

명세서

**발명의 명칭: 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한
맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법, 및 상기 제조방법을 이용하여
제조된 맞춤형 진피 재생 시트**

기술분야

- [1] 본 명세서는 2018년 1월 31일에 한국특허청에 제출된 한국 특허 출원 제 10-2018-0012220호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 내용 전부는 본 명세서에 포함된다.
- [2] 본 발명은 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법, 및 상기 제조방법을 이용하여 제조된 맞춤형 진피 재생 시트에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 본 명세서는 2018년 1월 31일에 한국특허청에 제출된 한국 특허 출원 제 10-2018-0012220호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 내용 전부는 본 명세서에 포함된다.
- [4] 본 발명은 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법, 및 상기 제조방법을 이용하여 제조된 맞춤형 진피 재생 시트에 관한 것이다.
- [5] [발명의 배경이 되는 기술]
- [6] 피부는 인체 표면 전체를 덮고 있는 가장 큰 장기로서, 체액의 유실을 막아주고, 외부로부터 유해물질과 미생물의 유입을 막고, 물리적 자극, 방사선과 자외선 등으로부터 우리 몸을 보호하는 기능을 수행하고 있다. 피부는 모낭, 털, 땀샘, 피지선 등 여러 부속기관을 보유하고 있어 보호막 기능 외에도 다양한 기능을 수행하고 있는 중요한 복합 기관이다. 피부는 크게 표피층(epidermis), 진피층(dermis) 및 피하조직(subcutaneous tissue, hypodermis)으로 나뉜다.
- [7] 진피층은 표피의 아래에 있는 층으로 혈관, 신경 등의 다양한 구조물들을 지지해 주는 기질을 공급하는 층으로 콜라겐, 탄성 섬유 및 세포외 기질(extracellular matrix)들로 이루어져 있다. 진피층은 크게 상층부의 섬유아세포(fibroblast)가 풍부하고 미세 혈관이 분포하는 유두층(papillary layer)과 두꺼운 콜라겐 섬유가 풍부한 세망 결합 조직(reticular connective tissue)으로 구성되어 있다.
- [8] 피부조직은 화상, 외상 및 피부 질환 등으로 인해 조직의 일부가 손상될 수 있는데, 이 경우 손상된 조직의 치유를 목적으로 하거나 재건성형을 목적으로 본인 피부조직을 이식하는 자가이식 autograft), 다른 사람의 피부를 이식하는 동종이식(homograft, allograft), 동물의 피부를 이식하는 이종이식(heterograft, xenograft) 방법을 사용한다. 이들 방법 중 자가이식이 가장 이상적이지만

치료부위가 광범위한 경우 조직을 확보할 수 있는 부위에 제한이 따르며, 채취 부위가 새로운 상처부위로 남게 되는 어려움이 있다. 동족이식은 영구적인 생착보다는 상처 주변부의 세포의 이동과 치유를 돕는 역할을 한다.

- [9] 인공피부(skin equivalent 또는 reconstructed skin)란 피부세포와 피부 구성물질인 콜라겐, 엘라스틴 등을 이용하여 3차원적으로 피부를 재구성한 것으로서, 살아있는 섬유아세포와 각질형성세포로 구성되어 실제 피부와 유사한 형태학적, 생리학적 특성을 나타내기 때문에 피부 모사체(skin equivalent 또는 reconstructed skin)라고 불린다. 인공피부는 심한 화상으로 피부 이식이 필요하지만, 화상의 정도가 너무 심하거나 환부가 너무 넓어서 자신의 피부만으로는 이식이 불가능한 환자들의 치료 목적으로 1980년대에 개발되었으며, 계속적인 개량과 연구를 통해서 현재는 피부 생리연구, 피부 자극 평가, 피부 효능평가 등 다양한 영역에서 활용되고 있다. 그러나 기존의 인공피부는 제조 방법에 있어서 조직 배양중에 진피가 점차 수축하는 현상이 나타나고, 진피 수축이 심한 경우에는 인공피부의 전체적인 형태 변형이 일어나는 문제점이 있다.
- [10] 기존 세포치료제의 경우 동종세포를 이용하여 이식하거나, 자가세포를 이식하는 방법이 이용되었다. 동종세포의 이식의 경우, 파라크린(paracrine) 효과는 있지만 신체는 이를 이물질(foreign body)로 받아들여 결국 없어지는 문제가 있다. 또한, 자가세포를 주사주입 방법으로 이식하는 경우, 세포가 자라기 위한 환경(예를 들어, 스캐폴드)이 없으면 소실될 확률이 높고 결국 주입되는 세포로 인한 효과를 보기는 어렵다.
- [11] 또한, 자가 조직 일부를 떼어 증식 배양하는 자가이식의 경우 공여 부위의 흉터 발생 가능성 및 이식 부위가 넓은 경우 공여 부위의 부족 등의 문제점이 있고, 동종이식 및 이종이식의 경우 면역거부반응 또는 염증유발 등의 문제를 가지고 있다. 그러므로, 손상된 피부를 대체 또는 재생시킬 수 있으며, 상기와 같은 부작용을 최소화할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.
- [12] [선행기술문헌]
- [13] [특허문헌]
- [14] 한국 등록특허공보: 10-1710615

