



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월28일
(11) 등록번호 10-2160587
(24) 등록일자 2020년09월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0606 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0174203
- (22) 출원일자 2019년12월24일
심사청구일자 2019년12월24일
- (56) 선행기술조사문헌
BioResearch Open Access, vol.2(6),
pp.448~454(2013)*
Chem. Soc. Rev., vol.48, pp.4049~4086(
2019.08.07.)*
W02018183199 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
주식회사 팽세
서울특별시 마포구 잔다리로 25, 5층(서교동, 우
신빌딩)
- (72) 발명자
신재하
서울특별시 은평구 증산로 435-1(신사동)
- (74) 대리인
김정수

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김정태

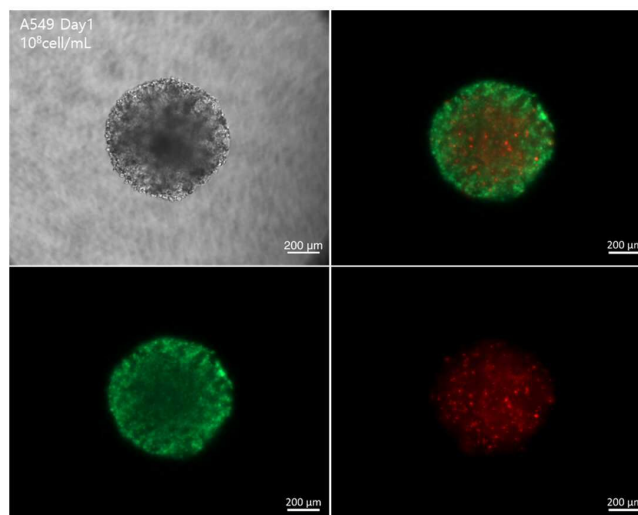
(54) 발명의 명칭 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물

(57) 요약

본 발명은 계면활성제, 점증제 및 필요에 따라 경화제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물을 제공한다.

본 발명의 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물에 의해 평면 기판에서 구현하기 어려운 3차원 구형의 스페로이드를 성공적으로 구현해 내고, 스페로이드의 크기 또한 균일하게 얻을 수 있으므로, 세포 배양 분야에서 3차원 구형의 스페로이드를 균일한 크기로 얻을 수 있는 기술로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12Y 203/02013 (2013.01)

C12N 2500/00 (2013.01)

C12N 2500/50 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2689742
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	2018년 팁스(TIPS) 프로그램 민간투자주도형 기술창업지원사업
연구과제명	바이오 3D프린터 장비 제작 및 이를 응용한 암 스페로이드 제조기술 구현
기여율	1/1
과제수행기관명	주식회사 팡세
연구기간	2018.12.01 ~ 2020.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

계면활성제 및 점증제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스(bath) 조성물에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 계면활성제가 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 점증제가 젤란검, 카라기난검, 로커스트콩검, 잔탄검, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 스타치포스페이트, 폴록사머, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 점증제가 조성물 총 중량에 대하여 0.001 ~ 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 액적 디핑용 액체 배스 조성물이 경화제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 경화제가 트랜스글루타미나제, 게니핀(genipin), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 다이아이스사이아네이트(diisocyanates), 카보다이이미드(carbodiimides), 염화칼슘, 트롬빈(thrombin), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 경화제가 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체)이고, 상기 점증제는 젤란검이며, 상기 경화제는 트랜스글루타미나제인 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체) 1 ~ 10 중량%, 젤란검 0.001 ~ 10 중량% 및 트랜스글루타미나제 1 ~ 10 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 계면활성제, 점증제 및 필요에 따라 경화제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스(bath) 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 전세계적으로 인체 내 손상된 장거나 조직을 재생 또는 대체하기 위하여 장기 및 조직 이식이 증가하고 있는 추세이다. 하지만, 장기 이식을 위한 기증자 부족은 점점 증가하고 있고, 따라서 이를 해결하기 위하여 인공 조직 및 장기를 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 일 예로서, 인공 조직 및 장기를 개발하기 위하여 제작하고자 하는 조직 및 장기에 적합한 세포를 3차원 지지체에 주입하고, 주입된 세포에 적절한 배양 환경을 제공하여 최종적인 인공 조직 및 장기를 제작하는 방법이 사용되고 있다. 또한, 세포와 함께 바이오잉크를 출력하는 3D 바이오프린팅 기술이 주목받고 있다.

[0003] 3D 바이오프린팅은 살아있는 세포를 바이오 잉크와 함께 프린트하여, 인체에 이식 가능한 3 차원 인공 구조체 또는 지지체를 만드는 기술로서, 이러한 3D 바이오프린팅 기술을 이용하여 오가노이드(organoid), 장기유사 칩(organ-on-a-chip), 동물 실험대체를 위한 조직 및 장기 유사체 등과 같이 질병의 치유에 도움을 줄 수 있는 여러 연구들이 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 최근에는, 종양 스페로이드(spheroid), 줄기세포 오가노이드(organoid) 및 3D 바이오프린팅을 통한 조직 공학과 같은 진보된 3D 세포 배양 방법을 사용하여 실제 생체내 세포 반응이 보다 면밀한 모델링으로 구현되고 있다. 이러한 과정에서 다양한 구조의 3D 바이오프린팅 시스템이 시도되고 있으며, 이와 함께 세포 배양 과정에서 발생하는 세밀한 문제점이 대두되고 있다.

