(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 1 월 20 일 (20.01.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/014809 A1

(51) 국제특허분류:
C12M 1/12 (2006.01) *B33Y 70/00* (2015.01)
B33Y 80/00 (2015.01) *B33Y 40/20* (2020.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/001999

(22) 국제출원일: 2021 년 2 월 17 일 (17.02.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0086872 2020 년 7 월 14 일 (14.07.2020) KR
10-2020-0184770 2020 년 12 월 28 일 (28.12.2020) KR

(71) 출원인: 바오밥헬스케어 주식회사 (**BAOBAB HEALTHCARE INC.**) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55 한양대학교 창업보육센터 513호 (사동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **전호준 (JEON, Hojun)**; 15010 경기도 시흥시 서울대학로278번길 25-24 1301호, Gyeonggi-do (KR). **최은정 (CHOI, Eunjeong)**; 15631 경기도 안산시 상록구 선진로 114 203동 606호, Gyeonggi-do (KR). **강동구 (KANG, Donggu)**; 15623 경기도 안산시 상록구 감골로 83 607동 404호, Gyeonggi-do (KR). **정경호 (JUNG, Kyoungho)**; 13943 경기도 안양시 동안구 안양판교로 42 103동 804호, Gyeonggi-do (KR). **김민경 (KIM, Minkyung)**; 16566 경기도 수원시 권선구 권선로668번길 19-15 205호, Gyeonggi-do (KR).

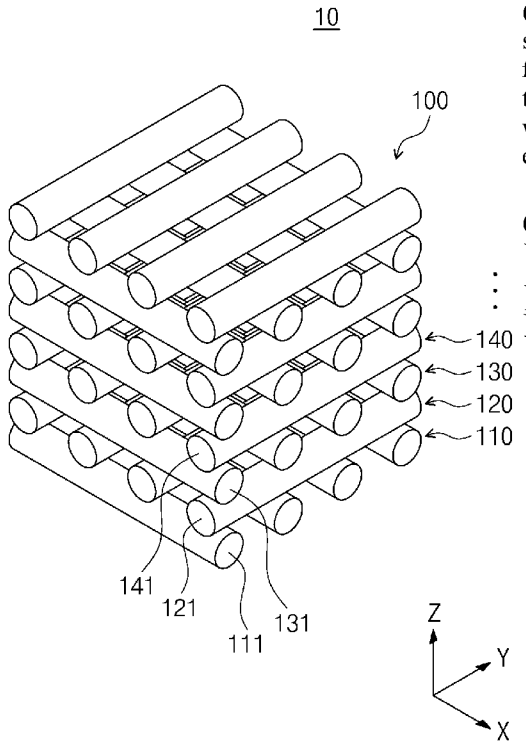
(74) 대리인: **박상열 (PARK, Sang Youl)**; 08505 서울시 금천구 가산디지털2로 123 1403호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE BED FOR MASS PRODUCTION OF EXOSOMES, AND PRODUCTION METHOD FOR SAME

(54) 발명의 명칭: 엑소좀 대량생산용 3차원 세포 배양배드 및 이의 제조 방법



(57) Abstract: Disclosed is a three-dimensional cell culture bed. A three-dimensional cell culture bed comprising: a three-dimensional scaffold in which struts formed from a bio-ink composition are disposed in two-dimensional layers, and the two-dimensional layers are stacked, forming a three-dimensional structure, with gaps formed between the struts; and polymers in the form of fibres, provided in the gaps.

(57) 요약서: 3 차원 세포 배양배드가 개시된다. 3 차원 세포 배양배드는 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3 차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3 차원 스캐폴드; 및 상기 공극들에 제공되는 파이버 형태의 고분자를 포함한다.

WO 2022/014809 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 엑소좀 대량생산용 3차원 세포 배양배드 및 이의 제조 방법

기술분야

[1] 본 발명은 엑소좀 대량생산용 3차원 세포 배양배드 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 삶의 질이 높아지고 인간의 생명연장의 꿈이 현실로 다가오면서 세포 담체를 만들어 이식함으로써 우리 몸의 손상된 조직 및 기능을 유지, 향상 또는 복원하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 조직 이식과 스캐폴드(Scaffold), 즉, 세포담체의 개발은 생체조직 공학의 발전에 따라 세포들이 3차원적으로 부착하고 배양될 수 있는 이상적인 구조 공간을 제공하고 있다. 이러한 지지체는 세포가 부착, 분화 및 이동 가능하도록 다공화된 구조로 구성되고 있으며, 생체 적합성, 생분해성, 기계적인 강도, 세포 친화적인 표면 성격, 세포 이동과 증식이 자유로운 내부 공극 구조를 가져야 한다.

[3] 최근 생체조직 공학의 발달과 더불어 더욱 더 정교하고 조직적으로 세포담체를 제작하기 위한 여러 가지 기계 공학적 기술들이 사용되고 있다. CAD/CAM 기술은 생체내 대체하고자 하는 부분에 대해 필요한 모양으로 만들어지도록 형상의 설계를 용이하게 하고, 원하는 형상의 정보를 직접적으로 얻어내고, 이를 CAD 파일로 변환하여 세포담체 제작에 필요한 구조정보를 얻어내기도 한다. 이후 3D 바이오 프린터라 불리는 정밀한 압출기계 등을 이용해 다양한 생분해성 고분자 재료와 변환된 CAD 파일을 이용해 원하는 세포담체를 제작하게 된다.

[4] 종래의 천연 생체 고분자 키토산(Chitosan)과 알지네이트(Alginate)를 혼합하여 스펀지 형태로 제작된 세포담체는 3차원 구조를 가지지만, 불균일한 공극으로 인해 세포의 이동 및 증식 등의 활성에 제한적인 한계를 가진다. 또한 중화 키토산 스폰지, 중화 콜라겐 스폰지 또는 콜라겐 코팅된 중화 키토산 스폰지를 포함하여 이루어지는 인공진피와, 이 인공진피에 인체 섬유아세포 또는 각종 생체 활성 인자들이 부가되어 있는 (생)인공진피, 그리고 이들의 제조방법은, 산성 키토산 수용액을 동결 건조한 후, 알칼리 용액으로 중화하는 인공진피 제조방법을 제공한다. 그러나, 이와 같이 제조된 인공진피는 스폰지 형태로서, 불균일한 공극으로 인해 세포의 이동 및 증식 등의 활성에 제한적인 한계를 가짐에 따라 실질적으로 2차원 세포배양과 크게 다름이 없는 결과를 보인다. 종래 세포 치료제 개발 및 연구를 위한 세포의 부족으로 제한적인 세포를 제공한다. 따라서, 종래 방식을 탈피한 대량 배양 공정 개발 필요하며, 제한적 배양으로 인한 줄기세포 유래 물질의 제한적 수확에 따른 관련 제품 개발의 어려움을 극복할 수 있는 줄기세포를 대량으로 배양할 수 있는 배드가 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 인체 친화적인 생물학적 특성 및 세포 활성이 향상되고, 줄기세포의 대량 배양과 줄기세포 유래물질의 대량 생산 구현할 수 있는 3차원 세포 배양배드 및 이의 제조방법을 제공한다.

[6] 또한, 본 발명은 줄기세포에서 내뿜는 엑소좀을 대량으로 얻어낼 수 있는 3차원 세포 배양배드 및 이의 제조방법을 제공한다.

[7] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 분야 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[8] 본 발명에 따른 3차원 세포 배양배드는 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3차원 스캐폴드; 및 상기 공극들에 제공되는 파이버 형태의 고분자를 포함한다.

[9] 또한, 상기 스트럿들의 직경은 10um 내지 2mm이고, 상기 파이버 형태의 고분자는 그 직경이 0.1um 내지 10um일 수 있다.

[10] 또한, 상기 3차원 스캐폴드는 상기 스트럿들이 제1방향으로 배열되는 제1 이차원 레이어; 및 상기 제1 이차원 레이어 상에 적층되며, 상기 스트럿들이 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 배열되는 제2 이차원 레이어를 포함할 수 있다.

[11] 또한, 상기 3차원 스캐폴드의 표면은 플라스마 처리될 수 있다.

[12] 또한, 상기 3차원 스캐폴드는, 복수의 제1스트럿들이 서로 이격하여, 제1방향으로 나란하게 배열된 제1 이차원 레이어; 상기 제1 이차원 레이어의 상부에 적층되며, 복수의 제2스트럿들이 서로 이격하여 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 나란하게 배열된 제2 이차원 레이어; 및 상기 제2 이차원 레어어의 상부에 적층되며, 복수의 제3스트럿들이 서로 이격하여 상기 제1방향으로 나란하게 배열된 제3 이차원 레이어를 포함하되, 상기 제3스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제1스트럿들의 사이 영역에 배열될 수 있다.

[13] 또한, 상기 제3 이차원 레어어의 상부에 적층되며, 복수의 제4스트럿들이 서로 이격하여 상기 제2방향으로 나란하게 배열된 제4 이차원 레이어를 포함하되, 상기 제4스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제2스트럿들의 사이 영역에 배열될 수 있다.

[14] 또한, 상기 바이오 잉크 조성물은 생분해성 물질; 생체활성 물질; 및 가교제;를 포함할 수 있다.

[15] 또한, 상기 생분해성 물질은, 천연 고분자, 합성 고분자 또는 이 둘을 포함할 수 있다.

[16] 또한, 상기 천연 고분자는, 콜라겐(collagen), 알긴산(alginic acid),

알부민(albumin), 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 실크 피브로인(silk fibroin), 폴리펩타이드(polypeptide), 헤파린(hparin), 알지네이트(alginate), 덱스트란(dextran), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 아카시아 검(acacia gum), 트라가칸친(tragacanthin), 펙틴(pectin), 구아검(guar gum), 히알루론산(Hyaluronic acid), 소듐카복시메틸덱스트란(Carboxymethyl dextran), 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 펩타이드(peptide), 올리고펩타이드(oligopeptide), 아가(agar), 카라기난(carrageenan), 갈락토만난(Galactomannans), 잔탄(Xanthan), 베타-사이클로덱스트린(Beta-Cyclodextrin), 아밀로즈(Amylose, 수용성 전분), 피브린(fibrin), 플루란(pullulan) 및 양성 전분(Tertiary amine starch ether)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하고,

[17] 상기 합성 고분자는, 폴리락트산(PLA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide; PLGA), 폴리(카프로락톤), 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트), 폴리(하이드록시 발러레이트), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)(PHBV), 폴리다이옥산온(PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르우레탄)(PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐알코올)](PVOH), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite; HA) 및 β트리칼슘 포스페이트(βphosphate; β로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[18] 또한, 상기 생분해성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 1 중량% 내지 100 중량%일 수 있다.

[19] 또한, 상기 생체활성 물질은, 성장인자, 세포 부착성 단백질, 세포 부착 분자, 아미노산, 지질, 탄수화물, 당질, 핵산, 효소, 무기물, 호르몬, 항원, 약물, Fetal bovine serum(FBS) 포함된 배양배지 세포 및 세포외기질로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[20] 또한, 상기 성장인자는, 아드레노메둘린(Adrenomedullin), 앙기오포이에틴(Angiopoietin), 자가분비 운동성 인자(Autocrine motility factor), 골 형성 단백질(Bone morphogenetic proteins), 섬모 향신경성 인자(Ciliary neurotrophic factor), 백혈병억제인자(Leukemia inhibitory factor), 인터류킨-1(Interleukin-1), 인터류킨-2(Interleukin-2), 인터류킨-3(Interleukin-3), 인터류킨-4(Interleukin-4), 인터류킨-5(Interleukin-5), 인터류킨-6(Interleukin-6), 인터류킨-7(Interleukin-7), 집락자극인자(Colony-stimulating factors), 대식세포증식작즉인자(Macrophage colony-stimulating factor), 과립구집락자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor),

표피성장인자(Epidermal growth factor), 에프린 A1(Ephrin A1), 에프린 A2(Ephrin A2), 에프린 A3(Ephrin A3), 에프린 A4(Ephrin A4), 에프린 A5(Ephrin A5), 에프린 B1(Ephrin B1), 에프린B2(Ephrin B2), 에프린 B3(Ephrin B3), 에리스로포이에틴(Erythropoietin), 섬유아세포성장촉진인자 1~23(Fibroblast growth factor 1~23), 소 성장 촉진 호르몬(Bovine somatotrophin), 신경 아교 세포계 유도 신경 영양 인자(Glial cell line-derived neurotrophic factor), 뉴투린(Neurturin), 페르세핀(Persephin), 아르테민(Artemin), 성장분화인자(Growth differentiation factor-9), 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor), 간암유래 성장인자(Hepatoma-derived growth factor) 인슐린(Insulin), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factors), 인슐린유사성장인자-1(Insulin-like growth factor-1), 인슐린유사성장인자-2(Insulin-like growth factor-2), 인터류킨(Interleukins), 각질세포 증식인자(Keratinocyte growth factor), 세포이동 자극인자(Migration-stimulating factor), 과립구대식세포 증식인자(Macrophage-stimulating protein), 마이오스타틴(Myostatin), 뉴레귤린 1~4(Neuregulin 1~4), 뉴로트로핀(Neurotrophins), 뇌유래신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor), 신경성장인자(Nerve growth factor), 뉴로트로핀 3(Neurotrophin-3), 뉴로트로핀 4(Neurotrophin-4), 태반 형성 인자(Placental growth factor), 레날라제(Renalase), T세포성장인자(T-cell growth factor), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin), 형질전환생장인자(Transforming growth factor), 형질전환생장인자 알파(Transforming growth factor alpha), 형질전환생장인자베타(Transforming growth factor beta), 종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor-alpha), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor) 및 wnt신호전달경로(Wnt Signaling Pathway)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[21] 또한, 상기 생체활성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.0001 중량% 내지 50중량%일 수 있다.

