(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0013507
(43) 공개일자 2024년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/52 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01) *B33Y 80/00* (2015.01)
C09D 11/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0091120
(22) 출원일자 2022년07월22일
심사청구일자 2022년07월22일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박찬흠
강원도 춘천시 방송길 70, 107동 3701호(온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
이영진
충청남도 서산시 성연면 성연3로 36, 510동 201호(이안아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

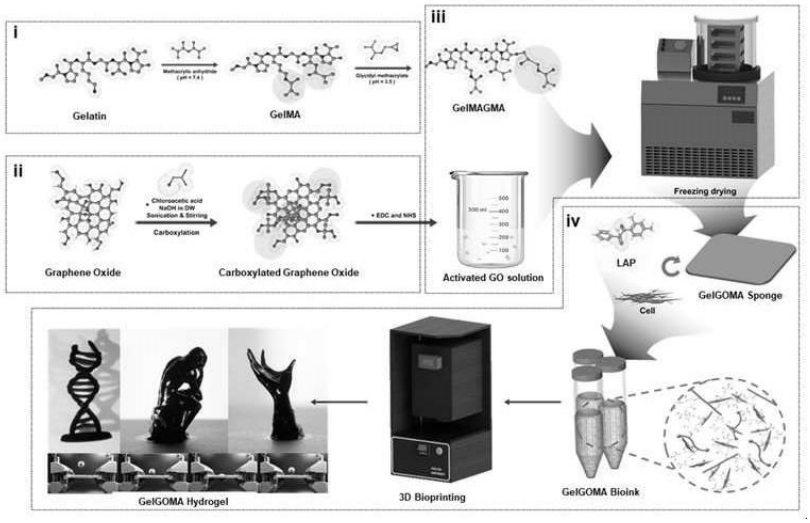
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **재생 의학용 초강력 전기전도성 생체 적합 하이드로겔 제조용 광경화성 바이오 잉크 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명에서는, 실크 나노섬유의 제조 및 젤라틴의 이중 메타크릴화와 같은 천연 고분자의 물리적 또는 화학적 변형의 (a)단계, 산화 그래핀(GO) 카르복실화의 (b)단계, (a)단계의 메타크릴화 천연 고분자와 (b)단계의 카르복실화된 GO간의 카르보디이미드화의 (c)단계, 및 실크 나노섬유가 들어가거나 들어가지 않은 3D 바이오프린팅의 (d)단계를 포함하는 초강력, 생체적합성, 전기전도성 및 신축성 하이드로겔 조성물 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 하이드로겔 조성물은 기존의 하이드로겔과는 달리 힘줄 및 심장과 같은 하중 지지 연조직 범위에서 높은 기계적 강도를 갖는 생체적합성 하이드로겔을 제조할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61L 27/222 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
B33Y 80/00 (2013.01)
C09D 11/04 (2013.01)
A61L 2300/604 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)

(72) 발명자
아지테루 올라툰지 아볼라린
강원도 춘천시 봉의산길22번길 15-1(봉의동)
이옥주
강원도 춘천시 동면 춘천로449번길 26-6, 302호
이지승
경기도 부천시 조종로85번길 31, 2층 201호 (원미동, 공원빌라)
이한나
강원도 춘천시 춘천로281번길 6, 가동 201호 (후평동)
술탄 티푸
강원도 춘천시 삭주로80번길 29, 102호 (후평동)
김장민
강원도 춘천시 춘주로 174, 103동 101호(퇴계동, 그린타운아파트)
권오준
경기도 남양주시 다산지금로145번길 15, 7306동 2103호(다산동, 다산 펜테리움 리버테라스1)
김지예
강원도 원주시 서원대로 86-3, 501호(단계동)
허지원
강원도 춘천시 새청말길 26, 107동 1006호(우두동, 강변코아루아파트)
김순희
강원도 춘천시 삭주로 40-1, 203호(교동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	200408
과제번호	HI20C0408
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발
연구과제명	줄기 세포 뇌질환 치료 향상을 위한 비강 내 전달법 및 줄기 세포 기능 강화 하이드로겔 공통 기반 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2020.04.23 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

매크로머(macromer)를 포함하는 하이드로겔 조성물에 있어서,

상기 매크로머는, 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)을 포함하되,

상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은, 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)과 공유 결합되는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

실크 피브로인 나노섬유를 더 포함하는, 하이드로겔 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)는, 초음파 처리 조건에서 그래핀 옥사이드(GO)와 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응을 통해 얻어지는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔 조성물.

청구항 4

매크로머(macromer)를 포함하는 하이드로겔 조성물의 제조 방법에 있어서,

a) 젤라틴과 메타크릴레이트(MA) 무수물을 1차 메타크릴화 반응시키는, GelGMA 제조 단계;

b) GelGMA와 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)를 2차 메타크릴화 반응시키는, GelMAGMA 제조 단계; 및

c) GelMAGMA와 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)의 카르보디이미드화 반응이 수행되는 GelGOMA 제조 단계;를 포함하는, 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 GelGOMA 제조 단계에서, 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은, 초음파 처리 조건에서 산화 그래핀(GO)과 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응을 통해서 얻어지는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 GelGOMA 제조 단계에서, 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은 교반 조건 하에서, N-히드록실숙신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-(디메틸아미노)프로필)-카르보디이미드 염산(EDC)의 첨가에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 7

DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물에 있어서,

매크로머를 포함하는 하이드로겔;

세포; 및

광개시제;를 포함하고,

상기 매크로머는, 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)을 포함하되,

상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은, 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)과 공유 결합되는 것을 특징으로 하는, DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 매크로머를 포함하는 하이드로겔은, 실크 피브로인 나노섬유를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은, 초음파 처리 조건하에서 산화 그래핀(GO)과 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는, DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은,

젤라틴과 메타크릴레이트(MA) 무수물의 1차 메타크릴화 반응이 수행되어 얻어진 GelGMA를, 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)와 2차 메타크릴화 반응시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는, DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 초강력, 신축성, 전기전도성 및 생체적합성이 우수한 하이드로겔로 프린팅 가능한 디지털 광 처리(DLP)용 광경화성 바이오 잉크 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 천연 고분자를 사용하여 내하중 특성 및 전기전도성이 우수하여 조직의 재생에 적합한 바이오 잉크를 기능화하여 제공하기 위한 것이다.

[0003] 연구 과제 정보

[0004] [과제고유번호] HI20C0408

[0005] [부처명] 보건복지부

[0006] [연구관리전문기관] 한국보건산업진흥원

[0007] [연구사업명] 첨단의료기술개발

[0008] [연구과제명] 줄기 세포 뇌질환 치료 향상을 위한 비강 내 전달법 및 줄기 세포 기능 강화 하이드로겔 공통 기반 기술 개발

[0009] [주관기관] 한림대학교

[0010] [기여도] 1/1

[0011] [연구기간] 2020.04.23.~2022.12.31.

배 경 기 술

[0013] 조직 공학 분야에서는, 사람의 조직 재생을 위해 세포, 생체 재료 및 물리 화학적 특성들을 사용한다. 조직 특이적 기계적 신호 및 세포 지원 시스템과 관련하여 여러 생체 재료를 기본 세포외 기질(ECM)로 모델링하기 위해 많은 연구가 수행되어 왔으며, 그 중 하나로 하이드로겔을 들 수 있다.

[0014] 구조적 및 물리적 특성 측면에서 하이드로겔은 ECM에 대해 높은 유사성을 갖고, 물에 용해되지 않아 정의된 구조를 유지할 수 있는 높은 흡수성, 가교 및 친수성 고분자이다. 이러한 하이드로겔은 구조 내에 많은 양의 물과 불균일한 가교점을 보유하기 때문에, 하중을 견디는 기본 연조직을 효과적으로 대체하기에는 충분하지 않는 것으로 간주된다. 예를 들어, 팽윤 정도가 증가하면, 하이드로겔은 인성, 강도, 연신율 및 회복성이 감소하는데, 이로인해 연골, 피부, 근육, 심장 판막, 혈관 및 힘줄과 같은 하중 지지 연조직의 조직 공학 분야에서는 하이드로겔을 사용할 수 없는 경우가 많다.

[0015] 또한, ECM 강성(stiffness)은 DNA 복구 효율과 유전독성 감도를 제어하는 것으로 알려져 있으며, 타겟 천연 조직에 대한 스캐폴드 기계적 유사성이 매우 중요하다. 이를 위해 하이드로겔 매트릭스의 화학적 네트워크를 제어하거나, 산화 그래핀(GO) 생체 복합물과 같은 생체 복합물을 사용함으로써, 탄성 및 초강력 하이드로겔을 제조할 수 있다. 이 경우 하이드로겔의 수분 함량이 감소되거나, 취성 및 파단이 유발될 수 있으므로, 생체 복합 재료를 고분자 골격에 공유 결합시킴으로써 기계적 특성을 향상시킬 수 있다.

[0016] ECM을 모방하기 위한 합성 및 천연 폴리머의 사용은, 재생 의학 분야에서 널리 이용되어 왔다. 합성 폴리머는 기능화하기 쉽지만 자연적인 과정으로 분해되기 어렵고, 종종 이식 중 주변 조직과의 물질 통합에 필요한 세포 상호 작용 모티프가 부족하다. 반면 젤라틴, 실크 피브로인(SF)과 같은 천연 고분자는, 생물학적 과정에 의해 쉽게 분해되지만 기능화 하기 어렵다. 합성 고분자에 비해 천연 고분자를 기능화 하는 것이 어렵기 때문에, 천연 고분자를 사용하여 초강력 하이드로겔을 제조하는 것은 여전히 어려운 연구 과제로 남아 있다.

[0017] SF와 젤라틴은 연조직 공학용 스캐폴드로 널리 사용되는 천연 고분자로, 생체 적합성과 라이신 아미노산 잔기에 있는 아미노 가장자리 체인의 존재에 따른 생체 내 연구의 용이성으로 인해 조직 공학 분야에서는 널리 제작 및 탐구 되어 왔다. SF 기반 하이드로겔은 젤라틴 하이드로겔에 비해 기계적 강도가 우수하다고 널리 알려져 있지만 적절한 자극 하에서 β-시트를 형성하여 그 강도가 증가한다.

[0018] 또한 GO 혹은 산화 철(IO)과 같은 다른 나노 입자를 SF 나노 섬유를 적용하여 지지체의 기계적 강도를 향상시킬 수 있으나, 그럼에도 불구하고 실크 나노섬유에서 추출한 하이드로겔은 내하중 ECM 대체재로 널리 적용되지 못하였다.

[0019] 부하를 견디는 ECM 대체재로서의 응용 외에도 전기 전도성 초강력 하이드로겔은, 소프트 센서, 웨어러블 전자 장치 및 손상된 뇌 복구를 위한 전기 감광성 세포의 캡슐화와 같은 전자 응용 분야에 바람직하게 활용될 수 있다. GO의 공유 환원(covalent reduction)은 SF 하이드로겔 복합물에 전기적 활성을 부여할 수 있으며, 이로 인해 실크 하이드로겔이 반도체에서 전기 전도성 하이드로겔로 전환되도록 한다.

[0020] 본 발명의 출원인은, 대한민국 등록특허 제10-2180865호에서, 하이드로겔의 전기전도성이 세포-세포 전달, 세포 분화 및 전체 조직 기능에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 생체 적합성이 우수한 광경화성 바이오잉크는 세포 캡슐화 및 섬세한 조직으로의 약물 전달을 위한 중요한 도구로 사용될 수 있으며, 하이드로겔로 변형된 후의 점탄성 특성은 캡슐화된 세포를 보호할 수 있다. 또한, 시간에 따른 분해는, 이식 후 내용물의 점진적인 방출을 보장하고, 낮은 반응성은 그 안에 캡슐화된 화학 물질의 화학적 안정성을 의미한다.

[0021] 대한민국 등록특허 제10-2180865호에는, 생체복합체를 3차원 구조로 제작하는 방법이 제시되어 있다. Vat 중합은 높은 효율과 분해능으로 인해 일반적으로 사용되는 적층 제조 공정이다. 모든 Vat 중합 적층 제조 공정 중에

서 DLP는, 마이크로 미러 어레이 장치를 사용한 레이어별 인쇄 패턴으로 인해 긴 수명의 광원, 향상된 속도 및 정밀도에서 우수하다. 따라서, DLP 바이오프린터를 통해 광경화성 고분자로부터 인쇄된 하이드로겔은 조직 공학 분야에 광범위하게 적용될 수 있다(WO 2018-186611 A2).

[0022] GO, SF 또는 젤라틴을 사용한 생체복합체 및 초강력 하이드로겔의 일부 초기 3D 프린팅은 중국 등록특허 제110003392호에 제시되어 있는데, 여기서 언급된 대부분의 접근 방식은 열악한 처리 조건으로 인해 세포 캡슐화에 바람직하지 않다.

[0023] 하지만, 이하에서 후술되는 본 발명에 따른 바이오 잉크의 제조 방법 및 이러한 방법으로 제조된 바이오 잉크의 경우, 세포 캡슐화에 적합하고, 강력한 기계적 특성과 함께 높은 하중을 지지할 수 있어, 하이드로겔의 적용 범위를 다양한 기관으로 확대시킬 수 있는 장점이 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0025] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2180865호

(특허문헌 0002) 국제공개특허 제2018-186611호

(특허문헌 0003) 중국 등록특허 제110003392호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 본 발명은, 하이드로겔 제조에 사용되는 천연 고분자(SF 및 젤라틴)를 사용하여 DLP 프린팅용 바이오 잉크에 관한 것으로, SF와 젤라틴은 세포 상호 작용 모티프, 생체 적합성, 저렴하고 생분해성을 갖는다. 구체적인 제조예를 통해 이러한 바이오 잉크로 인쇄된 생체 복합체의 세포 적합성을 관찰하였으며, 사용된 용매 및 화학물질은 쉽게 제거되고 시험관 내 및 생체 내 모두에서 세포 독성이 확인되지 않았다.

[0027] 본 발명에 따른 화학적으로 개질된 천연 고분자는, 심장 근육과 같이 긴장을 견디는 연조직을 제작에 사용되는 하이드로겔을 형성할 수 있도록 기계적 물성이 향상되었으며, GO 환원과 관련된 제조 공정을 통해 바이오잉크의 전기적 특성을 성공적으로 도입할 수 있었다. 또한, 손상시 뇌와 같은 전기민감성 조직으로의 용이한 세포 이식 및 약물 전달을 보장할 수 있도록 광경화 특성을 보유함으로써, 본 발명에 따라 제작된 하이드로겔은 심장 또는 뇌 조직과 같이 부하를 견디는 전기 민감 조직의 ECM과 기계적, 전기적으로 매우 유사한 장점을 갖는다.

과제의 해결 수단

[0029] 본 발명의 일 실시 형태에 다른 전기전도성과 생체적합성이 우수한 하이드로겔은, 매크로머(macromer)를 포함하며, 상기 매크로머는 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)을 포함하되, 상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은, 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)과 공유 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0030] 상기 전기전도성과 생체적합성이 우수한 하이드로겔은, 실크 피브로인 나노섬유를 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)는, 초음파 처리 조건에서 그래핀 옥사이드(GO)와 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응을 통해 얻어지는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명의 다른 실시 형태로, 매크로머(macromer)를 포함하는 하이드로겔의 하이드로겔의 제조 방법을 들 수 있으며, a) 젤라틴과 메타크릴레이트(MA) 무수물을 1차 메타크릴화 반응시키는, GelGMA 제조 단계; b) GelGMA와 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)를 2차 메타크릴화 반응시키는, GelMAGMA 제조 단계; 및 c) GelMAGMA와 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)의 카르보디이미드화 반응이 수행되는 GelGOMA 제조 단계;를 포함할 수 있다.