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명은 이식 거부반응을 최소화하고, 환자 맞춤형 진피 재생 시트를 제조할 수 있는 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물, 이를 이용한 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법, 및 진피 재생 시트를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [16] 본 발명의 일 실시상태는, 지방조직 유래 기질혈관분획, 세포외기질, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액; 및 트롬빈을 포함하는 제2 액을 포함하는, 진피

재생 시트용 바이오 잉크 조성물을 제공한다.

- [17] 본 발명의 다른 실시상태는, a) 3D 스캐너를 이용하여, 결손된 진피 부위의 3차원 데이터를 취득하는 단계; b) 지방조직 유래 기질혈관분획, 세포외기질, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액을 이용하여, 상기 취득된 3차원 데이터의 형상에 대응하는 제1 층을 형성하는 단계; c) 트롬빈을 포함하는 제2 액을 상기 제1 층에 도포하여 제2 층을 형성하는 단계; 및 d) 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 진피 재생 시트를 형성하는 단계;를 포함하는, 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법을 제공한다.

- [18] 본 발명의 또다른 실시상태는, 상기 제조방법을 이용하여 제조된, 맞춤형 진피 재생 시트를 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명에 따른 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법은 환자의 손상된 피부 조직에 적합하게 진피 재생 시트를 제조할 수 있는 장점이 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법은 본 발명은 환부의 정확한 형태를 3D 스캐닝하여, 환부와 일치되는 형상의 진피 재생 시트를 제조할 수 있다.

- [20] 본 발명에 따른 진피 재생 시트는 면역거부반응 없이 이식이 가능한 장점이 있으며, 또한 짧은 시간 내에 제조가 가능하여 건강한 세포를 환부에 이식할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 제조하기 위하여, 제1 액 및 제2 액을 각각 준비하는 과정을 도시한 것이다.

- [22] 도 2는 실험예 1에 따른 맞춤형 진피 재생 시트의 세포 생존력을 확인한 사진을 나타낸 것이다.

- [23] 도 3은 실험예 2를 위한 동물 실험에서의 피부를 제거한 사진을 나타낸 것이다.

- [24] 도 4는 실험예 2에 따라 제조된 대조군 및 실시예의 맞춤형 진피 재생 시트를 나타낸 것이다.

- [25] 도 5는 실험예 2에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식한 경과를 나타낸 것이다.

- [26] 도 6은 실험예 2의 동물 실험에서의 Masson's Trichrome 염색 결과를 나타낸 것이다.

- [27] 도 7은 CD31 염색을 이용하여, 실험예 2에 따른 동물 실험 결과 이식 부위의 혈관 형성 여부를 관찰한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 명세서에서 어떤 부제가 다른 부제 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부제가 다른 부제에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부제 사이에 또 다른 부제가 존재하는 경우도 포함한다.

- [29] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히

반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[30] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[31] 본 발명의 일 실시상태는, 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction), 세포외기질, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액; 및 트롬빈을 포함하는 제2 액을 포함하는, 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물을 제공한다.

[32] 본 발명에 따른 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물은 2액형으로서, 상기 제1 액과 상기 제2 액이 순차적으로 도포된 후 반응하여 진피 재생 시트가 형성될 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 액 내의 트롬빈과 상기 제1 액 내의 피브리노겐이 반응하여 피브린 네트워크를 형성할 수 있으며, 이는 상기 지방조직 유래 기질혈관분획 및 세포외기질이 충분히 고정되도록 하는 역할을 할 수 있다.