[22] 또한, 상기 가교제는, 탄닉에시드(tannic acid), 제니핀 (genipin), 트랜스글루타미나제 ((Moo Gloo TI) Transglutaminase), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드[1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; EDC], 하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS), 디메틸아미노프로필에틸카르보디이미드하이드로클로라이드(dimethylaminopropyl ethylcarbodiimide hydrochloride; EDAC), 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole) 및 글루타알데하이드(Glutaraldehyde)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[23] 또한, 상기 가교제는, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.00001 중량% 내지 30 중량%일 수 있다.

[24] 본 발명에 따른 3차원 세포 배양배드의 제조 방법은 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3차원 스캐폴드를 출력하는 3차원 스캐폴드 출력 단계; 고분자와 초순수가 혼합된 코팅액을 상기 3차원 스캐폴드의 표면에 코팅하는 코팅 단계; 및 상기 코팅액이 코팅된 3차원 스캐폴드를 건조하는 건조 단계를 포함하되, 상기 건조 단계가 완료된 상기 3차원 스캐폴드의 표면과 상기 공극에는 상기 고분자가 파이버 형태로 제공될 수 있다.

[25] 또한, 상기 3차원 스캐폴드 출력 단계에서 출력된 3차원 스캐폴드의 표면을 플라스마 처리하는 3차원 스캐폴드 표면 처리 단계를 더 포함하되, 상기 코팅 단계는, 플라스마 표면 처리된 상기 3차원 스캐폴드를 콜라겐, 알지네이트-젤라틴, 그리고 세포 부착성 단백질인 폴리도파민 중에서 선택된 물질이 포함된 코팅액에 침지할 수 있다.

[26] 또한, 상기 코팅 단계는, 상기 고분자가 제1함량으로 혼합된 제1코팅액에 상기 3차원 스캐폴드를 침지하는 1차 코팅 단계; 및 상기 1차 코팅 단계가 완료된 상기 3차원 스캐폴드를 상기 고분자가 상기 제1함량보다 낮은 제2함량으로 혼합된 제2코팅액에 침지하는 2차 코팅 단계를 포함할 수 있다

[27] 또한, 상기 건조 단계는 -100℃내지 -10℃온도에서 6시간 내지 100시간 동안 진행될 수 있다.

[28] 또한, 상기 3차원 스캐폴드 출력 단계는, 상기 바이도 잉크 조성물을 제1방향으로 출력하여 제1스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제1 이차원 레이어를 제조하는 단계; 상기 제1 이차원 레이어의 상부에 상기 바이도 잉크 조성물을 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 출력하여 제2스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제2 이차원 레이어를 제조하는 단계; 및 상기 제2 이차원 레이어의 상부에 상기 바이도 잉크 조성물을 상기 제1방향으로 출력하여 제3스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제3이차원 레이어 제조하는 단계를 포함하되, 상기 제3스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제1스트럿들의 사이 영역에 배열될 수 있다.

[29] 또한, 상기 3차원 스캐폴드 출력 단계는, 상기 제3 이차원 레이어의 상부에 상기 바이도 잉크 조성물을 상기 제2방향으로 출력하여 제4스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제4이차원 레이어 제조하는 단계를 포함하되, 상기 제4스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제2스트럿들의 사이 영역에 배열될 수 있다.

발명의 효과

[30] 본 발명에 의하면, 이차원 레이어들이 적층된 3차원 스캐폴드와 스트럿들의 사이 공극에 제공된 파이버 형태의 고분자들에 의하여, 줄기세포를 부착할 수 있는 표면적이 넓어지고, 줄기세포의 손실이 최소화되어 줄기세포의

대량배양이 가능하다.

[31] 또한, 본 발명에 의하면, 줄기세포에서 내뿜는 엑소좀을 대량으로 얻을 수 있다.

[32] 또한, 본 발명에 의하면, 배양배드는 줄기세포용 담체로 사용될 수 있고, 줄기세포의 증착, 증식 및 다양한 조직세포로 분화할 수 있는 줄기세포 담체로 적용될 수 있다. 또한, 배양배드는 기계공학적 세포배양시스템을 통한 줄기세포의 대량 배양할 수 있다. 부피 대비 높은 표면적으로 배양 단가/시간 절약이 가능하며, 3D 프린팅 기술과 3D 배양기술의 융합을 통한 줄기세포의 대량 배양과 줄기세포 유래물질의 대량 생산 구현할 수 있고, 생체모사가 가능하여 줄기세포를 이용한 다양한 사업화 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 본 발명의 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사시도이다.

[34] 도 2는 도 1의 3차원 세포 배양배드의 일부를 확대하여 나타내는 도면이다.

[35] 도 3은 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드의 제조 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

[36] 도 4는 본 발명의 제1실시 예에 따라 3D 바이오 프린터를 이용하여 스트럿을 출력하는 과정을 나타내는 도면이다.

[37] 도 5는 본 발명의 제1실시 예에 따라 제조된 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사진이다.

[38] 도 6은 도 5의 3차원 세포 배양배드의 SE(M) 사진이다.

[39] 도 7 및 도 8은 본 발명의 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드에서 줄기세포가 배양되는 과정을 나타내는 사진이다.

[40] 도 9는 본 발명의 제2실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사시도이다.

[41] 도 10은 도 9의 배양배드를 나타내는 정면도이다.

[42] 도 11은 도 9의 배양배드를 나타내는 우측면도이다.

[43] 도 12는 도 9의 배양배드의 일부를 확대하여 나타내는 도면이다.

[44] 도 13은 본 발명의 실시 예에 따라 제조된 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사진이다.

[45] 도 14는 도 13의 A영역을 확대하여 나타내는 사진이다.

[46] 도 15는 본 발명의 실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드에서 생산되는 엑소좀을 촬영한 사진이다.

[47] 도 16은 비교예에 따른 배양배드에서 생산되는 엑소좀을 촬영한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 본 발명에 따른 3차원 세포 배양배드는 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3차원 스캐폴드;

및 상기 공극들에 제공되는 파이버 형태의 고분자를 포함한다.

발명의 실시를 위한 형태

[49] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 상세히 설명할 것이다. 그러나 본 발명의 기술적 사상은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시 예는 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[50] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소 상에 있다고 언급되는 경우에 그것은 다른 구성요소 상에 직접 형성될 수 있거나 또는 그들 사이에 제 3의 구성요소가 개재될 수도 있다는 것을 의미한다. 또한, 도면들에 있어서, 막 및 영역들의 두께는 기술적 내용의 효과적인 설명을 위해 과장된 것이다.

[51] 또한, 본 명세서의 다양한 실시 예 들에서 제1, 제2, 제3 등의 용어가 다양한 구성요소들을 기술하기 위해서 사용되었지만, 이들 구성요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이들 용어들은 단지 어느 구성요소를 다른 구성요소와 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다. 따라서, 어느 한 실시 예에 제 1 구성요소로 언급된 것이 다른 실시 예에서는 제 2 구성요소로 언급될 수도 있다. 여기에 설명되고 예시되는 각 실시 예는 그것의 상보적인 실시 예도 포함한다. 또한, 본 명세서에서 '및/또는'은 전후에 나열한 구성요소들 중 적어도 하나를 포함하는 의미로 사용되었다.

[52] 명세서에서 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다. 또한, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징이나 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 배제하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 또한, 본 명세서에서 "연결"은 복수의 구성 요소를 간접적으로 연결하는 것, 및 직접적으로 연결하는 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[53] 또한, 하기에서 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 것이다.

[54]

[55] 도 1은 본 발명의 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사시도이고, 도 2는 도 1의 3차원 세포 배양배드의 일부를 확대하여 나타내는 도면이다.

[56] 도 1 및 도 2를 참조하면, 3차원 세포 배양배드(10)는 기계공학적 세포배양시스템을 통해 줄기세포를 대량 배양할 수 있다. 3차원 세포 배양배드(10)는 3차원 스캐폴드(100)와 고분자(200)를 포함한다.

[57] 3차원 스캐폴드(100)는 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿(strut, 111, 121, …)들이 이차원 레이어(110, 120, …) 상에 배열되고, 이차원 레이어(110, 120, …)들이 적층되어 3차원 구조체를 이룬다. 3차원 스캐폴드(100)는 정육면체, 직육면체, 삼각뿔, 원기둥, 구형 등 다양한 형태로 제공될 수 있다. 실시 예에 의하면, 3차원 스캐폴드(100)는 200mmX200mmX200mm 크기를 갖는다.

[58] 상기 바이오 잉크 조성물은 줄기세포의 부착, 증식, 골 세포로의 분화를 위한 것으로, 인장 특성, 높은 친수성 및 우수한 수분흡수 능력을 갖는 물리적 특성이 현저하게 개선된 3차원 스캐폴드(100)를 제조할 수 있다. 바이오 잉크 조성물은 생분해성 물질, 생체활성 물질, 그리고 가교제를 포함한다.

[59] 상기 생분해성 물질은 단일중합체 또는 공중합체로 이루어지며, 외부 이력에 의한 유동성이 거의 없는 구조적으로 안정한 3 차원 네트워크 구조를 형성하는데, 이러한 구조는 공유결합, 수소결합, 반데르발스 결합 또는 물리적인 응집 등 여러 요인에 의해 형성된다.

[60] 일 실시 예에 따르면, 상기 생분해성 물질은 천연 고분자, 합성 고분자 또는 이 둘을 포함하는 것일 수 있다.

[61] 상기 천연 고분자는, 콜라겐(collagen), 알긴산(alginic acid), 알부민(albumin), 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 실크 피브로인(silk fibroin), 폴리펩타이드(polypeptide), 헤파린(hparin), 알지네이트(alginate), 덱스트란(dextran), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 아카시아 검(acacia gum), 트라가칸친(tragacanthin), 펙틴(pectin), 구아검(guar gum), 히알루론산(Hyaluronic acid), 소듐카복시메틸덱스트란(Carboxymethyl dextran), 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 펩타이드(peptide), 올리고펩타이드(oligopeptide), 아가(agar), 카라기난(carrageenan), 갈락토만난(Galactomannans), 잔탄(Xanthan), 베타-사이클로덱스트린(Beta-Cyclodextrin), 아밀로즈(Amylose, 수용성 전분), 피브린(fibrin), 플루란(pullulan) 및 양성 전분(Tertiary amine starch ether)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[62] 상기 합성 고분자는, 폴리락트산(PLA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D, L-락트산-co-글리콜산)(poly(D, L-lactide-coglycolide; PLGA), 폴리(카프로락톤), 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트), 폴리(하이드록시 발러레이트), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)(PHBV), 폴리다이옥산온(PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르우레탄)(PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐 알코올)](PVOH), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite; HA) 및 β트리칼슘 포스페이트(βphosphate; β로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[63] 상기 생분해성 물질은 상기 바이오 잉크 조성물 중 1 중량% 내지 100 중량%인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 생분해성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 1 중량% 내지 50 중량%, 더 바람직하게는, 1 중량% 내지 30 중량%인 것일 수 있다. 상기 생분해성 물질이 상기 바이오 잉크 조성물 중 1 중량% 미만인 경우 낮은 점도로 인해 프린팅 시 구조체 제작의 문제가 발생할 수 있고, 100 중량% 초과인 경우 생체활성 물질이 첨가되지 않는다

[64] 상기 생분해성 물질이, 예를 들어, PCL, PLGA 등의 합성 고분자의 경우 100 중량%의 중량으로 토출하여 3차원 스캐폴드(100)의 제작이 가능하다. 따라서, 천연 고분자와 합성 고분자를 통합할 경우 생분해성 물질은 1 중량% 내지 100 중량%로 포함할 수 있다.