[0033] 상기 GelGOMA 제조 단계에서, 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은, 초음파 처리 조건에서 산화 그래핀

(GO)과 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응을 통해서 얻어지는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 GelGOMA 제조 단계에서, 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은 교반 조건 하에서, N-히드록실숙신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-(디메틸아미노)프로필)-카르보디이미드 염산(EDC)의 첨가에 의해 활성화될 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 실시 형태로 DLP 3D 프린팅용 바이오 잉크를 들 수 있는데, 매크로머를 포함하는 하이드로겔; 세포; 및 광개시제;를 포함하며, 상기 매크로머는, 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)을 포함하되, 상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은, 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)과 공유 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0036] 상기 매크로머를 포함하는 하이드로겔은, 실크 피브로인 나노섬유를 더 포함할 수 있으며, 상기 카르복실화된 산화 그래핀(GO-COOH)은, 초음파 처리 조건하에서 산화 그래핀(GO)과 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)의 반응에 의해 얻어지는 것이 바람직하고, 상기 이중 메타크릴레이션된 젤라틴(GelMAGMA)은, 젤라틴과 메타크릴레이트(MA) 무수물의 1차 메타크릴화 반응이 수행되어 얻어진 GelGMA를, 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)와 2차 메타크릴화 반응시켜 얻어지는 것이 더욱 바람직하다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 DLP 프린팅에 의해 초강력 하이드로겔(GelGOMA 및 그 유도체)의 조성 및 제조 기술을 제공함으로써 앞서 살펴본 하이드로겔의 문제점을 해결할 수 있다. 본 발명은 스펀지 제조, 바이오 잉크 조성, 생체 적합성 3D 프린팅된 하이드로겔, 및 이들의 하이드로겔의 적용 방법을 제공하기 위한 것으로, 앞서 배경이 되는 기술에서 언급된 기존의 하이드로겔의 한계를 극복하고, 가교 네트워크를 개선하기 위해, 젤라틴 천연 중합체는 광중합 동안 이중 메타크릴레이트화되었다.

[0039] 또한, 이중 메타크릴레이트 젤라틴의 기계적 물성을 향상시키기 위해 SF 나노섬유를 준비한 후, 이중 메타크릴레이트 젤라틴(GelMAGMA)과의 향상된 접합을 위해 하이드록실 작용기가 풍부한 GO를 카르복실화 하였다. 또 다른 측면에서, 본 발명에서는 a) 메타크릴레이트 무수물(MA)과의 젤라틴 반응 및 b) 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)와 단일 메타크릴레이트화된 젤라틴 반응을 포함하는 젤라틴의 이중 메타크릴화 과정을 수행하였다.

[0040] 예를 들어 젤라틴은 GMA와 직접 반응하여 광경화성 폴리머인 GelGMA를 생성하였다. GelMAGMA의 여분의 아미노작용기는 에스테르화 반응을 통해 GO의 카르복실 작용기를 통해 카르복실화된 GO에 공유 결합으로 연결될 수 있다. 이러한 과정은 산소 분자의 제거로 인한 π오비탈의 비편재화를 통해 GelGOMA에 전기적 특성을 부여하게 된다.

[0041] 다른 측면에서, 연결된 GO의 농도는 선택적으로 GelGOMA01, GelGOMA02 및 GelGOMA03으로 변경시켜 가면서, 시료를 제조하였다. 이러한 본 발명에 따른 제조 방법에서는, 스펀지 샘플을 얻기 위해 투석을 통해 미반응 물질을 제거한 후 동결 및 동결건조를 포함할 수 있다. 또한 스폰지 용액에 광가교제를 도입함으로써, DLP를 통해 강한 신축성 및 전기전도성 하이드로겔로 인쇄하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 이러한 제조 방법 및 이에 따라 제조된 바이오 잉크는, 신축성 및 생체 적합성을 갖는 3D 인쇄된 복합 구조물을 제공할 수 있다. 높은 수준의 가교 및 SF 나노 필러로 인해 인쇄된 복합 구조물은 높은 기계적 강도를 가질 뿐만 아니라, 바이오 잉크의 광경화성은 조직으로의 안전한 전달을 위해 세포 및 약물의 용이한 캡슐화가 가능하다. 본 발명의 또 다른 장점은 인쇄된 GelGOMA의 전기전도성으로 인해 전기감광성 조직의 재생에 까지 활용 및 적용 분야를 넓힐 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 GelGOMA의 이러한 특징 및 장점, 효과 등은 후술되는 발명의 상세한 설명 및 도면들로부터 명확하게 이해될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 초강력, 신축성 및 전기전도성 하이드로겔의 제조 공정의 개략도이다. (i) 이중 메타크릴화 공정을 통한 광경화성 젤라틴 폴리머 백본(GelMAGMA)의 합성은. 처음에는 무수 메타크릴레이트(MA)를 사용하고 나중에는 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)를 사용하고, (ii) GO 상의 카르복실 작용기의 수를 증가시키는 카르복실화 및 카르복실기의 후속 활성화를 포함하는 산화 그래핀(GO)의 활성화 시키며, (iii) 활성화된 GO 용액과 이중 메타크릴

레이트 젤라틴(GelMAGMA) 사이의 카르보디이미드화 반응으로 GelGOMA 스폰지 제공한다. (iv) DLP 바이오프린팅을 통한 GelGOMA 하이드로겔의 제작으로 초강력, 신축성 및 전기전도성 하이드로겔(GelGOMA)의 복잡한 구조를 제공할 수 있다.

도 2(a)는 FT-IR 스펙트럼을 통한 GelGOMA 및 관련 스폰지의 화학적 특성이고, 그림 2(b)는 1H-NMR을 통한 GelGOMA 및 관련 스폰지의 화학적 특성이다.

도 3은 GelGOMA 용액의 용해도, 분산 및 침강 특성을 관찰한 결과로, GO와 메타크릴화 스폰지(스폰지 + GO 용액) 및 카르복실화 GO(스폰지 + GO-COOH 용액)가 있는 메타크릴화 스폰지의 혼합물에 대한 시간 변화에 따른 분산 및 용해도를 보여주는 GelGOMA 용액의 사진이다.

도 4a는 주사 전자 현미경(SEM)으로 촬영한 가공된 스폰지(SGMA, GelGMA, GelMAGMA)의 사진이고, 도 4b는 주사 전자 현미경(SEM)을 통해 관찰한 GO 농도별 GelGOMA의 사진이다.

도 5는 C/N/O 중량비와 원자 퍼센트 표를 얻기 위해 제작된 스펀지 표면의 EDX 원소 매핑으로, 원은 EDX 원소 분석 포인트를 의미한다.

도 6(a)는 절연 및 광경화성 수지에서 DLP 프린터로 인쇄한 4포인트 프로브 EIS 셀 모델이고, 도 6(b)는 다양한 하이드로겔 농도에서 다양한 주파수를 갖는 GelGOMA 및 기타 하이드로겔의 전기 전도도 그래프이며, 도 6(c)는 다양한 하이드로겔 농도에서 하이드로겔의 전류-전압(I-V) 곡선 측정 결과이다.

도 7(a)는 인장 시험 실험 설정의 개략도이고, 도 7(b)는 압축 테스트 설정의 개략도이며, 도 7(c)는 다양한 하이드로겔 농도에서 제작된 모든 하이드로겔의 변위 대 인장 응력의 그래프이다.

도 7(d)는 다양한 농도의 하이드로겔에 대한 초기 길이의 최대 변형률이 30%에서 90%인 GelGOMA 하이드로겔의 순환 인장 응력 그래프이고, 도 7(e)는 다양한 농도에서 제작된 모든 하이드로겔의 변위 대 압축 응력의 그래프이며, 도 7(f)는 다양한 농도의 하이드로겔에 대한 초기 높이의 최대 변위 40%~55%에 대한 GelGOMA의 순환 압축 응력 그래프이다.

도 8(a)는 다양한 농도의 GO(즉, GelGOMA 01, GelGOMA 02 및 GelGOMA 03)에서 10, 20 또는 30%(w/v) 바이오잉크로 만든 GelGOMA의 인장 강도 그래프이고, 도 8(b)는 다양한 농도의 GO(즉, GelGOMA 01, GelGOMA 02 및 GelGOMA 03)에서 10, 20 또는 30%(w/v) 바이오잉크로 만든 GelGOMA의 압축 강도 그래프이다.

도 9(a)는 떨어지는 500g 철 비드에 대한 20%(w/v) GelGOMA 02 하이드로겔의 유연성, 신축성 및 인성을 보여주는 사진이고, 도 9(b)는 매끄러운 표면에서 20%(w/v) GelGOMA 02 하이드로겔 비드의 탄성 반동의 사진이다.

도 10은 본 발명에 따라 제조된 하이드로겔의 점탄성 특성이고, 도 11은 동등한 농도의 GelGMA 및 GelMAGMA 하이드로겔에 대한 10, 20 및 30%(w/v) GelGOMA 02 하이드로겔의 효소 분해비(degradation ratio, %)이다.

도 12(a)는 GelGOMA 02의 미니어처 인간 두개골 하이드로겔의 사진이고, 도 12(b)는 50㎛ 기공을 가진 GelGOMA 02의 큐브 하이드로겔의 사진이며, 도 12(c)는 GelGOMA 02로 만든 DNA 이중 나선 하이드로겔의 사진이다. 도 12(d)는 GelGOMA 02로 만든 다공성 지지체(공극 크기 50㎛)의 사진이다. 도 12(e)는 GelGOMA 02에서 인쇄된 기공 크기가 <100㎛인 기하학적 구조이고, 도 12(f)는 GelGOMA에서 인쇄된 Auguste Rodin 복제의 사상가 사진이며, 도 12(g)는 GelGOMA 02의 마이크로 인간 손 모양으로 인쇄된 하이드로겔의 사진이며, 도 12(h)는 GelGOMA 02의 측정 눈금자 하이드로겔의 사진이다.

도 13은 전도성 하이드로겔로 GelGOMA를 사용한 LED 조명으로, (a)는 HALYM2021을 형성하기 위해 특별히 배열된 LED 전구를 밝히기 위해 GelGOMA 하이드로겔로 대체된 전도성 강철이 있는 브레드 보드의 사진이고, (b)는 저전압인 2V에서 배치된 LED 조명의 저조도 조명이며, (c)는 고전압인 4V에서 배치된 고휘도 LED 조명이다.

도 14(a)는 실시간 증식 모니터링을 위해 GelGOMA 하이드로겔 용출액에서 배양된 인간 진피 섬유아세포(HDF)의 이미지로, 인간 진피 섬유아세포를 FITC에 대해 PKH67로 표지하고 명시야(BF)로 표지되지 않은 HDF로 표지함으로써 세포 증식을 관찰한 것이고, 도 14(b)는 그림 14B는 공초점 현미경으로 관찰한 GelGOMA 하이드로겔 내부 HDF의 생존 가능성을 보여주는 사진이며, 도 14(c)는 HDF 증식 및 GelGOMA 세포적합성의 정량화를 나타낸다. 이때, (i)는 실시간 GelGOMA 하이드로겔 용출액 테스트에서 세포 수의 계산 결과이고, (ii)는 GelGOMA의 세포 적합성을 확인하기 위한 하이드로겔 캡슐화된 HDF의 CCK-8 분석 결과이다.

도 15(a)는 GelGOMA 하이드로겔에서 전기감수성 세포의 분화의 증거로서 C2C12 분화의 관찰을 위한 미오신 중쇄(MHC) 면역형광 염색 결과이고, 도 15(b)는 GelGOMA 하이드로겔에서 전기감수성 세포의 분화의 증거로서 신경

분화를 보여주는 Neuro2a의 알파-튜불린 면역형광 염색 결과이며, 도 15(c)는 고배율에서 GelGOMA 하이드로겔(화살표는 신경돌기를 가리키는 화살표)에서 Neuro2a 세포의 많은 신경돌기 성장의 고배율 관찰 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 통해 상세히 설명하기에 앞서, 이건 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 밝혀둔다.

[0047] 이건 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.

[0048] 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다.

[0049] 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0050] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명의 명세서에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0051] 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은, 하이드로겔로 제조될 때 천연 유래 고분자의 물리적 특성의 단점을 해결하기 위한 것이다. 이하의 본 발명의 명세서에서는, 젤라틴의 이중 메타크릴화를 기반으로 한 초강력 하이드로겔을 얻는 방법, 천연 고분자를 나노충전재로 사용, 화학적으로 연결된 GO를 갖는 고분자의 전기전도도를 향상시키는 방법에 대하여 좀 더 구체적으로 설명하고자 한다.

[0053] 젤라틴에는 화학적 변형에 사용할 수 있는 아미노, 히드록실 및 카르복실 작용기가 존재한다. 젤라틴 분자의 아미노 그룹과 메틸아크릴레이트(MA)의 반응 후, 나머지 하이드록실 및 카복실 그룹은 GMA와 함께 산성 환경에서 추가 반응에 사용될 수 있다.

[0054] 도 1에서 확인되듯이, 먼저 GelMA 매크로머를 합성한 후, GelMA 매크로머 용액을 사용하여 GelMAGMA를 합성하였다. 도 2(a)의 FT-IR 스펙트럼은 각각 1645, 1513 및 1229 cm^{-1}에서 뚜렷한 아미드 I, II 및 III의 존재를 보여주었다. 메타크릴레이트화된 샘플에서 약 1295cm^{-1}의 새로운 흡수 피크는 C-N 아미드 결합의 존재를 의미한다. 젤라틴에 대한 GMA의 결합은 δ= 2.9 ppm에서 라이신 잔기 피크의 감소 및 δ= 6.2 - 6 및 5.8 - 5.6 ppm에서 메타크릴레이트 비닐기 피크의 증가에 의해 확인될 수 있다. 메틸기 피크는 δ= 1.8ppm에서 나타났으며, 메타크릴레이트 그룹의 양성자는 1H-NMR 스펙트럼에 표시된다(도 2(b) 참조)

[0055] 생체 복합물의 응집 및 침전은 접합이 좋지 않음을 의미한다. 고분자 백본에서 GO-COOH 입자의 상호작용과 분산 거동을 확인하기 위해, 도 3과 같이 분산 시험을 수행하였다. 이때 증류수(DW)에 녹인 5mg/mL 스폰지 용액을 상온에 방치하였다. 메타크릴레이트 폴리머 용액에서 나노입자의 침강, 분산 및 분포를 확인하기 위해 시간에 따라 사진을 촬영하였다. 몇 시간 동안 방치하면 물리적으로 혼합된 그룹에서 고분자 백본과 나노복합체 사이의 침강 및 상 분리가 관찰되었다.

[0056] 도 4(a)와 (b)의 SEM 이미지를 통해 GO가 결합된 GelGOMA의 다공성 구조를 확인할 수 있다. 상기 도 4(a)와 (b)의 결과에서 확인되듯이, GO가 결합된 GelGOMA의 다공성 구조는 세포의 증식을 도울 수 있고, 하이드로겔의 물성을 높일 수 있는 효과가 존재함을 의미한다.

[0057] 도 5 및 표 1의 EDX를 통한 표면 조성 분석 결과에 따르면, 탄소의 원자%가 최대 57.87% 및 최소 51.07%의 값을 가짐을 보여준다. 산소는 22.0% 이상 41.21% 이하; 질소 값은 모든 샘플에서 최대 24.33% 및 최소 19.99%를 나타내었다. 이러한 산소 감소는 전기 전도도에 대해 비편재화된 전자의 가용성을 의미한다.

표 1

[0059]

	GO	SGMA	GelGMA	GelMAGMA	GelGOMA 01	GelGOMA 02	GelGOMA 03
C	57.87	53.28	51.07	52.07	54.79	55.81	57.83

N	-	19.99	24.33	24.33	21.35	20.96	20.08
O	41.21	26.73	24.60	23.60	23.86	23.23	22.0
Total	99.08	100	100	100	100	100	100

[0060] [탄소/질소/산소 중량비 및 원자 백분율 표]

[0062] 본 발명에서는 하이드로겔의 향상된 전기 전도도를 구현하였다. GO와 GelMAGMA의 접합 과정을 통한 산소 제거는 비편재화된 전자가 겔 매트릭스를 통해 자유롭게 이동할 수 있는 짝을 이루지 않은 전자와 중첩 궤도를 생성하여 전기적 활성을 증가시킨다.

[0063] 수정된 전기 임피던스 분광법(EIS)으로 전도도를 확인하였다. 4-프로브 절연 셀 모델은 3D 인쇄 절연 몰드에 각 면에 5개씩 총 10개의 금으로 코팅된 스테인리스 전극을 장착하였다. 셀의 각 측면에 있는 5개의 바늘 모양 전극은 전류를 제공하는 4개의 외부 전극과 전압을 측정하는 1개의 중앙 전극으로 구성된다(도 6a 참조).

[0064] 하이드로겔 전도도 측정은 신뢰성을 높이기 위해 C-F 및 I-V 방법을 모두 사용하여 수행하였다. 먼저 C-F 방식에서는 20Hz ~ 2 x 10^5Hz 범위에서 측정하였으며, 그 결과, 측정된 모든 하이드로겔은 어느 일정 시점에서 주파수와 무관하게 일정한 값을 나타내었다. GelGOMA 그룹과 GelGOMA_SF 그룹 모두 GO가 없는 최소 전기 전도성 하이드로겔과 비교하여 최대 약 100배의 전도도 차이를 나타내었다(도 6(b) 및 6(c) 참조).

