

(11) 공개번호 10-2025-0074753
(43) 공개일자 2025년 05월 28일

(71) **출원인**
한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
성균관대학교 산학협력단
 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) **발명자**
진옥
 경기도 남양주시 별내5로 81, 3107동 1902호 (별내동, 남양주 별내 스위첸 아파트)

윤도진
 서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
 (뒷면에 계속)

(74) **대리인**
특허법인 본

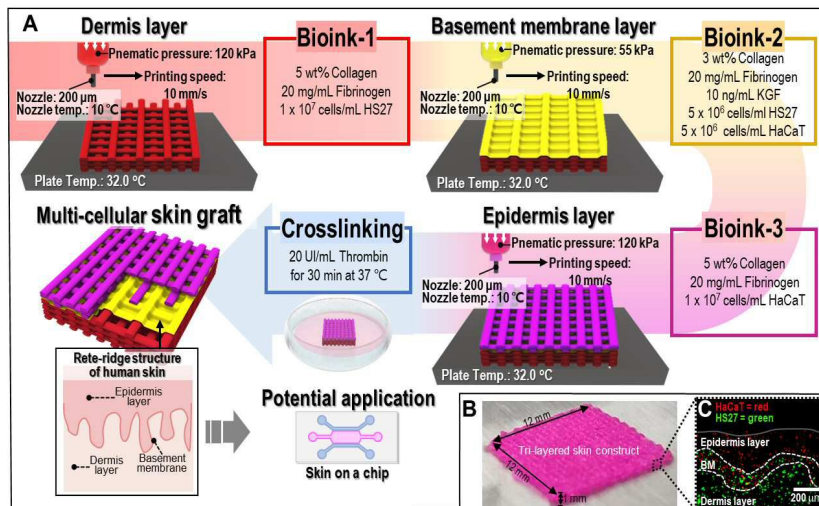
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법 및 이에 의해 제조된 인공 피부 조직**

(57) 요약

본 발명은 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용하되, 고점도의 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 이용하여 진피층 및 표피층을 제작하고, 각질세포 성장인자를 함유한 저점도의 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 진피층 및 표피층 사이에 기저막층을 제작하여 진피층, 기저막층 및 표피층으로 구성된 인공 피부 구조체를 제공하며, 인체 피부의 구조를 모사하기 위해 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크의 점성 및 성장인자, 바이오프린팅 조건들을 조절하여, 모굴구조의 기저막층을 포함한 인공 피부 구조체를 제작하는 것을 목적으로 한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 2502/094 (2013.01)
C12N 2502/1323 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)
C12N 2533/56 (2013.01)

(72) 발명자

김근형

경기도 성남시 분당구 구미로186번길 19 (구미동, 동서프라임빌)

김원진

경기도 수원시 화산로 187번길 30-3, 202호

채수정

경기도 수원시 권선구 금곡로 197번길 18-20, 수원 호매실동광뷰엘 423호

조서율

경기도 수원시 장안구 율전로 108번길 9, 율전 미주타운 709호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000421
과제번호	2022-ER1305-01
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	국가보건의료연구인프라구축
연구과제명	피부조직 3차원 바이오프린팅 및 비임상 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐 및 피브리노겐을 혼합하여 바이오잉크를 제조하는, 바이오잉크 제조 단계; 및

상기 바이오잉크를 이용해 진피층, 기저막층 및 표피층의 3개 층을 프린팅하여 피부 구조체를 형성하는, 피부 구조체 제조 단계;를 포함하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오잉크 제조 단계는

콜라겐(Collagen)을 증류수에 용해시키는, 콜라겐 용액 제조 단계;

피브리노겐을 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에 용해시키는, 피브리노겐 용액 제조 단계; 및

콜라겐 용액 및 피브리노겐 용액을 혼합하는, 혼합 단계;를 포함하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 콜라겐 용액 제조 단계에서 콜라겐은 돼지 피부에서 추출한 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 피브리노겐 용액 제조 단계에서 피브리노겐은 소 혈장에서 추출한 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 바이오잉크 제조 단계는

콜라겐, 피브리노겐 및 섬유아세포를 혼합하는 제1 바이오잉크 제조 단계;

콜라겐, 피브리노겐, 각질세포 성장인자, 섬유아세포 및 각질세포를 혼합하는 제2 바이오잉크 제조 단계; 및

콜라겐, 피브리노겐 및 각질세포를 혼합하는 제3 바이오잉크 제조 단계;를 포함하고,

상기 피부 구조체 제조 단계는

제1 바이오잉크를 이용하여 진피층을 프린팅하는, 진피층 제조 단계;

상기 진피층 상부에 제2 바이오잉크를 이용하여 진피층의 굴곡에 따라 얇은 막 형태의 기저막층을 프린팅하는, 기저막층 제조 단계;

상기 기저막층 상부에 제3 바이오잉크를 이용하여 표피층을 프린팅하는, 표피층 제조 단계; 및

상기 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는, 가교 결합 단계;를 포함하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제1 바이오잉크는 콜라겐 용액 4 내지 6 wt%, 피브리노겐 용액 17 내지 23mg/mL 및 섬유아세포 1×10^6 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 제2 바이오잉크는 콜라겐 용액 2 내지 4 wt%, 피브리노겐 용액 17 내지 23mg/mL, 섬유아세포 0.5×10^6 내지 0.5×10^8 세포/mL, 각질세포 0.5×10^6 내지 0.5×10^8 세포/mL 및 각질세포 성장인자 9 내지 11 ng/mL을 혼합하여 제조된 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 제3 바이오잉크는 콜라겐 용액 4 내지 6 wt%, 피브리노겐 용액 17 내지 23mg/mL 및 각질세포 1×10^6 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 진피층 제조 단계는

직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 가로배열 적층 단계;

상기 가로배열 적층 구조 위에 직경 100 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및

상기 세로배열 적층 구조 위에 너비 100 내지 $200\mu\text{m}$, 높이 200 내지 $300\mu\text{m}$ 의 필러(Pillar)를 $700\mu\text{m}$ 내지 $850\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 필러 적층 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 기저막층 제조 단계에서 얇은 막 형태의 기저막층은 진피층의 필러(Pillar)를 따라 굴곡진 형태로 되어 있는 모굴(Mogul) 구조인 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 표피층 제조 단계는

파동 모양의 굴곡진 형태인 기저막층 상단의 움푹 들어간 골 부분마다 너비 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, 높이 $200\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 의 필러(Pillar)를 $700\mu\text{m}$ 내지 $850\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층하는, 표피층 필러 적층 단계;

직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및

상기 세로배열 적층 구조 위에 직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 가로배열 적층 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항에 있어서,

상기 지지대(Strut)는 직경 100 내지 200 μ m인 원형 기둥 구조체이며, 상기 필러(Pillar)는 너비 100 내지 200 μ m, 높이 200 내지 300 μ m인 타원 모양의 기둥 구조체인 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 13

제5항에 있어서,

상기 가교 결합 단계는 35 내지 40℃ 환경에서 트롬빈(Tr) 용액 15 내지 25 UI/mL에 피부 구조체를 방치하여 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는 것을 특징으로 하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법.

청구항 14

제1항의 인공 피부조직 제조방법에 의해 제조된 인공 피부조직 등가물.

청구항 15

제14항의 인공 피부조직을 포함하는 동물대체 시험법의 시료물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법 및 이에 의해 제조된 인공 피부조직에 관한 것으로, 구체적으로는 고점도의 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 이용하여 진피층 및 표피층을 제작하고, 각질세포 성장인자를 함유한 저점도의 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 진피층 및 표피층 사이에 기저막층을 제작하여 진피층, 기저막층 및 표피층으로 구성된 인공 피부 구조체를 제공하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법 및 이에 의해 제조된 인공 피부조직에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체 체표면 전체를 덮고 있는 가장 큰 장기로서 체온 조절과 외부 환경에 대한 장벽으로의 기능 등 다양한 기능을 가지고 있으며, 성인의 경우 그 면적이 약 1.2 내지 2.3m²에 이른다. 피부는 표피(epidermis)와 진피(dermis)로 구성되어 있으며, 진피층은 콜라겐(collagen)과 섬유아세포(fibroblast)로 이루어져 있고, 표피층은 케라틴 세포와 멜라닌 형성 세포 등으로 구성되어 있다. 비교적 일률적인 두께를 가지는 표피층에 비해, 진피층의 두께는 부위에 따라 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있으나 표피의 약 3배의 두께를 가지는 것으로 알려져 있다.

[0003] 표피층은 기저막, 유극층, 과립층 및 각질층으로 계층화되어 있어 피부 표면에는 최종 분화된 죽은 세포가 여러 겹으로 쌓여 보호막 기능을 수행하게 된다. 기저막은 제4형 콜라겐 lattice에 라미닌 및 여러 세포외기질이 침착된 얇은 막 형태로 기저층의 세포가 부착하고 있으며, 상처가 나면 기저막의 분해가 동반되어 기저층의 세포가 진피의 제1형 콜라겐과 접하게 되며, 이때 표피 세포가 측면으로 이동하여 재상피화(reepithelialization)가 유도된다.

[0004] 진피층은 섬유아세포가 풍부하고 미세 혈관이 분포하는 유두층(papillary dermis)와 두꺼운 콜라겐 섬유가 풍부한 세망 결합 조직(reticular dermis)으로 구성되어 있다. 모낭 및 여러 피부 부속 기관은 진피 깊숙이 위치하고 있어, 부분층 피부손상(partial thickness wound)처럼 표피층이 소실된 경우에도 모낭에서부터 표피세포가 자라 나와서 재상피화를 유도하게 된다.

[0005] 한편, 인공적으로 피부조직을 구성하고자 하는 시도가 있으며, 이러한 인공피부는 일반적으로 자가 세포에 의한 재생능력을 상실한 피부손상이나, 피부 궤양 또는 의약품이나 화장품의 독성 및 효능 실험 등에 사용된다. 인공 피부는 손상된 인간의 피부를 대체할 수 있는 피부 대용품으로써 피부 치료나 이를 위한 의약품 개발 또는 피부와 접촉하는 의료기기, 생활필수품, 화장품 등의 독성 및 효능을 시험하기 위한 실험 재료로 매우 중요하다.