[65] 상기 생체활성 물질은, 성장인자, 단백질, 아미노산, 지질, 탄수화물, 당질, 핵산, 효소, 무기물, 호르몬, 항원, 약물, Fetal bovine serum(FBS) 포함된 배양배지 세포 및 세포외기질로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[66] 상기 성장인자는, 아드레노메둘린(Adrenomedullin), 앙기오포이에틴(Angiopoietin), 자가분비 운동성 인자(Autocrine motility factor), 골 형성 단백질(Bone morphogenetic proteins), 섬모 향신경성 인자(Ciliary neurotrophic factor), 백혈병억제인자(Leukemia inhibitory factor), 인터류킨-1(Interleukin-1), 인터류킨-2(Interleukin-2), 인터류킨-3(Interleukin-3), 인터류킨-4(Interleukin-4), 인터류킨-5(Interleukin-5), 인터류킨-6(Interleukin-6), 인터류킨-7(Interleukin-7), 집락자극인자(Colony-stimulating factors), 대식세포증식작즉인자(Macrophage colony-stimulating factor), 과립구집락자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), 표피성장인자(Epidermal growth factor), 에프린 A1(Ephrin A1), 에프린 A2(Ephrin A2), 에프린 A3(Ephrin A3), 에프린 A4(Ephrin A4), 에프린 A5(Ephrin A5), 에프린B1(Ephrin B1), 에프린 B2(Ephrin B2), 에프린 B3(Ephrin B3), 에리스로포이에틴(Erythropoietin), 섬유아세포성장촉진인자 1~23(Fibroblast growth factor 1~23), 소 성장 촉진 호르몬(Bovine somatotrophin), 신경 아교 세포계 유도 신경영양 인자(Glial cell line-derived neurotrophic factor), 뉴투린(Neurturin), 페르세핀(Persephin), 아르테민(Artemin), 성장분화인자(Growth differentiation factor-9), 간세포 성장 인자(Hepatocyte growth factor), 간암유래 성장인자(Hepatoma-derived growth factor) 인슐린(Insulin), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factors), 인슐린유사성장인자-1(Insulin-like growth factor-1), 인슐린유사성장인자-2(Insulin-like growth factor-2), 인터류킨(Interleukins), 각질세포 증식인자(Keratinocyte growth factor), 세포이동 자극인자(Migration-stimulating factor), 과립구대식세포

증식인자(Macrophagestimulating protein), 마이오스타틴(Myostatin), 뉴레귤린 1~4(Neuregulin 1~4), 뉴로트로핀(Neurotrophins), 뇌유래신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor), 신경성장인자(Nerve growth factor), 뉴로트로핀 3(Neurotrophin-3), 뉴로트로핀 4(Neurotrophin-4), 태반 형성 인자(Placental growth factor), 레날라제(Renalase), T세포성장인자(T-cell growth factor), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin), 형질전환생장인자(Transforming growth factor), 형질전환생장인자 알파(Transforming growth factor alpha), 형질전환생장인자베타(Transforming growth factor beta), 종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor-alpha), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor) 및 wnt 신호전달경로(Wnt Signaling Pathway)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[67] 상기 생체활성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.0001 중량% 내지 50 중량%인 것일 수 있다. 상기 성장인자가 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.0001 중량% 미만인 경우 성장인자가 타깃조직에 미치는 영향이 미미해 비활성화가 될 수 있고, 50 중량% 초과인 경우 바이오 잉크 조성물의 제작의 어려움과 더불어 세포의 성장이 비 정상적이거나 유전자 변형이 생겨 화학적 및 생화학적 자극 요소로 세포의 생장 및 특정 조직으로의 분화가 활성화돼 비정상적일 수 있다.

[68] 일 실시형태에 따르면, 상기 가교제는, 탄닉에시드(tannic acid), 제니핀(genipin), 트랜스글루타미나제 ((Moo Gloo TI) Transglutaminase), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드[1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; EDC], 하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS), 디메틸아미노프로필에틸카르보디이미드하이드로클로라이드(dimethylaminopropyl ethylcarbodiimide hydrochloride; EDAC), 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole) 및 글루타알데하이드(Glutaraldehyde)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[69] 상기 가교제는, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.00001 중량% 내지 30 중량%인 것일 수 있다. 상기 가교제가 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.00001 중량% 미만인 경우 3 차원 스캐폴드 제조 시 기계적 물성, 형상구현 및 형상유지를 지속적으로 할 수 없는 문제가 있을 수 있고, 30 중량% 초과인 경우 가교제의 독성으로 인해 배양배드로서 사용하기 어려운 문제가 있을 수 있다.

[70] 상기 스트럿(111, 121, …)은 3D 바이오 프린터(300)를 이용하여 바이오 잉크 조성물로 형성된다. 실시 예에 의하면, 3D 바이오 프린터(300)에서 출력되는 스트럿(111, 121, …)의 직경이 10um 내지 2mm일 수 있다. 상기 스트럿(111, 121, …)은 XY 평면으로 제공되는 이차원 레이어(110, 120, …) 상에서 기 설정된 방향으로 복수의 열로 출력된다. 그리고 상기 스트럿(111, 121, …)은 Z축 방향으로 복수의 이차원 레이어(110, 120, …) 상에서 기 설정된 방향으로 복수의

열로 출력된다.

[71] 이에 의해, 3차원 스캐폴드(100)는 Z축 방향으로 복수의 이차원 레이어(110, 120, ...)들이 적층된 3차원 구조체를 이루며, 각각의 이차원 레이어(110, 120, ...) 상에는 스트럿(111, 121, ...)이 복수의 열로 배열된다. 그리고 스트럿(111, 121, ...)들의 배열 방향은 각각의 이차원 레이어(110, 120, ...)마다 상이할 수 있다. 실시 예에 의하면, 제1 이차원 레이어(110)에서는 스트럿(111)들이 제1방향으로 배열될 수 있고, 제2 이차원 레이어(120)에서는 스트럿(121)들이 제1방향과 상이한 제2방향으로 배열될 수 있다. 제1방향은 X축 방향일 수 있고, 제2방향은 Y축 방향일 수 있다. 이와 달리, 제1방향은 X축 방향일 수 있고, 제2방향은 X축 방향에 소정 각도로 경사진 방향일 수 있다.

[72] 스트럿(111, 121, ...)들이 각각의 이차원 레이어(110, 120, ...)마다 배열되는 방향이 상이함에 따라 스트럿(111, 121, ...)들은 격자 모양으로 배열되며, 인접한 스트럿(111, 121, ...)들 사이에는 공극(130)이 형성된다. 실시 예에 의하면, 공극(130)은 그 크기가 1 ㎛ 내지 3mm이고, 공극율(porosity)이 1 % 내지 99 %이고, 투과율(tortuosity)이 1 % 내지 99 %이고, 굴곡율(permeability)이 1 % 내지 99 %일 수 있다.

[73] 고분자(200)는 3차원 스캐폴드(100)의 표면과 공극(130)들 내에 제공된다. 고분자(200)는 파이버 형태로, 스트럿(111, 121, ...)과 동일하거나 작은 직경을 가질 수 있다. 실시 예에 의하면, 고분자(111, 121, ...)는 0.1um 내지 10um의 직경을 가질 수 있다. 일 실시 예에 의하면, 고분자(111, 121, ...)는 천연 고분자일 수 있다. 고분자(111, 121, ...)는 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 그리고 젤라틴에서 선택될 수 있다. 파이버 형태의 고분자(111, 121, ...)는 3차원 스캐폴드(100)의 표면과 공극(130)들 내에서 그물망 형태로 배열되어, 줄기세포가 부착될 수 있는 표면적을 넓혀 줄기세포의 3차원 배양이 가능하게 한다. 또한, 고분자(111, 121, ...)는 공극(130)들로 인한 줄기세포의 손실을 최소화한다.

[74]

[75] 이하 상술한 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드(10)의 제조 방법에 대해 자세하게 설명한다.

[76] 도 3은 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드의 제조 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

[77] 도 3을 참조하면, 3차원 세포 배양배드의 제조 방법은 바이오 잉크 조성물을 준비하는 단계(S10), 3차원 스캐폴드 출력 단계(S20), 3차원 스캐폴드 경화 단계(S30), 3차원 스캐폴드 표면 처리 단계(S40), 코팅 단계(S50), 그리고 건조 단계(S60)를 포함한다.

[78] 바이오 잉크 조성물 준비 단계(110)는 상술한 바이오 잉크 조성물을 준비한다. 상기 바이오 잉크 조성물을 준비하는 단계는, 생분해성 물질을 준비하는 단계, 생분해성 물질을 투석하는 단계, 투석된 생분해성 물질을 원심분리하는 단계, 그리고 원심분리된 생분해성 물질에 생체활성 물질 및 가교제를 혼합하는

단계를 포함한다.

[79] 상기 생분해성 물질 준비 단계는, 상기에서 설명한 생분해성 물질을 준비하는 단계이다. 구체적인 생분해성 물질의 종류는 상술하였으므로, 중복 기재는 생략하기로 한다.

[80] 상기 생분해성 물질을 DPBS(Dulleco's phosphatebuffer)을 넣고 40 ℃내지 60 ℃의 온도에서 30 분 내지 3 시간 동안 녹여준 다음, 생분해성 물질-DPBS 용액에 메타크릴릭 무수물(Methacrylic anhydride)을 혼합하여 2 시간 내지 4 시간 동안 반응을 진행시키는 것일 수 있다.

[81] 상기 생분해성 물질 투석 단계는, 반응이 진행된 불투명한 용액을 처음 넣어준 DBPS 용액의 3 배 내지 5 배 넣어 반응을 종결시킨 후 투석 튜브(Dialysis tubing)에 나눠 담은 후 30 ℃내지 50 ℃에서 DI water를 사용하여 일주일간 투석(dialyze)하는 것일 수 있다.

[82] 상기 생분해성 물질 원심분리 단계는, 투석된 용액을 원심분리시키는 것일 수 있다. 원심분리 시킨 후 동결 건조하는 것일 수 있다.

[83] 상기 성장인자 및 가교제 혼합 단계는, 원심분리시킨 생분해성 물질에 성장인자 및 가교제를 혼합하는 것일 수 있다. 구체적인 성장인자 및 가교제의 종류는 상술하였으므로, 중복 기재는 생략하기로 한다. 또한, 실란-표면 개질된 실리카 입자를 더 포함할 수도 있다.

[84] 3차원 스캐폴드 출력 단계(S10)는 3D 바이오 프린터를 이용하여 바이오 잉크 조성물로 스트럿(111, 121, …) 들을 출력한다.

[85]

[86] 도 4는 본 발명의 제1실시 예에 따라 3D 바이오 프린터를 이용하여 스트럿을 출력하는 과정을 나타내는 도면이다.

[87] 도 3 및 도 4를 참조하면, 3D 바이오 프린터(300)는 노즐(310)과 냉각 스테이지(320)를 포함하며, 노즐(310)에서 바이오 잉크 조성물이 냉각 스테이지(320)에 스트럿(111, 121, …)으로 출력된다.

[88] 냉각 스테이지(320)는 상온보다 낮은 온도를 유지한다. 냉각 스테이지(320)는 0℃내지 -100℃ 바람직하게는, 0℃내지 -90℃ 또는 0℃내지 -80℃ 또는 0℃내지 -70℃ 또는 0℃내지 -60℃ 또는 0℃내지 -50℃ 또는 0℃내지 -40℃ 또는 0℃내지 -30℃ 또는 0℃내지 -20℃ 또는 0℃내지 -10℃의 온도로 유지될 수 있다. 노즐(310)에서 출력되는 바이오 잉크 조성물은 냉각 스테이지(320) 상에서 냉각된다.

[89] 노즐(310)은 0.1 mm s-1 내지 20 mm s-1의 이동속도 및 0.001 MPa 이상; 0.1 내지 2 MPa; 또는 0.3 내지 1 MPa; 또는 0.3 내지 0.5 MPa의 압력으로 바이오 잉크 조성물을 출력할 수 있다.

[90] 3차원 스캐폴드 출력 단계(S20)는 노즐(310)이 바이오 잉크 조성물을 출력하면서 제1방향으로 반복 이동하여 스트럿(111)들이 제1방향으로 배열된 제1 이차원 레이어(110)를 형성한다. 그리고 노즐(310)이 제1 이차원 레이어(110)

상부에 바이오 잉크 조성물을 출력하면서 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 반복 이동하여 스트럿(121)들이 제2방향으로 배열된 제2 이차원 레이어(120)를 형성한다. 또한 노즐(310)은 제2 이차원 레이어(120) 상에 스트럿(131)들이 제1방향으로 배열된 제3 이차원 레이어(130)를 형성하고, 제3 이차원 레이어(130)상에 스트럿(141)들이 제2방향으로 배열된 제4이차원 레이어(140)를 형성할 수 있다. 이러한 이차원 레이어(110, 120, ...)의 형성은 3차원 스캐폴드(100)의 목표 높이에 따라 반복될 수 있다. 3차원 스캐폴드(100)는 각각의 이차원 레이어(110, 120, ...)에서 스트럿(111, 121, ...)들이 이격 배열되고, 배열 방향이 상이하므로, 인접한 스트럿(111, 121, ...)들 사이에 공극(130)이 형성된다.

[91] 3차원 스캐폴드 경화 단계(S30)는 3D 바이오 프린터(300)에서 출력된 3차원 스캐폴드를 경화시킨다. 3차원 스캐폴드 경화 단계(S30)는 UV, 가시광 및 레이저로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 광을 조사하여 3차원 스캐폴드를 경화할 수 있다. 실시 예에 따르면, 3차원 스캐폴드 경화 단계(S30)는 365 nm 및 405 nm 파장에서 30 초 내지 48 시간 동안 수행될 수 있다.

[92] 3차원 스캐폴드 표면 처리 단계(S40)는 경화가 완료된 3차원 스캐폴드의 표면을 플라스마 처리한다. 플라스마 표면 처리로, 3차원 스캐폴드의 표면은 친수성을 띄어 세포의 초기 부착과 생장에 유리하다. 또한, 플라스마 표면 처리는 3차원 스캐폴드 표면을 멸균한다.

[93] 3차원 스캐폴드 표면 처리 단계(S40)는 저주파 플라즈마, 고주파 플라즈마 또는 이 둘을 이용할 수 있다. 실시 예에 의하면, 플라즈마 전력은 0.1 W 내지 100 W이고, 플라즈마 처리시간은 1 초 내지 12 시간이고, 가스 플로우는 1 sccm 내지 100 sccm이고, 가스 종류는 산소, 염소, 질소 및 아르곤으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다. 가스 종류는 이외에도 대기 중의 모든 종류의 가스를 사용할 수 있다.