[0005] 즉, 기존의 응집방식으로 만들어진 스페로이드는 균일성이 낮다는 문제점이 있고, 행잉드랍 방식은 균일한 스페로이드 제작은 가능하나 조작의 난이도가 높아 수행하는 연구자에 따라 오차가 발생할 가능성이 높다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국특허 공개 제10-2018-0117179호 (2018년10월26일)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 발명자들은 균일한 스페로이드를 신속하게 제작할 수 있는 기술에 대하여 연구하던 중, 액체 배스(liquid bath)를 사용하여 평면 기판에서는 구현하기 어려운 3차원 구형의 세포구조체인 스페로이드(spheroid)를 구현함으로써, 특별한 용기가 아닌 사용자들이 사용하던 기존 용기에 배스 조성물을 넣어 사용하여 3차원 구형의 구조체를 재현성 있게 구현할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0008] 따라서, 본 발명은 상기 스페로이드(spheroid)를 구현할 수 있는 조성물인, 계면활성제, 점증제 및 필요에 따라 경화제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스(bath) 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면에 따라, 계면활성제 및 점증제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스(bath) 조성물이 제공된다.

[0010] 일 구현예에서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 솔비탄 에스테르, 폴리옥시에틸렌 솔비탄, 폴리옥시에틸렌 에테르 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다.

- [0011] 일 구현예에서, 상기 계면활성제는 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%로 포함될 수 있다.
- [0012] 일 구현예에서, 상기 점증제는 젤란검, 카라기난검, 로커스트콩검, 잔탄검, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 스타치포스페이트, 폴록사머, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다.
- [0013] 일 구현예에서, 상기 점증제는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 ~ 10 중량%로 포함될 수 있다.
- [0014] 일 구현예에서, 상기 액적 디핑용 액체 배스 조성물은 경화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0015] 일 구현예에서, 상기 경화제는 트랜스글루타미나제, 게니핀(genipin), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 다이아이소시아나이드(diisocyanates), 카보다이미드(carbodiimides), 염화칼슘, 트롬빈(thrombin), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다.
- [0016] 일 구현예에서, 상기 경화제는 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%로 포함될 수 있다.
- [0017] 일 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물은 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 젤란검 및 트랜스글루타미나제를 포함할 수 있다.
- [0018] 일 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체) 1 ~ 10 중량%, 젤란검 0.001 ~ 10 중량% 및 트랜스글루타미나제 1 ~ 10 중량%를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 의해, 계면활성제, 점증제 및 필요에 따라 경화제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물이 하이드로겔 토출 장치의 노즐에서 토출되는 액적을 받아내어 노즐로부터 분리되는 시점에 구형의 스페로이드 형태를 유지하고 충격을 최소화하면서 배스 조성물에 내부 부유되도록 함으로써, 스페로이드 제작 기술에서 기존에 바이오리액터 또는 low attachment plate를 사용하던 기술인 응집방식 또는 행잉드랍방식에 비하여 빠르고 균일하게 스페로이드 제작이 가능하며, 연구자의 기술 성숙도와 관계없이 자동화된 방법으로도 활용할 수 있어 High-throughput screening (HTS) 분석에 적용할 수 있을 뿐만 아니라, 평면 기판에서 구현하기 어려운 3차원 구형의 스페로이드를 성공적으로 구현해 낼 수 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0020] 따라서, 본 발명의 계면활성제, 점증제 및 필요에 따라 경화제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스 조성물은 세포 배양 분야 등 스페로이드 제작 분야에서 3차원 구형의 스페로이드를 균일한 크기로 얻을 수 있는 기술로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 스페로이드 제작 방법을 요약하여 도시한 개략도이다.
- 도 2는 배양 플레이트에서 배양되는 A549 (폐암 세포주)의 스페로이드 사진이다.
- 도 3은 배양 플레이트에서 배양되는 HT29(대장암 세포주)의 스페로이드 사진이다.
- 도 4는 A549[폐암 세포주] 스페로이드를 형광현미경으로 관찰한 사진이다[좌상: Bright Field image, 우상: Merged fluorescence image, 좌하: Calcine AM(Green Fluorescence) image, live 세포, 우하: Ethidium homodimer-1(Red Fluorescence) image, dead 세포].
- 도 5는 DU145(전립선암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진이다[좌상: Bright Field image, 우상: Merged fluorescence image, 좌하: Calcine AM(Green Fluorescence) image, live 세포, 우하: Ethidium homodimer-1(Red Fluorescence) image, dead 세포].
- 도 6은 HT29(대장암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진이다[좌상: Bright Field image, 우상: Merged fluorescence image, 좌하: Calcine AM(Green Fluorescence) image, live 세포, 우하: Ethidium homodimer-1(Red Fluorescence) image, dead 세포].
- 도 7은 HCT116(대장암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진이다[좌상: Bright Field image, 우상: Merged fluorescence image, 좌하: Calcine AM(Green Fluorescence) image, live 세포, 우하: Ethidium homodimer-1(Red Fluorescence) image, dead 세포].

