



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월23일
(11) 등록번호 10-2104120
(24) 등록일자 2020년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
B29C 64/106 (2017.01) B33Y 80/00 (2015.01)
B29K 67/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0050195
(22) 출원일자 2018년04월30일
심사청구일자 2018년04월30일
(65) 공개번호 10-2018-0122288
(43) 공개일자 2018년11월12일
(30) 우선권주장
1020170056451 2017년05월02일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110106235 A*
J. Mater. Chem. B, vol.4,
pp.7521~7539(2016)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
(72) 발명자
김성원
서울특별시 강남구 압구정로 151, 101동 404호 (압구정동, 현대아파트)
임정연
서울특별시 강남구 선릉로 748, 201동 305호 (청담동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 4 항

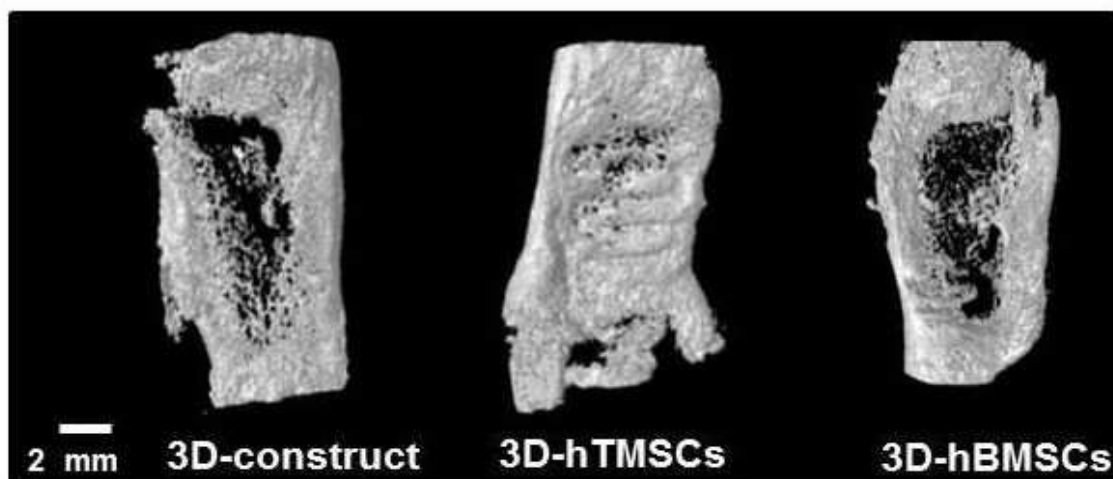
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법 및 이의 이용에 관한 것으로, 기존의 중간엽 줄기세포는 획득 과정에서 극심한 통증을 동반하고, 획득 시기에 제한이 있거나, 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모되며 감염 등의 위험성이 높지만, 사람 코 하비갑개 유 (뒷면에 계속)

대표도 - 도5b



래 중간엽 줄기세포는 획득 과정에서 수술의 위험성이 낮고, 언제든지 충분한 양의 중간엽 줄기세포를 획득할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체는 기존의 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체보다 체외 및/또는 체내에서 안정적으로 생존 및 증식할 수 있고 골 분화능 또한 높다는 장점이 있다. 상기의 장점으로 인해 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포로부터 3D 바이오프린팅 조직체를 용이하게 제조할 수 있으므로 세포 치료제의 실용화를 앞당기는데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

- B29C 64/106** (2017.08)
- B33Y 80/00** (2013.01)
- B29K 2067/00** (2019.01)
- B29K 2995/0056** (2019.01)
- C12N 2533/54** (2013.01)
- C12N 2533/74** (2013.01)

장진아

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 9동 402호 (지곡동, 교수아파트)

김석원

서울특별시 금천구 금하로 793, 114동 1404호 (시흥동, 벽산2단지아파트)

(72) 발명자

박선화

서울특별시 관악구 신림로68길 29-10, 801호 (신림동, 조은빌)

윤병곤

경기도 수원시 장안구 정자천로133번길 26, 554동 704호 (정자동, 백설마을 동양고속아파트)

조동우

서울특별시 광진구 아차산로 262, B동 1404호 (자양동, 더샵스타시티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3228

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 호흡기도(기관, trachea) 재생을 위한 환자 맞춤형 바이오프린팅 기관 실용화 기반기술 개발

기여율 1/3

주관기관 가톨릭대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2020.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711013379

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 사람 기도 (코점막 : 하비갑개) 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 호흡점막상피 도포 기능성 안면 두경부 결손의 재건

기여율 1/3

주관기관 가톨릭대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 14172차세대974

부처명 식품의약품안전평가원

연구관리전문기관 식품의약품안전처

연구사업명 차세대 줄기세포기반제제 평가 연구 사업단

연구과제명 3D 프린팅 기반 줄기세포치료제제의 조직분화능에 따른 유효성 평가기반 연구

기여율 1/3

주관기관 가톨릭대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.01 ~ 2017.11.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 유효성분으로 포함하는, 골결손 치료용 세포 치료제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조직체는 하기 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는, 골결손 치료용 세포 치료제:

- (a)사람 코 하비갑개 절제술 시행과정에서 채취한 코 하비갑개 조직으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;
- (b)상기 분리된 중간엽 줄기세포를 하이드로젤에 봉입하여 바이오잉크를 제작하는 단계; 및
- (c)상기 바이오잉크를 폴리카프로락톤(polycaprolactone)과 혼합하여 미세압출 방식으로 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 제작하는 단계.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 방법은, 상기 (c)단계에서 제작된 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 안정화 배양액에서 안정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 골결손 치료용 세포 치료제.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 (b)단계의 하이드로젤은 콜라젠 또는 알지네이트(alginate)인 것을 특징으로 하는, 골결손 치료용 세포 치료제.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체의 제조방법 및 상기 3D 바이오프린팅 조직체의 이용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 조직공학은 21세기 10대 차세대 성장 동력 산업의 하나인 바이오 장기/신약 분야의 기반기술로써, 3D 프린팅 기술을 기반으로 한 재생의학에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 단순 인체 외형 골격의 유지와 3D 프린팅 구조체가 이식된 후 생체 잔존 조직 세포들의 모집(recruit)을 기대하는 맞춤형 거푸집(scaffold) 개념의 기존 생체 적합성 맞춤형 3D 프린팅 구조체 이식으로는 재현성 있는 일관된 기능성 인체 조직 및 기관 재생은 불

가능한 상황이다. 따라서 효과적인 인간의 조직 및 장기재생을 위해 3차원 프린팅 기술을 기반으로 다양한 조직으로 분화가 가능한 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 기술이 미래 신성장 동력으로 주목받고 있으며, 차세대 줄기세포치료제 개념을 선도하는 새로운 연구 영역으로서 3D 프린팅 기반 줄기세포치료제 개발에 대한 연구가 필요한 상황이다.

- [0003] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stromal cell)는 성체조직인 골수, 흡입된 지방조직, 제대혈, 탯줄 등에서 얻을 수 있으며 섬유모세포의 형태를 갖는다. 상기 세포는 시험관에서 무한정 증식이 가능하며, 혈액줄기세포와 달리 지방, 골세포, 연골세포, 심근세포, 신경세포 등 다양한 종류의 중요한 세포계열로 분화할 수 있어 조직공학과 재생의학의 영역에서 많은 연구가 이루어지고 있다(KR10-1327076).
- [0004] 한편, 상기 중간엽 줄기세포를 획득하기 위한 수술은 극심한 통증을 동반하거나 전신마취나 척추마취가 필요할 수 있으며, 획득되는 중간엽 줄기세포의 양이 매우 적고 임상적으로 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모되며, 감염과 세포 손실의 위험성이 높다는 문제점이 제기되고 있다.
- [0005] 이에, 본 발명자들은 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로, 기존의 중간엽 줄기세포 공여부보다 접근성이 높은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 기반으로 3D 바이오프린팅 기술을 이용하여 효과적이고 안정적인 줄기세포 3D 조직체를 제작할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0008] 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