[94] 코팅 단계(S50)는 플라스마 처리가 완료된 3차원 스캐폴드에 코팅액을 코팅한다. 일 예에 의하면, 코팅 단계(S50)는 3차원 스캐폴드를 코팅액에 침지시킨다. 코팅액은 고분자와 초순수가 혼합된 용액이다. 실시 예에 의하면, 코팅액에는 고분자가 0.001중량% 내지 2중량% 함량으로 혼합될 수 있다. 고분자는 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 그리고 젤라틴에서 선택될 수 있다.

[95] 코팅 단계(S50)는 1차 코팅 단계(S51)와 2차 코팅 단계(S52)가 순차적으로 진행될 수 있다. 1차 코팅 단계(S51)는 고분자가 제1함량으로 혼합된 제1코팅액에 3차원 스캐폴드를 침지하고, 2차 코팅 단계(S52)는 고분자가 제1함량보다 낮은 량으로 혼합된 제2코팅액에 3차원 스캐폴드를 침지시킨다. 실시 예에 의하면, 제1함량은 2중량%이고, 제2함량은 0.001중량% 일 수 있다.

[96] 코팅 단계(S50)가 완료되면, 3차원 스캐폴드의 표면에 코팅액이 코팅되고 공극 내에 코팅액이 수용된다.

[97] 건조 단계(S60)를 코팅액이 수용된 3차원 스캐폴드를 냉동 건조한다. 실시 예에

의하면, 건조 단계는 -100℃내지 -10℃온도에서 6시간 내지 100시간 동안 진행될 수 있다. 일 예에 의하면, 건조 단계는 -80℃온도에서 72시간 동안 진행될 수 있다. 건조 단계(S60)가 완료되면, 코팅액에 포함된 초순수가 증발하고 3차원 스캐폴드의 표면과 공극 내에 고분자가 파이버 형태로 제공된다.

[98]

[99] 도 5는 본 발명의 제1실시 예에 따라 제조된 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사진이고, 도 6은 도 5의 3차원 세포 배양배드의 SE(M) 사진이다. 본 실시 예에서는 고분자로 콜라겐이 사용되었다.

[100] 도 5 및 도 6을 참조하면, 스트럿(111, 121, ...)들의 표면과 그 사이 공극(130)에 콜라겐이 파이버 형태로 위치하고 있음을 확인할 수 있다. 파이버 형태의 콜라겐(200)들은 공극(130)을 채우고, 스트럿(111, 121, ...)들의 가교 역할을 한다.

[101]

[102] 도 7 및 도 8은 본 발명의 제1실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드에서 줄기세포가 배양되는 과정을 나타내는 사진이다. 도 7은 줄기세포 부착 후 8시간이 경과한 모습을 나타내는 도면이고, 도 8은 줄기세포 부착 후 14일이 경과한 모습을 나타내는 도면이다.

[103] 도 7 및 도 8을 참조하면, 줄기 세포가 파이버 형태의 콜라겐들의 표면에 다수 부착된 것을 확인할 수 있으며, 시간이 경과함에 따라 공극 내에서 줄기 세포가 대량 증식되고 있음을 확인할 수 있다.

[104]

[105] 도 9는 본 발명의 제2실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사시도이고, 도 10은 도 9의 배양배드를 나타내는 정면도이고, 도 11은 도 9의 배양배드를 나타내는 우측면도이고, 도 12는 도 9의 배양배드의 일부를 확대하여 나타내는 도면이다.

[106] 도 9 내지 도 12을 참조하면, 제1 이차원 레이어(110)는 복수의 제1스트럿(111)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열된다.

[107] 제2 이차원 레이어(120)는 제1 이차원 레이어(110)의 상부에 적층되며, 복수의 제2스트럿(121)들이 서로 이격하여 제1방향과 상이한 제2방향으로 나란하게 배열될 수 있다.

[108] 제3 이차원 레이어(130)는 제2 이차원 레이어(120)의 상부에 적층되며, 복수의 제3스트럿(131)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열될 수 있다. 제3스트럿(131)들은 상부에서 바라볼 때, 제1스트럿(111)으로부터 소정 거리 오프셋(offset)되어 위치한다. 실시 예에 의하면, 제3스트럿(131)들 각각은 제1스트럿(111)들의 사이 영역에 위치한다.

[109] 제4 이차원 레이어(140)는 제3 이차원 레이어(130)의 상부에 적층되며, 복수의 제4스트럿(131)들이 서로 이격하여 제2방향으로 나란하게 배열될 수 있다. 제4스트럿(141)들은 상부에서 바라볼 때, 제2스트럿(121)으로부터 소정 거리

오프셋(offset)되어 위치한다. 실시 예에 의하면, 제4스트럿(141)들 각각은 제2스트럿(121)들의 사이 영역에 위치한다.

[110] 제5 이차원 레이어(150)는 제4 이차원 레이어(140)의 상부에 적층되며, 복수의 제5스트럿(151)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열될 수 있다. 제5스트럿(151)들은 상부에서 바라볼 때, 제3스트럿(131)으로부터 소정 거리 오프셋(offset)되어 제3스트럿(131)들의 사이 영역에 위치한다. 일 실시 예에 의하면, 제5스트럿(151)들 각각은 제1스트럿(111)들과 동일 선상에 위치할 수 있다. 다른 실시 예에 의하면, 제5스트럿(151)들 각각은 제1스트럿(111)들 및 제3스트럿(131)들 각각으로부터 오프셋되어, 제1스트럿(111)과 제3스트럿(131) 사이 영역에 위치할 수 있다.

[111] 제6 이차원 레이어(160)는 제5 이차원 레이어(150)의 상부에 적층되며, 복수의 제6스트럿(161)들이 서로 이격하여 제2방향으로 나란하게 배열될 수 있다. 제6스트럿(161)들은 상부에서 바라볼 때, 제4스트럿(141)으로부터 소정 거리 오프셋(offset)되어 제4스트럿(141)들의 사이 영역에 위치한다. 일 실시 예에 의하면, 제6스트럿(161)들 각각은 제2스트럿(121)들과 동일 선상에 위치할 수 있다. 다른 실시 예에 의하면, 제6스트럿(161)들 각각은 제2스트럿(121)들 및 제4스트럿(141)들 각각으로부터 오프셋되어, 제2스트럿(121)과 제4스트럿(141) 사이 영역에 위치할 수 있다.

[112] 상술한 과정으로 복수의 이차원 레이어(110, 120, ...)들이 적층되어 3차원 구조체를 형성한다. 즉, 홀수 층의 이차원 레이어(110, 130, ...)들은 스트럿(111, 131, ...)들이 제1방향으로 나란하게 배열되고, 바로 아래의 홀수 층의 스트럿들 사이 영역에 위치한다. 그리고 짝수 층의 이차원 레이어(120, 140, ...)들은 스트럿(121, 141, ...)들이 제2방향으로 나란하게 배열되고, 바로 아래의 짝수 층의 스트럿들 사이 영역에 위치한다.

[113] 상술한 구조의 3차원 스캐폴드(100)에는 인접한 스트럿(111, 121, ...)들 사이에 공극(11)이 형성된다. 실시 예에 의하면, 공극(11)은 그 크기가 1 ㎛ 내지 3mm이고, 공극율(porosity)이 1 % 내지 99 %이고, 투과율(tortuosity)이 1 % 내지 99 %이고, 굴곡율(permeability)이 1 % 내지 99 %일 수 있다.

[114] 고분자(200)는 3차원 스캐폴드(100)의 표면에 코팅되고, 공극(11)들 내에 제공된다. 고분자(200)는 파이버 형태로, 스트럿(111, 121, ...)과 동일하거나 작은 직경을 가질 수 있다. 실시 예에 의하면, 고분자(200)는 0.1um 내지 10um의 직경을 가질 수 있다. 일 실시 예에 의하면, 고분자(200)는 천연 고분자일 수 있다. 고분자(200)는 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 그리고 젤라틴에서 선택될 수 있다. 파이버 형태의 고분자(200)는 3차원 스캐폴드(100)의 표면과 공극(11)들 내에서 그물망 형태로 배열되어, 줄기세포가 부착될 수 있는 표면적을 넓혀 줄기세포의 3차원 배양이 가능하게 한다. 또한, 고분자(200)는 공극(11)들로 인한 줄기세포의 손실을 최소화한다.

[115]

[116] 이하 상술한 제2실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드의 제조 방법에 대해 자세하게 설명한다. 제2실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드의 제조 방법은 3차원 스캐폴드 출력 단계를 제외한 나머지 과정이 도 3에서 설명한 3차원 세포 배양배드의 제조 방법과 동일하게 진행된다.

[117] 3차원 스캐폴드 출력 단계는 노즐(310)이 바이오 잉크 조성물을 출력하면서 제1방향으로 반복 이동하여 제1스트럿(111)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열된 제1 이차원 레이어(110)를 제조한다. 그리고 노즐(310)이 제1 이차원 레이어(110) 상부에 바이오 잉크 조성물을 출력하면서 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 반복 이동하여 제2스트럿(121)들이 서로 이격하여 제2방향으로 나란하게 배열된 제2 이차원 레이어(120)를 제조한다. 또한 노즐(310)은 제2 이차원 레이어(120) 상에 제3스트럿(131)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열된 제3 이차원 레이어(130)를 제조하고, 제3 이차원 레이어(130)상에 제4스트럿(141)들이 서로 이격하여 제2방향으로 나란하게 배열된 제4 이차원 레이어(140)를 제조한다. 상부에서 바라볼 때, 제3스트럿(131)들 각각은 제1스트럿(111)들의 사이 영역에 위치하고, 제4스트럿(141)들 각각은 제2스트럿(121)들의 사이 영역에 위치한다.

[118] 또한, 노즐(310)은 제4 이차원 레이어(140) 상에 제5스트럿(151)들이 서로 이격하여 제1방향으로 나란하게 배열된 제5 이차원 레이어(150)를 제조하고, 제5 이차원 레이어(150)상에 제6스트럿(161)들이 서로 이격하여 제2방향으로 나란하게 배열된 제6 이차원 레이어(160)를 제조한다.

[119] 일 실시 예에 의하면, 상부에서 바라볼 때, 제5스트럿(151)들 각각은 제3스트럿(131)들의 사이 영역에 위치하고, 제1스트럿(111)들과 동일 선상에 위치할 수 있다. 그리고 제6스트럿(161)들 각각은 제4스트럿(141)들의 사이 영역에 위치하고, 제2스트럿(121)들과 동일 선상에 위치할 수 있다.

[120] 다른 실시 예에 의하면, 상부에서 바라볼 때, 제5스트럿(151)들 각각은 제1스트럿(111) 및 제3스트럿(131)들에 대해 각각 오프셋되어 제1스트럿(111)과 제3스트럿(131) 사이 영역에 위치할 수 있다. 그리고 제6스트럿(161)들 각각은 제2스트럿(121) 및 제4스트럿(141)들에 대해 각각 오프셋되어 제2스트럿(121)과 제4스트럿(141) 사이 영역에 위치할 수 있다.

[121] 이러한 이차원 레이어(110, 120, …)의 형성은 3차원 스캐폴드(100)의 목표 높이에 따라 반복될 수 있다. 3차원 스캐폴드(100)는 각각의 이차원 레이어(110, 120, …)에서 스트럿(111, 121, …)들이 이격 배열되고, 배열 방향이 상이하므로, 인접한 스트럿(111, 121, …)들 사이에 공극(11)이 형성된다.

[122]

[123] 도 13은 본 발명의 실시 예에 따라 제조된 3차원 세포 배양배드를 나타내는 사진이고, 도 14는 도 13의 A영역을 확대하여 나타내는 사진이다. 본 실시 예에서는 고분자로 콜라겐이 사용되었다.

[124] 도 13 및 도 14를 참조하면, 제1스트럿(111)과 제2스트럿(112)이 서로 상이한

방향으로 배열되고, 제3스트럿(113)이 제1스트럿(111)으로부터 오프셋되고 제1스트럿(111)과 동일한 방향으로 배열된다. 제1 내지 제3스트럿(111, 112, 113)들 사이에는 공극(11)이 형성되고, 공극(11)에는 콜라겐(200)이 파이버 형태로 위치하는 것을 확인할 수 있다. 콜라겐(200)은 제1 내지 제3스트럿(111, 112, 113)들의 가교 역할을 한다.

[125] 상술한 바와 같이, 3차원 세포 배양배드는 스트럿들이 서로 상이한 방향으로 적층되고, 동일한 방향으로 배열된 스트럿들은 다른 이차원 레이어의 스트럿들과 오프셋되어 배열되므로, 3차원 스캐폴드의 표면적이 증대되고, 공극이 조밀하게 형성된다. 이로 인해 공극들 내에는 콜라겐이 조밀하게 채워질 수 있다.

[126]

[127] 도 15는 본 발명의 실시 예에 따른 3차원 세포 배양배드에서 생산되는 엑소좀을 촬영한 사진이고, 도 16은 비교예에 따른 배양배드에서 생산되는 엑소좀을 촬영한 사진이다. 비교예에 따른 배양배드는 XY평면상의 2차원 배양배드가 사용되었다. 도 15 및 도 16의 사진에서 밝은 영역(EX1, EX2)이 엑소좀을 나타낸다.

[128] 도 15 및 도 16을 참조하면, 배양배드에는 줄기세포가 부착되어 배양되며, 줄기세포에서 내뿜는 엑소좀을 생산할 수 있다. 본 발명에 따른 배양배드에서는 $1.96X10^{11}$Particles/mL의 소포체가 생산되는 반면, 비교예에 따른 배양배드에서는 $4.36X10^{8}$Particles/mL의 소포체가 생산되는 것을 확인할 수 있다.