[0065] 또한, 하기의 표 2에서 확인되듯이, GO와 연결된 하이드로겔과 GO와 연결되지 않은 하이드로겔 사이의 전도도 차이는 약 9~100배 범위임을 알 수 있다. 반대로 저항값은 경우에 따라 전도도와 대조적으로 최소 7배에서 최대 400배의 차이를 나타내었다.

표 2

[0066]

	SGMA (S/mm)	GelGMA (S/mm)	GelMAGMA (S/mm)	GelGOMA 02_SF (S/mm)	GelGOMA 02 (S/mm)
10%	0.0026 ± 7.1 × 10^{-6}	0.0029 ± 9.3 × 10^{-6}	0.00050 ± 3.9 × 10^{-7}	0.0142 ± 4.4 × 10^{-5}	0.015 ± 2.4 × 10^{-5}
20%	0.0020 ± 3.2 × 10^{-6}	0.0016 ± 8.6 × 10^{-7}	0.0006 ± 1.8 × 10^{-5}	0.0101 ± 7.4 × 10^{-5}	0.0121 ± 1.7 × 10^{-5}
30%	0.0017 ± 8.7 × 10^{-6}	0.0011 ± 7.0 × 10^{-8}	0.0005 ± 1.2 × 10^{-5}	0.0097 ± 1.4 × 10^{-5}	0.0097 ± 4.2 × 10^{-5}

[0067] [하이드로겔의 비교 전기 전도도 요약표]

[0069] 본 발명의 주요 특징들 중 하나로 하이드로겔의 신축성 및 강도를 들 수 있으며, 압축, 인장 및 반복 시험을 통해 제작된 구조물의 기계적 강도를 확인하였다. 압축강도와 인장강도 모두 파단점에서의 응력과 변형률을 최대 강도로 취하였다(도 7 내지 도 11 참조).

[0070] 적어도 인장 강도는 277.95, 308.91, 406.42 및 454.33kPa일 수 있으며, 일부 예에서 인장 강도는 최대 364.39kPa, 476.6kPa, 755.67kPa 및 846.87kPa를 나타내었다. 압축 응력은 경우에 따라 최대 756.984kPa, 822.342kPa, 1602.738kPa 및 2226.076kPa일 수 있다. 일부 예에서 압축 응력은 적어도 296.55kPa, 363.86kPa, 863.313kPa 및 1090.603kPa일 수 있다.

[0071] 주기적 테스트(cyclic test)의 경우, 하이드로겔이 30%(w/v)의 고농도를 제외하고 연속 10회 동안 55% 및 90% 신장 또는 압축 후에 초기 구조를 회복한다는 것을 확인하였다.

[0072] 표 3 및 4의 인장강도 및 압축강도 결과 모두 GO의 농도가 증가할수록 강도는 증가하나 일정량 이상의 GO를 첨가하면 물성이 저하되는 것을 확인할 수 있었다.

표 3

[0073]

KPa	GelGOMA 01	GelGOMA 02	GelGOMA 03
10%	402.49 ± 16.3	406.42 ± 9.7	396.75 ± 12.5
20%	621.6 ± 12.9	652.28 ± 13.8	489.63 ± 18.4
30%	715.75 ± 20.5	755.67 ± 23.1	580.41 ± 27.2

[0074] [다양한 GO 농도에서 GelGOMA의 인장 강도 측정 결과]

표 4

[0075]

KPa	GelGOMA 01	GelGOMA 02	GelGOMA 03
10%	796.979 ± 26.8	863.313 ± 10.8	760.886 ± 19.1
20%	1079 ± 31.5	1103.285 ± 50.3	850.632 ± 47.4
30%	1661 ± 13.7	1602.738 ± 19.3	1243.756 ± 23.2

[0076] [다양한 GO 농도에서 GelGOMA의 압축 강도 측정 결과]

[0078] 모든 군에서 저장탄성률(G')이 손실탄성률(G'')보다 큰 결과를 나타내었는데, 이는 모든 그룹의 하이드로겔이 엘라스토머 물질의 거동을 나타냄을 의미한다. 초강력 하이드로겔은 100kPa 범위 내에서 가교 정도를 나타내는 인상적인 저장 모듈러스를 가지고 있으며, 구조적 무결성을 손상시키지 않으면서 강력한 신축성을 갖고 있음을 의미한다.

[0079] GelGOMA 바이오 잉크를 사용하여 제작된 모든 구조는 CAD 설계 모양으로 높은 정확도로 인쇄되었다(도 12 참조). 예를 들어 인간의 두개골 모양의 구조에서는 뼈의 만곡과 미세한 치아의 모양이 구현되었고, DNA 이중나선 구조는 지지대 없이도 100㎛ 이하의 구멍이 있는 가로 구조를 구현할 수 있었다. 또한 불규칙한 구조로 다양한 방향으로 존재하는 직경 30~100㎛의 기공을 인쇄할 수 있었으며, 20~30㎛의 두께로 사람 손 모양의 손가락 부분에 해당하는 구조를 구현할 수 있었다.

[0080] 또한, 1cm 미만의 사람 손 모양으로 규칙적인 공극 구조, 굴곡, 등 근육의 관절 표현이 완벽하게 표현되었다. 본 발명의 발명자들은 화학적으로 연결된 GO의 존재로 인해 광개시제를 사용하지 않고도 모든 제조된 구조에 대한 상세한 미세 기공을 달성할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0081] 본 발명의 명세서에서 제시하고 있는 하이드로겔의 또 다른 장점은 전기 민감성 조직 재생을 위한 지지체에 관한 것을 들 수 있다. Myoblast cells (C1C12) 및 neuroblast cells (Neuro2a)는, 예시적으로 사용될 수 있는 근육 및 뉴런 조직의 전기감수성 세포이다. GelGOMA의 기계적 및 전기전도성 특성은 도 15(a) 내지 (c)에 제시된 것처럼, 각각 C1C12 및 Neuro2a에서 근관 및 신경돌기 파생물의 발현에 의해 입증된 근육 및 뉴런 조직으로 이러한 세포의 분화 및 성숙을 가능하게 한다.

[0083] **[실시예 1] SF 나노섬유의 제조 (Fabrication of SF nanofiber)**

[0084] Bombyx mori의 실크 고치(silk cocoons)는 고무줄을 제거하고 고무줄을 제거한 실크는 일정한 교반 하에 2시간 동안 60℃에서 40%(v/v) H_2SO_4로 가수분해되었다. 가수분해 반응은 DW로 5배 희석하여 종결하고, 중성 pH가 될 때까지 10,000rpm에서 원심분리하여 반복적으로 세척하였다.

[0085] 가수분해 후, 얻어진 수불용성 실크 피브로인을 0.1%(w/v)의 증류수(DW)에 현탁시켰다. 그 후, 300W 및 19.5kHz에서 15분 동안 작동되는 균질화기 프로브(f=13mm)를 통해 초음파 균질화기에 의해 아이스 배스에서 기계적으로 소화되었다. 균질화를 3회 반복하여 유백색의 SF 나노섬유 용액을 얻었다. 기계적 분해 후 4000rpm에서 15분간 원심분리하여 제세동된 실크 피브로인을 얻었다. DW의 SF 나노섬유 분산액은 추가로 사용할 때까지 4℃로 유지시켰다. SF 나노섬유는 초강력 하이드로겔의 기계적 특성을 더욱 강화하기 위한 나노충전제로 사용될 수 있다.

[0087] **[실시예 2] 젤라틴의 메타크릴화(Methacrylation of gelatin)**

[0088] 천연 고분자의 기능화는 조정 가능한 하이드로겔을 제조하는 과정에서 매우 중요하다. 본 발명에서는 천연 젤라틴 바이오폴리머를 메타크릴레이트에 의해 개질하였다. 본 발명에서 제시하는 일반 하이드로겔과 초강력 하이드로겔과의 비교 실험을 위하여 본 발명에서는 단일 메타크릴레이트 젤라틴을 함께 고려하였다.

[0089] GMA를 통해 단일 메타크릴레이트 젤라틴(GelGMA)을 생성하였다. 여기서 젤라틴은 50℃에서 DW(Deionized Water)에 지속적으로 교반하면서 용해시켜 2%(w/v)의 젤라틴 용액을 준비하였다. 이후, 24시간 동안 10mL의 GMA로 메타크릴화 시켰다. GelGMA 용액을 40℃에서 DW에 대한 투석으로 후처리한 후, -80℃에서 동결하고 3일 동안 동결건조한 후, -20℃에서 사용할 때까지 보관하였다.

[0090] 여기까지가 이중 메타크릴레이트 젤라틴(GelMAGMA)의 합성 과정에서, 초강력 하이드로겔 제조하는 첫 번째 단계이다(1차 메타크릴레이션).

[0091] GelMA는 50℃에서 DW에서 제조된 3%(w/v) 젤라틴 용액과 7mL 메타크릴레이트 무수물(MA)을 반응시켜 1차 합성한 이후, MA의 소수성 특성을 고려하고, 적절한 혼합을 보장하기 위해 MA를 일정한 교반 하에서 천천히 첨가했다. 1차 메타크릴화 3시간 후, 10mL GMA를 첨가하기 전에 용액의 pH를 1M의 HCl을 사용하여 3.5로 조정한 이후, 반응을 24시간 동안 일정한 교반 하에 50℃에서 진행하였다.

[0092] 2차 메타크릴화는 40℃의 진탕 배양기에서 7일 동안 12-14 kDa의 투석 막을 통해 DW에 대한 GelMAGMA의 투석으로 완료되으며, 정제된 GelMAGMA 용액을 냉동하고 3일 동안 동결건조한 다음 추가로 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0094] **[실시예 3] 카르복실화 및 카르보디이미드화 반응(Carboxylation and carbodiimidation reactions)**

[0095] GelMAGMA-GO 생체복합체(GelGOMA)의 합성은 투석에 의한 정제 전 GELMAGMA에 대하여 앞서 실시예 2에서 언급된 방법의 후속 단계이다. GelMAGMA 2차 메타크릴화가 완료되기 직전에, 5mL DW에서 제조된 1, 2 또는 3mg/mL GO(Fine Chemicals, S. Korea) 현탁액을 1시간 동안 초음파 처리하여 GO의 카르복실화를 진행하였다.

[0096] 이후, 1.2g의 수산화나트륨(NaOH)과 1g의 클로로아세트산($ClCH_2COOH$)을 3시간 동안 연속 초음파 처리 조건에서, 각 GO 현탁액에 첨가하였다. 이렇게 생성된 카르복실화된 GO(GO-COOH) 용액을 DW에서 반복적인 현탁액 및 원심분리에 의해 세척하였으며, GO 카르복실화는 카르복실-아미노 접합을 통해 GelMAGMA에 결합하는 GO의 반응 부위를 증가시키게 된다. 따라서, GO 표면 상에 존재하는 대부분의 히드록실 작용기는 이러한 과정을 통해 카르복실기로 전환될 수 있다.

[0097] GO-COOH의 카르복실기의 활성화는 2mg/mL N-hydroxylsuccinimide(NHS) 및 4mmol/L of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)-carbodiimide hydrochloric acid (EDC)를 어둠 속에서 지속적으로 교반하면서 GO-COOH 용액으로, mercaptoethanol로 종결되기 전에 반응을 밤새 방치하였다. 활성화된 GO-COOH(1, 2 및 3mg/mL) 용액과 정제되지 않은 GelMAGMA 간의 카르보디이미드화 반응(Carbodiimidation reaction)은 일정한 교반 하에 24시간 동안 둥근 바닥 플라스크에서 동일한 부피의 두 반응물을 혼합함으로써 종결시켰다. GelMAGMA와 1, 2 또는 3mg/mL GO-COOH 용액의 카르보디이미드화 반응(Carbodiimidation reaction) 결과물을 이하에서는 각각 GelGOMA01, GelGOMA02 또는 GelGOMA03이라 지칭하기로 한다. 이렇게 카르보디이미드화 반응이 수행된 GelGOMA 용액을 7일 동안 진탕 배양기에서 40℃의 따뜻한 물에 대해 투석하였다. 투석된 용액을 필터(miracloth)로 여과하고, 응집체를 제거하기 위해 원심분리기로 동결, 동결건조하고 -20℃에서 보관하였다.

[0099] **[실시예 4] 하이드로겔의 특성화(Characterization of hydrogels)**

[0100] GelGMA의 메타크릴화, GelMAGMA의 이중 메타크릴화 및 GelGOMA의 카보디이미드화를 확인하기 위해, Bruker Analytik GmbH사의 Bruker DPX FT - NMR Spectrometer(9.4T)를 이용하여 400MHz에서 양성자 핵자기공명(H1-NMR)을 수행하였다. 중수소(D20)를 사용하여 GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMAs 스폰지에서 5 mg/ml 샘플 용액을 준비하였다. 모든 샘플 용액은 분석 전에 0.45㎛ 주사기 필터로 여과시켰으며, ACD/NMR 프로세서 소프트웨어는 관심 스펙트럼을 측정하기 전에 기준선 보정에 사용되었다.

[0101] 젤라틴에 대한 GMA의 공유 결합은 이중 메타크릴레이트 그룹에서 더 높은 메타크릴레이트 비닐 및 메틸 피크의

출현을 통해 확인되었으며, 이중 메타크릴화 그룹에서 라이신 피크의 감소가 현저하게 감소하였다. GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMAs 스폰지의 제조에서 발생하는 그래프트 공중합 반응을 Frontier PerkinElmer로 확인하였다. 전계 방출(SEM)로 제작된 스폰지의 표면 형태를 관찰한 반면 FT-IR의 경우 브롬화칼륨으로 연마하여 FT-IR 스펙트럼을 얻은 샘플을 준비했으며, 금/팔라듐(gold/palladium) 코팅된 샘플을 사용하여 SEM 결과를 확인하였다.

[0102] GO-COOH의 환원은 제작된 하이드로겔에 전기전도성을 부여하므로, 금/팔라듐 코팅된 샘플을 EDX 매핑에 사용하여 GelMAGMA에 대한 공유 결합 시 GO-COOH의 감소율을 결정하였다. amide I, II 및 III의 출현은 FT-IR 스펙트럼에서 그래프트 공중합을 의미한다(도 2(a) 참조).

[0103] 테스트 샘플은, 스폰지+GO 그룹, 스폰지+GO-COOH 그룹 및 GelGOMA 그룹의 총 세가지 그룹으로 구분하여 제조되었다. 좀 더 구체적으로는 스폰지+GO 그룹은 GO, GelGMA + GO, SGMA + GO 및 GelMAGMA + GO를 포함하고, 스폰지+GO-COOH 그룹은 GO-COOH, SGMA + GO-COOH, GelGMA + GO-COOH 및 GelMAGMA + GO-COOH를 포함하며, GelGOMA 그룹은 GelGOMA 01, GelGOMA 02 및 GelGOMA 03으로 구성된다.

[0104] 스폰지+GO 그룹과 스폰지+GO-COOH 그룹의 경우에는, GO 또는 GO-COOH를 DW에 분산시켜 2 mg/mL 농도를 만들고 SGMA, GelGMA 또는 GelMAGMA 스폰지를 5 mg/mL의 농도가 되도록 용해시켰다. 이 그룹은 스펀지와 GO 또는 GO-COOH의 물리적 혼합을 포함하므로 물리적 혼합 그룹에 해당하며, 스폰지 없이 2 mg/mL 농도의 GO 및 GO-COOH를 대조군으로 포함되었다.

[0105] 세번째의 GelGOMA 그룹은, carbodiimidation 반응을 통해 GelGOMA에 GO-COOH의 공유 결합이 존재하므로, 화학 그룹에 해당한다. 5 mg/mL 농도의 DW에 GelGOMA 01, GelGOMA 02 또는 GelGOMA 03 스폰지를 용해하여 화학 그룹 용액을 제조하였고, 모든 시료 용액을 유리 바이알에 옮겨 상온에서 관찰하고 간격을 두고 샘플 이미지를 촬영하였다(도 3 참조).