- [0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a)사람 코 하비갑개 절제술 시행과정에서 채취한 코 하비갑개 조직으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;
- [0010] (b)상기 분리된 중간엽 줄기세포를 하이드로젤에 봉입하여 바이오잉크를 제작하는 단계; 및
- [0011] (c)상기 바이오잉크를 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)과 혼합하여 미세압출 방식으로 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 제작하는 단계를 포함하는, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일구현예로, 상기 방법은, 상기 (c)단계에서 제작된 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 안정화 배양액에서 안정화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (b)단계의 하이드로젤은 콜라젠 또는 알지네이트(alginate)일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일구현예로, 상기 세포 치료제는 골결손 치료용 세포 치료제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법 및 이의 이용에 관한 것으로, 기존의 중간엽 줄기세포는 획득 과정에서 극심한 통증을 동반하고, 획득 시기에 제한이 있거나, 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모되며 감염 등의 위험성이 높지만, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 획득 과정에서 수술의 위험성이 낮고, 언제든지 충분한 양의 중간엽 줄기세포를

획득할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체는 기존의 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체보다 체외 및/또는 체내에서 안정적으로 생존 및 증식할 수 있고 골 분화능, 골 결손 재생능 및 골 결손 부위내 생존 및 분화능 또한 높다는 장점이 있다.

[0017] 상기의 장점으로 인해 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포로부터 3D 바이오프린팅 조직체를 용이하게 제조할 수 있으므로 세포 치료제의 실용화를 앞당기는데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 이에 더하여, 본 발명의 방법으로 제조된 3D 바이오프린팅 조직체는 사용된 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포와 그 유전적 기원이 동일하므로 각 개체에 맞추어진 면역적합성 세포 치료제의 제공을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 3D 바이오프린팅 조직체를 나타낸 도이다.

도 2a 및 도 2c는 3D 바이오프린팅 조직체의 체외에서의 세포의 안정성을 나타낸 도이다.

도 2b 및 도 2d는 3D 바이오프린팅 조직체의 체외에서의 세포의 증식능 변화를 나타낸 도이다.

도 3a는 골 분화 배양액에서 3D 바이오프린팅 조직체를 1 내지 3주 동안 골 분화를 유도한 결과물을 나타낸 도이다.

도 3b는 골 분화를 유도한 3D 바이오프린팅 조직체를 일반광학현미경을 이용하여 갈슘 축적을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 3c는 면역형광염색법을 통하여 골 분화를 유도한 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 포함 3D 바이오프린팅 조직체에서 골 분화 관련 단백질(RUNX2)의 발현 여부를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3d는 면역형광염색법을 통하여 골 분화를 유도한 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포 포함 3D 바이오프린팅 조직체에서 골 분화 관련 단백질(RUNX2)의 발현 여부를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4a 및 도 4c는 3D 바이오프린팅 조직체 및 골 분화를 유도한 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 세포 생착 여부를 면역형광염색법을 통하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4b 및 도 4d는 3D 바이오프린팅 조직체 및 골 분화를 유도한 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 골 분화능을 면역형광염색법을 통하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4e는 골 분화를 유도한 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 세포 생착 여부를 human nuclei에 대한 면역형광염색법을 통하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a는 Tibial defect model에 코 하비갑개 유래 또는 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 이식하는 것을 나타낸 도이다.

도 5b는 동물을 희생하여 적출한 장골 조직을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 micro-computed tomography (micro-CT)를 이용해, 각각 3D construct와 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체와 비교하여 골 재생 정도를 나타낸 도이다.

도 5c는 micro-computed tomography (micro-CT)를 이용해, 코 하비갑개 및 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체와 3D construct가 이식된 골 결손부위에서 골 재생 정도를 각각 Tissue volume (BV/TV) within the defect area, trabecular number (Tb.N.), trabecular thickness (Tb.Th.), 및 trabecular separation (Tb.Sp.)을 기준으로 측정 및 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6a는 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹에서 2주후에 골 재생이 나타나는 것을 H&E 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6b는 Masson's trichrome(MT) 염색을 통해 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체에서 체내 골 분화 및 갈슘 축적을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 6c 및 6d는 사람 코 하비갑개 중간엽 줄기세포 및 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 이식 그룹에서 세포의 생착 여부 및 골세포로의 분화 여부를 RUNX2 및 human nuclei에 대한 면역형광염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6e는 사람 코 하비갑개 및 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 이식 그룹에서 세포의

생착여부 및 골세포로의 분화여부를 확인하기 위해, human nuclei에 대한 면역형광염색을 통해 나타난 human nuclei 세포(cell)의 개수를 각각 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명자들은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포로부터 세포 안정성, 증식능, 골 분화능, 골 결손 재생능 및 골 결손 부위내 생존 및 분화능이 우수한 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법을 발견하였고, 이에 본 발명은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 3D 바이오프린팅 조직체를 포함하는 세포 치료제를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명은 (a)사람 코 하비갑개 절제술 시행과정에서 채취한 코 하비갑개 조직으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;
- [0022] (b)상기 분리된 중간엽 줄기세포를 하이드로겔에 봉입하여 바이오잉크를 제작하는 단계; 및
- [0023] (c)상기 바이오잉크를 폴리카프로락톤과 혼합하여 미세압출 방식으로 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 제작하는 단계를 포함하는, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서, 상기 방법은 상기 (c)단계에서 제작된 3D 바이오프린팅 줄기세포 조직체를 안정화 배양액에서 안정화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에서, 상기 하이드로겔은 콜라겐 또는 알지네이트(alginate)일 수 있고, 바람직하게는 콜라겐일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다(실시예 1 참조).
- [0026] 본 발명의 다른 일실시예에서, 3D 바이오프린팅 조직체의 체외에서의 세포 안정성, 증식능, 및 골 분화능을 측정한 결과, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체의 체외 세포 안정성, 증식능, 및 골 분화능이 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에 비하여 높음을 확인하였다(실시예 2 및 실시예 3 참조).
- [0027] 본 발명의 또 다른 일실시예에서, 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 세포 생착능 및 골 형성 관련 변화를 측정한 결과, 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체보다 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에서 체내 세포 생착 및 골세포로의 분화가 잘 일어나는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0028] 본 발명의 또 다른 일실시예에서, 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 골 결손 재생능을 분석한 결과, 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체보다 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에서 골 재생이 더 크게 일어나는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0029] 본 발명의 또 다른 일실시예에서, 3D 바이오프린팅 조직체의 체내에서의 골 결손 부위 생존 및 분화능을 분석한 결과, 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체보다 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에서 체내 골 분화 및 갈슘 축적의 가능성이 훨씬 높고, 세포가 잘 생착이 더 크게 일어나는 것을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어 “줄기세포(stem cell)”란, 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는 세포로서 그 특징은 반복 분열하여 자가 재생(self-renewal)할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 세포를 의미한다. 태아의 발생과정 중 모든 조직에서 생겨나며, 성인이 되어서도 골수, 상피조직 등 세포가 활발히 교체되는 일부 조직에서 발견된다. 줄기세포는 분화 가능한 세포의 종류에 따라 수정란이 첫 분열을 시작할 때 형성되는 전능성 줄기세포(totipotent stem cells)와, 이 세포들이 계속 분열해 만들어진 포배 내막에 있는 만능성 줄기세포(pluripotent stem cells), 그리고 성숙한 조직과 기관 속에 존재하는 다능성 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류된다. 이때, 다능성 줄기세포는, 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 세포로써 태아기, 신생아기, 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직 손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다. 이러한 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라고도 한다.
- [0031] 성체 줄기세포로 분류되는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 재생의학의 재료로 각광받고 있는 세포로, 골수, 체대혈, 탯줄 혈액 등의 조직에서 채취될 수 있으며, 혈액 줄기세포와 달리 지방조직세포, 골세포

포, 연골세포, 신경세포, 심근세포 등 다양한 인체 조직을 구성하는 세포로의 분화능을 가진다. 본 발명에서는 사람 코 하비갑개 조직으로부터 분리한 중간엽 줄기세포를 이용하였다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 골결손 치료용 3D 바이오프린팅 조직체를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제를 제공한다.

