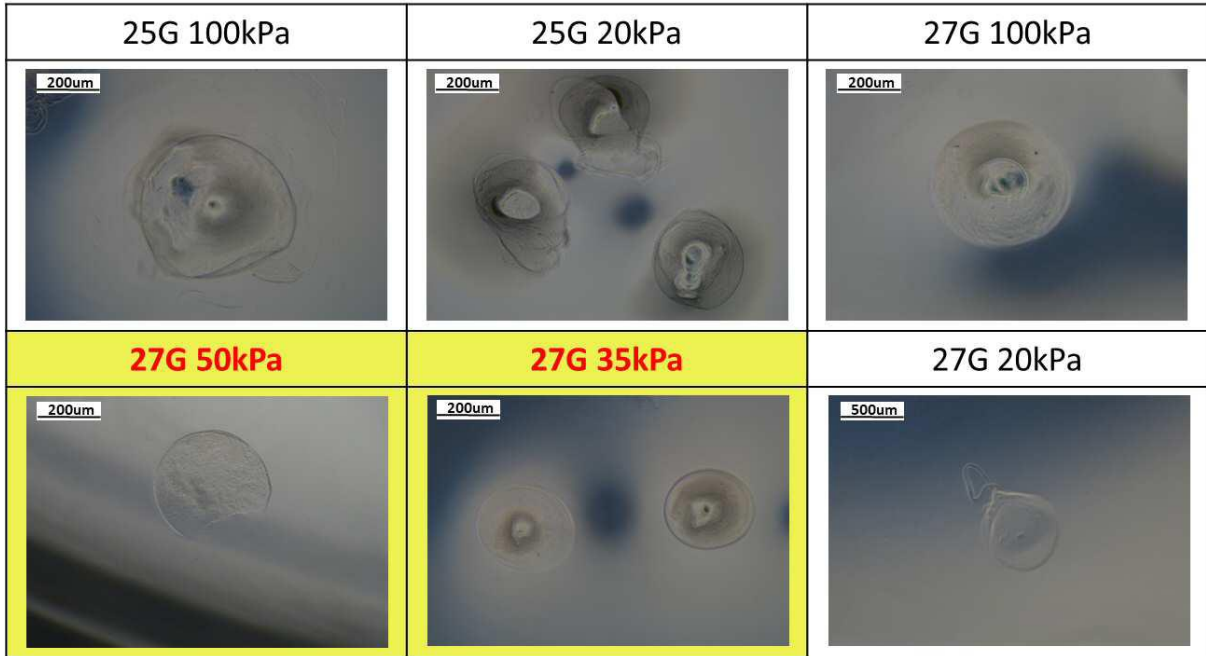
【도 2】



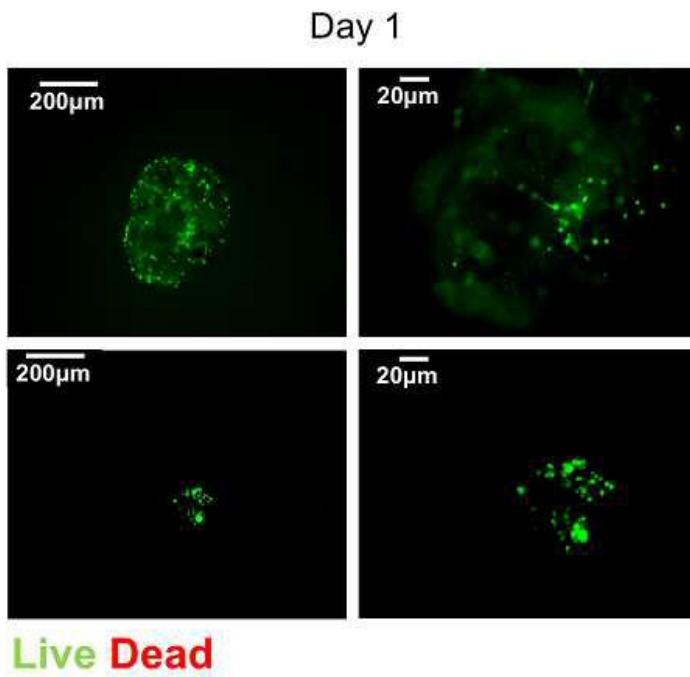
【도 3】

1:4	1:2	1:1
2:1	4:1	dECM : Alginate
		<p><Printing parameter></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pressure : 100kPa • Nozzle : 27G • Time : 0.032s • CaCl₂ : 2% • Alginate : 2% • dECM : 2.5%