[33] 상기 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose tissue derived stromal vascular fraction)은 지방조직 유래 줄기세포(adipose derived stem cells)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획은 지방조직 유래 줄기세포 외의 다른 세포들(예를 들어, 지방세포, 적혈구세포 및 다른 기질세포, 등) 및 세포외 기질 물질을 실질적으로 포함하지 않을 수 있으며, 보다 바람직하게는 다른 세포들 및 세포외 기질 물질을 전혀 포함하지 않을 수 있다.

[34] 상기 지방조직 유래 기질혈관분획은 동종 동물 또는 이종 동물의 지방 조직으로부터 추출된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 지방조직 유래 기질혈관 분획은 자가 유래 지방 조직으로부터 추출된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획은 시술 대상인 환자 또는 동물의 지방조직을 이용하여 추출된 것일 수 있다. 상기 지방조직 유래 기질혈관분획은 지방조직으로부터 지방조직 유래 기질혈관분획(SVF)와 세포외기질(ECM) 등을 미세 클러스터(micro or nano SVF/ECM Cluster)의 형태 추출하여 수득할 수 있으며, 필요에 따라 순수한 지방조직 유래 기질혈관분획(SVF)과 세포외기질(ECM)을 따로 분리하여 사용할 수도 있다. 일 예로, Tiss'you사의 Lipocell 키트를 이용하여, 지방조직으로부터 추출된 것일 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획은 당 업계에 알려진 방법 및 추출 키트 등을 이용하여 얻을 수 있다.

[35] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액에서의 지방 조직 유래 기질혈관분획의 농도는 10^5 개/ml 내지 10^7 개/ml일 수 있다. 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 농도가 상기 범위 내인 경우, 제조되는 맞춤형 진피 재생 시트는 이식 부위에서 진피 세포로의 분화가 효과적으로 수행될 수 있다.

[36] 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 함량은 높을수록 효과가 향상되지만, 이의 함량이 지나치게 높아지는 경우 세포외기질 및 피브리노겐 등에 따른 효과가 발현되기 곤란할 수 있다. 그러므로, 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 함량은 제1 액 내에서의 다른 구성 성분의 함량의 잔부일 수

있다.

- [37] 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획은 지방 조직 유래 세포외기질과 함께 사용됨으로써, 진피 세포로의 분화가 촉진될 수 있다. 구체적으로, 상기 지방 조직 유래 세포외기질은 환부의 상처 치유에 필수적인 세포가 성장하고 분화하는 데에 필요한 생화학적 인자를 가지고 있으며, 지방 조직 유래 기질혈관분획이 진피 세포로 분화한 후 고정될 수 있는 물리적 환경을 제공할 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 세포외기질은 동종 또는 이종 동물의 지방 조직(또는 세포)으로부터 추출된 것일 수 있다. 또한, 상기 세포외기질은 동종 또는 이종 동물의 섬유화 조직(또는 세포)으로부터 추출된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 세포외기질은 자가 지방 조직(또는 세포), 또는 자가 섬유화 조직(또는 세포)으로부터 추출된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 세포외기질은 시술 대상인 환자 또는 동물의 지방세포를 이용하여 추출된 것일 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 세포외기질은 탈세포화된 것일 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 세포외기질은 $5\ \mu\text{m}$ 내지 $100\ \mu\text{m}$ 직경의 입자일 수 있다. 구체적으로, 상기 세포외기질은 물리적 방법으로 탈세포화 및 분쇄되어 입자상으로 준비될 수 있다. 나아가, 상기 세포외기질은 당 업계에 알려져 있는 방법을 이용하여 얻을 수 있다.
- [41] 상기 제1 액의 피브리노겐 및 상기 제2 액의 트롬빈의 반응을 통한 피브린 매트릭스는 상기 지방조직 유래 기질혈관분획 및 상기 세포외기질을 고정하는 역할을 할 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액에서의 세포외기질의 함량은 20 wt% 내지 60 wt%일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 액에서의 세포외기질의 함량은 20 wt% 내지 50 wt%일 수 있다. 상기 세포외기질의 함량이 상기 범위 내인 경우, 진피 세포로 분화된 세포의 생존률이 향상되어 효과적으로 결손된 진피 부위의 재생이 이루어질 수 있다. 상기 세포외기질의 함량이 지나치게 높은 경우, 진피 재생 시트 제조를 위한 피브리노겐과 트롬빈의 함량이 상대적으로 적어져서 제조된 진피 재생 시트의 형태가 유지되기 곤란한 문제가 생길 수 있다. 또한, 상기 세포외기질의 함량이 지나치게 적은 경우, 진피 재생 시트 제조를 위한 피브리노겐과 트롬빈의 함량이 지나치게 높아져서 제조된 진피 재생 시트가 지나치게 단단하게 되어 세포외기질에 따른 효과를 기대하기 어려운 문제가 발생할 수 있다. 그러므로, 상기 세포외기질의 함량을 상기 범위로 조절하여 진피 세포로 분화된 세포의 생존률을 향상시키고, 나아가 진피 재생 시트의 형상 유지도 용이하게 하는 것이 바람직하다.
- [43] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액에서의 피브리노겐의 농도는 4 mg/ml 내지 50 mg/ml일 수 있다. 또한, 상기 제1 액에서의 피브리노겐의 농도는 5 mg/ml 내지 40 mg/ml, 또는 7 mg/ml 내지 30 mg/ml일 수 있다.