- [0006] 인공피부(Artificial skin)는 피부 세포와 피부 구성 물질인 콜라겐, 엘라스틴 등을 이용하여 피부 구조를 재구성한 것으로서, 살아있는 섬유아세포와 각질형성세포를 이용하여 실제피부와 유사한 구조적, 기능적 특성을 나타내기 때문에 피부 모사체(Skin equivalent 또는 Reconstructed skin)라고도 불린다.
- [0007] 1980년대 초반 최초의 사람 피부 모사체가 보고된 이후로 다양한 체외 피부 모델이 개발되고 상업화되어 왔지만 이 모델들 대부분은 섬유아세포 및 각질세포에 기반을 두고 사람 상피만을 모방한 정적인 배양시스템을 채용했다.
- [0008] 한편, 3D 바이오 프린팅은 세포 및 기타 생체 적합성 물질을 결합하여 자연 조직 특성을 최대한 모방하는 생체 의학 부품을 제작하는 기술이다. 일반적으로 생체 조직과 유사한 구조를 만들기 위해 바이오잉크를 출력 및 적층 하여 제조한다. 바이오잉크는 3차원 가공을 위한 물리적 성질과 세포가 목적된 기능을 수행하게 하기 위한 생물학적 환경을 제공하며, 우수한 세포 친화성을 가지는 소재이다. 이러한 삼차원 바이오 프린팅을 통해 제조된 생체 의학 부품은 해부학적으로 및 기능적으로 생체 조직과 동일한 특성을 가져야 한다.
- [0009] 특히, 인체의 기저막은 표피능(Rete-ridge)라 불리는 다방향으로 굴곡진 특이 구조를 가지고 있다. 하지만 현재 제작되고 있는 인공 피부 구조체들은 대부분 동결 건조된 단순 스펀지 형태이거나 진피층 및 표피층만으로 이루어진 형태를 보이고 있다.
- [0010] 이러한 제작방식은 구조체 내부의 기공 구조의 섬세한 조절이 부족하여 세포 및 영양분의 투과 및 혈관 침투가 어려우며, 인체 피부조직의 진피층, 기저막 및 표피층으로 이루어진 복합구조를 완벽히 모사하는 데에 어려움을 가지고 있고, 인체의 피부 기저막은 표피능(Rete-ridge)이라 불리는 다방향으로 굴곡진 특유의 형태를 띠는데 이러한 형태를 모사한 연구는 미미한 실정이다.

선행기술문헌

- [0011] 대한민국 공개특허공보 제10-2023-0079777호(공개일 2023.06.07.)
- [0012] 대한민국 등록특허공보 제10-2010215호(공고일 2019.08.12.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 인체 피부의 구조를 모사하기 위해 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크의 점성 및 성장인자, 바이오프린팅 조건들을 조절하여, 모굴구조의 기저막층을 포함한 인공 피부 구조체를 제작하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 콜라겐 및 피브리노겐을 혼합하여 바이오잉크를 제조하는, 바이오잉크 제조 단계; 및 상기 바이오잉크를 이용해 진피층, 기저막층 및 표피층의 3개 층을 프린팅하여 피부 구조체를 형성하는, 피부 구조체 제조 단계;를 포함하는 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 상기 바이오잉크 제조 단계는 콜라겐(Collagen)을 증류수에 용해시키는, 콜라겐 용액 제조 단계; 피브리노겐을 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에 용해시키는, 피브리노겐 용액 제조 단계; 및 콜라겐 용액 및 피브리노겐 용액을 혼합하는, 혼합 단계;를 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 콜라겐 용액 제조 단계에서 콜라겐은 돼지 피부에서 추출한 것일 수 있다.
- [0018] 상기 피브리노겐 용액 제조 단계에서 피브리노겐은 소 혈장에서 추출한 것일 수 있다.
- [0019] 상기 바이오잉크 제조 단계는 콜라겐, 피브리노겐 및 섬유아세포를 혼합하는 제1 바이오잉크 제조 단계; 콜라겐, 피브리노겐, 각질세포 성장인자, 섬유아세포 및 각질세포를 혼합하는 제2 바이오잉크 제조 단계; 콜라겐, 피브리노겐 및 각질세포를 혼합하는 제3 바이오잉크 제조 단계;를 포함하고, 상기 피부 구조체 제조 단계는

제1 바이오잉크를 이용하여 진피층을 프린팅하는, 진피층 제조 단계; 상기 진피층 상부에 제2 바이오잉크를 이용하여 진피층의 굴곡에 따라 얇은 막 형태의 기저막층을 프린팅하는, 기저막층 제조 단계; 상기 기저막층 상부에 제3 바이오잉크를 이용하여 표피층을 프린팅하는, 표피층 제조 단계; 및 상기 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는, 가교 결합 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 상기 제1 바이오잉크는 콜라겐 용액 4wt% 내지 6wt%, 피브리노겐 용액 17mg/mL 내지 23mg/mL 및 섬유아세포 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것일 수 있다.

[0021] 상기 제2 바이오잉크는 콜라겐 용액 2wt% 내지 4wt%, 피브리노겐 용액 17 mg/mL 내지 23mg/mL, 섬유아세포 0.5×10^6 세포/mL 내지 0.5×10^8 세포/mL, 각질세포 0.5×10^6 세포/mL 내지 0.5×10^8 세포/mL 및 각질세포 성장인자 9ng/mL 내지 11ng/mL을 혼합하여 제조된 것일 수 있다.

[0022] 상기 제3 바이오잉크는 콜라겐 용액 4 wt% 내지 6wt%, 피브리노겐 용액 17mg/mL 내지 23mg/mL 및 각질세포 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것일 수 있다.

[0023] 상기 진피층 제조 단계는 직경 100 μ m 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 가로배열 적층 단계; 상기 가로배열 적층 구조 위에 직경 100 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및 상기 세로배열 적층 구조 위에 너비 100 내지 200 μ m, 높이 200 내지 300 μ m의 필러(Pillar)를 700 μ m 내지 850 μ m간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 필러 적층 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 상기 기저막층 제조 단계에서 얇은 막 형태의 기저막층은 진피층의 필러(Pillar)를 따라 굴곡진 형태로 되어 있는 모굴(Mogul) 구조인 것일 수 있다.

[0025] 상기 표피층 제조 단계는 파동 모양의 굴곡진 형태인 기저막층 상단의 움푹 들어간 골 부분마다 너비 100 μ m 내지 200 μ m, 높이 200 μ m 내지 300 μ m의 필러(Pillar)를 700 μ m 내지 850 μ m간격으로 가로배열 적층하는, 표피층 필러 적층 단계; 직경 100 μ m 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및 상기 세로배열 적층 구조 위에 직경 100 μ m 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 가로배열 적층 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 상기 지지대(Strut)는 직경 100 μ m 내지 200 μ m인 원형 기둥 구조체이며, 상기 필러(Pillar)는 너비 100 내지 200 μ m, 높이 200 내지 300 μ m인 타원 모양의 기둥 구조체인 것일 수 있다.

[0027] 상기 가교 결합 단계는 35 내지 40 $^{\circ}$ C 환경에서 트롬빈(Tr) 용액 15 내지 25 UI/mL에 피부 구조체를 방치하여 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한, 인공 피부조직 제조방법에 의해 제조된 인공 피부조직 등가물을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한, 인공 피부조직을 포함하는 동물대체 시험법의 시료물을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 인체 내 존재하는 단백질인 콜라겐 및 피브리노겐을 바이오잉크로 활용하여 생체적합성을 추구하였으며, 바이오잉크의 점도 및 바이오프린팅 조건을 조절하여 인체 피부의 복합적인 구조를 모방한 인공 피부 구조체를 제작했기에 사람과 유사한 인공 피부를 제조할 수 있다.

[0031] 또한, 섬유아세포와 각질세포를 활용한 기술로 인공 피부 구조체를 제작함으로써 세포 활동 및 피부 관련 유전자의 발현 등 인체 내에서 나타나는 생리활동을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은, 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조 단계를 나타낸다.

도 2는, 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크 제조 단계를 나타낸다.

도 3은, 바이오잉크를 이용한 피부 구조체 제작 순서도를 나타낸다.

도 4는, 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 이용한 인공 피부 구조체 제작 공정을 모식도로 나타낸다.

도 5는, 온도, 전단응력, 주파수 및 항복응력에 따른 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다.

도 6은, 바이오잉크 내 섬유아세포 및 각질세포의 생존/사멸 염색 실험 결과를 나타낸다.

도 7은, 바이오잉크 내 섬유아세포의 세포 독성 실험 결과를 나타낸다.

도 8은, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 광학 이미지를 나타낸다.

도 9는, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 지지대(Strut) 두께 및 기공 크기 분석 결과를 나타낸다.

도 10은, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 인체적성 평가 결과를 나타낸다.

도 11은, 노즐의 직경 및 프린팅 시 적용되는 압력에 따른 토출 안정성 평가 및 세포 생존도 평가 결과를 나타낸다.

도 12는, 인공 피부 구조체의 기저막층 모굴 구조 제작 공정을 모식도로 나타낸다.

도 13은, 인공 피부 구조체의 기저막층 모굴 구조를 모사하기 위한 저점도 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다.

도 14는, 기저막층의 광학 이미지 및 세포 염색 이미지 결과를 나타낸다.

도 15는, 각 그룹별 인공 피부 구조체 제작 시 기저막층에 대한 최적의 모굴 구조 형성 테스트 수행을 위한 광학 이미지 및 세포 염색 이미지 결과를 나타낸다.

도 16은, 배양된 인공 피부 구조체의 기계적 특성 평가 결과를 나타낸다.

도 17은, 배양된 인공 피부 구조체의 유전자 발현 평가 결과를 나타낸다.

도 18은, 인공 피부 구조체의 진피층, 기저막층 및 표피층의 구조를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크 및 3D 프린팅 기술을 이용한 인공 피부 구조체 제조 과정

[0035] 도 1에 나타난 바와 같이, 바이오잉크 및 3D 프린팅을 이용한 인공 피부조직의 제조 단계는 크게 콜라겐 및 피브리노겐을 혼합하여 바이오잉크를 제조하는, 바이오잉크 제조 단계; 및 상기 바이오잉크를 이용해 진피층, 기저막층 및 표피층의 3개 층을 프린팅하여 피부 구조체를 형성하는, 피부 구조체 제조 단계;로 나뉠 수 있다..

