(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092409
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01) *B33Y 80/00* (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3882 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0182528
(22) 출원일자 2023년12월15일
심사청구일자 2023년12월15일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박찬흠
강원특별자치도 춘천시 방송길 70, 107동 3701호 (온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
허지원
강원특별자치도 춘천시 새청말길 26, 107동 1006호 (우두동, 강변코아루아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

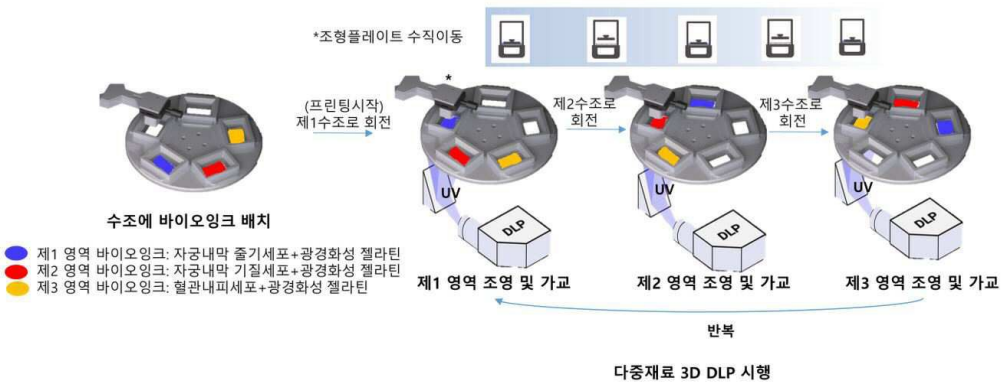
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **세포 함유 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 DLP 방식의 바이오 3D 프린터를 사용하여 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 인공 자궁내막 구조체는, 광가교성 하이드로겔 전구체에 자궁내막 기질세포, 자궁내막 줄기세포, 혈관내피세포가 혼합된 서로 다른 바이오 잉크를 제조한 후, 다중재료 바이오 DLP 3D 프린팅을 통해 제조될 수 있으며, 자궁내막 줄기세포가 포함된 제1영역; 상기 제1영역과 직접 접하도록 연결되며, 자궁내막 기질세포가 포함된 제2영역; 및 상기 제1영역과 제2영역을 동시에 관통하고 내벽에 혈관내피세포가 포함된 중공관 형태의 제3영역;을 포함한다

대 표 도 - 도4



다중재료 3D DLP 시행

(52) CPC특허분류
A61L 27/3808 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
B33Y 80/00 (2013.01)
A61L 2430/22 (2013.01)

(72) 발명자
김순희
강원특별자치도 춘천시 삭주로 40-1, 203호 (교동)
이옥주
강원특별자치도 춘천시 동면 춘천로449번길 26-6, 302호
이지승
경기도 부천시 조종로85번길 31, 2층 201호 (원미동, 공원빌라)
이영진
충청남도 서산시 성연면 성연3로 36, 510동 201호 (이안 서산테크노밸리)
올라툰지 아지테루
강원특별자치도 춘천시 봉의산길22번길 15-1 (봉의동)
김경희
강원특별자치도 춘천시 교동길 57-2, 101호 (교동)
나스 수달시니
강원특별자치도 춘천시 삭주로70번길 16-1, 106호 (교동)
김장민
강원특별자치도 춘천시 춘주로 174, 103동 101호 (퇴계동, 그린타운아파트)
권오준
경기도 남양주시 다산지금로145번길 15, 7306동 2103호 (다산동, 다산 펜테리움 리버테라스Ⅰ)
오문식
강원특별자치도 춘천시 신북읍 장본길 54-10

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039627
과제번호	HI21C1847010023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	공익적 의료기술연구사업
연구과제명	바이오 DLP 3D 프린터를 이용한 난임 치료 기술 개발용 혈관기반 인공 자궁 내막 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

자궁내막 줄기세포(endometrial stem cell)를 포함하는 제1 영역;

자궁내막 기질세포(endometrial stromal cell)를 포함하는 제2 영역; 및

혈관 내피세포(human endothelial cells, HUVEC)를 포함하고, 상기 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되어 연속된 도관 형태를 갖는 제3 영역;을 포함하고,

상기 제1 영역과 제2 영역은, 수직방향으로 적층된 구조가 아닌, 수평방향으로 연접하도록 3D 프린팅된, 인공 자궁내막 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 연속된 도관 형태의 제3 영역은, 상기 제1 영역과 제2 영역이 수평방향으로 연접하여 형성된 연접면을 관통하도록 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되며, 내부가 빈 연속 도관 구조인 것을 특징으로 하는, 인공 자궁내막 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역은, 각각 살아있는 세포들이 하이드로겔 내에 포접되어 있는 것을 특징으로 하는, 인공 자궁내막 구조체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 하이드로겔은, 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 형성하는 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크가 조사된 빛에 의해 광경화된 것을 특징으로 하는, 인공 자궁내막 구조체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크는, 각각 광가교성 천연 고분자 하이드로겔 전구체(hydrogel precursor); 광개시제(photo initiator); 및 살아있는 세포;를 포함하고,

각 바이오 잉크 내에 포함된 살아있는 세포는 서로 상이한 것을 특징으로 하는, 인공 자궁내막 구조체.

청구항 6

복수의 수조들이 배치된 상판과 수직 이동 가능한 조형 플레이트를 포함하는 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여, 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법에 있어서,

광가교성 천연 고분자 하이드로겔 전구체(hydrogel precursor), 광개시제(photo initiator), 및 살아있는 세포를 포함하는 복수의 바이오 잉크들을 제조하는 단계;

제조된 복수의 바이오 잉크들을 각각 서로 다른 수조에 배치하는 단계;

상기 복수의 수조들이 장착된 상판이 회전 이동하고, 상기 바이오 DLP 3D 프린팅 장치의 조형 플레이트가 수직 이동하여, 상기 조형 플레이트가 복수의 수조들 중 어느 하나의 수조 내의 바이오 잉크에 침지되는 이동 단계;

침지된 조형 플레이트의 소정 영역에 빛을 조사하여, 조형 플레이트 표면의 바이오 잉크를 경화하는 경화 단계;

및

상기 이동 단계와 경화 단계를 복수 회 반복하는 단계;를 포함하는, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여, 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 인공 자궁 내막 구조체는, 제1 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제1 영역, 제2 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제2 영역, 및 제3 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제3 영역을 포함하고,

상기 제1 영역과 제2 영역은, 수직방향으로 적층된 구조가 아닌, 수평방향으로 연접하도록 형성되며,

상기 제3 영역은, 상기 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되어 연속된 도관 형태를 갖는 것을 특징으로 하는, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1 바이오 잉크는 자궁내막 줄기세포를 포함하고,

제2 바이오 잉크는 자궁내막 기질세포를 포함하며,

제3 바이오 잉크는 혈관 내피세포를 포함하는, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 천연 고분자 하이드로겔 전구체는, 젤라틴, 실크피브로인, 히알루론산, 피브린, 알지네이트, 아가로스, 젤란검, 콜라겐, 키토산 및 탈세포화된 세포외기질 중에서 선택되는 적어도 하나 이상을 포함하고,

광가교 특성을 갖도록 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA); 메타크릴무수물 (methacrylic anhydride: MA); 또는 글리시딜메타크릴레이트와 메타크릴무수물의 중합체와의 반응 결과물인, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 광개시제는, 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methylether), 디에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 적어도 하나 이상을 포함하는, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

연속된 도관 형태를 갖는 제3 영역의 일단으로 세포 배양 유체를 공급하고, 타단으로 세포 배양 유체를 배출하도록 순환 펌프를 작동시켜 세포 배양 유체를 0.2~3ml/min의 속도로 순환시키는 배양 단계;를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다중 세포 및 재료의 프린팅이 가능한 DLP 방식의 3D 바이오 프린팅 장치를 사용하여, 세포 함유 도관이 내부에 매립된 인공 자궁내막 구조체를 한번에 제조하는 방법과 이러한 방법으로 제조된 인공 자궁내막 구조체에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은, 다중재료 DLP 3D 바이오프린터를 이용하여, 혈관 내피세포를 함유하고, 내부가 빈 도관을 인공 자궁내막 구조체 내부에 매립된 인공 자궁내막 구조체를 제조하고, 혈관 내피세포가 포함된 빈 도관에 세포 배양 유체를 순환시킴으로써 인공 혈관을 인공 자궁내막 구조체 내에 형성하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0003] [과제고유번호] 1465039627

[0004] [부처명] 보건복지부

[0005] [연구관리전문기관] 한국보건산업진흥원

[0006] [연구사업명] 공익적 의료기술연구사업

[0007] [연구과제명] 바이오 DLP 3D 프린터를 이용한 난임 치료 기술 개발용 혈관기반 인공 자궁 내막 개발

[0008] [주관기관] 한림대학교산학협력단

[0009] [연구기간] 2021.07.01.~2023.12.31.

배 경 기 술

[0010] 조직 세포들은 충분한 산소와 영양분을 적절히 공급받아야 오랜 시간 동안 생존하거나 기능을 유지할 수 있다. 우리 몸을 구성하고 있는 대부분의 조직이나 기관에는 혈관이 분포하여 조직내 세포들이 충분한 산소와 영양분을 적절히 공급받으며 생존 및 기능을 유지하도록 해준다. 인체의 기능적인 조직과 장기를 체외에서 생성하는 것은 조직공학의 주요 해결책 중 하나이며, 이를 위해 조직 내에 잘 구성된 혈관 네트워크를 제조하는 것은 매우 중요한 일이다. 그러나 단순히 혈관세포를 혼합하여 구조체를 제작하거나 조직세포와 혈관세포를 교대로 단순 적층하는 방식은 실제 조직이나 장기의 환경을 모사하기에는 힘들며 좀 더 입체적인 접근이 필요하다.

[0011] 기능적으로 혈관화된 장기 구조물을 제작하기 위하여 최근 패턴화할 수 있는 템플릿을 제조한 후 액상의 하이드로겔 전구체를 부어 고체화시킨 후 템플릿과 분리시켜 혈관 패턴이 있는 구조체를 제조하거나(비특허문헌 1), 3차원 임베디드 바이오프린팅 기법을 이용하여 희생재료(sacrificial material)을 출력하고 이를 다시 제거함으로써 채널이 있는 구조체를 제작하는 사례들이 개시되었다(비특허문헌 2). 이 경우 구조체 제작 후에 혈관내피세포를 관류시키는 방법으로 혈관 세포층을 형성시킬 수 있다.

[0012] 그러나 구조체 제작 후 세포 주입을 하는 2단계의 과정을 거쳐야 하므로 번거롭고, 세포의 손실률이 높으며, 혈관 유사 구조가 아닌 단순히 빈 채널만 형성시키므로 실제 혈관이 있는 장기를 모사했다고 보기에는 힘들다. 따라서 여전히 특정 장기의 구조적 특성과 내부의 혈관을 동시에 모방하는 것에는 한계가 있는 실정이다.

[0013] 한편 자궁의 요소 중 자궁내막은 호르몬에 의하여 모양이나 기능에 변화가 생기며, 성장인자와 싸이토카인을 분비함으로써 배아가 착상하고 발달하는 환경을 제공하는 조직이다. 조직공학적인 치료법은 자궁내막 손상을 치료할 수 있는 하나의 대안이 될 수 있으며, 자궁유래 세포와 생체재료를 이용하여 셀시트(비특허문헌 3), 조직패치(비특허문헌 4), 튜브 (비특허문헌 5) 등을 제작하여 자궁내막 대체물로 사용하는 연구들이 개시되고 있다. 기능적으로 혈관화된 자궁내막 구조체를 제작한다면 최종 이식시 숙주의 혈관과 더 잘 통합하는 이점이 있을 수 있다.

[0014] 이러한 연구의 일환으로 최근 자궁 내막 줄기세포, 섬유아세포, 혈관내피세포층을 적층하여 자궁내막 복합체(비특허문헌 6)를 제작한 사례가 있으나 3차원적인 자궁구조체를 재현하기에는 제약이 있으며 이에 적절한 3차원 바이오프린팅 기술 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Nanomaterials 2019, 9(5), 689

(비특허문헌 0002) Advanced materials 2017, 29(37), 1703156

(비특허문헌 0003) Sun H et al, Biology of Reproduction, 2018, 99(5), 1057

(비특허문헌 0004) Cao Y et al,, Stem Cell Res Ther. 2018, 9(1), 192

(비특허문헌 0005) Miyazaki K et al, Biomaterials, 2014, 35(31), 8791

(비특허문헌 0006) Park SR et al, Biofabrication, 13(4), 045012

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 이러한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 혈관 내피세포가 함유되면서 벽을 갖고 내부가 빈 도관 형태의 구조가 내부에 매립된 인공 자궁내막 구조체를 제공하기 위한 것으로, 다중재료 3D 바이오프린터를 이용하여 특정 구조를 갖는 인공 자궁내막 구조체를 제작하는 방법 및 이러한 방법으로 제조된 인공 자궁내막 구조체을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 실시 형태에 따른 인공 자궁내막 구조체는, 자궁내막 줄기세포(endometrial stem cell)를 포함하는 제1 영역; 자궁내막 기질세포(endometrial stromal cell)를 포함하는 제2 영역; 및 혈관 내피세포(human endothelial cells, HUVEC)를 포함하고, 상기 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되어 연속된 도관 형태를 갖는 제3 영역;을 포함하고, 상기 제1 영역과 제2 영역은, 수직방향으로 적층된 구조가 아닌, 수평방향으로 연접하도록 3D 프린팅된 것이다.