[0106] 본 발명에서는, DLP 프린터에 사용될 수 있도록 광중합 특성을 갖는 유세포 혹은 무세포 바이오 잉크를 제공할 수 있다. 이중으로 메타크릴화된 다양한 농도의 합성 바이오잉크는, 광개시제의 존재 하에서 광경화 가능하게 되므로 하이드로겔 제조용 DLP 프린터에 적합하다. 일 실시예로 본 발명에서는, lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate(LAP)는 세포 및/또는 무세포 하이드로겔 제조를 위한 광개시제로 사용되었다. 무세포 하이드로겔 제작을 위해 0.3%(w/v)의 LAP 용액을 인산염 완충 식염수를 사용하여 제조하였고, 이후, 메타크릴화된 스폰지를 0.3%(w/v) LAP 용액에 완전히 용해시킨 후, 진공 믹서를 사용하여 10, 20 또는 30%(w/v) 농도의 바이오 잉크를 제조하였으며, 40℃에서 잠시 유지하였다. 본 발명의 명세서 내에서 언급되는 히드로겔 농도는, 이들이 제조되는 바이오잉크의 농도를 의미한다. LAP 및 바이오잉크의 농도는 다양하게 변화될 수 있으며, 적용 대상 및 기타 요인에 따라 변화될 수 있다. 용해된 바이오잉크를 40㎛ 나일론 메쉬 셀 스트레이너(nylon-mesh cell strainer)를 사용하여 여과하여 불순물을 제거하였다.

[0107] 세포 캡슐화 하이드로겔의 경우, 0.3%(w/v) LAP 용액을 무혈청 DMEM에서 멸균 조건에서 제조하였으며, LAP 용액을 0.22㎛ 주사기 필터로 여과한 후, 메타크릴화 스폰지를 진공 믹서를 통해 용해시켰다. 스폰지의 찌꺼기 혹은 불순물은 셀 스트레이너로 제거하고 바이오잉크를 60℃에서 30분 동안 저온 살균하였다.

[0109] **[실시예 5] 하이드로겔의 제조 및 특성**

[0110] 바이오 잉크의 광중합은, 바이오 친화적인 파장인 365 nm에서 UV 소스를 사용하여 DLP 프린터로 수행되었다. 원하는 CAD(Computer-Aided Design) 모델을 DLP 프린터로 내보내기 전에 바이오프린터의 슬라이서 소프트웨어에 스테레오리소그래피(STL) 파일로 변환하였다. 우수한 하이드로겔 구조를 얻기 위해 프린팅 파라미터를 선택하였으며, 이 과정에서 GelGOMA 하이드로겔 제작에 사용된 프린팅 파라미터는 표 5에 정리하였다.

표 5

[0112]

	층 두께	바닥 층 경화 시간	경화 시간	자외선 빛 세기
GelGOMA	50 ㎛	2.5 sec	2.5 sec	4.79 mW cm^{-2}

[0113] [DLP 프린팅 파라미터]

[0115] 경우에 따라 상기 프린팅 파라미터들을 일부 변경하여 최선의 결과를 얻을 수도 있는데, 이는 다른 요인들 중에서도 바이오 잉크의 특성에 따라 변화될 수 있기 때문이다. 바이오 잉크를 바이오 프린터에 공급하여 층별 자동화된 광중합을 진행하였으며, 프린팅 후 하이드로겔을 PBS로 헹구어 경화되지 않은 바이오잉크를 제거하였다. DLP 프린터는, 바이오 프린터 중에서도 설계된 구조의 반복성을 보장하는 강력한 수단이며, GelGOMA 바이오잉크의 복잡한 구조 프린팅성을 이러한 맞춤형 DLP 프린터로 조사하였다. 미세다공성 지지체, 로댕의 생각하는 사람, DNA 이중나선, 미터법, 사람 손과 같은 미세 및 나노 크기의 복잡한 구조를 SolidWorks로 모델링하고 CAD를 STL 파일로 DLP 프린터에 전송하였다. 25%(w/v) 광경화성 GelGOMA 바이오잉크를 사용하여 앞서 설명한 모든 구조를 프린팅하였으며(도 12 참조), 이렇게 얻어진 3D 구조는 강력한 기계적 특성과 구조적 무결성을 보여주었다.

[0116] 본 발명의 주요한 특성 중 하나는 하이드로겔의 기계적 강도이며, 실시예에 따른 GelGOMA의 개선된 강도, 탄성 및 생체적합성은 프린팅된 하이드로겔의 물리적 특성화를 통해 확인되었다. 초강력 하이드로겔의 유변학적 특성 확인은 Anton Paar MCR 302를 사용하여 수행되었고, 이러한 레오미터에는 Peltier 요소, 자동 온도 조절 후드 및 샌드블라스트 유형 기하학(PP25, 25mm 직경)이 장착되었다.

[0117] 점탄성 분석은 직경 25mm 및 두께 2mm의 디스크 모양 하이드로겔 샘플에서 수행되었고, 주파수 스위프(frequency sweep) 측정에서 동적 계수는 전단 변형률을 1%로 일정하게 유지하면서 0.1 ~ 100rad/s의 주파수 범위에서 측정되었다. 응력-변형률 곡선과 주기적 응력-변형률 곡선을 얻기 위해 10kgf 로드셀이 장착된 만능 시험기(UTM)를 사용하였고, 압축 테스트를 위해 DLP 프린터에서 직경 8mm(d) 및 두께(t) 10mm 하이드로겔 디스크를 사용하였으며, 각 하이드로겔에 대하여 10mm/min의 속도로 압축력을 가하였다.

[0118] 한편, 15mm 길이(l), 10mm 너비(w), 2mm t의 오목 기둥을 갖는 개뼈 모양의 하이드로겔의 인장 강도를 결정하기 위해 샘플이 파손될 때까지 10mm/min의 인장 속도로 인장 지그를 이동시켰다. 최대 변형률의 100%, 90%, 80%에서 반복적인 압축 및 인장 시험을 수행하였으며, 50 mm/min의 속도로 각 하이드로겔 샘플에 대해 Load-Unloading 주기를 10회 수행하였다. 기계적 및 유변학적 분석을 위한 모든 하이드로겔 샘플은 앞서 설명한 것처럼, DLP 바이오프린터를 통해 10, 20 또는 30%(w/v) 바이오잉크로 프린팅되었습니다. GelGOMA 하이드로겔이 기존 하이드로겔의 문제점을 해결할 수 있는 특성을 나타내었지만, GelGOMA 물리적 특성을 추가로 더 개선하였다.

[0119] GelGOMA_SF 하이드로겔을 제공하기 위해 DLP 프린팅 전에 GelGOMA 02 광경화성 용액에 0.1%(w/v) SF 나노섬유를 추가하였으며, 80% 습도 및 주변 온도에서 하이드로겔 프린팅 직후에 테스트를 수행하였다. 또한, 하이드로겔이 갑작스러운 하중 충격을 견디는 능력을 확인하기 위해 철 비드 낙하 테스트도 진행하였다. 10cm에서 500g의 철구슬을 지그에 고정된 7×4×0.3cm(l×w×t) 30%(w/v) GelGOMA_SF 하이드로겔에 떨어뜨렸다. 추가적으로, 30%(w/v) GelGOMA _SF 하이드로겔의 직경 1cm 비드를 30cm 높이에서 매끄러운 표면으로 떨어뜨려 초강력 하이드로겔의 탄성을 확인하였다. 고속 카메라를 사용하여 고정된 거리에서 철 비드와 하이드로겔 비드의 튕김 현상을 기록하였으며, GelGOMA와 철 비드를 사용하여 하이드로겔 강도, 연신율, 탄력성 및 반발 높이의 시각적 분석을 수행하였다.

[0121] **[실시예 6] 하이드로겔의 분해**

[0122] 본 발명에 따른 초강력 하이드로겔을 조직 공학적 응용을 검토하기 위해서는 생분해성 분석이 필요하다. DLP 프린터를 사용하여 10, 20 또는 30%(w/v) GelGOMA 02, GelMAGMA 및 GelGMA 바이오잉크에서 직경 10mm 및 두께 4mm의 하이드로겔 디스크를 제조한 후, 각 하이드로겔에 대하여 세 개의 샘플을 30일 동안 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 PBS로 제조된 2U Pronase E 용액에서 배양하였다.

[0124] **[실시예 7] 하이드로겔의 전기적 특성**

[0125] 전류 흐름과 연결부의 접촉으로 인한 전기 저항을 제거하기 위해 4-프로브 측정이 적용되었다. 사용된 하이드로겔은 10%, 20% 또는 30% 농도에서 SGMA, GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMA이며, 하이드로겔을 관통하는 전극의 거리는 1mm이다. 4점 프로브 방법을 사용하여 I-V 스윕 테스트를 수행하였다.

[0126] 먼저, 하이드로겔 테스트 시료에 양단의 외부전극 4개를 1mm 깊이로 연결한 후 -0.01A부터 0.01A까지 5 x 10^{-5}A 간격으로 전류를 스윕 공급하였으며, 중앙 전극을 통해 전압을 측정하였다. I-V 스윕은 Keithley 4200-SCS 파라미터 분석기를 사용하여 측정되었으며 DC 전압을 사용하여 각 재료의 저항 값을 확인하였으며, 전류 스윕 테스트 데이터의 신뢰성을 높이기 위해 AC 전압에서 주파수 스윕 테스트를 수행하였다.

[0127] 전압 및 전류는 Keithley 4200-SCS 파라미터 분석기를 사용하여 제어하고 컨덕턴스는 Agilent 4284 LCR 미터로 각 측정에 대해 20Hz와 200kHz 사이의 주파수를 1000Hz 단위로 스위핑하여 측정하였다. 이때 신호레벨은 0.4V로 설정하였고, I-V를 측정할 때와 달리 양쪽의 중앙 프로브를 제외한 4개의 전극을 모두 연결하여 2-prove 방식으로 측정했다.

[0128] 무납땜 미니 브레드보드를 사용하여 발광 다이오드(LED) 조명으로 GelGOMA의 전기 전도도를 확인하였다. 브레드보드의 전기 전도성 금속 클립은 25%(w/v) 바이오잉크로 인쇄된 GelGOMA 하이드로겔로 교체하였으며, 브레드보드에 LED를 배열된 패턴으로 고정하고 암실에서 2V 또는 4V의 전위차를 인가하였다(도 13 참조).

[0130] **[실시예 8] 하이드로겔의 생체적합성**

[0131] 본 발명의 또 다른 구체적 특징은 하이드로겔의 생체적합성이다. 초강력 하이드로겔과 그 용출액의 세포적합성 및 세포 증식 가능성을 인간 진피 섬유아세포(HDF) 세포로 분석하였다.

[0132] HDF 세포는 10%(v/v) 소태아혈청(FBS) 및 1%(v/v) 페니실린-스트렙토마이신(P/S)을 포함하는 고 포도당 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM)에 시딩하였으며, 2D 및 3D 세포 배양 모두에 대한 하이드로겔 생체 적합성 효과를 확인하였다. 2D 세포 배양을 위해 2mL의 25%(w/v) 광경화성 GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMA02를 6웰 플레이트에 준비하고 10초 동안 UV 처리한 후, 10mL의 완전한 DMEM을 각 하이드로겔에 첨가하고 37° C의 5% CO2 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 72시간 인큐베이션 후, 하이드로겔 용출액을 추출하고 2D HDF 세포 배양을 위해 멸균 여과하였다. 그 후, HDF 세포를 완전한 DMEM과 함께 5000개 세포/웰로 24-웰 플레이트에 시딩하였으며, 세포 부착 후 배양 배지를 200㎛의 하이드로겔 용출액으로 교체한 후, 다음 24시간 동안 배양을 계속하였다.

[0133] 세포 생존율은 제조업체의 프로토콜에 따라 CCK-8 분석으로 검사되었다. 동시에, INCELL 2200 이미징 시스템을 통해 bright-field(BF) 및 녹색 형광 필드(Fluorescein isothiocyanate; FITC)에서 24시간 동안 실시간 세포 증식을 관찰하였다. 형광 이미징을 위해 HDF 세포를 PKH67 염료로 표지하였으며, 표지/비표지 HDF 세포를 6웰 플레이트에 10,000개 세포/웰의 농도로 접종하였다. 배양 배지는 INCELL 배양 챔버에서 24시간 동안 배양하기 전에 각 샘플의 하이드로겔 용리액으로 변경되었으며, 분석은 INCELL 개발자 소프트웨어에 의해 수행되었다.

[0134] 3D 세포 배양을 위하여, HDF 세포를 3D DLP 바이오프린팅을 통해 25%(w/v) GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMA 하이드로겔에 캡슐화 하였다. 간단히 요약하면, passages 4-5에서 HDF 세포를 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 분리하여 계수한 후, 1x10^{6} 세포/mL 농도에서 각각의 바이오 잉크에 재현탁시켰다. 바이오잉크는 앞서 설명한 멸균 조건에서 25%(w/v) 농도의 무혈청 DMEM을 함유하는 LAP(0.3% w/v)에 용해된 GelGMA, GelMAGMA 및 GelGOMA 스폰지로부터 제조되었다. 그 후, 세포가 로딩된 바이오잉크 용액을 멸균 조건에서 DLP 바이오프린터에 도입하였다. 세포 캡슐화 인쇄 구조를 표준 세포 배양 조건에서 완성된 DMEM에서 7일 동안 배양하였으며, 일정 시간 간격으로 샘플을 수거하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 캡슐화된 HDF 세포의 세포독성 및 증식은 Live/Dead 및 CCK-8 분석 키트를 통해 각각 평가되었으며, 샘플은 공초점 현미경으로 관찰하였다(도 14 참조).

[0136] **[실시예 9] 전기감수성 세포 분화 및 전체 마운트 하이드로겔 면역형광 염색**

[0137] 전기감수성 세포의 분화에 대한 GelGOMA의 전기전도도의 영향을 조사하기 위해, 불멸화 쥐 근모세포(C2C12) 및 신경모세포(Neuro2a) 세포를 코람 바이오텍에서 구입하였다.

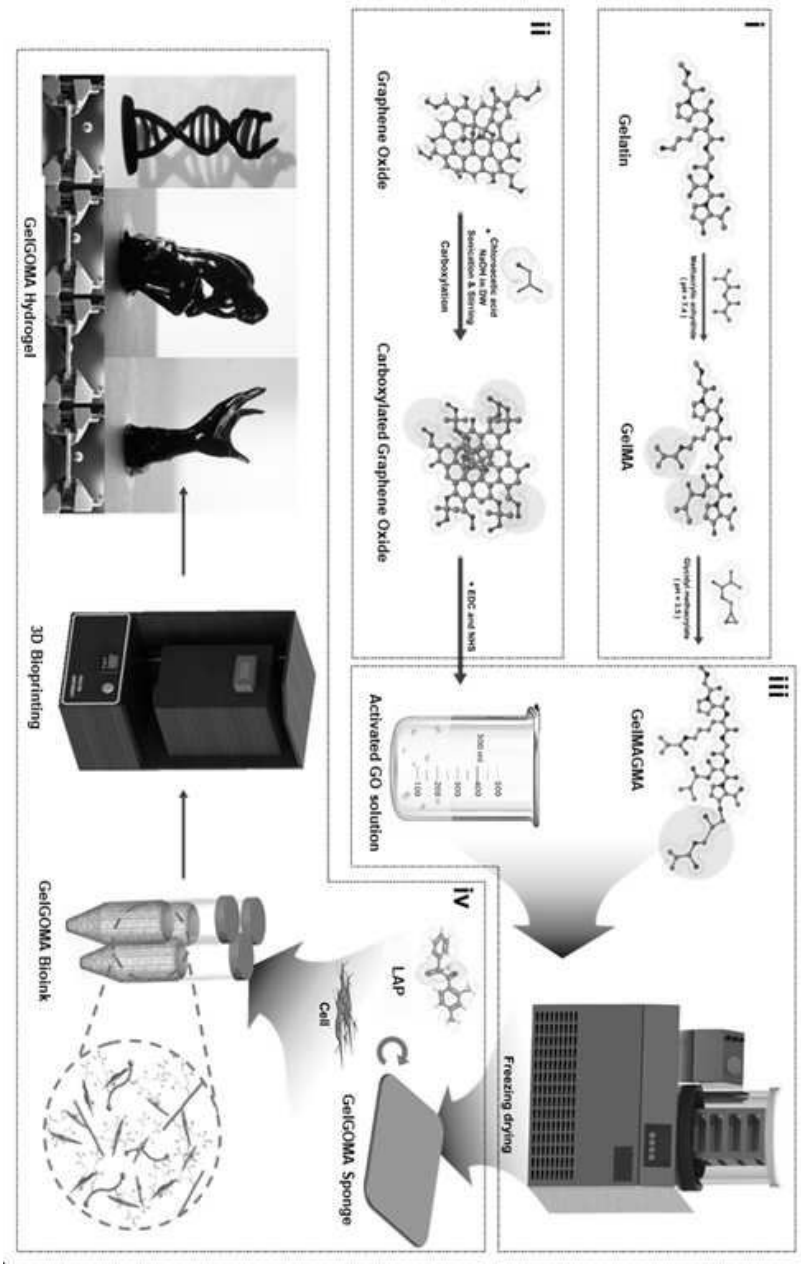
[0138] 10%(v/v) FBS 및 1%(v/v) P/S가 보충된 고 포도당 DMEM은 C1C12의 성장 배지로 사용되었고, 1%(v/v) P/S, 1%가 보충된 고 포도당 DMEM (v/v) 비필수 아미노산(NEAA), 1%(v/v) 피루브산나트륨(NaPyr) 및 10%(v/v) FBS를 N2a 성장 배지에 사용되었다. C2C12 및 Neuro2a는 DLP 프린터를 통해 위에서 설명한 대로 GelGOMA에 캡슐화되었다. 세포가 포함된 하이드로겔을 각각의 성장 배지에서 3일 동안 배양하였고, 그 후 성장 배지를 분화 배지로 변경하였다.