[0036] 1단계: 바이오잉크 제조 단계

[0037] 3D 프린팅에 사용될 바이오잉크를 제조하기 앞서, 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크를 먼저 제조한다.

[0038] 도 2에 나타난 바와 같이, 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크 제조 단계는 콜라겐(Collagen)을 증류수에 용해시키는, 콜라겐 용액 제조 단계; 피브리노겐을 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에 용해시키는, 피브리노겐 용액 제조 단계; 및 콜라겐 용액 및 피브리노겐 용액을 혼합하는, 혼합 단계;로 진행된다.

[0039] 상기 콜라겐 용액 제조 단계에서 콜라겐은 돼지 피부에서 추출한 것을 특징으로 한다. 상기 돼지 피부에서 추출한 콜라겐은 증류수에 용해시켜 콜라겐 용액을 제조한다.

[0040] 피브리노겐 용액 제조 단계에서 피브리노겐은 소 혈장에서 추출한 것을 특징으로 한다. 상기 소 혈장에서 추출한 피브리노겐은 10X DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium) 용액에 용해시켜 피브리노겐 용액을 제조한다.

[0041] 앞선 단계를 거쳐 제조된, 콜라겐 용액 및 피브리노겐 용액은 1:1 비율로 혼합하여, 제1, 제2 및 제3 바이오잉크의 기반이 될 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크를 제조한다.

[0042] 제1, 제2 및 제3 바이오잉크는 도 3에 나타난 바와 같이, 바이오잉크를 이용한 피부 구조체 제작 순서도에서 바이오잉크 제조 단계는 콜라겐, 피브리노겐 및 섬유아세포를 혼합하는 제1 바이오잉크 제조 단계; 콜라겐, 피브리노겐, 각질세포 성장인자, 섬유아세포 및 각질세포를 혼합하는 제2 바이오잉크 제조 단계; 및 콜라겐, 피브리노겐 및 각질세포를 혼합하는 제3 바이오잉크 제조 단계;를 거쳐 제조된다.

- [0043] 상기 제1 바이오잉크는 콜라겐 용액 4wt% 내지 6wt%, 피브리노겐 용액 17 mg/mL 내지 23mg/mL 및 섬유아세포 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 콜라겐 용액 5wt%, 피브리노겐 용액 20mg/mL 및 섬유아세포 1×10^7 세포/mL 제조된 것이다.
- [0044] 상기 제2 바이오잉크는 콜라겐 용액 2wt% 내지 4wt%, 피브리노겐 용액 17 mg/mL 내지 23mg/mL, 섬유아세포 0.5×10^6 세포/mL 내지 0.5×10^8 세포/mL, 각질세포 0.5×10^6 세포/mL 내지 0.5×10^8 세포/mL 및 각질세포 성장인자 9ng/mL 내지 11ng/mL을 혼합하여 제조된 것이다. 바람직하게는 상기 제2 바이오잉크는 콜라겐 용액 3wt%, 피브리노겐 용액 20 mg/mL, 섬유아세포 0.5×10^7 세포/mL, 각질세포 0.5×10^7 세포/mL 및 각질세포 성장인자 10ng/mL 을 혼합하여 제조된 것이다.
- [0045] 상기 제3 바이오잉크는 콜라겐 용액 4wt% 내지 6wt%, 피브리노겐 용액 17 mg/mL 내지 23mg/mL 및 각질세포 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL를 혼합하여 제조된 것이다. 바람직하게는 상기 제3 바이오잉크는 콜라겐 용액 5wt%, 피브리노겐 용액 20 mg/mL 및 각질세포 1×10^7 세포/mL 를 혼합하여 제조된 것이다.
- [0046] **2단계: 피부 구조체 제조 단계**
- [0047] 피부 구조체 제조 단계는 도 3에 나타난 바와 같이, 바이오잉크를 이용한 피부 구조체 제작 순서도는 제1 바이오잉크를 이용하여 진피층을 프린팅하는, 진피층 제조 단계; 상기 진피층 상부에 제2 바이오잉크를 이용하여 진피층의 굴곡에 따라 얇은 막 형태의 기저막층을 프린팅하는, 기저막층 제조 단계; 상기 기저막층 상부에 제3 바이오잉크를 이용하여 표피층을 프린팅하는, 표피층 제조 단계; 및 상기 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는, 가교 결합 단계;를 거쳐 제조된다.
- [0048] 상기 바이오잉크 제조 단계를 통해 제조된 제1, 제2 및 제3 바이오잉크 및 3D 프린팅 시스템을 이용해 진피층, 기저막층 및 표피층을 제조한다.
- [0049] **2-1단계: 진피층 제조 단계**
- [0050] 진피층 제조 단계에서 진피층은 직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 가로배열 적층 단계; 상기 가로배열 적층 구조 위에 직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 의 지지대(Strut)가 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및 상기 세로배열 적층 구조 위에 너비 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, 높이 $200\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 의 필러(Pillar)를 $700\mu\text{m}$ 내지 $850\mu\text{m}$ 간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 진피층 필러 적층 단계;로 형성하도록 하여 그물망 구조로 3단 적층되는 것을 특징으로 한다.
- [0051] 상기 지지대(Strut)는 직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 인 원형 기둥 구조체이며, 상기 필러(Pillar)는 너비 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, 높이 $200\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 인 타원 모양의 기둥 구조체인 것을 특징으로 한다.
- [0052] 상기 진피층 지지대 가로배열 적층 단계 및 진피층 지지대 세로배열 적층 단계는 배럴 온도 8°C 내지 12°C , 플레이트 온도 30°C 내지 34°C , 프린팅 속도 8mm/s 내지 12mm/s , 압력 90kPa 내지 120kPa, 지지대(Strut) 직경 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 및 지지대 간 간격 $300\mu\text{m}$ 내지 $400\mu\text{m}$ 의 프린팅 조건으로 제1 바이오잉크를 이용하여 진피층 하단을 제작한다. 이 때, 형성된 필러층의 구멍(pore)의 너비는 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 이다.
- [0053] 상기 진피층 필러 적층 단계는 배럴 온도 8°C 내지 12°C , 플레이트 온도 30°C 내지 34°C , 프린팅 속도 8mm/s 내지 12mm/s , 압력 90kPa 내지 120kPa, 필러(Pillar) 너비 $100\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, 필러(Pillar) 높이 $200\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 및 필러 간 간격 $700\mu\text{m}$ 내지 $850\mu\text{m}$ 의 프린팅 조건으로 제1 바이오잉크를 이용하여 진피층 최상단을 제작한다. 이 때, 형성된 필러층의 구멍(pore)의 너비는 $500\mu\text{m}$ 내지 $600\mu\text{m}$ 이다.
- [0054] 배럴 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 온도에 의해 바이오잉크의 유변학적 특성이 변화하여, 원하는 형상으로 프린팅되지 않을 수 있다. 플레이트 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 겔화에 악영향을 미칠 수 있다.
- [0055] 상기 진피층 제조 단계는 바람직하게는 배럴 온도 10°C , 플레이트 온도 32°C , 프린팅 속도 10mm/s 의 조건에서 제1 바이오잉크를 이용하여 진행된다.
- [0056] **2-2단계: 기저막층 제조 단계**
- [0057] 상기 기저막층 제조 단계에서 얇은 막 형태의 기저막층은 진피층의 가로배열된 필러(Pillar)을 따라 굴곡진 형

태로 되어 있는 모굴(Mogul) 구조인 것을 특징으로 한다.