[0018] 상기 연속된 도관 형태의 제3 영역은, 상기 제1 영역과 제2 영역이 수평방향으로 연접하여 형성된 연접면을 관통하도록 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되며, 내부가 빈 연속 도관 구조인 것이 바람직하다.

[0019] 상기 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역은, 각각 살아있는 세포들이 하이드로겔 내에 포접되어 있으며, 상기 하이드로겔은, 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 형성하는 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크가 조사된 빛에 의해 광경화된 것이 더욱 바람직하다.

[0020] 상기 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크는, 각각 광가교성 천연 고분자 하이드로겔 전구체(hydrogel precursor); 광개시제(photo initiator); 및 살아있는 세포;를 포함하고, 각 바이오 잉크 내에 포함된 살아있는 세포는 서로 상이한 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 다른 실시 형태로는, 복수의 수조들이 배치된 상판과 수직 이동 가능한 조형 플레이트를 포함하는 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여, 인공 자궁내막 구조체를 제조하는 방법을 들 수 있으며, 광가교성 천연 고분자 하이드로겔 전구체(hydrogel precursor), 광개시제(photo initiator), 및 살아있는 세포를 포함하는 복수의 바이오 잉크들을 제조하는 단계; 제조된 복수의 바이오 잉크들을 각각 서로 다른 수조에 배치하는 단계; 상기 복수의 수조들이 장착된 상판이 회전 이동하고, 상기 바이오 DLP 3D 프린팅 장치의 조형 플레이트가 수직 이동하여, 상기 조형 플레이트가 복수의 수조들 중 어느 하나의 수조 내의 바이오 잉크에 침지되는 이동 단계; 침지된 조형 플레이트의 소정 영역에 빛을 조사하여, 조형 플레이트 표면의 바이오 잉크를 경화하는 경화 단계; 및 상기 이동 단계와 경화 단계를 복수 회 반복하는 단계;를 포함한다.

[0022] 상기 인공 자궁 내막 구조체는, 제1 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제1 영역, 제2 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제2 영역, 및 제3 바이오 잉크가 경화되어 형성되는 제3 영역을 포함하고, 상기 제1 영역과 제2 영역은, 수직방향으로 적층된 구조가 아닌, 수평방향으로 연접하도록 형성되며, 상기 제3 영역은, 상기 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되어 연속된 도관 형태를 갖는 것이 바람직하다.

[0023] 상기 제1 바이오 잉크는 자궁내막 줄기세포를 포함하고, 제2 바이오 잉크는 자궁내막 기질세포를 포함하며, 제3 바이오 잉크는 혈관 내피세포를 포함할 수 있다.

[0024] 또한 상기 천연 고분자 하이드로겔 전구체는, 젤라틴, 실크피브로인, 히알루론산, 피브린, 알지네이트, 아가로스, 젤란검, 콜라겐, 키토산 및 탈세포화된 세포외기질 중에서 선택되는 적어도 하나 이상을 포함하고, 광가교 특성을 갖도록 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA); 메타크릴무수물 (methacrylic anhydride: MA); 또는 글리시딜메타크릴레이트와 메타크릴무수물의 중합체와의 반응 결과물인 것이 바람직하다.

[0025] 상기 광개시제는, 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methylether), 디에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 적어도 하나 이상이 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 인공 자궁내막 구조체의 제조 방법은, 연속된 도관 형태를 갖는 제3 영역의 일단으로 세포 배양 유체를 공급하고, 타단으로 세포 배양 유체를 배출하도록 순환 펌프를 작동시켜 세포 배양 유체를 0.2~3ml/min의 속도로 순환시키는 배양 단계;를 추가로 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은, 자궁내막의 구조적이고 생물학적인 특성을 구현할 수 있을 뿐만 아니라, 내부에 기능적인 혈관이 도관의 형태로 매립된 구조체를 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 한번의 작동으로 출력할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 프린팅과 동시에 혈관 내피세포를 하이드로겔 내에 봉입시킴으로써 기존의 구조체 제작 후 관류하는 방식의 단점인 세포 소실을 감소할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 세포를 함유하고, 도관이 매립된 인공 자궁내막 제작방법은 세포와 재료를 달리하거나 설계를 달리하여 다양한 형태의 인공 장기 혹은 조직 구조체를 제작할 수 있다.

[0030] 아울러, 본 발명은 특정 세포와 특정 재료에 제한되지 않고, 바이오 DLP 3D 프린팅 장치 내의 수조 수만큼의 복수 종의 재료 및 세포를 적용할 수 있어, 생체 유사성이 높은 자궁내막 구조체를 제공할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 세포 함유 도관 매립 인공 자궁내막 구조체는, 손상된 자궁내막 조직을 대체하는 이식물로 사용되거나, 자궁내막 질환을 치료하기 위한 약물 테스트 플랫폼으로 제공될 수 있다.

[0032] 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 제조된, 본 발명에 따른 세포 함유 도관매립 인공 자궁내막 구조체를 세포 배양 유체를 새포가 함유된 도관 내로 관류방식으로 공급하여 배양함으로써, 기존의 정적배양과 달리 유체흐름에 의하여 세포에 기계적 자극을 제공할 수 있으며, 역동적인 체내 환경을 유사하게 모사할 수 있다. 이로 인해 본 발명에 따라 제작된 인공 자궁내막 구조체의 활성도를 높여주고, 자궁내막 조직의 표현형을 유지시킬 수 있다.

[0033] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 기존의 내부에 채널이 있는 구조체 제작 과정을 보여주는 개념도이다.

도 2는 본 발명의 실시에 사용되는 바이오 DLP(digital lighting processing) 3D 프린터의 측면 사시도(a)와 윗면 사시도(b)이다.

도 3는 본 발명에서 사용되는 바이오 3D DLP 프린터의 조형 플레이트가 수조 내로 하강 되기 전(a)과 조형 플레이트가 수조 내로 하강한 상태(b)를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 4와 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체의 제조 과정을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체의 윗면과 횡단면을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체의 제조 과정을 순서도로 나타낸 것이다.

도 8은 도 7의 인공 자궁 내막 구조체를 실제 출력한 후, 배관과 연결한 모습을 보여주는 사진이다.

도 9는 본 발명에 사용되는 바이오 잉크 제조 과정 모식도로, 도 9(A)는 광경화성 젤라틴 (GelMAGMA)의 제조 과정을 나타낸 것이고, 도 9(B)는 세포 함유 도관 함침 자궁내막 구조체의 각 영역을 구성하는 제1 내지 제3 바이오 잉크의 제조 과정을 나타낸 것이다.

도 10은 GelMAGMA의 NMR을 통한 methacrylation 피크 확인 결과(A) 및 FT-IR을 통한 관능기 분석 결과(B)이다.

도 11은 GelMAGMA의 농도에 따라 제작된 하이드로겔의 압축강도를 측정한 결과이다.

도 12는 GelMAGMA의 농도에 따라 제작된 하이드로겔이 수용액상에서 부풀어 오르는 정도(도 12(A)) 및 수분 함유 능력(도 12(B))를 측정한 결과이다.

도 13은 GelMAGMA의 농도에 따라 제작된 하이드로겔이 배양액 상에서 시간에 따른 분해도를 측정한 결과이다.

도 14은 20% GelMAGMA으로 제작된 하이드로겔 내에서 자궁내막 줄기세포 및 자궁내막 세포의 생존도 (Live/Dead assay)(도 14(A)), 및 증식도 (CCK-8 assay)(도 14(B))를 관찰한 결과이다.

도 15는 본 발명에 따라 제작된 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체(A)와 다양한 변형 구조(B, C)를 모델링 한 후, 실제 3D 프린팅한 결과물 및 붉은색 물감 퍼퓨전으로 내부가 뚫린 도관의 형성을 확인한 결과이다.

도 16은 본 발명에 따른 세포 함유 도관 매립 인공 자궁내막 구조체 내부의 세포 분포를 관찰한 사진이다.

도 17은 동물실험을 위한 이식용 세포 함유 도관 매립 인공 자궁내막 구조체의 모델링(A)와, 실제 프린팅된 이식용 세포 함유 도관 매립 인공 자궁내막 구조체 및 이의 내부 도관 확인 결과(B)를 보여주며, 도 17(C)는 이식용 구조체의 누드마우스 피하 이식 결과 및 혈관의 유도를 2주 및 4주에 확인한 사진이다(비교예로 세포 함유 내부 도관이 존재하지 않는 인공 자궁내막 구조체를 사용함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 통해 상세히 설명하기에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 밝혀둔다.

[0036] 본 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0037] 본 명세서 전체에서, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “%”는 별도의 언급이 없는 경우에는, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%를 의미한다.

[0038] 각 단계들에 있어 식별부호는 설명의 편의를 위하여 사용되는 것으로 식별부호는 각 단계들의 순서를 설명하는 것이 아니며, 각 단계들은 문맥상 명백하게 특정 순서를 기재하지 않는 이상 명기된 순서와 다르게 실시될 수 있다. 즉, 각 단계들은 명기된 순서와 동일하게 실시될 수도 있고 실질적으로 동시에 실시될 수도 있으며 반대의 순서대로 실시될 수도 있다.

[0039] 이하에서는, 본 발명의 실시예를 구체적으로 살펴본다. 그러나 본 발명의 범주가 이하의 바람직한 실시예에 한정되는 것은 아니며, 당업자라면 본 발명의 권리범위 내에서 본 명세서에 기재된 내용의 여러 가지 변형된 형태를 실시할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시 형태에 따른 세포 함유 도관 함침 인공 자궁내막은, 자궁내막 줄기세포를 포함된, 자유 형상의 제1 영역; 상기 제1 영역과 수평 방향으로 연접하도록 나란히 연결되고, 자궁내막 기질세포를 포함하는 자유 형상의 제2 영역; 및 상기 제1 영역과 제2 영역의 내부에 매립되어, 제1 영역과 제2 영역을 수평 방향으로 동시에 관통하는, 내부가 빈 도관 형태의 제3 영역;을 포함한다. 상기 제3 영역은 혈관 내피세포를 포함한다.

[0042] 이때 상기 제1 영역과 제2 영역의 형태는 특별히 한정되지 않지만, 적어도 하나의 면을 통해 수평방향으로 연접되어 연접면이 존재하고, 제3 영역은 제1영역과 제2 영역 각각의 내부에 매립된 파이프 형태의 내부가 빈 도관 구조를 가지며, 상기 연접면을 통과하는 연속된 구조이며, 일단과 타단이 제1영역 및/또는 제2 영역의 외부로 개구되어 있다.

[0043] 이러한 일정 구조체 내에 파이프 형태의 도관이 매입된 구조는, 종래의 기술에서 언급하였듯이, 도 1에 제시된 것처럼, 3차원 임베디드 바이오프린팅 기법을 통해, 희생재료(sacrificial material)를 출력한 후, 이를 제거함으로써 채널이 있는 구조체를 제작 하는 것이 일반적이었다.

[0044] 하지만, 이러한 방식으로 제조된 매립 도관 구조체의 경우, 구조체 제작 후에 채널 내로 세포를 관류시키는 방

법으로 세포층을 형성시킬 수 있으나 구조체 제작 후 세포 주입을 하는 2단계의 과정을 거쳐야 하므로 번거롭고, 세포의 소실량이 많다는 문제점이 존재한다. 또한, 내부 채널이 혈관으로 사용될 경우, 혈관벽이 없는 단순 채널만을 형성시키게 되는 단점이 존재한다.

[0045] 아울러, 채널이 형성되는 구조체의 재질과 매립된 채널(도관) 내에 형성되는 물질이 서로 다른 두 가지 재료만을 사용할 수 있으며, 세가지 이상의 복수의 재료들이 사용될 경우 과도하게 많은 단계가 반복 수행되거나, 한번에 제작할 수 없다는 문제점이 여전히 존재한다.

[0046] DLP는 DMD(Digital micromirror device) 칩을 이용해 이미지의 고정밀 표시를 구현하는 기술로, 광원으로 digital light projector를 사용하므로, 한층을 한꺼번에 경화할 수 있어 출력시간을 단축시킬 수 있다. 또한 본 발명에서 사용되는 바이오 DLP 3D 프린팅 장치는, 자력으로 탈/부착될 수 있는 복수의 수조; 다중재료의 프린팅이 가능하도록 회전되는 수조 장착 상판; 3D 바이오프린팅 시 오염을 최소화할 수 있는 자동 영점 조절 장치; 및 세포 생존율을 높일 수 있는 온도 조절 장치;를 포함하는 것으로 복수의 바이오잉크를 수평방향으로 쌓아올릴 수 있음은 물론, 수직방향으로 서로 다른 바이오잉크를 배치하는 것도 가능하다.