[0139] C1C12의 경우 분화 배지는 저포도당 DMEM, 2%(v/v) 말 혈청(HS; Gibco, Waltham, MA, USA) 및 1%(v/v) P/S를 포함하는 반면 N2a에 대한 분화 배지는 고 포도당 DMEM, 1%(v/v) P/S, 1%(v/v) NEAA, 1%(v/v) NaPyr, 1%(v/v) FBS 및 10 μM 레티노산을 포함한다. 세포 캡슐화 하이드로겔을 소정의 간격을 두고 꺼내어 PBS로 부드럽게 세척하고 4% 파라포름알데히드에서 30분 동안 고정하였다. 전체 하이드로겔은 1 x PBS, 5%(v/v) HS 및 0.5%(v/v) Triton X-100을 포함하는 차단 완충액에서 4℃에서 밤새 투과하였다. 그 후, C1C12 함유 하이드로겔 및 Neuro2a 함유 하이드로겔을 각각 미오신 중쇄 1(MHC; 1:200) 및 α-튜불린(1:200) 1차 항체에서 4℃에서 밤새 배양했다. PBS에서 여러 번 세척한 후 DyLight®550-접합(1:250) 및 FITC-접합(1:250) 이차 항체를 하이드로겔에 첨가하고, DAPI(1:200)로 대조 염색하였다. 스테인드 하이드로겔 이미지는 K1-fluo 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 관찰하였다(도 15 참조).

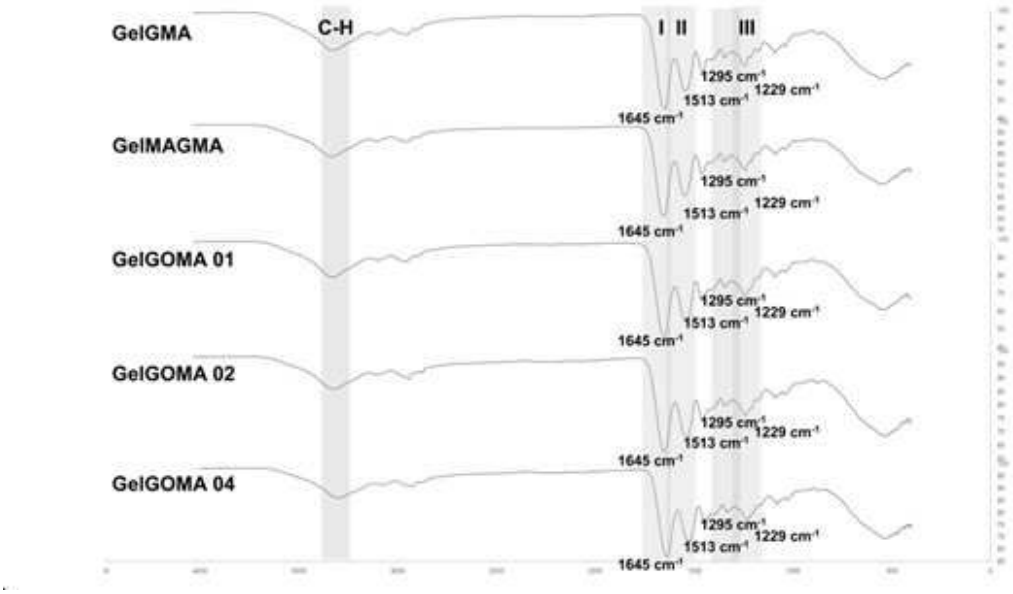
[0140] 이상과 같이 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 형태들을 구체적으로 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서도 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 구체적인 실시 형태들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적이 아닌 것으로 해석되어야 한다.

도면

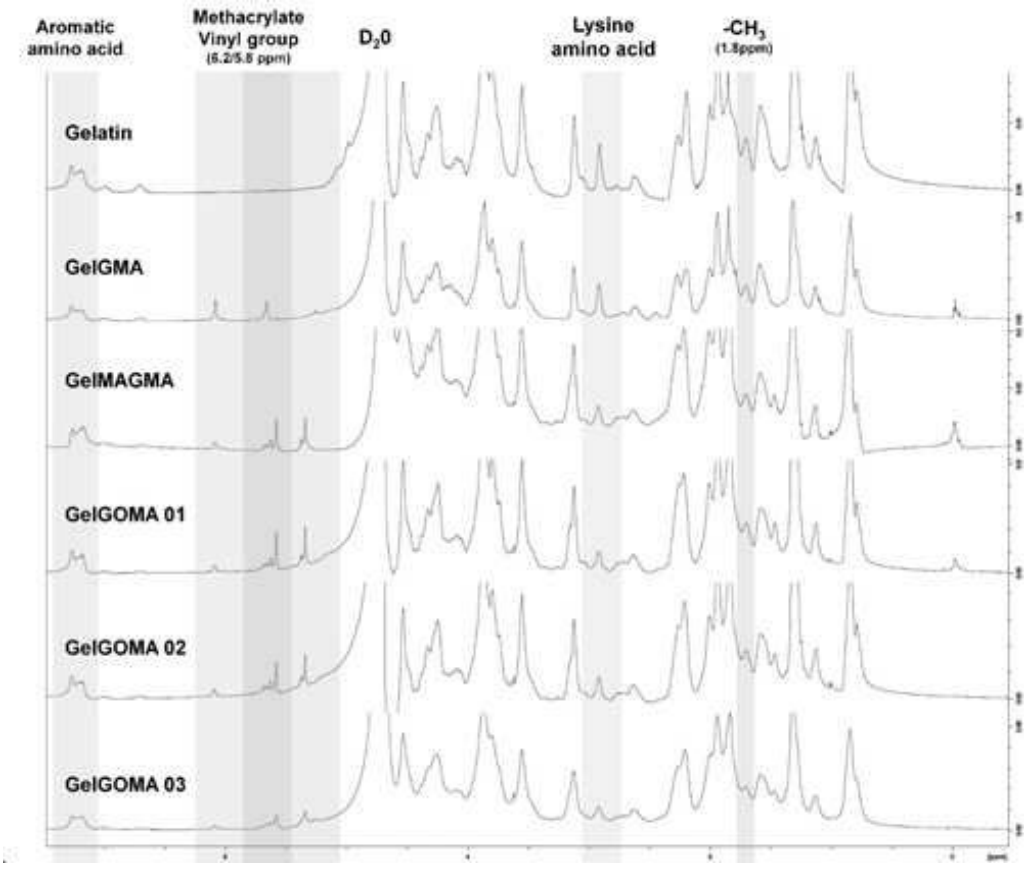
도면1


i
Gelatin
GelMA
ii
Graphene Oxide
Carboxylated Graphene Oxide
iii
GelMAGMA
Activated GO solution
Freezing drying
iv
LAP
Cell
GelGOMA Sponge
GelGOMA Bioink
3D Bioprinting
GelGOMA Hydrogel

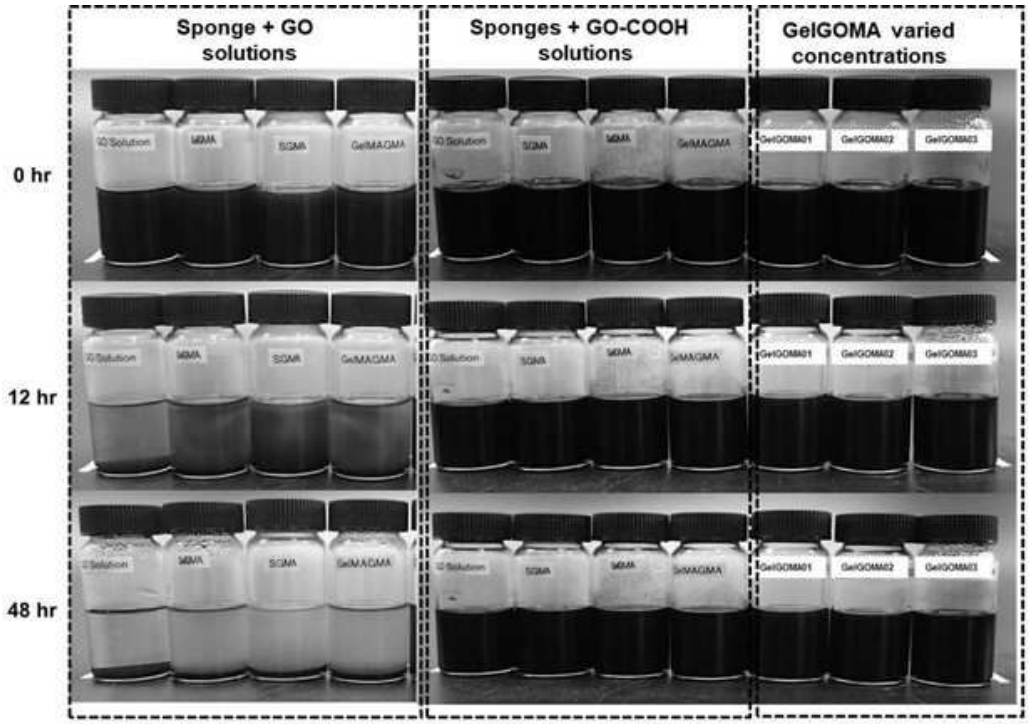
도면2a


GelGMA
C-H
I II
III
1295 cm-1
1513 cm-1
1229 cm-1
1645 cm-1
GelMAGMA
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 04

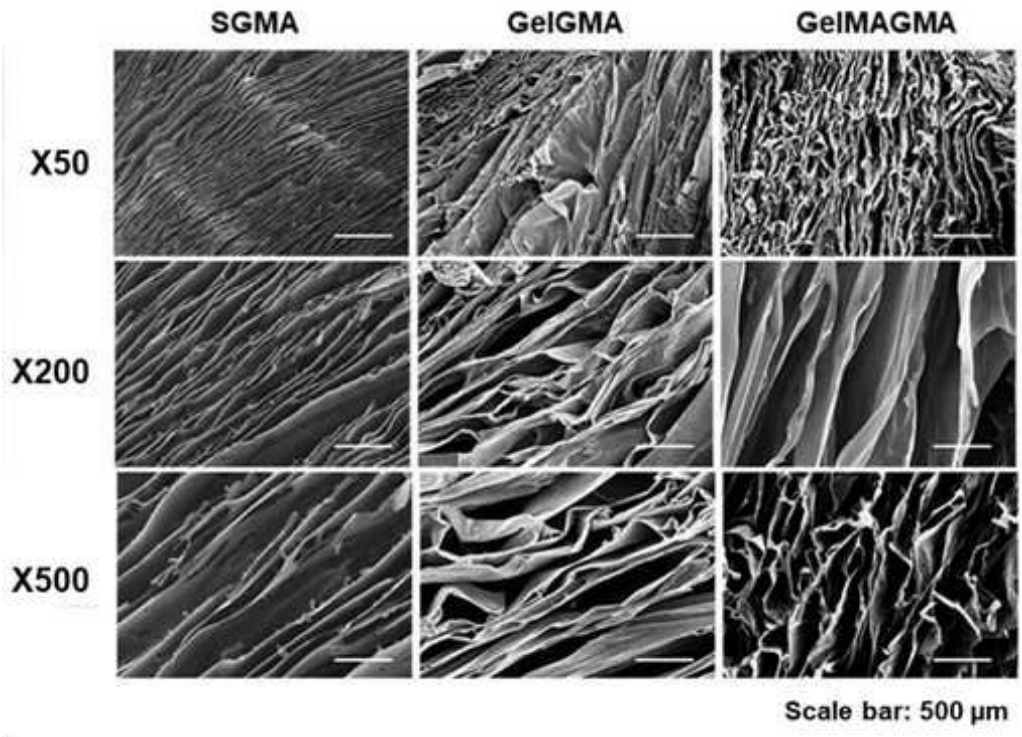
도면2b


Aromatic amino acid
Methacrylate Vinyl group
(6.2/5.8 ppm)
D20
Lysine amino acid
-CH3
(1.8ppm)
Gelatin
GelGMA
GelMAGMA
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03

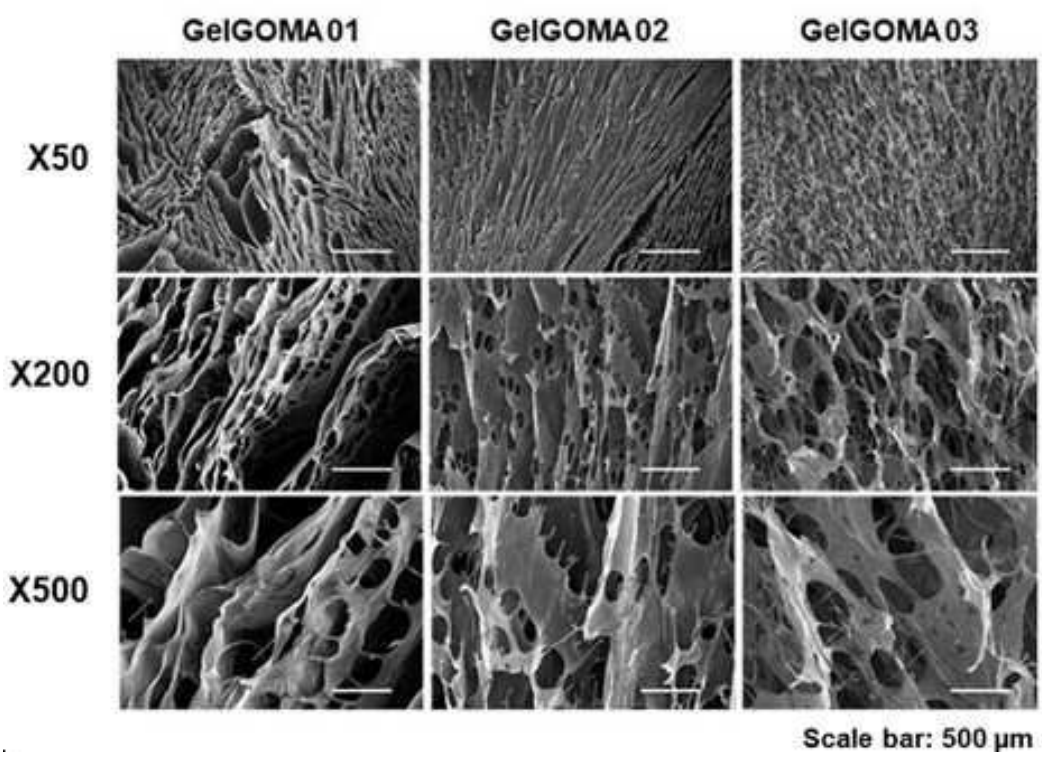
도면3


Sponge + GO solutions
Sponges + GO-COOH solutions
GelGOMA varied concentrations
0 hr
12 hr
48 hr