【도 4】

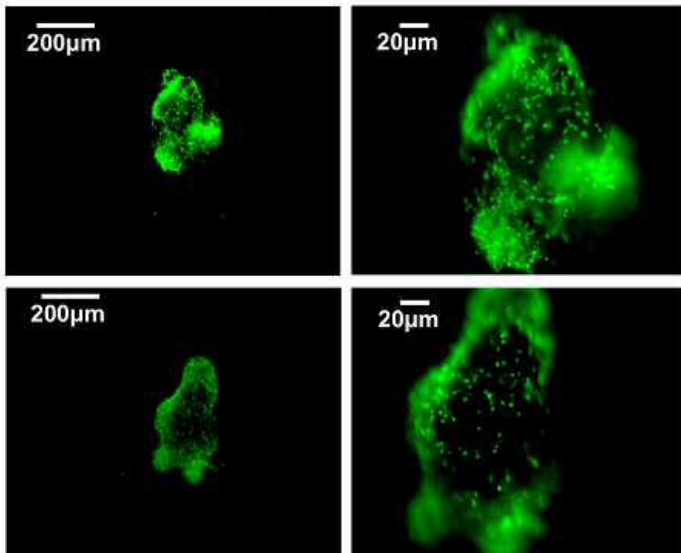


【도 5a】



【도 5b】

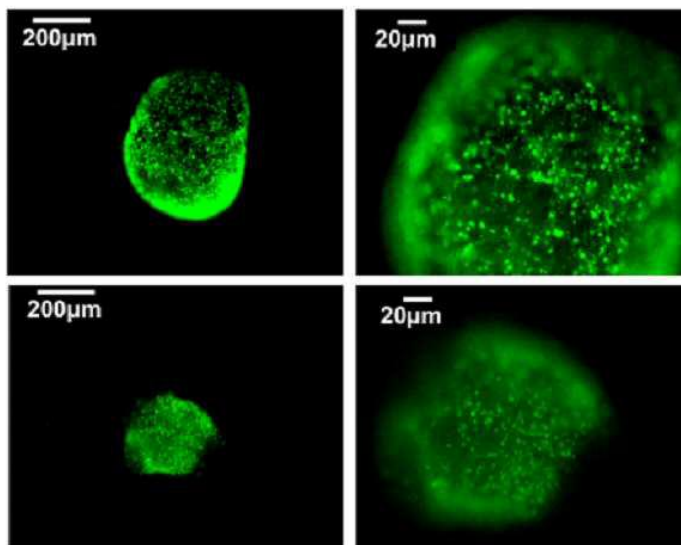
Day 7



Live Dead

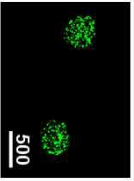
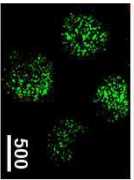
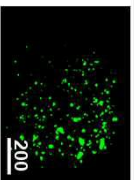



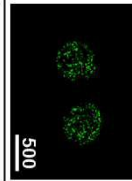
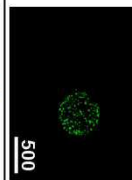
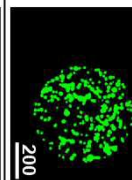
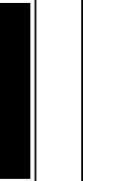
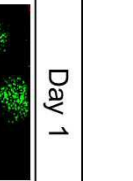
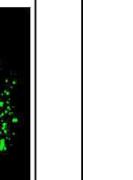
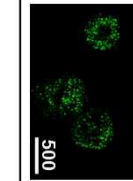
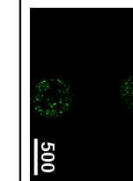
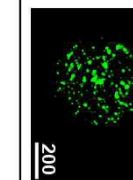
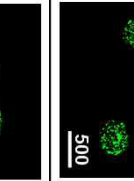
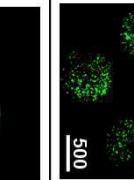
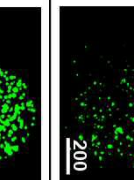
【도 5c】

Day 14



Live Dead

【 5d】

	Day 1						Day 7					
CPC												
EPC												
CPC +EPC												

Unit : μm **Live Dead**