[129] 이는 3차원 스캐폴드 내에 형성된 콜라겐 파이버가 줄기 세포의 손실을 최소화하고, 줄기 세포가 초기에 부착할 수 있는 표면적을 넓혀 줄기세포의 3차원 배양을 가능하게 하였고, 이로 인해 줄기세포에서 내뿜는 엑소좀 또한 대량으로 얻어낼 수 있게 된 결과라고 판단된다. 본 발명에 따른 방법으로 줄기 세포를 배양했을 경우, 비교예에 비해 최대 500배 이상으로 엑소좀 생산수율이 향상됨을 확인할 수 있다.

[130]

[131] 이상, 본 발명을 바람직한 실시 예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시 예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[132] 본 발명에 따른 3차원 세포 배양배드는 줄기세포에서 내뿜는 엑소좀을 대량으로 얻어낼 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3차원 스캐폴드; 및
상기 공극들에 제공되는 파이버 형태의 고분자를 포함하는 3차원 세포 배양배드.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 스트럿들의 직경은 10um 내지 2mm이고, 상기 파이버 형태의 고분자는 그 직경이 0.1um 내지 10um인 3차원 세포 배양배드.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 3차원 스캐폴드는
상기 스트럿들이 제1방향으로 배열되는 제1 이차원 레이어; 및
상기 제1 이차원 레이어 상에 적층되며, 상기 스트럿들이 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 배열되는 제2 이차원 레이어를 포함하는 3차원 세포 배양배드.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 3차원 스캐폴드의 표면은 플라스마 처리된 3차원 세포 배양배드.

[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 3차원 스캐폴드는,
복수의 제1스트럿들이 서로 이격하여, 제1방향으로 나란하게 배열된 제1 이차원 레이어;
상기 제1 이차원 레이어의 상부에 적층되며, 복수의 제2스트럿들이 서로 이격하여 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 나란하게 배열된 제2 이차원 레이어; 및
상기 제2 이차원 레어어의 상부에 적층되며, 복수의 제3스트럿들이 서로 이격하여 상기 제1방향으로 나란하게 배열된 제3 이차원 레이어를 포함하되,
상기 제3스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제1스트럿들의 사이 영역에 배열되는 3차원 세포 배양배드.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 제3 이차원 레어어의 상부에 적층되며, 복수의 제4스트럿들이 서로 이격하여 상기 제2방향으로 나란하게 배열된 제4 이차원 레이어를 포함하되,
상기 제4스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제2스트럿들의 사이 영역에 배열되는 3차원 세포 배양배드.

[청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 바이오 잉크 조성물은,

생분해성 물질;
생체활성 물질; 및
가교제;
를 포함하는,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 생분해성 물질은, 천연 고분자, 합성 고분자 또는 이 둘을 포함하는 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 천연 고분자는, 콜라겐(collagen), 알긴산(alginic acid), 알부민(albumin), 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 실크 피브로인(silk fibroin), 폴리펩타이드(polypeptide), 헤파린(hparin), 알지네이트(alginate), 덱스트란(dextran), 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 아카시아 검(acacia gum), 트라가칸친(tragacanthin), 펙틴(pectin), 구아검(guar gum), 히알루론산(Hyaluronic acid), 소듐카복시메틸덱스트란(Carboxymethyl dextran), 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 펩타이드(peptide), 올리고 펩타이드(oligopeptide), 아가(agar), 카라기난(carrageenan), 갈락토만난(Galactomannans), 잔탄(Xanthan), 베타-사이클로덱스트린(Beta-Cyclodextrin), 아밀로즈(Amylose, 수용성 전분), 피브린(fibrin), 플루란(pullulan) 및 양성 전분(Tertiary amine starch ether)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하고,
상기 합성 고분자는, 폴리락트산(PLA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide; PLGA), 폴리(카프로락톤), 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트), 폴리(하이드록시 발러레이트), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)(PHBV), 폴리다이옥산온(PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르우레탄)(PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐알코올)](PVOH), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite; HA) 및 β트리칼슘 포스페이트(βphosphate; β로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 10] 제 7 항에 있어서,
상기 생분해성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 1 중량% 내지 100

중량%인 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 11] 제 7 항에 있어서,
상기 생체활성 물질은, 성장인자, 세포 부착성 단백질, 세포 부착 분자, 아미노산, 지질, 탄수화물, 당질, 핵산, 효소, 무기물, 호르몬, 항원, 약물, Fetal bovine serum(FBS) 포함된 배양배지 세포 및 세포외기질로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 성장인자는, 아드레노메둘린(Adrenomedullin), 앙기오포이에틴(Angiopoietin), 자가분비 운동성 인자(Autocrine motility factor), 골 형성 단백질(Bone morphogenetic proteins), 섬모 향신경성 인자(Ciliary neurotrophic factor), 백혈병억제인자(Leukemia inhibitory factor), 인터류킨-1(Interleukin-1), 인터류킨-2(Interleukin-2), 인터류킨-3(Interleukin-3), 인터류킨-4(Interleukin-4), 인터류킨-5(Interleukin-5), 인터류킨-6(Interleukin-6), 인터류킨-7(Interleukin-7), 집락자극인자(Colony-stimulating factors), 대식세포증식작즉인자(Macrophage colony-stimulating factor), 과립구집락자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), 표피성장인자(Epidermal growth factor), 에프린 A1(Ephrin A1), 에프린 A2(Ephrin A2), 에프린 A3(Ephrin A3), 에프린 A4(Ephrin A4), 에프린 A5(Ephrin A5), 에프린 B1(Ephrin B1), 에프린B2(Ephrin B2), 에프린 B3(Ephrin B3), 에리스로포이에틴(Erythropoietin), 섬유아세포성장촉진인자 1~23(Fibroblast growth factor 1~23), 소 성장 촉진 호르몬(Bovine somatotrophin), 신경 아교 세포계 유도 신경 영양 인자(Glial cell line-derived neurotrophic factor), 뉴투린(Neurturin), 페르세핀(Persephin), 아르테민(Artemin), 성장분화인자(Growth differentiation factor-9), 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor), 간암유래 성장인자(Hepatoma-derived growth factor) 인슐린(Insulin), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factors), 인슐린유사성장인자-1(Insulin-like growth factor-1), 인슐린유사성장인자-2(Insulin-like growth factor-2), 인터류킨(Interleukins), 각질세포 증식인자(Keratinocyte growth factor), 세포이동 자극인자(Migration-stimulating factor), 과립구대식세포 증식인자(Macrophage-stimulating protein), 마이오스타틴(Myostatin), 뉴레귤린 1~4(Neuregulin 1~4), 뉴로트로핀(Neurotrophins), 뇌유래신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor),

신경성장인자(Nerve growth factor), 뉴로트로핀 3(Neurotrophin-3), 뉴로트로핀 4(Neurotrophin-4), 태반 형성 인자(Placental growth factor), 레날라제(Renalase), T세포성장인자(T-cell growth factor), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin), 형질전환생장인자(Transforming growth factor), 형질전환생장인자 알파(Transforming growth factor alpha), 형질전환생장인자베타(Transforming growth factor beta), 종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor-alpha), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor) 및 wnt신호전달경로(Wnt Signaling Pathway)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 13] 제 7 항에 있어서,
상기 생체활성 물질은, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.0001 중량% 내지 50중량%인 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 14] 제 7 항에 있어서,
상기 가교제는, 탄닉에시드(tannic acid), 제니핀 (genipin), 트랜스글루타미나제 ((Moo Gloo TI) Transglutaminase), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드[1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; EDC], 하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS), 디메틸아미노프로필에틸카르보디이미드하이드로클로라이드(dimethylaminopropyl ethylcarbodiimide hydrochloride; EDAC), 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole) 및 글루타알데하이드(Glutaraldehyde)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 15] 제 7 항에 있어서,
상기 가교제는, 상기 바이오 잉크 조성물 중 0.00001 중량% 내지 30 중량%인 것인,
3차원 세포 배양배드.

[청구항 16] 바이오 잉크 조성물로 형성된 스트럿들이 이차원 레이어 상에 배열되고, 상기 이차원 레이어들이 적층되어 3차원 구조체를 이루며, 상기 스트럿들 사이에 공극이 형성된 3차원 스캐폴드를 출력하는 3차원 스캐폴드 출력 단계;
고분자와 초순수가 혼합된 코팅액을 상기 3차원 스캐폴드의 표면에 코팅하는 코팅 단계; 및
상기 코팅액이 코팅된 3차원 스캐폴드를 건조하는 건조 단계를 포함하되, 상기 건조 단계가 완료된 상기 3차원 스캐폴드의 표면과 상기 공극에는

상기 고분자가 파이버 형태로 제공되는 3차원 세포 배양배드의 제조 방법.

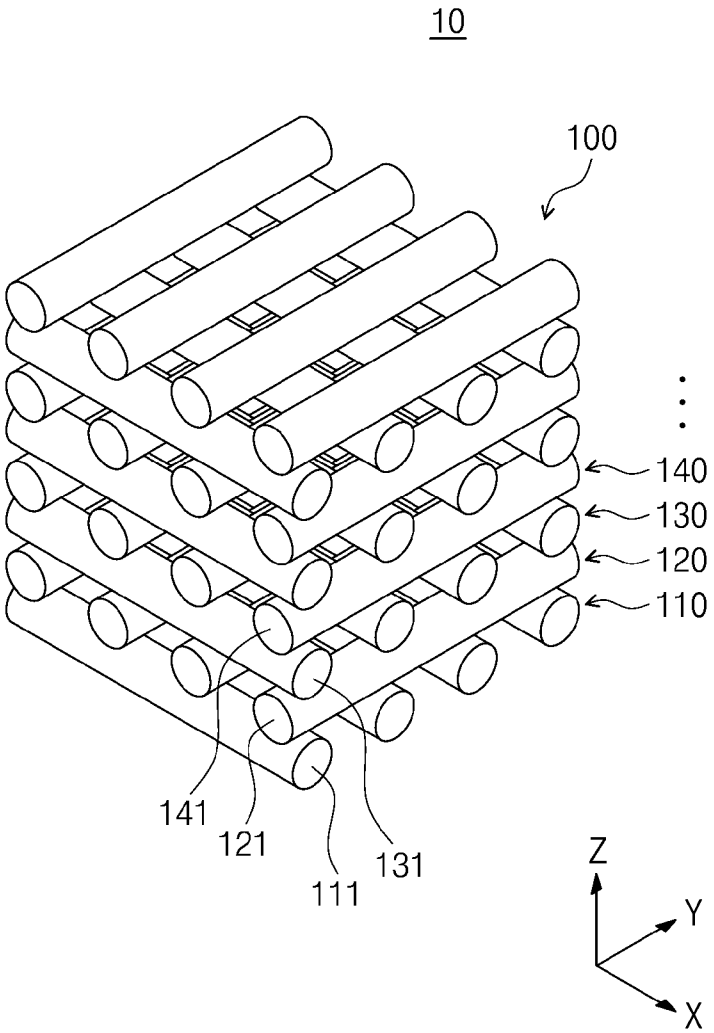
[청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 3차원 스캐폴드 출력 단계에서 출력된 3차원 스캐폴드의 표면을 플라스마 처리하는 3차원 스캐폴드 표면 처리 단계를 더 포함하되,
상기 코팅 단계는,
플라스마 표면 처리된 상기 3차원 스캐폴드를 콜라겐,
알지네이트-젤라틴, 그리고 세포 부착성 단백질인 폴리도파민 중에서 선택된 물질이 포함된 코팅액에 침지하는 3차원 세포 배양배드의 제조 방법.

[청구항 18] 제 16 항에 있어서,
상기 코팅 단계는,
상기 고분자가 제1함량으로 혼합된 제1코팅액에 상기 3차원 스캐폴드를 침지하는 1차 코팅 단계; 및
상기 1차 코팅 단계가 완료된 상기 3차원 스캐폴드를 상기 고분자가 상기 제1함량보다 낮은 제2함량으로 혼합된 제2코팅액에 침지하는 2차 코팅 단계를 포함하는 3차원 세포 배양배드의 제조 방법.