- [44] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제2 액에서의 트롬빈의 농도는 30 IU/ml 내지 250 IU/ml일 수 있다. 또한, 상기 제2 액에서의 트롬빈의 농도는 40 IU/ml 내지 250 IU/ml, 40 IU/ml 내지 100 IU/ml, 또는 45 IU/ml 내지 80 IU/ml일 수 있다.
- [45] 상기 피브리노겐 및 상기 트롬빈의 농도가 상기 범위 내인 경우, 경화 속도를 적절하게 확보하며 상기 지방 조직 유래 기질혈관분획의 분포를 고르게 유지할 수 있다. 이를 통하여, 제조되는 맞춤형 진피 재생 시트 내에 세포 분포를 고르게 유지하며, 맞춤형 진피 재생 시트의 이식 후 세포 분화능이 효과적으로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 피브리노겐 및 상기 트롬빈의 농도가 상기 범위 내인 경우, 제조된 진피 재생 시트의 형태를 잘 유지할 수 있으며 적절한 경도를 유지하여 환부에 적합하게 이식될 수 있는 장점이 있다.
- [46] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제1 액은 아프로티닌을 더 포함할 수 있다. 상기 아프로티닌(aprotinin)은 췌장에서 분비되는 프로틴분해효소의 억제제로서, 총 58 개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다. 주로 소의 폐에서 추출되며 혈액 속에서는 피브린의 분해를 저지하여, 지혈작용을 하는 것으로 알려져 있다.
- [47] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 아프로티닌은 1 ml의 제1 액 당 900 KIU 내지 1,100 KIU(kininogen Inactivator Unit), 구체적으로 1000 KIU로 포함될 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 제2 액은 염화칼슘 용액 내에 트롬빈이 분산된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 액은 1 ml 당, 40 IU 내지 250 IU의 트롬빈, 5 mg 내지 6.5 mg의 염화칼슘을 포함할 수 있다.
- [49] 상기 제1 액 및 제2 액의 용매는 물, 구체적으로는 생리식염수일 수 있다. 또한, 상기 제1 액 내의 피브리노겐과 상기 제2 액 내의 트롬빈은 상용의 피브린 글루 키트를 통하여 입수할 수 있다.
- [50] 상기 제1 액과 제2 액은 10분 이내, 바람직하게는 5분 이내에 반응이 완료되므로, 상기 진피 재생 시트용 바이오 잉크 조성물은 시술 현장에서 3D 프린터기를 이용하여 진피 재생 시트를 즉석에서 제조할 수 있는 장점이 있다.
- [51] 본 발명은 피브리노겐 및 트롬빈으로 구성되는 피브린 글루를 접착제로 사용하며, 이는 히알루론산 접착제 또는 콜라겐 접착제보다 높은 점성을 확보할 수 있으므로, 상기 맞춤형 진피 재생 시트는 환부와의 우수한 접착력을 가지고, 나아가 높은 강도를 유지할 수 있다.
- [52] 본 발명의 다른 실시상태는, a) 3D 스캐너를 이용하여, 결손된 진피 부위의 3차원 데이터를 취득하는 단계; b) 지방조직 유래 기질혈관분획, 세포외기질, 및 피브리노겐을 포함하는 제1 액을 이용하여, 상기 취득된 3차원 데이터의 형상에 대응하는 제1 층을 형성하는 단계; c) 트롬빈을 포함하는 제2 액을 상기 제1 층 상에 도포하여 제2 층을 형성하는 단계; 및 d) 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 진피 재생 시트를 형성하는 단계;를 포함하는, 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법을 제공한다.