- [0058] 상기 기저막층은 배럴 온도 8℃ 내지 12℃, 플레이트 온도 30℃ 내지 34℃, 프린팅 속도 8mm/s 내지 12mm/s 및 압력 40kPa 내지 70kPa의 프린팅 조건으로 제2 바이오잉크를 이용하여 얇은 막 형태의 기저막층을 제작한다.
- [0059] 배럴 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 온도에 의해 바이오잉크의 유변학적 특성이 변화하여, 원하는 형상으로 프린팅되지 않을 수 있다. 플레이트 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 겔화에 악영향을 미칠 수 있다.
- [0060] 상기 기저막층 제조 단계는 바람직하게는 배럴 온도 10℃, 플레이트 온도 32℃, 프린팅 속도 10mm/s의 조건에서 제2 바이오잉크를 이용하여 진행된다.
- [0061] 2-3단계: 표피층 제조 단계
- [0062] 상기 표피층 제조 단계에서 표피층은 파동 모양의 굴곡진 형태인 기저막층 상단의 움푹 들어간 골 부분마다 너비 100 μ m 내지 200 μ m, 높이 200 μ m 내지 300 μ m의 필러(Pillar)를 700 μ m 내지 850 μ m간격으로 가로배열 적층하는, 표피층 필러 적층 단계; 직경 100 μ m 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 세로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 세로배열 적층 단계; 및 상기 세로배열 적층 구조 위에 직경 100 μ m 내지 200 μ m의 지지대(Strut)가 300 μ m 내지 400 μ m간격으로 가로배열 적층 구조를 형성하는, 표피층 지지대 가로배열 적층 단계;로 형성하도록 하여 그물망 구조로 3단 적층되는 것을 특징으로 한다.
- [0063] 상기 지지대(Strut)는 직경 100 μ m 내지 200 μ m인 원형 기둥 구조체이며, 상기 필러(Pillar)는 너비 100 μ m 내지 200 μ m, 높이 200 μ m 내지 300 μ m인 타원 모양의 기둥 구조체인 것을 특징으로 한다.
- [0064] 상기 표피층 필러 적층 단계는 배럴 온도 8℃ 내지 12℃, 플레이트 온도 30℃ 내지 34℃, 프린팅 속도 8mm/s 내지 12mm/s, 압력 90kPa 내지 120kPa, 필러(Pillar) 너비 100 μ m 내지 200 μ m, 필러(Pillar) 높이 200 μ m 내지 300 μ m 및 필러 간 간격 700 μ m 내지 850 μ m의 프린팅 조건으로 제3 바이오잉크를 이용하여 표피층 최하단을 제작한다. 이 때, 형성된 필러층의 구멍(pore)의 너비는 500 μ m 내지 600 μ m이다.
- [0065] 상기 표피층 지지대 세로배열 적층 단계 및 표피층 지지대 가로배열 적층 단계는 배럴 온도 8℃ 내지 12℃, 플레이트 온도 30℃ 내지 34℃, 프린팅 속도 8mm/s 내지 12mm/s, 압력 90kPa 내지 120kPa, 지지대(Strut) 직경 100 μ m 내지 200 μ m 및 지지대 간 간격 300 μ m 내지 400 μ m의 프린팅 조건으로 제3 바이오잉크를 이용하여 표피층 상단을 제작한다. 이 때, 형성된 필러층의 구멍(pore)의 너비는 100 μ m 내지 200 μ m이다.
- [0066] 배럴 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 온도에 의해 바이오잉크의 유변학적 특성이 변화하여, 원하는 형상으로 프린팅되지 않을 수 있다. 플레이트 온도의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우 겔화에 악영향을 미칠 수 있다.
- [0067] 상기 표피층 제조 단계는 바람직하게는 배럴 온도 10℃, 플레이트 온도 32℃, 프린팅 속도 10mm/s의 조건에서 제3 바이오잉크를 이용하여 진행된다.
- [0068] 2-4단계: 가교 결합 단계
- [0069] 상기 2-1 내지 2-3 단계를 거쳐 바이오 프린팅된 진피층, 기저막층 및 표피층의 3층 피부 구조체는 35 내지 40℃ 환경에서 트롬빈(Tr) 용액 15 내지 25 UI/mL에 피부 구조체를 방치하여 진피층, 기저막층 및 표피층을 가교 결합하는, 가교 결합 단계를 거쳐 인공 피부 구조체를 제작한다.
- [0070] 제1 내지 제3 바이오잉크는 온도에 의해 유변학적 특성이 변화하기 때문에, 배럴 온도 8℃ 내지 12℃ 및 플레이트 온도 30℃ 내지 34℃의 프린팅 조건을 유지하도록 하여 프린팅 시 유변학적 특성이 변하는 것을 방지한다.
- [0071] 또한, 프린팅 직후 구조 유지를 위해 플레이트의 온도를 겔화 온도와 가깝게 유지하도록 하여 인공 피부 구조체를 제작한다.
- [0072] 3 단계: 마무리 단계
- [0073] 핀셋을 이용하여 트롬빈 용액에 인공 피부 구조체가 프린팅된 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET) 필름을 잡고 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)가 담긴 6-웰 플레이트(six-well plate)로 샘플을 옮긴 후, DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 잠깐 담지하여 세척을 한 인공 피부 구조체는 성장 배지가 담긴 플레이트로 옮겨 CO₂ 배양기 내에서 배양한다.

- [0074] 상기 배지는 2 내지 3일에 한 번씩 교체하며, 7일간의 배양 후, 인공 피부 구조체는 조직화 진행 유도를 위해 hanging inserts를 이용하여 공기-액체(air-liquid) 방식으로 배양한다.
- [0075] 실시예 1: 인공 피부 구조체의 제조
- [0076] 진피층, 기저막층, 표피층으로 구성된 3층 피부 구조를 제작하기 위해, 준비된 제1 내지 제3 바이오잉크를 공압 디스펜서(AD-3000C; 유진테크, 한국)가 장착된 3D 프린팅 시스템(DTR3-2210 T-SG; DASA Robot, 한국)을 사용하여 바이오프린팅하였다. 각 바이오잉크는 내경 200 μm 의 노즐을 이용하여 10mm/s로 압출되었다. 콜라겐 구성 요소의 세동을 방지하기 위해 배럴 내부 바이오잉크의 온도는 10℃로 설정되었지만 프린팅 단계의 온도는 압출 후 콜라겐 분자의 세동을 유도하기 위해 32℃로 설정되었다. 바이오프린팅된 3층 피부 구조는 트롬빈 용액(20 UI/mL, Sigma-Aldrich)에서 37℃에서 30분 동안 가교결합되었다.
- [0077] 바이오프린팅된 피부 구조는 5% CO₂를 함유한 환경에서 37℃의 배양 배지에서 배양되었다. 7일간의 기존 침지배양 후, 이전 보고에 나타난 바와 같이 피부 구조물을 5% CO₂를 함유한 환경에서 37℃에서 14일 동안 공기-액체법을 사용하여 배양하였다. 간략히 설명하면, 배양된 세포 구조물을 SPLInsert™(SPL Life Sciences, 한국)의 상부에 놓고 삽입물을 세포 배양 플레이트에 넣었다. 그런 다음 배양 배지(1 mL)를 삽입물과 배양 플레이트에 첨가했다. 배양 배지는 이틀에 한 번씩 교체되었다.
- [0078] **인공 피부 구조체의 진피층 및 표피층 제작을 위한 바이오잉크의 유변학적 특성 평가**
- [0079] 도 1 내지 도 3의 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크 및 3D 프린팅 기술을 이용한 인공 피부 구조체 제조 과정의 전체적인 모식도는 도 4의 콜라겐/피브리노겐 기반 바이오잉크를 이용한 인공 피부 구조체 제작 공정 모식도로 나타낼 수 있다.
- [0080] 먼저, 바이오잉크의 피브리노겐 중량 분율이 5wt% 콜라겐을 함유한 바이오잉크의 유변학적 특성에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해 0, 10, 20 및 30mg/mL의 중량 분율을 가지는 피브리노겐을 제조한 후, 5wt% 콜라겐에 각각 혼합하여 실험을 진행하였다.
- [0081] 도 5에 나타난 바와 같이, 온도, 전단응력, 주파수 및 항복응력에 따른 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다.
- [0082] 먼저, 도 5의 (a)는 온도(Temperature) 변화에 따른 피브리노겐 농도별 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다. 5wt% 콜라겐만 있는 경우 37.6℃에서 겔(Gel)화 되는 반면, 5wt% 콜라겐 및 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물의 경우 32.0℃에서 겔화가 진행되는 것으로 나타나, 피브리노겐이 더 낮은 온도에서 콜라겐의 겔화 반응을 촉진할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0083] 도 5의 (b)는 전단응력(Shearing stress) 변화에 따른 피브리노겐 농도별 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다. 5wt% 콜라겐 및 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대한 전단응력 변화를 확인한 결과, 피브리노겐의 중량 분율이 높을수록 전단응력이 높다는 것을 확인하였다.
- [0084] 도 5의 (c)는 주파수(Frequency) 변화에 따른 피브리노겐 농도별 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다. 5wt% 콜라겐 및 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대한 주파수 변화를 확인한 결과, 피브리노겐의 중량 분율이 높을수록 주파수가 높다는 것을 확인하였다.
- [0085] 도 5의 (d)는 항복응력(Yield stress) 변화에 따른 피브리노겐 농도별 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다. 5wt% 콜라겐 및 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대한 항복응력 변화를 확인한 결과, 피브리노겐의 중량 분율이 높을수록 항복응력이 높다는 것을 확인하였다.
- [0087] **인공 피부 구조체의 진피층 및 표피층 제작을 위한 바이오잉크의 세포의 생존도/증식을 평가**
- [0088] 바이오 프린팅 후 초기 세포 생존 가능성은 조직 형성 및 재생에 직접적인 영향을 미칠 수 있기 때문에, 바이오잉크를 통한 진피층 및 표피층 제작 시 세포의 생존 가능성을 확인하기 위해 생존/사멸 염색(Live and dead staining) 실험 및 세포 독성 실험(MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay, MTT assay)을 진행하였다.
- [0089] 도 6에서 나타난 바와 같이, 바이오잉크 내 섬유아세포 및 각질세포의 생존/사멸 염색 실험 결과를 나타낸다.