[0033] 본 발명의 일구현예로, 상기 세포 치료제는 골결손 치료용 세포 치료제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0035] 본 발명의 세포치료제의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 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.

[0038] **실시예 1. 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반의 3D 바이오 프린팅 조직체 제작**

[0039] 본 연구에 이용한 코 하비갑개 조직은 코 하비갑개 절제술 시행과정에서 얻어진 조직으로서 수술 전 환자의 동의하에 이용하였다. 코 하비갑개 조직을 채취한 직후 겐타마이신(국제약품공업, 성남, 대한민국)이 포함된 생리 식염수로 3-5회 세척하여 섬유모세포를 분리하였다.

[0040] 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 분리를 위해 수술과정에서 제거된 코 하비갑개 조직을 4℃에서 보관하였고, 이 조직을 실온에서 항생-항진균 용액(Gibco, Gaithersberg, MD)으로 3회 세척하였다. 이를 다시 중성 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 뒤 수술용 가위를 이용하여 1mm³ 크기로 잘게 절단하였다.

[0041] 상기 절단한 조직을 100mm 배양용 접시에 놓고 소독된 슬라이드 글라스로 덮어 배양용 접시에 유착시켰고 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbeco' s Modified Eagle' s Media) 배지를 넣어 37℃, 5% CO2환경의 배양기에서 배양하였다. 2-3주간의 배양 후 슬라이드 글라스를 제거하고 배양액에 부유하는 세포를 세척하여 버리고 배양용 접시 바닥에 붙은 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 트립신을 사용해서 바닥으로부터 떼어내어 3대까지 계대 배양된 세포를 사용하였다.

[0042] 상기 배양방법을 통해서 얻어진 세포들을 3% 콜라젠과 섞어 2% 바이오잉크를 제작하고 multihead dispenser를 이용해 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)과 함께 미세압출 방식으로 3D 프린팅 줄기세포 조직체를 제작하였다. 3D 프린팅 조건은 하기와 같다.

[0043] - PCL 조건: 노즐 25N (내경 0.25 mm, 외경 0.45 mm)

[0044] 이동속도 (feed rate): 400 mm/min

[0045] 분사 압력: 500kpa

[0046] 온도: 80℃

[0047] -Cell encapsulated in collagen 조건:

[0048] 노즐: 26G (내경 0.25 mm, 외경 0.46 mm)

[0049] 이동속도 (feed rate): 80 mm/min

[0050] 분사 속도: 0.04 mm/s

[0051] 온도: 15-20℃

[0052] 그 결과, 도 1의 3D 바이오프린팅 조직체를 제작하였다

[0054] **실시예 2. 3D 바이오프린팅 조직체의 체외 안정성 및 증식능 분석**

- [0055] 상기 실시예 1에 따라 3D 바이오프린팅 조직체를 제작하여 10% FBS가 포함된 배양액에는 사람 코 하비갑개 유래 줄기세포를, 20% FBS가 포함된 배양액에는 골수 유래 줄기세포를 넣어 1, 7, 및 14 일 동안 체외 배양 시킨 후 Live-dead 염색 (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit, Invitrogen, USA)을 이용한 세포의 안정성과 EZ-Cytox assay kit (DAEILLAB Co, Korea, <http://www.daeillab.co.kr>)를 이용한 세포 증식능 변화를 확인하였다.
- [0056] 그 결과, 도 2a 내지 도 2d에서 나타난 바와 같이, 골수 유래 중간엽 줄기세포(hBM-MSC)를 이용한 3D 프린팅 조직체에 비해 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(hTMSC)가 포함된 조직체의 경우 세포의 안정성 및 증식능이 더 높음을 확인하였다. 그러나 2D 배양의 경우 14일 동안 세포의 안정성 및 증식능에는 큰 차이가 나지 않는 것을 확인하였다.
- [0058] **실시예 3. 3D 프린팅 줄기세포 조직체의 체외 골 분화능 분석**
- [0059] 상기 실시예 1에 따라 3D 바이오프린팅 조직체를 제작하여 하루 동안 10% 또는 20% FBS가 포함된 배양액에 넣어 안정화 시킨 후 다음날 골 분화 배양액 (10% FBS이 포함된 DMEM, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 0.1 mM 텍사메타손, 50 mM ascorbate-2-phosphate, 및 10 mM 베타-글리세로인산철)으로 교체 후 2-3일에 한 번씩 배지를 교체하며 3주간 배양하였다.
- [0060] 상기 배양이 끝난 후 1X PBS로 세 차례 세척하고 2% 파라포름알데히드로 20분 동안 고정한 후, 탈이온수 (deionized water)로 세 차례 세척하였다. 그 후 2% lizarin res Solution으로 30분 동안 반응시키고, 탈이온수로 세 차례 세척한 뒤 일반광학현미경으로 calcium accumulation을 분석하였다.
- [0061] 또한, 상기 배양이 끝난 후 1X PBS로 세 차례 세척하고 2% 파라포름알데히드로 20분 동안 고정한 후, PBS로 세 차례 세척하였다. 0.1% Triton X-100을 이용하여 permeabilization(염색이 될 수 있게 세포막을 뚫어주었다.)을 하고 PBS 세척 후 1% normal goat serum을 상온에서 1시간 동안 처리하여 nonspecific binding을 blocking 한 후 골 분화 관련 단백질에 대한 1차 항체 (Runt-related transcription factor: RUNX2, osteocalcin: OCN)를 처리하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, PBS로 세정 하고, 1차 항체에 대한 형광이 붙은 2차 항체 (Alexa Fluor 594-conjugates 또는 488-conjugates)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 PBS로 세정을 하고, 마운팅(mounting) 용액으로 마운팅을 한 후 공초점현미경(confocal microscopy)을 사용하여 골 분화 관련 단백질의 발현 여부를 면역형광염색법으로 분석하였다. DAPI는 counting staining용으로 4',6-diamidino-2-phenylindole를 의미한다.
- [0062] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, Alizarin res Solution 염색을 통해 분화 2주 및 3 주차에 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에 비해 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포가 포함된 조직체에서 골 분화가 더 잘 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.
- [0063] 그러나, 도 3b에 나타난 바와 같이, 2D 배양의 경우 두 세포 그룹에서 분화능의 큰 차이가 보이지 않았다.
- [0064] 또한, 도 3c 및 도 3d에 나타난 바와 같이, 분화 3주차에 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 3D 바이오프린팅 조직체에 비해 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포가 포함된 조직체에서 RUNX2 단백질이 더 강하게 발현되는 것을 확인하였다.
- [0066] **실시예 4. 3D 프린팅 줄기세포 조직체의 체내 생존 및 골 분화능 분석**
- [0067] 상기 실시예 1에 따라 3D 바이오프린팅 조직체를 제작한 후 7일 동안 10% 또는 20% FBS가 포함된 배양액에 넣어 안정화 시키거나 골 분화를 유도한 후 balb/c nude 마우스의 등쪽 피하(subcutaneous) 부분에 이식하고 2주 및 6주 후 동물을 희생하여 조직체를 적출하고 H&E 염색(도 4a 및 도 4c 참조)과 MT 염색 (도 4b 및 도 4d 참조)을 통해 세포의 생착 및 골 형성 관련 변화 (mineralized bone matrix)를 관찰하였다.
- [0068] 상기 마우스로부터 조직체를 얻어 4% 파라포름알데히드로 고정하고 다음날 PBS로 세척하였다. 조직체를 파라핀에 포매하여 블록을 만들고 4-5 μ m 두께로 섹션하여 탈파라핀(deparaffin) 과정을 거친 후 H&E 염색과 Masson's trichrome(MT) 염색을 하기 위해 탈파라핀 과정을 거친 파라핀 섹션을 프로테아제 K(proteinase K)를 이용하여 retrieval 시킨 후 탈이온수로 세 차례 세척해준 뒤 0.3% Triton X-100을 이용하여 permeabilization 하고 PBS 3차례 세척 후 1% normal goat serum을 상온에서 1시간 동안 처리하여 nonspecific binding을 blocking 한 후 골 분화 관련 단백질인 RUNX2와 human nuclei marker(hNU)에 대한 1차 항체를 처리하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, PBS로 세정 하고, 1차 항체에 대한 형광이 붙은 2차 항체 (Alexa Fluor 594-conjugates 또는 488-conjugates)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 PBS로 세정을 하고, 마운팅 (mounting) 용액으로 마운팅을 한 후 공초점현미경(confocal microscopy)을 사용하여 이식세포 내에

서의 생존 및 골 분화 여부를 면역형광염색법으로 분석하였다. DAPI는 counting staining용으로 4',6-diamidino-2-phenylindole를 의미한다.