- [53] 또한, 본 발명의 일 실시상태에 따르면, a1) 3D 프린터를 이용하여 수득된 3차원 데이터의 형상에 대응하는 몰드를 제조하는 단계를 더 포함하고, b) 단계는 상기 몰드 내에 상기 제1 액을 도포하는 것일 수 있다.
- [54] a) 단계는 당업계에서 알려진 3D 스캐너 장비 또는 3D 프린트 장비를 이용할 수 있다. 또한 a1) 단계는 당업계에서 알려진 3D 프린트 장비를 이용할 수 있다. 상기 몰드는 상기 제1 액 및 제2 액의 도포시 입체적 형태를 고정할 수 있도록 하는 역할을 할 수 있다. 상기 몰드는 상기 맞춤형 진피 재생 시트의 형성 후 제거될 수 있다. 상기 몰드는 당 업계에서 일반적으로 사용되는 생체 적합성 고분자를 이용하여 형성될 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, b) 단계 및 c) 단계는 잉크젯 프린팅 또는 3D 프린팅을 이용하여 수행될 수 있다. 구체적으로, b) 단계 및 c) 단계는 당업계에서 알려진 2 이상의 노즐을 가지는 프린팅 장치를 이용할 수 있으며, 각각의 노즐에서 상기 제1 액 및 제2 액을 각각 토출하여 입체 형상을 만들 수 있다. 나아가, 상기 제1 층의 형성시 3D 프린터 또는 잉크젯 프린터를 이용하여, 균질한 세포 분포를 가지도록 하여, 상기 맞춤형 진피 재생 시트 내의 세포 뭉침 현상 등을 방지할 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, b) 단계 및 c) 단계는 2회 이상 교대로 반복 수행될 수 있다. 구체적으로, 부피가 큰 진피 재생 시트의 형성이 필요한 경우, b) 단계 및 c) 단계가 교대로 수행되어, "제1 층/제2 층/제1 층/제2 층"과 같이 적층된 후 응고하여 진피 재생 시트가 형성될 수 있다.
- [57] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, d) 단계는 10분 이내에 완료될 수 있으며, 바람직하게는 5분 이내에 완료될 수 있다. 구체적으로, d) 단계는 3분 내지 7분 동안 반응하여 상기 제1 층 및 상기 제2 층이 반응하여, 맞춤형 진피 재생 시트를 형성하는 것일 수 있다.
- [58] 본 발명에 따른 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법에 있어서, 상기 지방조직 유래 기질혈관분획 및 세포외기질은 환자 또는 동물의 지방조직에서 추출되어 별도의 배양 단계 없이 준비될 수 있다. 이를 이용하여 상기 제1 액을 제조한 후, 상기 맞춤형 진피 재생 시트를 빠른 시간 내에 제조하여 이를 환부에 이식할 수 있으므로, 세포의 활성이 극대화될 수 있다.
- [59] 또한, 상기 맞춤형 진피 재생 시트의 제조방법은 환부의 형상과 동일하게 진피 재생 시트를 제조할 수 있으므로, 이식 부위와 진피 재생 시트 간의 간극을 최소화하여 회복 후 자연스러운 상태를 구현할 수 있다.
- [60] 본 발명의 또 다른 실시상태는, 상기 제조방법을 이용하여 제조된, 맞춤형 진피 재생 시트를 제공한다.
- [61] 상기 맞춤형 진피 재생 시트는 전술한 바와 같이, 환자 또는 동물의 지방조직을 이용하여 단시간 내에 환부에 적합한 형상으로 제조한 후 이식될 수 있다. 상기 진피 재생 시트는 환부에 이식하고, 드레싱으로 환부를 보호하여 손상된 피부의 회복을 도모할 수 있다. 상기 맞춤형 진피 재생 시트는 이식된 후, 지방조직 유래

기질혈관분획이 진피 세포로 분화되고, 분화된 진피 세포는 상기 지방 조직 유래 세포외기질 및 피브린 매트릭스 내에 고정되어 손상된 피부의 회복이 될 수 있다.