- [0090] 도 6의 (a)는 5wt% 콜라겐에 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대해, 섬유아세포(HS27 세포)의 1일차, 3일차 및 7일차 세포 생존/사멸 염색을 진행하였다. 생존/사멸 염색 실험을 진행한 결과, 5wt% 콜라겐 + 30mg/mL 피브리노겐을 혼합한 혼합물이 다른 피브리노겐 농도를 혼합한 혼합물에 비해 더 많은 섬유아세포가 사멸한 것을 확인하였다.
- [0091] 도 6의 (b)는 5wt% 콜라겐에 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대해, 각질세포(HaCaT 세포) 1일차, 3일차 및 7일차 세포 생존/사멸 염색을 진행하였다. 생존/사멸 염색 실험을 진행한 결과, 5wt% 콜라겐 + 30mg/mL 피브리노겐을 혼합한 혼합물이 다른 피브리노겐 농도를 혼합한 혼합물에 비해 더 많은 각질세포가 사멸한 것을 확인하였다.
- [0092] 도 7에서 나타낸 바와 같이, 바이오잉크 내 섬유아세포의 세포 독성 실험 결과를 나타낸다. 5wt% 콜라겐에 0, 10, 20 및 30mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물에 대해, 세포 독성 실험(MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay, MTT assay)을 진행한 결과, 앞선 실험에서 확인한 바와 같이 5wt% 콜라겐 + 30mg/mL 피브리노겐을 혼합한 혼합물이 다른 피브리노겐 농도를 혼합한 혼합물에 비해 세포 생존율이 낮은 것을 확인하였다.
- [0094] **진피층 및 표피층 제작을 위한 콜라겐/피브리노겐 바이오잉크의 피브리노겐 함량 최적화를 위한 인쇄적성(Printability) 평가**
- [0095] 앞선 실험 결과를 통해 5wt% 콜라겐 + 30mg/mL 피브리노겐을 혼합한 혼합물은 인공 피부 구조체를 제작함에 있어서 부적합하다는 것을 확인하였다.
- [0096] 이번 실험은 5wt% 콜라겐 및 0, 10 및 20mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물로 제조된 바이오잉크의 인쇄가능성을 확인하기 위해 200 μ m의 지지대(Strut) 직경을 얻도록 인쇄를 진행하였고, 각각의 바이오잉크로 제작된 구조체에 대한 광학 이미지, 지지대 두께, 기공 크기 분석 및 인쇄적성 평가를 진행하였다.
- [0097] 상기 200 μ m의 지지대(Strut) 직경은 세포가 영양분 및 산소를 효과적으로 운반하는 데 적합한 크기로 볼 수 있기에 200 μ m의 직경을 갖는 지지대를 제작하는 것은 중요한 요소이다.
- [0098] 도 8에서 나타낸 바와 같이, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 광학 이미지를 나타낸다.
- [0099] 도 9에서 나타낸 바와 같이, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 지지대(Strut) 두께 및 기공 크기 분석 결과를 나타낸다.
- [0100] 도 10에서 나타낸 바와 같이, 피브리노겐 농도별 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 인쇄적성 평가 결과를 나타낸다.
- [0101] 5wt% 콜라겐에 0, 10 및 20mg/mL의 피브리노겐을 각각 혼합한 혼합물로 제조된 바이오잉크로 제작한 각각 구조체의 직경을 확인한 결과, 모든 바이오잉크에 대해 약 200 μ m의 직경을 갖는 것으로 나타났다.
- [0102] 다만, 그물망 구조의 기공에 의해 결정되는 인쇄적성(Printability)은 상기 바이오잉크의 피브리노겐 농도가 증가함에 따라 향상되는 것을 확인하였다.
- [0103] 상기 인쇄적성(Printability)은 Pr 값이 0.9 내지 1.1 사이에 있을 때 그물망 구조 제작에 적합하며, 도 10에서 나타낸 바와 같이 5wt% 콜라겐 + 20mg/mL 피브리노겐 혼합물로 제조한 바이오잉크가 인쇄적성(Printability)이 우수하다는 것을 확인하였다.
- [0104] 따라서, 바이오잉크의 세포의 생존도/증식률 평가 및 인쇄적성(Printability) 평가를 통해, 5wt% 콜라겐 + 20mg/mL 피브리노겐 혼합물로 제조한 바이오잉크로 제작한 인공 피부 구조체가 세포 생존성 및 인쇄적성 측면에서 적절하다는 것을 확인하였다.
- [0106] **인쇄 매개변수에 따른 최적의 인쇄 처리 영역을 결정하기 위한 단일 라인 테스트 수행**
- [0107] 지지대 직경 및 세포 생존율과 함께 다양한 인쇄 매개변수(인쇄 노즐 직경, 공압 및 인쇄 속도)에 대한 최적의 인쇄 처리 영역을 결정하기 위해 단일 라인 테스트를 진행하였다.
- [0108] 도 11에서 나타낸 바와 같이, 노즐의 직경 및 프린팅 시 적용되는 압력에 따른 토출 안정성 평가 및 세포 생존

도 평가 결과를 나타낸다.

[0109] 인쇄 노즐의 이동 속도가 증가함에 따라 지지대 크기는 점차 감소했지만, 속도가 너무 높으면 불연속적인 흐름이 관찰되는 것을 확인하였다. 또한, 공압이 증가함에 따라 지지대 직경은 증가했지만, 매우 높은 압력에서는 전단응력으로 인해 세포 생존율이 상당히 낮은 것을 확인하였다.

[0110] 단일 라인 테스트를 통한 정량적 분석을 기반으로 적절한 인쇄 매개변수를 확인했으며, 최적의 인쇄 처리 영역은 노즐 크기 200 μ m, 공압 120 kPa, 인쇄 속도 10mm/s임을 확인하였다.

[0112] 인공 피부 구조체의 기저막층에 대한 유변학적 특성 평가

[0113] 도 12에서 나타낸 바와 같이, 인공 피부 구조체의 기저막층 모굴 구조 제작 공정을 모식도로 나타낸다.

[0114] 인공 피부 구조체에서 기저막층을 제작하기 위해서는 바이오잉크의 점도가 주요 구성 요소이기 때문에, 이번에는 콜라겐의 중량 분율을 변화시켜 최적의 점도를 갖는 바이오잉크를 확인하고자 실험을 진행하였다.

[0115] 먼저, 바이오잉크의 콜라겐 중량 분율이 피브리노젠을 함유한 바이오잉크의 유변학적 특성에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해 1, 3 및 5 wt%의 중량 분율을 가지는 콜라겐을 제조한 후, 20mg/mL 피브리노젠에 각각 혼합하여 실험을 진행하였다.

[0116] 도 13에서 나타낸 바와 같이, 인공 피부 구조체의 기저막층 모굴 구조를 모사하기 위한 저점도 콜라겐/피브리노젠 기반 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다.

[0117] 먼저, 도 13의 (a) 내지 (c)는 전단응력(Shearing stress) 및 항복응력(Yield stress) 변화에 따른 콜라겐 농도별 바이오잉크의 유변학적 특성 평가 그래프를 나타낸다. 20mg/mL 피브리노젠에 1, 3 및 5wt%의 콜라겐을 각각 혼합한 혼합물에 대한 전단응력 및 항복응력 변화를 확인한 결과, 바이오잉크의 콜라겐 중량 분율이 증가함에 따라 전단응력 및 항복응력이 증가했다는 것을 확인하였다.

[0118] 도 14에서 나타낸 바와 같이, 기저막층의 광학 이미지 및 세포 염색 이미지 결과를 나타낸다.

[0119] 기저막층의 모굴 구조를 제작하려면 기저막층 구조용 바이오프린팅 필름이 인쇄 후 중력에 의해 아래쪽으로 구부러져야 하기 때문에 저점도 바이오잉크가 필요하다. 이는 콜라겐 농도가 낮을수록 얇은 모굴 구조를 효과적으로 제작할 수 있음을 나타낸다.

[0120] 폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL)을 사용하여 제작하고 플라즈마로 처리하고 I형 콜라겐으로 코팅한 그물망 구조 위에 인쇄된 지지대의 광학 이미지에서 볼 수 있듯이, 1wt% 콜라겐 + 20mg/mL의 피브리노젠 혼합물로 제조된 바이오잉크의 점도는 너무 낮고 항복응력으로 인해 굽힘 모양을 유지할 수 없다.

[0121] 또한, 5wt% 콜라겐 + 20mg/mL의 피브리노젠 혼합물로 제조된 바이오잉크는 상대적으로 높은 탄성계수(Modulus)와 항복응력으로 인해 구부러지지 않음을 확인하였다.

[0122] 다만, 3wt% 콜라겐 + 20mg/mL의 피브리노젠 혼합물로 제조된 바이오잉크는 그물망 구조의 굴곡형태가 적절하게 유지되었음을 확인하였다.

[0123] 3wt% 콜라겐이 기저막층을 제작하는데 적절한 중량 분율을 가짐이 확인되었고, 3wt% 콜라겐 + 20mg/mL의 피브리노젠 혼합물로 제조된 바이오잉크로 제작한 인공 피부 구조체에 대한 광학 이미지 및 세포 염색 이미지를 확인한 결과, 각질세포(HaCaT 세포) 및 섬유아세포(HS27 세포)가 빨간색 및 녹색으로 염색됨을 확인하였고, 각각의 세포들이 기저막층에서 망상 능선 모양으로 잘 존재하는 것을 확인하였다.

[0125] 배양된 인공 피부 구조체의 특성 평가

[0126] 기저막층은 표피층 및 진피층 사이의 안정적인 연결과 상호 작용을 중재하는 구조이다. 라미닌-5(Laminin, Lama-5)는 기저막층의 조립을 가속화하는 중요한 요소로, 표피층의 기저세포와 유두진피 사이의 안정적인 연결을 제공한다.

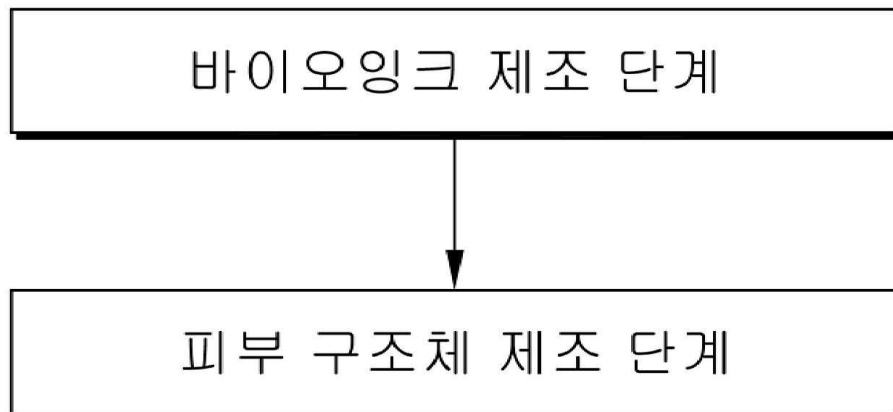
[0127] 또한, Lama-5는 기저막층 생성을 가속화하고 상처 입은 피부의 치유도 증가시킬 수 있다. 사이토케라틴(cytokeratin, CK)은 상피 완전성과 기계적 저항에 영향을 미치며, 증식성 각질세포를 나타내는 사이토케라틴-14(CK-14)는 상피의 기저막층에서 검출되는 반면, 사이토케라틴-10(CK-10)은 표피층의 각질화를 유도하는 각질

세포의 최종 분화를 나타낸다.