[0069] 그 결과, 도 4a 및 도 4c에 나타난 바와 같이, 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹에서 2주 후에 세포가 체내에 잘 정착되어 있는 것을 H&E 염색을 통해 확인하였고, 골수 유래 중간엽 줄기세포 보다는 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 그룹에서, 그리고 체외에서 7일간 골 분화를 유도한 그룹의 세포에서 체내 생착이 더 많이 일어나는 것을 확인하였다.

[0070] 또한, 도 4b 및 도 4d에 나타난 바와 같이, H&E 염색 및 MT 염색을 통해 체외에서 7일 동안 골 분화를 유도한 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체에서 체내 골 분화 및 칼슘 축적의 가능성이 훨씬 높음을 확인하였다. 더불어, 도 4e에 나타난 바와 같이, 6주 후에도 골 분화가 유도된 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 이식그룹에서 칼슘 축적이 더 잘 나타나는 것을 확인하였다.

[0071] 더불어, 도 4e에 나타난 바와 같이, human nuclei에 대한 면역형광염색 결과, 조직체를 체외에서 7일간 골 분화 유도한 사람 코 하비갑개 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 이식그룹에서 세포가 잘 정착되어 있는 것을 확인하였고, RUNX2 면역염색 결과 골세포로의 분화도 더 잘 일어나는 것을 확인하였다.

[0073] **실시예 5. 3D 프린팅 줄기세포 조직체의 체내 골 결손 재생능 분석**

[0074] 상기 실시예 1에 따라 3D 바이오프린팅 조직체를 제작한 후 7일 동안 배양액에 넣어 골 분화를 유도한 후 Sprague-Dawley rat의 장골 결손 부분에 이식하고 2주 및 5주 후 동물을 희생하여 조직체를 적출하였다. 조직체를 4% 파라포름알데히드로 고정하고 micro-computed tomography (micro-CT)를 이용해 골 재생 정도를 각각 Tissue volume (BV/TV) within the defect area, trabecular number (Tb.N.), trabecular thickness (Tb.Th.), 및 trabecular separation (Tb.Sp.)을 기준으로 측정 및 분석하였다 (도 5b 및 도 5c). 그 결과, 도 5b 및 도 5c에 나타난 바와 같이, micro-CT 분석을 통해 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹에서 2주 후에 골 결손 부분의 재생이 일어나는 것을 세포가 없는 3D construct을 이식한 그룹과의 비교를 통해 확인하였고, 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 그룹보다는 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 그룹에서 골 재생이 더 크게 일어나 defect 크기가 줄어드는 것을 확인하였다.

[0076] **실시예 6. 3D 프린팅 줄기세포 조직체의 골 결손 부위 내 생존 및 분화능 분석**

[0077] Micro-CT 분석이 끝난 후에 조직체를 H&E 염색(도 4a 및 도 4c 참조)과 Masson's trichrome(MT) 염색 (도 4b 및 도 4d 참조)을 통해 골 형성 관련 변화 (mineralized bone matrix)를 관찰하였다.

[0078] 4% 파라포름알데히드에 고정된 조직체를 파라핀에 포매하여 블록을 만들고 4-5 μ m 두께로 섹션하여 탈파라핀 (deparaffin) 과정을 거친 후 H&E 염색과 MT 염색을 실시하였다. 또한 골 분화 관련 단백질인 RUNX2와 human nuclei marker(hNU)의 발현을 알아보기 위해 탈파라핀 과정을 거친 파라핀 섹션을 프로테이나제 K(proteinase K)를 이용하여 retrieval 시킨 후 탈이온수로 세 차례 세척해준 뒤 0.3% Triton X-100을 이용하여 permeabilization 하고 PBS 3차례 세척 후 1% normal goat serum을 상온에서 1시간 동안 처리하여 nonspecific binding을 blocking 한 후 RUNX2와 human nuclei marker(hNU)에 대한 1차 항체를 처리하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, PBS로 세정 하고, 1차 항체에 대한 형광이 붙은 2차 항체 (Alexa Fluor 594-conjugates 또는 488-conjugates)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 PBS로 세정을 하고, 마운팅 (mounting) 용액으로 마운팅을 한 후 공초점현미경(confocal microscopy)을 사용하여 이식세포 내에서의 생존 및 골 분화 여부를 면역형광염색법으로 분석하였다. DAPI는 counting staining용으로 4',6-diamidino-2-phenylindole를 의미한다.

[0079] 그 결과, 도 6a 에 나타난 바와 같이, 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹에서 진한 붉은색으로 보이는 부분이 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹보다 더 많이 확인되는바, 2주 후에 골 재생이 골수 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 이식한 그룹보다 잘 유도된다는 것을 H&E 염색을 통해 확인하였고, 도 6b에 나타난 바와 같이, MT 염색을 통해 골수 유래 중간엽 줄기세포 보다는 사람 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체를 이식했을 때 체내 골 분화 및 칼슘 축적의 가능성이 훨씬 높음을 확인하였다.

[0080] 더불어, 도 6c 및 6d, 6e에 나타난 바와 같이, RUNX2 및 human nuclei에 대한 면역형광염색 결과, 사람 코 하비갑개 중간엽 줄기세포 기반 3D 바이오프린팅 조직체 이식 그룹에서 보다 세포가 잘 정착되어 있는 것을 확인하

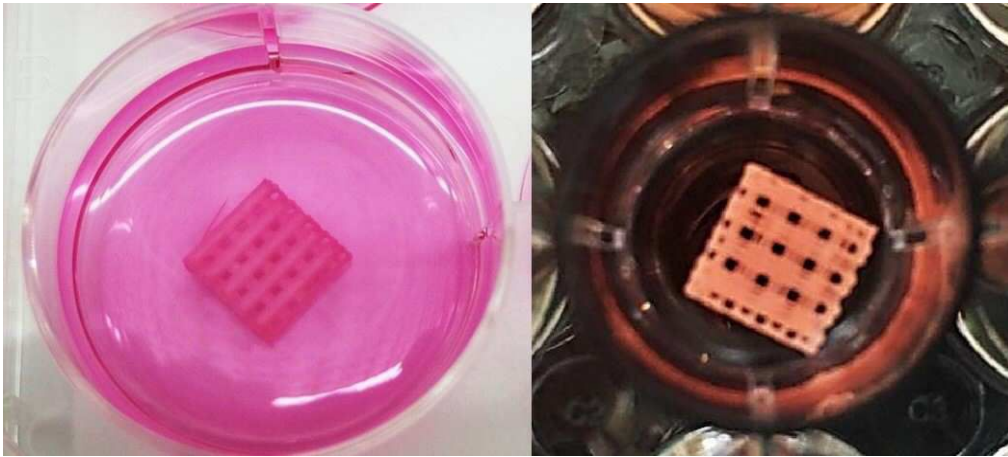
였고, RUNX2 면역염색 결과 이식된 줄기세포의 골세포로의 분화도 더 잘 일어나는 것을 확인하였다.