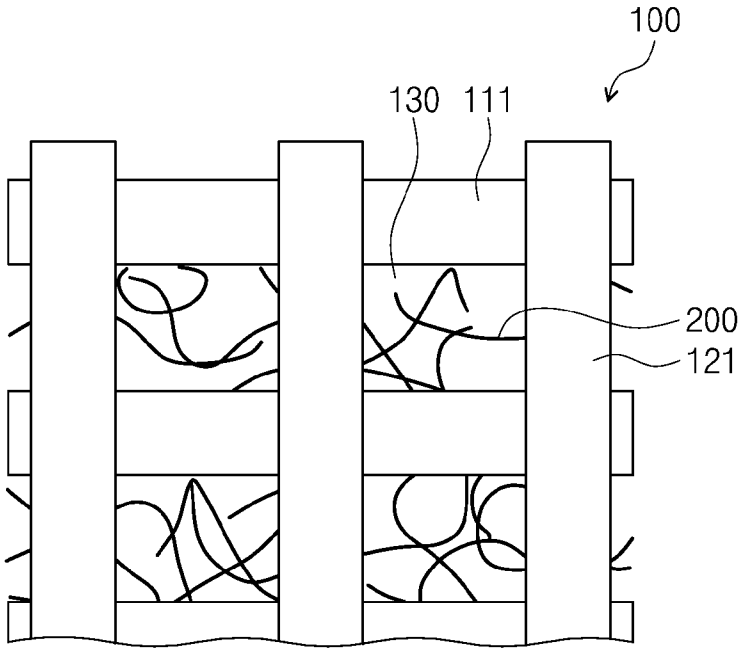
[청구항 19] 제 16 항에 있어서,
상기 건조 단계는 -100℃내지 -10℃온도에서 6시간 내지 100시간 동안 진행되는 3차원 세포 배양배드의 제조 방법

[청구항 20] 제 16 항에 있어서,
상기 3차원 스캐폴드 출력 단계는,
상기 바이도 잉크 조성물을 제1방향으로 출력하여 제1스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제1 이차원 레이어를 제조하는 단계;
상기 제1 이차원 레이어의 상부에 상기 바이도 잉크 조성물을 상기 제1방향과 상이한 제2방향으로 출력하여 제2스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제2 이차원 레이어를 제조하는 단계; 및
상기 제2 이차원 레이어의 상부에 상기 바이도 잉크 조성물을 상기 제1방향으로 출력하여 제3스트럿들이 서로 이격하여 나란하게 배열된 제3이차원 레이어 제조하는 단계를 포함하되,
상기 제3스트럿들은 상부에서 바라볼 때, 상기 제1스트럿들의 사이 영역에 배열되는 3차원 세포 배양배드의 제조 방법.

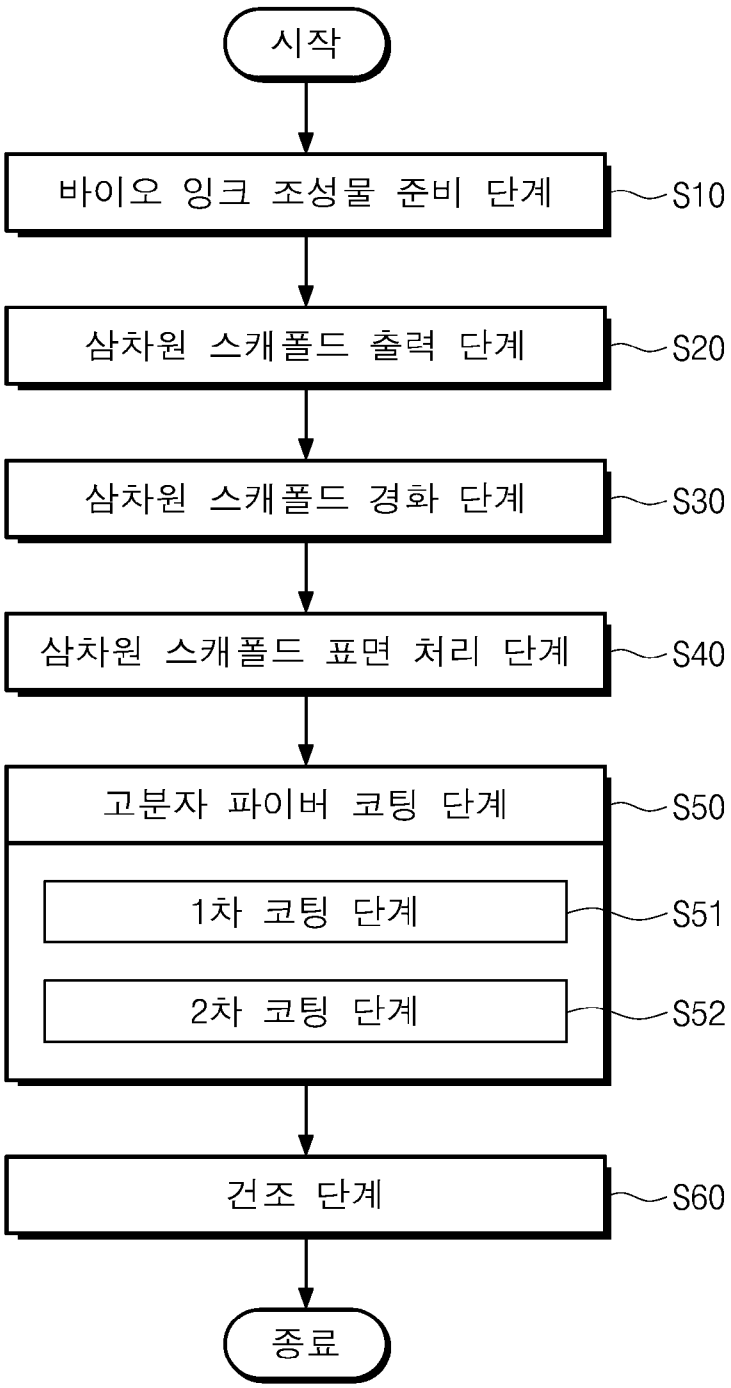
[도1]



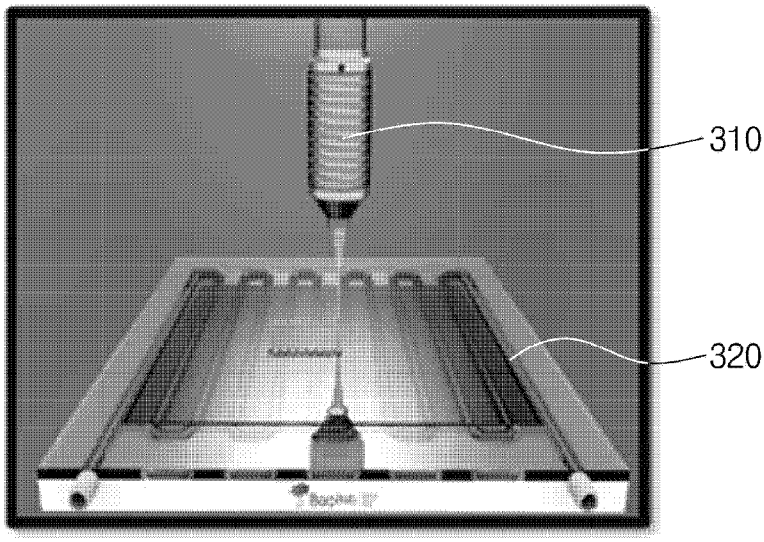
[도2]



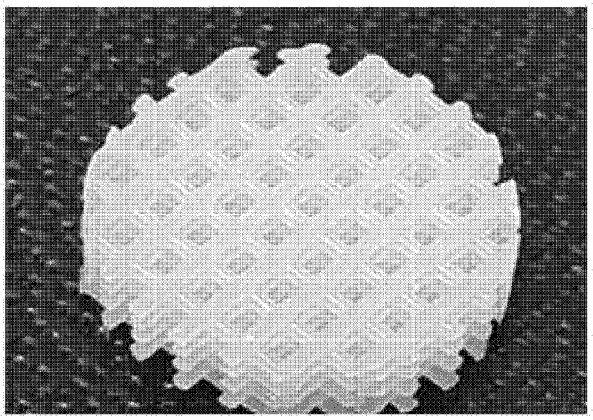
[도3]


시작
바이오 잉크 조성물 준비 단계
S10
삼차원 스캐폴드 출력 단계
S20
삼차원 스캐폴드 경화 단계
S30
삼차원 스캐폴드 표면 처리 단계
S40
고분자 파이버 코팅 단계
S50
1차 코팅 단계
S51
2차 코팅 단계
S52
건조 단계
S60
종료

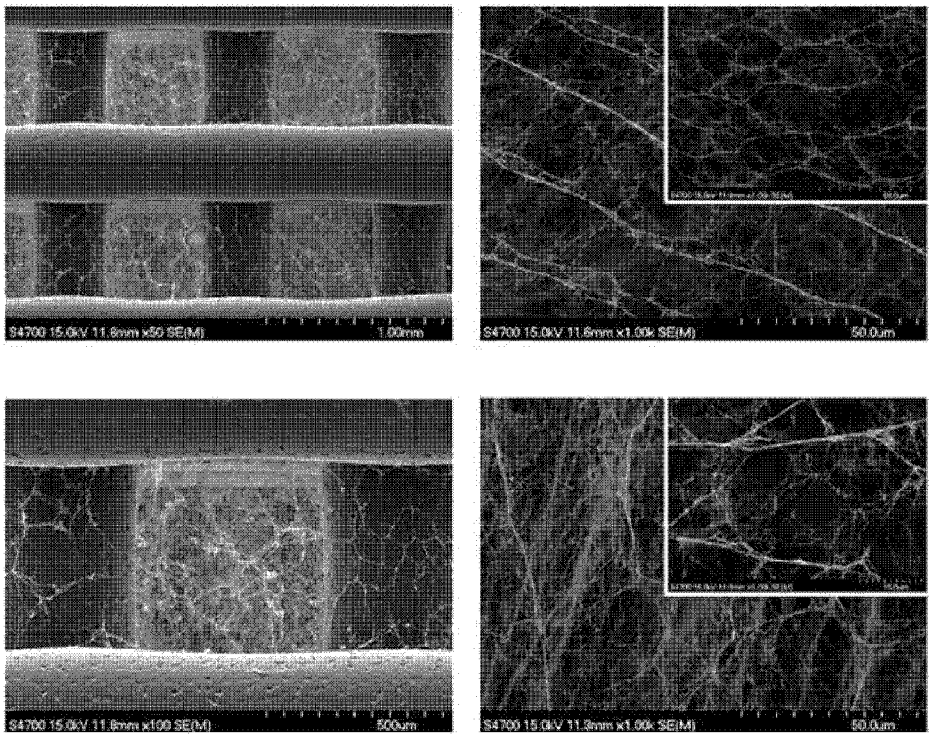
[도4]



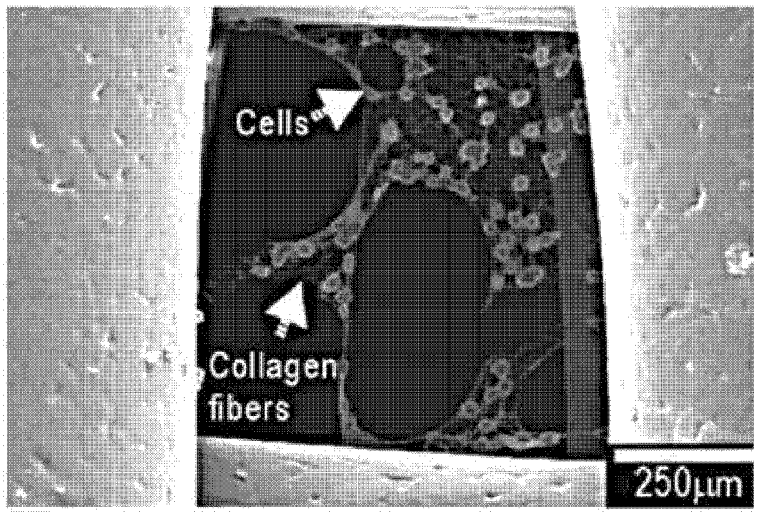
[도5]



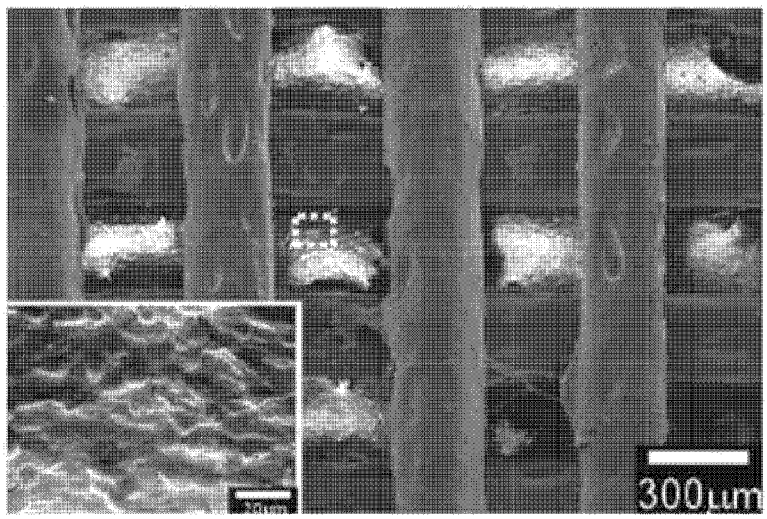
[도6]


S4700 15.0kV 11.6mm x50 SE(M)
1.00mm
S4700 15.0kV 11.6mm x1.00k SE(M)
50.0um
S4700 15.0kV 11.6mm x100 SE(M)
500um
S4700 15.0kV 11.3mm x1.00k SE(M)
50.0um