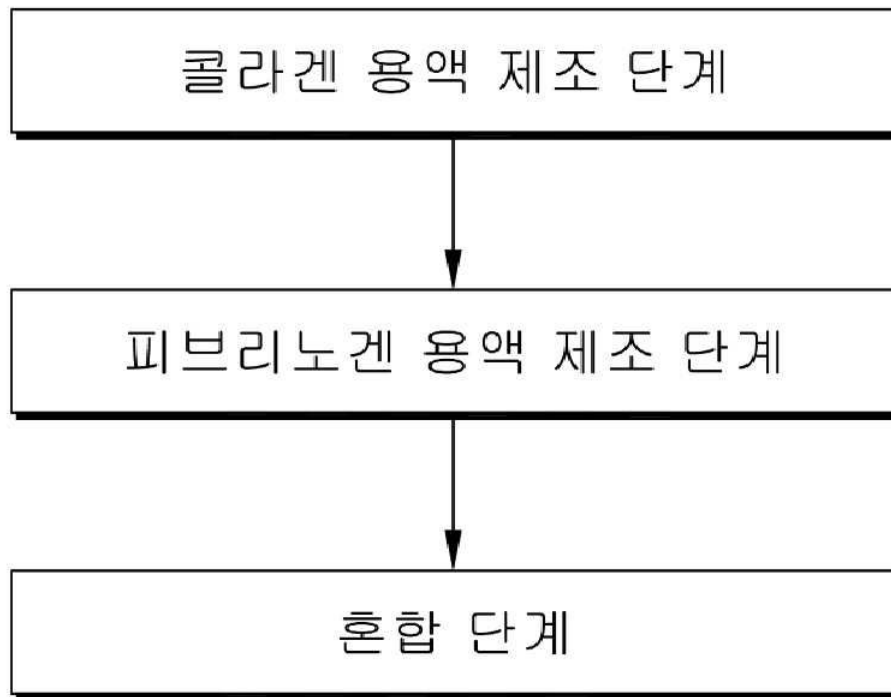
- [0128] 3개의 세포가 함유된 구조에서 기저막층의 형성을 관찰하기 위해 표피층 + 진피층(이하, 그룹 1), 표피층 + 각질세포 성장인자(KGF)를 포함하지 않는 기저막층 + 진피층(이하, 그룹 2) 및 표피층 + 각질세포 성장인자(KGF)가 포함된 기저막층 + 진피층(이하, 그룹 3)으로 나눠 실험을 진행하였다.
- [0129] 도 15에서 나타난 바와 같이, 각 그룹별 인공 피부 구조체 제작 시 기저막층에 대한 최적의 모굴 구조 형성 테스트 수행을 위한 광학 이미지 및 세포 염색 이미지 결과를 나타낸다.
- [0131] 각 그룹의 인공 피부 구조체를 배양한 후, 구조물을 DAPI(청색)/Lama5(적색) 및 DAPI(청색)/CK10(적색)/CK14(녹색) 항체로 염색하였고, 그룹 1 내지 3의 모든 생체 인쇄 구조물에 대해 표피층, 기저막층 및 진피층이 관찰되었다.
- [0132] 그룹 3 구조가 다른 그룹의 구조에 비해 훨씬 더 선명한 기저막층이 관찰되었으며, 표피층 및 진피층 사이의 안정적인 연결이 형성될 수 있음을 확인하였다. 또한, 망상 능선의 독특한 물리적 모양도 그룹 3에서 훨씬 더 선명하게 관찰됨을 확인하였다.
- [0133] 분화된 사이토케라틴을 정성적으로 평가하기 위해 샘플의 압축 기계적 특성을 측정하는 실험을 진행하였다.
- [0134] 도 16에서 나타난 바와 같이, 배양된 인공 피부 구조체의 기계적 특성 평가 결과를 나타낸다.
- [0135] 도 17에서 나타난 바와 같이, 배양된 인공 피부 구조체의 유전자 발현 평가 결과를 나타낸다.
- [0136] 생체 인쇄 구조물은 약 6 kPa의 낮은 압축 계수를 나타냈으나, 그룹 3 구조에서 탄성계수(Modulus)가 크게 증가됨을 확인하였다. 또한, 그룹 3의 탄성계수(Modulus)가 다른 그룹에 비해 훨씬 높아 그룹 3의 피부 조직 발달이 양호하게 이루어졌음을 알 수 있었다.
- [0137] 또한, 그룹 3 구조의 Lama5 및 사이토케라틴(CK10 및 CK14)의 면역형광 이미지는 능선이 안정적으로 형성되어 기저막층 관련 유전자(Co14, Lama5 및 CK14)가 훨씬 더 많이 발현되고, 정상적으로 관찰되는 것으로 확인하였다.