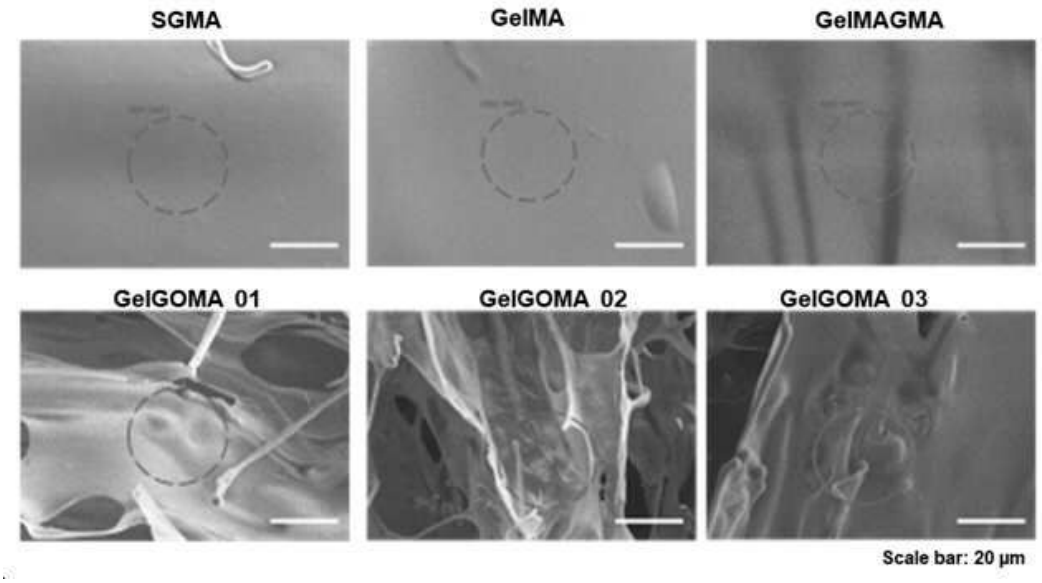
도면4a


SGMA
GelGMA
GelMAGMA
X50
X200
X500
Scale bar: 500 μm

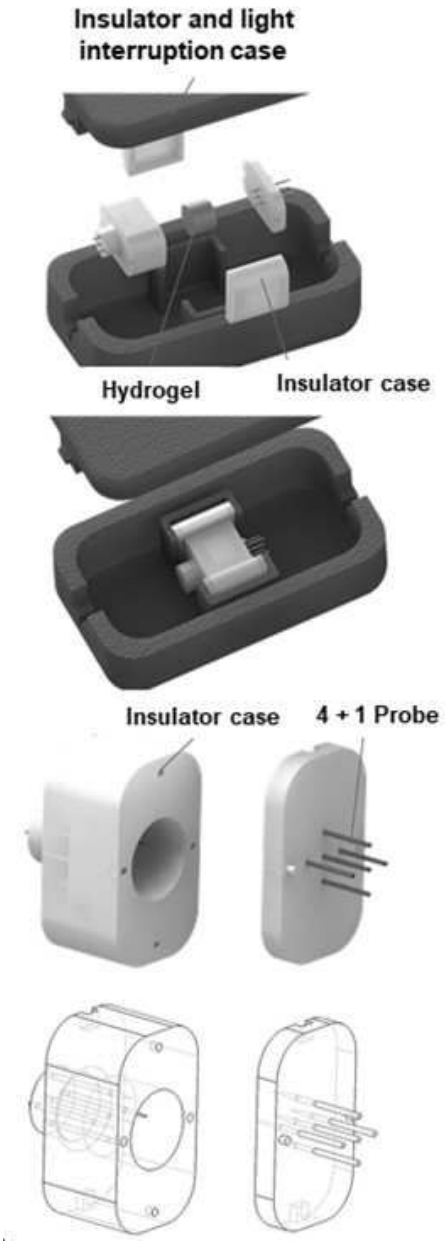
도면4b


GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03
X50
X200
X500
Scale bar: 500 μm

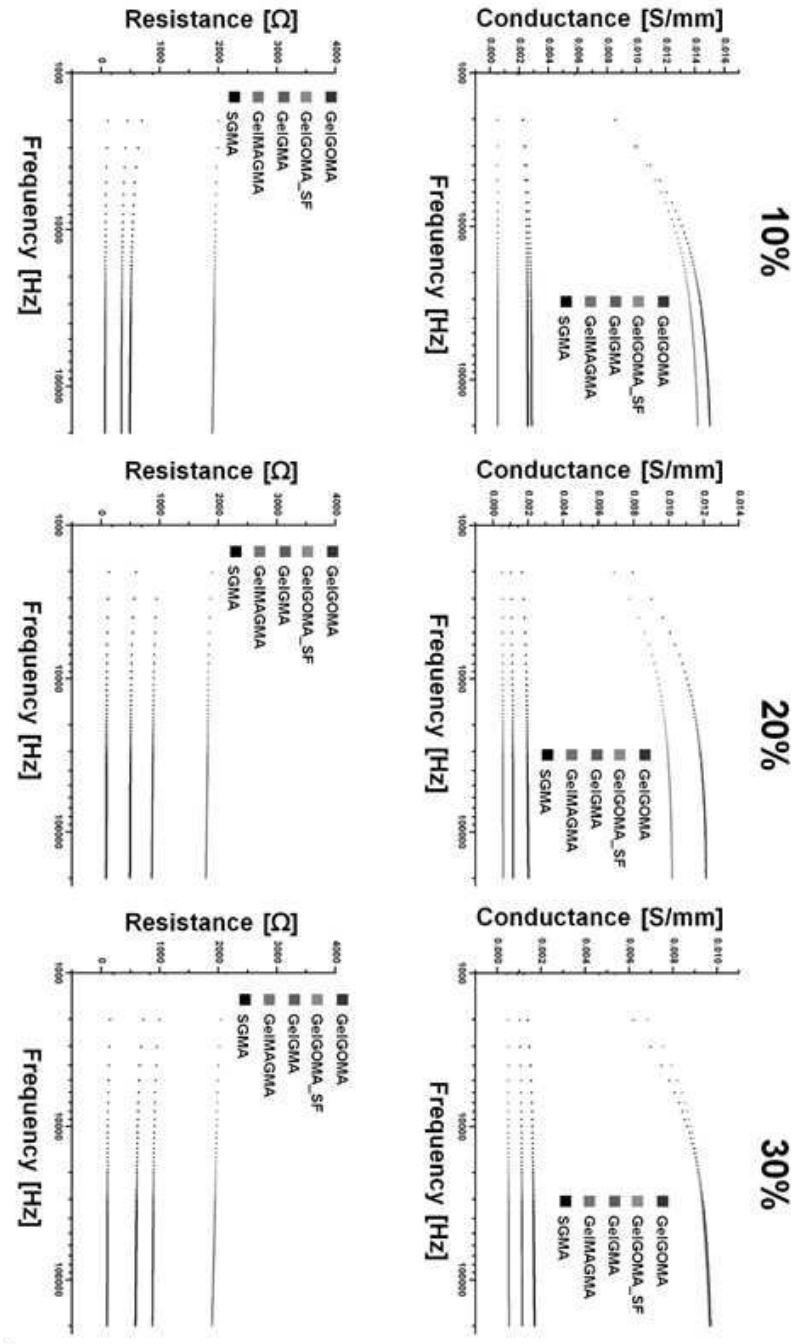
도면5


SGMA
GelMA
GelMAGMA
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03
Scale bar: 20 μm

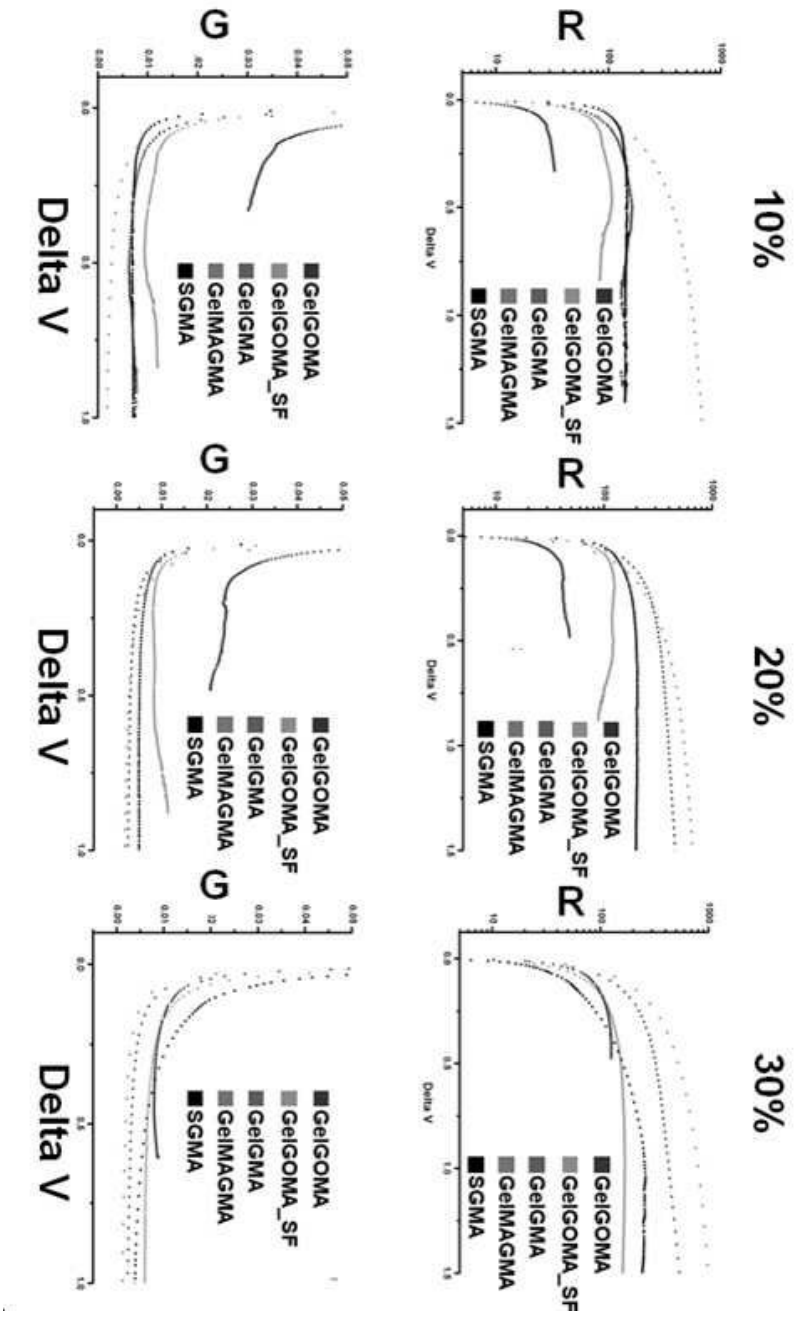
도면6a


Insulator and light interruption case
Hydrogel
Insulator case
Insulator case
4 + 1 Probe

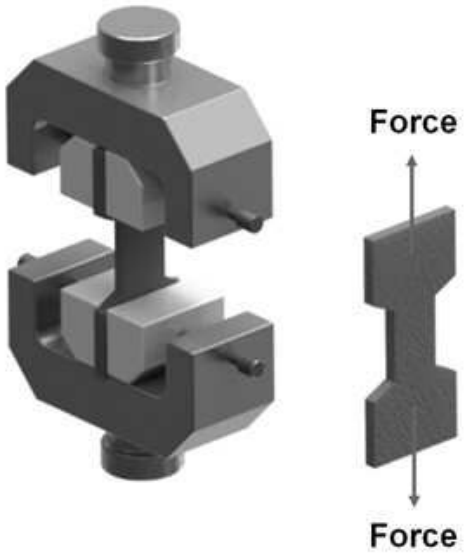
도면6b

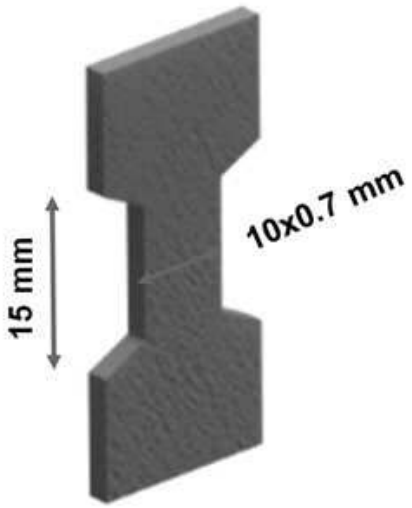

10%
20%
30%
Conductance [S/mm]
Resistance [Ω]
Frequency [Hz]
GelGOMA
GelGOMA_SF
GelGMA
GelMAGMA
SGMA

도면6c

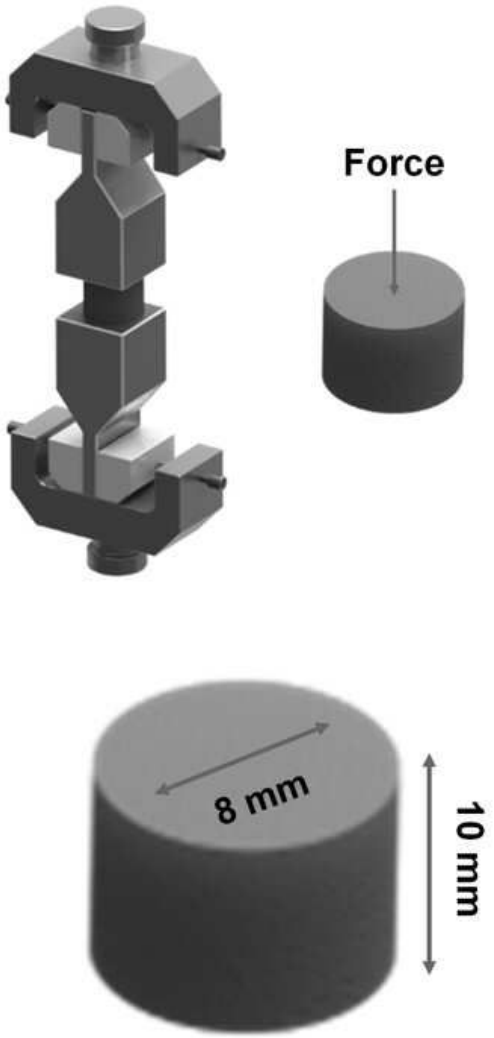


도면7a



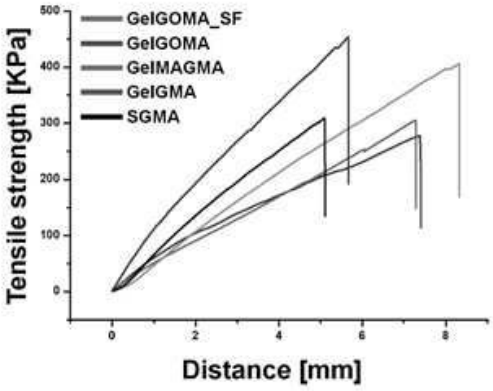


도면7b

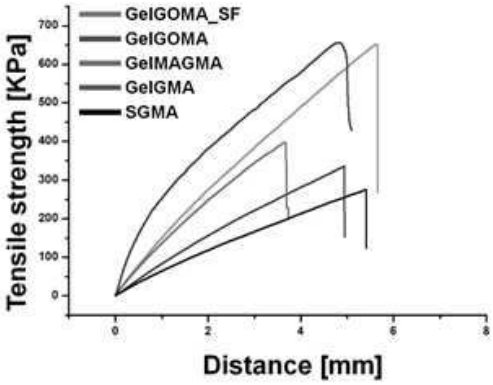


도면7c

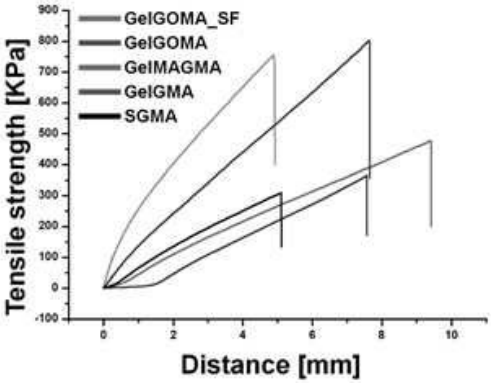
10%


GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Tensile strength [KPa]
Distance [mm]

20%

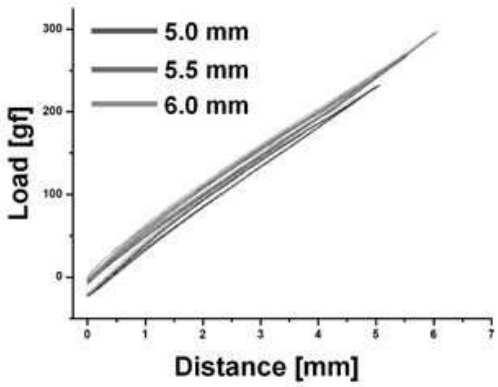

GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Tensile strength [KPa]
Distance [mm]

30%

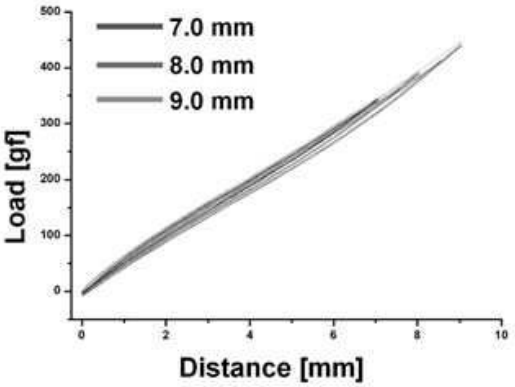

GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Tensile strength [KPa]
Distance [mm]