도 8은 MCF-7(유방암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진이다[좌상: Bright Field image, 우상: Merged fluorescence image, 좌하: Calcin AM(Green Fluorescence) image, live 세포, 우하: Ethidium homodimer-1(Red Fluorescence) image, dead 세포].

도 9는 3D 바이오프린터로 제작된 A549 스페로이드의 다양한 크기의 사진이다.

도 10은 3D 바이오프린터로 제작된 오가노이드의 1일차 사진이다(삽입도는 기존 기술에 의해 형성된 오가노이드의 사진임).

도 11은 3D 바이오프린터로 제작된 오가노이드의 7일차 사진이다.

도 12는 응집 기반 오가노이드(Aggregation-based organoid) 및 바이오프린터로 제작된 오가노이드(Bioprintin-based organoid)의 크기(Size of organoids) 및 표준편차(Size uniformity) 분포를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "액적(droplet)"은 하이드로겔 재료(액체 또는 겔일 수 있음)의 임의의 결속 부피를 지칭한다. 물 액적의 부피는 일반적으로 1.0 mL 미만이나, 점성 물질의 경우 이보다 큰 부피일 수 있으며, 매질의 단일 결속 부피를 액적으로 칭한다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 "스페로이드(spheroid)"는 세포가 응집되어 대체적으로 단면이 원형 또는 타원형으로 보일 수 있을 정도로 형성된 입체 구조를 의미한다.
- [0024] 본 발명은 계면활성제 및 점증제를 포함하는 하이드로겔 액적 디핑용 액체 배스(bath) 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 액체 배스 조성물은, 평면 기관에서 구현하기 어려운 3차원 구형의 세포구조체를 구형에 가까운 스페로이드로 얻기 위하여, 하이드로겔 토출 장치의 노즐에서 토출되는 액적을 액체 배스(liquid bath)를 사용하여 받아냄으로써 구형의 세포구조체인 스페로이드를 구현하는 액체 배스 조성물이다.
- [0026] 본 발명에서 액체 배스 조성물에 포함되는 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 솔비탄 에스테르, 폴리옥시에틸렌 솔비탄, 폴리옥시에틸렌 에테르 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다. 구체적으로, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체[예를 들어, 폴록사머(Poloxamer), 플루로닉[®] F-127(Pluronic[®] F-127)], 솔비탄 에스테르[예를 들어, 스판[™](Span[™])], 폴리옥시에틸렌 솔비탄[예를 들어, 트윈[™](Tween[™])], 폴리옥시에틸렌 에테르[예를 들어, 브리즈[™](Brij[™])] 등을 포함한다.
- [0027] 일 구현예에서, 상기 계면활성제는 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 2 ~ 8 중량%, 더욱 바람직하게는 4 ~ 6 중량%로 포함될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물에 포함되는 상기 점증제는 배스 조성물의 점도를 적절한 범위로 조절하여 하이드로겔 토출 장치의 노즐에서 토출되는 액적이 노즐로부터 분리되는 시점에 구형의 스페로이드 형태를 유지하고 충격을 최소화하면서 배스 조성물에 내부 부유되도록 하는 역할을 한다.
- [0029] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 적절한 점증제의 예는 젤란검, 카라기난검, 로커스트콩검, 잔탄검, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 스타치포스페이트, 폴록사머, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 상기 점증제는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.005 ~ 5 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 ~ 1 중량%로 포함될 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 상기 액적 디핑용 액체 배스 조성물은 경화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 이 때 상기 경화제는 하이드로겔 토출 장치의 노즐에서 토출되는 하이드로겔 액적을 경화시키는 역할을 한다.
- [0032] 상기 경화제는 하이드로겔 액적에 포함되어 있는 물질을 경화시킴으로써 종국적으로 하이드로겔 액적을 경화시킬 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 트랜스글루타미나제(젤라틴 경화제), 케니핀(genipin), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 다이아이소시아나이트(diisocyanates), 카보다이미드(carbodiimides) 등의 젤라틴 경화제; 염화칼슘 등의 알지네이트 경화제; 트롬빈(thrombin) 등의 피브리노겐 경화제; 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 경화제는 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 2 ~ 5 중량%로 포함될 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔 액적 디핑용 액체 베스 조성물은 바람직한 조성으로서 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 젤란검 및 트랜스글루타미나제를 포함할 수 있으며, 가장 바람직한 조성으로서, 조성물 총 중량에 대하여 폴록사머(폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체) 1 ~ 10 중량%, 젤란검 0.001 ~ 10 중량% 및 트랜스글루타미나제 1 ~ 10 중량%를 포함할 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] <실시예>

[0039] 1. 스페로이드 제작

[0040] (1) 개요

[0041] 평면의 기관에서 구현하기 어려운 3차원 구형의 세포구조체를 액체 베스(liquid bath)를 사용하여 구현하기 위하여 하기 방법을 수행하였다. 사용되는 용기는 특별한 용기가 필요한 것이 아니라 사용자들이 기존 사용하던 용기에 베스를 넣어 사용할 수 있으며, 바이오잉크 액적(drop)을 베스의 수면 위치에 맞추어 넣어줄 수 있는 장치라면 본 기술을 적용 가능하다.