도면

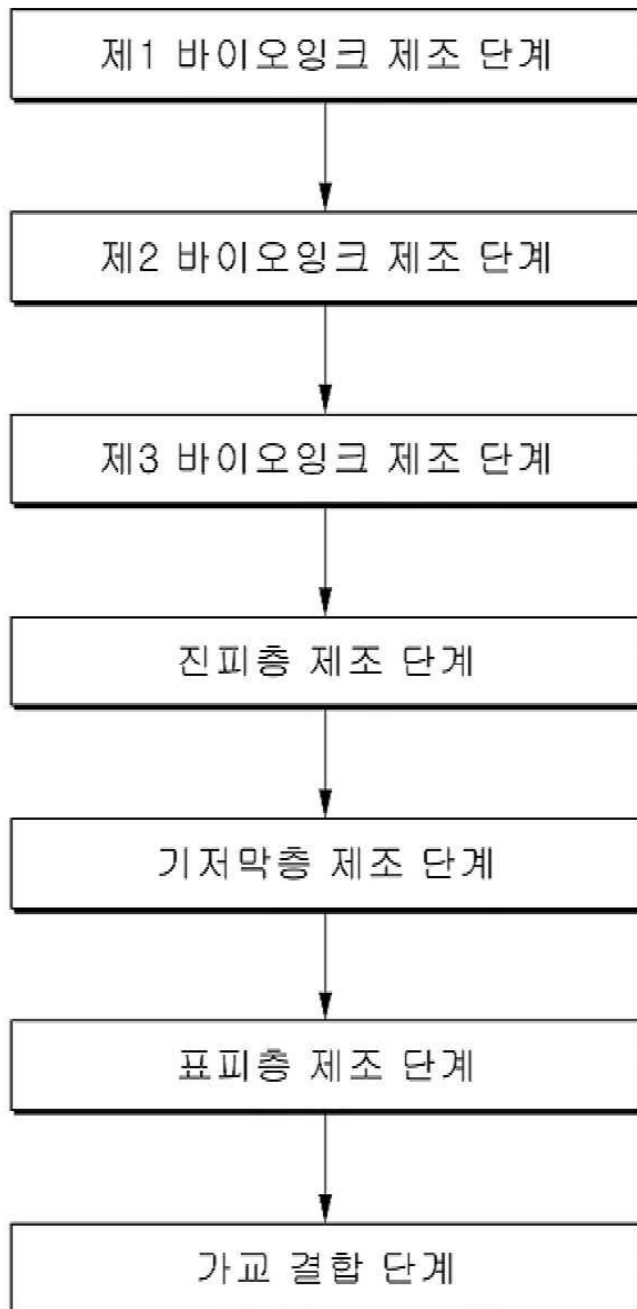
도면1



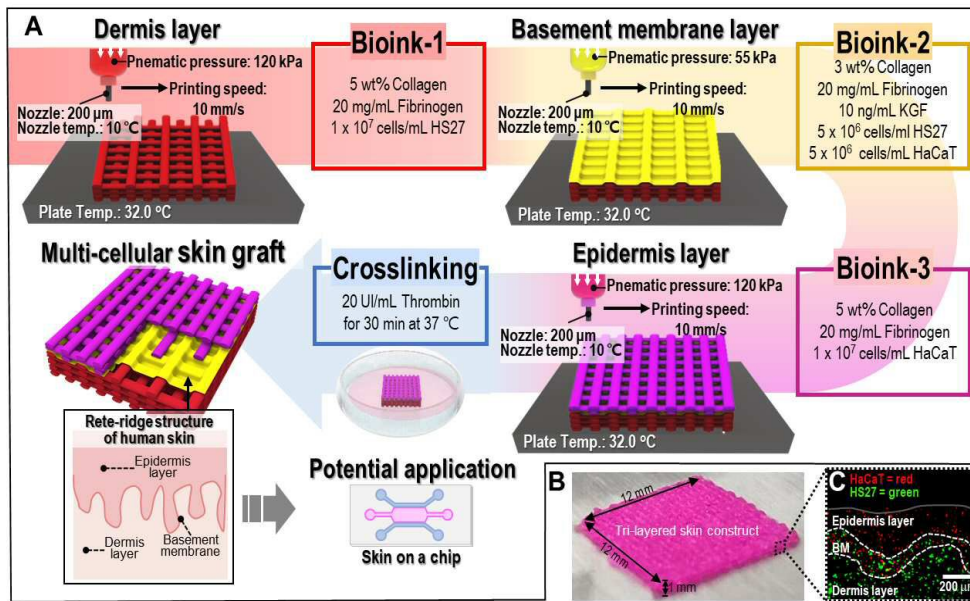
도면2



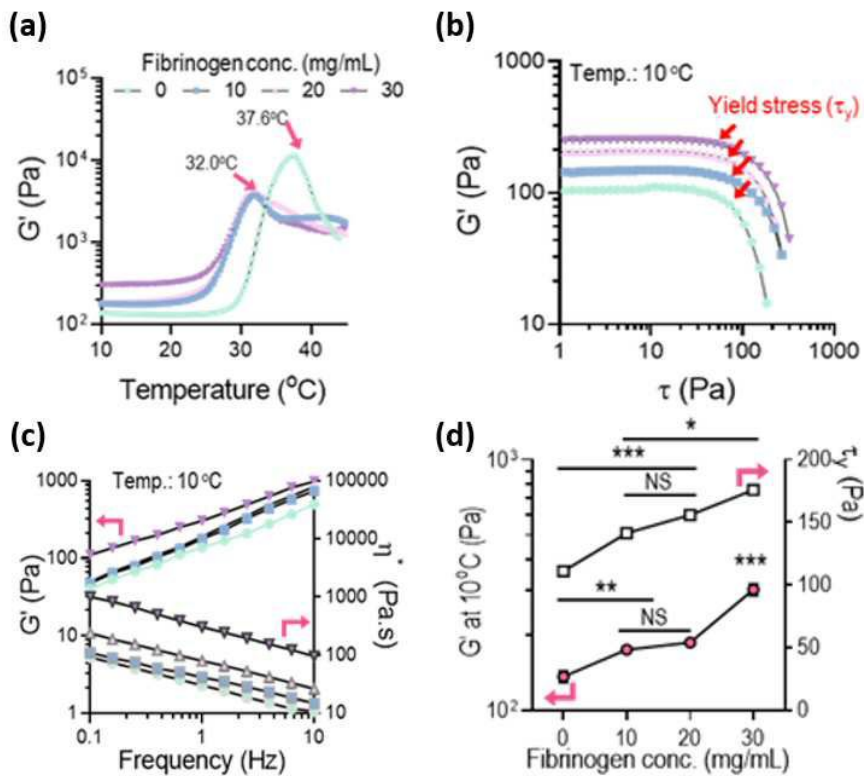
도면3



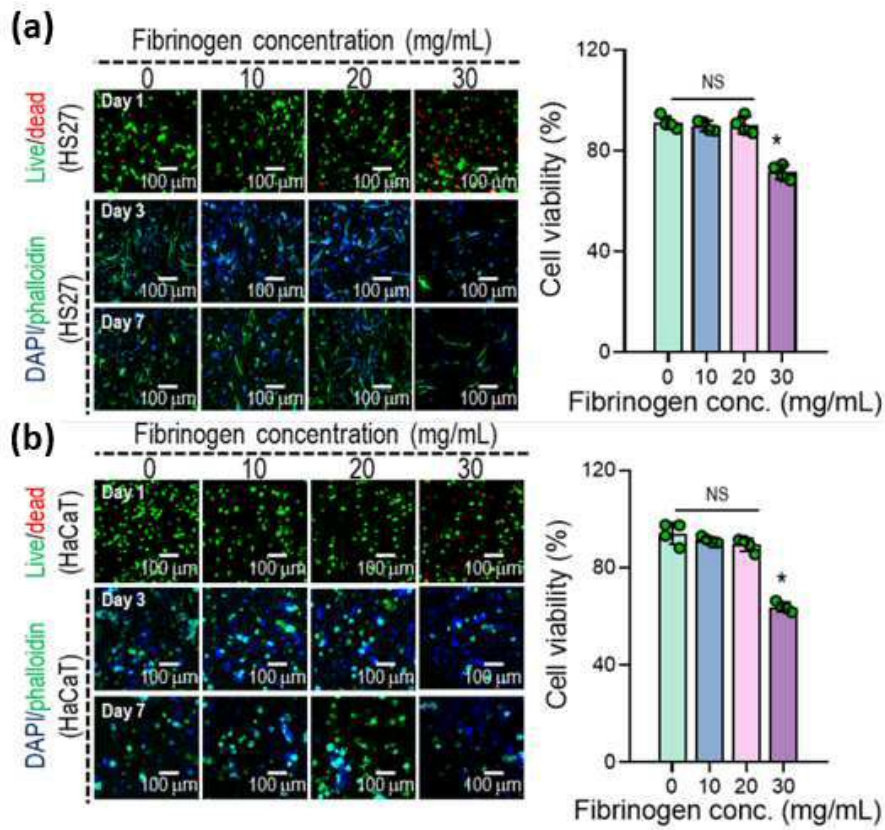
도면4



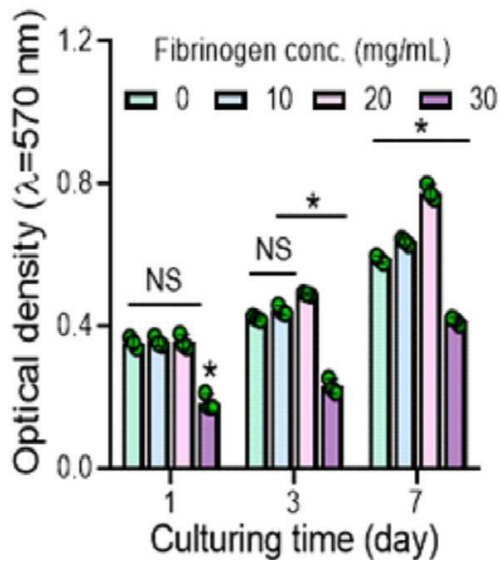
도면5



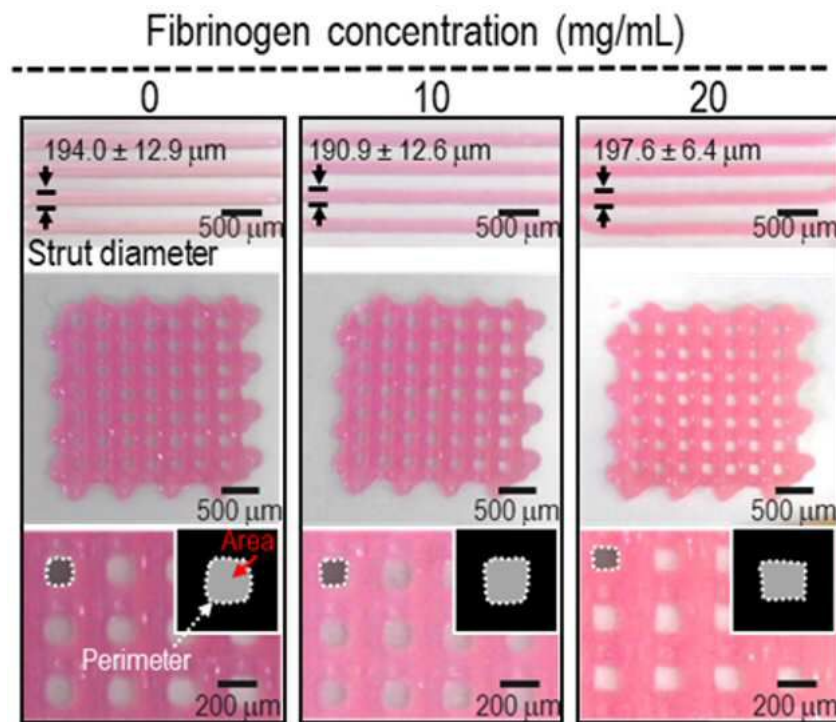
도면6



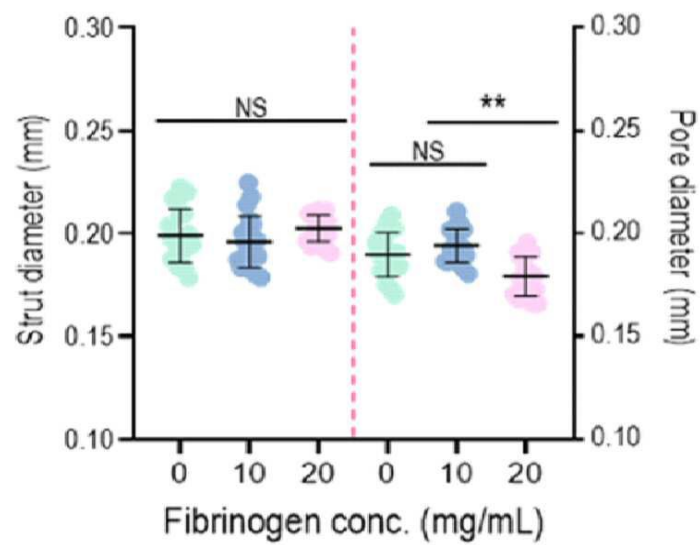
도면7



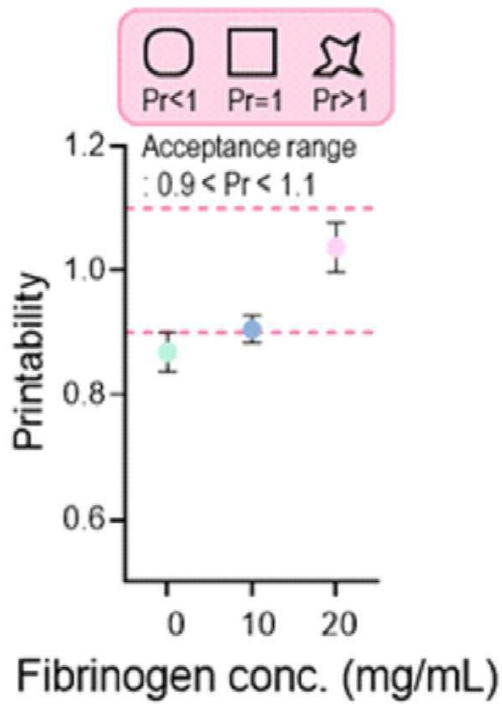