[0047] 본 발명에서는 조형 플레이트(15)가 결합된 조형 플레이트 연결바(13); 상기 조형 플레이트 연결바(13)를 수직방향으로 승강 및 하강시키는 z축 스크류(18)와 연결된 z축 스텝 모터(19); 상면에 복수의 수조(22)가 탈착 및 부착이 가능하도록 결합되는 수조 고정부를 포함하고, 하부에 회전 기어박스(41)가 연결된 수조 장착 상판(31); 및 상기 수조 장착 상판(31)의 하부에서 선택된 수조(22)를 향해 빛을 조사하는 빔 프로젝터(51);를 포함하는 다중 바이오 잉크를 프린팅할 수 있는 바이오 DLP 3D 프린팅 장치(도 2(a)와 (b) 및 도 3참조)를 사용하여 적어도 3개 이상의 서로 다른 조성을 갖는 바이오 잉크를 한꺼번에 프린팅함으로써, 보다 간편하고 신속하게 인공 자궁내막 구조체를 제조할 수 있다.

[0048] 도 2에 도시된 것과 같이 본 발명의 인공 자궁내막 구조체를 제조하기 위해 사용되는 바이오 DLP(digital lighting processing) 3D 프린팅 장치는, 조형 플레이트 구동부, 로드셀 검출 센서 보드(61), 통합 컨트롤 보드(62) 및 회전용 스텝모터 컨트롤 보드(63)를 포함한다. 상기 조형 플레이트 구동부는, z축 조인트(11), z축 연결 조형 플레이트 바(12), 조형 플레이트 연결바(13), 조형 플레이트 결합 플레이트(14), 조형 플레이트(15), 조형 플레이트 고정 나사(16), 영점 조절용 로드셀 센서(17), z축 스크류(18) 및 z축 스텝 모터(19)를 포함한다.

[0049] 도 2 및 도 3에서 확인되듯이, z축 연결 조형 플레이트 바(12)내에는 미세한 전단 압력을 감지 할 수 있는 로드셀 센서(17)가 내장되고, 조형 플레이트(15)는 결합 플레이트(14)를 통해 상기 z축 연결 조형 플레이트 바(12)에 결합된다. 특히, 영점 조절 과정에서 조형 플레이트(15)와 테플론 필름 및 석영 유리판의 손상을 최소화하고, 보다 정밀한 영점 조절을 위해, 조형 플레이트(15)의 움직임의 속도가 제어될 수 있다.

[0050] 이때 영점 조절 시간을 최소화하기 위해, 조형 플레이트(15)는 수조(22)의 바닥판으로부터 약 1.0cm의 높이까지는 약 6 ~ 8 mm/sec의 속도로 신속하게 하강하다가, 수조(22)의 바닥판으로부터 약 1.0cm의 높이 이내의 높이에서는 조형 플레이트(15)의 하강 속도를 감소시켜(약 2.5 ~ 1.5 mm/sce), 로드셀 센서(17), (테플론) 필름 및 석영 유리판의 손상을 줄이는 것이 바람직하며, 이러한 조형 플레이트의 하강 속도의 조절과 제어는, 통합 컨트롤 보드(62)에서 z축 스텝 모터(19)를 제어하여 z축 스크류(18)의 가감속을 수행하는 것이 더욱 바람직하다.

[0051] 로드셀(17)의 전단 압력의 범위는 0.1 ~ 1g(0.01-0.01N)인 것이 바람직하며, 이러한 로드셀(17)의 전단 압력 범위는 수조의 바닥판에 사용되는 테플론 필름의 종류에 따라 변화될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명에서 사용되는 바이오 DLP(digital lighting processing) 3D 프린팅 장치에 사용되는 복수의 자력 체결 수조(22)는, 바이오 3D 프린팅 공정 중에서 흔히 발생하는 오염을 최소화하고 사용자의 편의성을 높이기 위한 구조를 갖는 것이 바람직하다.

[0053] 도 3에서 확인되듯이, 수조(22)의 하면에는 자성체인 수조 마그네틱(21)이 위치하는데, 상기 수조 마그네틱(21)과 결합되도록 수조 장착 상판(31)에는, 수조 장착용 상판 마그네틱(34)이 위치하게 된다. 이러한 수조 마그네틱(21)과 수조 장착용 상판 마그네틱(34)은 극성을 반대로 하여 최대한 자력을 통한 결합력을 증가시키는 것이 바람직하다. 이때 수조 마그네틱(21)과 상판 마그네틱(34) 사이에는 추가적으로 공차를 두어, 양 마그네틱이 서로 부딪쳐 파손되는 것을 방지할 수 있다. 이러한 자성체를 사용한 자력 고정 결합 방식은, 수조의 고정 및 탈부착이 수월할 뿐만 아니라 기존의 나사 고정 방식에 비해 주변의 오염도를 줄일 수 있다. 또한 기존의 나사 고정 방식이 수조의 평탄도를 유지할 수 없어 정확한 프린팅이 곤란하다는 문제점을 효과적으로 해결할 수 있다.

[0054] 특히 본 발명에서 사용되는 바이오 DLP 3D 프린팅 장치에는, 회전 수조가 장착되는 수조 장착 상판(31)에는 복수의 수조가 장착될 수 있으며, 수조의 크기와 배치를 조절함으로써 5개 이상의 수조들이 장착되는 것도 가능하다. 이렇듯 복수의 탈부착식 수조를 사용하기 때문에, 다양한 바이오 잉크 및 다중 3D 프린팅이 효과적으로 수행될 수 있다.

[0055] 이러한 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 통해 한번에 제조되는 인공 자궁내막 구조체의 경우, 원하는 수의 (세포와 하이드로겔이 혼합된) 바이오잉크를 제조한 후, 복수의 수조 내에 각각 배치한 후, 조형 플레이트(15)가 Z축으로 움직이는 동안에 수조가 회전하여 다중재료를 한 층에 배치시킬 수 있다. 따라서 복수의 바이오 잉크를 준비한 후, 한 번의 바이오 DLP 3D 프린팅 장치의 작동을 통해 세포 함유 도관이 매립된 인공 자궁 내막 구조체를 제조할 수 있다.

[0056] 도 4와 도 5는 이러한 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 세포 함유 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체의 제조 과정을 도식적으로 나타낸 이해도이다. 앞서 언급하였듯이, 세포 함유 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체의 경우, 다중 노즐의 토출(extrusion) 방식의 3D 프린터를 사용하여 제작하는 것도 이론상으로는 가능하지만, 한 층에 3개의 바이오 잉크를 배치하기 위하여는, 노즐이 교대로 움직여야 하며 한 층을 채우기 위하여 붓으로 그리듯이 선단위로 채우면서 움직여야 하므로 많은 시간이 소요된다. 또한 노즐을 통과할 때 세포에게 부여되는 shear stress는 세포의 생존도를 감소시키므로, 본 발명에서는 다중재료를 한번에 출력할 수 있는 바이오 DLP 3D 프린터를 사용하여 전체 구조를 한 번에 출력하는 것이 바람직하다.

[0057] 도 4에서 확인되듯이, 서로 다른 3 종류의 바이오 잉크가 각각의 서로 다른 수조에 배치된 후, 수조가 회전이동하여 목적하는 잉크가 조형 플레이트(15)와 광원 사이에 위치하면, 조형 플레이트(15)는 z방향으로 수직이동하여 목적 잉크에 침지되어 조형층 위치로 위지하고, 이후 UV 광을 조사하여 광경화시킴으로써 원하는 위치에 구조물을 형성할 수 있다.

[0058] 이때, 도 5에 제시된 것처럼, 인공 자궁 내막 구조체를 형성하는, 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역은 각각 서로 다른 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크가 광경화되어 형성되며, 목적하는 위치에만 UV 광을 조사함으로써, 선택적으로 동일 평면 상에서 서로 다른 재질의 구조체를 동시에 형성시킬 수 있으며, 도 6에 제시된 것과 같이 상기 제1 영역과 제2 영역이 적어도 하나의 면을 통해 수평방향으로 연접되고, 제1영역과 제2 영역 각각의 내부에 매립된 파이프 형태의 내부가 빈 도관 구조를 갖는 제3 영역이, 제1 영역과 제2 영역의 연접면을 통과하는 연속된 구조를 제작할 수 있다. 이때 제3 영역의 일단과 타단은 제1영역 및/또는 제2 영역의 외부로 개구되도록 형성될 수 있다.

[0059] 상기 제1 영역과 제2 영역 및 제3 영역에는 각각 서로 다른 세포들이 하이드로겔 내에 포접되어 존재하게 되며, 이들이 구성하는 본 발명에 따른 세포가 포함된 도관 매립 인공 자궁내막 구조체는, 자궁내막 손상에 의한 불임 치료용으로 사용될 수 있다.

[0060] 도 7는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 함유 도관 함침 인공 자궁내막 제조과정을 도시한 순서도이다. 인공 자궁내막 구조체 설계, 바이오잉크 제작 (하이드로겔 전구체 제작, 세포배양, 및 이들의 혼합), 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 통한 출력 단계를 포함하며, 이후 인공 자궁내막 구조체의 제3 영역에 배관을 연결하여 세포 배양 유체를 순환시켜 세포를 배양의 단계;를 추가로 더 포함할 수 있다. 이하에서는 각 단계들에 대해 구체적으로 설명한다.

[0061] 먼저, 세포를 포함하는 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체를 설계하는 단계는, 벽이 존재하고 내부가 빈 도관(제3 영역)과 상기 도관이 들어갈 자리가 추출된 인공 자궁내막 부분(제1 및 제2 영역)을 각각 따로 설계하는 과정을 포함한다. 이러한 구조체를 설계하는 단계에서, 도관의 내경을 임의로 선택할 수 있으나, 1.27, 1.48, 1.64, 1.70, 1.84, 2.1 ㎜ 중 하나의 내경을 갖도록 설계할 수 있다.

[0062] 바이오잉크의 제작 단계는, 광가교될 수 있는 하이드로겔 전구체(hydrogel precursors)와 광개시제 (photo initiator); 및 세포;를 혼합하여 바이오 잉크를 제조하는 과정으로, 제1 영역을 형성하는 제1 바이오 잉크, 제2 영역을 형성하는 제2 바이오 잉크 및 제3 영역을 형성하는 제3 바이오 잉크를 각각 제조할 수 있으며, 제1 내지 제3 바이오 잉크는 포함되는 세포의 종류만이 상이하고, 광가교될 수 있는 하이드로겔 전구체와 광개시제는 동일한 종류를 사용하는 것도 가능하다.

[0063] 상기 하이드로겔 전구체 재료로 젤라틴, 실크피브로인, 히알루론산, 피브린, 알지네이트, 아가로스, 젤란검, 콜라겐, 키토산, 탈세포화된 세포외기질 등의 천연 고분자들 중에서 선택되는 어느 하나가 적용될 수 있으며, 이들이 광가교 될 수 있도록, 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA), 메타크릴무수물

(methacrylic anhydride: MA) 또는 글리시딜메타크릴레이트와 메타크릴무수물이 동시에 중합된 고분자를 사용하는 것이 바람직하다.

[0064] 예를 들어, 천연 고분자로 젤라틴이 사용될 경우, 젤라틴과 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA) 또는 메타크릴무수물 (methacrylic anhydride: MA)를 중합하여 사용할 수 있으며, 도 8(A)에 제시된 것처럼, 젤라틴에 글리시딜메타크릴레이트와 메타크릴무수물을 동시에 중합한 GelMAGMA를 사용하는 것도 가능하다.

[0065] 상기 광개시제로는, 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methylether), 디에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택하여 사용될 수 있으며, 0.3% Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP)를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0066] 상기 세포는 3D 프린팅을 통해 형성하는 부분에 따라 서로 다른 세포가 사용될 수 있는데, 도관 부분인 제3영역을 형성하는 제3 바이오 잉크에는 혈관내피세포(human endothelial cell, HUVEC)가 포함될 수 있고, 도관이 매립되는 자궁내막 부분(제1영역, 제2 영역)에는 자궁내막 줄기세포(endometrial stem cell) 또는 자궁내막 기질세포(endometrial stromal cell)이 포함될 수 있으며, 약 $1x10^7$/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0067] 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여 세포 함유 도관 함침 인공 자궁내막을 출력하는 단계는, 인공 자궁내막 구조체의 제1 내지 제3 영역 각각을 따로 출력하는 것이 아닌 전체 구조를 한번에 출력하는 3차원 바이오프린팅 기법으로 출력될 수 있으며, 본 발명자의 선등록 특허인 다중 세포 및 재료의 프린팅이 가능한, 마그네틱 체결 수조가 포함된 바이오 DLP(digital lighting processing) 3D 프린터(등록특허 제10-2415399호)가 사용될 수 있다.

[0068] 이렇게 출력된 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체는, 제3 영역의 일단과 타단에 순환 펌프와 연결된 배관을 연결하여, 출력된 인공 자궁내막 구조체의 내부로 세포 배양 유체가 순환됨으로써, 혈관 내피 세포가 배양되어 혈관이 형성될 수 있다.