[0043] (2) 기술 내용

[0044] 액체 베스의 조성은 하기 표 1과 같고, 바이오잉크의 조성은 하기 표 2와 같다.

표 1

재료	혼합비율	역할
플루로닉 F-127(Pluronic F-127)	5%	접중제/계면활성제
젤란검(Gellan gum)	0.03-0.33%	접중제
트랜스글루타미나제(Transglutaminase)	3%	경화제 (gelatin)

표 2

재료	혼합비율*	역할
젤라틴	6-7.5%	세포외기질(ECM)
젤란검	0.45-0.67%	접중제

[0048] 플루로닉 F-127은 15%로 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 녹인 용액을 혼합에 사용하였고, 트랜스글루타미나제는 10%로 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 녹인 용액을 혼합에 사용하였다.

[0049] 젤란검은 3차 증류수에 1%로 녹인 용액을 최종적으로 상기 혼합 비율이 되도록 혼합하여 사용하였다.

[0050] 경화제로 사용된 트랜스글루타미나제는 바이오잉크의 젤라틴 성분을 경화시키기 위하여 액체 베스 조성에 포함시킨 것으로, 액체 베스 안으로 출력할 바이오잉크의 특성에 따라 조성에서 제거되거나 다른 경화 물질로 대체 가능하다.

[0051] 사용하는 바이오잉크의 점도에 따라 접중제의 비율을 달리하여 액체 베스 조성물을 조정할 수 있다. 액체 베스와 바이오잉크의 조합이 구형의 형성에 중요하다.

[0053] 2. 스페로이드 제작 방법

[0054] (1) 개요

[0055] 평면 기관에서 3차원 구형의 세포구조체를 균일하게 제작하기에는 어려움이 있으며, 이를 액체 베스와 바이오잉크 토출 장치로 해결하고자 하였다. 이러한 방법에 의하여 반복재현성을 가지는 3차원 구형 세포구조체의 제작이 가능하게 되었으며, 노즐의 직경에 따라 구형의 크기를 조절할 수 있고, 마이크로피펫 사용이 어려운 점성 소재를 바이오프린팅을 사용함으로써 균일한 토출이 가능하도록 하였다.

[0057] (2) 기술 내용

[0058] 제작 방법을 도 1에 요약하여 도시하였고, 제작 순서는 하기와 같다.

[0059] ① 출력 배스를 출력할 용기에 넣어 준비하고, 세포가 혼합된 바이오잉크(하이드로겔)를 출력용 배럴에 넣고 프린터에 장착하였다.

[0060] ② 잉크를 제작하고자 하는 스페로이드의 크기로 토출하여 방울(droplet)로 맺히게 하였다(Beading 단계). 이 때, 노즐 직경과 토출 시간, 압력 등의 토출 조건에 따라 방울의 크기를 조절할 수 있으며, 사용하는 토출 장치의 사양에 따라 최적화하여 사용해야 한다.

[0061] ③ 잉크가 맺힌 노즐을 출력 배스의 수면까지 내려 잉크 방울이 출력 배스 안으로 들어가게 하였다(Dipping Gelation 단계). 형성된 바이오잉크 방울이 디핑(dipping)에 의한 표면장력의 변화로 노즐로부터 분리되었다. 노즐의 끝이 잉크 방울의 크기보다 더 수면 안쪽으로 들어가는 경우 구형이 손상되므로, 제작 크기에 따라 노즐의 위치를 최적화할 필요가 있다. 이 단계는 디핑(dipping)에 의한 표면장력 변화로 바이오잉크 액적을 분리하는 원리이며, 이 때 배스 외부에서 만들어진 액적의 형상이 그대로 유지되면서 분리되기 위하여 액체 배스와 바이오잉크의 조합이 중요하다.

[0062] ④ 출력 노즐을 원점으로 이동시켜 방울을 노즐과 분리하였다.

[0063] ⑤ 필요에 따라, 37 °C에서 30분간 경화시켰다. 이 때, 사용하는 바이오잉크의 특성에 따라 경화조건이 달라질 수 있다.

[0065] 3. 스페로이드 제작

[0066] 3D 바이오프린터로 하기와 같이 암세포 스페로이드를 제작하였다.

[0067] ① 스페로이드를 출력할 세포의 펠렛(10^8 세포)을 37 °C에서 예열한 바이오잉크(0.67% 젤란검 + 6% 젤라틴 in DPBS) 1 mL에 현탁시켜(suspension) 3D 바이오프린터의 출력 배럴에 로딩하였다. 24웰 플레이트에 액체 배스(젤란검 0.1%, 플루로닉 F-127 5%, 트랜스글루타미나제 3% in DPBS)를 400 μ L/웰로 채워 준비하였다.

[0068] ② 노즐은 30G(blunt tip)을 사용하였고 압력은 20 kPa로 액체 배스가 채워진 24웰 플레이트에 출력하였다.

[0069] ③ 배양기(37 °C)에서 30분간 경화시켰다.