도면8



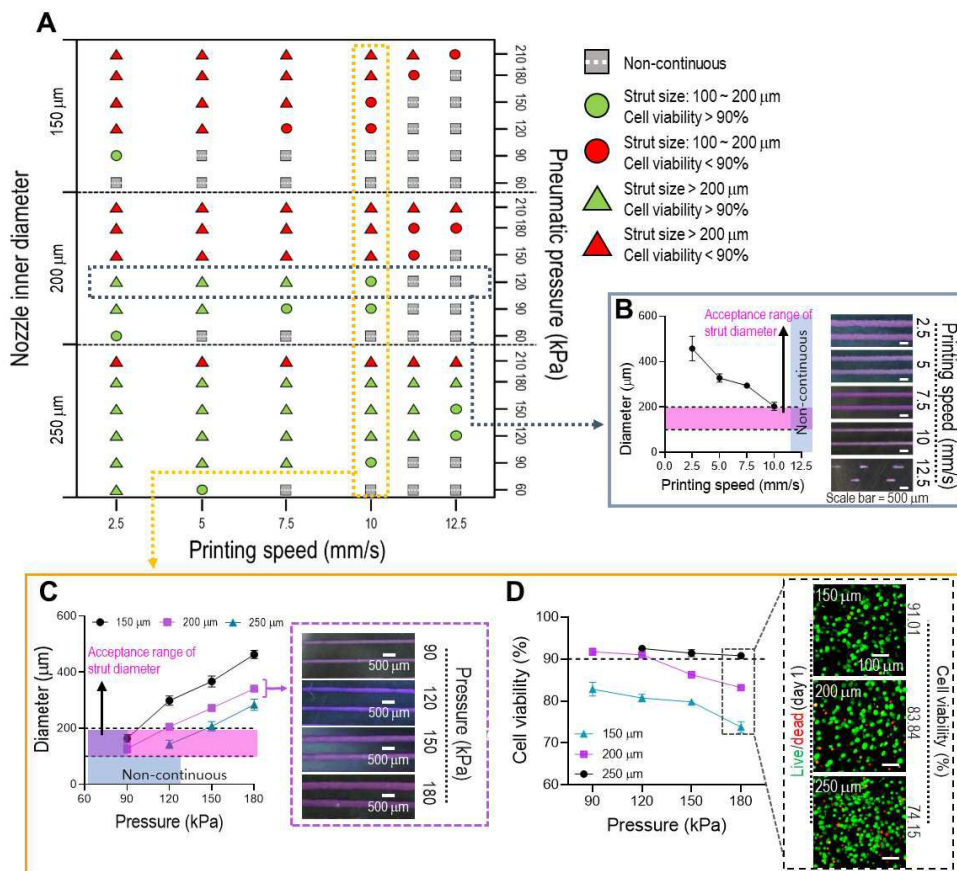
도면9



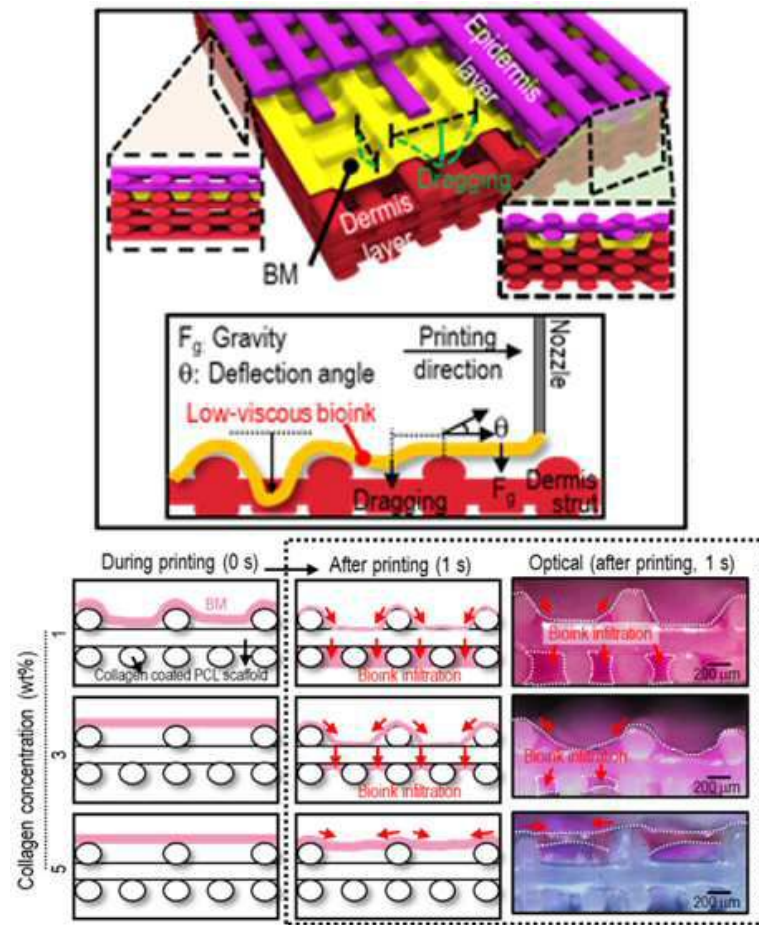
도면10



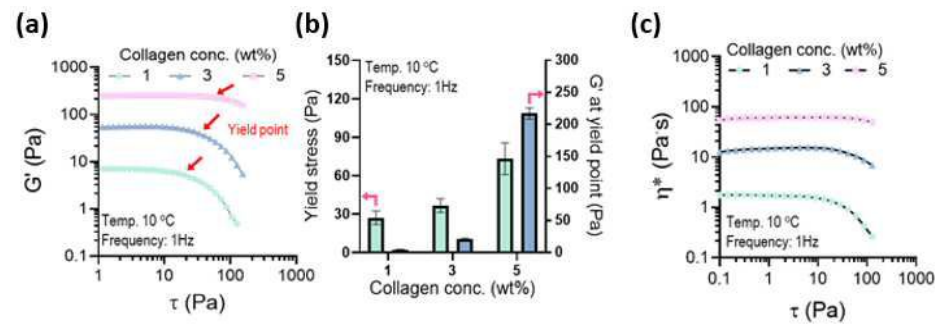
도면11



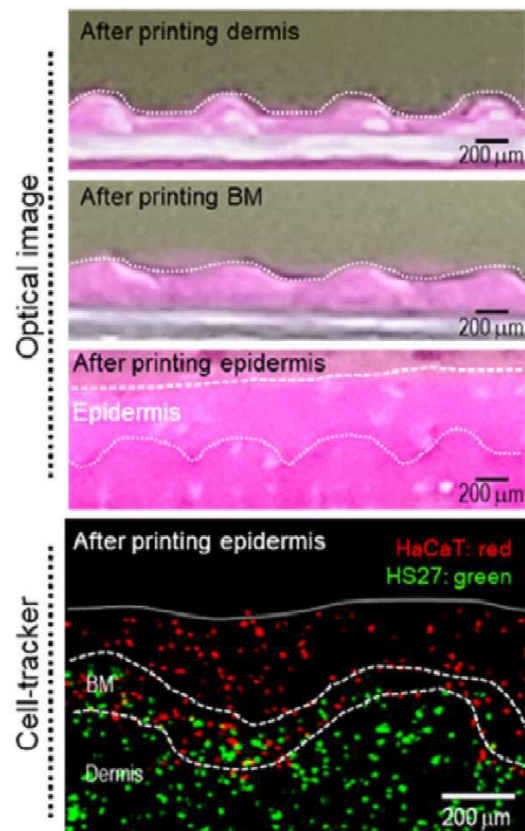
도면12



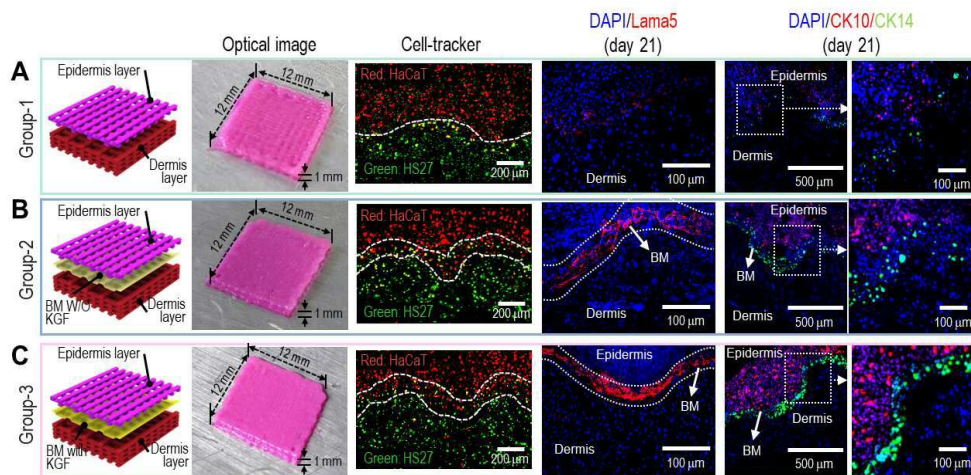
도면13



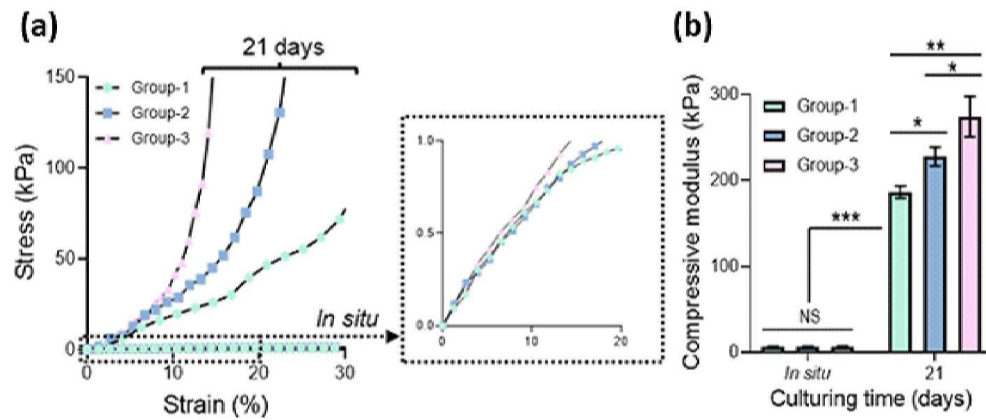
도면14



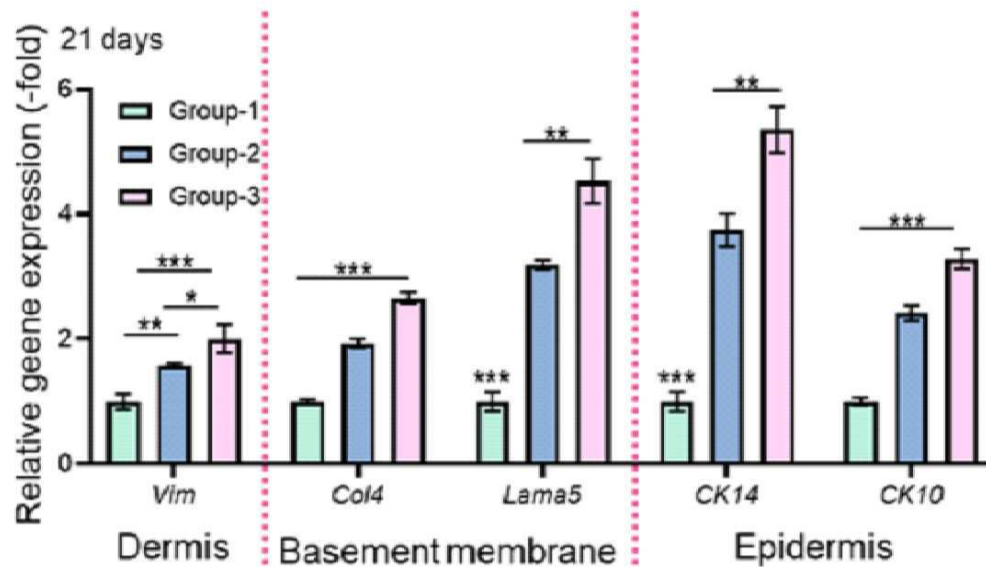
도면15



도면16



도면17



도면18