[0081]

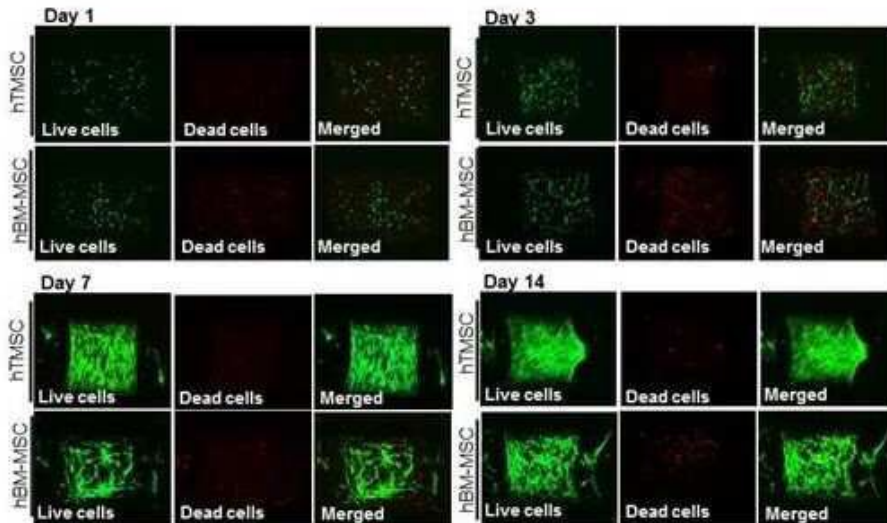
상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