[0070] ④ 액체 배스를 제거하고 DPBS 1 mL로 세척한 후 스페로이드를 저부착 웰 플레이트(Low attachment well plate)에서 배양하였다.

[0071] - 배양액: RPMI + 10% FBS + 1% antibiotic antimycotic solution, 1 mL/웰

[0072] - 배양 조건: 37 °C, 5% CO₂

[0073] 스페로이드가 담겨진 배양 플레이트의 사진을 도 2(A549, 폐암 세포주) 및 도 3(HT29, 대장암 세포주)에 나타내었다.

[0075] 4. 3D 바이오프린터로 제작된 암세포 스페로이드의 생/사 분석(Live/Dead assay)

[0076] ① 스페로이드를 출력할 세포의 펠렛(10^8 세포)을 37 °C에서 예열한 바이오잉크(0.67% 젤란검 + 6% 젤라틴 in DPBS) 1 mL에 현탁하여 3D 바이오프린터의 출력 배럴에 로딩하였다. 24웰 플레이트에 액체 배스를 400 μ L/웰로 채워 준비하였다.

[0077] ② 노즐은 30G(blunt tip)을 사용하였고 압력은 20 kPa로 액체 배스가 채워진 24웰 플레이트에 출력하였다.

[0078] ③ 37 °C에서 30분간 경화시켰다.

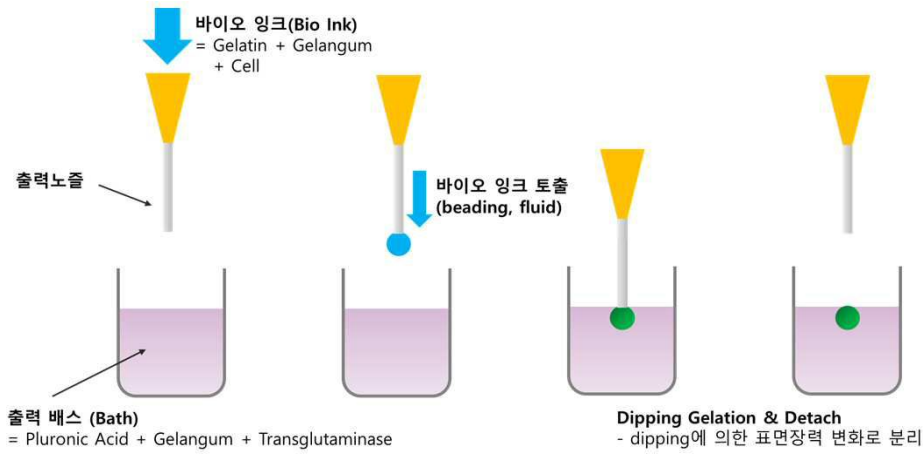
[0079] ④ 액체 배스를 제거하고 DPBS 1 mL로 세척한 후 스페로이드를 저부착 웰 플레이트에서 배양하였다. 배양액(RPMI + 10% FBS + 1% antibiotic antimycotic solution)을 1 mL/웰 사용하고 24시간 배양하였다(37 °C, 5% CO₂).

[0080] ⑤ 배양액을 제거하고 DPBS 1 mL/웰로 2회 세척한 후 형광염료(fluorescence reagent)를 처리하였다 (Fluorescence reagent: Ethidium homodimer-1 농도 4 μ M, Calcein AM 농도 1 μ M의 DPBS 용액).