[0069] 인공 자궁내막 구조체의 양단에 순환 펌프와 연결된 배관을 연결할 때(도 8 참조), 주사기 바늘의 외경은 1.27~2.1 mm 중 구조체의 도관 내경과 일치되는 크기의 끝이 뭉툭한 바늘을 선택하되, 도관의 내경과 동일하게 선택하는 것이 바람직하다.

[0070] 상기 순환 펌프를 작동시켜 제 3영역인 도관 부분을 통하여 인공 자궁내막 구조체 내부로 세포 배양 유체를 순환시킬 때, 유체의 순환 속도는 약 0.2-0.3 ml/min의 범위로 조절하는 것이 바람직하며, 순환되는 세포 배양 유체로는, 자궁내막 줄기세포, 자궁내막 기질세포, 및 혈관내피세포에 적합한 배양액이면 특별히 제한되지 않으나, 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)을 사용하는 것이 바람직하다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 바이오 잉크에 포함되는 하이드로겔 전구체 재료로는, 천연 고분자인 젤라틴, 실크피브로인, 히알루론산, 피브린, 알지네이트, 아가로스, 젤란검, 콜라겐, 키토산, 탈세포화된 세포외기질 등 중에서 선택하여 적용할 수 있으나 생체적합성이 높고, 가공이 용이하며, 가격이 상대적으로 낮은 젤라틴을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 하이드로겔 전구체가 광가교될 수 있도록 글리시딜메타크릴레이트 또는 메타크릴무수물을 사용하거나 글리시딜메타크릴레이트와 메타크릴무수물을 동시에 사용할 수 있으나, 글리시딜메타크렐리이트와 메타크릴무수물을 동시에 사용하여 합성하는 것이 바람직하다.

[0072] 도 5(A)는 광가교성 젤라틴 하이드로겔 전구체를 제작하는 과정을 도식적으로 제시하고 있으며, 젤라틴이 용해된 용액에 메타크릴 무수물 (methacrylic anhydride: MA)과 글리시딜메타크렐레이트(glycidyl methacrylate: GMA)를 혼합하여 GelMAGMA 용액을 제조 및 투석하는 단계; 및 GelMAGMA 용액을 동결 건조하여 스펀지를 제조하는 단계;를 포함한다.

[0073] 좀 더 구체적으로 설명하면, 메타크릴무수물과 젤라틴 반응 과정(MA 첨가 후 4시간 교반) 중 젤라틴 상의 아미노 그룹(amino groups)에 메타크릴레이트기가 도입될 수 있으며, 글리시딜메타크릴레이트와의 반응 과정(GMA 첨가 후 24시간 교반) 중 젤라틴 상의 하이드록실기 (OH) 및 카르복실기 (COOH)를 통하여 메타크릴레이트기가 도입 될 수 있는데, 이렇게 젤라틴의 메타크릴레이션을 위한 관능기 활용도 증가로 젤라틴 하이드로겔의 열 안정성 및 기계적 강도가 더욱 증가하게 된다.

[0074] 증류수에서 수행되는 투석과정은, 투석시간이 6일 미만일 경우 GelMAGMA 용액 내 포함된 이온 성분의 제거가 충

분하지 못하여 생체적합성이 저하되거나 프린팅으로 제조된 구조체의 기계적 강도가 저하되고, 투석시간이 8일을 초과하게 되는 경우 시간 초과에 따른 별 다른 장점이나 효과가 존재하지 않으므로 오히려 경제성만이 저하된다. 또한 젤라틴은 상온에서 하이드로겔화되므로 투석시 30도 이상의 온도를 유지하는 것이 바람직하다. 투석된 용액은 미라클로스 (miracloth)에 통과시켜 걸러주고 걸러준 용액은 -80℃ 온도로 약 10 ~ 14시간 동안 동결한 다음, 동결온도와 동일한 온도에서 약 40 ~ 60시간 동안 동결건조 하고 사용시까지 -20° C에 보관한다.

[0075] 도 5(B)는 GelMAGMA 스펀지를 배양액에 녹인 후 광개시제를 투입하여 혼합용액을 제조하고, 각 영역에서 요구되는 세포들을 혼합함으로써 제1 영역 내지 제3 영역을 형성하는 제1 내지 제3 바이오잉크를 제조하는 과정을 보여준다.

[0076] 광개시제로 프리 라디컬계이며 생체적합한 4-(2-히드록시에톡시)페닐-(2-히드록시-2-프로필)케톤 (Irgacure 2959)을 포함한 알파 히드록시알킬페논류 (irgacure 184, Irgacure 651 포함), 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP)와 같은 제 1형 광개시제를 300~400 nm 광원에서 사용할 수 있으며, 가시광선영역 (400~700nm)의 광원을 사용할 경우 에오신 와이(Eosin-Y), 로즈벵갈 (rose bengal), 리보플라빈 (riboflavin vitamin B2)과 같은 제 2형 광개시제를 사용할 수 있다. 그러나 DLP 3D 바이오프린팅시 빠른 출력을 위하여 300-400 nm 파장의 광원과 함께 제 1형 광개시제를 사용하는 것이 바람직하며 0.3% LAP(Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0077] 상기 세포 종류는 특별히 제한되는 것은 아니나, 본 발명에서는 도관 부분(제3 영역)을 형성하는 제1 바이오 잉크에는 혈관 내피 세포(human endothelial cell)가 포함되고, 도관이 매립되는 자궁내막 부분(제1 영역 및 제2 영역)을 형성하는 제1 및 제2 바이오 잉크에는 각각 자궁내막 줄기세포(endometrial stem cell)와 자궁내막 기질세포(endometrial stromal cell)가 포함되는 것이 바람직하며, 생물학적 성질과 인쇄 적합성 등을 고려하여 세포수를 선택하는 것이 바람직하다.

[0078] 본 실시예에서는 각 바이오 잉크 내에 $1x10^7$/ml의 농도로 각 세포들이 바이오 잉크에 혼합되었다.

[0079] 이러한 바이오 잉크를 제조하는 과정은, 조기 광중합을 방지하기 위해 어두운 곳에서 수행되는 것이 바람직하고, 각 시료들은 빛을 차단하기 위해 알루미늄 호일로 덮어 두는 것이 바람직하다. 이와 같은 방법으로 제조된 제1 내지 제3 바이오잉크는 상기 광개시제가 광중합 반응을 개시할 수 있는 파장의 광을 통해 겔화 또는 경화되어 하이드로겔을 형성할 수 있다.

[0080] 본 발명의 바이오잉크에는 GelMAGMA, 세포 배양액 및 광개시제 외에도 바이오 3D 프린팅을 통해 제공하고자 하는 바이오 구조체의 사용 양태 또는 특성에 따라 성장 인자나 약물 등이 유효한 양으로 적절히 더 포함될 수 있다.

[0081] 상기 도관 함침 인공 자궁내막 구조체는 라이노7(Rhino-Rhinoceros3D, Robert McNeel & Associates)프로그램을 사용하여 설계하였다. 제1파트, 제2파트 및 제3파트는 따로 설계하되, 벽이 있고 내부가 빈 도관과 이 도관이 들어갈 자리가 추출된 인공 자궁내막 부분을 고려하여 설계하는 것이 바람직하다.

[0082] 상기 제3 영역인 도관를 설계하는 단계에서, 내경을 임의로 선택할 수 있으나, 1.27, 1.48, 1.64, 1.70, 1.84, 2.1 mm 중 하나의 내경을 갖도록 설계하여 배관 연결시 하이드로겔 부분에 상용화된 주사 바늘이 사용될 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

[0083] 앞서 도 8과 관련하여 설명하였듯이, 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체를 배양하기 위해, 인공 자궁내막 구조체의 제3 영역의 일단과 타단에 순환 펌프와 연결된 배관을 연결하고, 순환 펌프를 작동시켜 도관 부분을 통하여 인공 자궁내막 구조체 내부로 세포 배양 유체를 순환시켜 줄 수 있다.

[0084] 상기 세포 배양 유체로는, 혈관내피세포 배양을 위해서 배관 내에는 혈관내피세포용 배지: EGM™-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit™(Lonza, cat. CC-3156) 배지를 사용하고, 인공 자궁내막 구조체에는 자궁내막 줄기세포와 기질세포 배양액인 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)을 사용하는 것이 바람직하다.

[0085] 이하에서는 이상의 설명한 내용을 제조예와 실험예를 통해 보다 상세하게 설명하고자 한다. 다만, 이러한 설명은 본 발명을 좀 더 쉽게 이해할 수 있도록 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아님을 밝혀둔다.

[0087] **[제조예 1] 바이오잉크 및 하이드로겔 제작**

[0088] 먼저 7.5g의 젤라틴(type A, 300 bloom, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 50℃의 증류수 250 ml에 넣고 600 rpm으로 교반하여 녹여 3%(w/v)의 젤라틴 수용액을 얻었다. 젤라틴이 완전히 녹은 젤라틴 수용액에 0.5 mL/min의 속도로 7 mL의 메타크릴무수물 (Methacrylic anhydride, MA, Sigma-Aldrich)를 용액에 떨어뜨린 후, 교반하여 4시간 동안 반응시켰다. 이후 0.5 mL/min의 속도로 10 mL의 글리시딜메타크릴레이트 (Glycidyl methacrylate, GMA, Sigma-Aldrich)를 추가로 공급하여 50℃에서 24시간 동안 교반하면서 반응을 수행하였다.

[0089] 반응 결과물을 12-14 kDA cutoff 투석 튜브에 넣고, 40℃ 증류수에서 7일간 침지시켜 불순물을 제거하는 투석 단계를 거쳤으며, 3회씩 증류수를 교체하였다.

[0090] 투석된 용액은 미라클로스(miracloth)에 통과시켜 걸러주고, 걸러준 용액을 -80℃에서 10-14시간 동안 동결하고, 동일한 온도에서 약 40-60시간 동안 동결건조하여 GelMAGMA 스펀지를 제조하였다.

[0091] 바이오 DLP 3D 프린터를 이용하여 하이드로겔을 제작하기 위하여, 증류수에 광개시제인 LAP를 0.3%(w/v) 녹인 후, 여기에 앞서 제조된 GelMAGMA 스폰지를 녹여 20%의 GelMAGMA 용액을 제조하였다. 이하에서 언급되는 20%(w/v) GelMAGMA 용액은, 특별한 언급이 없어도 광개시제인 LAP가 포함된 20%(w/v) GelMAGMA 용액임을 미리 밝혀둔다.

[0092] 단, 세포를 포함하는 바이오 잉크를 제조할 때에는, 광개시제은 LAP를 배양액에 0.3%(w/v)의 농도로 미리 포함시킨 후, 여기에 GelMAGMA 스폰지를 떼어 20%(w/v) GelMAGMA 용액을 제조하였다.

[0093] 이렇게 제조된 20%(w/v) GelMAGMA 용액을 60℃에서 30분 동안 저온 멸균한 후, $1x10^7$/ml의 농도로 자궁내막 줄기세포(endometrial stem cell), 자궁내막 기질세포(endometrial stromal cell) 및 혈관 내피세포(human endothelial cells, HUVEC)를 각각 별도로 혼합하여 제1 내지 제3 바이오 잉크를 제조하였다.

[0094] 바이오 DLP 3D 프린터의 프린팅 조건은 한 층당 두께(thickness)는 100 μm, 한 층당 가교시간 (curing time) 3s, 베이스 층 수 (Base layer) 3, 베이스 층 가교시간 (Base curing) 3s, 버퍼링 층 수(Buffer layer) 4의 값으로 설정하였다.

[0096] **[실험예 1] NMR 및 FT-IR 측정**

[0097] 제조예 1에서 제조된 GelMAGMA가, 세포를 함유하는 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체 제조에 적합한 바이오잉크 재료인지 여부를 확인하기 위하여, Gelatin, GelMA 및 GelGMA와 함께 물성을 NMR와 FT-IR로 확인하였다.

[0098] 먼저 GelMAGMA 중합체의 광가교사이트 도입 여부를 확인하기 위하여 1H NMR 스펙트럼을 측정하였다. GelMAGMA 중합체 0.5mg을 700㎕ 듀테륨 용매(D2O, Sigma-Aldrich)에 용해시키고, 0.45㎛ 크기의 필터로 여과한 후, 1H-NMR 장치(JNM-ECZ400s/L1, JEOL USA, 400 MHz)로 분석하였으며, 결과를 도 10(A)에 나타내었다.

[0099] GelMA, GelGMA에 비하여 GelMAGMA가 메타크릴레이트 그룹 내의 프로톤 통합 강도가 높았으며, 이는 GelMAGMA의 메타크릴레이트 그룹 밀도가 다른 비교예에 비하여 높음을 의미한다. 따라서 GelMAGMA에 빛을 조사하였을 때 가교도가 훨씬 증진될 것으로 예측된다.