- [62] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [63] **지방조직 유래 기질혈관분획(SVF)**
- [64] 지방조직 유래 기질혈관 분획(SVF) 세포는 하기 단계를 통하여 획득하였다.
- [65] 1. 무균 수술실에서 의사의 주도하에 지방흡입술을 실시하여 약 60 cc의 지방 조직을 추출하고, 이와 동일한 양으로 0.075 %의 콜라게나아제(collagenase)를 첨가하고, 이를 37 °C의 온도에서 230 rpm의 Shaking incubation으로 30 분 동안 반응시켰다.
- [66] 2. 상기와 같이 반응 후, 반응물을 25 °C에서 420 g(Relative Centrifugal Force (RCF))의 속도로 10분간 원심분리를 하였으며, 원심 분리 결과 SVF 펠렛층, 콜라게나아제층 및 오일층의 3층으로 구분되었다.
- [67] 3. SVF 펠렛층을 제외한 상부액을 제거하고, SVF 펠렛층을 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 재현탁한 후, 100 μ m의 나일론 필터(Cell strainer)를 이용하여 재현탁한 SVF층의 섬유질과 남아있는 불순물을 제거하였다.
- [68] 4. 필터링된 SVF를 포함하는 용액을 재현탁하며 3회 원심분리를 한 후, 최하층의 펠렛만 남기고 제거한 후, Cell counter를 이용하여 nucleus cell을 계산한 결과, 1 ml 당 0.26×10^6 개 내지 2.2×10^6 개의 SVF가 획득된 것을 확인할 수 있었다.
- [69] **세포외기질(ECM; extracellular matrix)**
- [70] 무균 수술실에서 의사의 주도하에 지방흡입술을 실시하여 지방 조직을 추출한 후, 이를 생리 식염수에 혼합하였다. 그리고, 12,000 rpm 내지 20,000 rpm 조건의 homogenizer를 이용하여 기계적으로 지방 조직으로부터 ECM을 분리한 후, 이를 원심 분리하였다. 원심 분리 후의 침전물을 다시 원심 분리하는 과정을 3회 내지 5회 반복한 후 최종적으로 ECM을 획득하였다.
- [71] **실험예 1 - 맞춤형 진피 재생 시트 내의 세포 생존력 확인을 위한 In Vitro 실험**
- [72] 도 1은 본 발명에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 제조하기 위하여, 제1 액 및 제2 액을 각각 준비하는 과정을 도시한 것이다. 구체적으로, 상기 획득된 SVF와 ECM을 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합한 후, 여기에 4.5 mg/ml의 피브리노겐이 혼합된 아프로티닌액 1 ml와 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합하여 제1 액을 제조하였다. 이 때, 제1 액 내의 ECM의 함량을 도 2와 같이 10 wt% 또는 20 wt%로 조절하였다.
- [73] 나아가, 제조된 제1 액과 동일한 부피의 트롬빈이 분산된 염화칼슘 용액을

준비하였다. 이 때, 제2 액 내의 트롬빈의 농도는 도 2와 같이 7.8 IU/ml 내지 250 IU/ml로 조절하였다.