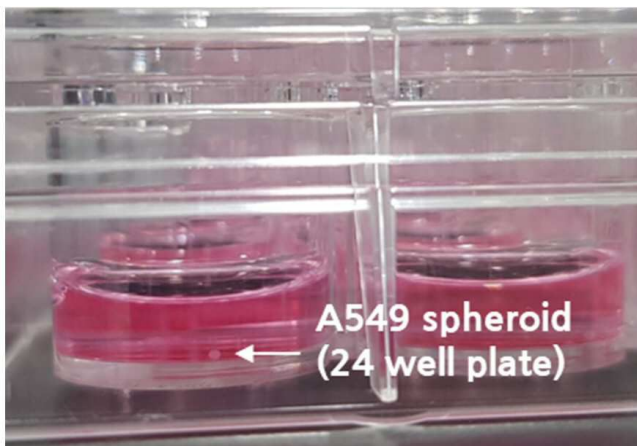
- [0081] ⑥ 상온에서 30분간 반응 후 형광현미경으로 관찰하였다(Ex/Em: Calcein=494/517 nm, Ethidium homodimer-1 528/617 nm).
- [0082] A549(폐암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진을 도 4에 나타내었다.
- [0083] DU145(전립선암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진을 도 5에 나타내었다.
- [0084] HT29(대장암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진을 도 6에 나타내었다.
- [0085] HCT116(대장암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진을 도 7에 나타내었다.
- [0086] MCF-7(유방암 세포주) 스페로이드를 관찰한 사진을 도 8에 나타내었다.
- [0088] **5. 3D 바이오프린터로 제작된 A549 스페로이드 크기 분포 분석**
- [0089] <실험방법>
- [0090] ① 스페로이드를 출력할 세포의 펠렛(10^8 세포)을 37 °C에서 예열한 바이오잉크(0.67% 젤란검 + 6% 젤라틴 in DPBS) 1 mL에 현탁하여 3D 바이오프린터의 출력배럴에 로딩하였다. 24웰 플레이트에 액체 배스를 400 μ l/웰로 채워 준비하였다.
- [0091] ② 노즐은 30G(blunt tip)을 사용하였고 압력은 20 kPa로 액체 배스가 채워진 24웰 플레이트에 출력하였다.
- [0092] ③ 37 °C에서 30분간 경화시켰다.
- [0093] ④ 액체 배스를 제거하고 DPBS 1 mL로 세척한 후 현미경 관찰하여 각 스페로이드의 이미지를 얻었다. 얻어진 이미지를 도 9에 나타내었다.
- [0094] ⑤ 이미지(image) J 소프트웨어를 이용하여 스페로이드의 직경을 측정한 후 평균값과 표준편차를 구하였다. 그 결과, 평균 직경은 645.78 μ m, 표준편차는 49.46 μ m로 측정되었다.
- [0096] **6. 3D 바이오프린터로 제작된 오가노이드(organoid) 배양 및 크기 균일도 분석**
- [0097] ① 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cell, H9)의 펠렛(10^8 세포)을 37 °C에서 예열한 바이오잉크(0.67% 젤란검 + 6% 젤라틴 in DPBS) 1 mL에 현탁하여 3D 바이오프린터의 출력 배럴에 로딩하였다. 24웰 플레이트에 액체 배스를 400 μ l/웰로 채워 준비하였다.
- [0098] ② 노즐은 30G(blunt tip)을 사용하였고 압력은 20 kPa로 액체 배스가 채워진 24웰 플레이트에 출력하였다.
- [0099] ③ 37 °C에서 30분간 경화시켰다.
- [0100] ④ 액체 배스를 제거하고 DPBS 1 mL/웰로 2회 세척한 후 스페로이드를 배양액에서 배양하였다.
- [0101] - 배양액: Essential8 (Gibco)
- [0102] - 배양조건: CERO(benchtop incubator & bioreactor), 37°C, 5% CO₂
- [0103] 도 10에 3D 바이오프린터로 제작된 오가노이드의 1일차 사진(삽입도는 기존 기술에 의해 형성된 오가노이드의 사진임)을 나타내었고, 도 11에 3D 바이오프린터로 제작된 오가노이드의 7일차 사진을 나타내었다.
- [0104] 또한, 도 12에 응집 기반 오가노이드(Aggregation-based organoid) 및 바이오프린터로 제작된 오가노이드(Bioprintin-based organoid)의 크기(Size of organoids) 및 표준편차(Size uniformity) 분포를 나타낸 그래프를 나타내었다.
- [0105] 도 10, 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, 기존기술인 응집 기반 오가노이드(Aggregation-based organoid)에 비하여 바이오프린터로 제작된 오가노이드(Bioprintin-based organoid)의 경우에 오가노이드 크기가 더욱 균일하다는 것을 알 수 있다.