[0100] 또한 GelMAGMA 중합체에서 젤라틴의 변형 여부 확인을 위하여, 소량의 샘플을 포타슘브로마이드(KBr)와 함께 분쇄하여 제작하여 FT-IR 분석을 시행하였고 그 결과를 도 10(B)에 나타내었다. 젤라틴의 amide I (1645 cm^{-1}), II(1513cm^{-1}), III(1229cm^{-1}) 피크가 모든 그룹에서 확인되었다.

[0102] **[실험예 2] GelMAGMA 하이드로겔의 압축강도**

[0103] GelMAGMA 하이드로겔의 기계적 강도를 평가하기 위해, 일반 DLP printer를 사용하여 지름 11.2㎜, 높이 10㎜의 원기둥 형태의 시료 구조체를 GelMAGMA의 농도별(10, 15, 20%)로 제작하였다. 10kg 로드셀을 이용하여 유니버설 테스팅머신(QM100S, QMESYS, Korea)를 통해 각 시료 구조체의 압축강도를 측정하였으며(압축속도 = 5㎜/min) 샘플이 파손될 때까지 진행하였다.

[0104] 이렇게 측정된 압축강도 결과는 각각 도 11의 (A)와 (B)에 나타내었다. 도 11(A)는 변형율에 따른 압축응력

(compressive stress) 측정한 결과이고, 도 11(B)는 압축강도 (compressive strength)를 나타낸다. GelMAGMA의 농도가 증가함에 따라 압축응력과 압축강도 모두 증가하였다.

[0106] **[실험예 3] GelMAGMA 하이드로겔의 함수량**

[0107] GelMAGMA하이드로젤의 함수량 및 팽창도를 평가하기 위해, 일반 DLP printer를 사용하여 지름 10㎜, 높이 3㎜의 원기둥 형태의 시료 구조체를 GelMAGMA의 농도별(10, 15, 20%)로 제작하였다. 함수량의 경우 각 시료 구조체를 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS, pH=7.4)에 넣어 딥프리저에서 24시간 동안 얼린 후, 4일간 동결 건조 하였고, 건조된 하이드로겔을 EGM2 배양액과 증류수(DW)에 넣어 48시간 동안 30분 마다 무게를 재어 함수량을 측정하였다.

[0108] 또한 팽창도 측정을 위하여 프린팅된 시료 구조체를 EGM2 배양액과 증류수에 넣어 48시간 동안 30분마다 가로 세로 길이를 재어 초기 크기와 비교하였으며, 도 12에 측정 결과를 정리하였다.

[0109] 함수율 (도 12(A))과 팽창률 (도 12(B)) 모두 GelMAGMA의 농도가 낮을수록 높아졌으며, 재료와 용매 사이의 삼투압의 차이가 큰 증류수에서 더 높은 값을 보였다. 이는 GelMAGMA하이드로젤의 농도가 함수량 및 팽창도에 미치는 영향을 보여준다.

[0111] **[실험예 4] GelMAGMA 하이드로겔의 분해도**

[0112] GelMAGMA 하이드로겔의 분해도를 평가하기 위해, 일반 DLP printer를 사용하여 가로 10㎜, 세로 10㎜, 높이 3㎜의 원기둥 형태의 시료 구조체를 제작하였다. 이때 GelMAGMA의 농도별(10, 15, 20%)로 제작하였으며 비교군으로 GelGMA와 GelMA를 동일한 농도별(10, 15, 20%)로 제작하여 비교하였다. 프린팅 조건은 제조예 1과 같다.

[0113] 각 시료 구조체를 배양액 5㎖가 담긴 튜브에 넣고 28일 동안 shaking incubator(37℃, 75 rpm)에서 배양시키면서 3일에 한번씩 배양액을 교체해주었다. 매 분석시간 마다 샘플을 DW에 헹군 후 동결건조 하였고, 초기 무게 대비 손실된 무게를 백분율로 환산해 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0114] GelMAGMA, GelMA, GelGMA 순서로 분해속도가 느렸으며 각 그룹별로 20%, 15%, 10%의 순서로 분해속도가 느렸다. 이로부터 농도와 가교도가 높을수록 기계적 강도가 높아지고 수분을 덜 함유하게 되면서, 분해도가 느려짐을 확인할 수 있었다.

[0116] **[실험예 5] GelMAGMA 하이드로겔의 세포 적합성**

[0117] 자궁내막 줄기세포와 자궁내막 기질세포(CCD-986sk)는 가천대학교에서 제공받았으며, DMEM/F-12 (Welgene), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin streptomycine (PS) 용액으로 구성된 성장배지에서 배양시켰다. 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하면서 배지는 3일마다 교체하였다. 각 세포들은 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 분리하였으며, LUNA II 자동 세포 계수기(Logos Biosystems, Anyang, Korea)를 사용하여 계수하였다.

[0118] 먼저 DMEM/F-12 용액을 사용하여 0.3% (w/v) LAP의 개시제를 포함하는 수용액을 제조한 후, 여기에 GelMAGMA 스펀지를 투입하여 20%(w/v) GelMAGMA 용액을 제작하였다. 이를 60℃에서 30분 동안 저온멸균 한 후 1×10^7 cells/mL 농도의 각 세포를 고르게 혼합하여 바이오잉크를 완성하였다.

[0119] 이를 바이오 DLP 3D 프린터를 사용하여 가로 5㎜, 세로 5㎜, 높이 2㎜의 하이드로겔을 출력하였으며, 인쇄된 구조물은 표준 세포 배양조건(37℃, 5% CO_2)에서 DMEM/F-12 (Welgene), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin streptomycine (PS) 용액으로 구성된 성장배지에서 7일간 배양하며 세포 적합성을 평가하였다.

[0120] 도 14(A)는 Live/dead assay kit(Life Technoogies, USA)를 사용하여 하이드로겔 내에서 세포의 생존도를 분석한 결과이다. 제조사의 프로토콜에 따라 2㎛M EthD-1과 0.5㎛M의 CalceinAM 용액을 각 세포가 로딩된 하이드로겔에 30분 동안 상온에서 배양하였고, 컨포칼현미경(K1-fluo, NanoscopeSystems, Korea)을 사용하여 관찰하였다. 두 세포 모두 하이드로겔 내에서 죽은 세포(빨간색)는 거의 발견되지 않았으며 살아있는 세포(녹색)가 시간에 따라 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0121] 또한 세포 증식률은 Cell Counting Kit-8 assay (CCK-8; EnzoBiochem, NY, USA)를 사용하여 출력된 하이드로겔

에 배지와 CCK-8 용액이 9:1로 혼합된 용액을 처리한 후 인큐베이터에서 4시간 동안 반응시켰다. 흡광도는 마이크로플레이트 리더 (BioTek, Santa Clara, CA, USA)로 450㎚에서 측정되었으며, 그 결과를 도 14(B)에 정리하였다.

[0123] **[제조예 2] 세포 함유 도관이 함침된 인공 자궁내막 구조체 제작**

[0124] 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체를 제조하기 위해, 제1 바이오 잉크, 제2 바이오 잉크 및 제3 바이오 잉크를 제조한 후, 각각 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 제작하기 위해 도 2와 3에 제시된 바이오 DLP 3D 프린팅 장치를 사용하여, 도 4 및 5의 과정을 거쳐 도 6의 인공 자궁내막 구조체를 제조하였다.

[0125] 먼저 제1 바이오 잉크가 배치된 제1 수조에 조형플레이트가 수직 이동하여 침지된 후, 제1 영역이 형성될 영역에만 UV 광이 조사되어, 조형플레이트의 표면에서 제1 바이오 잉크가 경화된다(제1 경화 단계). 이후 조형플레이트가 위쪽으로 이동한 후, 바이오 잉크들이 배치된 수조가 회전 이동하여 제2 바이오 잉크가 배치된 제2 수조가 조형플레이트 아래로 위치한다. 이후 조형플레이트가 이동하여 제2 수조 내의 제2 바이오 잉크 내에 침지된 후, 제2 영역이 형성될 영역으로만 UV 관을 조사하여 제2 바이오 잉크가 조형플레이트의 표면에서 경화된다(제2 경화 단계).

[0126] 제2 바이오 잉크가 경화되어 제2 영역이 조형플레이트 상에 형성된 후, 조형플레이트는 다시 위쪽으로 이동하게 되고, 수조가 회전하여 제3 바이오 잉크가 배치된 제3 수조가 조형플레이트의 아래쪽으로 이동한다. 경화된 제1 영역 및 제2 영역이 형성된 조형플레이트는 제3 수조 내의 제3 바이오 잉크로 수직 하강하여 침지된 후, UV 광이 제3 영역이 형성될 부위에만 조사되어 제3 바이오 잉크가 경화되어 제3 영역을 형성하게 된다(제3 경화 단계).

[0127] 이러한 제1 내지 제3 경화 단계가 반복됨으로써, 세포 함유 도관이 함침된 인공 자궁내막 구조체를 인쇄할 수 있게 된다. 상기 제1 내지 제3 경화 단계는 출력하고자 하는 구조체의 형태와 배치에 따라 적절하게 변화될 수 있으며, 예를 들어 동일한 높이에 서로 다른 두 개의 인쇄층만이 존재하는 경우(즉, 제1 영역과 제2 영역만 존재하는 경우) 제3 경화단계를 생략하고, 제1 경화단계와 제2 경화단계만 반복하여 수행될 수 있으며, 동일한 높이에 서로 다른 세 종류의 인쇄층이 존재할 경우, 제1 내지 제3 경화 단계가 차례로 수행될 수 있다.

[0128] 구체적이고 예시적인 실시 형태로 제1 바이오 잉크와 제2 바이오 잉크에 포함되는 자궁내막 줄기세포와 자궁내막 기질세포는 실험예 5와 동일한 조건에서 배양하였으며, 제3 바이오 잉크에 포함되는 HUVEC (ATCC, USA)는 150㎜ 0.1% 젤라틴 코팅 용기에서 EGM™-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit™(Lonza, cat. CC-3156) 배지로 배양하였다. 이렇게 배양된 세포들은 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 탈착시켰다.

[0129] 제1 영역을 형성하는 제1 바이오 잉크와 제2 영역을 형성하는 제2 바이오 잉크를 제조하기 위해, DMEM/F-12 배양액에 광개시제를 혼합하여 0.3%(w/v) LAP 용액을 제조한 후, LAP 용액에, 제조예 1에서 제조된 GelMAGMA 스펀지를 혼합하여 20%의 GelMAGMA 용액을 제조하였다. 이를 60℃에서 30분 동안 저온 멸균한 후, 자궁내막 줄기세포와 자궁내막 기질세포를 각각 $1x10^7$/ml 씩 혼합하여 제1 바이오 잉크와 제2 바이오 잉크를 제조하였다.

[0130] 제3 바이오 잉크의 경우에는 EGM-2 배양액을 사용하는 것과 세포가 혈관 내피 세포인 점을 제외하고는, 제1 및 제2 바이오 잉크의 제조 방법과 동일한 방법으로 제조하였다.

[0131] 이러한 제1 내지 제3의 바이오 잉크들을, 다중재료의 인쇄가 가능한 바이오 DLP 3D 프린터인 NBR Tech, Ltd. KOREA의 바이오 3D DLP 프린터를 사용하여 출력함으로써, 본 발명에 따른 세포가 함유된 도관 매립 인공 자궁내막 구조체를 제조하였다.

[0132] 좀 더 구체적으로 설명하면, 상기 인공 자궁내막 구조체는 라이노7(Rhino-Rhinoceros3D, Robert McNeel & Associates)프로그램을 사용하여 설계되었으며, 다중재료 출력이 가능하도록, 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 각각 별도로 설계하였다. 즉 벽이 있고 내부가 빈 도관과 상기 도관이 들어갈 자리가 추출된 인공 자궁 내막 부분을 고려하여 설계하였으며, 각 설계도를 결합하면, 도 6에 제시된 구조를 얻을 수 있다.

[0133] 상기 도 6의 인공 자궁 내막 구조체는, 자궁내막 줄기세포를 포함하는 자유 형상의 제1 영역(파란색); 상기 제1 영역 구조체와 나란히 연결되며 자궁내막 기질세포를 포함하는 자유 형상의 제2 영역(빨간색); 및 상기 제1 영역과 제2 영역을 수평 방향으로 동시에 관통하고, 혈관 내피세포를 포함하면서, 벽이 있고 내부가 빈 도관 형상을 갖는 제3 영역(노란색);을 포함한다.

[0134] 이후 제1 영역과 제2 영역 및 제3 영역의 3D 모델을 3D 프린팅이 가능한 포맷인 STL(stereolithography)형식의 파일로 변환하였다. 변환된 STL파일을 3D프린터에 로딩해 준 후, 구동 프로그램 상에서 제1 수조와 제1 영역의 STL파일, 제2 수조와 제2 영역의 STL파일 및 제3 수조와 제3 영역의 STL파일을 각각 연동시켰다.

[0135] 다음으로 바이오 DLP 3D 프린터 내의 제1 내지 제3 수조에 각각 제1 내지 제3 바이오 잉크를 각각 채운 후, 출력을 준비하였다. 프린팅 작업이 시작되면 슬라이싱 된 한 층에 해당되는 이미지를 출력시키기 위해, 각 영역별 STL파일 정보가 번갈아가며 프린터로 전달되는데, 이때 조형 플레이트를 중심으로 제1 내지 제3 수조가 STL파일의 변화에 따라 회전하게 된다.