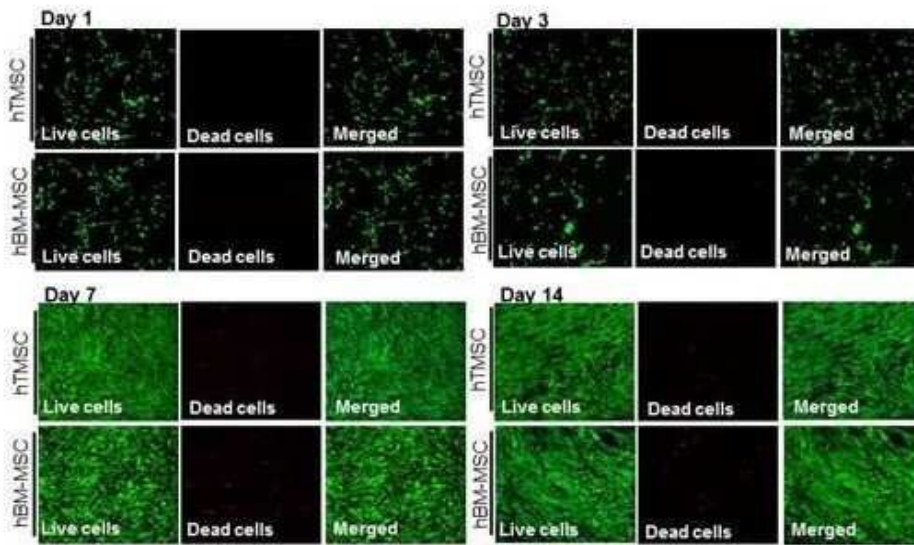
도면1



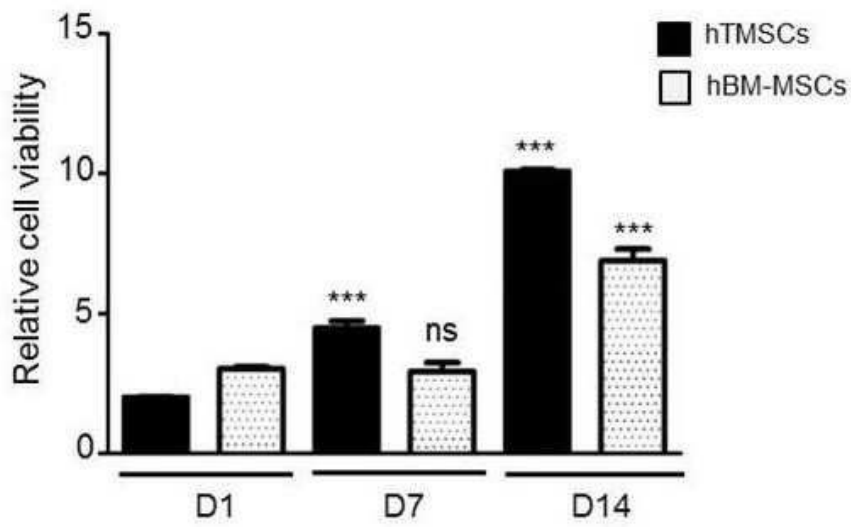
도면2a



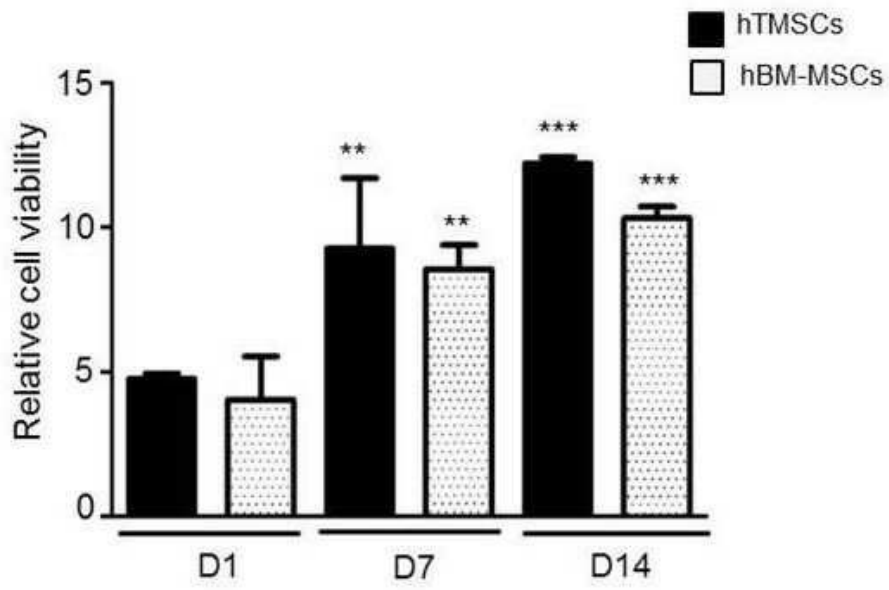
도면2b



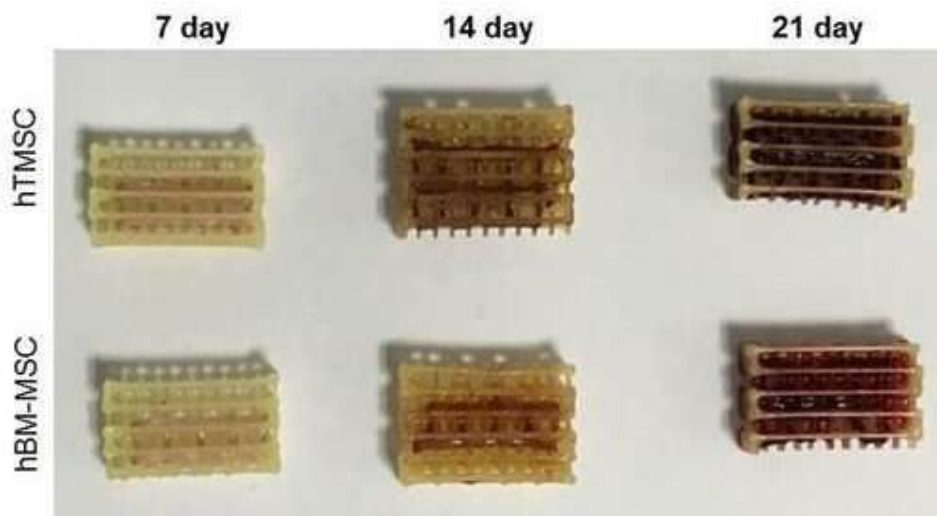
도면2c



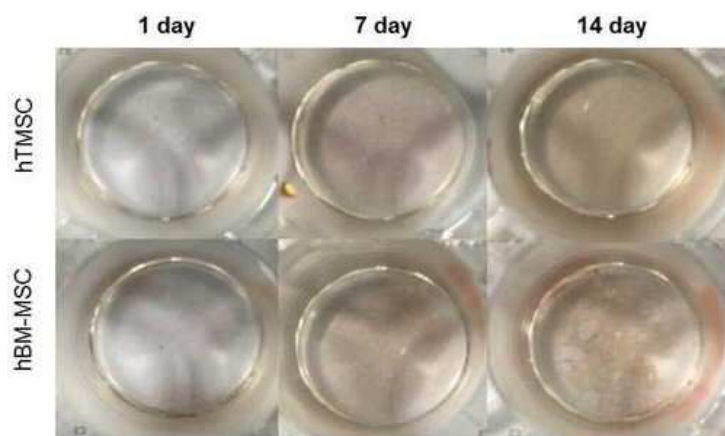
도면2d



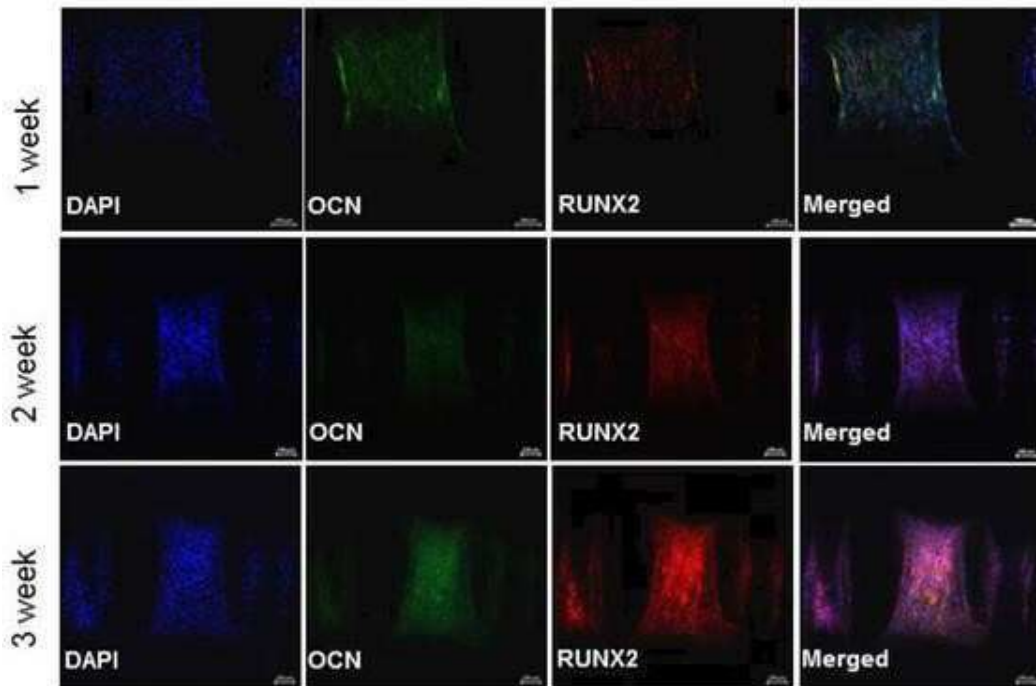
도면3a