도면

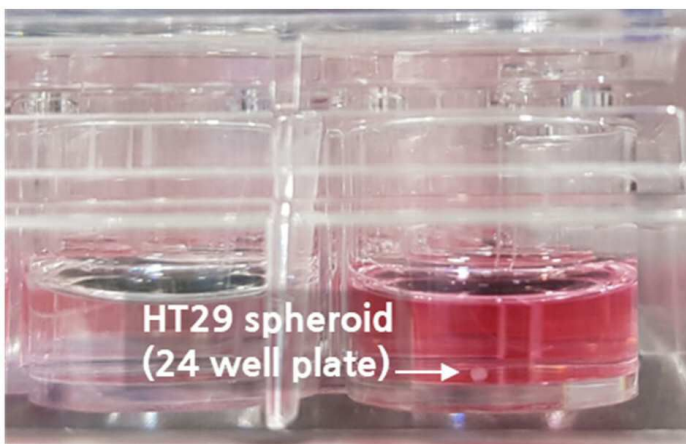
도면1



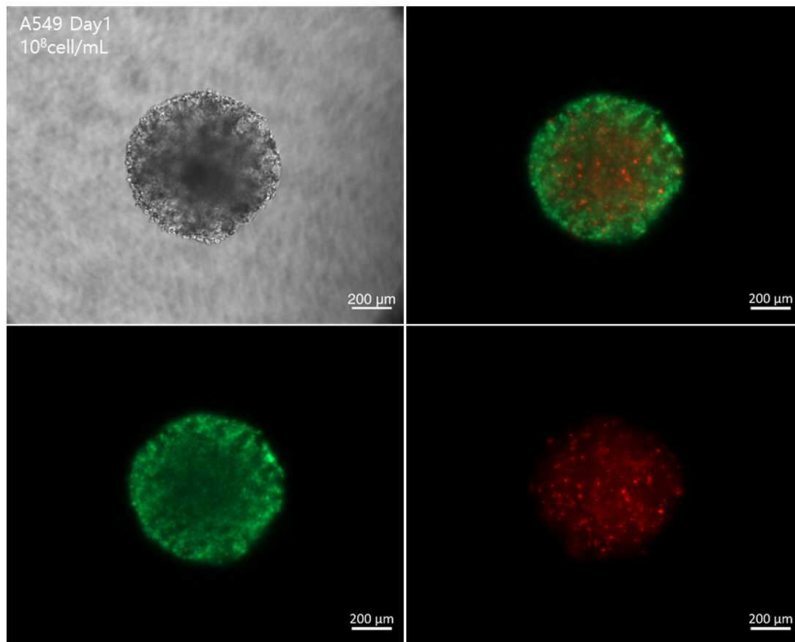
도면2



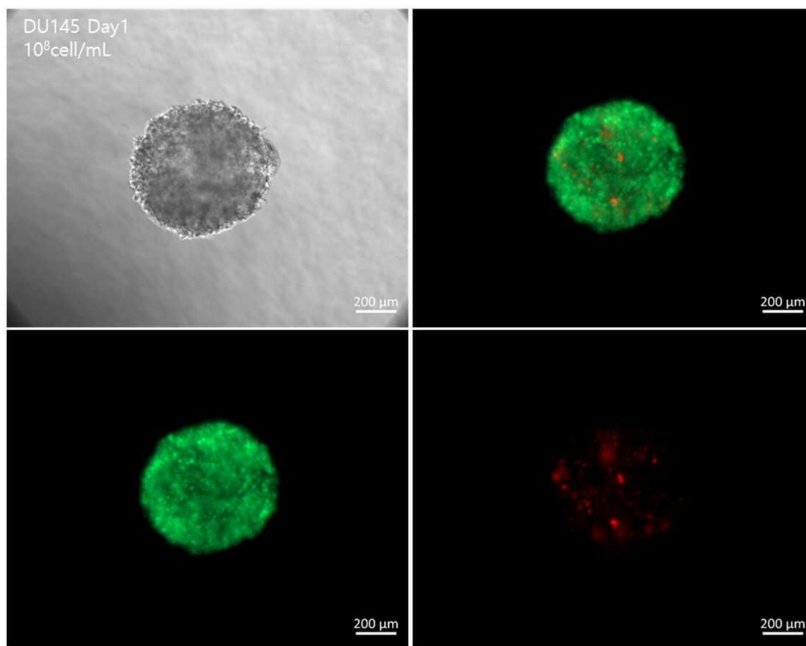
도면3



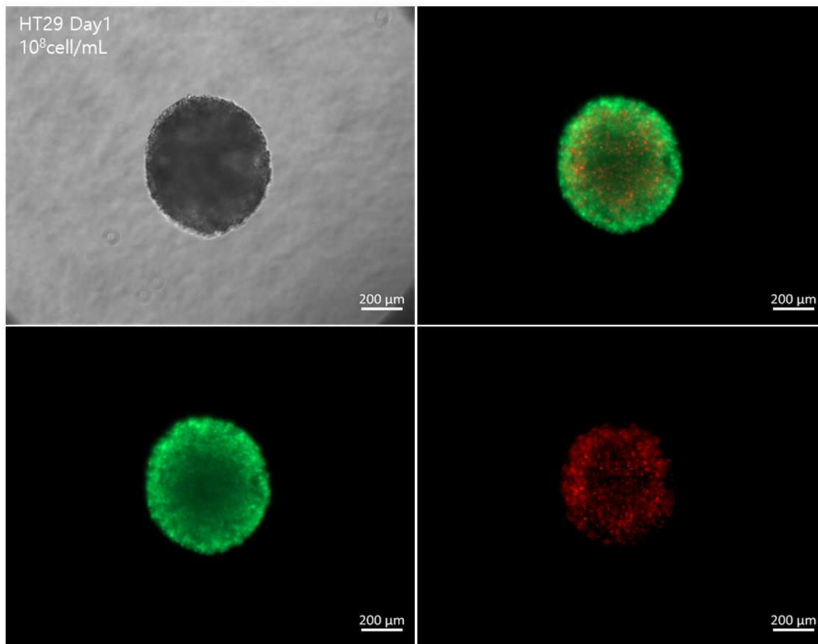
도면4



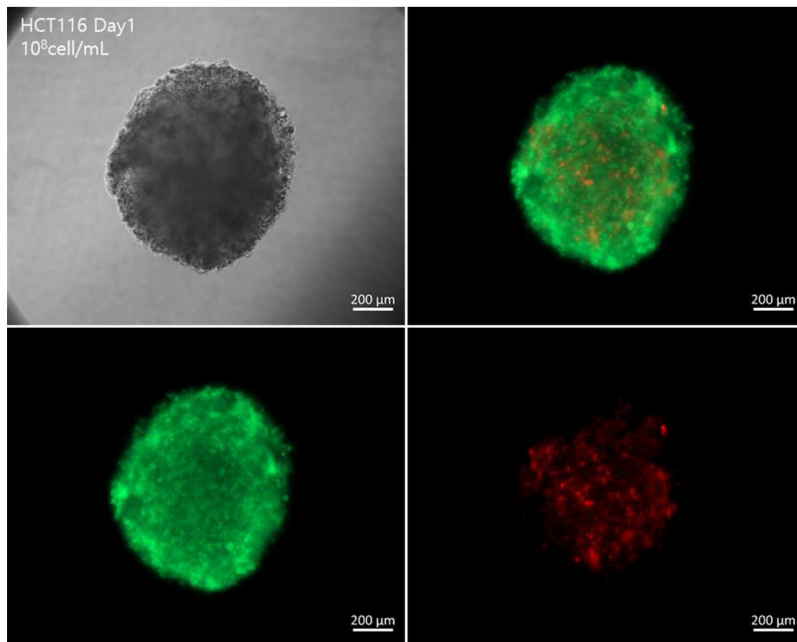