[0136] 한편 조형 플레이트는 Z축 수직방향으로 이동하면서 한 층 쌓일 때마다 UV가 조사되어 가교하는 과정이 반복되며(도 3 내지 5 참조), 인쇄된 하이드로젤은 최종 멸균된 PBS로 세척되었다.

[0137] 제3 영역인 도관의 내경은 18G 주사 바늘 외경에 해당하는 1.27㎜가 되도록 설계되여, 인쇄 후 세포 배양을 위해 배관을 연결할 때 하이드로겔 부분에 상용화된 18G 주사 바늘을 꽂을 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

[0138] 본 발명에 따른 인공 자궁 내막 구조체의 구체적인 프린팅을 위한 조건은 아래의 표 1과 같다.

표 1

[0139]

설정 항목	층 두께(Layer thickness)	전체층 개수(Layer number)	바닥면 노출시간(Bottom exposure time)	일반 노출 시간(Normal exposure time)	조형 플레이트 상승 시간(Lift up time)	조형 플레이트 하강 시간(Lift down time)
설정값	100㎛	26	5 sec	5 sec	2 sec	2 sec

[0140] 각 층의 두께는 100㎛, 전체층 수는 26이며, 실제 3개의 수조를 회전시키면서 조형 플레이트 상에 총 69회(도관 49회, 도관 윗부분 10회, 도관 아랫부분 10회)의 가교 과정을 거쳤으며 약 50분이 소요되었다. 도 15에는 본 발명에 따른 인공 자궁 내막 구조체의 3D 프린팅 결과(도 15(A)) 및 그 외 다양한 모델들의 출력 결과를 나타내었으며(도 15(B) 및 (C)), 구조체 내부에 매립된 도관으로 붉은색 물감을 관류시켜 도관의 한쪽 끝에서 나머지 한쪽 끝으로 물감이 잘 통과되는 것을 확인하였다.

[0142] **[실험예 6] 세포 함유 도관 함침 인공 자궁내막 구조체 내 세포분배도**

[0143] 세포 함유 도관이 함침된 인공 자궁내막 구조체 내에서 세포 분배도를 확인하기 위하여, 제1 영역을 형성하는 제1 바이오 잉크 내의 자궁내막 줄기세포를 PKH26(적색)으로 라벨링하였고, 제2 영역을 형성하는 제2 바이오 잉크에 포함된 자궁내막 기질세포를 PKH67(녹색)으로 라벨링한 후, 바이오잉크를 각각 제조하여 제조예 2의 방법으로 바이오 프린팅 과정을 수행하였다.

[0144] 출력물은 표준 세포 배양조건(37℃, 5% CO2)에서 EGM-2 배양액으로 배양하였으며, 인공 자궁내막 구조체 내의 세포 분배도를 형광현미경으로 확인하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0145] 전반적으로 고른 세포 분배를 보였고, 제1 영역에서는 적색위주의 형광이, 제2 영역에서는 녹색위주의 형광이 관찰되었으며, 이는 본 발명에 따른 인공 자궁내막 구조체가 실제 자궁내막의 특성을 잘 구현하고 있음을 의미한다.

[0146]

[0147] **[제조예 3] 세포가 함유된 도관이 매립된 인공 자궁 내막 구조체의 배양**

[0148] 제조예 2에서 제작된 인공 자궁내막 구조체의 제3 영역의 양단에 순환 펌프와 연결된 배관을 연결하였다. 이때 제3 영역을 구성하는 도관의 내경과 주사기 바늘의 외경이 같도록 선택하였으며, 이때 사용된 주사 바늘은 18G (바늘 외경 1.27 ㎜)의 상용화된 주사 바늘을 선택하였다.

[0149] 순환 펌프를 작동시켜 제3 영역인 도관 부분을 통하여 인공 자궁내막 구조체 내부로 순환되는 세포 배양 유체는 0.2-0.3 ㎖/min의 속도로, working time 45분, resting time 90분의 과정으로 수행되었다. 이때 순환되는 세포 배양 유체로는, 혈관 내피세포의 배양에 사용되었던 EGM™-2를 사용하였고, 인공 자궁 내막 구조체 전체를 배양하는 배양액으로는 자궁내막 줄기세포, 자궁내막 기질세포에 성장 배지인 10% FBS, 1% PS가 함유된 DMEM/F-12을

사용하였다.

[0150] 인공 자궁 내막 구조체를 넣는 케이스는 폴리젯 프린터와 의료용 레진을 이용하여 제작하였고, 인공 자궁 내막 구조체를 케이스 내에 넣은 후 배관을 연결하였으며(도 8 참조), 도관의 일단에서 타단으로 유체가 완전히 통과하는 것을 확인하였다.

[0152] **[실험예 7] 세포 함유 도관 함침 인공 자궁내막 구조체 피하이식**

[0153] 0.3% LAP가 포함된 DMEM/F-12 기반의 수용액을 사용하여 20%(w/v) GelMAGMA를 제조한 후, PKH26(적색)과 PKH67(녹색)로 각각 표지된 자궁 내막 줄기세포 또는 자궁 내막 기질세포 $1x10^7$ cells/ml를 혼합하여 제1 및 제2 바이오잉크를 제작하였다.

[0154] 이를 사용하여 도 17(A)의 상판(제1 영역)과 하판(제2 영역)을 프린팅하되, 0.3%의 LAP가 포함된 EGM-2 기반으로 제조된 20%(w/v) GelMAGMA를 $1x10^7$ cells/ml 혈관내피세포와 혼합하여 제3 바이오잉크를 사용하여 도 17(A)의 모델의 중간에 도관의 형태로 제3 영역이 위치하도록 한번에 프린팅 하였다.

[0155] 도 17(B)는 이러한 모델 구조를 실제 동물 실험을 위해 출력한 후, 그 외관과 물감 퍼퓨전을 통해 도관 형성 구조를 확인 결과이다. 이러한 본 발명의 도관이 매립된 인공 자궁 내막 구조체의 비교예로 제3 영역(도관)이 없는 구조체를 제작하였으며, 실제 동물 실험을 수행하였다.

[0156] 동물 실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회(IACUC No. Hallym 22-046, Korea)승인을 받았으며, 8주령의 수컷 누드마우스(BALB/c-nu Slc)를 마취시켜 양쪽 등 측면에 실시예와 비교예 각 1개씩 총 2개를 피하 이식하였다(도 17(C)의 왼쪽 그림 참조).

[0157] 이식 후 2주 및 4주 후에 쥐의 피부를 절개하여 관찰하였으며, 본 발명에 따른 혈관내피세포를 포함하는 도관이 매립된 인공 자궁내막 구조체를 이식한 그룹이, 매립된 도관이 존재하지 않는 그룹에 비해 더 많은 혈관이 구조체 내부로 유입된 것을 확인할 수 있었다(도 17(C)의 오른쪽 사진 참조).

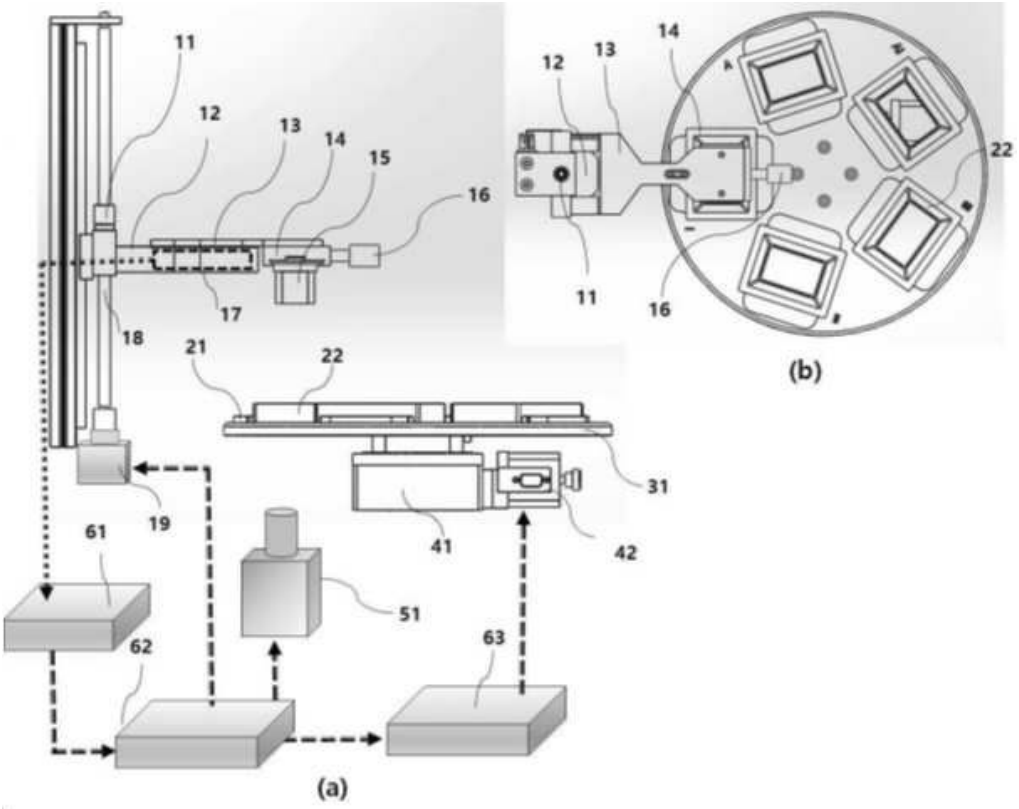
[0158] 본 발명은 상술한 특정의 실시예 및 설명에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변형 실시가 가능하며, 그와 같은 변형은 본 발명의 보호 범위 내에 있게 된다.

도면

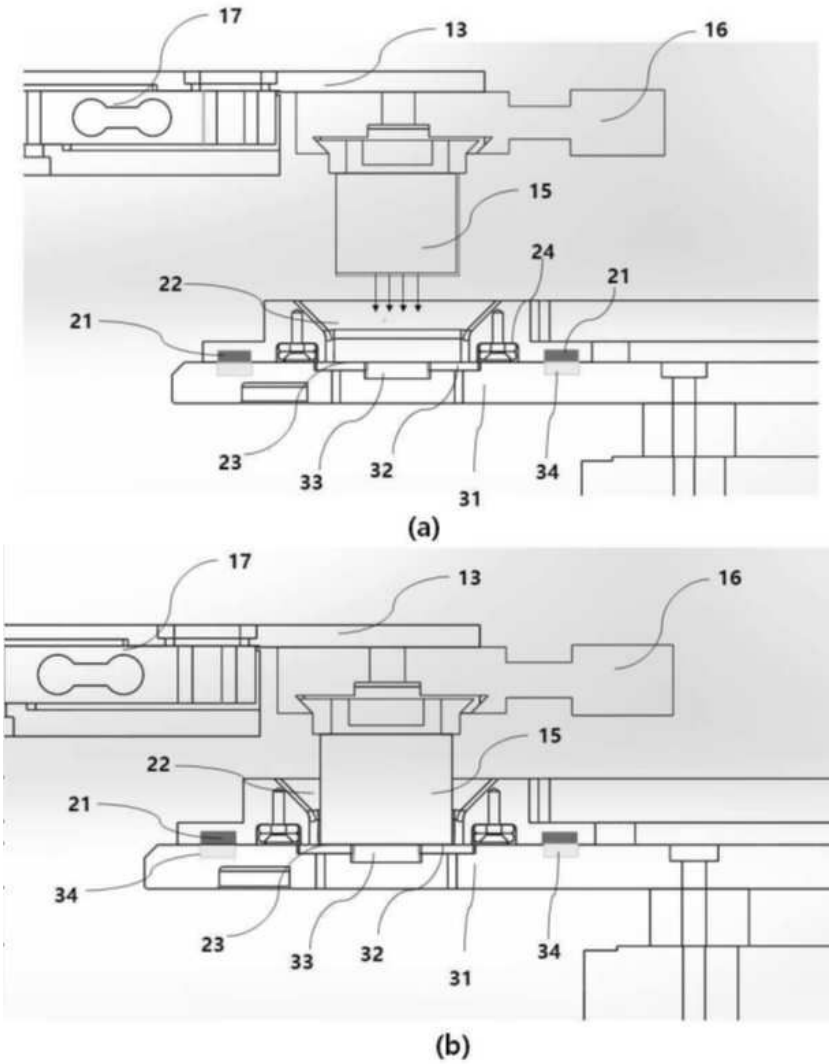
도면1



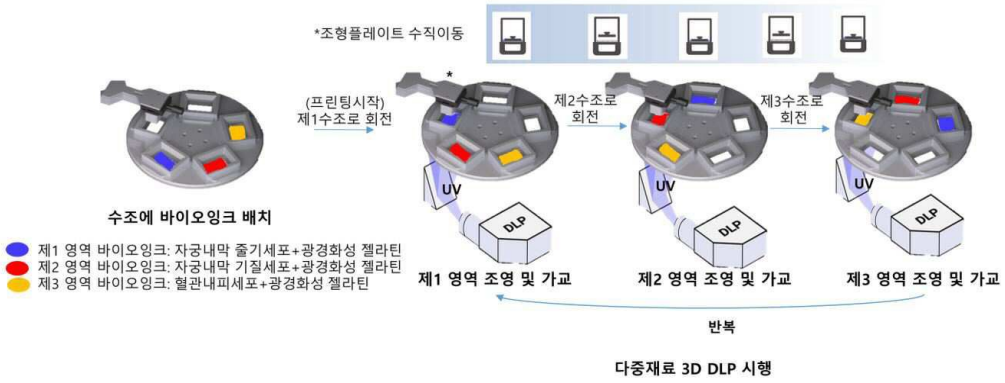
도면2


11
12
13
14
15
16
17
18
21
22
19
61
62
51
63
41
42
31
(a)
12
13
14
22
11
16
(b)