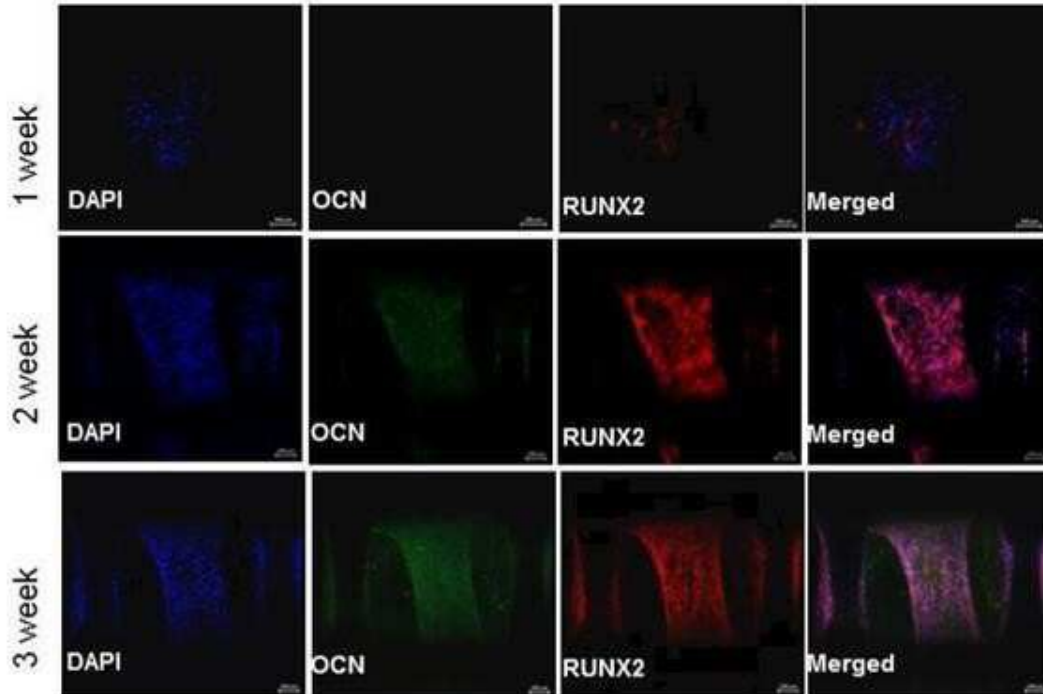
도면3b



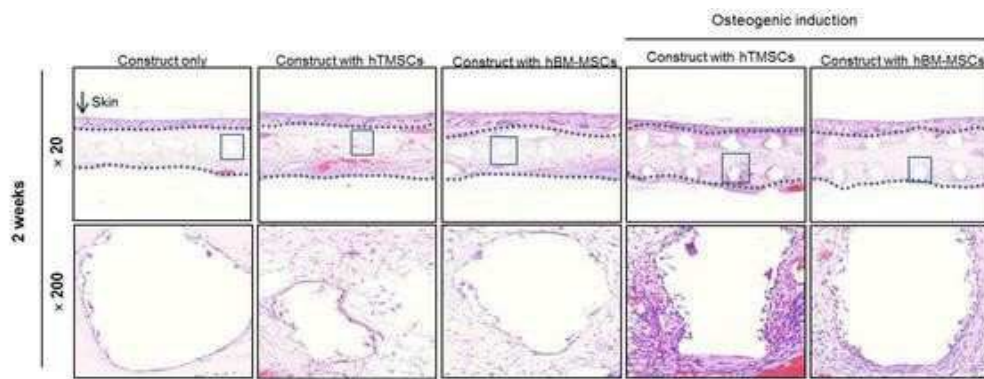
도면3c



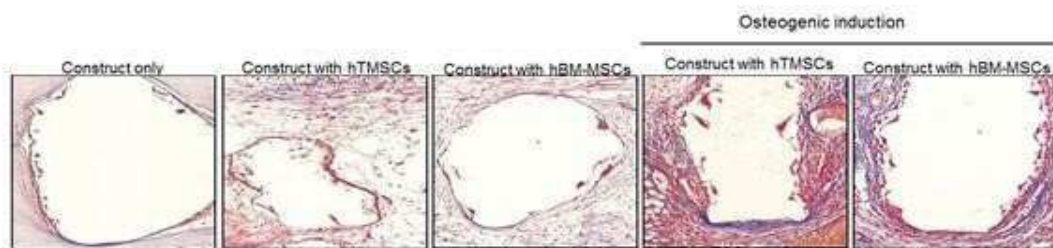
도면3d



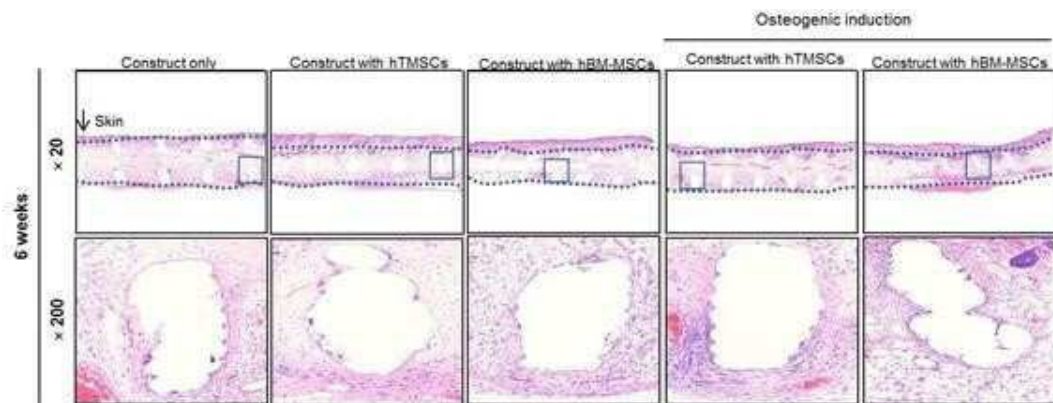
도면4a



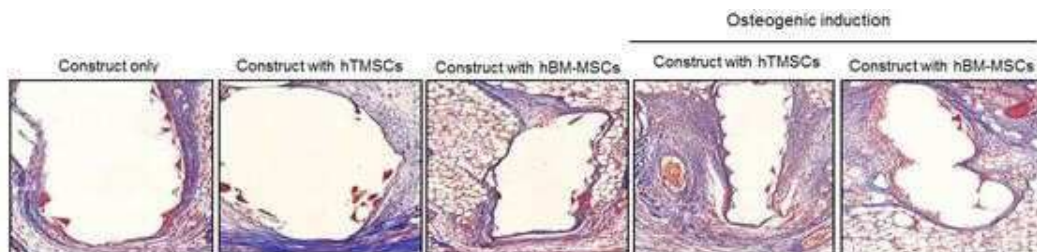
도면4b



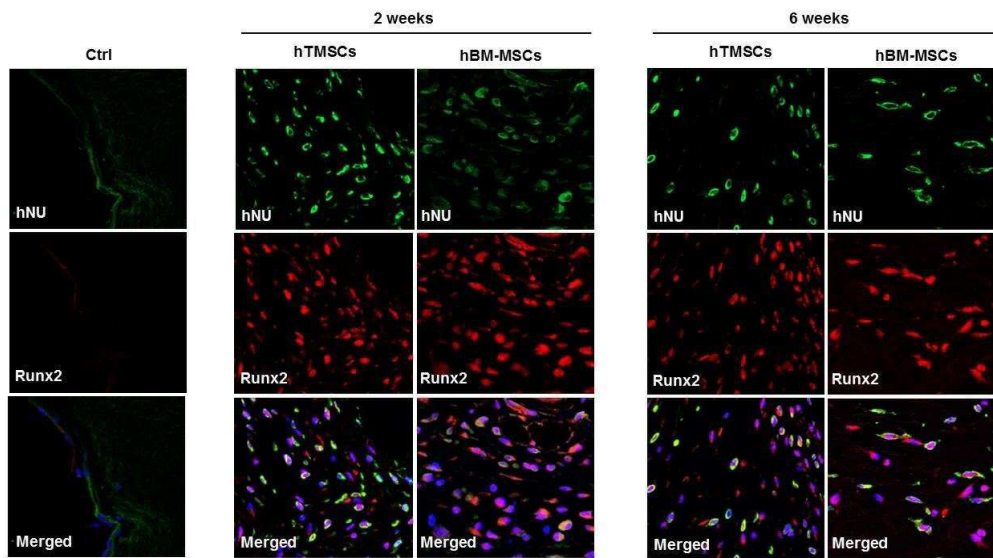
도면4c



도면4d