도면5



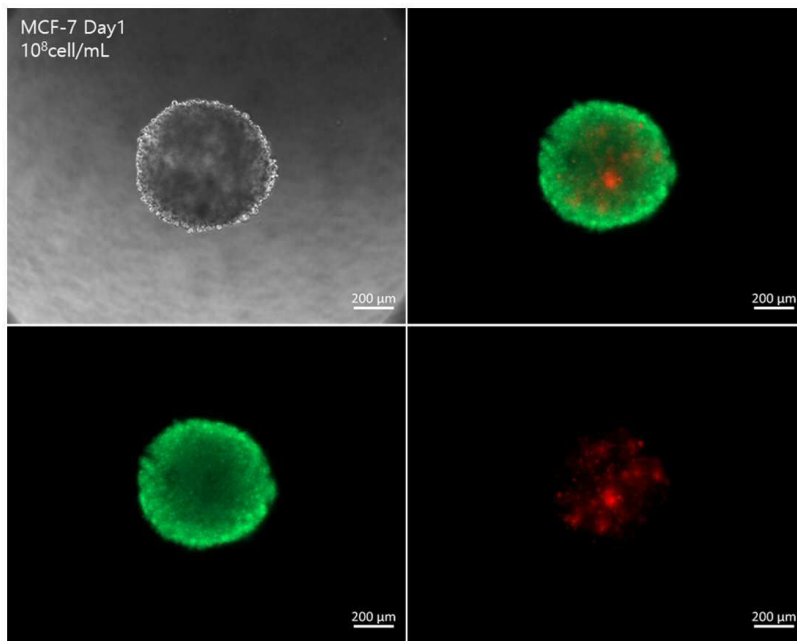
도면6



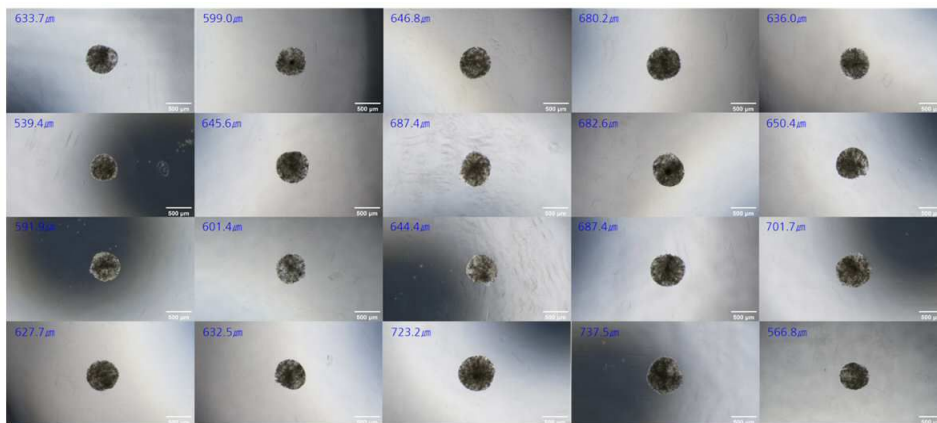
도면7



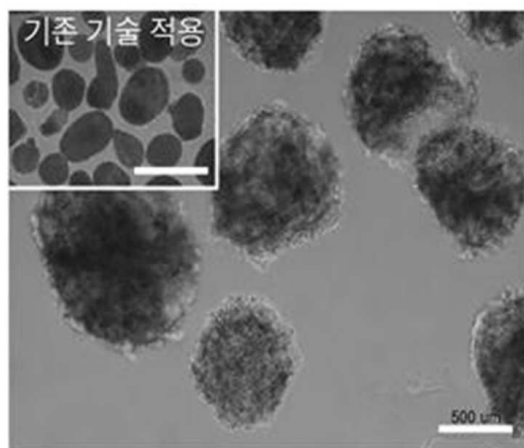
도면8



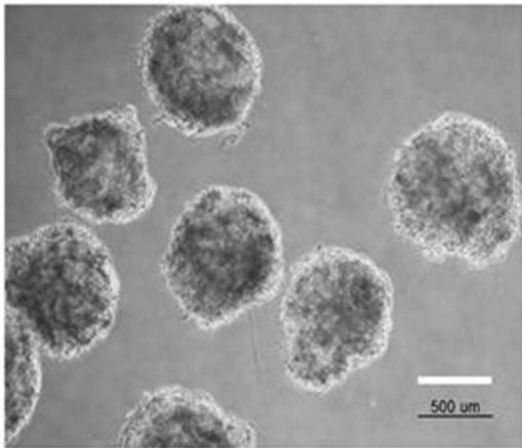
도면9



도면10



도면11



도면12