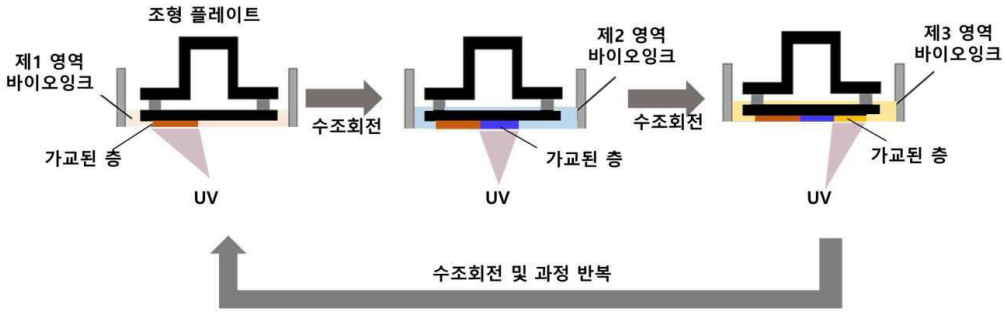
도면3


17
13
16
15
24
22
21
21
23
33
32
31
34
(a)
17
13
16
15
22
21
34
23
33
32
31
34
(b)

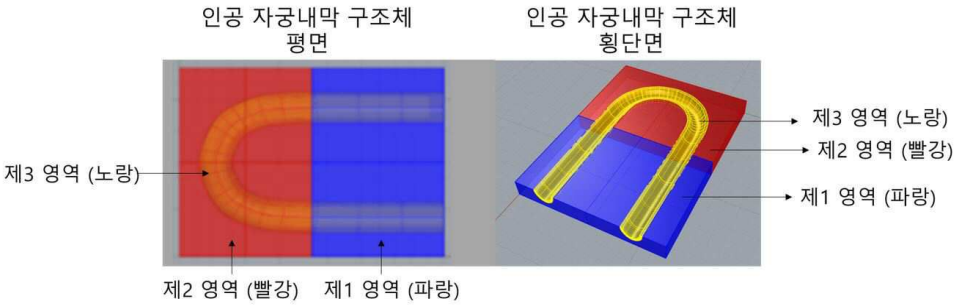
도면4


*조형플레이트 수직이동
(프린팅시작)
제1수조로 회전
제2수조로
회전
제3수조로
회전
UV
DLP
수조에 바이오잉크 배치
제1 영역 바이오잉크: 자궁내막 줄기세포+광경화성 젤라틴
제2 영역 바이오잉크: 자궁내막 기질세포+광경화성 젤라틴
제3 영역 바이오잉크: 혈관내피세포+광경화성 젤라틴
제1 영역 조영 및 가교
제2 영역 조영 및 가교
제3 영역 조영 및 가교
반복
다중재료 3D DLP 시행

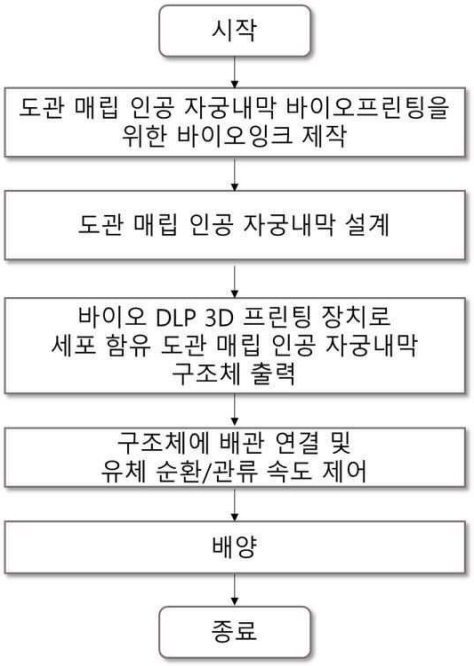
도면5


조형 플레이트
제1 영역
바이오잉크
가교된 층
UV
수조회전
제2 영역
바이오잉크
가교된 층
UV
수조회전
제3 영역
바이오잉크
가교된 층
UV
수조회전 및 과정 반복

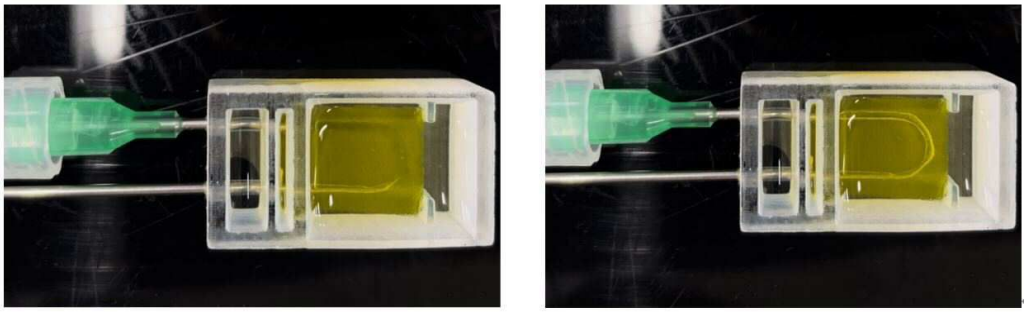
도면6


인공 자궁내막 구조체
평면
인공 자궁내막 구조체
횡단면
제3 영역 (노랑)
제2 영역 (빨강)
제1 영역 (파랑)
제3 영역 (노랑)
제2 영역 (빨강)
제1 영역 (파랑)

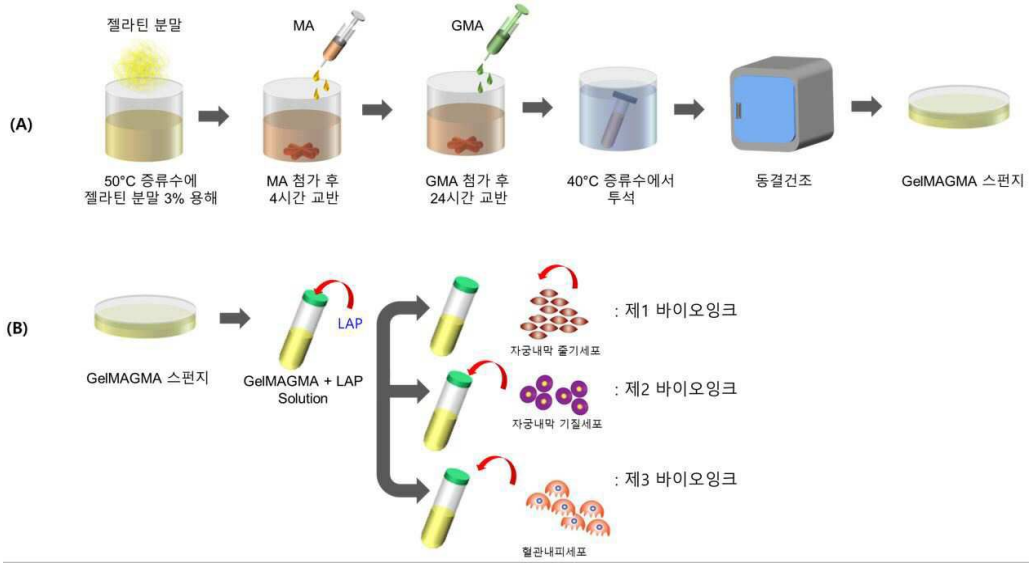
도면7


시작
도관 매립 인공 자궁내막 바이오프린팅을 위한 바이오잉크 제작
도관 매립 인공 자궁내막 설계
바이오 DLP 3D 프린팅 장치로 세포 함유 도관 매립 인공 자궁내막 구조체 출력
구조체에 배관 연결 및 유체 순환/관류 속도 제어
배양
종료

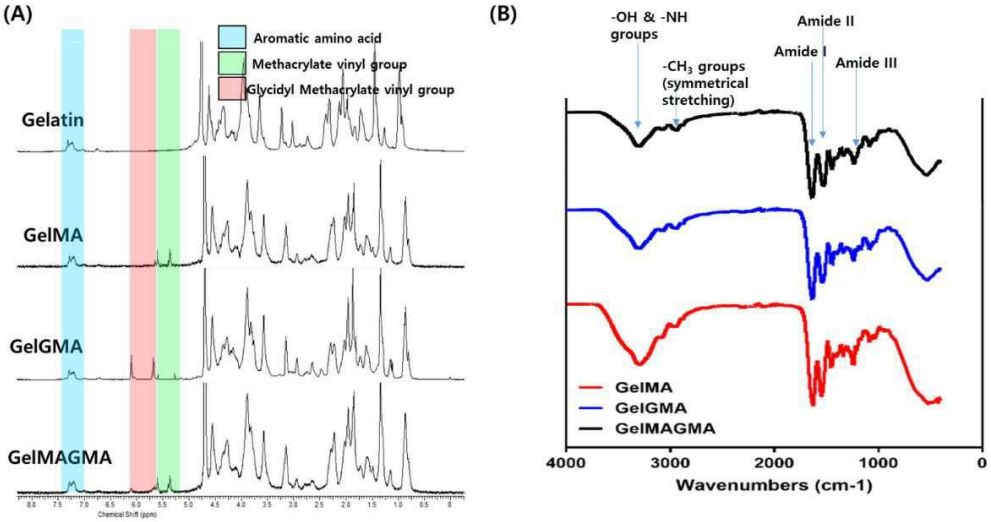
도면8



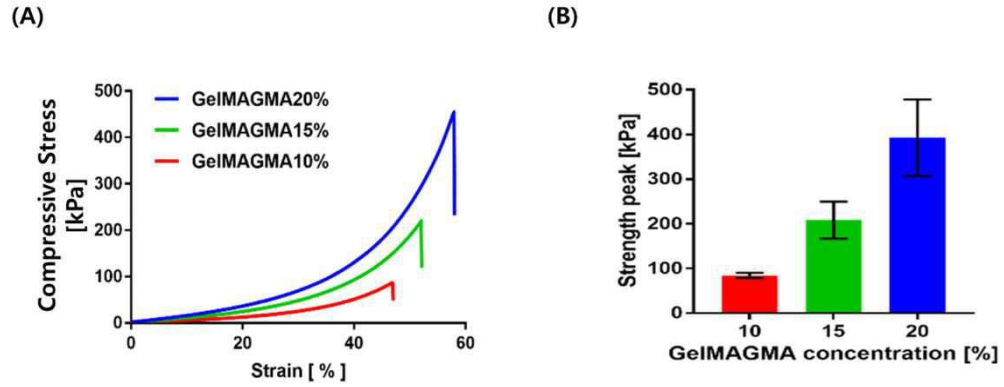
도면9


(A)
젤라틴 분말
MA
GMA
50°C 증류수에
젤라틴 분말 3% 용해
MA 첨가 후
4시간 교반
GMA 첨가 후
24시간 교반
40°C 증류수에서
투석
동결건조
GelMAGMA 스펀지
(B)
GelMAGMA 스펀지
LAP
GelMAGMA + LAP
Solution
자궁내막 줄기세포
: 제1 바이오잉크
자궁내막 기질세포
: 제2 바이오잉크
혈관내피세포
: 제3 바이오잉크