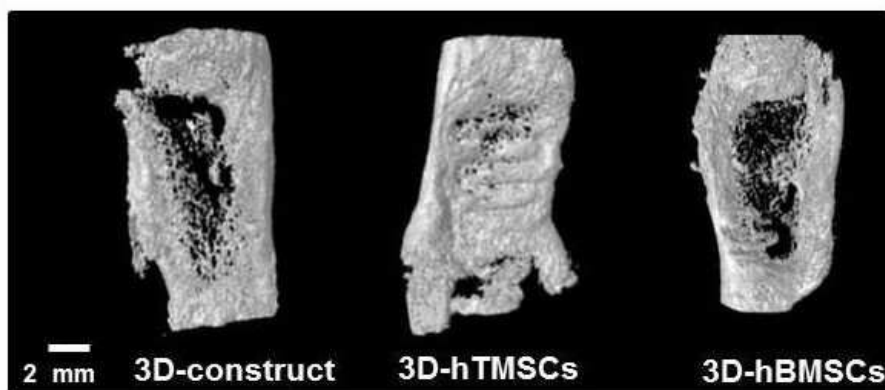
도면4e



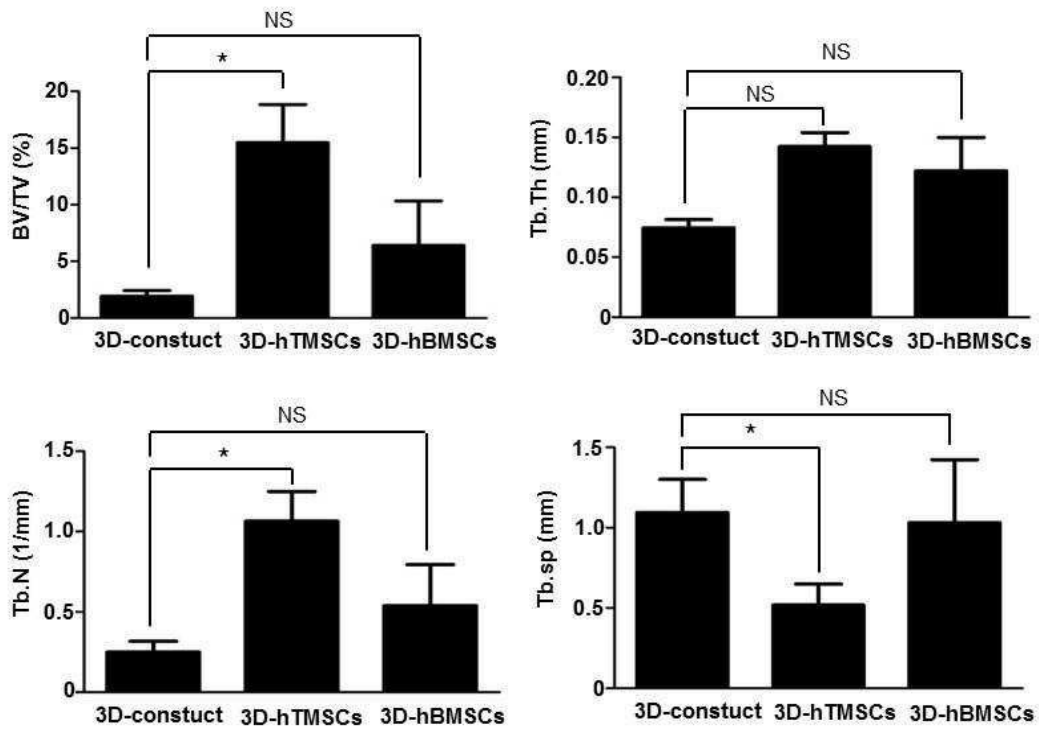
도면5a



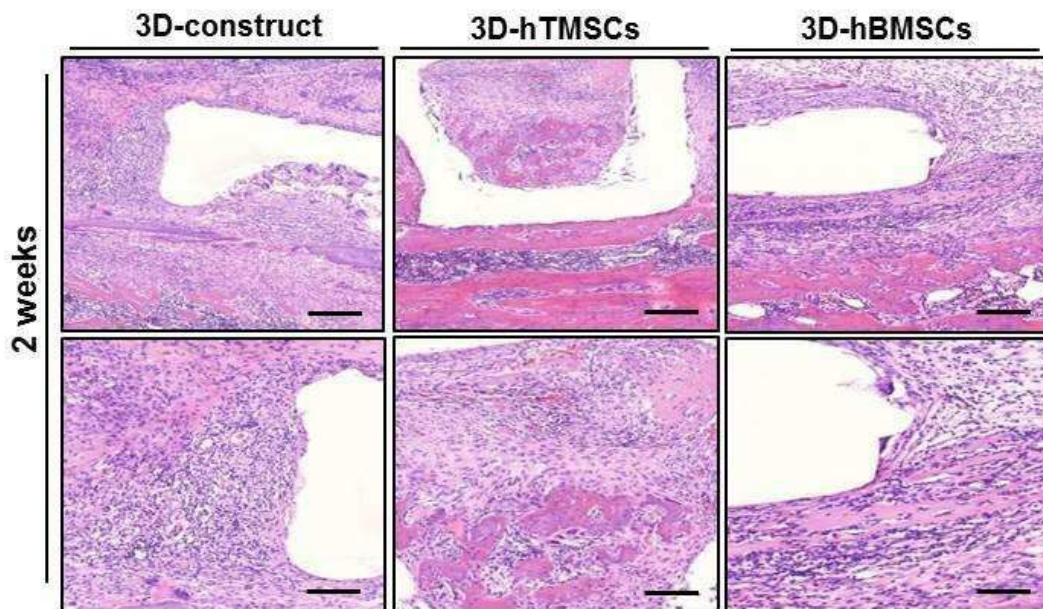
도면5b



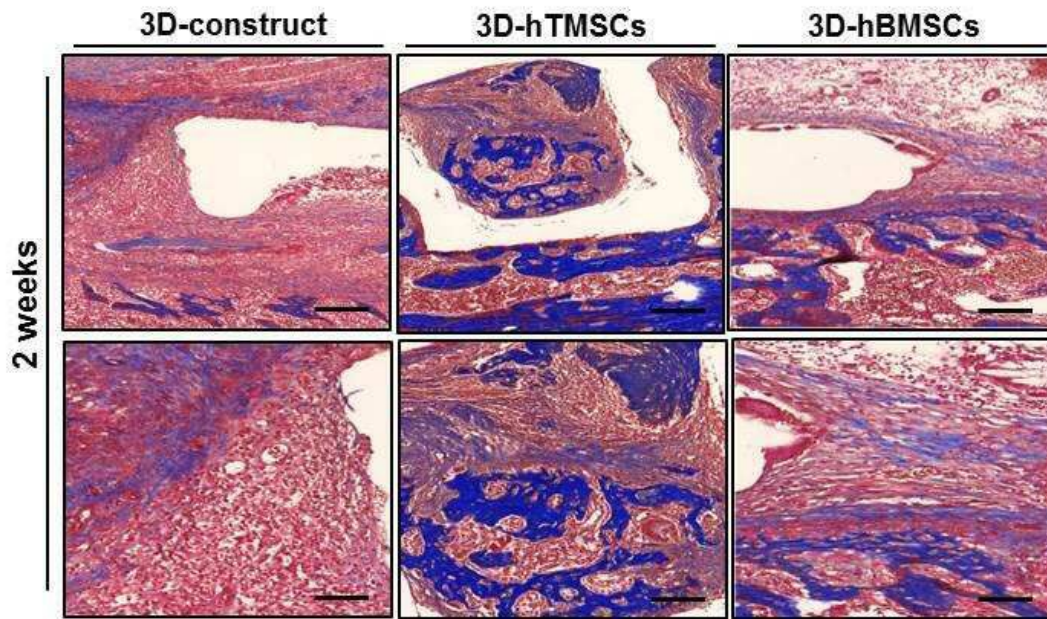
도면5c



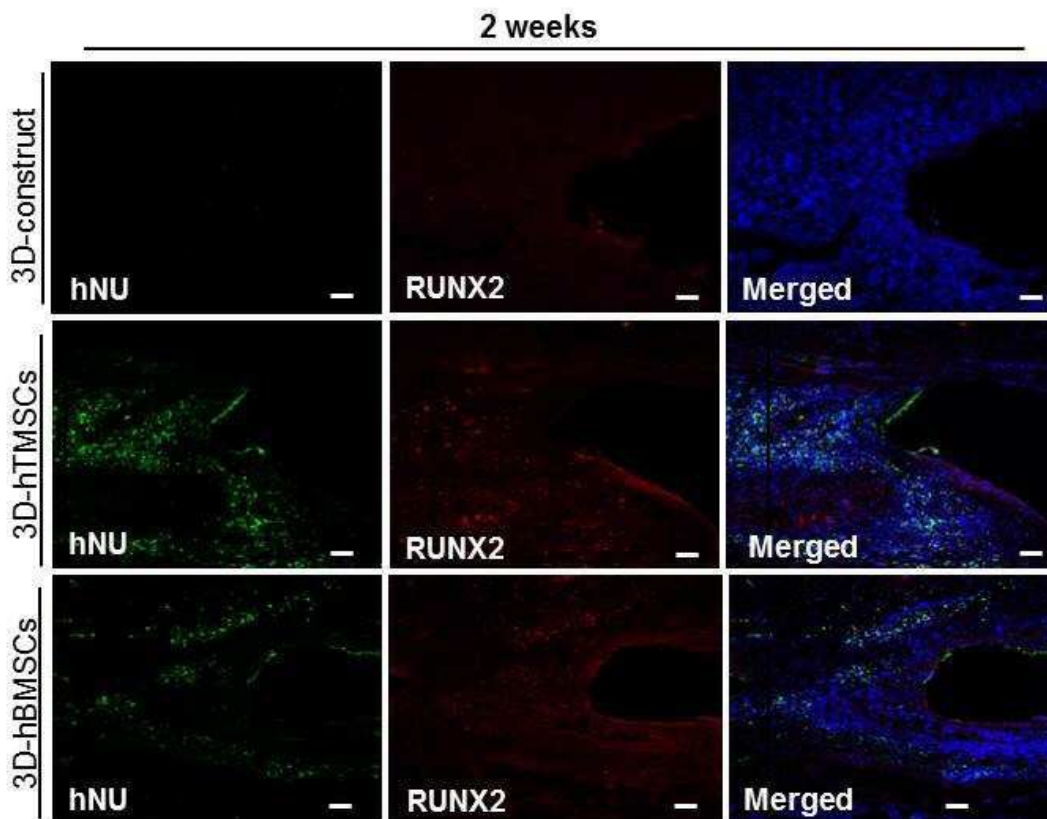
도면6a



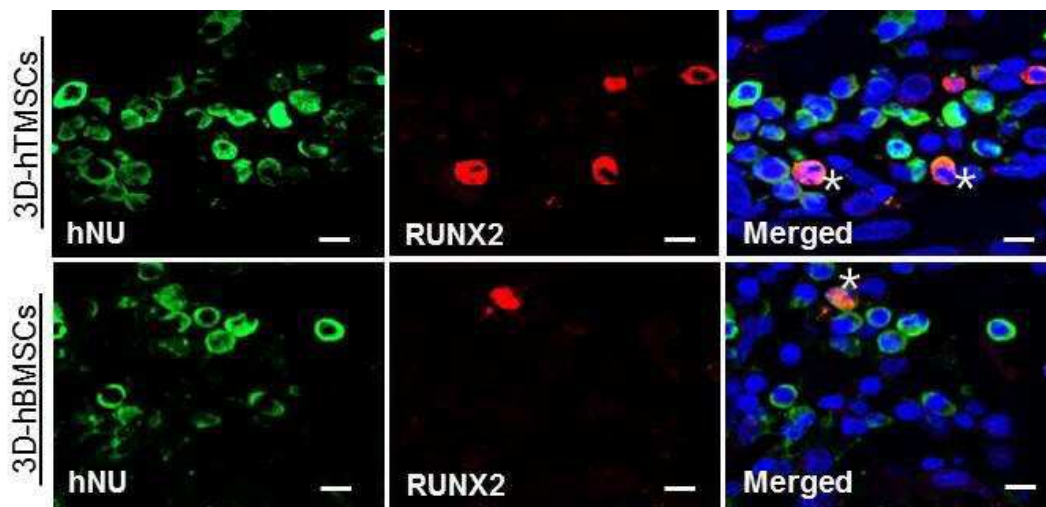
도면6b



도면6c



도면6d



도면6e