- [74] 준비된 제1 액을 도포하여 제1 층을 형성한 후, 제1 층 상에 준비된 제2 액을 도포하여 맞춤형 진피 재생 시트를 제조하였다.
- [75] 도 2는 실험예 1에 따른 맞춤형 진피 재생 시트의 세포 생존력을 확인한 사진을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 2는 맞춤형 진피 재생 시트에 대하여 살아있는 세포를 확인하기 위한 녹색형광 calcein-AM 염색과 혈장막의 손실 여부를 확인하기 위한 붉은색 형광-ethidium homodimer-1 염색을 한 후, 공초점현미경(Confocal microscope(leica, TCS SP5))을 이용하여 세포 생존력을 확인한 것이다. 도 2에 따르면, ECM의 함량이 20 wt%인 경우 SVF와 ECM 간의 상호작용(interaction)이 향상되어 세포 증식이 활발해지는 것을 확인할 수 있으며, 나아가 트롬빈의 농도가 50 IU/ml 이상인 경우 세포의 증식이 보다 활발한 것을 확인할 수 있다.
- [76] **실험예 2 - 맞춤형 진피 재생 시트의 효능 확인을 위한 동물 실험(In Vivo 실험)**
- [77] 본 발명에 따른 진피 재생 시트의 효능을 검증하기 위하여, 4개월된 돼지의 피부를 2.5 cm × 2.5 cm 크기로 제거한 후, 전술한 방법과 같이 돼지의 지방 조직으로부터 SVF 및 ECM을 획득하였다. 도 3은 실험예 2를 위한 동물 실험에서의 피부를 제거한 사진을 나타낸 것이다.
- [78] 나아가, 상기 획득된 SVF와 ECM을 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합한 후, 여기에 9 mg/ml의 피브리노겐이 혼합된 아프로티닌액 1 ml와 혼합 주사기(mix syringe)를 이용해서 혼합하여 제1 액을 제조하였다. 이 때, 제1 액 내의 ECM의 함량은 20 wt%였고, SVF의 농도는 6.25×10^6 개/ml 였다. 또한, 50 IU/ml 농도의 트롬빈을 포함하는 제2 액을 준비하였다.
- [79] 그리고, 3D 스캐너를 이용하여 제거된 피부 영역을 스캐닝한 후, 3D Bio 3D 프린터(INVIVO, ROKIT)를 사용하여 준비된 제1 액 및 제2 액을 순차적으로 도포한 후 5분 간 굳혀 맞춤형 진피 재생용 시트를 제조하였다. 이와 같이 제조된 진피 재생용 시트를 제거된 피부 영역에 이식한 후 드레싱 처리하여 14일 동안 피부의 회복 정도를 관찰하였다.
- [80] 대조군으로서, 제1 액에 ECM을 포함하지 않고 동일한 방법으로 맞춤형 진피 재생 시트를 제조하여 제거된 피부 영역에 이식한 후 드레싱 처리하여 14일 동안 피부의 회복 정도를 관찰하였다.
- [81] 도 4는 실험예 2에 따라 제조된 대조군 및 실시예의 맞춤형 진피 재생 시트를 나타낸 것이다.
- [82] 도 5는 실험예 2에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식한 경과를 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 5는 대조군(only SVF)과 실시예(SVF+ECM)에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식한 사진을 나타낸 것이며, 이식 당일(0 days)로부터 14일 후(14 days)의 경과를 나타낸 것이다.
- [83] 도 6은 실험예 2의 동물 실험에서의 Masson's Trichrome 염색 결과를 나타낸

것이다. 구체적으로, 도 6은 손상이 없는 피부(normal) 영역, 피부를 제거한 영역(defect only), 및 피부가 제거된 영역에 실시예에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식(SVF+ECM)한 영역, 각각을 피부 제거 후 14일 경과 후 Masson's Trichrome 염색을 하여 관찰한 것이다. 도 6에 따르면, 피부가 제거된 후 14일간 방치된 경우(defect only) 진피층에 콜라겐 복합체가 매우 낮은 농도로 형성되는 것을 확인할 수 있다. 이에 반하여, 실시예에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식(SVF+ECM)한 경우, 진피층에 뚜렷한 푸른색으로 염색이 되어 진피층에 콜라겐 복합체가 높은 밀도로 형성된 것을 확인할 수 있으며, 표피층에 뚜렷하게 붉은색으로 염색이 되어 표피층의 구성 성분인 케라틴, 세포질 등이 형성됨을 확인할 수 있다.

[84] 도 7은 CD31 염색을 이용하여, 실험예 2에 따른 동물 실험 결과 이식 부위의 혈관 형성 여부를 관찰한 것이다. 구체적으로, 도 7은 손상이 없는 피부(normal) 영역, 피부를 제거한 영역(defect only), 및 피부가 제거된 영역에 실시예에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식(SVF+ECM)한 영역, 각각을 피부 제거 후 14일 경과 후 CD31 염색을 하여 혈관 재생 여부를 관찰한 것이다. 도 7에 따르면, 피부가 제거된 후 14일간 방치된 경우(defect only) 갈색으로 염색된 혈관 영역이 매우 산발적으로 좁게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이에 반하여, 실시예에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 이식(SVF+ECM)한 경우, 갈색으로 염색된 혈관 생성 영역이 매우 크게 다수로 존재하는 것을 확인할 수 있다.

[85] 실험예 2의 여러 실험 결과를 바탕으로, 본 발명에 따른 맞춤형 진피 재생 시트를 피부에 이식하는 경우, 피부의 재생이 촉진되고 나아가 피부 내의 혈관 생성도 촉진되어 본래의 피부와 유사하게 회복될 수 있음을 알 수 있다.