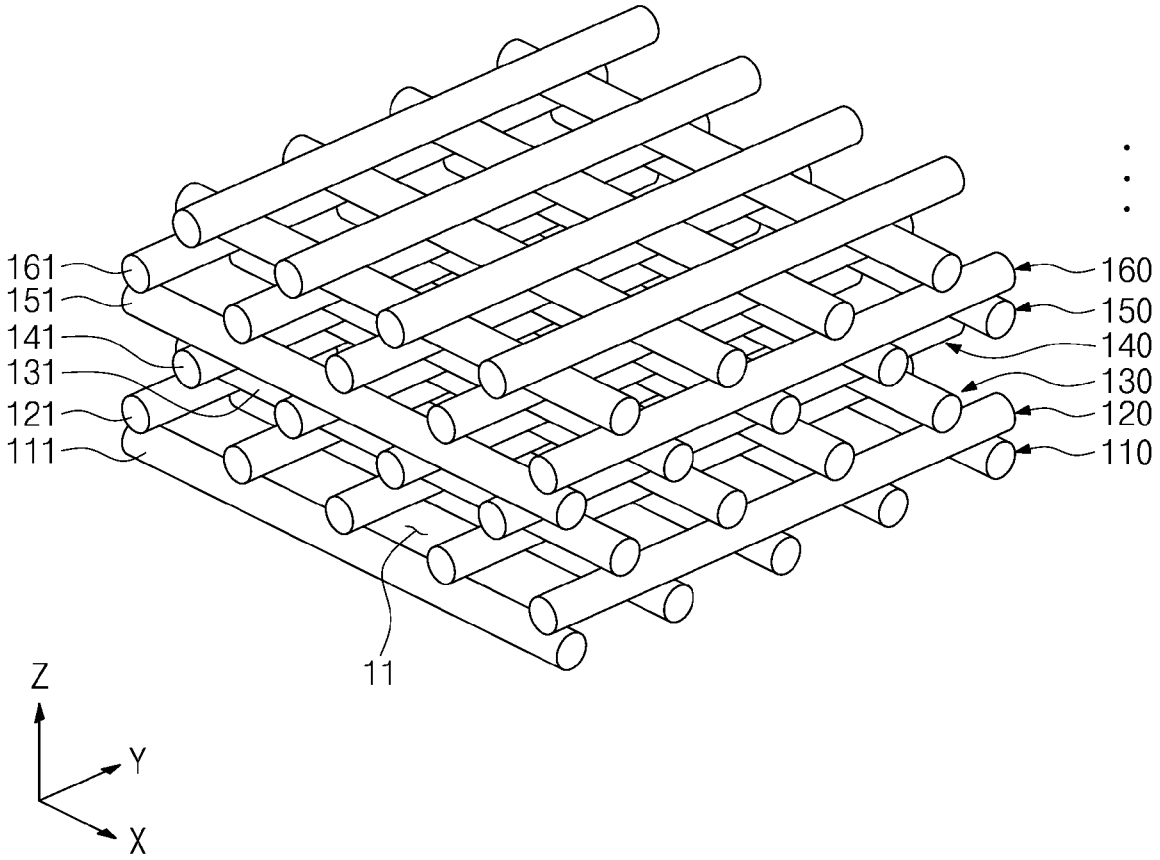
[도7]


Cells
Collagen fibers
250μm

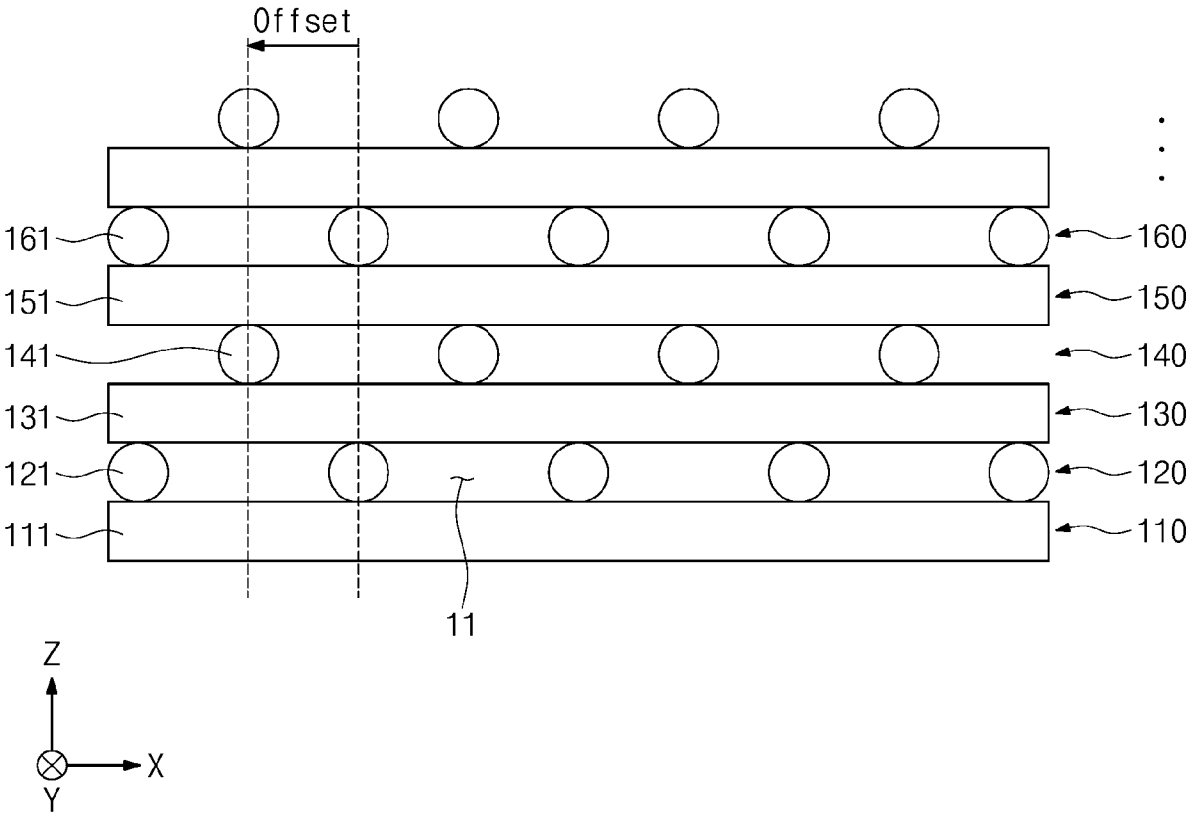
[도8]


300μm

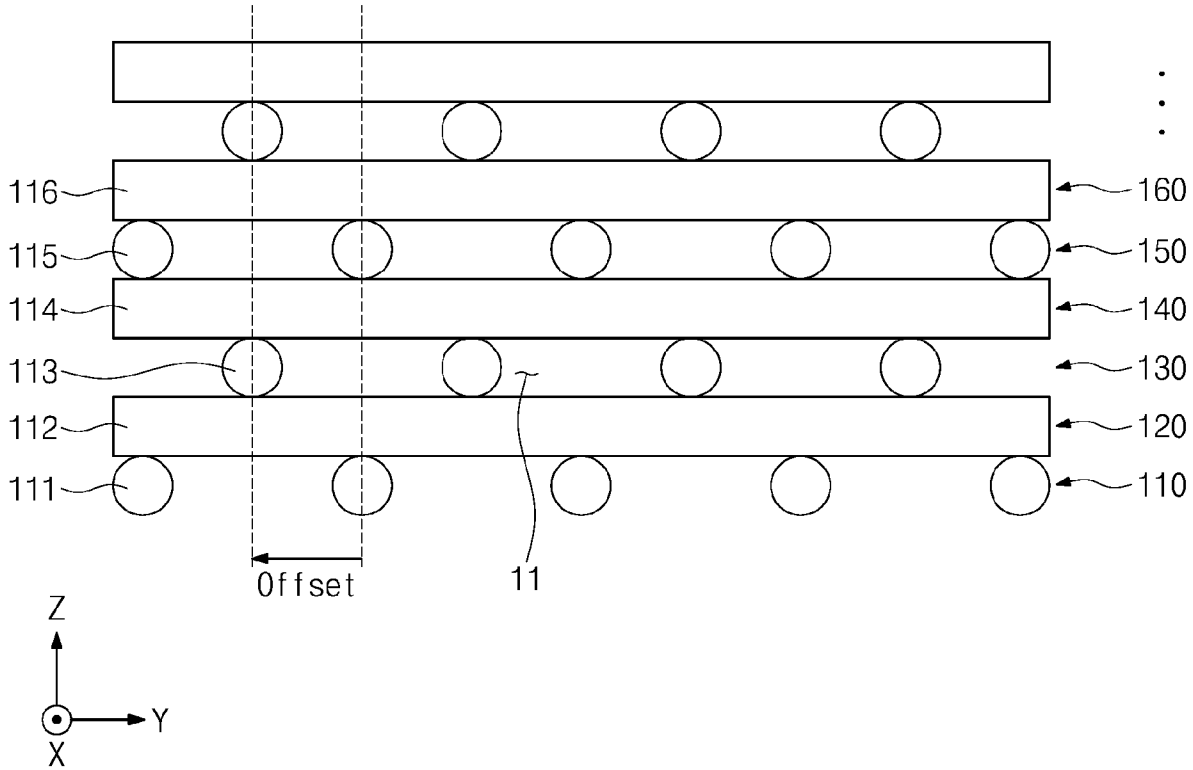
[도9]


161
151
141
131
121
111
160
150
140
130
120
110
11
Z
Y
X

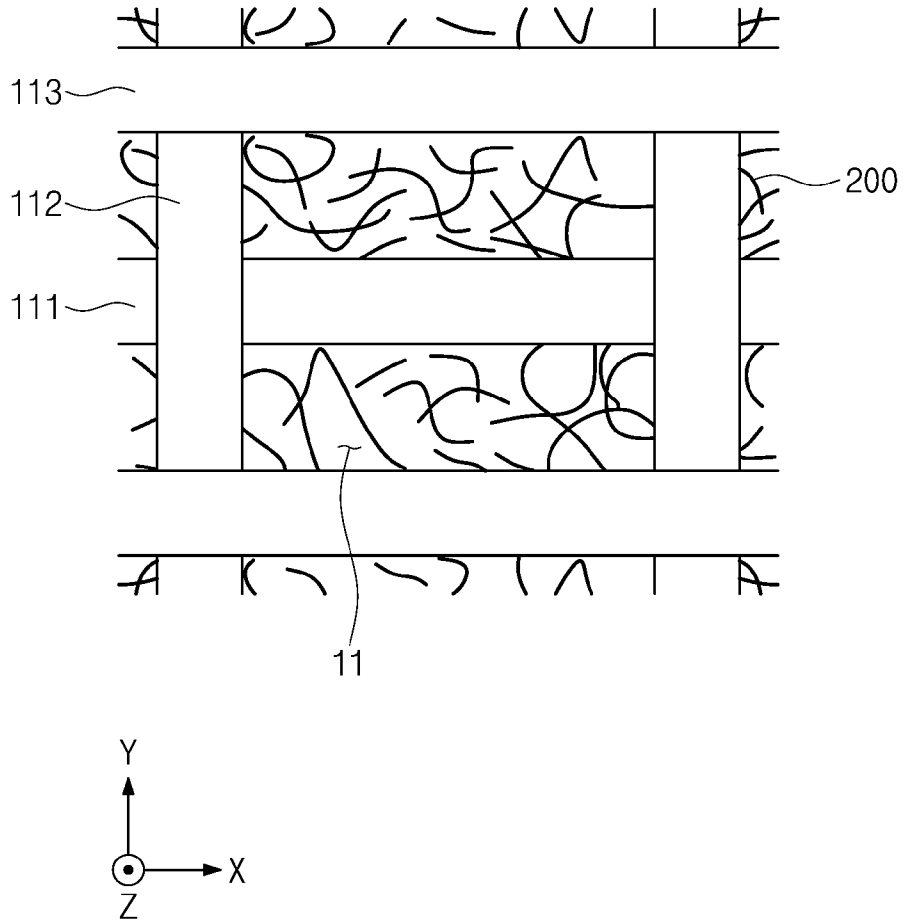
[도10]


Offset
161
151
141
131
121
111
160
150
140
130
120
110
11
Z
X
Y

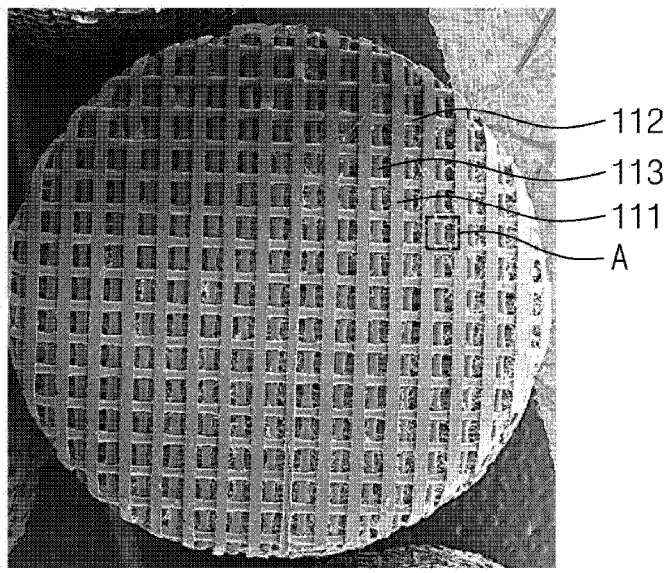
[도11]


116
115
114
113
112
111
160
150
140
130
120
110
Offset
11
Z
Y
X

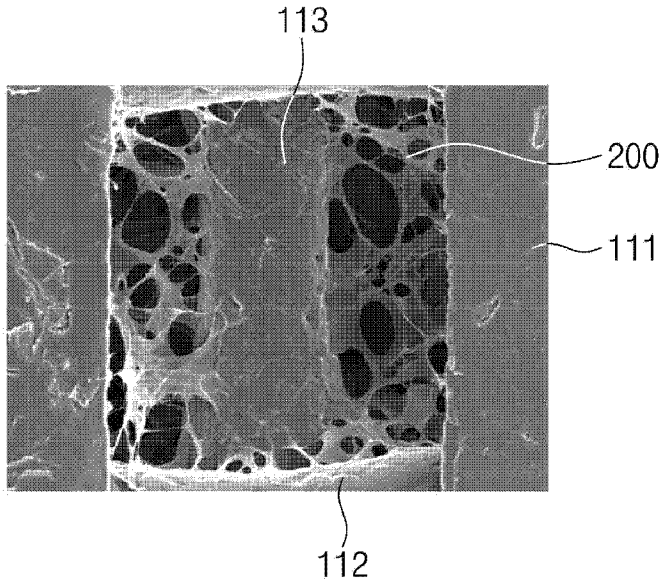
[도12]