도면7d

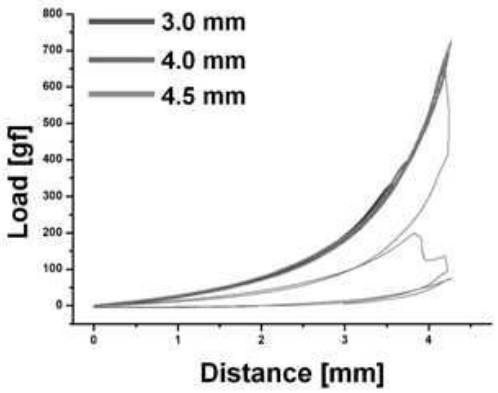
10%


5.0 mm
5.5 mm
6.0 mm
Load [gf]
Distance [mm]

20%

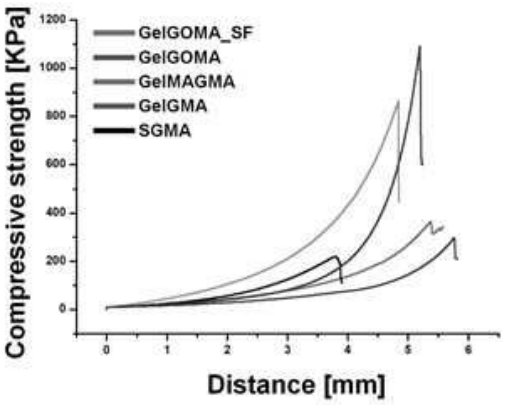

7.0 mm
8.0 mm
9.0 mm
Load [gf]
Distance [mm]

30%

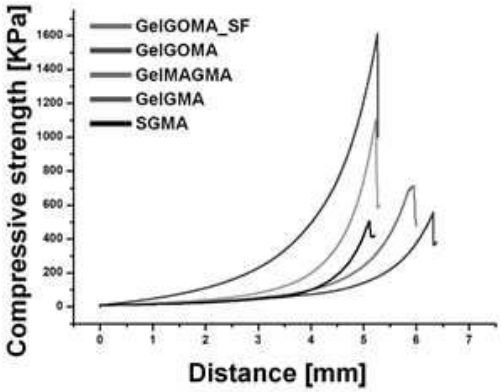

3.0 mm
4.0 mm
4.5 mm
Load [gf]
Distance [mm]

도면7e

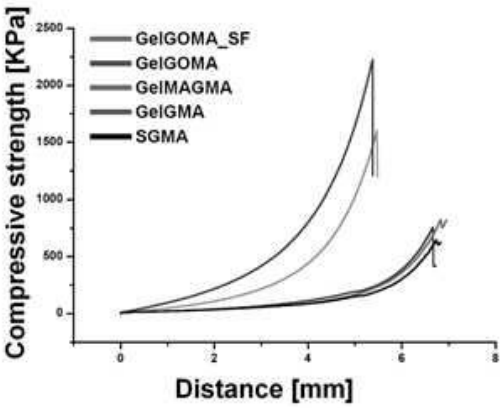
10%


GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Compressive strength [KPa]
Distance [mm]

20%

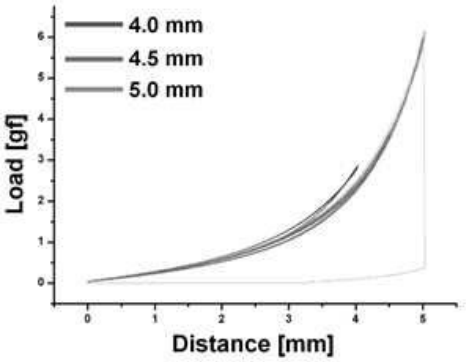

GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Compressive strength [KPa]
Distance [mm]

30%

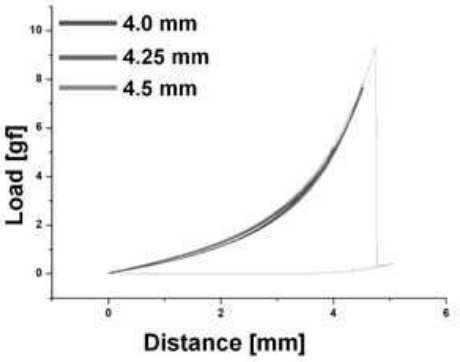

GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Compressive strength [KPa]
Distance [mm]

도면7f

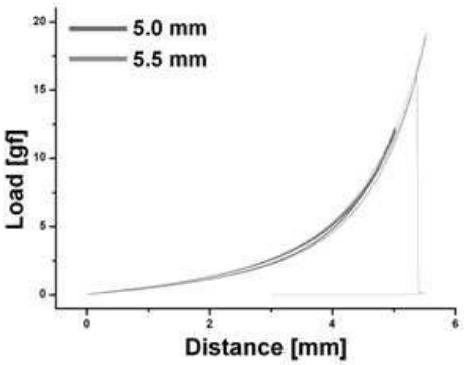
10%


4.0 mm
4.5 mm
5.0 mm
Load [gf]
Distance [mm]

20%

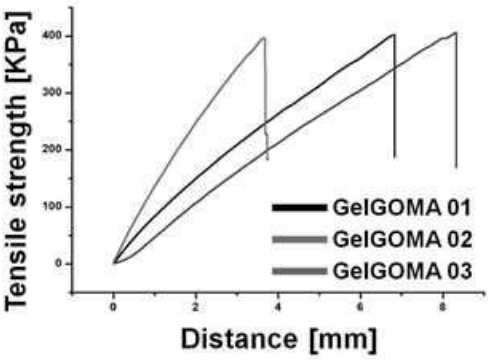

4.0 mm
4.25 mm
4.5 mm
Load [gf]
Distance [mm]

30%

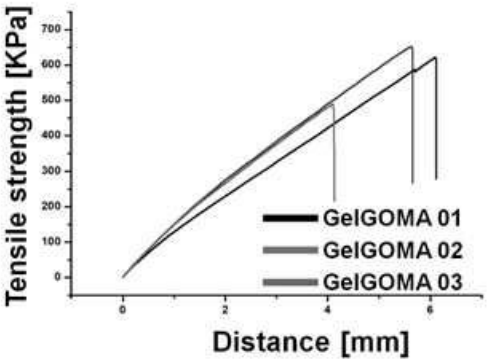

5.0 mm
5.5 mm
Load [gf]
Distance [mm]

도면8a

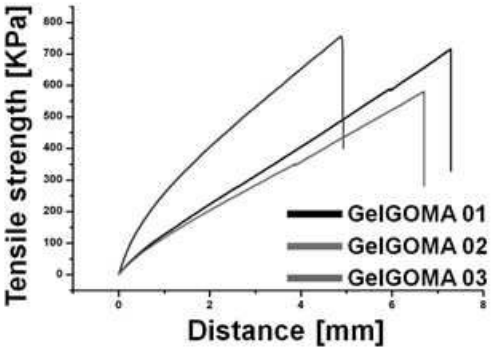
10%


Tensile strength [KPa]
Distance [mm]
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03

20%

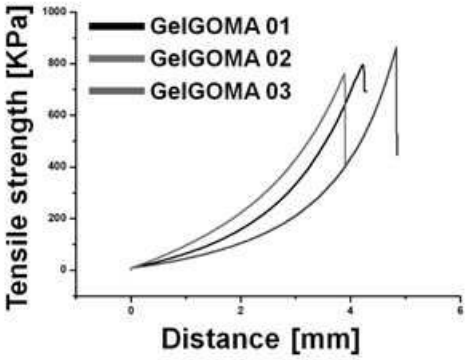

Tensile strength [KPa]
Distance [mm]
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03

30%

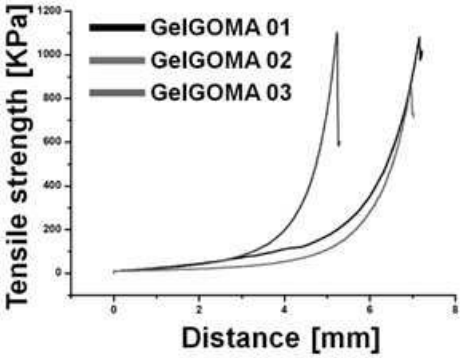

Tensile strength [KPa]
Distance [mm]
GelGOMA 01
GelGOMA 02
GelGOMA 03

도면8b

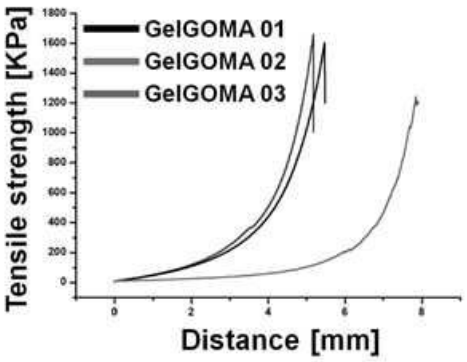
10%



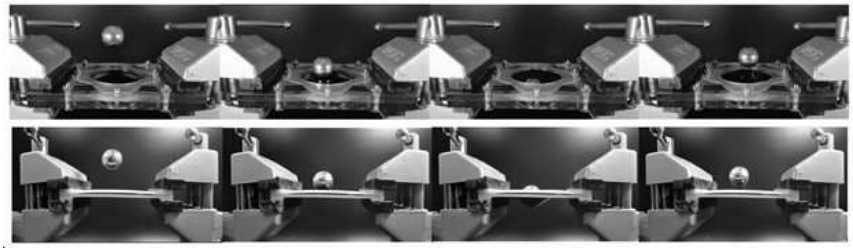
20%



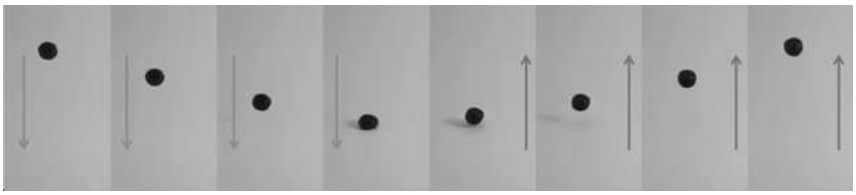
30%



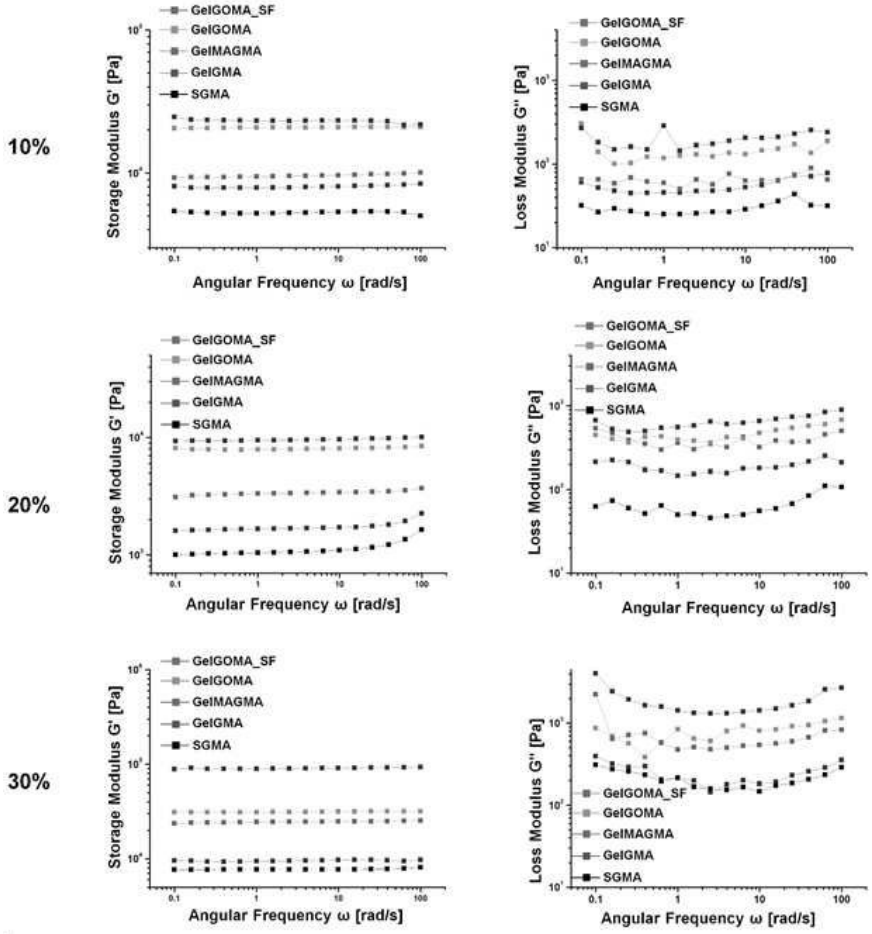
도면9a



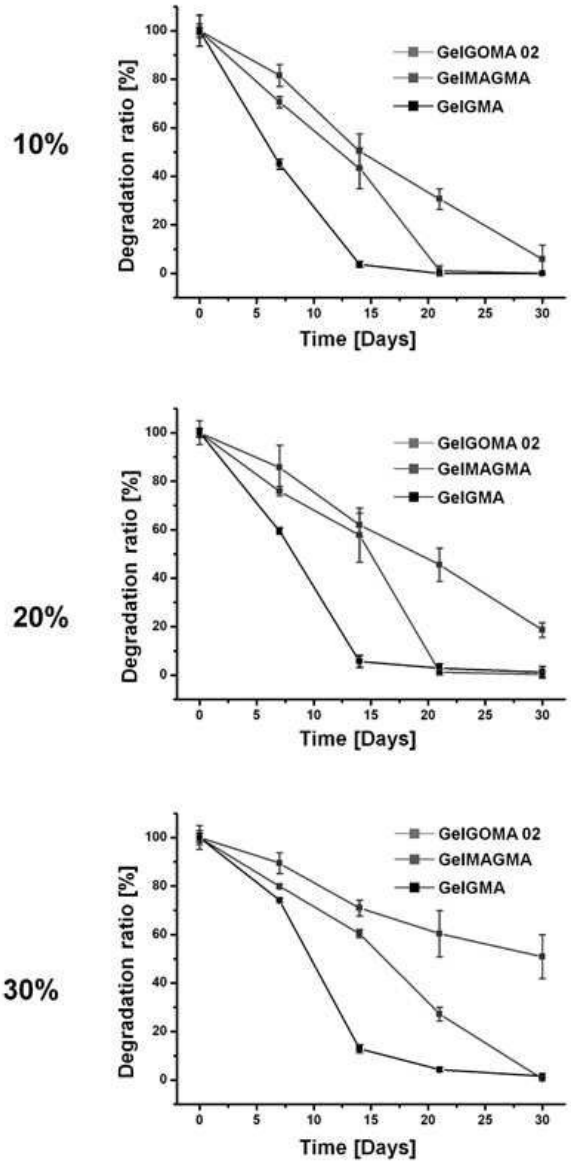
도면9b



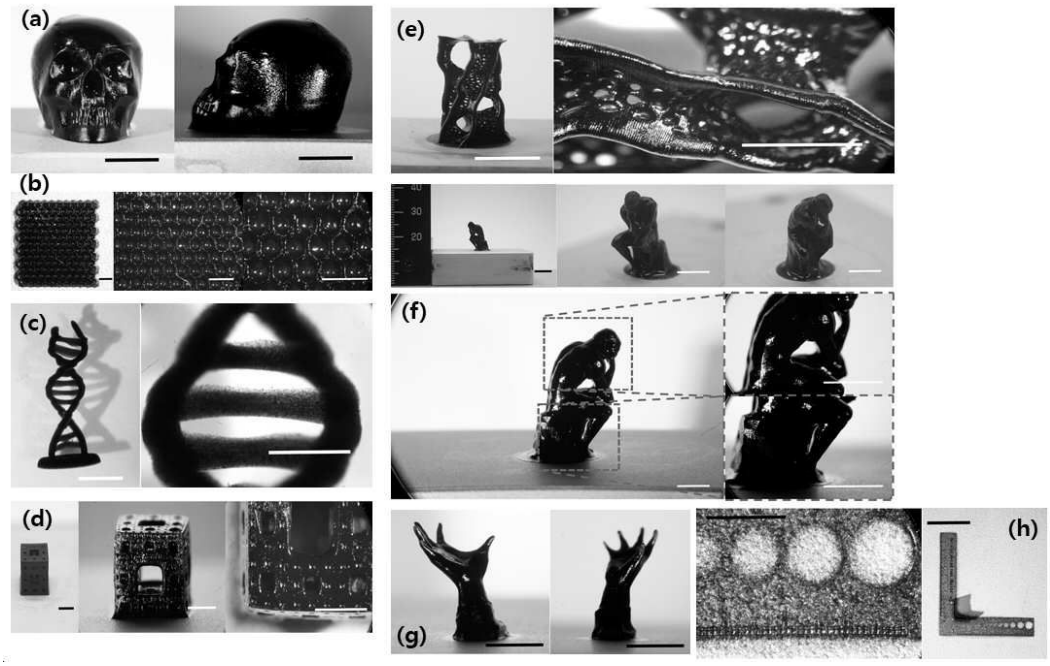
도면10


10%
20%
30%
GelGOMA_SF
GelGOMA
GelMAGMA
GelGMA
SGMA
Storage Modulus G' [Pa]
Loss Modulus G'' [Pa]
Angular Frequency ω [rad/s]