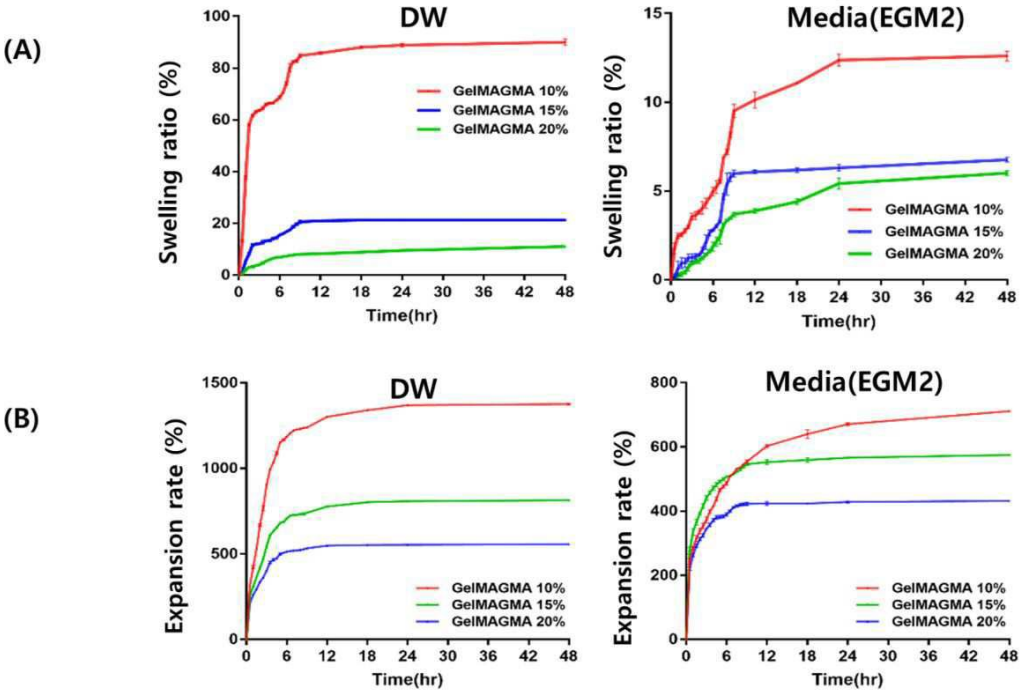
도면10


(A)
Aromatic amino acid
Methacrylate vinyl group
Glycidyl Methacrylate vinyl group
Gelatin
GelMA
GelGMA
GelMAGMA
(B)
-OH & -NH
groups
-CH3 groups
(symmetrical
stretching)
Amide II
Amide I
Amide III
GelMA
GelGMA
GelMAGMA
4000
3000
2000
1000
0
Wavenumbers (cm-1)

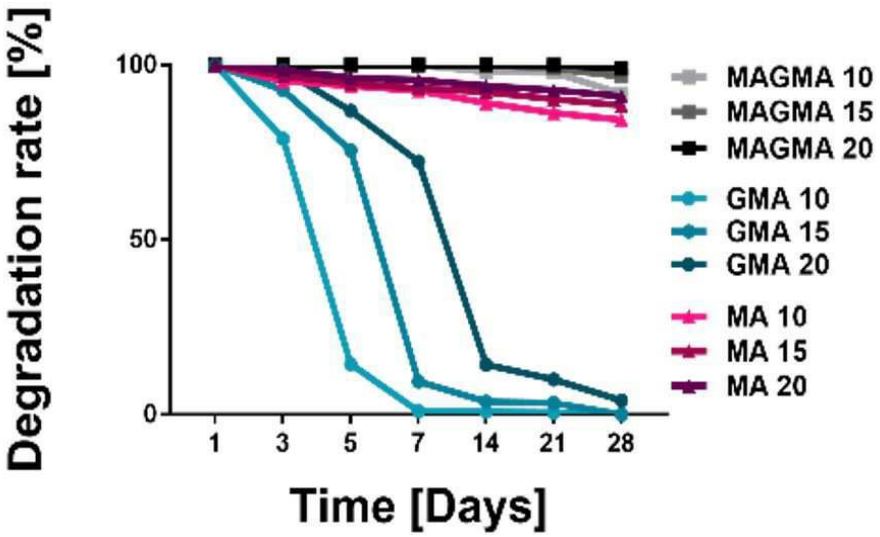
도면11


(A)
(B)
Compressive Stress [kPa]
GelMAGMA20%
GelMAGMA15%
GelMAGMA10%
Strain [%]
Strength peak [kPa]
GelMAGMA concentration [%]

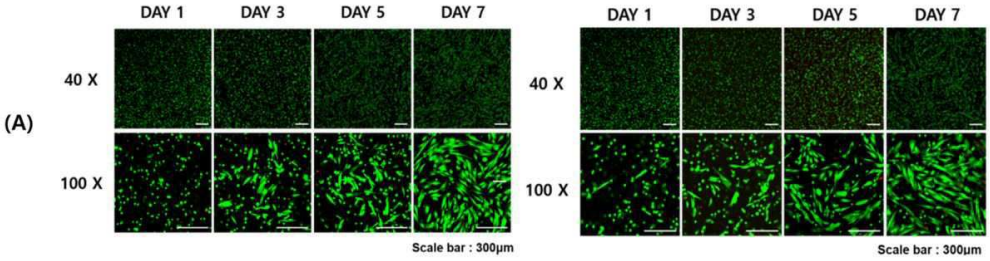
도면12

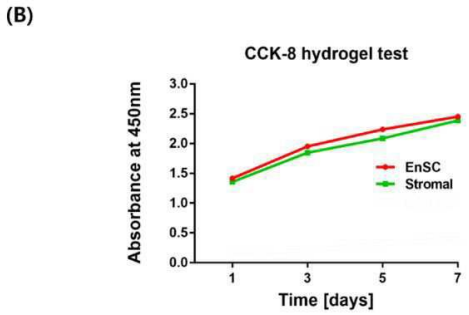

(A)
(B)
DW
Media(EGM2)
Swelling ratio (%)
Expansion rate (%)
Time(hr)
GelMAGMA 10%
GelMAGMA 15%
GelMAGMA 20%

도면13

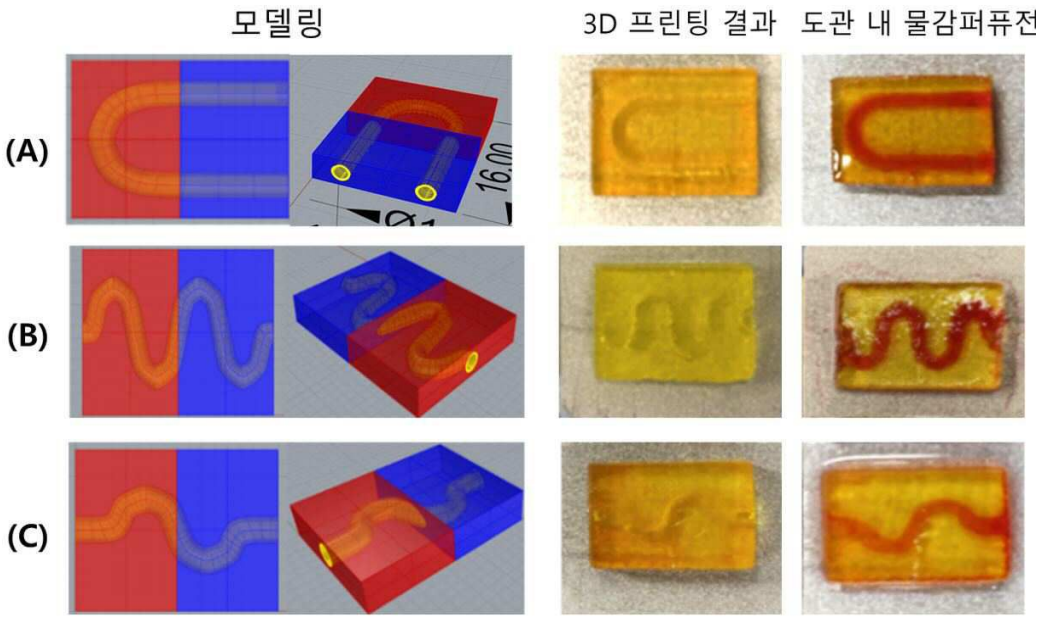

Degradation rate [%]
100
50
0
1
3
5
7
14
21
28
Time [Days]
MAGMA 10
MAGMA 15
MAGMA 20
GMA 10
GMA 15
GMA 20
MA 10
MA 15
MA 20

도면14

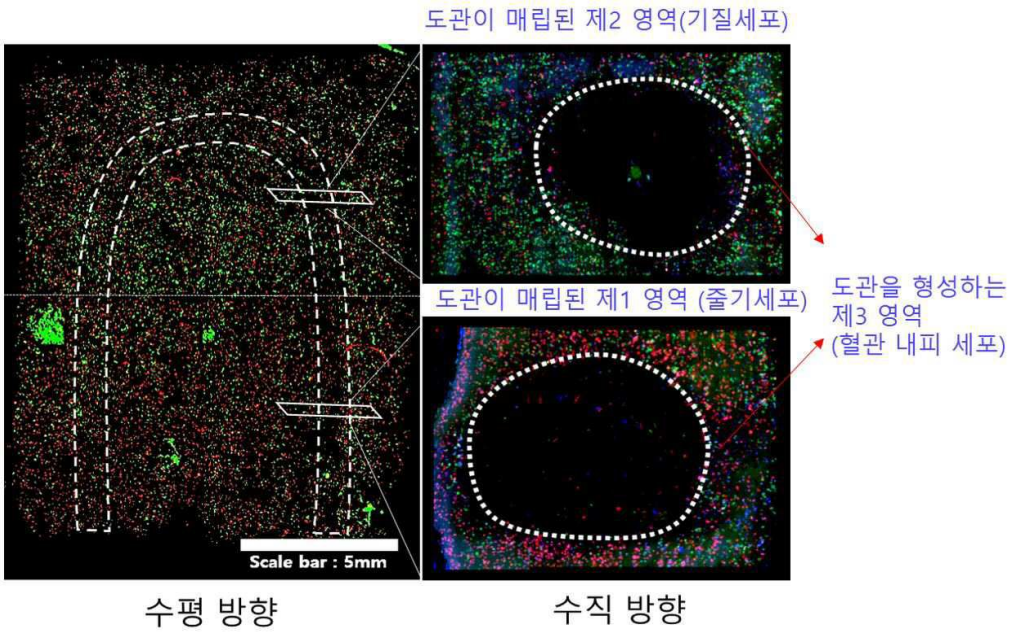

(A)
DAY 1
DAY 3
DAY 5
DAY 7
40 X
100 X
Scale bar : 300μm
자궁내막 줄기세포 (EnSC)
자궁내막 기질세포 (Stromal)


(B)
CCK-8 hydrogel test
Absorbance at 450nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
3
5
7
Time [days]
EnSC
Stromal

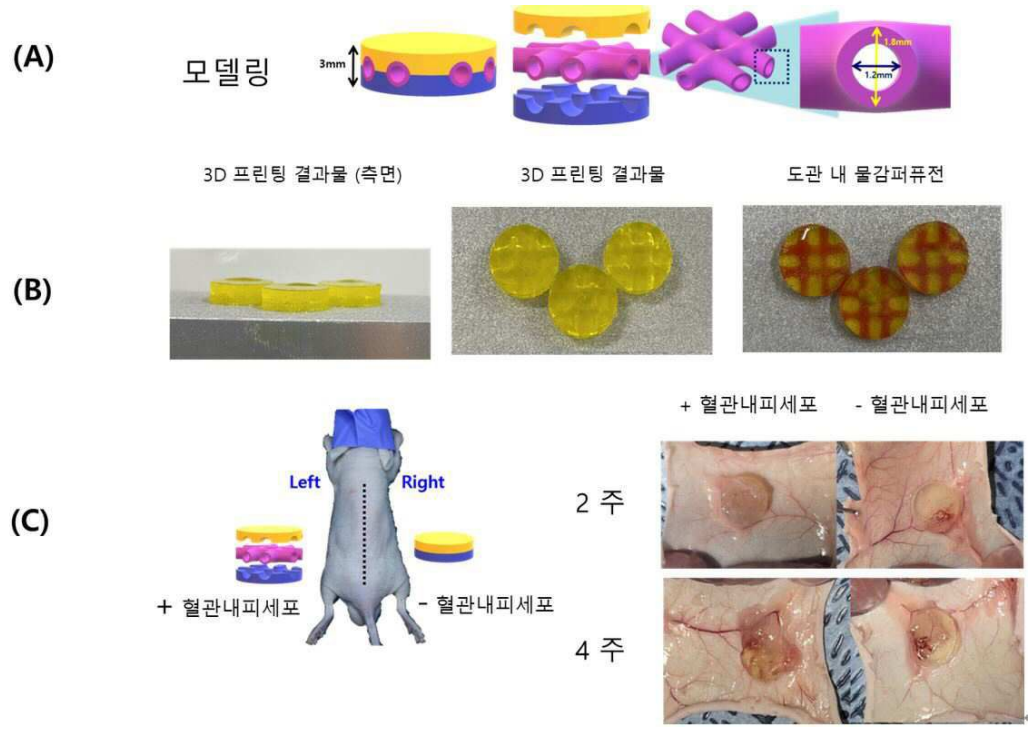
도면15


모델링
3D 프린팅 결과
도관 내 물감퍼퓨전
(A)
(B)
(C)
16.00

도면16


도관이 매립된 제2 영역(기질세포)
도관이 매립된 제1 영역 (줄기세포)
도관을 형성하는
제3 영역
(혈관 내피 세포)
Scale bar : 5mm
수평 방향
수직 방향

도면17


(A)
모델링
3mm
1.8mm
1.2mm
(B)
3D 프린팅 결과물 (측면)
3D 프린팅 결과물
도관 내 물감퍼퓨전
(C)
Left
Right
+ 혈관내피세포
- 혈관내피세포
+ 혈관내피세포
- 혈관내피세포
2 주
4 주