113
112
111
200
11
Y
X
Z

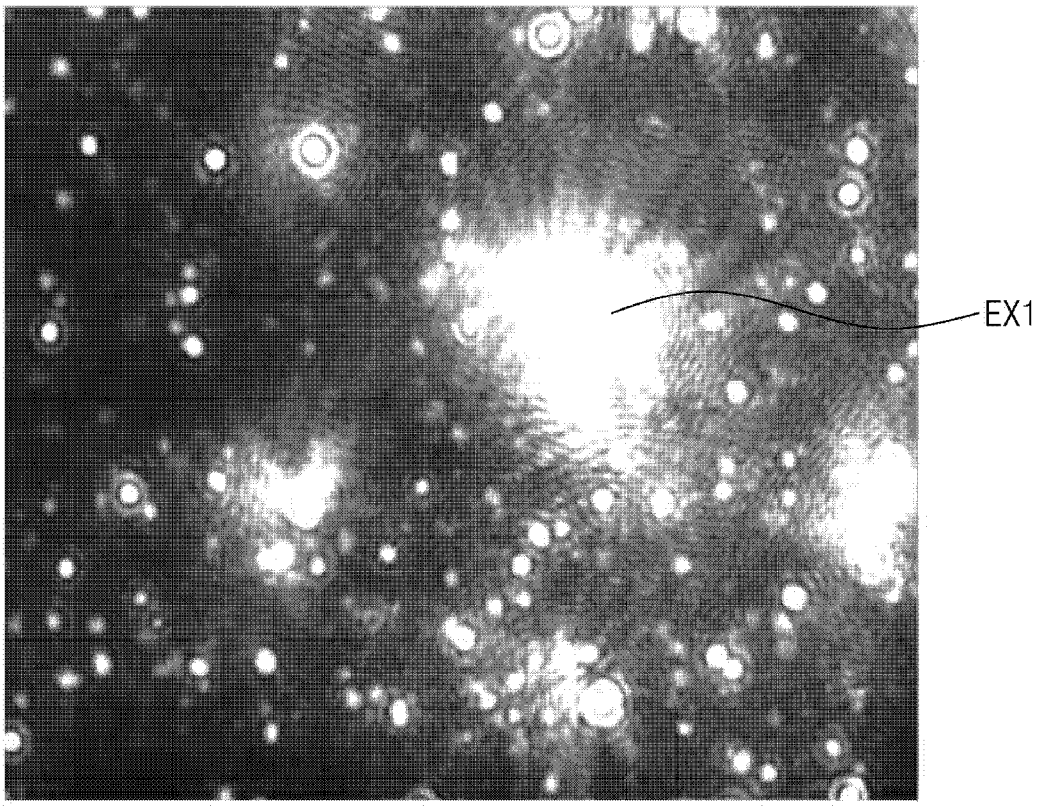
[도13]

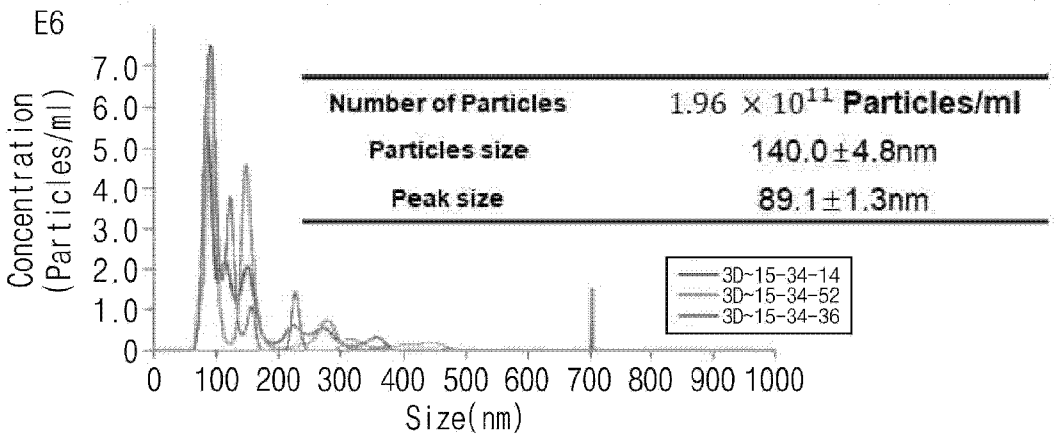


[도14]

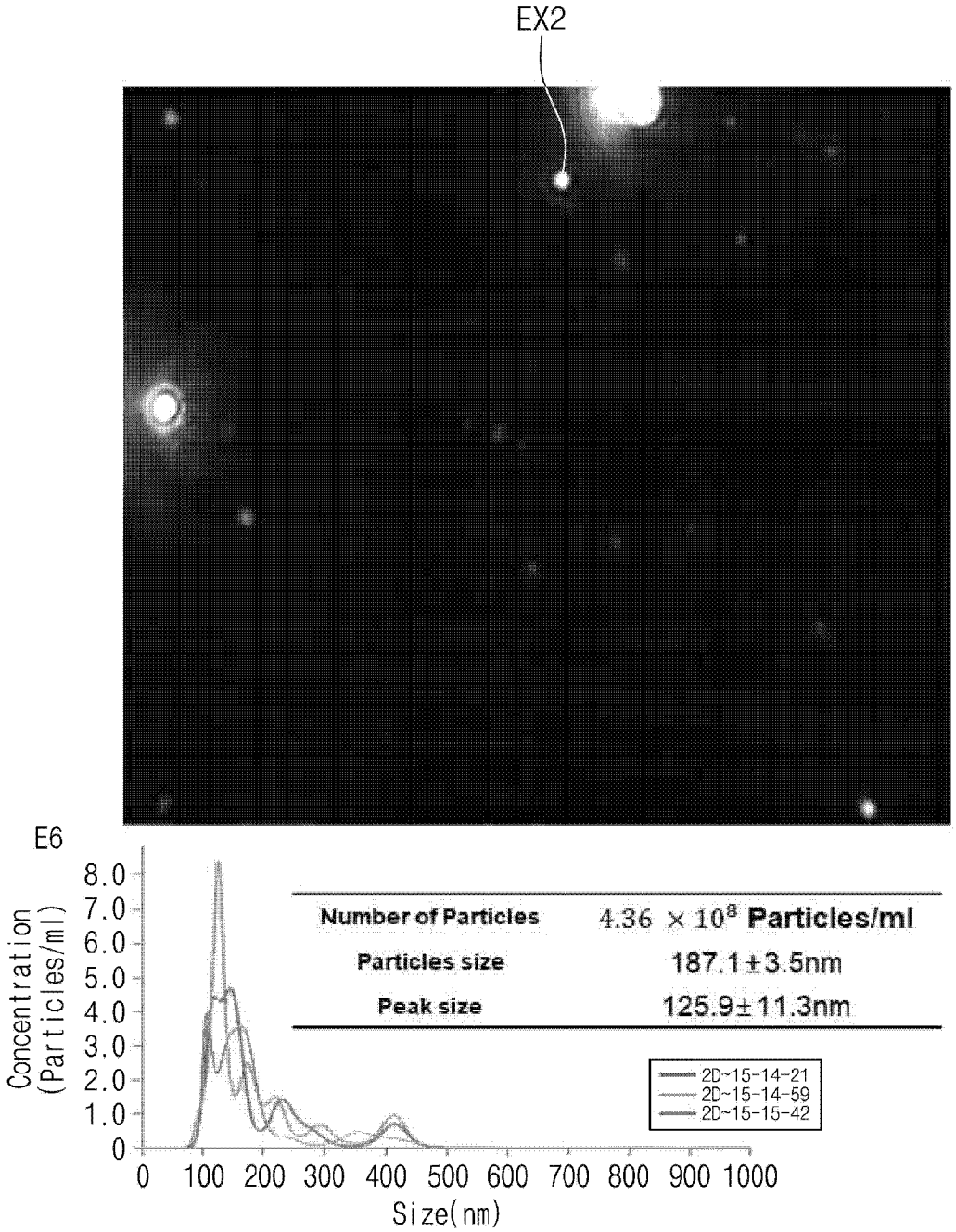


[도15]


EX1


E6
Concentration (Particles/ml)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000
Size(nm)
Number of Particles 1.96 × 10^11 Particles/ml
Particles size 140.0±4.8nm
Peak size 89.1±1.3nm
3D~15-34-14
3D~15-34-52
3D~15-34-36

[도16]


EX2
E6
Concentration (Particles/ml)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000
Size(nm)
Number of Particles 4.36 × 10^8 Particles/ml
Particles size 187.1±3.5nm
Peak size 125.9±11.3nm
2D~15-14-21
2D~15-14-59
2D~15-15-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/001999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/12(2006.01)i; **B33Y 80/00**(2015.01)i; **B33Y 70/00**(2015.01)i; **B33Y 40/20**(2020.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M 1/12(2006.01); A61L 27/44(2006.01); A61L 27/58(2006.01); B33Y 70/00(2015.01); B33Y 80/00(2015.01); C12M 1/00(2006.01); C12N 5/07(2010.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 바이오 잉크(bioink), 3차원 세포 배양배드(3D cell culture bad), 스캐폴드(scaffold), 플라스마(plasma), 생분해성 물질(biodegradable material), 생체활성 물질(bioactivity material), 가교제(cross-linking agent)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1130239 B1 (HONG, Kook-Sun) 26 March 2012 (2012-03-26) See paragraphs [0024]-[0035].	1-20
Y	JP 2013-247943 A (KYOTO UNIV) 12 December 2013 (2013-12-12) See claim 1.	1-20
Y	KR 10-1135709 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 13 April 2012 (2012-04-13) See paragraphs [0014]-[0022].	4,17
Y	KR 10-2010560 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 13 August 2019 (2019-08-13) See claim 4; and paragraphs [0014]-[0025].	7-15

✓ Further documents are listed in the continuation of Box C.

✓ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 May 2021	**17 May 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/001999

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GURKAN, Umut A. et al. Engineering anisotropic biomimetic fibrocartilage microenvironment by bioprinting mesenchymal stem cells in nanoliter gel droplets. Molecular Pharmaceutics. 2014, vol. 11, pp. 2151-2159. See abstract; and pages 2151-2159.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/001999

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1130239	B1	26 March 2012	CN	103492166	A	01 January 2014
				KR	10-1118107	B1	09 March 2012
				KR	10-1118108	B1	09 March 2012
				KR	10-1215843	B1	31 December 2012
				WO	2012-115334	A1	30 August 2012
JP	2013-247943	A	12 December 2013	JP	6024047	B2	09 November 2016
KR	10-1135709	B1	13 April 2012	KR	10-2010-0114815	A	26 October 2010
				US	2010-0267143	A1	21 October 2010
KR	10-2010560	B1	13 August 2019	KR	10-2019-0042185	A	24 April 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/001999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 1/12(2006.01)i; **B33Y 80/00**(2015.01)i; **B33Y 70/00**(2015.01)i; **B33Y 40/20**(2020.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 1/12(2006.01); A61L 27/44(2006.01); A61L 27/58(2006.01); B33Y 70/00(2015.01); B33Y 80/00(2015.01); C12M 1/00(2006.01); C12N 5/07(2010.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바이오 잉크(bioink), 3차원 세포 배양배드(3D cell culture bad), 스캐폴드(scaffold), 플라스마(plasma), 생분해성 물질(biodegradable material), 생체활성 물질(bioactivity material), 가교제(cross-linking agent)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1130239 B1 (홍국선) 2012.03.26 단락 [0024]-[0035]	1-20
Y	JP 2013-247943 A (KYOTO UNIV) 2013.12.12 청구항 1	1-20
Y	KR 10-1135709 B1 (서울대학교산학협력단) 2012.04.13 단락 [0014]-[0022]	4,17
Y	KR 10-2010560 B1 (성균관대학교산학협력단) 2019.08.13 청구항 4; 및 단락 [0014]-[0025]	7-15
A	GURKAN, UMUT A. 등, `Engineering anisotropic biomimetic fibrocartilage microenvironment by bioprinting mesenchymal stem cells in nanoliter gel droplets', Molecular Pharmaceutics, 2014년, 11권, 페이지 2151-2159 요약; 및 페이지 2151-2159	1-20

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년05월17일(17.05.2021)	**2021년05월17일(17.05.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**정다원**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/001999

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1130239 B1	2012/03/26	CN 103492166 A	2014/01/01
		KR 10-1118107 B1	2012/03/09
		KR 10-1118108 B1	2012/03/09
		KR 10-1215843 B1	2012/12/31
		WO 2012-115334 A1	2012/08/30
JP 2013-247943 A	2013/12/12	JP 6024047 B2	2016/11/09
KR 10-1135709 B1	2012/04/13	KR 10-2010-0114815 A	2010/10/26
		US 2010-0267143 A1	2010/10/21
KR 10-2010560 B1	2019/08/13	KR 10-2019-0042185 A	2019/04/24