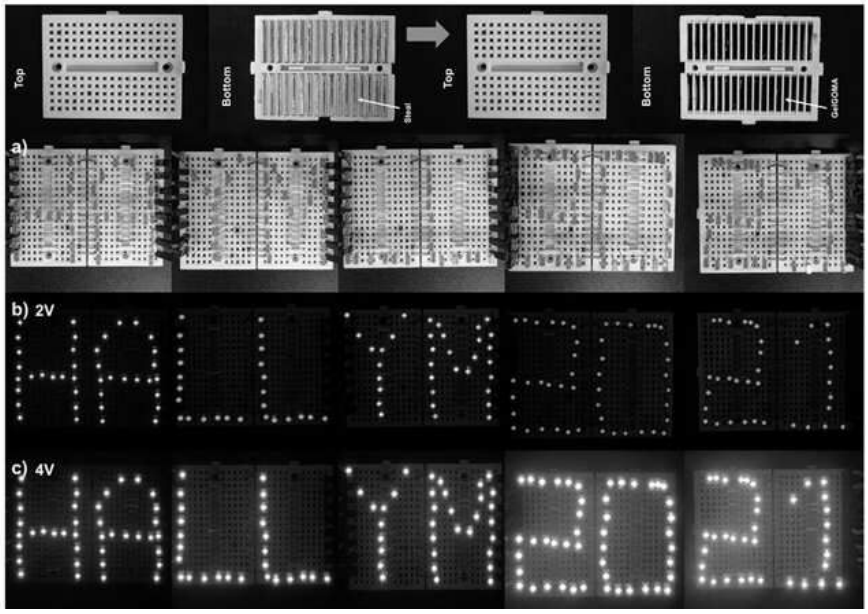
도면11


10%
20%
30%
Degradation ratio [%]
Time [Days]
GelGOMA 02
GelMAGMA
GelGMA
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25
30

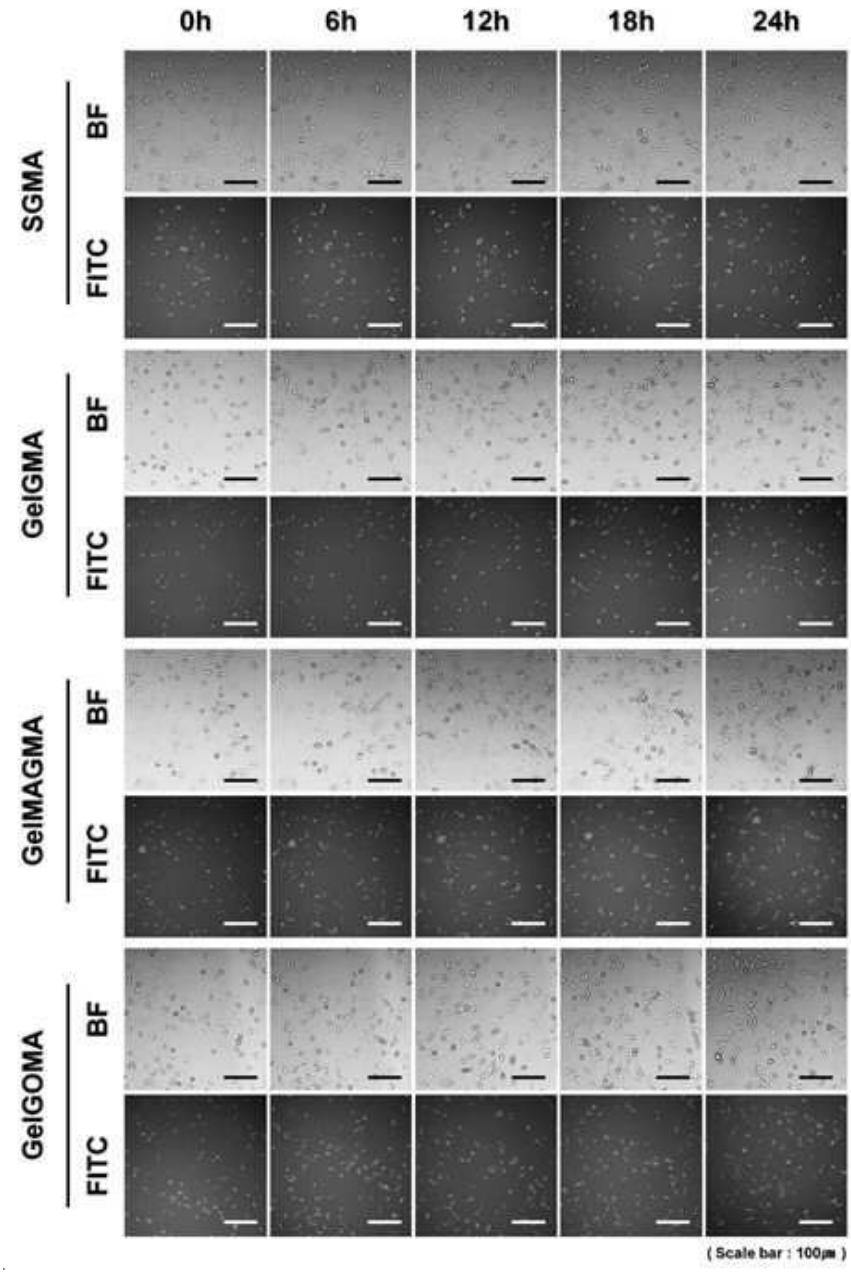
도면12



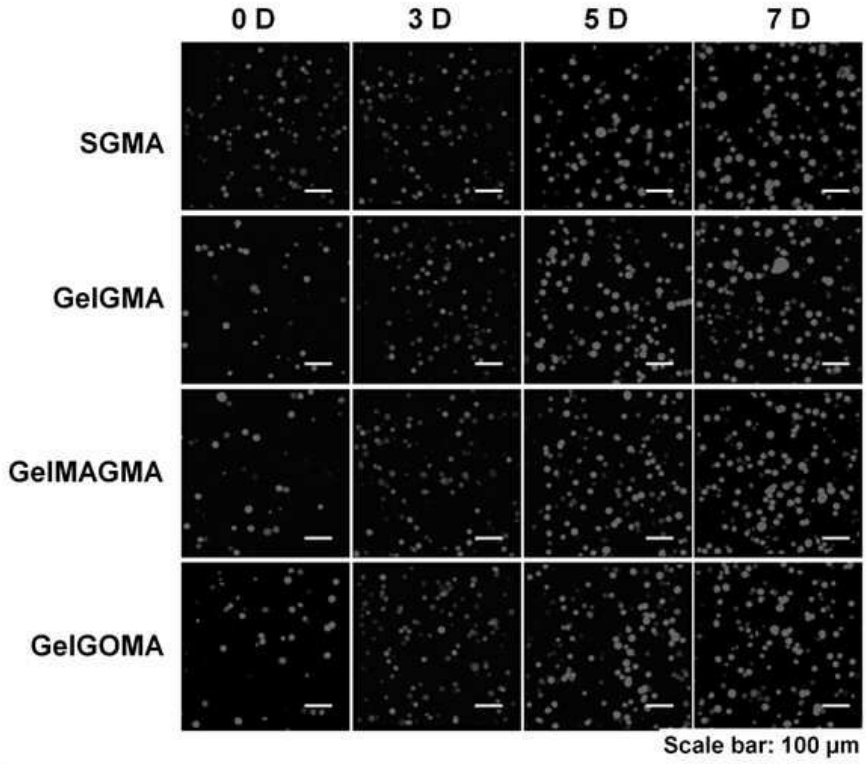
도면13



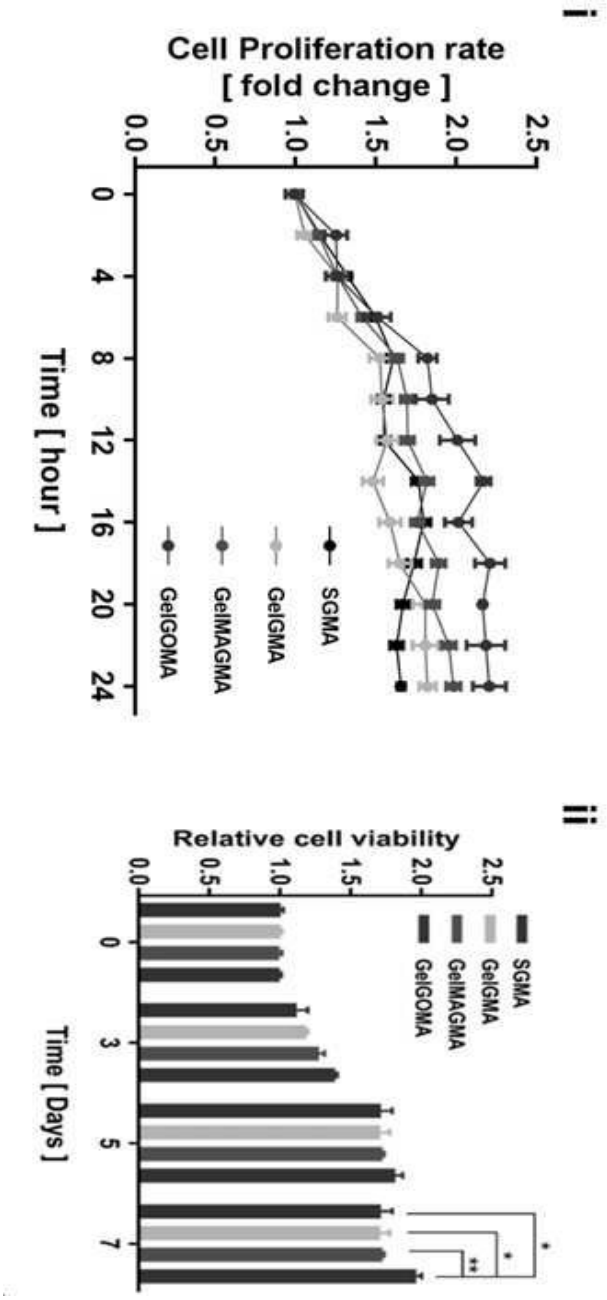
도면14a


0h
6h
12h
18h
24h
SGMA
GelGMA
GelMAGMA
GelGOMA
BF
FITC
(Scale bar : 100㎛)

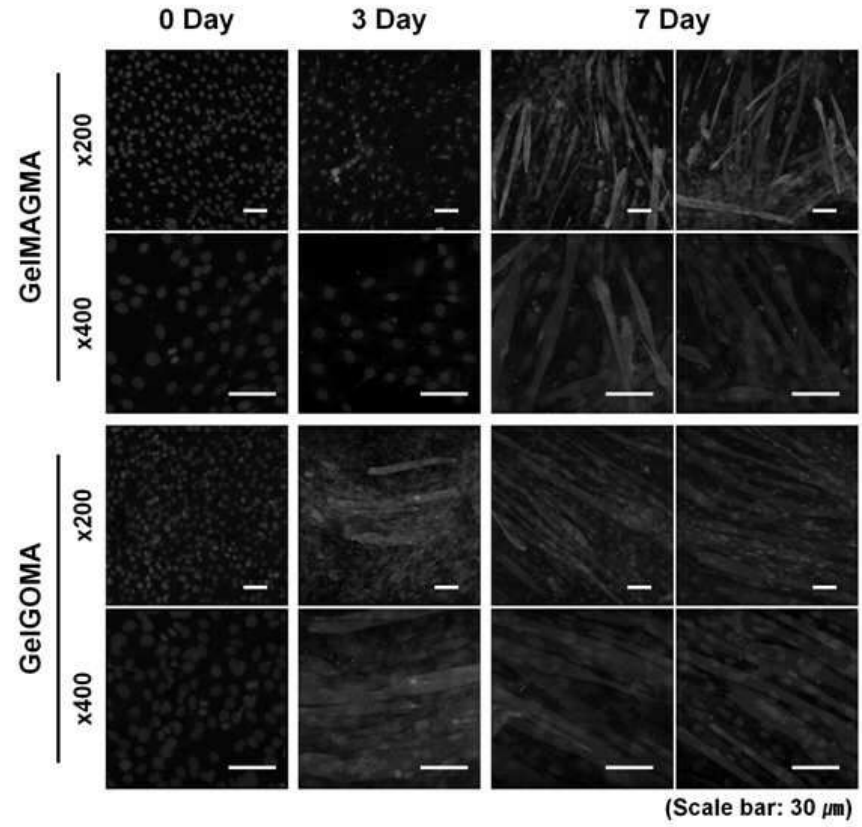
도면14b



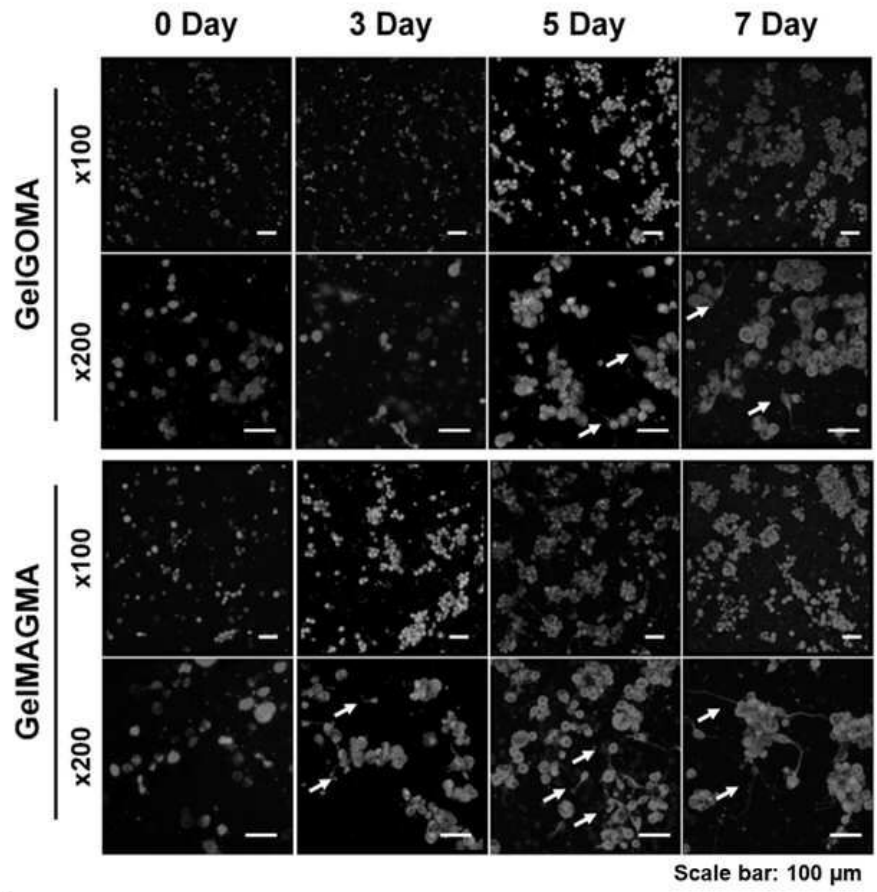
도면14c


i
Cell Proliferation rate
[fold change]
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Time [hour]
0
4
8
12
16
20
24
SGMA
GelGMA
GelMAGMA
GelGOMA
ii
Relative cell viability
Time [Days]
0
3
5
7
SGMA
GelGMA
GelMAGMA
GelGOMA
*
*
**

도면15a


0 Day
3 Day
7 Day
GelMAGMA
x200
x400
GelGOMA
x200
x400
(Scale bar: 30 μm)

도면15b


0 Day
3 Day
5 Day
7 Day
GelGOMA
x100
x200
GelMAGMA
x100
x200
Scale bar: 100 μm

도면15c

